

Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci



SPEKTRÁLNÍ METODY STUDIA CHEMICKÝCH LÁTEK

Učební text k praktickému cvičení Metody studia anorganických látek a pro
studenty chemických přírodovědných oborů

Radka Novotná, Tomáš Šilha, Zdeněk Trávníček

Učební text byl vytvořen v rámci projektu FRVŠ 3051/2011 „Inovace předmětu
Metody studia anorganických látek – Spektrální metody“

Olomouc 2011

Předmluva

Předkládaný text slouží k praktické výuce objasňující základní principy spektrálních metod studia chemických látek (infračervená, Ramanova, elektronová, NMR spektroskopie a hmotnostní spektrometrie) v předmětu *Metody studia anorganických látek* a dále k doplnění předmětů *Fyzikálně-chemické metody studia látek*, *NMR spektroskopie* a *Vybrané kapitoly z anorganické chemie* v rámci chemických studijních programů Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci. Učební text obsahuje základní principy jednotlivých metod a jejich praktický význam. Součástí textu je i dvanáct návodů do praktického cvičení a základy interpretace spekter.

Autoři

OBSAH

1. Spektroskopie	3
2. UV-Vis spektroskopie	5
Praktická práce se spektrofotometrem Perkin-Elmer	15
3. Infračervená spektroskopie	24
Praktická práce s FT IČ spektrometrem ThermoNicolet Nexus 670	38
4. Ramanova spektroskopie	48
Praktická práce s FT Ramanovým spektrometrem NXR 9650	57
5. NMR spektroskopie	62
Praktická práce s 400 MHz NMR spektrometrem Varian	85
6. Hmotnostní spektrometrie	94
Praktická práce s LCQ Fleet ESI-MS spektrometrem	100

Spektroskopie

Spektroskopie je obor, který se zabývá studiem **interakcí látek s elektromagnetickým zářením**. Z množství absorbovaného nebo emitovaného záření lze získat údaje o jednotlivých energetických hladinách, z těchto dat lze následně vyvodit podrobné informace o struktuře molekul nebo krystalů, jimž studovaná spektra přísluší.

V roce 1666 zjistil Isaac Newton při pozorování průchodu světla skleněným hranolem, že délka barevné plochy je daleko větší než její šířka, a na základě dalších pokusů dospěl k závěru, že bílé světlo bylo hranolem rozloženo v to, co označil jako barevné spektrum. Tyto pokusy byly prvopočátkem spektroskopie, rozvíjela se i nadále, ale ve dvacátém století po vyřešení problému s interpretací atomových spekter Nielsem Bohrem našla praktické využití.

Typ záření	Vlnočet (cm ⁻¹)	Frekvence (Hz)	Energie (kJ/mol)	Interakce s hmotou
Záření gama (γ)	10 ⁸ - 10 ¹⁰	3·10 ¹⁸ - 3·10 ²⁰	10 ⁶ - 10 ⁸	Přeskoky jaderných částic mezi energetickými hladinami jádra
Rentgenové záření (RTG)	10 ⁶ - 10 ⁸	3·10 ¹⁶ - 3·10 ¹⁸	10 ⁴ - 10 ⁶	Ionizace
Ultrafialové záření (UV)	10 ⁴ - 10 ⁶	3·10 ¹⁴ - 3·10 ¹⁶	100 - 10 ⁴	Přechody elektronů
Viditelné záření (VIS)	100 - 10 ⁴	3·10 ¹² - 3·10 ¹⁴	1 - 100	Přechody elektronů
Infračervené záření (IR)	1 - 100	3·10 ¹⁰ - 3·10 ¹²	0,01 - 1	Vibrace a rotace molekul
Mikrovlnné záření (MW)	0,01 - 1	3·10 ⁸ - 3·10 ¹⁰	10 ⁻⁴ - 0,01	Rotace molekul
Rádiové záření (LW)	10 ⁻⁴ - 0,01	3·10 ⁶ - 3·10 ⁸	10 ⁻⁶ - 10 ⁻⁴	Přechody jaderného spinu

Tabulka 1. Typy elektromagnetického záření a jejich vlastnosti.

Spektroskopie dělíme podle:

- vlnových délek elektromagnetického záření
 - radio-spektroskopie
 - submilimetrová spektroskopie
 - optická spektroskopie – infračervená spektroskopie
– UV-Vis spektroskopie
 - rentgenová spektroskopie
 - spektroskopie gama záření

2. studovaných látek

- a) atomová spektroskopie
- b) molekulová spektroskopie
- c) spektroskopie krystalů

3. charakteru spektra

- a) emisní spektroskopie
- b) absorpční spektroskopie
- c) Ramanova spektroskopie
- d) fluorescenční spektroskopie
- e) laserová spektroskopie
- f) jaderná spektroskopie

UV-Vis spektroskopie

Ultrafialovo-viditelná spektroskopie je analytickou metodou, kterou řadíme mezi elektromagnetické spektroskopické metody. **Podstatou** je absorpce elektromagnetického záření v intervalu 200–800 nm (UV-Vis oblast) molekulami vzorku. Při absorpci dochází k excitaci valenčních elektronů, které jsou součástí molekulových orbitalů. Proto molekulová absorpční spektra v UV-Vis oblasti jsou svou podstatou elektronová spektra. U molekul je ale nutné brát v úvahu kromě elektronových hladin i vibrační a rotační energetické podhladiny, proto jsou výsledná spektra spojitá, tedy pásová.

Patří mezi nejstarší fyzikálně-chemické metody. Vyniká přesností, rychlostí, citlivostí a experimentální nenáročností. Díky těmto vlastnostem našla široké uplatnění. Pomocí UV-Vis spektroskopie lze identifikovat neznámé látky (v kombinaci s ostatními spektroskopickými metodami) a stanovit koncentraci známých látek. Je využívána v průtočných celách detektorů různých separačních metod (např. v nejpoužívanějších detektorech chromatografie HPLC). Měření je prováděno buď při vhodné vlnové délce, nebo jsou snímána celá spektra v krátkých časových intervalech. Ve forenzní chemii se používala k identifikaci barev a inkoustů. Výhodou je možnost měřit všechna skupenství - plynné látky, roztoky (vodná i nevodná prostředí, široká oblast aplikací), pevné látky (transparentní látky – krystaly, nebo měření difúzně-reflexních spekter).

Ultrafialové (UV) záření, jakožto oblast elektromagnetického záření, se rozděluje na blízké ultrafialové záření (200 - 400 nm) a daleké ultrafialové záření (10–200 nm). Vzniká deexcitací v atomech při přeskoků elektronů z vyšších slupek na nižší ve středních částech elektronového obalu, energie fotonů se pohybuje v rozmezí cca 4–100 eV.

Záření označované jako **UVA** má vlnovou délku od 315 do 400 nm. Asi 99 % UV záření, které dopadne na zemský povrch, je ze spektrální oblasti UVA. **UVB** má vlnovou délku v rozsahu od 280 do 315 nm. Je z převážné většiny absorbováno ozónem ve stratosféře. Záření UVB je zhoubné pro živé organizmy. Jeho energie je schopná rozkládat nebo narušovat bílkoviny nebo jiné životně důležité organické sloučeniny s vážnými následky pro metabolismus postihnutého jedince, nebo vzniku rakoviny. **UVC** je nejtvrďší UV záření – jeho vlnová délka je nižší než 280 nm. Toto záření hraje roli při vzniku ozónu - při dopadu na dvouatomární molekulu kyslíku jí toto záření dodá energii pro vznik ozónu. Na rozdíl od UVB, které dokáže proniknout jen několika vrstvami buněk, je penetrace UVC pletivy a tkáněmi živých organismů poměrně větší. Toto UV záření již začíná být ionizující. **EUV** je

extrémní ultrafialové záření s vlnovými délkami nižšími než 31 nm, které se podílí na některých chemických procesech ionosféry, zejména její nejsvrchnější vrstvy (nejvyšší ionosférické vrstvy, tzv. Appletonovy vrstvy).

Zdrojem UV záření jsou tělesa zahřátá na velmi vysokou teplotu, Slunce (hvězdy), rtuťové výbojky (horské slunce), elektrický oblouk (sváření). Vlastnosti: reaguje s fotografickou deskou, způsobuje zánět spojivek, způsobuje v menších dávkách zhnědnutí kůže a produkci vitamínu D, ve vyšších dávkách rakovinu kůže, působí jako desinfekce, ničí mikroorganismy, jako přirozená ochrana proti UV záření slouží ozónová vrstva (součástí stratosféry), při dopadu na určité látky se mění na viditelné světlo (ochranné prvky bankovek), vyvolává luminiscenci a je pohlcováno obyčejným sklem.

Viditelné světlo (Vis) je elektromagnetické záření o vlnové délce 390–760 nm a frekvenci 10^{14} Hz. A platí vztah:

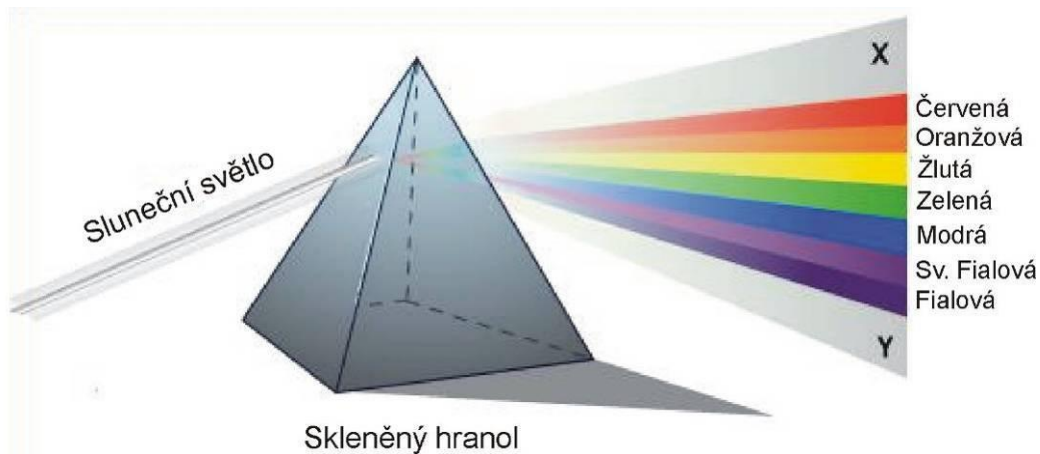
$$c = \lambda \cdot f$$

kde, c je rychlost světla ve vakuu ($2,99792458 \cdot 10^8 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$), f = frekvence (Hz) a λ = vlnová délka (nm). Tento vztah platí v celém spektru elektromagnetického záření. Rozlišujeme tři základní vlastnosti světla: svítivost (amplituda), polarizaci (úhel vlnění) a frekvenci (barvu).

Zdroje světla jsou přirozené (slunce, oheň, hvězdy), umělé (žárovka, zářivka, výbojka, laser), (poly)chromatické (složené ze světla více vlnových délek, např. bílé světlo, které je složené ze sedmi barev), monochromatické (jedna vlnová délka – laser).

Rychlost světla ve vakuu poprvé změřil Hippolyte Fizeau v roce 1849. Fizeau poslal svazek světla na zrcadlo, kterému do cesty vložil točící se ozubené kolo. Při známé rychlosti otáčení kola vypočetl rychlost světla na 313 000 km/s. Dnes je rychlost světla definovaná jako $c = 299\,792\,458 \text{ m/s}$. Nelze ji tedy již nijak zpřesnit. Je tomu tak proto, že jednotka délky metr je dnes definována právě pomocí rychlosti světla.

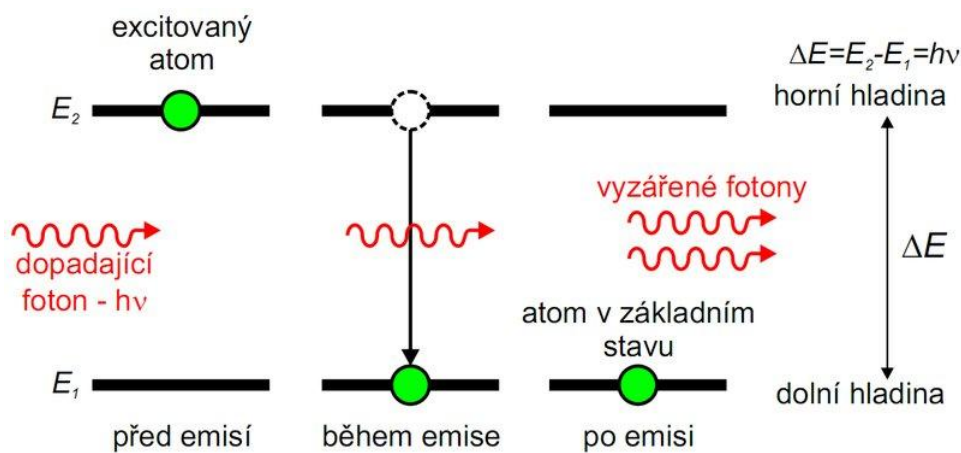
V jiném prostředí se světlo šíří rychlostí v , která je vždy nižší než c . Podíl těchto rychlostí je roven indexu lomu daného prostředí n , tj. $n = c/v$. V důsledku toho dochází na rozhraní látek s různými hodnotami n k lomu světla.



Obr. 1. Disperze světla na skleněném hranolu.

Interakce látky s elektromagnetickým zářením

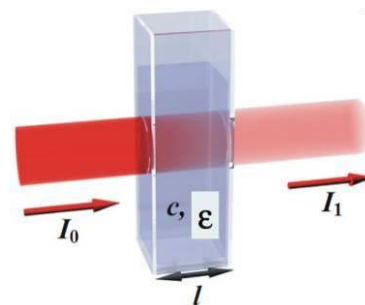
Látky mohou elektromagnetické záření pohltit nebo vyzářit. Mluvíme-li o pohlcení neboli absorpci, tak molekuly přijímají energii. Naopak pokud molekuly vyzářejí energii, mluvíme o emisi. Spektrum obsahující vlnové délky v určitém rozsahu se označuje jako spojité spektrum. Příklad spojitého spektra lze získat rozkladem bílého světla. Rozkladem spojitého spektra získáme souvislý pás spektrálních barev.



Obr. 2. Interakce elektromagnetického záření s látkou.

Aby došlo k absorpci, musí být v látce minimálně dvě hladiny, a to základní energetická hladina a hladina příslušející excitovanému stavu (viz obr. 2). Pravděpodobnosti přechodů mezi jednotlivými hladinami jsou úměrné počtu molekul v příslušných stavech. Další nezbytnou podmínkou, aby došlo k absorpci záření, je nenulová hodnota tranzitního momentu, neboli veličiny, která charakterizuje změnu rozložení elektronů v době excitace molekuly.

Případy, kdy bude hodnota tranzitního stavu nulová, nebo nenulová, jsou vyjádřeny výběrovými pravidly. Povolené jsou pouze přechody jednoelektronové. Zakázány jsou přechody mezi stavy, které se liší multiplicitou κ ($\kappa = 2S + 1$), je to tzv. spinový zákaz. Zakázány jsou také přechody, které se neliší paritou (Laportovo pravidlo). Při pohlcení světelné energie může dojít k její přeměně na kinetickou energii



Obr. 3. Průchod záření květou.

neuspořádaného pohybu částic absorbující látky, tedy na teplo. Pohlcená energie se však může přeměnit zpět ve světelnou energii, což se označuje jako luminiscence.

Transmitanci světelného toku lze vypočítat:

$$T = I/I_0$$

kde T je transmitance, I je intenzita záření, které prošlo vzorkem a I_0 je intenzita záření, které do vzorku vstoupilo. Záporný dekadický logaritmus transmitance vyjadřuje absorbanci $A = -\log T$. Absorbance je aditivní veličinou. Absorbují-li záření dané vlnové délky dvě a více složek, je celková absorbance součtem absorbancí jednotlivých složek. Experimentálně bylo zjištěno, že při průchodu světla o intenzitě I vrstvou látky o tloušťce $d\delta$, dojde k zeslabení této intenzity o hodnotu dI , která je úměrná původní intenzitě světla a síle vrstvy, tzn.

$$dI = -\beta I d\delta$$

integrací tohoto vztahu dostaneme tzv. *Lambertův-Beerův zákon*

$$A = \epsilon \cdot c \cdot l$$

kde ϵ je molární absorpční koeficient [$\text{mol}^{-1} \cdot \text{l} \cdot \text{cm}^{-1}$], c je koncentrace [$\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$] a l je tloušťka měřené vrstvy [cm]

Typy přechodů

Absorpční pásy komplexů v ultrafialové a viditelné oblasti spektra je možno rozdělit do několika skupin podle ϵ (tato veličina je ve vztahu k pravděpodobnosti, že daný přechod nastane). Hodnotu ϵ můžeme chápat jako veličinu, která je mírou pravděpodobnosti přechodu.

1) Absorpční pás má hodnotu $\epsilon \sim 10^2 - 1$

Jedná se o pásy zakázané výběrovými pravidly (spinový zákaz a Laportovo pravidlo).

Pásy lze pozorovat vzácně a jsou umožněny interakcí označovanou spin-orbit.

2) Absorpční pás má hodnotu $\epsilon \sim 10 - 10^2$

Jsou identifikovány jako přechody mezi různými ligandovými stavy centrálního atomu, tj. mezi stavy vzniklými rozštěpením jeho původně degenerované vlivem elektrostatického pole nebo interakce s elektronovými oblaky ligandů. Jedná se o přechody označované jako d-d nebo f-f a jsou tedy zakázány Laportovým pravidlem. Přechody mezi těmito ligandovými stavy jsou povoleny pouze jako kvadropulové přechody nebo přechody se změnou magnetického dipólu. Přechody této skupiny se nazývají obecně intrakonfigurační. U komplexních sloučenin zásadního významu, podávají informace o stereochemii.

3) Absorpční pás má hodnotu $\epsilon \sim 10^3 - 10^5$

Pásky této skupiny jsou velmi výrazné a vykazují většinou značnou závislost na povaze ligandu. Můžeme je rozdělit do třech skupin a to:

- Lokalizované na ligandu*, které je možno analyzovat porovnáním s absorpčními spektry volných ligandů. V organických sloučeninách, které nejčastěji připadají v úvahu jako ligandy, rozdělujeme přechody mezi vazebnými a antivazebnými orbitály $\sigma-\sigma^*$ nebo $\pi-\pi^*$ a přechody mezi nevazebnými a antivazebnými orbitály $n-\sigma^*$ a $n-\pi^*$.
- Rydbergovy přechody* jsou lokalizovány na centrálním atomu v komplexní sloučenině a jsou spojeny se změnou konfigurace (změna hlavního kvantového čísla). Jejich analýza je možná srovnáním se spektry volných iontů.
- Přechody přenosu náboje* (bývají označeny anglickou zkratkou CT = charge transfer) jsou spojeny s přenosem elektronu z ligandu na centrální atom (LMCT = ligand to metal CT) nebo z centrálního atomu na ligand (MLCT). Jsou to obvykle silné absorpční pásky při nižších vlnových délkách, které jsou těžko rozlišitelné od přechodů Rydbergových, zakrývají tedy slabší přechody d-d.

Přechody popsané v bodech *b* a *c* jsou nazývány jako přechody interkonfigurační.

Elektronová konfigurace volného atomu a atomu v poli nekulové symetrie

V jednoelektronovém atomu popisujeme systém pomocí kvantových čísel (n, l, m_l, m_s). K popisu atomu nebo iontu v poli kulové symetrie je potřeba nových kvantových čísel, která charakterizují elektronový systém atomu jako celek. Proto zavádíme elektronový term (Russel-Saundersův vektorový model atomu) a označujeme ho symbolem $^{\kappa}L$, kde $\kappa = 2S + 1$, což je spinová multiplicita (tj. stupeň spinové degradace) a celkové kvantové číslo L určuje orbitální degradaci. Celkový stupeň degradace termu je $d = (2S + 1)(2L + 1)$. Podle

Hundových pravidel je základním stavem (tj. stavem s nejnižší energií) stav, který má při maximální hodnotě spinové multiplicity současně největší hodnotu L , tedy maximální možnou celkovou multiplicitu. Energetické rozdíly mezi základními stavy a stavy excitovanými je možno v konečné podobě vyjádřit pomocí Racahových parametrů (A , B , C). Tyto parametry jsou vždy kladné a spolu s koeficienty (a , b , c) charakterizují vzájemnou integraci elektronů, mezi nimiž platí vztah: $E(L, S) = aA + bB + cC$. Energie silně závisí na hodnotách parametrů A , B , C a na náboji a povaze atomu. Racahovy parametry jsou tabelovány. Stav víceelektronového atomu popisujeme tedy pomocí kvantových čísel L , S , M_L , M_S . To znamená, že kvantová čísla L a M_L popisují symetrii elektronového oblaku jako celku.

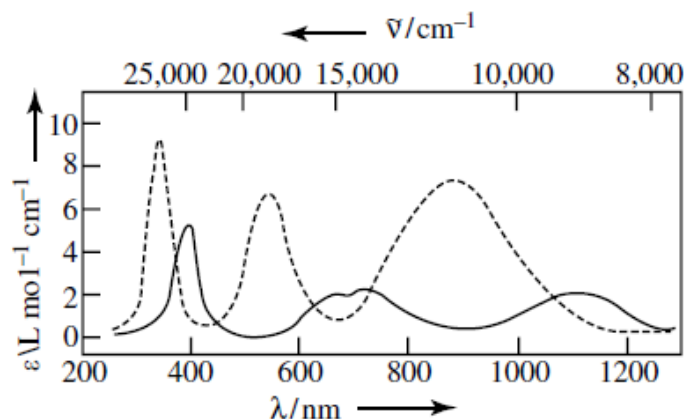
Stav volného iontu		Krystalové stav
L	Symbol termu	$\Sigma_i \Gamma_i$
0	S	A_1
1	P	T_1
2	D	$E + T_2$
3	F	$A_2 + T_1 + T_2$
4	G	$A_1 + E + T_1 + T_2$
5	H	$E + 2T_1 + T_2$

Tabulka 2: Štěpení stavů volného iontu v oktaedrickém a tetraedrickém krystalovém poli.

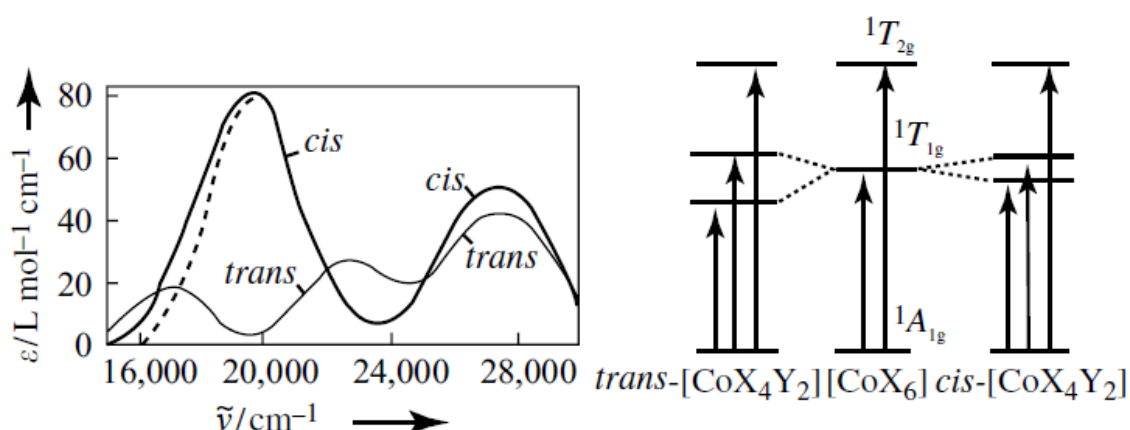
Na atom v poli nekulové symetrie působí vnější pole a proto kvantová čísla L a M_L přestávají být vhodnými kvantovými čísly pro popis takového atomu. K popisu nových krystalových stavů jsou určena nová kvantová čísla, která označujeme Γ , M_Γ . Jako nejvýhodnější se ukázal popis nových krystalových stavů pomocí ireducibilních reprezentací (podle R. S. Mullikena). Podobně, jako lze popsat energie stavů volného atomu pomocí Racahových parametrů, je možno vyjádřit energii krystalového stavu $E(\Gamma^i)$ výrazem: $E(\Gamma^i) = a\Delta + bB + cC$, kde Δ je parametr označovaný jako síla krystalového pole, přičemž základní podmínkou pro hodnocení energetických poměrů centrálního atomu je podmínka konstantního těžiště termu, ze kterého je možno vyjádřit tzv. stabilizační energii krystalového pole (CFSE). Pro komplexy oktaedrické symetrie platí: $E = -[0,4n - 0,6(k - n)]\Delta$ a pro komplexy v tetraedrické symetrii platí: $E = [0,6(k - n) - 0,4n]\Delta$, kde n je počet elektronů v hladině t_2 a k celkový počet elektronů v d ve volném iontu.

Elektronová spektra vybraných komplexních sloučenin

V této části si představíme několik elektronových spekter koordinačních sloučenin s jejich vyhodnocením pomocí Tanabe-Suganových diagramů. Obrázky 4 a 5 ukazují příklady elektronových spekter různých komplexních sloučenin.



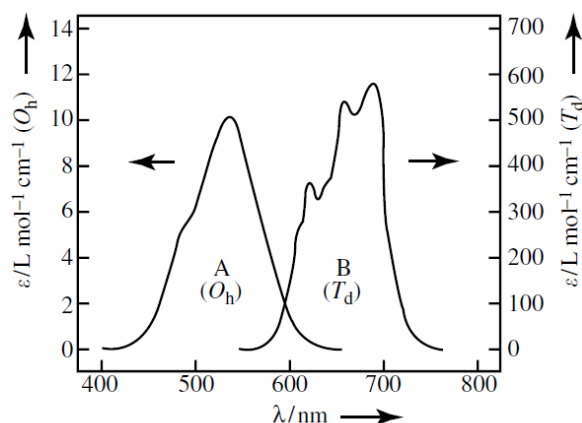
Obr. 4. Elektronová spektra $[\text{Ni}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ (—) a $[\text{Ni}(\text{en})_3]^{2+}$ (---).



Obr. 5. Pomocí elektronových spekter lze určit, jestli se jedná o *cis* nebo *trans* koordinační sloučeninu. Na obrázku vlevo je spektrum komplexu $[\text{Co}(\text{en})_2\text{F}_2]^+$. Schematický diagram vpravo ukazuje energetické přechody.

Elektronová spektra $[\text{Co}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ a $[\text{CoCl}_4]^{2-}$

Spektra těchto d^7 komplexů vidíme na obrázku 6. $[\text{Co}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ – jedná se o oktaedrický komplex kobaltu v oxidačním stupni +II a elektronovou konfigurací valenční sféry d^7 . $[\text{CoCl}_4]^{2-}$ – jedná se o tetraedrický komplex kobaltu v oxidačním stupni +II a elektronovou konfigurací valenční sféry d^7 . K výpočtu používáme T-S diagramů d^3 .



Obr. 6. Elektr. spektra $[\text{Co}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ (křivka A) a $[\text{CoCl}_4]^{2-}$ (křivka B).



a) Určení hodnot Dq a B z Tanabe-Suganových diagramů

$$v_1 = 8100 \text{ cm}^{-1} \dots\dots\dots 4T_{1g} \rightarrow 4T_{2g}$$

$$v_2 = 16000 \text{ cm}^{-1} \dots\dots\dots 4T_{1g} \rightarrow 4A_{2g}$$

$$v_3 = 19400 \text{ cm}^{-1} \dots\dots\dots 4T_{1g} \rightarrow 4T_{1g} (\text{P})$$

$$\underline{B = 825 \text{ cm}^{-1}}$$

$$E_{v_1/B} = 8100/825 = 8,818 \quad \rightarrow \Delta/B = 10,9 \rightarrow \Delta = 8992 \rightarrow Dq = 899,2 \text{ cm}^{-1}$$

$$E_{v_2/B} = 16000/825 = 21,188 \quad \rightarrow \Delta/B = 11,5 \rightarrow \Delta = 9487 \rightarrow Dq = 948,7 \text{ cm}^{-1}$$

$$E_{v_3/B} = 19400/825 = 25,515 \quad \rightarrow \Delta/B = 11,2 \rightarrow \Delta = 9240 \rightarrow Dq = 925,0 \text{ cm}^{-1}$$

$$\underline{Dq = 924,0 \text{ cm}^{-1}}$$

b) Určení hodnot Dq a B z poměrů vlnočtů (diagramů III)

$$v_3/v_1 = 2,39 \quad B_1 = 9400/23,5 = 825 \text{ cm}^{-1}$$

$$v_3/v_2 = 1,21 \quad B_2 = 19400/23,0 = 843 \text{ cm}^{-1}$$

$$v_2/v_1 = 1,97 \quad B_2 = 16000/23,3 = 686 \text{ cm}^{-1}$$

$$B_1 = 825,53 \rightarrow Dq_1 = 825,53 \cdot 1,1 = 908 \text{ cm}^{-1}$$

$$B_2 = 843,47 \rightarrow Dq_1 = 843,47 \cdot 1,0 = 943 \text{ cm}^{-1}$$

$$\text{Průměrná hodnota } \underline{Dq = 875 \text{ cm}^{-1}}$$

$$\text{Průměrná hodnota } \underline{B = 834 \text{ cm}^{-1}}$$

c) Určení hodnot Dq a B ze sekulárních rovnic

$$B = 1/15(v_3 - 2v_1 + 10Dq)$$

$$Dq = 1/20[2v_1 - v_3 + \sqrt{v_3^2 + v_1v_3 - v_1^2}]$$

$$\underline{B = 827 \text{ cm}^{-1}}$$

$$\underline{Dq = 921 \text{ cm}^{-1}}$$



a) Určení hodnot Dq a B z Tanabe-Suganových diagramů

$$v_2 = 4980 \text{ cm}^{-1} \dots\dots\dots 4A_2 \rightarrow 4T_2$$

$$v_3 = 14000 \text{ cm}^{-1} \dots\dots\dots 4A_2 \rightarrow 4T_1 (\text{P})$$

$$\underline{B = 691 \text{ cm}^{-1}}$$

$$E_{v_1/B} = 4980/691 = 8,818 \quad \rightarrow \Delta/B = 10,9 \rightarrow \Delta = 8992 \rightarrow Dq = \underline{345,2 \text{ cm}^{-1}}$$

b) Určení hodnot Dq a B z poměrů vlnočtů

$$\nu_3 / \nu_2 = 2,81 \quad (\text{Diagram I}) \quad Dq/B = 0,40$$

$$(\text{Diagram III}) \quad E\nu_3 / B = 20,2 \quad \underline{B = 693 \text{ cm}^{-1}}$$

$$Dq = 693 \cdot 0,40 = \underline{277 \text{ cm}^{-1}}$$

c) Určení hodnot Dq a B ze sekulárních rovnic

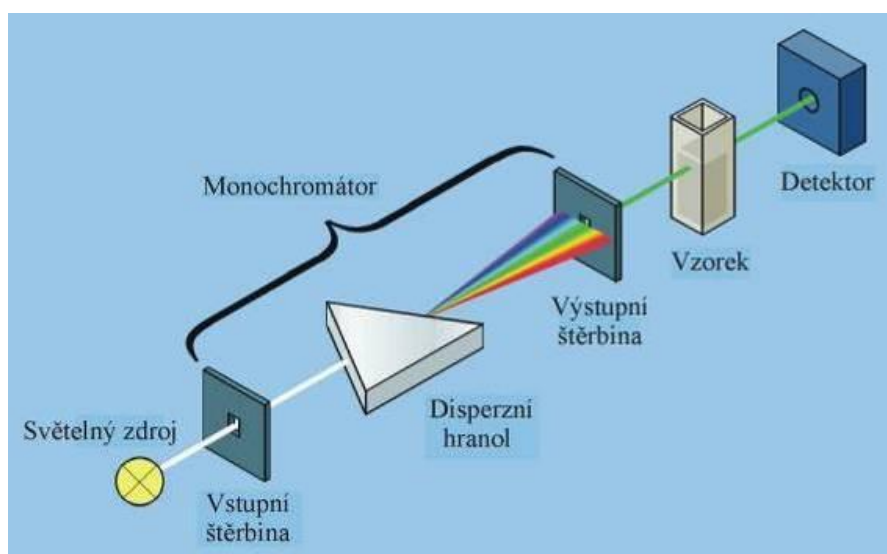
$$\nu_2 + \nu_3 = 30Dq + 15B$$

$$\nu_3 - \nu_2 = \sqrt{(15B - 6Dq)^2 + 64Dq^2}$$

$$\underline{B = 695 \text{ cm}^{-1}}$$

$$\underline{Dq = 280 \text{ cm}^{-1}}$$

UV-Vis spektra se měří na **spektrometrech** (spektrofotometrech). Spektrometry se konstruují jako jednopaprskové nebo dvouprskové. Části jednopaprskového spektrometru jsou znázorněny na obrázku 7. Základními částmi jsou zdroj světla, monochromátor, měřící prostor a detektor. Jako zdroj se často používá wolframové vlákno (300–2500 nm) a pro UV oblasti jsou to nejčastěji deuteriové výbojky (190–400 nm). Polychromatické záření prochází přes monochromátor (např. optická mřížka a výstupní štěrba). Monochromatické záření pak prochází vzorkem. Roztoky vzorků o přesné koncentraci se plní do standardních kyvet s optickou dráhou 1 cm. Jako detektory se často používají fotonásobiče, fotodiody nebo CCD detektory (charge-coupled device).



Obr. 7. Znáznornění optické dráhy jednopaprskového UV-Vis spektrometru.

Abychom v jednopaprskovém spektrometru získali spektrum samotného vzorku (nikoliv roztoku vzorku v rozpouštědle), musí se nejprve změřit slepý referenční vzorek (samotné

rozpouštědlo) a pak se do stejné optické dráhy umístí kyveta s roztokem vzorku. Naopak u dvoupaprskových spektrometrů je před vzorkovací prostor umístěn dělič paprsku, který monochromatické záření rozdělí na dva paprsky, které pak procházejí dvěma paralelními kyvetovými prostory, a tak umožňuje měřit slepý i měřený vzorek současně ve dvou optických drahách. Zobrazené spektrum je pak poměrem dvou naměřených intenzit prošlého záření, přičemž intenzita záření prošlá referenčním vzorkem je dána jako 100%.

Spektrometry mohou být také konfigurovány k měření spekter pevných vzorků (difúzně-reflexní spektra), tedy k měření intenzity odražené od vzorku a srovnané s intenzitou odraženého záření od vzorku referenčního (jako např. bílý filtrační papír napuštěný nujolem, na který se pak nanáší nujolová suspenze se vzorkem).

Praktická práce se spektrofotometrem Perkin-Elmer Lambda 35 a 40



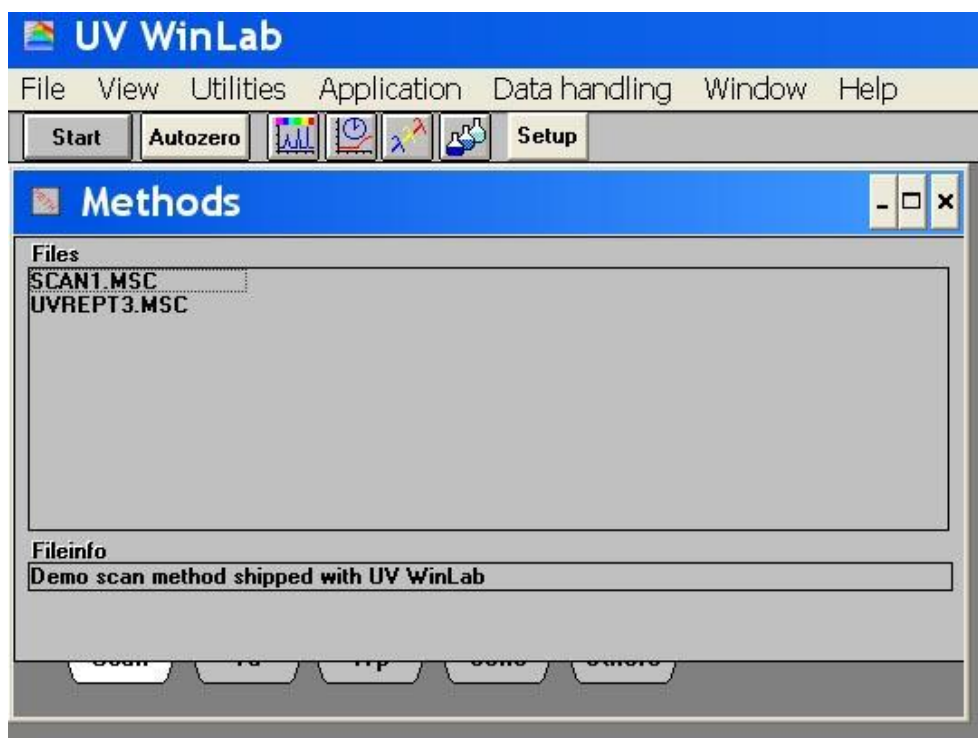
Obr. 8. UV-Vis spektrometr Perkin-Elmer Lambda 35 určený k měření roztokových spekter v oblasti 11000-40000 cm^{-1} , popřípadě difúzně-reflexních spekter vzorků v pevné fázi.

Popis přístroje a programu pro měření v UV-Vis oblasti

Pracujeme na spektrofotometrech Perkin-Elmer modely Lambda 35 a Lambda 40 vybavených reflexní koulí pro měření difúzně-reflexních spekter pevných vzorků. Z tohoto důvodu jsou přístroje konfigurovány jako jednopaprskové. V praxi to znamená, že před každým měřením, případně sérií měření se stejným srovnávacím vzorkem, musíme nejprve srovnávací vzorek změřit (baseline). Přístroje jsou nastavovány softwarově programem UV WinLab v. 2.85.04 od fy. Perkin- Elmer.

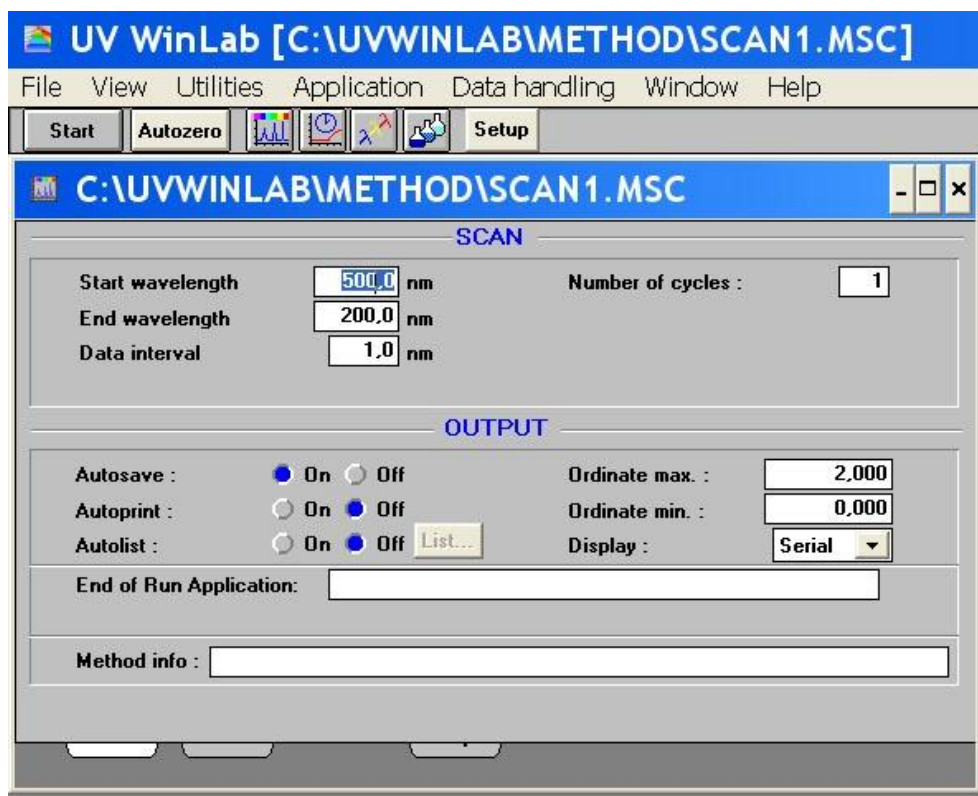
Základní postup měření:

1. zapneme spektrofotometr a ovládací počítač, spustíme program *uv winlab* a vyčkáme na oznámení *instrument ready*. Zvolíme měřicí metodu. (pokud není uložena požadovaná metoda, otevřeme *scan1* a tu modifikujeme).



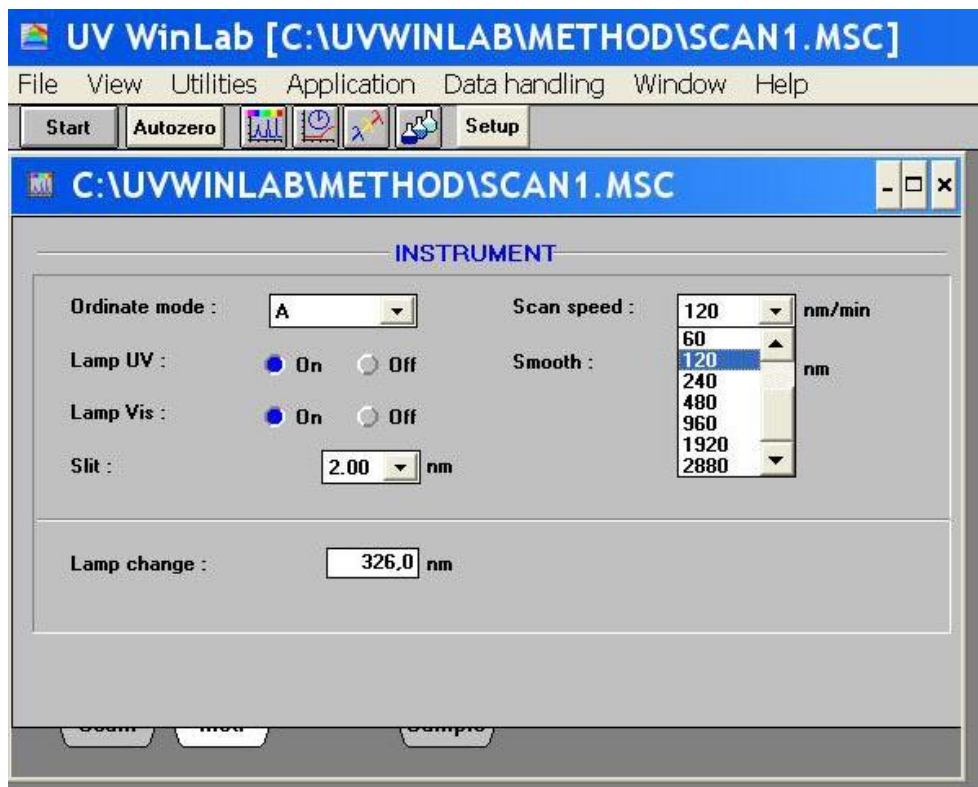
Obr. 9. Zvolení měřicí metody.

2. Modifikace metody - základní nastavení spektrofotometru.



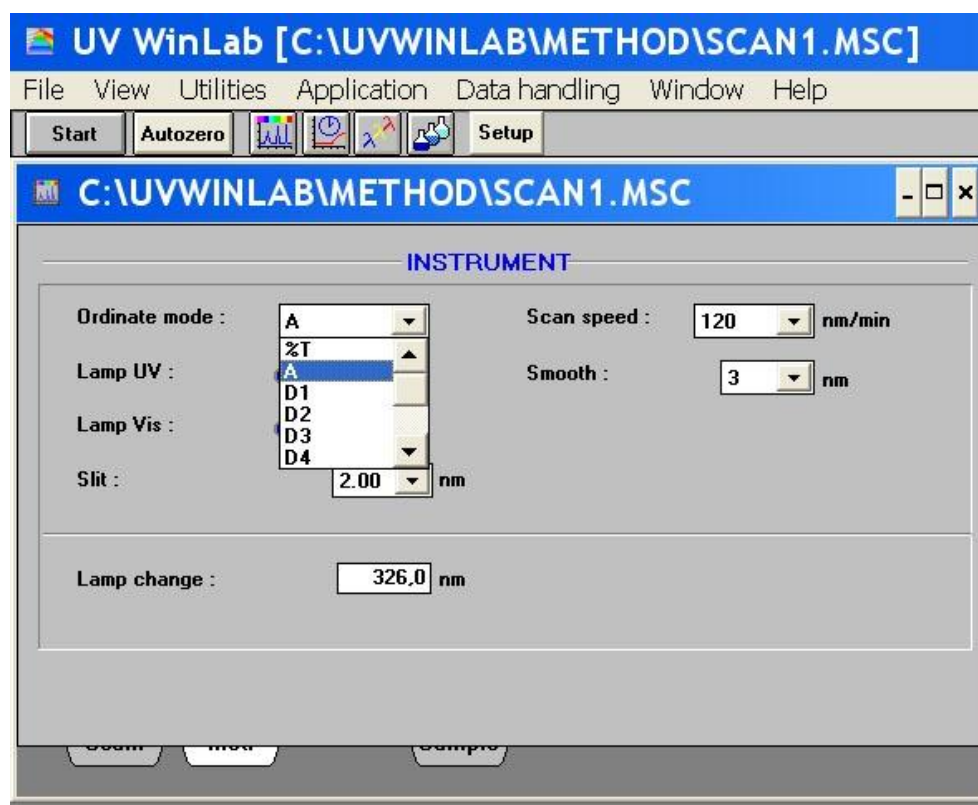
Obr. 10. Základní nastavení měření.

V tomto okně nastavíme rozsah vlnových délek měření *start* a *end wavelength* nastavení rozsahu absorbance resp. transmittance (*ordinate*) a nastavení počtu cyklů (standardně 1).



Obr. 11. Nastavení parametrů (rychlost skenování).

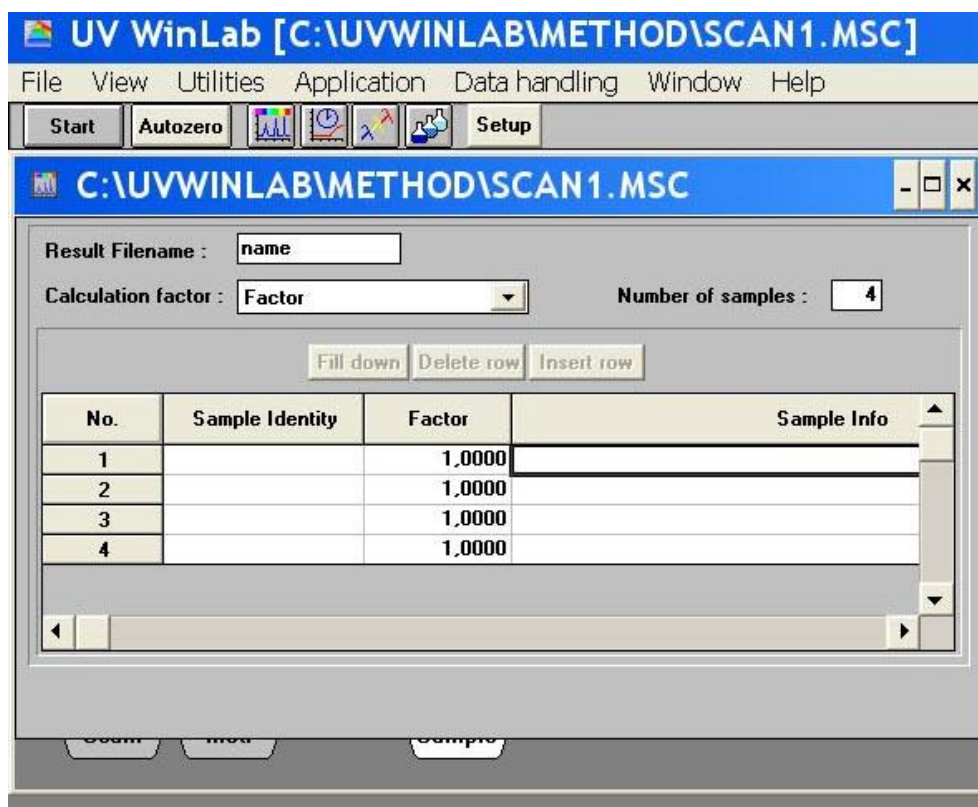
Nastavení rychlosti skenování (*speed scan*) (čím menší rychlost, tím kvalitnější záznam a tím delší doba měření). Standardně bývá nastaveno 240 nm/min a nastavení měřicího módu (*ordinate mode*) absorbance resp. transmittance.



Obr. 12. Nastavení parametrů měřicího módu.

Štěrbina (nastavuje rozlišení), *Slit* standardně 2 nm. Vyhlazení *Smooth* – příliš vysoké hodnoty vedou ke ztrátě informace, standardně 3. Modifikovanou metodu můžeme uložit pod změněným názvem pro případné další použití.

3. Popis vzorku a počet vzorků.



Obr. 13. Popis měřených vzorků v programu UV WinLab.

Zde zvolíme název ukládaného souboru, maximálně 8 znaků bez oddělovačů (**Result filename**). Každé měření se ukládá jako soubor se jménem a v okénku **Sample info** je možno zapsat informace o vzorku.

4. Před měřením připravíme vzorky. Roztoky měříme zpravidla v křemenných kyvetách (UV-oblast). Jako srovnávací vzorek použijeme příslušné čisté rozpouštědlo. Pevné vzorky nanese jako nujolovou suspenzi na speciální filtrační papír a jako srovnávací vzorek použijeme filtrační papír napuštěný nujolem. Vlastní měření zahájíme stiskem tlačítka **start**, během měření sledujeme grafický záznam.

5. Po skončení měření se automaticky uloží binární soubor s příponou *.sp. Pokud chceme výsledek uložit jako textový soubor (dva sloupce čísel), např. pro načtení do programu Origin, je třeba při ukládání zvolit - uložit jako ASCII s příponou *.txt. Výsledek je také možno editovat přímo v programu **UV WinLab**.

6. Po skončení měření vypneme spektrofotometr, vyčistíme kyvety, které nakonec vymyjeme etanolem. Uvedeme pracoviště do výchozího stavu.

Příprava nujolové suspenze pro měření difúzně-reflexních spekter:

Měříme spektrum suspenze pevné látky v parafinovém oleji (nujolu). Nujol vyplňuje prostor mezi částicemi pevné látky, takže záření, které prochází různými částmi vzorku, nenaráží na oblasti s velmi rozdílným indexem lomu (jako kdyby byl mezi částicemi např. vzduch).

Suspenzi připravíme důkladným roztíráním studovaného vzorku (stačí 10-20 mg, podle potřeby lze samozřejmě více) s nujolem v achátové misce nebo mezi dvěma rovnými skleněnými povrchy vybroušenými do posledního stádia před leštěním (např. Petriho misky). Nujol přidáváme postupně, až získáme hustou suspenzi o konzistenci „zubní pasty“. Nujolovou suspenzi pak nanese na speciální filtrační papír.

Praktické úkoly:

A. Roztoková spektra komplexních sloučenin

Úkol: Změřte roztoková spektra komplexů $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ a $\text{K}_2[\text{Co}(\text{SCN})_4]$. Porovnejte jejich absorpční pásy, určete hodnoty Dq a B z Tanabe-Suganových diagramů a určete symetrii komplexů a elektronovou konfiguraci valenční sféry.

Pomůcky a chemikálie: kyveta, 25ml odměrná baňka, špachtle, analytické váhy, ultrazvuková lázeň, miktropipeta, UV-Vis spektrometr Perkin-Elmer Lambda 40 methanol pro UV spektroskopii, chlorid hexaamminkobaltitý, tetrathiokyanatokobaltnatan draselný.

Postup: Po naladění přístroje podle instrukcí rozpustíme vzorek v methanolu (pomocí ultrazvukové lázně), tak aby výsledný roztok měl koncentraci 10^{-4} mol/dm^3 , změříme slepý vzorek (methanol) a poté spektra komplexů a zpracujeme je. Z práce vypracujeme protokol, do něhož provedeme navíc identifikaci základních absorpčních pásů jednotlivých komplexních sloučenin podle zadání.

B. Difúzně-reflexní spektra komplexních sloučenin

Úkol: Změřte difúzně-reflexní spektra komplexů $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ a $\text{Hg}[\text{Co}(\text{SCN})_4]$. Porovnejte jejich absorpční pásy, určete hodnoty Dq a B z Tanabe-Suganových diagramů a určete symetrii komplexů a elektronovou konfiguraci valenční sféry.

Pomůcky a chemikálie: kyveta, filtrační papír, achátová miska s tloučkem, špachtle, UV-Vis spektrometr Perkin-Elmer Lambda 40

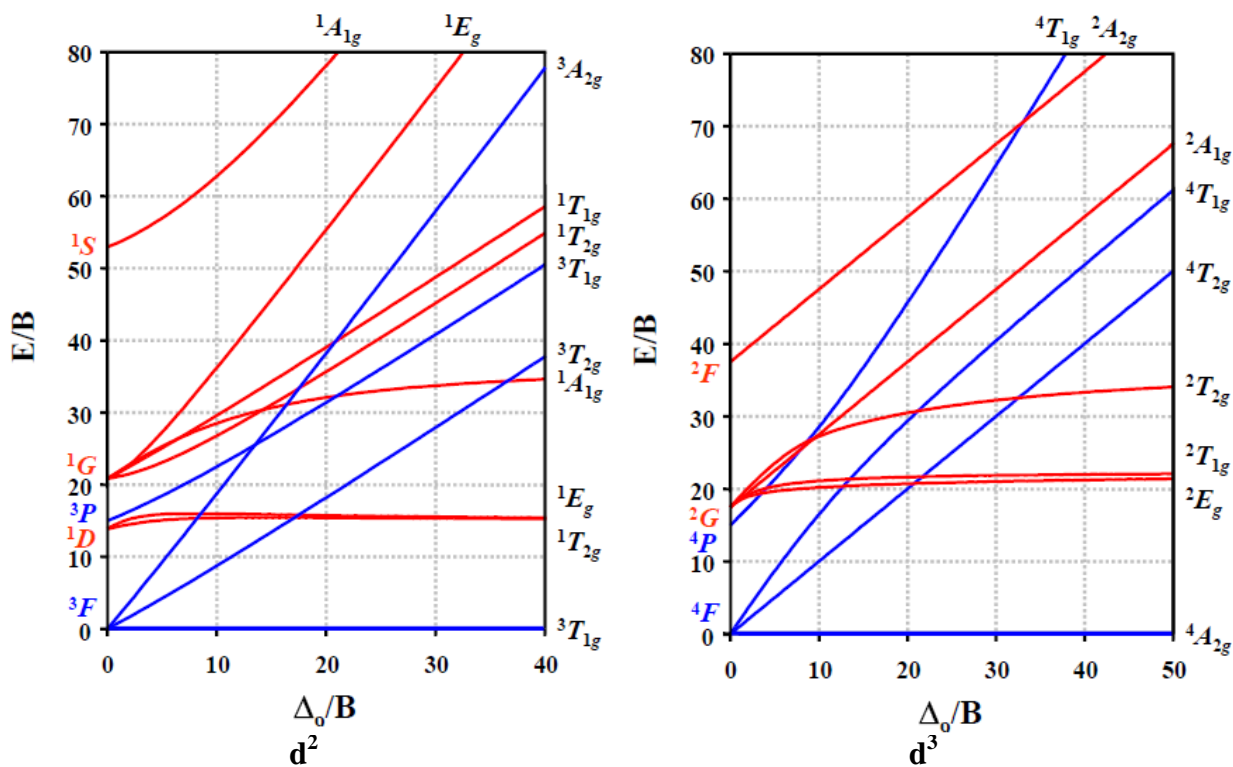
nujol, pentahydrát síranu měďnatého, tetrathiokyanatokobaltnatan rtuťnatý.

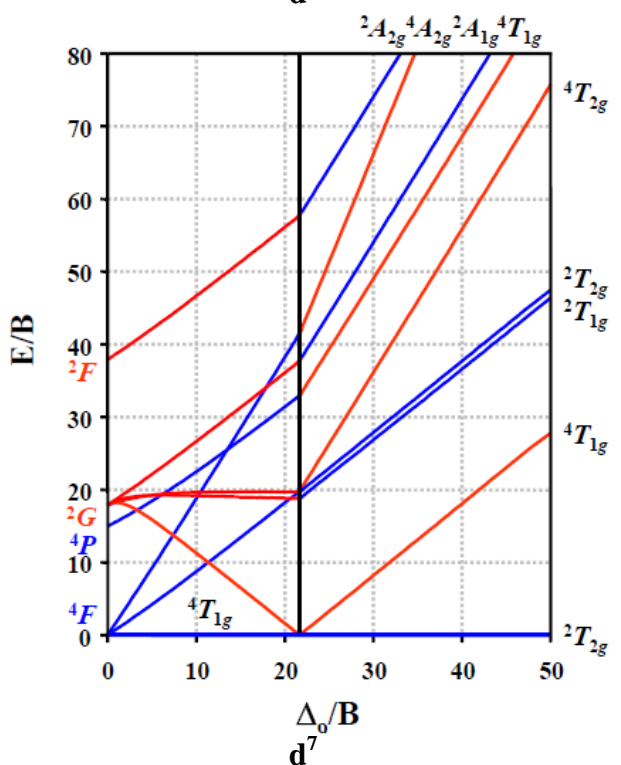
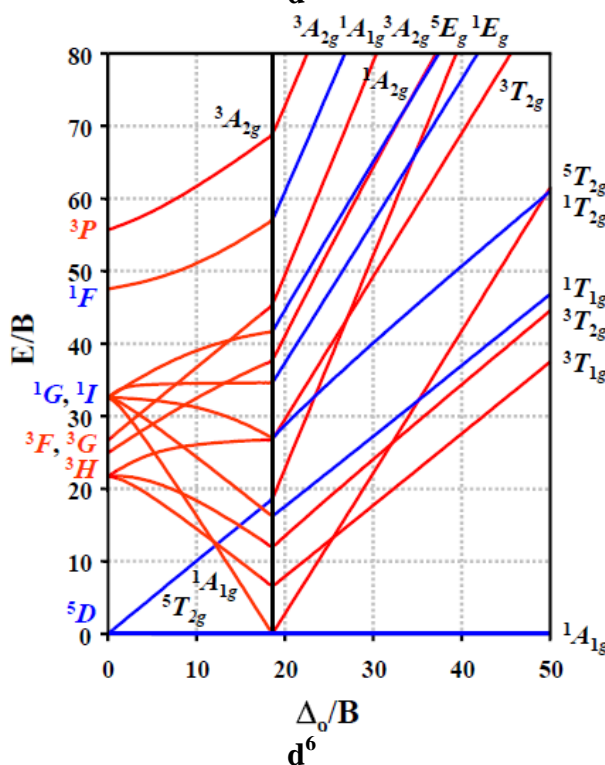
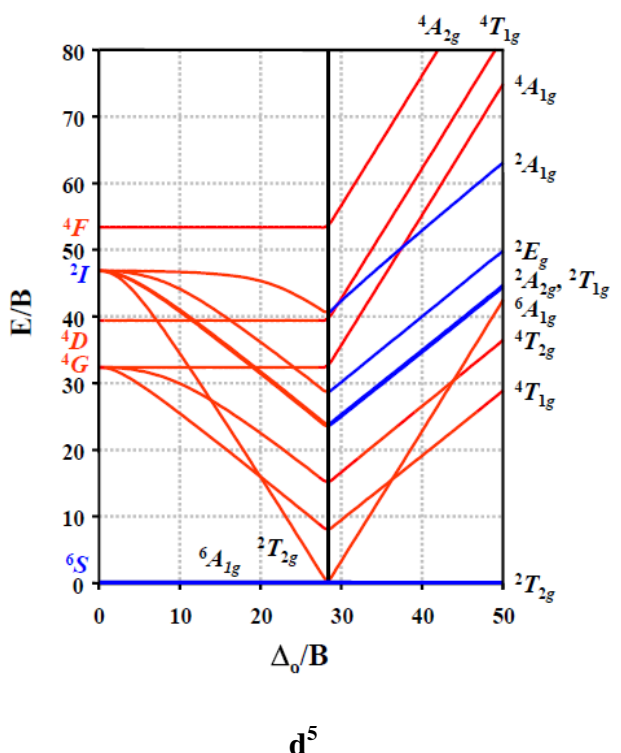
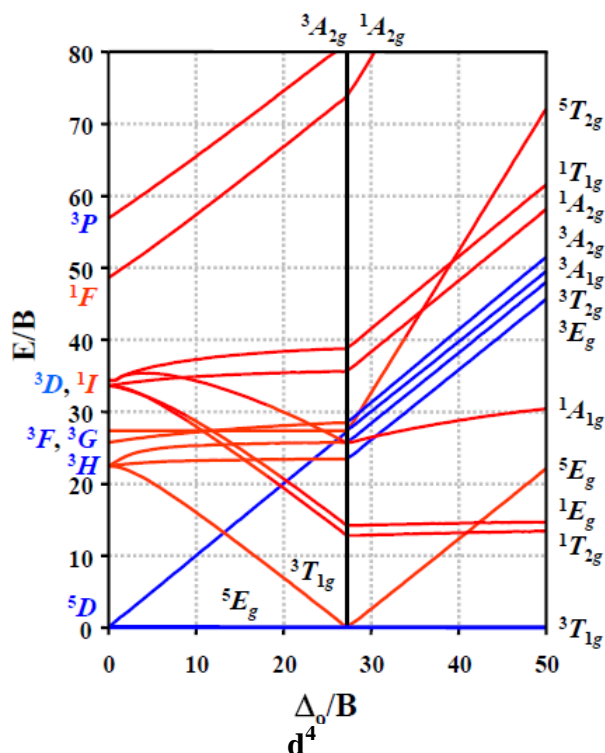
Postup: Naladíme přístroj podle instrukcí. Vzorek důkladně rozetřeme v achátové misce s nujolem a pak tuto suspenzi nanese na speciální filtrační papír. Změříme spektrum slepého vzorku (filtrační papír s nujolem) a poté spektra suspenzí vzorků a zpracujeme je. Z práce vypracujeme protokol, do něhož provedeme navíc identifikaci základních absorpčních pásů jednotlivých komplexních sloučenin podle zadání.

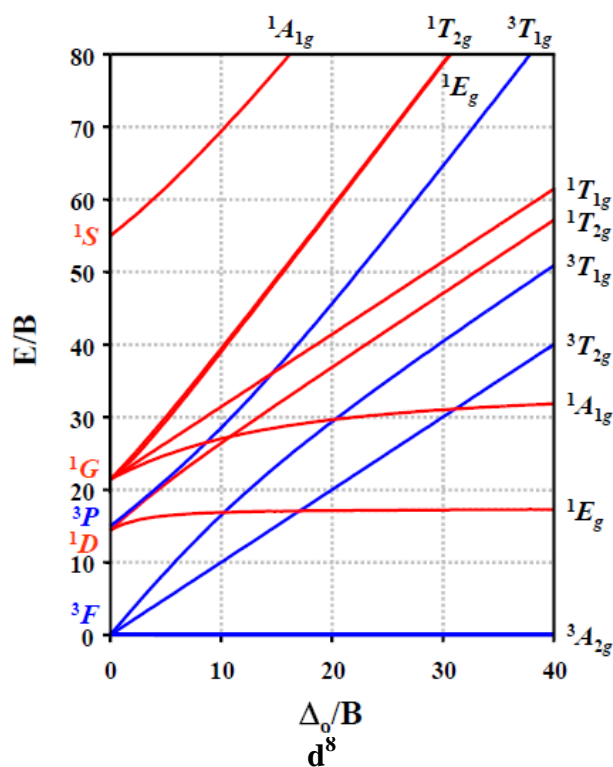
d^n	E	konfigurace	$2S+1\Gamma_i$	bB + cC	a(Δ)
d^2	A – 8B	t_{2g}^2	${}^3T_{1g}$ 3E_g ${}^1T_{2g}$ ${}^1A_{1g}$	3B 9B + 2C 9B + 2C 18B + 5C	-0,8 -0,8 -0,8 -0,8
		$t_{2g}^1 e_g$	${}^3T_{2g}$ ${}^3T_{1g}$ ${}^1T_{2g}$ ${}^1T_{1g}$	0 12B 8B + 2C 12B + 2C	+0,2 +0,2 +0,2 +0,2
		e_g^2	${}^3A_{2g}$ 1E_g ${}^1A_{1g}$	0 8B + 2C 16B + 4C	+1,2 +1,2 +1,2
d^3	3A – 15B	t_{2g}^3	${}^4A_{2g}$ 2E_g ${}^2T_{1g}$ ${}^2T_{2g}$	0 9B + 3C 9B + 3C 15B + 5C	-1,2 -1,2 -1,2 -1,2
		$t_{2g}^2 e_g^1$	${}^4T_{2g}$ ${}^4T_{1g}$:	0 12B	-0,2 -0,2
		$t_{2g}^1 e_g^2$	${}^4T_{1g}$:	3B	+0,8
d^4	6A – 21B	t_{2g}^4	${}^3T_{1g}$ 1E_g ${}^1T_{2g}$ ${}^1A_{1g}$	6B + 5C 12B + 7C 12B + 7C 21B + 10C	-1,6 -1,6 -1,6 -1,6
		$t_{2g}^3 e_g^1$	5E_g :	0	-0,6
		$t_{2g}^2 e_g^2$	${}^5T_{2g}$:	0	+0,4
d^5	10A – 35B	t_{2g}^5	${}^2T_{2g}$ ${}^4T_{1g}$ ${}^4T_{2g}$ ${}^2A_{2g}$	15B + 10C 10B + 6C 18B + 6C 12B + 9C	-2,0 -1,0 -1,0 -1,0
		$t_{2g}^3 e_g^2$:	0	0
			${}^6A_{1g}$ ${}^4A_{1g}$ 4E_g ${}^4T_{2g}$ 4E_g ${}^4T_{1g}$ ${}^4A_{2g}$	10B + 5C 10B + 5C 13B + 5C 17B + 5C 19B + 7C 22B + 7C	0 0 0 0 0 0
		$t_{1g}^2 e_g^3$:	10B + 6C 18B + 6C	+1,0 +1,0
			${}^4T_{1g}$ ${}^4T_{2g}$:		
d^6	15A – 35B – 7C	t_{2g}^6	${}^1A_{1g}$ ${}^3T_{1g}$	5B + 8C 5B + 5C	-2,4 -1,4

		$t_{2g}^5 e_g^1$ $t_{2g}^4 e_g^2$ $t_{2g}^3 e_g^3$ \vdots	${}^3T_{2g}$ ${}^1T_{1g}$ ${}^1T_{2g}$ ${}^5T_{2g}$ \vdots 5E_g \vdots	$13B + 5C$ $5B + 7C$ $21B + 7C$ 0 0	$-1,4$ $-1,4$ $-1,4$ $-0,4$ $+0,6$
d^7	$21A - 4B + 14C$	$t_{2g}^6 e_g^1$ $t_{2g}^5 e_g^2$ $t_{2g}^5 e_g^2$ $t_{2g}^3 e_g^4$	2E_g ${}^4T_{1g}$ ${}^4T_{2g}$ ${}^4T_{1g}$ \vdots ${}^4A_{2g}$ \vdots	$7B + 4C$ $3B$ 0 $12B$ 0	$-1,8$ $-0,8$ $+0,2$ $+0,2$ $+1,2$
d^8	$28A - 50B + 21C$	$t_{2g}^6 e_g^2$ $t_{2g}^6 e_g^3$ $t_{2g}^4 e_g^4$	${}^3A_{2g}$ 1E_g ${}^1A_{1g}$ ${}^3T_{2g}$ ${}^3T_{1g}$ ${}^1T_{2g}$ ${}^1T_{1g}$ ${}^3T_{1g}$ 1E_g ${}^1T_{2g}$ ${}^1A_{1g}$	0 $8B + 2C$ $16B + 4C$ 0 $12B$ $8B + 2C$ $12B + 2C$ $3B$ $9B + 2C$ $9B + 2C$ $18B + 5C$	$-1,2$ $-1,2$ $-1,2$ $-0,2$ $-0,2$ $-0,2$ $-0,2$ $+0,8$ $+0,8$ $+0,8$ $+0,8$

Tabulka 3: Hodnoty energie stavů ${}^{2S+1}\Gamma_i$ v oktaedrickém poli, vztaženém na energii základního stavu atomu (E) jako nulový bod.







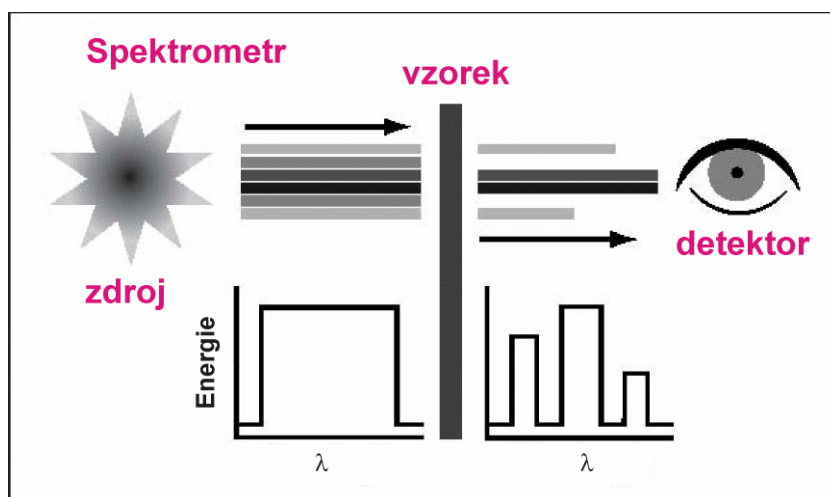
Obr. 14. Tanabe-Suganovy diagramy pro elektronové konfigurace $d^2 - d^8$ (závislost relativní energie ligandových stavů na síle ligandového pole symetrie).

Použitá a doporučená literatura:

1. J. Lindon, D. Koppenaal: *Encyclopedia of spectroscopy and spectrometry, 2nd Ed.*, Academic Press; 2010.
2. A. A. Vlček: *Struktura a vlastnosti koordinačních sloučenin*. ČSAV; 1966.
3. A. B. P. Lever: *Studies in physical and theoretical chemistry 33, Inorganic Electronic Spectroscopy, Sec. Ed.*, Elsevier; 1984.
4. E. A. Boudroux, L. N. Mulay: *Theory and applications of molecular paramagnetism*, John Wiley and Sons; 1976.
5. B. N. Figgis, M. A. Hitchman: *Ligand field theory and its applications*, Wiley-VCH; 2000.
6. W. Li, G. Zhou, T. Mak: *Advanced Structural Inorganic Chemistry*, Oxford University Press, 2008.

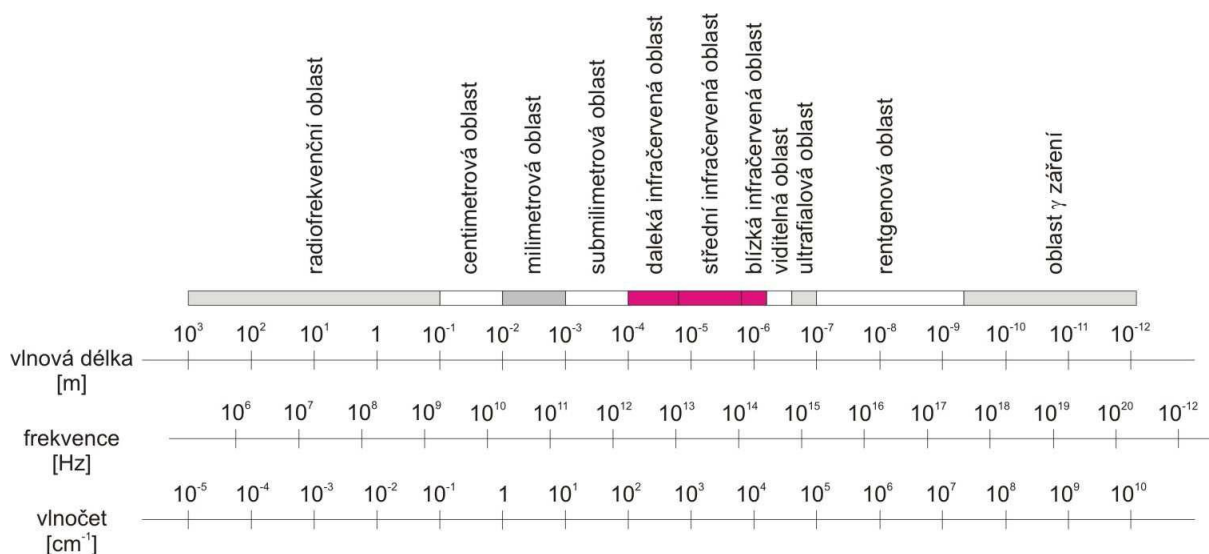
Infračervená spektroskopie

Infračervenou (IČ) spektroskopií řadíme mezi spektrální nedestruktivní analytické metody. Z jejího názvu vyplývá, že s analyzovaným vzorkem interaguje infračervená část elektromagnetického záření a výsledkem měření je spektrum, tedy závislost absorpance (transmitance) na vlnočtu záření.



Obr. 15. Schematické znázornění pohlcení části IČ záření vzorkem ve spektrometru [materiály firmy Nicolet].

Hodnoty vibračních energií v získaném spektru souvisí s pevností chemických vazeb, s molekulovou geometrií a hmotnostmi jader, tedy s molekulovou strukturou měřené látky. Využívá se tedy k identifikaci a kvantitativní analýze strukturních jednotek v analyzovaném vzorku, kterým může být látka známá (důkaz její přítomnosti) nebo neznámá (určení strukturních rysů, přítomnosti funkčních skupin). Díky těmto charakteristikám má IČ spektroskopie důležitou roli v organické i anorganické chemii, ve výzkumu i průmyslu. Hojně se využívá ve farmacii, medicínské diagnostice, forenzní chemii, v kontrole potravin, agrochemii, při výzkumu molekulové dynamiky, chemických vlastností molekul, vlivu prostředí na studované molekuly a mnoho jiných oblastí.



Obr. 16. Elektromagnetické spektrum [převzato z P. Kania, Infračervená spektrometrie].

Infračervená část elektromagnetického záření zasahuje od červené oblasti viditelného záření po mikrovlnnou oblast. Zahrnuje tedy záření o vlnočtech 14000 až 20 cm^{-1} , přičemž pro analýzu nejvyužívanější je oblast $4000\text{--}200 \text{ cm}^{-1}$. Podle energie záření dělíme infračervenou oblast na blízkou ($14000\text{--}4000 \text{ cm}^{-1}$), střední ($4000\text{--}400 \text{ cm}^{-1}$) a vzdálenou ($400\text{--}20 \text{ cm}^{-1}$). Podle konvence se obvykle popis intenzity absorpce u spekter měřených ve střední IČ oblasti uvádí v procentualitě propustnosti (transmittance, T [%]) na dekadické logaritmické škále. Signál je tedy representován minimem na záznamu, jímž je nejnižší bod, odpovídající propustnosti pro daný pás. Naopak u spekter měřených ve vzdálené IČ oblasti se spektrum uvádí jako závislost absorpance na vlnočtu záření. Signál je tedy naopak maximem odpovídajícím absorpci pro záření dané energie. Pro zopakování i zde uvedme, že transmittance (propustnost) je definována jako poměr intenzity záření, které prošlo vzorkem (I) k intenzitě záření vycházejícího ze zdroje (I_0). Absorbance je definována jako dekadický logaritmus $1/T$.

$T = I / I_0$	$A = \log 1/T$	$\nu = 1/\lambda [\text{cm}^{-1}]$
---------------	----------------	------------------------------------

Závislost energie na vlnové délce je logaritmická, proto se používá vlnočty, který je definován jako převrácená hodnota vlnové délky, a tedy uvedená závislost energie na vlnočtu bude funkcí logaritmickou.

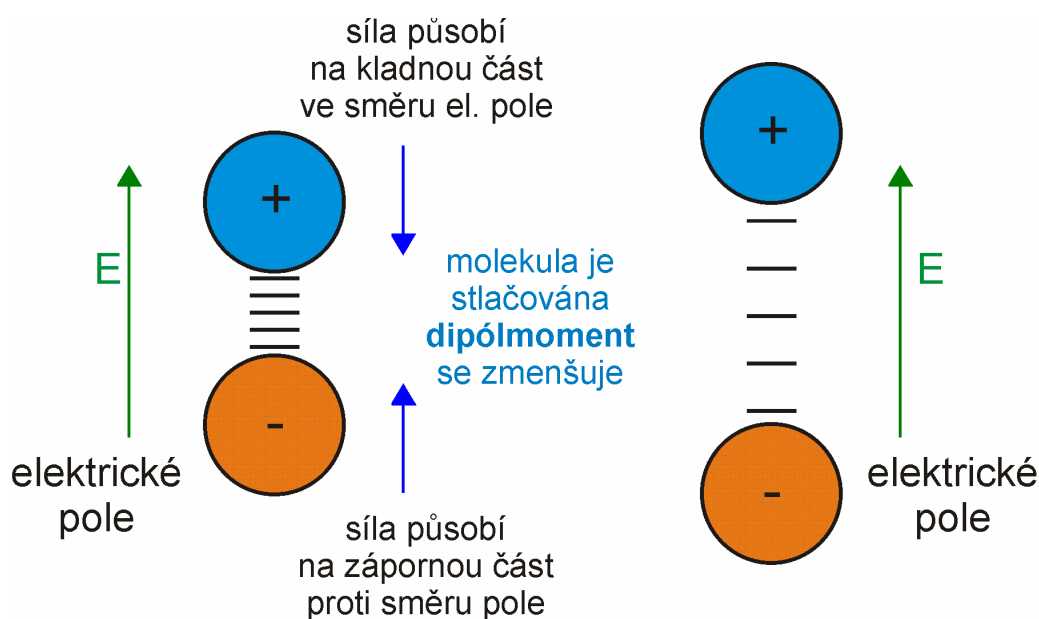
Podstatou infračervené spektroskopie je interakce infračerveného záření se studovanou látkou, kdy hmota může foton o určité energii pohlit (absorpční infračervená spektroskopie), nebo vyzářit (emisní infračervená spektroskopie). Každý atom či skupina atomů v molekule

vibruje kolem své rovnovážné pozice. Frekvence těchto vibrací závisí na hmotě a vzájemném uspořádání zúčastněných částic, síle jejich vazeb. Energie fotonů IČ záření ($1\text{--}60\text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) je dostatečná ke změně vibračního či rotačního stavu molekuly. Vibrační pohyb si lze představit jako periodickou změnu mezijaderné vzdálenosti mezi atomy. Obecně má n atomová molekula $3n$ stupňů volnosti; tři jsou určeny pro translační pohyb těžiště molekuly ve směru os x , y a z a tři jsou určeny pro popis jejího rotačního pohybu (či dva v případě lineární molekuly, kde dva rotační momenty ve směru os x , y a z jsou totožné). Číslo $3n-6$ ($3n-5$ v případě lineární molekuly) tedy zbývá na tzv. vibrační stupně volnosti neboli vibrační pohyby molekuly (např. H_2O , nelineární molekula, $3\times 3-6 = 3$ vibrační módy).

Nezávisle na struktuře, konstituci, konfiguraci, konformaci a dalších aspektech chemické vazby lze u téže sloučeniny za analogických podmínek pro každou vibraci změřit v IČ spektru (přibližně) stejný absorpční pás, bez ohledu na okolnosti. Naopak, lze na strukturu, konstituci, konfiguraci, konformaci z IČ spekter usuzovat.

Typy vibrací

Vibrace lze popisovat jako změny vazebných délek a úhlů. Aby byla vibrace v IČ spektru pozorovatelná (aktivní), musí při ní docházet ke změně dipólového momentu. Polární (polarizovaná) vazba obvykle je aktivní (př. $\text{C}=\text{N}$), vazba nepolární v symetrické molekule bude absorbovat velmi slabě, pokud vůbec ($\text{C}=\text{C}$).

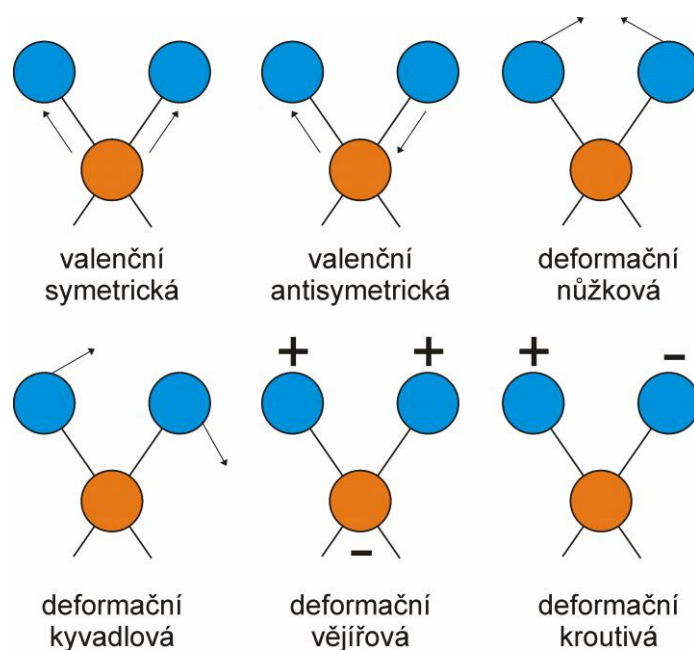


Obr. 17. Schematické znázornění změny dipólového momentu vlivem elektrické složky elektromagnetického záření.

Vibrace dělíme na:

- Valenční – mění se převážně délka vazby
 - symetrická
 - asymetrická
- deformační – dochází ke změně vazebných úhlů
 - rovinné – nůžkové, kyvadlové
 - mimorovinné (atom vibruje mimo rovinu tvořenou ostatními atomy) – vějířové, krouživé

Na natáhnutí vazby je třeba více energie než na její ohnutí, proto frekvence valenčních vibrací jsou vždy vyšší než frekvence odpovídajících deformačních vibrací dané funkční skupiny.



Obr. 18. Některé typy vibrací.

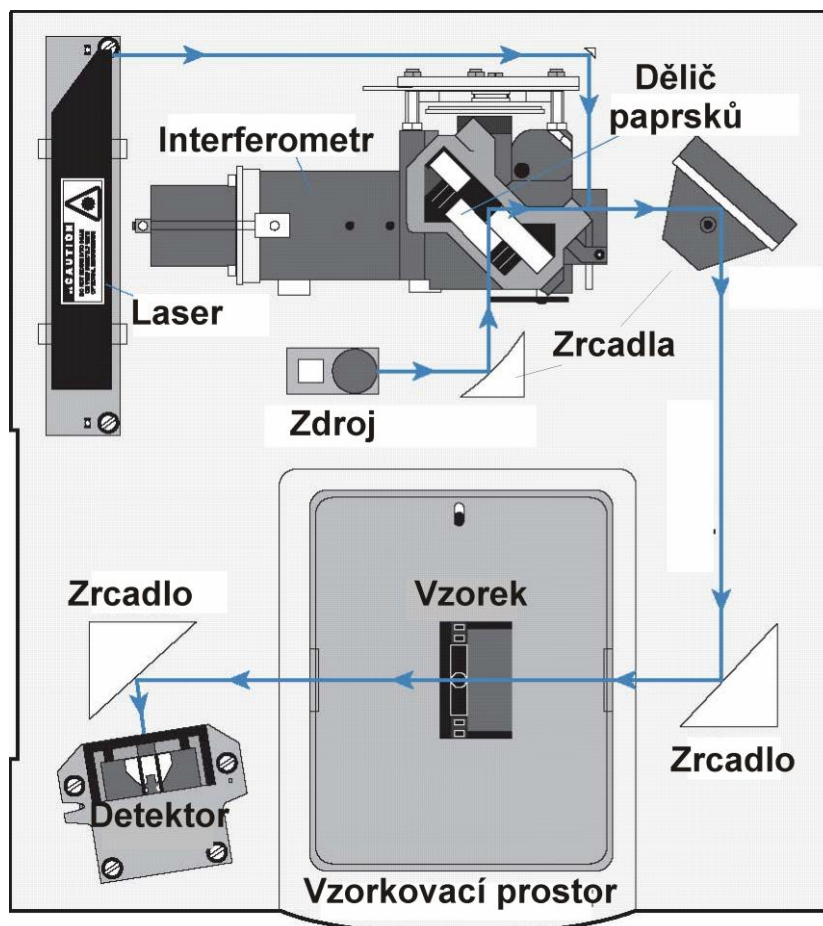
Měření infračervených spekter se provádí na **infračervených spektrometrech**, které můžeme rozdělit do tří základních skupin:

- a) disperzní IČ spektrometry – součástí jsou zdroj IČ záření (keramická tyčinka s navinutým odporovým vláknem žhaveným na teplotu 1000-1400 °C), které pak prochází vzorkem (v kyvetě z materiálu propustného pro IČ záření, většinou halogenidy alkalických kovů – KBr, NaCl, CsI, CaF₂, TlI, TlBr), a dále monochromátorem, který postupně (rotací difrakční mřížky) přivádí na detektor záření

o vybraných vlnótech; použití disperzních spektrometrů je na ústupu (postupné měření spektra po jednotlivých hodnotách vlnóťů je časově náročné).

b) Nedisperzní IČ spektrometry – analogické k disperzním spektrometrům, ale neobsahují monochromátor záření, monochromatické záření vychází již přímo ze zdroje IČ záření, kterými bývají vysoce monochromatické lasery (např. laserové diody).

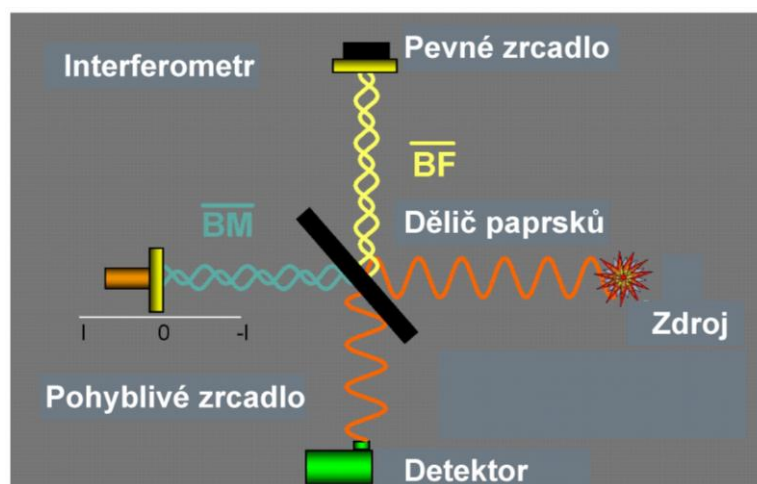
c) IČ spektrometry s Fourierovou transformací (FT) (interferometrické)



Obr. 19. Znáornění optické dráhy (modrá) v interferometrickém IČ spektrometru [materiály fy Nicolet].

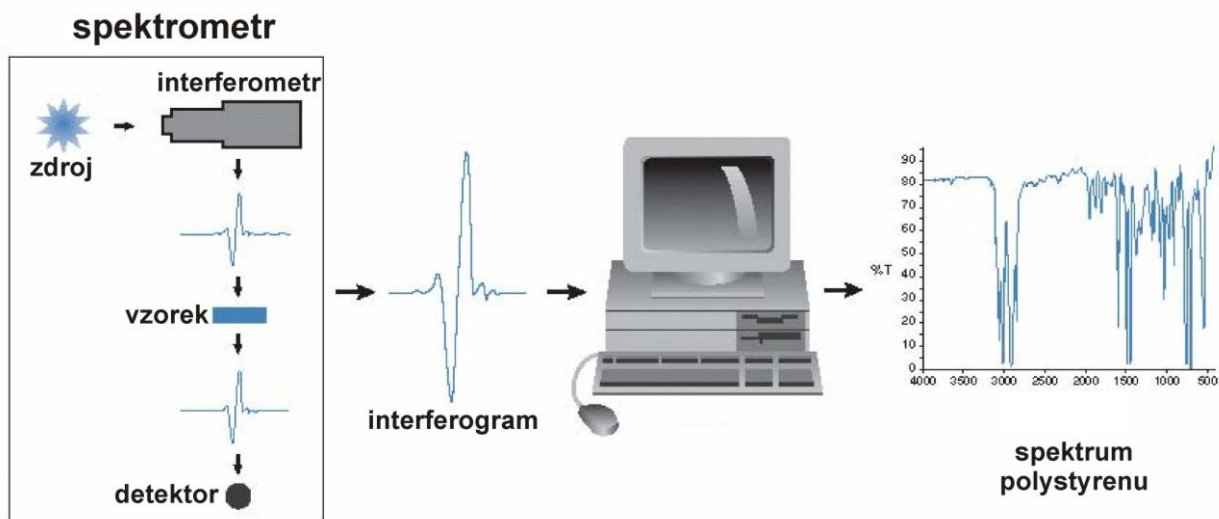
Zdrojem záření je opět keramická tyčinka, která při zahřátí emituje spojité IČ záření, které pak dopadá pod úhlem 45° na dělič paprsků (propustí jen požadovanou část spektra, např. střední IČ), kterým projde 50% záření na pohyblivé zrcadlo. Zbýlých 50% se odráží na pevné zrcadlo. Paprsky se od obou rovinných, vzájemně kolmých zrcadel zpětně odrážejí a na děliči paprsků pak podle aktuální polohy pohyblivého zrcadla interferují. K pozitivní interferenci dojde, pokud je dráhový rozdíl těchto paprsků celistvým násobkem vlnové délky procházejícího záření ($n\lambda$). Intenzita záření tedy závisí na pohybu zrcadla (ovlivňuje dráhový rozdíl paprsků).

Rekombinovaný paprsek je pak odražen do kyvetového prostoru se vzorkem a pak dopadá na detektor. Signál na detektoru je snímán v závislosti na pohybu zrcadla. Dělič paprsků, pohyblivé a pevné zrcadlo tvoří základní části tzv. *Michelsonova interferometru*. Kontrola rovnoměrného pohybu zrcadla v interferometru je prováděna pomocí laseru, jehož monochromatické záření slouží také ke kalibraci vlnočtové stupnice přístroje.



Obr. 20. Schéma rozložení pevného, pohyblivého zrcadla a děliče paprsků v Michelsonově interferometru [materiály fy Nicolet].

Na rozdíl od předchozích dvou typů spektrometrů je signál opouštějící interferometr a dopadající na detektor součtem všech možných interferencí při všech možných frekvencích (záření tedy není monochromatické, spektrum se tak nezaznamenává postupně po jednotlivých vlnočtech záření). Každý zaznamenaný *interferogram* obsahuje veškeré spektrální informace. Interferogram se matematickou operací Fourierovou transformací převádí z časové škály do frekvenční nebo vlnočtové na spektrum odpovídající jednomu skenu. S opakovaným pohybem zrcadla jsou zaznamenávány další interferogramy, z nichž je pak spočítán průměrný interferogram, který se Fourierovou transformací převede na spektrum, které má na ose x vlnočtovou stupnici. Vyšším počtem skenů se zvyšuje kvalita spektra, protože se zlepšuje poměr signálu ku šumu. FT IČ spektrometry jsou v současné době nejpoužívanější, protože umožňuje získat za kratší měřicí čas kvalitnější spektrum s vyšším rozlišením.



Obr. 21. Schéma zisku spektra polystyrenu na FT IČ spektrometru s interferometrem [materiály fy Nicolet].

Obrovskou výhodou IČ spektroskopie je možnost měřit vzorky ve **všech skupenstvích** a také **různými měřicími technikami**, které experimentátor volí podle povahy vzorku nebo požadovaných informací ze spektra. Jak tedy vybrat tu správnou měřicí techniku?

Transmitanční (transmisní) techniky

Nejpoužívanější technikou pro získání infračerveného spektra neznámé látky je transmitanční měření (záření přímo *prochází* vzorkem), velkou výhodou je možnost měření vzorků ve všech skupenstvích; mezi jehož techniky náleží:

Plynný vzorek:

- Plynová kyveta

Kapalný vzorek:

- Kapalinová kyveta
- Tenká vrstva mezi okénky
- Polymerní porézní nosič



Obr. 22. Kapalinová kyveta.

Pevný vzorek:

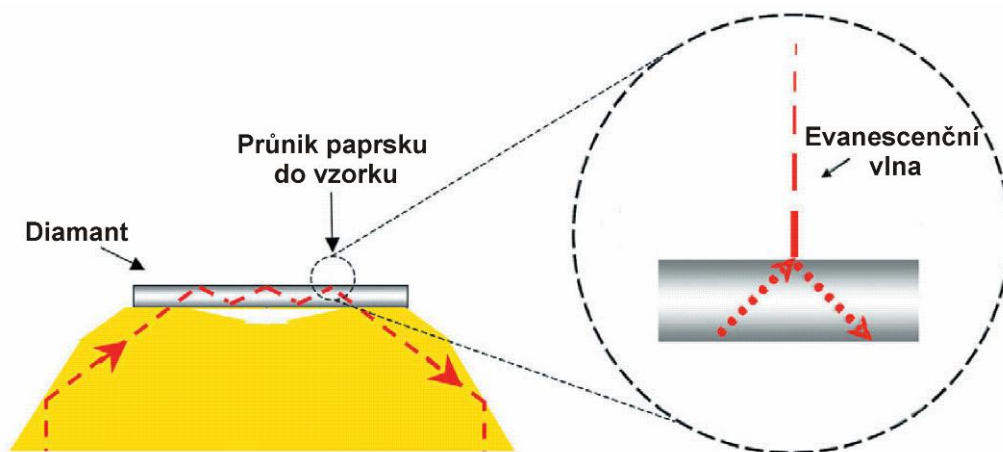
- KBr nebo CsI tableta (vzorek se smíchá s opticky inertním materiálem a slisuje se do tvaru tenké tablety o tloušťce 0,005-0,5 mm)
- Suspenze v Nujolu (parafinový olej) nebo Fluorolube (fluorovaný uhlovodík)
- Kyveta s KBr, NaCl nebo polyethylenovými okénky
- Samonosné fólie
- Film nebo odparek na KBr, NaCl nebo polyethylenovém okénku

Reflektanční (odrazové) techniky

Můžeme měřit vzorky v pevném nebo kapalném skupenství.

Zeslabená úplná reflektance (ATR)

Pro měření vzorků, které silně absorbují infračervené záření (vodné roztoky, emulze) je výhodná technika zeslabené totální reflektance (ATR - Attenuated Total Reflectance). Výhodou je minimální příprava vzorku pro analýzu. Technika je založena na principu násobného úplného odrazu záření na fázovém rozhraní měřeného vzorku a měřicího krystalu z materiálu o vysokém indexu lomu. Krystal je většinou planární, ve tvaru lichoběžníkového hranolu. Záření je přivedeno do krystalu soustavou zrcadel tak, aby úhel dopadu na fázové rozhraní vyhověl podmínce totálního odrazu. Měřený vzorek je v dokonalém kontaktu s ATR krystalem a záření proniká částečně do analyzovaného materiálu (evanescentní vlna). Záření pronikne do povrchu vzorku řádově v μm až mm , charakterizujeme tedy pouze velmi tenké povrchové vrstvy. Měřený vzorek absorbuje záření o určité frekvenci (přechod na vyšší vibračně-rotaci hladinu), které pak bude v totálně odraženém záření zeslabeno. Průnik záření do vzorku se zvyšuje s rostoucí vlnovou délkou. Relativní intenzity pásů ve spektru tak klesají s rostoucími hodnotami vlnových délek. Ve srovnání se spektry v měřených transmittančními technikami. Pro možnost přímého porovnání spekter získaných různými technikami, se tento jev může matematicky kompenzovat. ATR korekce je součástí softwarového vybavení IČ spektrometrů. Používají se krystaly např. ze ZnSe, diamantu, AgCl, Si, Ge, saříru.



Obr. 23. Znárodnění odrazu IČ paprsku na ATR krystalu a evanescentní vlny [inspirováno D.A. Wharton et al., J. Exp. Biol. 211 (2008) 2901].

Spekulární reflektance

Spekulární (zrcadlová) reflektanční technika je založená na měření změny intenzity záření odraženého od lesklé podložky, na které je umístěn nebo nanesen vzorek. Spekulární reflexí je

ta část odraženého záření, která splňuje Snellův zákon, tzn. úhel odrazu se vzhledem k makroskopické rovině vzorku rovná úhlu dopadu.

Intenzita odraženého paprsku od povrchu je závislá na úhlu dopadu záření, optických (index lomu) a absorpčních vlastnostech vzorku a na povrchu analyzovaného materiálu. Touto technikou bývají analyzovány tenké filmy materiálů nanesených na kovových podložkách a vzorky, které nemohou být měřeny na průchod nebo jinými technikami, např. silně absorbující materiály nebo vysoce odrážející záření.

Difúzní reflektance (DRIFT)

IČ záření dopadá na práškový vzorek, část je absorbována, část je odražena a část je rozptýlena a tato je detekována. Poslední efekt je nazýván jako difúzní reflektance. Technika pak bývá označována jako DRIFT nebo DRIFTS (Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy). Odražená a reflektanční složka záření závisí na velikosti částic a distribuci velikosti částic. Pro reprodukovatelnost měření je proto důležité mlít vzorek na velikost částic mezi 10 a 20 μm a reprodukovatelně plnit vzorkovací kelímek. Pro měření standardních pevných látek, jako např. léčiva, je často zapotřebí zředit vzorek KBr, aby byla získána spektra o vysoké kvalitě. Je to metoda vhodná k automatizaci a jsou dostupná příslušenství umožňující měření série vzorků bez jakéhokoliv zásahu obsluhy.

Existují samozřejmě i další techniky IR spektroskopie, jako Fotoakustická spektroskopie, FTIR mikroskopie, ATR circle cell pro kapalné vzorky.

Absorpční maxima v **infračerveném spektru** pozorujeme pouze, pokud je energie záření o daném vlnočtu rovná energetickému rozdílu mezi jednotlivými vibračními hladinami dané vazby či části molekuly. Ze všech optických vlastností, které můžeme měřit výše uvedenými technikami, mohou tedy ve spektru na ose y vystupovat propustnost (transmitance) T , absorbance A a reflektance R . Výhodou IČ spektrometrů je, že jejich software umí jednoduše jednotlivé veličiny navzájem převádět. Na ose x je nejčastěji vyneseno vlnočtení záření, případně vlnová délka. Jednotlivé pásy ve spektru charakterizujeme *polohou* (vlnočtem) a *relativní intenzitou* (vzájemným porovnáním intenzit se výrazné pásy označují jako silné (very strong vs, strong s), střední (medium m) a slabé (weak w). Při vyhodnocování kvantity (tedy určením množství stanovované látky) podle Lambert-Beerova zákona se informace odečítají v absorbančním módu. Nejčastěji se však infračervená spektroskopie užívá ke kvalitativní

analýze, tedy k důkazu, identifikaci nebo analýze strukturních rysů (přítomnosti funkčních skupin) látek, protože prakticky neexistují dvě látky s identickým IČ spektrem.

Provádí se tedy **interpretace infračerveného spektra**.

- Pásy vibrací *funkčních skupin* se vyskytují ve spektrech v určitých konkrétních oblastech (tabulky rozsahů vlnočtů charakteristických vibrací funkčních skupin), takže lze z analýzy spektra usuzovat na nebo vyloučit přítomnost určitých funkčních skupin. Je-li funkční skupina v molekule přítomna, musí spektrum vykazovat všechny absorpční pásy (identifikované jak hodnotou vlnočtu, tak relativní intenzitou), které ji charakterizují.

Rámcová základní pravidla interpretace:

- Postupovat od nejvyšších vlnočtů k nižším
- pásy jsou charakterizovány polohou, intenzitou, tvarem a symetrií
- je nutné si uvědomit, že není možné přiřadit všechny absorpční pásy jednotlivým částem molekuly

Z výše uvedeného vyplývá, že jen velmi zřídka může být pouze na základě IČ spektra určena struktura neznámé látky. Obvykle se u látky pomocí IČ spektroskopie provádí zjištění (ne)přítomnosti funkčních skupin a struktura se potvrzuje jinými technikami (NMR spektroskopie, monokrystalová strukturní analýza). Nebo naopak může být struktura navržená jinými nepřímými technikami v IČ spektroskopii potvrzena.

Infračervené spektrum můžeme rozdělit na dvě hlavní oblasti (dělení ovšem není ostré, oblasti se vzájemně překrývají):

1. oblast vibrací *valenčních* ($4000 - 1500 \text{ cm}^{-1}$)
2. oblast vibrací *deformačních* ($1500 - 500 \text{ cm}^{-1}$)

V oblasti *valenčních vibrací* nalezneme charakteristické absorpční pásy funkčních skupin. Vlnočty absorbujících funkčních skupin jsou poměrně specifické a na zbytku molekuly závisí jen málo. Tuto část spektra můžeme dále rozdělit na další tři části:

a) $4000 - 2500 \text{ cm}^{-1}$: valenční vibrace vazeb *vodíku* (O-H, N-H a C-H). Volná O-H okolo 3600 cm^{-1} , vázaná vodíkovou vazbou – rozšíření pásu a posun do nižších oblastí; N-H vazby méně intenzivní a ostřejší; C-H $3300 - 2700 \text{ cm}^{-1}$ (alkyny okolo 3300 cm^{-1} , alkeny blízko nad 3300 cm^{-1} méně intenzivně, nasycené systémy pod 3000 cm^{-1} několika zřetelnými pásy, aromatické C-H vazby málo intenzivní, často překryté signály $3100 - 3000 \text{ cm}^{-1}$).

b) $2500 - 1900 \text{ cm}^{-1}$: absorpce *trojných vazeb*, oblast charakteristická pro nitrily a alkyne.

c) 1900 – 1500 cm^{-1} : absorpce *dvojných vazeb*, nejintenzivnější pásy 1800 – 1600 cm^{-1} karbonylové skupiny, deriváty karboxylových kyselin – vlnčet karbonylu se zvyšuje v řadě amidy primární, amidy sekundární, karboxylové kyseliny, estery, chloridy, anhydridy.

V oblasti 1500 – 500 cm^{-1} pozorujeme *deformační vibrace*. Tato oblast se nazývá „oblast otisku prstu / palce“ pro danou molekulu. Tuto oblast lze jen stěží přesně interpretovat, je charakteristická pro molekulu jako celek, dochází zde totiž ke spřahování vibrací. Je ale pomocí této oblasti možné určit přítomnost dané molekuly, stejně jako podle otisku prstu u lidí – tedy při počítačové identifikaci spekter pomocí spektrálních knihoven. Pozor ale, mimo deformačních vibrací zde také pozorujeme pásy některých valenčních vibrací (např. C-halogen, vlnčet klesá v pořadí C-F, C-Cl, C-Br, C-I). Do části spektra 1250 – 1400 cm^{-1} spadá také valenční vibrace vazby C-O alkoholů a fenolů.

	Valenční vibrace			Deformační vibrace		
	rozsah (cm^{-1})	Int.	přiřazení	rozsah (cm^{-1})	Int.	přiřazení
Alkany	2850–3000	s	CH ₃ , CH ₂ , CH, 2 nebo 3 pásy	1350–1470 1370–1390 720–725	m m w	CH ₂ , CH ₃ CH ₃ CH ₂ kyvadlová
Alkeny	3020–3100 1630–1680 1900–2000	m var s	=C–H, =CH ₂ C=C C=C asymetrická	880–995 780–850 675–730	s m m	=C–H, =CH ₂ (mimorovinná deformace) cis–RCH=CHR
Alkyny	3300 2100–2250	s var	C–H C≡C	600–700	s	C–H
Areny	3030 1600 a 1500	var m- w	C–H C=C (v kruhu), 2 pásy 3 u konjugovaných	690–900	s-m	C–H deformační, deformace kruhu
Alkoholy a Fenoly	3580–3650 3200–3550 970–1250	var s s	O–H (volné), ostré O–H (H–vázaný), široký C–O	1330–1430 650–770	m var-w	O–H deformační (rovinná) O–H deformační (mimorovinná)
Aminy	3400–3500 3300–3400 1000–1250	w w m	N–H (prim. aminy), 2 pásy N–H (sek. aminy) C–N	1550–1650 660–900	m-s var	NH ₂ nůžková (1°–aminy) NH ₂ a N–H vějířová (posuny při H–vazbách)
Aldehydy a Ketony	2690–2840 1720–1740 1710–1720 1690 1675 1745 1780	m s s s s s s	C–H (aldehyd) C=O (nas. aldehyd) C=O (nasyč. keton) aryl keton α , β –nenasycený cyklopentanon cyklobutanon	1350–1360 1400–1450 1100	s s m	α –CH ₃ deformační α –CH ₂ deformační C–C–C deformační

Karboxylové kyseliny a deriváty	2500–3300 (kyseliny)	s	O–H (široký)	1395–1440	m	C–O–H deformační
	1705–1720 (kyseliny)	s	C=O (H–vázaný)			
	1210–1320 (kyseliny)	m-s	O–C			
	1785–1815 (halogenid)	s	C=O			
	1750&1820 (anhydrid)	s	C=O (2 pásy)			
	1040–1100	s	O–C			
	1735–1750 (ester)	s	C=O			
	1000–1300	s	O–C (2 pásy)			
	1630–1695 (amid)	s	C=O	1590–1650 1500–1560	m m	N–H (prim. amid) N–H (sek. amid)
Nitrily	2240–2260	m	C≡N (ostrá)			
Izokyanáty Izothiokyanáty Diimidy, Azidy a Keteny	2100–2270	m	–N=C=O, –N=C=S –N=C=N–, –N ₃ , –C=C=O			

Tabulka 4: Tabulka základních valenčních a deformačních vibrací organických sloučenin (var = různá intenzita).

Fundamentální vibrace	
	cm ⁻¹
N₂	2360
O₂	1580
CO₂	2284
NH₃	3223 (ν_1), 1060 (ν_2), 3378 (ν_3), 1646 (ν_4)
(CN)⁻	2080–2239
(SCN)⁻	1293 (ν_1), 470 (ν_2), 2066 (ν_3)
(CO₃)²⁻	1087 (ν_1), 874 (ν_2), 1432 (ν_3), 706 (ν_4)
(PO₄)²⁻	935 (ν_1), 420 (ν_2), 1080 (ν_3), 550 (ν_4)
(ClO₄)⁻	935 (ν_1), 460 (ν_2), 1050–1170 (ν_3), 630 (ν_4)
[PtCl₄]²⁻	335 (ν_1), 164 (ν_2), 304 (ν_4)
(NO₂)⁻	1320–1365 (ν_1), 807–818 (ν_2), 1221–1251 (ν_3)
(NO₃)⁻	1018–1050 (ν_1), 807–850 (ν_2), 1310–1405 (ν_3), 697–716 (ν_4)
(MnO₄)⁻	840 (ν_1), 340–350 (ν_2), 900 (ν_3), 387 (ν_4)

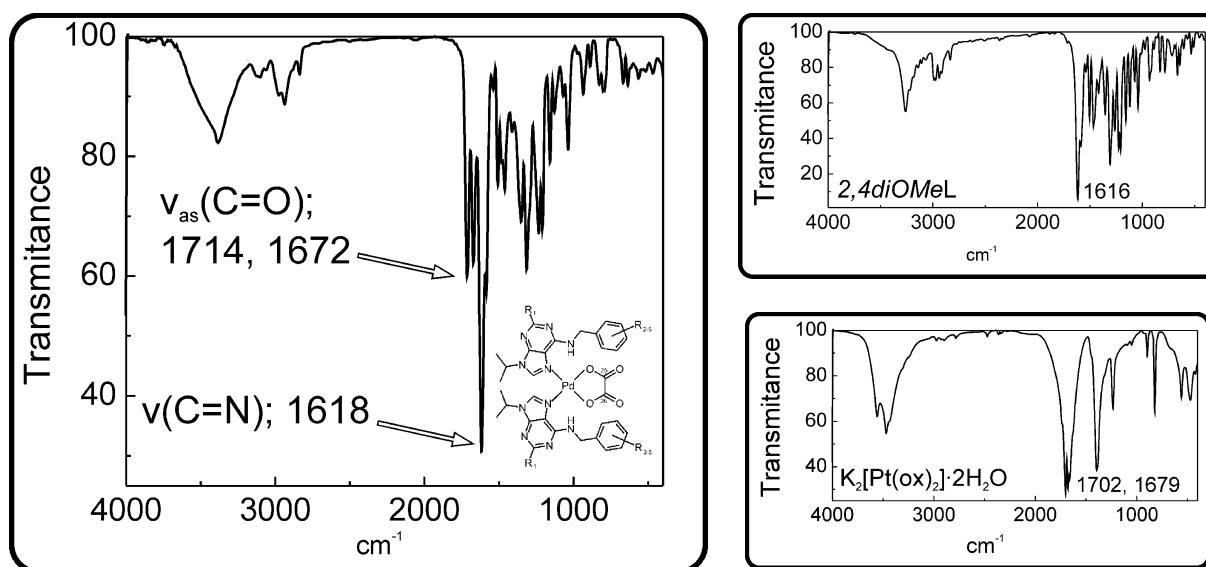
Tabulka 5: Fundamentální vibrace některých anorganických molekul a aniontů.

Koordináční sloučeniny

Využití IČ spektroskopie v chemii koordinačních a organokovových sloučenin souvisí se změnou symetrie ligandu po koordinaci. Proto je IČ spektroskopie účinným nástrojem při určení typu koordinace. Např. síranový anion (T_d symetrie) má v IČ spektru dva pásy v oblasti

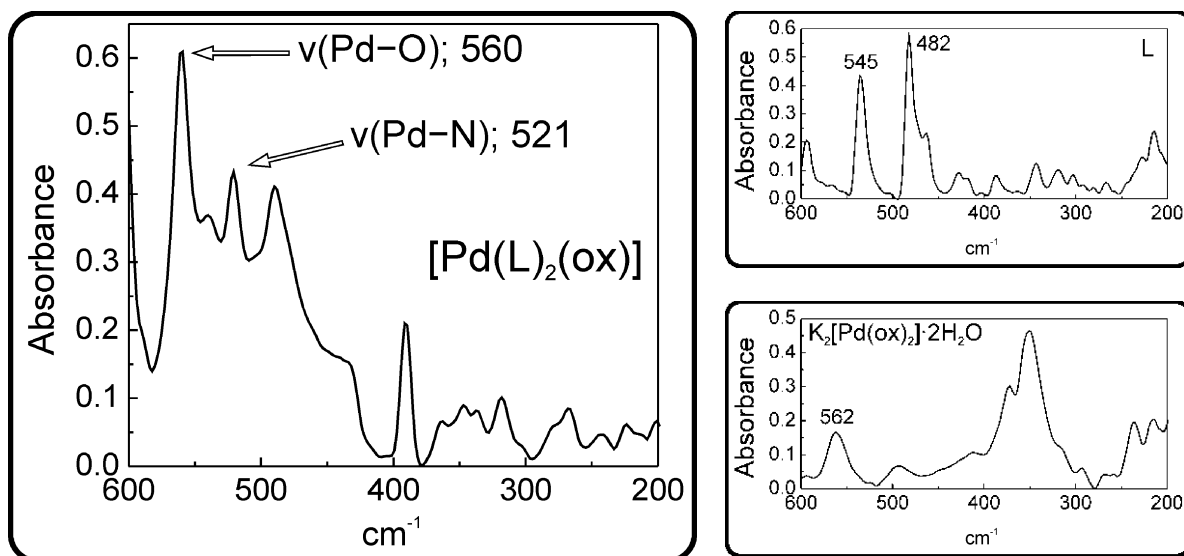
1200–600 cm^{-1} , a to 1104 cm^{-1} (ν_3) a 613 cm^{-1} (ν_4). V komplexu $[\text{Co}(\text{NH}_3)_5\text{OSO}_3]$ má koordinovaný sulfato ligand nižší symetrii (C_{3v}) a v IČ spektru 6 pásů: 970 (ν_1), 438 (ν_2), 1032–1044 a 1117–1143 (ν_3), 645 a 604 (ν_4) cm^{-1} . Pokud je skupina můstkujícím ligandem, symetrie se sníží na C_{2v} a ve spektru se objeví ještě více pásů; pásy ν_3 a ν_4 se každý štěpí na tři píky.

Analýza IČ spekter koordinačních sloučenin se obvykle provádí srovnávacím způsobem, tzn., že navzájem porovnáme spektra „výchozích“ sloučenin (sůl s kationem kovu; sloučeniny, které jsou v komplexu koordinovány jako ligandy) a komplexní sloučeniny, protože takto lze často pomocí zjištěných posunů vibrací ve spektrech usuzovat na způsob koordinace ligandů na centrální atom. Například při koordinaci dimethyl sulfoxidu (DMSO) na různé přechodné kovy pozorujeme při porovnání se spektrem volného DMSO pokles frekvence valenční vibrace S–O při koordinaci přes kyslík, zatímco frekvence vibrace dané vazby se zvýší při koordinaci přes síru.



Obr. 24. IČ spektra Pd(II) oxalato komplexu $[\text{Pd}(2,4\text{diOMeL})_2(\text{ox})] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2-chlor-N6-(2,4-dimethoxybenzyl)-9-isopropyladenin (2,4diOMeL) a $\text{K}_2[\text{Pt}(\text{ox})_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, které vzájemným porovnáním potvrzují přítomnost oxalátu i organické sloučeniny v komplexu.

Spektroskopie ve vzdálené infračervené oblasti je zvláště výhodná pro studium koordinačních sloučenin, protože frekvence vibrací vazeb těžkých atomů (kovů) obvykle pozorujeme v této oblasti.



Obr. 25. IČ spektra ve vzdálené oblasti Pd(II) oxalato komplexu $[\text{Pd}(\text{L})_2(\text{ox})]$, 2-chlor-N6-benzyl-9-isopropyladenin (L) and $\text{K}_2[\text{Pd}(\text{ox})_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, jejichž vzájemné porovnání odhalí přítomnost nových pásů ve spektru komplexu, které podle literatury odpovídají vibracím vazeb Pd–O a Pd–N.

Praktická práce s FT IČ spektrometrem ThermoNicolet Nexus 670



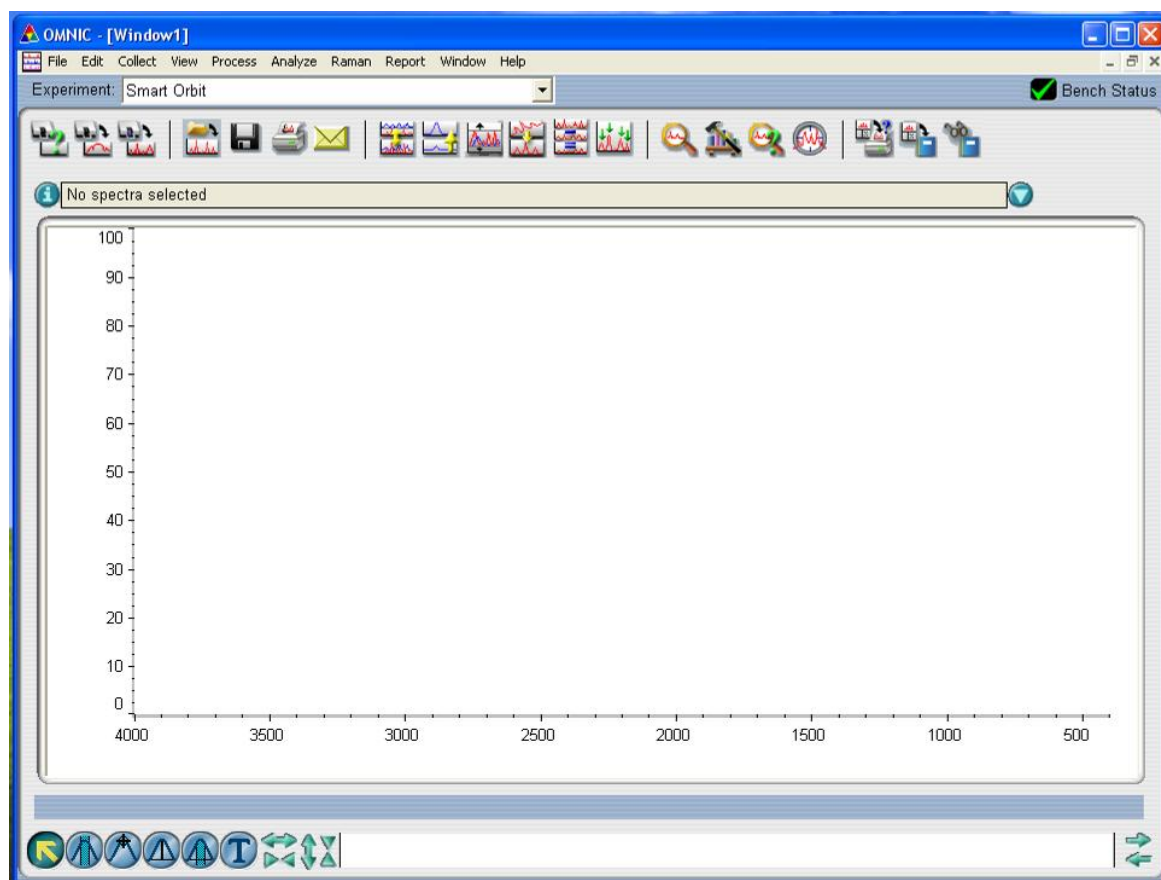
Obr. 26. FT infračervený spektrometr ThermoNicolet Nexus 670 (zde s ATR nástavcem) s NXR 9650 FT-Ramanových nástavcem (vpravo).

Přístroj je jednopaprskový, což znamená, že před každým měřením (či několika měřeními) je nutné změřit spektrum pozadí (optická dráha paprsku vede celým spektrometrem), následně pak měříme spektrum vzorku (optická dráha vede opět celým spektrometrem a navíc vzorkem). Přístroj pak po změření těchto dvou jednopaprskových spekter vypočítá spektrum samotného vzorku. K ovládání a obsluze přístroje slouží software OMNIC, který je nainstalován v ovládacím počítači.

Základní postup práce při měření na spektrometru a obsluha softwaru OMNIC:

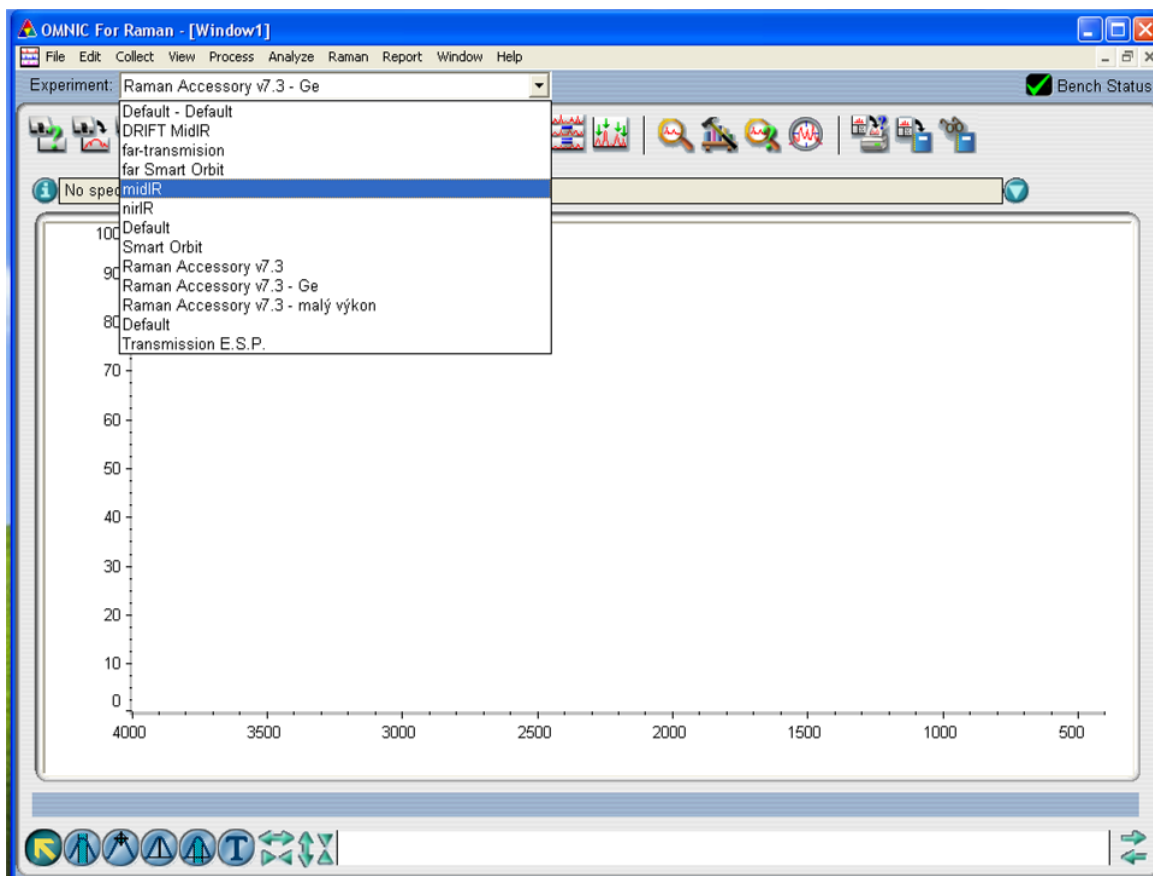
1. Podle požadované techniky měření umístíme do kyvetového prostoru požadovaný nástavec (na transmisní měření, ATR nástavec) a správný dělič paprsků (KBr pro střední oblast, SolidSubstrate pro vzdálenou oblast), zapneme spektrometr (infračervený spektrometr je neustále v pohotovostním režimu pro optimální funkci interferometru, laseru a zdroje; zapnutí se provádí na Ramanově nástavci) a profukování dusíkem (pro minimalizaci vlivu pátů ze vzduchu = zejména CO₂ a vodní pára) – provede pověřený pracovník.
2. Zapneme ovládací počítač, spustíme program OMNIC a vyčkáme spuštění spektrometru. V programu je základní rozrolovávací menu (File, Edit, Collect, View, Process, Analyze, Report, Windows, Help) s operacemi pro měření a zpracování spekter. Základní operace lze jednoduše spustit pomocí ikon, které jsou umístěny pod rozrolovávacím menu. Na ikonách je

přehledně graficky znázorněná proveditelná operace a při přiblížení kurzorem se objeví i krátký anglický popis dané operace.



Obr. 27. Okno programu OMNIC.

3. Nastavíme typ experimentu na liště pod menu podle toho jaké spektrum a jakou technikou chceme měřit – mid IR, far transmission, ATR, far-ATR. Každý daný typ experimentu má již přednastavené měřicí parametry, které lze zkontrolovat v okně „Experiment Setup“ (zelený otazník mezi ikonami). S obsahem okna budete seznámeni před zahájením práce.



Obr. 28. Nastavení typu experimentu v programu OMNIC.

4. Změříme spektrální pozadí kliknutím na ikonu „Collect background“.
5. Provedeme vlastní měření spektra vzorku – podle instrukcí vložíme kyvetu / tabletu / okénko se vzorkem do měřicího prostoru nástavce pro transmisní techniky, případně vložíme vzorek na krystal ATR nástavce a klikneme na ikonu „Collect sample“. Pokud máme v parametrech měření zaškrtnuto „Preview data collection“, objeví se měřicí okno, v němž se zobrazí spektrum změřené během jednoho skenu (= preview) bez akumulace. Takto můžeme zkontrolovat, jestli jsou správně nastaveny parametry měření nebo jestli je vzorek vhodně upraven pro měření (tloušťka vrstvy, dostatečné přilnutí vzorku na ATR krystal apod.). Pro spuštění vlastního měření musíme potvrdit „Start collection“.
6. Zpracujeme změřené spektrum tak, že kliknutím na ikonu „Automatic baseline correct“ softwarově srovnáme základní linii spektra. Spektrum měřené transmisními technikami se zobrazí s absorbancí na ose y. Veškeré úpravy spektra lze provádět v absorbančním módu. Spektrum lze vyhladit, vyříznout určitou část, odečíst od sebe dvě spektra, softwarově přepočítat do transmittančního módu. Tyto operace nalezneme pod rozrolovávacím menu „Process“. Spektra měřená ATR technikou se zobrazí s reflektancí na ose y. Abychom mohli spektra změřená různými technikami navzájem porovnávat, software programu OMNIC

umožňuje přepočítání reflektance na absorbanci pomocí příkazu „Advanced ATR correction“ nebo „Other corrections – ATR“, které opět nalezneme v menu „Process“. Po této úpravě zpracujeme spektrum stejně jako v případě spektra transmisního. Pro identifikaci a označení jednotlivých pásů vlnočtem stiskneme ikonu „Find peaks“ (několik šipek vedle sebe), zobrazí se přímkou, která se objeví tam, kam klikneme myší, a označí pásy pod touto přímkou. Pro manuální označení pásů nebo vymazání označení pásů klikneme na ikonu „T“, kterou nalezneme pod spektrálním oknem. Po označení pásů spektrum uložíme klasicky příkazem „Save as“. Program umožňuje uložit spektrum kromě výchozího formátu s příponou *.spa také jako obrázek *.tif nebo textový soubor (pro programy jako MS Excell nebo Origin) *.csv. Další funkce softwaru OMNIC Vám ukáže pověřený pracovník.

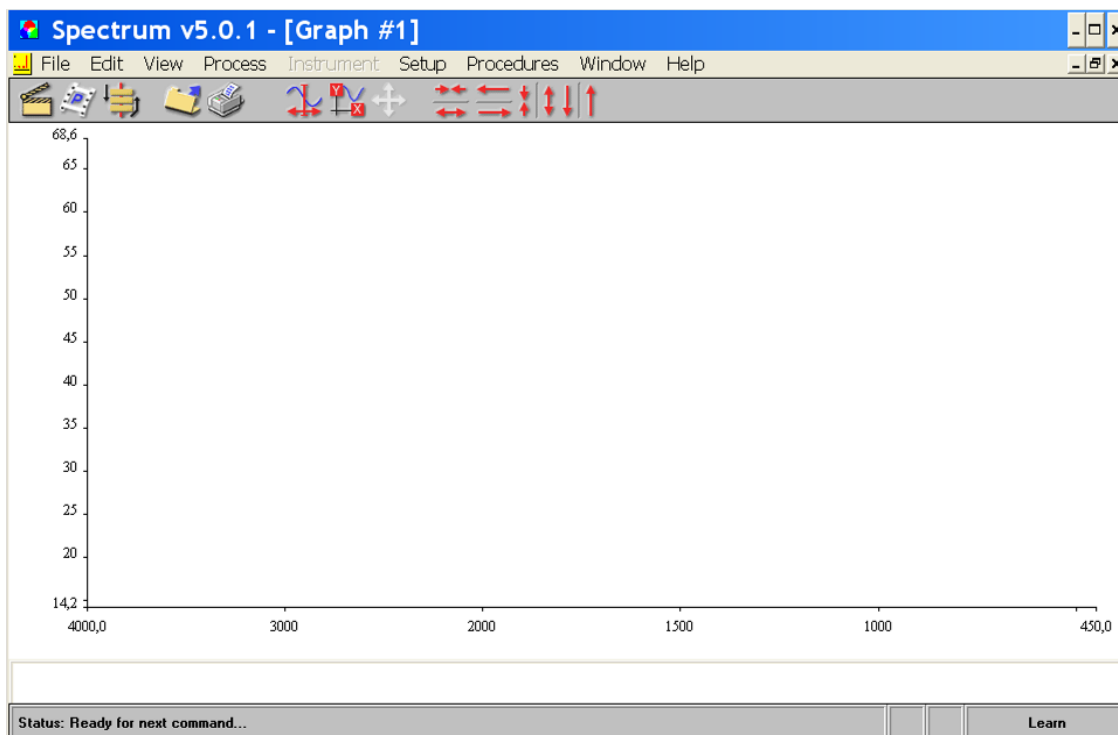
7. Po ukončení práce a uložení spektra můžeme zavřít program OMNIC, nutné je *důkladně vyčistit* vše, co jsme použili ke změření spektra (kyvety, okénka, lis na tablety, třecí misku s tloučkem aj.)!

Praktická práce s IČ spektrometrem Spectrum One (Perkin Elmer)



Obr. 29. IČ spektrometr Spectrum One (Perkin Elmer).

Spektrometr Spectrum One firmy Perkin Elmer je konfigurován na měření spekter pevných látek (v KBr tabletě) ve střední oblasti IČ záření. Praktická práce je analogická se spektrometrem Nexus 670 (Thermo Nicolet). Ovládacím softwarem je Spectrum One (obr. 30), jehož ovládaní uživatel jednoduše odvodí po zvládnutí práce se softwarem OMNIC. Práci s tímto přístrojem budeme demonstrovat na jednom ukázkovém vzorku.



Obr. 30. Základní ovládací okno softwaru Spectrum One.

Postup práce při měření technikou KBr tablety:

Odvážený (0,1-10 mg, záleží na molárním absorpčním koeficientu) sypký vzorek smísíme s odváženým množstvím KBr (100-200 mg) a důkladně rozdrťme ve vibračním mlýnku nebo rozetřeme v achátové třecí misce s tloučkem. Uvedená množství jsou jen informativní, vždy záleží na měřeném materiálu i na potřebné velikosti tablety. Zhomogenizovaný vzorek v ocelové raznici lisujeme v hydraulickém lisu maximálně při tlaku 80 kN, přičemž se vytvoří sklovitá modifikace KBr, u níž dochází jen k malým ztrátám intenzity prošlého IČ záření, spektrální propustnost v rozsahu 50000-450 cm^{-1} . Dobře vylisovaná tableta je průhledná! Vzniklou samonosnou transparentní tenkou tabletu vložíme do držáku a v něm pak vložíme do měřicího prostoru spektrometru

Výhodou této metody je, že ji lze využít pro kvalitativní i kvantitativní účely pro měření ve střední IČ oblasti. **POZOR!** Při přípravě tablety působí na zkoumanou látku velké energie (mletí a lisování) a některé termolabilní látky mohou podléhat chemickým reakcím (hydratace, dehydratace,



Obr. 31. Hydraulický lis na KBr tablety.

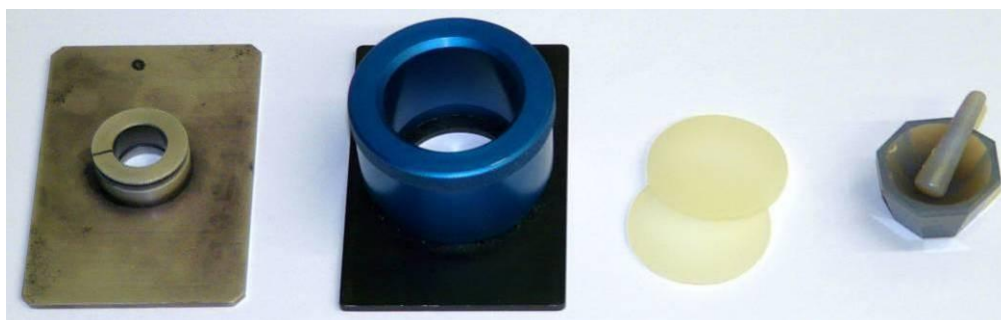
dehalogenace). Iontové sloučeniny mohou navíc vyměňovat ionty s nosným médiem (např. stříbrné soli karboxylových kyselin).

Postup práce při měření nujolovou technikou:

Nujolová technika se s výhodou používá pro měření spekter ve vzdálené IČ oblasti, protože nujol nemá žádnou vlastní absorpci v oblasti nižších vlnočtů ($< 500 \text{ cm}^{-1}$).

Nujolovou suspenzi připravíme analogicky, jak je popsáno u UV-Vis spektroskopie. Suspenzi špachtlí opatrně přeneseme na KBr nebo NaCl (pro střední oblast) nebo polyethylenové (PE, pro vzdálenou oblast) okénko, které přiklopíme druhým okénkem pro vytvoření souvislé vrstvy o konstantní tloušťce a vložíme do držáku, který umístíme do měřicího prostoru spektrometru (pokud vytvoříme suspenzi dobré hustoty, která nestéká z okénka, lze měřit i bez přiklopení druhým okénkem).

Nujolové spektrum dobré kvality získáme, pouze pokud střední velikost dispergovaných částic nedosahuje vlnové délky záření. V opačném případě se uplatňují ohybové jevy a dochází ke značným ztrátám vlivem odrazu, proto je nutné vzorek rozetřít opravdu důkladně. Ovšem krystaly některých látek, které tvoří destičky nebo lístečky, se nedají s nujolem rozetřít za žádných podmínek. Nujolová technika je pohodlnější, rychlejší a vzorky nejsou během přípravy pro měření vystavovány extrémním podmínkám. Tato technika je ale použitelná pouze pro kvalitativní účely. Lze použít i jiné disperzní médium, např. perfluorokerosen (fluorolube).



Obr. 32. Držák na KBr tabletu, držák na PE okénka s nujolovou suspenzí, PE okénka, achátová miska na roztírání vzorku s nujolem (zleva).

Postup práce s kapalinovou rozebíratelnou kyvetou:

Po vyjmutí kyvety z exsikátoru (má okénka z NaCl nebo KBr – materiály citlivé na vlhkost) uvolníme a sejmemo všechny čtyři fixační matice. Poté vytáhneme horní kovové čelo přes těla šroubů a opatrně od sebe oddělíme KBr nebo NaCl okénka, přičemž horní okénko odložíme na suchý filtrační papír. Na dolní okénko, které leží na dolním kovovém čele

kyvety, nakápneme kapátkem dvě až tři kapky zkoumaného vzorku a přiložíme horní okénko tak, aby kapalina vytvořila rovnoměrnou vrstvu bez bublinek. Nasuneme horní kovové čelo, které fixujeme rovnoměrným zašroubováním všech čtyř matic. Stažení musí být rovnoměrné na všech šroubech, matice nikdy nedotahujeme silou, nikdy nedotahujeme jen jednu matici, ale všechny čtyři matice najednou!!! Ve všech fázích práce s kyvetou pracujeme extrémně opatrně, protože okénka jsou křehká a může dojít k jejich prasknutí! Navíc musíme mít na paměti, že okénka *nesmí* v žádném případě přijít do styku s vodou, neboť bychom je tak znehodnotili. Při čištění kyvety po měření ji musíme opět rozebrat. Okénka od sebe opatrně oddělíme a položíme suchými stranami na filtrační papír. Zbytky kapaliny odsajeme buničinou a pak na okénko kápneme pět až šest kapek chloroformu a opět je odsajeme. Tento krok aspoň dvakrát zopakujeme.

Postup práce s ATR nástavcem:

Měření provádíme na nástavci Smart Orbit s diamantovým krystalem. ATR technikou lze měřit vzorky kapalné i pevné. Vzorek musí být v těsném kontaktu s krystalem, proto kapalný vzorek kapeme a pevný vzorek vsypeme přímo na krystal, přičemž pevný vzorek navíc přimáčkneme otočnou hlavicí nástavce. Počet skenů bývá obvykle vyšší než u transmisních technik, protože z podstaty techniky vyplývá nižší citlivost. Diamant má navíc vlastní absorpci kolem 2000 cm^{-1} (dobře patrné při měření pozadí), na což je nutné pamatovat při interpretaci (může dojít ke snížení intenzity nebo úplnému vymizení pásů vibrací v této oblasti). Po skončení měření je nutné krystal důkladně vyčistit (opatrně papírovým ubrouskem



Obr. 33. Smart Orbit ATR nástavec.

a těkavým rozpouštědlem, např. acetonem). O správném vyčištění se lze přesvědčit kontrolou tak, že prohlédneme spektrální „preview“ po kliknutí na ikonu „Collect sample“, nesmí pak být patrné žádné spektrální rysy předchozího vzorku nebo acetonu.

Praktické úkoly:

A. Infračervená spektra ve střední oblasti organických látek

Úkol: Změřte IČ spektra vybraných organických látek KBr technikou a porovnáním spektra s knihovnou spekter a se změřenými látkami identifikujte neznámý vzorek. U jednotlivých spekter identifikujte pásy základních vibrací (funkčních skupin).

Pomůcky a chemikálie: achátová miska s tloučkem, vibrační mlýnek, analytické váhy, špachtle, ocelová raznice na tablety, hydraulický lis, IČ spektrometr ThermoNicolet Nexus 670, držák na tablety

KBr, kyselina benzoová, kyselina anthranilová, kyselina šťavelová, 1,10-fenantrolin, kyselina salicylová, neznámý vzorek

Postup: Podle výše popsaného postupu si připravíme tabletu nejprve pouze z KBr, abychom zjistili, jaké části spektra nebudeme interpretovat jako pásy měřených organických látek. Poté připravíme KBr tablety z vybraných organických látek, změříme spektra a zpracujeme je. Poté změříme spektrum neznámého vzorku, zpracujeme jej a pomocí knihovny spekter provedeme prvotní identifikaci (menu „Analyze“ – „Library Setup“ – „Search“; knihovna identifikuje procentuální shodu s uloženými spektry, může nám dát více ekvivalentních možností). Následným porovnáním naměřených spekter organických látek a neznámého vzorku určíme, o jakou látku se jedná. Z práce vypracujeme protokol, do něhož provedeme navíc identifikaci základních vibrací funkčních skupin jednotlivých organických látek.

B. Infračervená spektra organických látek měřená ATR technikou ve střední oblasti

Úkol: Změřte IČ spektra kyselin benzoové a anthranilové na ATR nástavci.

Pomůcky a chemikálie: IČ spektrometr ThermoNicolet Nexus 670 s vloženým ATR nástavcem, špachtle, stříčka s acetonem, kyseliny benzoová a anthranilová

Postup: Podle výše popsaného postupu změříme spektra zadaných látek a porovnáme je se spektry měřenými technikou KBr tablety. Zhodnotíme výhodnost jednotlivých technik zejména s důrazem na funkční skupiny –OH a –NH. Zpracujeme protokol, do něhož vložíme překrytí spekter látek měřených různými technikami.

C. Identifikace aniontu neznámé látky ve vodném roztoku.

Úkol: Identifikujte anion neznámé látky rozpuštěné ve vodném roztoku.

Pomůcky a chemikálie: IČ spektrometr ThermoNicolet Nexus 670 s vloženým ATR nástavcem, špachtle, mikropipeta, stříčka s acetonem,

Destilovaná voda, roztok neznámé soli, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{Cu}(\text{BF}_4)_2$, $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$

Postup: ATR technikou změříme pevné vzorky vybraných měďnatých solí a spektra zpracujeme. Pak změříme IČ spektrum destilované vody ATR technikou. Změříme IČ spektrum roztoku neznámé měďnaté soli ATR technikou. Odečteme spektrum destilované vody od spektra neznámého vzorku, a to tak, že ve spektrálním okně máme obě spektra, musíme je kurzorem označit (obě musí být červená) a v menu zvolíme „Process“ – „Subtract“. Vzniklé rozdílové spektrum uložíme pod novým jménem. Spektrum zpracujeme obvyklým způsobem a pomocí knihovny provedeme prvotní identifikaci. Poté porovnáním s ostatními spektry přesně určíme neznámý vzorek. Vypracujeme protokol, do kterého provedeme interpretaci spekter s určením základních vibrací aniontů.

D. Infračervená spektra ve vzdálené oblasti jednoduchých komplexních sloučenin měřená nujolovou technikou.

Úkol: Změřte IČ spektra ve vzdálené oblasti jednoduchých komplexních sloučenin nujolovou technikou.

Pomůcky a chemikálie: IČ spektrometr ThermoNicolet Nexus 670, achátová miska s tloučkem, špachtle

Nujol, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $[\text{Cu}(\text{NH}_3)_4]\text{SO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

Postup: Nejdříve změříme spektrum samotného nujolu na polyethylenových okénkách, abychom zjistili, jaké části spektra nebudeme interpretovat jako pásy měřených látek. Poté podle výše popsaného postupu připravíme suspenze vybraných látek a změříme jejich spektra ve vzdálené oblasti, spektra zpracujeme a uložíme. Porovnáním dat z doporučené literatury identifikujeme ve spektrech pásy Cu–O nebo Cu–N, čímž ověříme koordinaci (v případě modré skalice – je voda krystalová nebo koordinovaná?) jednoduchých ligandů na Cu(II). Vypracujeme protokol a uvedeme návrh interpretace poloh vibrací koordinačních vazeb a literaturu, z níž jsme při interpretaci čerpali.

Použitá a doporučená literatura:

1. J. Lindon, D. Koppenaal: *Encyclopedia of spectroscopy and spectrometry, 2nd Ed.*, Academic Press; 2010.
2. K. Nakamoto: *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds, Part A: Theory and Applications in Inorganic Chemistry, 6th Ed.*, John Wiley and Sons; 2009.
3. K. Nakamoto: *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds, Part B: Applications in coordination, organometallic, and bioinorganic chemistry, 6th Ed.*, John Wiley and Sons; 2009.
4. B.C. Smith: *Infrared Spectral Interpretation: A Systematic Approach*, CRC Press; 1999.
5. G. Socrates: *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies*, John Wiley and Sons, 2001.
6. P. Kania: *Infračervená spektroskopie*; http://www.vscht.cz/an1/lach1/7_IC.pdf.
7. Materiály firmy Nicolet CZ:
<http://www.nicoletcz.cz/userfiles/file/Aplikace/IntroductionToFTIR.pdf>.
www.nicoletcz.cz/webinars/.

Ramanova spektroskopie

Ramanova spektroskopie je řazena stejně jako spektroskopie infračervená mezi nedestruktivní vibrační molekulové spektroskopie. Název metody nám prozradí pouze, že výsledkem měření je spektrum, tedy závislost ramanské intenzity na vlnočtu záření.

Metoda je pojmenována po indickém fyzikovi **Siru Chandrasekharu Venkata Ramanovi** (Nobelova cena 1930), který v roce 1928 s K.S. Krishnanem popsal fenomén neelastického rozptylu světla. Záření rozptýlené molekulami obsahuje fotony o stejné frekvenci, jako mělo dopadající záření, ale také může obsahovat fotony se změněnou nebo posunutou frekvencí. Spektroskopická metoda měření těchto frekvenčně posunutých fotonů byla tedy později pojmenována po Siru Ramanovi a posun frekvence fotonů bývá označován jako Ramanův jev.

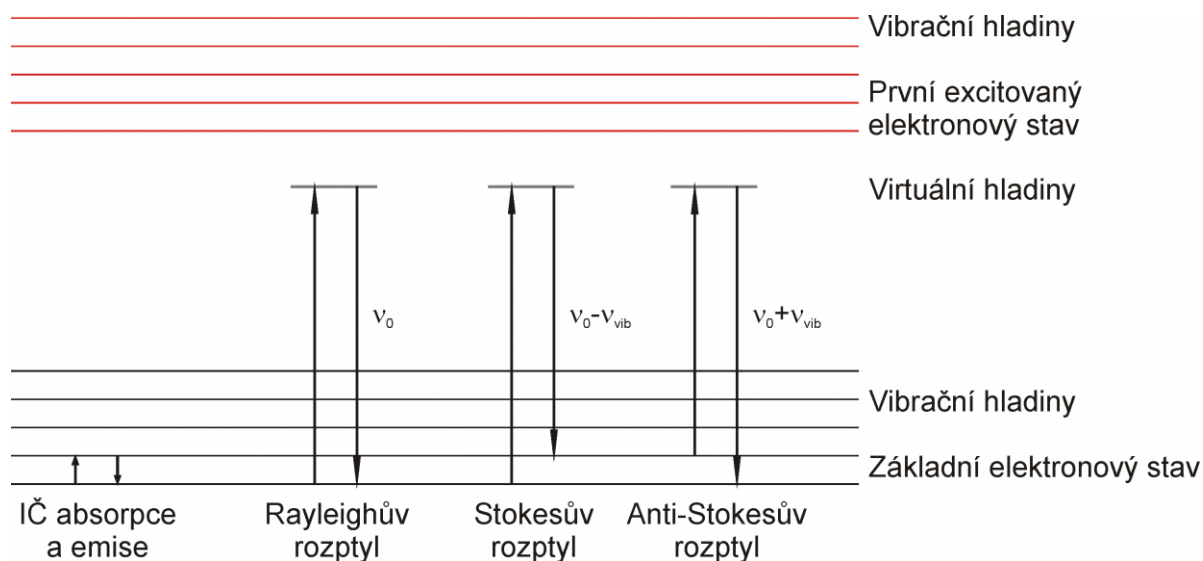


Obr. 34. C.V. Raman.

Dnes díky vyvinuté instrumentaci a téměř nulové nutné přípravě vzorku pro měření se metoda s výhodou využívá při identifikaci látek, určování jejich struktury a složení. Využití našla při studiu pevných látek (krystalické i amorfni materiály, kovy, polovodiče, polymery), kapalin (čisté látky, roztoky vodné i nevodné), plynů, při analýze povrchů (např. sorbenty, elektrody, senzory) nebo analýze biologických systémů (od biomolekul až po organismy). Ve farmaceutickém průmyslu se používá při identifikaci látek, charakterizaci vstupních materiálů, kvalitativní i kvantitativní analýze finálních léčiv. V kombinatoriální chemii se uplatňuje při analýze polymorfie či povrchové struktury. V medicíně v klinické praxi se využívá *ex vivo* a *in vivo* například při časně detekci rakoviny, monitorování efektů různých látek na kůži, rychlé identifikaci patogenních organismů. Hojně se používá i ve forenzní analýze, protože umožňuje studium látek bez nutnosti odstranění jejich obalu nebo vyndání materiálu z důkazního sáčku. Díky této výhodě se využívá při analýze zadržených nelegálních drog, laboratorních vzorků, výbušnin či vláken. Ramanova spektroskopie se dále využívá v analýze polovodičů a mikroelektroniky, v potravinářském a textilním průmyslu, petrochemii, mineralogii a geochemii a samozřejmě i ve výzkumu při charakterizaci nově připravených látek (komplexní sloučeniny, nanomateriály apod.). Výhodou je také možnost měření vzorků ve vodných roztocích.

Podstatou Ramanovy spektroskopie je zářivý dvoufotonový přechod mezi dvěma stacionárními vibračními stavy molekuly. Vzorek je ozářen silným monochromatickým zářením (obvykle je zdrojem laser). Většina záření se od vzorku elasticky odrazí, tedy

odražené záření (ν_R) má stejnou vlnovou délku jako záření dopadající (ν_0). Tento proces se označuje jako **Rayleighův rozptyl** ($\nu_R = \nu_0$). Malá část záření – asi jeden foton z milionu (0,0001%) – se však od vzorku odrazí neelasticky, tedy pozorujeme posun vlnové délky odraženého záření vzhledem k dopadajícímu záření. Obecně si neelastický (nepružný) odraz (srážku) můžeme popsat takto: *je to taková srážka, při které je část kinetické energie srážejících se těles během srážky přeměněna na vnitřní energii, tedy kinetická energie alespoň jednoho ze srážejících se těles se nezachovává.*

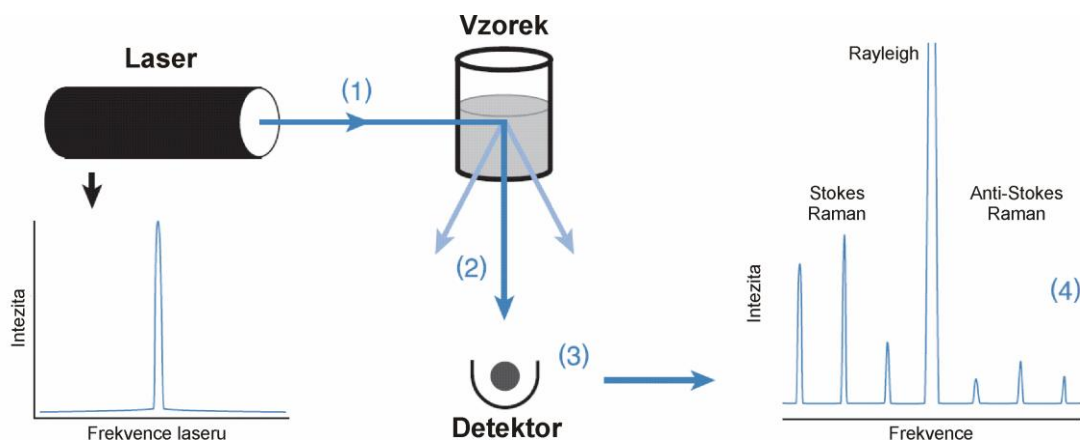


Obr. 35. Schematické zobrazení dvoufotonových přechodů ($\Delta E_{vib} = h \cdot \nu_{vib}$, energetický rozdíl mezi vibračními hladinami).

Když se podíváme na zjednodušený diagram energetických hladin (Obr. 35), molekula před ozářením je v základním vibračním i elektronovém energetickém stavu. Elektrické pole laseru zvedne energii systému tím, že způsobí změnu polarizovatelnosti chemické částice (tj. změnu energetické náročnosti deformovatelnosti elektronového obalu molekuly vlivem elektrického pole zvenčí). Polarizovatelný stav částice s vyšší energií nepředstavuje reálnou vyšší energetickou hladinu, ale bývá označován jako „virtuální energetický stav“. Relaxace z virtuálního stavu probíhá téměř okamžitě, a to Rayleighovým rozptylem ($\nu_R = \nu_0$). Minoritní neelastický rozptyl má za důsledek záření o jiné energii, než je energie dopadajícího záření ($\nu_R = \nu_0$). Rozlišujeme dva druhy takového záření. Pokud je molekula excitována fotonem ($E_0 = h\nu_0$) na virtuální energetickou hladinu, která je vlastně poruchou v elektronové distribuci kovalentní vazby, vrací se ne do základního, ale do prvního excitovaného vibračního stavu za současné emise fotonu s nižší energií ($E = h\nu_R$; $\nu_R = \nu_0 - \nu_{vib}$). Záření s nižší energií (vyšší vlnovou délkou) označujeme jako **Stokesův rozptyl**. Většina systémů má

alespoň částečně obsazené i vyšší vibrační energetické stavy. Když proběhne Ramanův jev u systému z vyššího vibračního stavu, stále je možná relaxace do základního energetického stavu. Takovéto rozptýlené záření má pak vyšší energii (menší vlnovou délku) než dopadající záření ($\nu_R = \nu_0 + \nu_{\text{vib}}$) a nazývá se **Anti-Stokesův rozptyl**.

Aby byl daný vibrační mód aktivní v Ramanově spektru, je nutná **změna polarizovatelnosti** během vibračního pohybu. Tuto podmínku lze označit za základní výběrové pravidlo pro Ramanovu spektroskopii, které je tedy odlišné pro pozorování vibračního módu v infračervené spektroskopii, kde touto základní podmínkou je změna dipólového momentu během příslušného vibračního pohybu. Pokud je tedy daný vibrační mód aktivní v Ramanově spektru, bude pro něj možné pozorovat dvě linie, a to symetricky rozložené kolem linie Rayleighova rozptylu – ve Stokesově a Anti-Stokesově oblasti. Ve většině případů jsou však měřena spektra pouze v oblasti Stokesova rozptylu vzhledem na nutnost odfiltrovat Rayleighův rozptyl, jehož intenzita je cca 10^5 - 10^{12} -krát vyšší než intenzita běžných Ramanových linií.

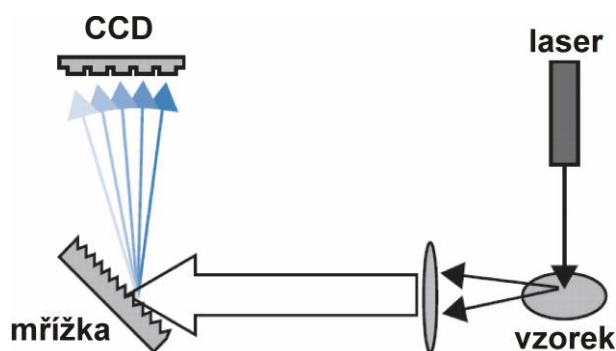


- (1) Záření laseru excituje vzorek.
- (2) Toto záření je vzorkem rozptýleno do všech směrů.
- (3) Část tohoto rozptýleného záření je fokusována na detektor.
- (4) Ramanovo spektrum vykazuje frekvenční pásy v místě původní frekvence laseru (Rayleigh) a ramanovské spektrální pásy charakteristické pro daná vzorek.

Obr. 36. Schéma měření Ramanova spektra [podle materiálů fy Nicolet].

Ramanova spektra měříme na **Ramanových spektrometrech**. Užívají se dvě různé technologie, z nichž každá má své výhody a využití ve specifických typech analýz: disperzní spektrometry a spektrometry s Fourierovou transformací. Hlavními součástmi spektrometrů obecně jsou: zdroj excitujícího záření (laser), vzorkovací prostor (komora), sběrná optika, disperzní prvek (disperzní spektrometry) / interferometr (FT spektrometry), detektor.

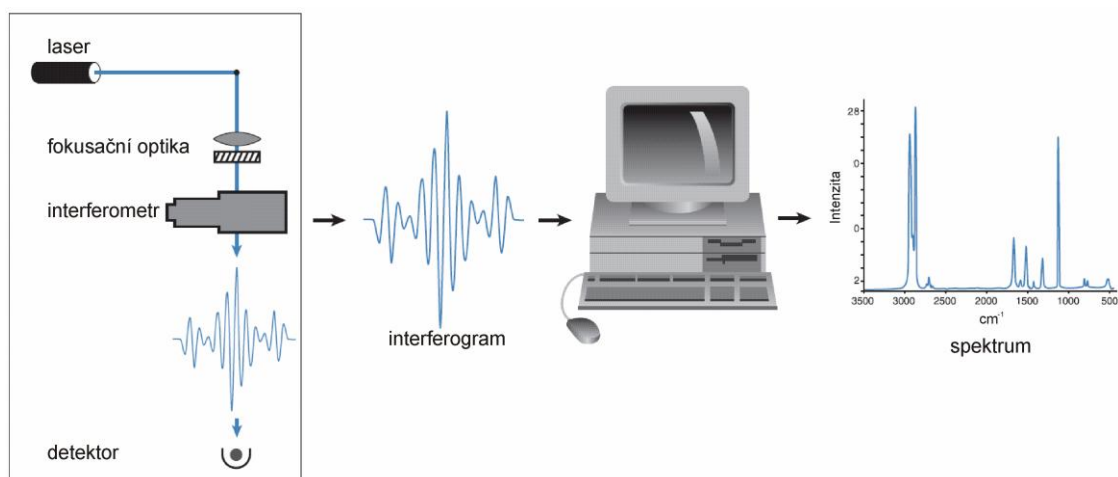
- a) Disperzní Ramanův spektrometr – pro pozorování Ramanova spektra je nutná separace Ramanova rozptýleného záření na jednotlivé vlnové délky. U disperzních spektrometrů toho dosahujeme pomocí fokusace Ramanova signálu na mřížku (disperzní prvek), která prostorově oddělí jednotlivé vlnové délky. Takto prostorově dispergovaný paprsek je pak fokusován na plošný CCD detektor (charge-coupled device). Jako zdroj bývá nejčastěji používán laser s excitačním zářením v UV-Vis oblasti s typickými vlnovými délkami 780 nm, 633 nm, 532 nm a 473 nm. Výhodou excitace v UV-Vis oblasti je vyšší intenzita



Obr. 37. Schéma disperzního Ramanova spektrometru [podle materiálů fy Nicolet].

- rozptylu (intenzita rozptylu klesá se čtvrtou mocninou vlnové délky excitujícího záření), naopak zásadní nevýhodou jsou rizika velmi intenzivní *fluorescence* nebo nežádoucích fotochemických reakcí. Fluorescence je silnou emisí záření intenzivnější o několik řádů než ramanovský signál. K fluorescenci dochází, pokud se virtuální hladina prolíná s oblastí vyšších elektronových hladin, takže čím vyšší energie laseru (menší vlnová délka), tím pravděpodobnější je fluorescence. Tento jev závisí na energii excitace, takže vzorek, který fluoreskuje při jedné vlnové délce, již nemusí při jiné. Mřížka má velký vliv na spektrální rozlišení. Čím vyšší počet vrypů je na mřížce (1800-2400 vrypů/mm, tím širší je disperzní úhel rozptýlených paprsků.
- b) FT-Ramanův spektrometr – jako zdroj se uplatňuje laser s excitačním zářením v blízké IČ oblasti (např. 1064 nm Nd:YVO₄ laser). Použitím laseru o nižší energii mají i virtuální hladiny nižší energii, a tak je nižší pravděpodobnost jejich překryvu s vyšší elektronovou hladinou, tedy i nižší pravděpodobnost fluorescence. Nižší energie excitace vzhledem k nižší intenzitě rozptylu vyžaduje systémy o vysoké světelnosti a vysoce citlivé (chlazené) detektory. Tok záření Ramanova rozptylu obecně též roste se zvyšujícím se tokem excitujícího laserového záření, to znamená se zvyšujícím se výkonem laseru („laser power“). Výkon laseru je ale limitován riziky ohřevu vzorku, jeho rozkladu, příp. riziky dalších nežádoucích fotochemických a fotofyzikálních procesů. Výkon laseru je možné softwarově nastavit a přizpůsobit jeho hodnotu vlastnostem vzorku, požadavkům na rychlost analýzy a na hodnotu poměru signál/šum. Jako detektory se často používají indium gallium arsenidové (InGaAs)

nebo kapalným dusíkem chlazené Ge detektory. Stejně jako FT-IČ spektrometry, používají FT-Ramanovy spektrometry pro zvýšení citlivosti, možnost rychlého měření všech vlnových délek najednou a velkou přesnost vlnových délek díky interní kalibraci *interferometr*. Princip interferometru s děličem paprsků (CaF_2), pevným a pohyblivým zrcadlem byl popsán u infračervené spektroskopie. Výstupem FT-Ramanovského interferometru je také *interferogram*, který obsahuje veškeré spektrální informace. Interferogram je pak Fourierovou transformací převeden z časové škály do frekvenční nebo vlnočtové.



Obr. 38. Schéma měření spektra na FT Ramanově spektrometru s interferometrem [materiály fy Nicolet].

Ramanova spektra obecně se měří se vzorky umístěnými v uzavřeném vzorkovém prostoru, který je obvykle upraven pro měření vzorků v různých skleněných vzorkovnicích (ampulích, vialkách, kyvetách pro UV-Vis spektrometrii či kyvetách pro NMR spektrometrii). Takto lze měřit kapaliny či práškové vzorky velmi malého objemu. Existuje ale i množství speciálních držáků, např. pro měření pevných vzorků, pro proměrování tenkovrstvých chromatogramů nebo vzorků na kapkovacích destičkách. Důležitým aspektem umístění vzorku v kyvetovém prostoru je též možnost jeho přesného polohování vůči excitujícímu paprsku a sběrné optice rozptýleného záření. Přístroje bývají vybaveny x - y - z polohovacím zařízením s manuálním ovládním nebo s krokovými motory s řízením pomocí joysticku, tlačítek nebo ovládacího softwaru. Takováto zařízení právě umožňují fokusovat paprsek přímo do vzorku umístěného v obalu, sáčku, kyvetě apod.

Existují také mnohé další techniky a uspořádání měření Ramanových spekter, které mají již ovšem více specializované použití (rezonanční Ramanova spektroskopie, povrchově zesílená Ramanova spektroskopie SERS). Ramanův spektrometr může být například propojen

s optickým mikroskopem, resp. vzorkovací prostor je nahrazen optickým mikroskopem (mikro-Raman), s využitím především v analýzách povrchů včetně jejich spektrálního mapování. Ramanova spektra lze měřit i *in situ*, většinou s využitím vláknové optiky s různými typy sond, které mohou být umístěny například přímo v chemickém či biotechnologickém výrobním reaktoru.

Proč je tedy Ramanova spektroskopie uživatelsky zajímavou analytickou technikou?

Velkou výhodou jsou téměř žádné požadavky na úpravu vzorku před měřením v kombinaci s množstvím informací, které lze, například ve spolupráci se spektrálními knihovnami, ze spektra získat. Jediné, co vlastně musíme se vzorkem udělat, abychom získali spektrum, je umístit ho do optické dráhy excitačního paprsku. Nemusíme se starat o tloušťku vzorku (jako například u transmisních technik IČ spektroskopie) ani o příspěvek okolní atmosféry, takže není nutné měření ve vakuu, atmosféře suchého vzduchu nebo dusíku. Sklo, voda a plastové obaly mají velmi slabé ramanské signály, což je samozřejmě další velkou výhodou při měření Ramanových spekter vzorků přímo ve skleněných nádobách, plastových baleních (takže mizí nebezpečí kontaminace vzorku) a vodných roztocích. Je to metoda nedestruktivní, takže ubývá nutnost vzorek rozpouštět, lisovat do tablet, připevňovat na optické nosiče nebo jinak zasahovat do fyzikální (nebo i chemické) struktury vzorků. Proto se Ramanova spektroskopie s výhodou využívá při studiu krystalinity, fázových přeměn nebo polymorfie. Další výhodou je, že Ramanova spektroskopie umožňuje měřit spektrum v širokém rozsahu vlnočtů, tedy v jednom měření obsáhneme jak střední, tak vzdálenou infračervenou oblast vlnočtů vibračních módů bez nutnosti měnit děliče paprsků nebo znovu upravovat vzorek, jako je tomu u IČ spektroskopie. A navíc, žádné dvě látky nemají naprosto shodné Ramanovo spektrum, což umožňuje jednoznačnou identifikaci látky, interpretaci spektra a vyhledávání ve spektrálních knihovnách.

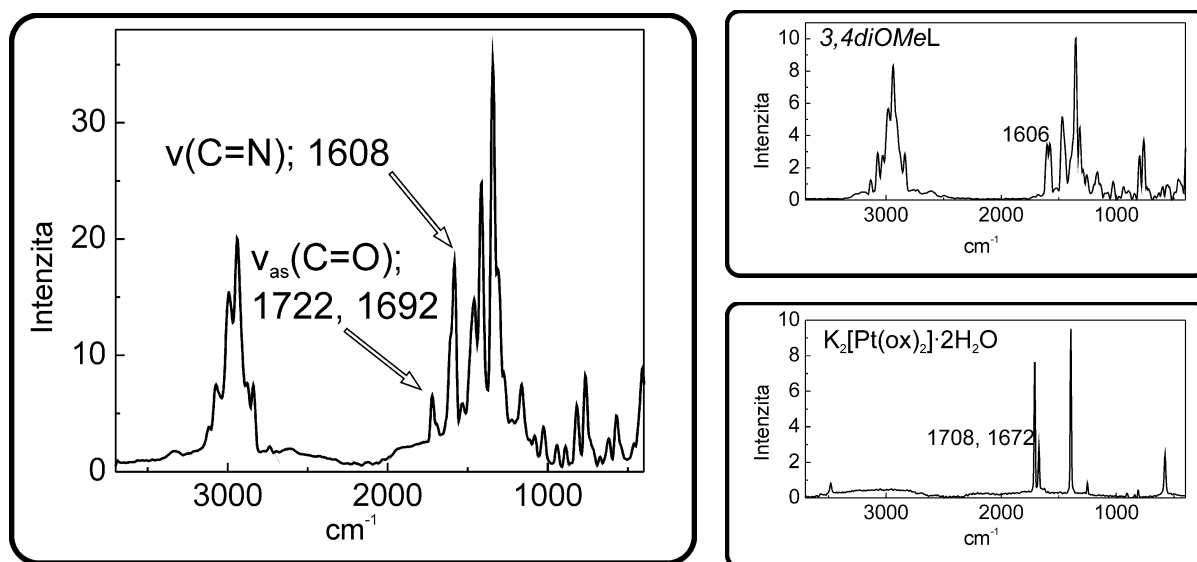
Z hlediska **interpretace a strukturní analýzy** poskytují Ramanova spektra stejně jako infračervená spektra informace o vibračně-rotacích pohybech polyatomických částic. Frekvence normálních vibračních módů závisí na hmotnostech zúčastněných atomů a na síle vazeb mezi nimi, tj. na základních parametrech popisujících strukturu molekuly. Informace, které získáme z Ramanových spekter, jsou často srovnatelné a navíc komplementární k infračervené spektroskopii. Vibrační frekvence molekul jsou nezávislé na tom, zda je studujeme infračervenou nebo Ramanovou spektroskopií, ale intenzity spektrálních linií budou odlišné. Základní podmínkou pozorovatelnosti vibračního módu v Ramanově spektru je změna polarizovatelnosti během vibračního pohybu, zatímco v infračerveném spektru je

zásadní změna dipólového momentu. Takže např. u molekuly CO_2 se symetrická valenční vibrace (dochází k deformaci elektronového obalu, tedy ke změně polarizovatelnosti, ale dipólmoment se nemění) projeví jen v Ramanově spektru a asymetrická valenční vibrace jen v IČ spektru. Některé vibrační pohyby jsou pozorovatelné oběma metodami, některé pozorujeme jen Ramanovou / IČ spektroskopii. Proto se tyto metody navzájem výborně doplňují.

Přiřazení pásů jednotlivým vibračním modům se provádí podobně jako při interpretaci absorpčních spekter ve střední a vzdálené IČ oblasti. Takže pozorujeme oblast vibrací funkčních skupin a také oblast „otisku palce“. Ale zatímco v IČ spektrech jsou intenzivní pásy pro vibrace polárních skupin, např. $-\text{OH}$, $-\text{C}=\text{O}$, $-\text{NO}_2$ (s výraznou změnou dipólového momentu), v Ramanových spektrech jsou intenzivnější pásy pro symetrické vibrace a vibrace ve fázi než pro vibrace asymetrické a v protifázi, obzvláště intenzivní pak jsou pásy vícenásobných symetrických vazeb – např. $-\text{C}\equiv\text{C}-$, $-\text{C}=\text{C}-$, $-\text{N}=\text{N}-$ (výrazná změna polarizovatelnosti). Vzhled infračervených a Ramanových spekter je tak silně ovlivněn symetrií molekul (buněk krystalu) a symetrií jednotlivých vibračních pohybů. Pro molekuly s nízkou symetrií (charakterizované pouze prvkem symetrie „identita“) jsou pásy všech vibrací pozorovatelné v obou typech spekter jen s odlišnou intenzitou. Pro molekuly s vysokou symetrií se IČ a Ramanova spektra navzájem informačně doplňují. Např. pro molekuly se středem symetrie platí princip alternativního zákazu, tj. pásy vibrací patrné v Ramanově spektru jsou zakázány v IČ spektru a naopak; plně symetrické vibrace jsou aktivní v Ramanově spektru a v IČ spektru jsou neaktivní. Na rozdíl od IČ spekter se dají velmi snadno identifikovat i symetricky substituované skupiny, resp. skelety molekul. Např. symetricky substituovaná trojná vazba se obvykle projevuje velmi silným pásem valenční $\text{C}\equiv\text{C}$ vibrace v oblasti $2260\text{--}2160\text{ cm}^{-1}$. Je tak možné ji jednoznačně odlišit od nesymetricky substituované $\text{C}=\text{C}$ vazby ($2180\text{--}2100\text{ cm}^{-1}$). Dále se v Ramanových spektrech výrazně projevuje dvojná $\text{C}=\text{C}$ vazba valenční vibrací v oblasti $1690\text{--}1630\text{ cm}^{-1}$ pro nekonjugované alkeny a v oblasti $1660\text{--}1580\text{ cm}^{-1}$ pro konjugované alkeny. Naopak pouze slabými pásy se projevují $\text{C}=\text{O}$ vazby v ketonech, esterech, amidech atd. Na rozdíl od infračervené spektroskopie lze pomocí Ramanovy spektroskopie úspěšně charakterizovat technicky významné prvkové materiály, např. uhlíkové materiály (grafitické vrstvy, saze, přírodní i umělé diamanty atp.) a křemíkové materiály (elektronika).

Na obrázku 39 jsou příklady Ramanových spekter Pt(II) oxalato komplexu s dvěma monodentátně N7-koordinovanými molekulami 2-chlor-N6-(3,4-dimethoxybenzyl)-9-isopropyladeninu a jedním bidentátně koordinovaným aniontem oxalátu (šřavelanu). Toto

spektrum komplexu bylo porovnáno se spektry samotných výchozích sloučenin, tedy adeninového derivátu a dihydrátu bis(oxaláto)platnatanu draselného. Toto porovnání prokazuje přítomnost obou látek ve výsledném komplexu. Pokud porovnáme tato spektra s IČ spektry analogického Pd(II) oxalato komplexu na obr. 24, zjistíme, že v Ramanových spektrech výrazně poklesla intenzita vibrací $\nu(\text{C}=\text{O})$ a $\nu(\text{C}=\text{N})$ a naopak nejvýraznějšími vibracemi jsou $\nu(\text{C}=\text{C})$ a obecně vibrace purinového skeletu (cca. 1300 cm^{-1}).



Obr. 39. Ramanova spektra Pt(II) oxalato komplexu $[\text{Pt}(3,4diOMeL)_2(\text{ox})]$, 2-chlor-N6-(3,4-dimethoxybenzyl)-9-isopropyladenin (*3,4diOMeL*) a $\text{K}_2[\text{Pt}(\text{ox})_2]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, které vzájemným porovnáním potvrzují přítomnost oxalátu i organické sloučeniny v komplexu.

Pravidla interpretace Ramanových spekter jsou analogická jako i IČ spektroskopie a byla již v tomto textu popsána. Proto následující tabulka jen stručně shrne charakteristické vibrace vybraných vazeb a skupin v Ramanových spektrech.

	Vybrané valenční vibrace			Další charakteristické pásy
	rozsah (cm^{-1})	Int.	přirazení	rozsah (cm^{-1})
Voda (krystalová, rozpuštědlo)	3600–3100	m,	$\nu(\text{OH})$, široký	1645–1615
	1645–1600	v	$\delta(\text{H}_2\text{O})$	–
Alkany	2995–2940	m	$\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$	2895–2840
	2955–2915	m	$\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$	2880–2835
	2895–2840	m-s	$\nu_{\text{s}}(\text{CH}_3)$	1470–1385
	2880–2830	m-s	$\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$	1480–1385
	1255–1165	m	$\nu(\text{CC})$, $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$	1029–980, 930–925, 360–270
	1175–1130	w	$\nu(\text{CC})$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	955–900 (m), 840–790, 495–490 (skeletální)
Alkeny	3120–3050	m	$\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$, $=\text{CH}_2$	3050–2960
	3050–2960	m	$\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$, $=\text{CH}_2$	1685–1620
	1685–1620	s	$\nu(\text{C}=\text{C})$, $\text{C}=\text{CH}_2$	1440–1360

	3060–2995	m	$\nu(\text{CH})$, =CH– (vnitřní dvojná vazba)	izolované 1685–1620 konjug. 1660–1580
	1685–1620	s	$\nu(\text{C}=\text{C})$, izol.	1440–1190
	1660–1580	s-m	$\nu(\text{C}=\text{C})$, konjug.	1440–1190
	1440–1340	s-m	$\nu(\text{C}=\text{C})$, cyklické, vibrace nenas. kruhů	–
Alkyny	3340–3280	w-m	$\nu(\text{CH})$, $-\text{C}\equiv\text{CH}$	2150–2100
	2150–2100	s-m	$\nu(\text{C}\equiv\text{C})$, $-\text{C}\equiv\text{CH}$	1020–905
	1020–905	w-m	$\nu(\text{C}-\text{C}\equiv\text{C})$, $\text{C}-\text{C}\equiv\text{CH}$	370–220
Areny	3105–3000	m-s	$\nu(\text{CH})$, Ar	1630–1590
	1630–1590	m-s	$\nu(\text{C}=\text{C})$, Ar	1590–1575
	1590–1575	var	$\nu(\text{C}=\text{C})$, Ar	1470–1425 (w), 1290–990 (w)
Alkoholy & Fenoly	3670–3580	w	$\nu(\text{OH})$ volné, ostré	1420–1260
	3600–3400	w	$\nu(\text{OH})$, H–vazba	1440–1300
	1260–1170	m-w	$\nu(\text{CO})$, Ar–OH	–
	1215–1100	m-s	$\nu(\text{CO})$, $\text{R}_3\text{C}-\text{OH}$ (terc.)	800–750
	1150–1070	s-m	$\nu(\text{CO})$, $\text{R}_2\text{CH}-\text{OH}$ (sek)	900–800
	1090–1000	s-m	$\nu(\text{CO})$, $\text{R}-\text{OH}$ (prim)	900–800
	900–800	s-m	$\nu(\text{CCO})$, $\text{R}-\text{OH}$ (prim, sek)	–
Aminy	3550–3280	m-w	$\nu_{\text{as}}(\text{NH}_2)$, prim. aminy	3450–3160
	3450–3160	w	$\nu_{\text{s}}(\text{NH}_2)$, prim. aminy	1660–1580
	3500–3300	w	$\nu(\text{NH})$, sek. aminy	1580–1490
	1360–1200	m-w	$\nu(\text{CN})$, prim. aminy níž	1280–1020
Aldehydy & Ketony	2850–2800	w	$\nu(\text{CH})$, $-\text{CHO}$, aldehyd	2745–2650 (s-m)
	1745–1650	w-m	$\nu(\text{C}=\text{O})$, aldehyd	1440–1325
	1750–1690	m	$\nu(\text{C}=\text{O})$, nasyc. keton	1325–1175
	1705–1650	m-w	$\nu(\text{C}=\text{O})$, $\text{ArCO}-$, nenas. keton	1320–1280
Karboxylové kyseliny & deriváty	3580–3500 (kyseliny)	w	$\nu(\text{OH})$, $-\text{COOH}$	1800–1740
	1800–1740 (kyseliny)	w-m	$\nu(\text{C}=\text{O})$, $-\text{COOH}$	1380–1280
	1190–1075 (kyseliny)	w	$\nu(\text{CO})$, $-\text{COOH}$	–
	1800–1705 (ester)	m-w	$\nu(\text{C}=\text{O})$, postupně vinyl, nas.–nenas. estery	1300–1150
	1690–1640 (amid)	m-w	$\nu(\text{C}=\text{O})$, $-\text{CO}-\text{NH}_2$	1420–1400
Nitrily	2270–2200	s	$\nu(\text{C}\equiv\text{N})$, ostrá	390–340
Thiokyanáty	2185–2135	m-s	$\nu(\text{C}\equiv\text{N})$, $-\text{S}-\text{C}\equiv\text{N}$	1090–925
	1090–925	m-s	$\nu_{\text{s}}(\text{S}-\text{C}\equiv\text{N})$	700–670
	700–670	s	$\nu_{\text{as}}(\text{C}-\text{S}-\text{C})$, $-\text{C}-\text{S}-\text{C}\equiv\text{N}$	660–610
	660–610	s	$\nu_{\text{s}}(\text{C}-\text{S}-\text{C})$, $-\text{C}-\text{S}-\text{C}\equiv\text{N}$	–
Isokyanáty	2295–2250	w	$\nu_{\text{as}}(\text{N}=\text{C}=\text{O})$	1460–1340
	1460–1340	s	$\nu_{\text{s}}(\text{N}=\text{C}=\text{O})$	650–580
Isothiokyanáty	2150–1990	m	$\nu_{\text{as}}(\text{N}=\text{C}=\text{S})$	1250–925
	1250–925	s	$\nu_{\text{s}}(\text{N}=\text{C}=\text{S})$	690–650
Nitrosloučenin	1570–1485	m-w	$\nu_{\text{as}}(\text{NO}_2)$	1385–1315
	1385–1315	s	$\nu_{\text{s}}(\text{NO}_2)$	1180–850
	1180–850	s-m	$\nu(\text{CN})$, $-\text{C}-\text{NO}_2$	–

Tabulka 6. Polohy základních vibračních funkcí skupin organických látek.

Praktická práce s FT Ramanovým spektrometrem NXR 9650



Obr. 40. NXR 9650 FT-Ramanův nástavec (v pozadí s kontejnerem na kapalný dusík pro chlazení detektoru) připojený k FT IČ spektrometru ThermoNicolet Nexus 670.

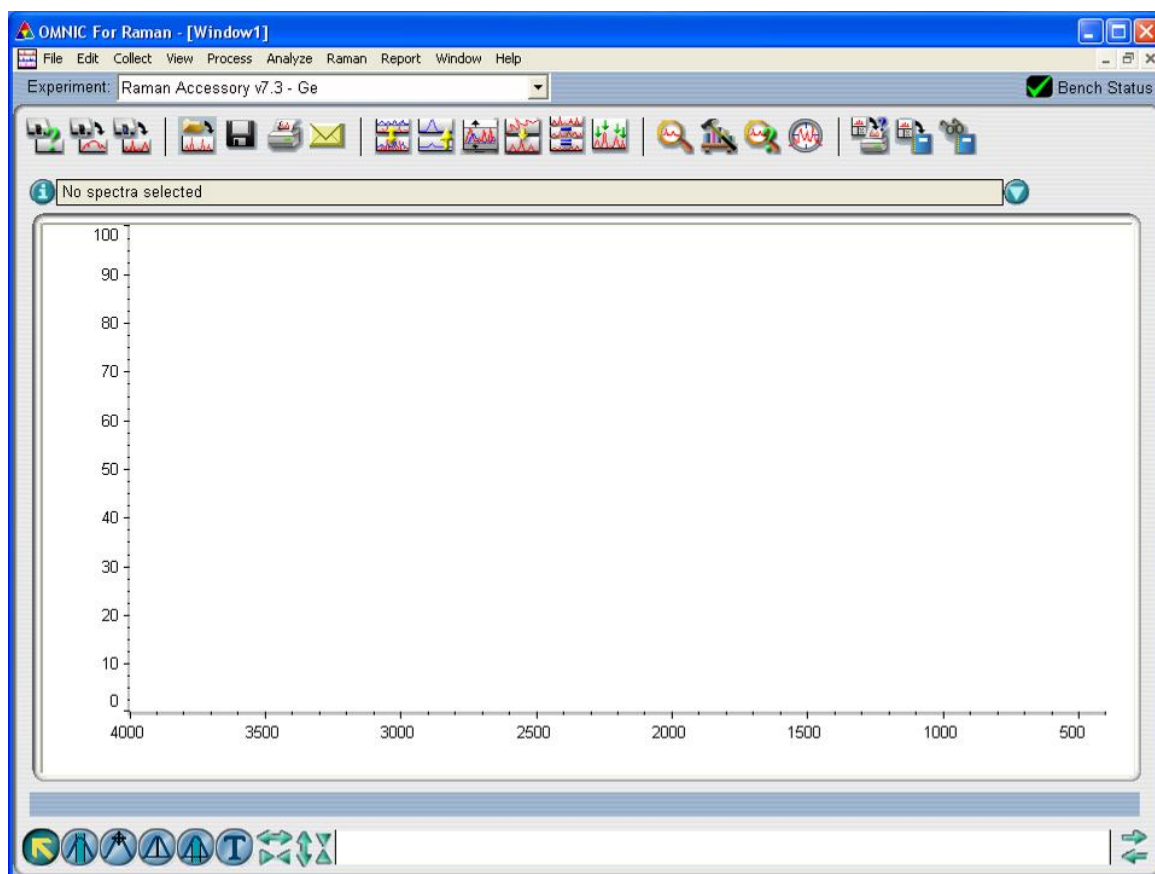
Ramanův nástavec NXR 9650 je připojen k dříve popsanému IČ spektrometru ThermoNicolet Nexus 670. Proto je zdrojem laser z IČ spektrometru (1064 nm, Nd:YVO₄ laser) a optická dráha paprsku prochází IČ spektrometrem. Jakmile softwarově zadáme, že budeme měřit Ramanova spektra, dojde k otočení parabolického zrcadla na rozhraní obou přístrojů a paprsek je místo do IČ interferometru fokusován do Ramanova nástavce na vzorek a odtud do kapalným dusíkem chlazeného Ge detektoru. Proto je nutné 30-60 min před zahájením měření naplnit kontejner nad detektorem kapalným dusíkem (provede pověřený pracovník), aby byl detektor připravený k měření.

Měření na Ramanově spektrometru je rychlejší, protože není třeba před každým vzorkem (nebo sérií vzorků) měřit spektrální pozadí. Ovšem občas bývá problematické vhodně nafokusovat vzorek a docílit detekce signálu na detektoru. Proto je naladění přístroje před měřením, které se provádí na standardizovaném vzorku polystyrenu, nutné nechat na zkušeném pracovníkovi.

Obsluha spektrometru se provádí na již známém softwaru OMNIC, proto již uvedeme jen funkce potřebné k měření Ramanových spekter.

Základní postup práce při měření na Ramanově spektrometru NXR 9650 a obsluha softwaru OMNIC:

1. Do spektrometru umístíme správný dělič paprsků (CaF_2) propouštějící monochromatické záření laseru s excitací v blízké IČ oblasti. Zapneme spektrometr (na Ramanově nástavci) – provede pověřený pracovník.
2. Zapneme ovládací počítač, spustíme program OMNIC a vyčkáme spuštění spektrometru.
3. V liště pod menu nastavíme jako typ experimentu „Raman Accessory v 7.3 – Ge“ s přednastavenými měřicími parametry.

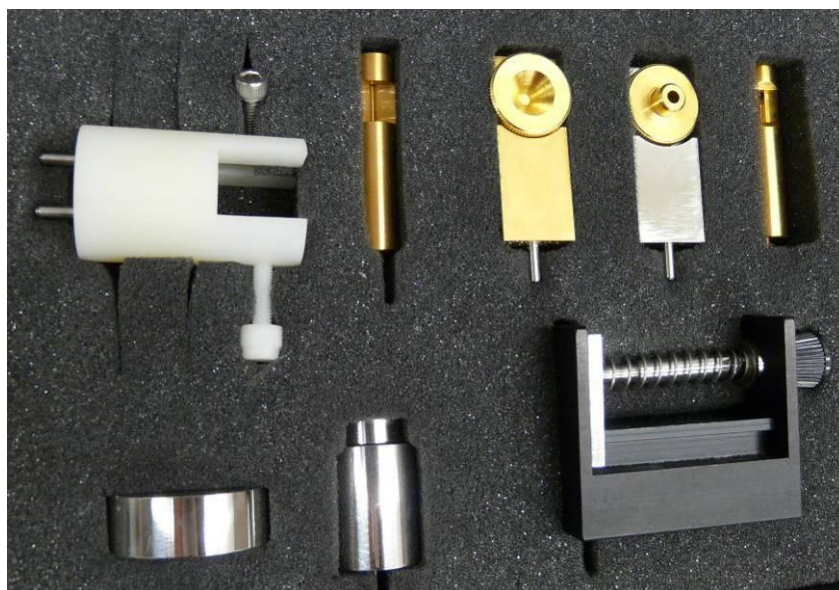


Obr. 41. Nastavení experimentu pro měření Ramanových spekter v programu OMNIC.

4. Klikneme na ikonu „Experiment Setup“ (zelený otazník). S obsahem okna budete seznámeni před zahájením práce.
5. Vložíme do měřicího prostoru standardizovaný vzorek polystyrenu, na kterém se provádí ladění přístroje a signálu na detektoru. Než zapneme laser, nastavení pozice vzorku (x - y - z) a kontrola dopadu odražených paprsků na detektor se provádí pomocí bílého světla. V okně na monitoru vidíme interferogram, pokud je vše správně nastaveno. Vypneme bílé světlo a zapneme laser. V okně „Experiment Setup“ lze shlédnout i „preview“ spektra. Jakmile vidíme

interferogram i po odrazu paprsku laseru od polystyrenu, můžeme zahájit měření – provede pověřený pracovník

5. Provedeme vlastní měření spektra vzorku – podle instrukcí vložíme zvolený nástavec s nalisovaným / upevněným pevným vzorkem či kapalným vzorkem v držáku kyvet do měřicího prostoru a opět provedeme kontrolu detekce signálu jako v předchozím bodě (musíme vidět interferogram). Dále můžeme nastavit výkon laseru (laser power 0,1-1,2 W). Ideální je začít měření s nejnižším výkonem. Poté klikneme na ikonu „Collect sample“. Pro spuštění vlastního měření musíme potvrdit „Start collection“.



Obr. 42. Různé nástavce pro upevnění vzorků pro Ramanovu spektroskopii.

6. Zpracujeme změřené spektrum analogicky k práci s IČ spektrem (ikony „Automatic baseline correct“, „Find peaks“). Poté spektrum uložíme klasicky příkazem „Save as“.

7. Měření lze na stejném vzorku opakovat se zvýšeným výkonem laseru (pokud se vzorek nezahřívá, nepálí nebo nefluoreskuje).

8. Po ukončení práce a uložení spektra můžeme zavřít program OMNIC, nutné je *důkladně vyčistit* vše, co jsme použili ke změření spektra!

Praktické úkoly:

A. Ramanova spektra organických látek

Úkol: Změřte Ramanova spektra vybraných organických látek a porovnáním spekter identifikujte neznámý vzorek. U jednotlivých spekter identifikujte pásy základních vibrací (funkčních skupin).

Pomůcky a chemikálie: nástavec na pevné vzorky, špachtle, IČ spektrometr ThermoNicolet Nexus 670 s Ramanovým nástavcem NXR 9650

polystyren, kyselina benzoová, kyselina anthranilová, kyselina šťavelová, 1,10-fenantrolin, kyselina salicylová, neznámý vzorek

Postup: Po naladění přístroje podle instrukcí upevníme vzorky vybraných organických látek do držáku pevných látek, změříme spektra a zpracujeme je. Poté změříme spektrum neznámého vzorku. Následným porovnáním se spektry měřených organických látek určíme, o jakou látku se jedná. Z práce vypracujeme protokol, do něhož provedeme navíc identifikaci základních vibrací funkčních skupin jednotlivých organických látek. Proložíme dříve naměřená IČ spektra organických látek s Ramanovými a zaznameneáme rozdíly intenzit a aktivitu základních vibrací.

B. Identifikace aniontu neznámé látky pomocí Ramanovy spektroskopie.

Úkol: Identifikujte anion neznámé látky pomocí Ramanovy spektroskopie.

Pomůcky a chemikálie: nástavec na pevné vzorky, IČ spektrometr ThermoNicolet Nexus 670 s Ramanovým nástavcem NXR 9650, špachtle,

neznámá sůl, ZnSO_4 , $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{Zn}(\text{ClO}_4)_2$

Postup: Po naladění přístroje podle instrukcí upevníme vzorky vybraných zinečnatých solí do držáku pevných látek, změříme spektra a zpracujeme je. Poté změříme spektrum neznámého vzorku. Následným porovnáním se spektry měřených Zn(II) solí určíme, o jakou látku se jedná. Z práce vypracujeme protokol, do něhož provedeme navíc identifikaci základních vibrací funkčních skupin jednotlivých měřených látek. Proložíme dříve naměřená IČ spektra měďnatých solí se stejnými anionty s Ramanovými a zaznameneáme rozdíly intenzit a aktivitu základních vibrací.

Použitá a doporučená literatura:

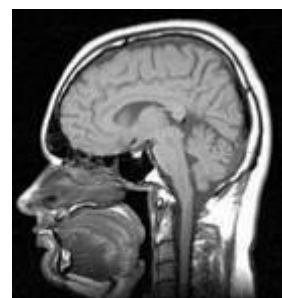
1. J. Lindon, D. Koppenaal: *Encyclopedia of spectroscopy and spectrometry, 2nd Ed.*, Academic Press; 2010.
2. K. Nakamoto: *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds, Part A: Theory and Applications in Inorganic Chemistry, 6th Ed.*, John Wiley and Sons; 2009.
3. K. Nakamoto: *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds, Part B: Applications in coordination, organometallic, and bioinorganic chemistry, 6th Ed.*, John Wiley and Sons; 2009.
4. G. Socrates: *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies*, John Wiley and Sons, 2001.
5. M. Dendisová, P. Žvátora, P. Matějka: *Ramanova spektrometrie*;
<http://www.vscht.cz/anl/lach2/RAMAN.pdf>.
6. Materiály firmy Nicolet CZ:
<http://www.nicoletcz.cz/userfiles/file/Aplikace/IntroductionToRaman.pdf>.
www.nicoletcz.cz/webinars/.

NMR spektroskopie

Nukleární magnetická rezonanční spektroskopie je fyzikálně-chemická analytická metoda, kterou stejně jako spektroskopie infračervenou a UV-Vis řadíme mezi absorpční (emisní) spektroskopie. Tato metoda detekuje absorpci radiofrekvenčního (RF) záření jádry atomů v molekule. Toto záření má v porovnání s IČ a UV-Vis zářeními mnohem větší vlnovou délku (cca. 10^4 cm), protože ke změnám populací spinových stavů v jádře stačí mnohem menší energie (cca. 10^{-6} kcal/mol). Z názvu metody můžeme odvodit, že využívá vlastností atomových jader (*nukleární*), velmi silného magnetického pole na ovlivnění magnetických vlastností jader (*magnetická*), rezonance, tedy schopnosti jader přejít na vyšší energetickou hladinu po absorpci RF záření (*rezonanční*), a také že výsledkem měření je NMR *spektrum*, tedy závislost intenzity absorbovaného záření na jeho frekvenci.

Velkou výhodou metody je, že lze měřit vzorky ve všech skupenstvích a mnohdy stačí i méně než 1 μg vzorku. Stále nejužívanější je ale roztoková NMR spektroskopie, která bývá také označována jako NMR vysokého rozlišení. Měření je tedy prováděno v roztoku, v němž se vlivem náhodného pohybu některé interakce zprůměrují, signály jsou úzké a od sebe navzájem dostatečně rozlišené linie, umožňuje kvantitativní i kvalitativní analýzu chemických individuí i směsí, malých molekuly až biomakromolekul. „Nevýhodou“ metody může být její náročnost – k nastavení správných měřicích parametrů a interpretaci spekter složitějších molekul je třeba zkušeného odborníka.

Vzhledem k tomu, že magnetické vlastnosti jader jsou výrazně ovlivněny jejich strukturním okolím, poskytuje NMR spektroskopie unikátní informace o složení, struktuře a prostorovém uspořádání sloučenin. Nejvíce propracovanou a nejdůležitější oblastí využití NMR spektrometrie je tedy strukturní analýza organických, anorganických sloučenin i přírodních látek. Metodu lze využít k důkazu přítomnosti určité funkční skupiny nebo látky ve směsi. Může být také použita pro studium kinetiky chemických reakcí a různých dynamických procesu obecně. Významné je využití metody v lékařství v MR zobrazování / tomografii používané k zobrazení vnitřních orgánů lidského těla, kdy je možné získat řezy určité oblasti těla, ty dále zpracovávat a spojovat až k výslednému 3D obrazu požadovaného orgánu. Dále se NMR využívá k analýze potravin či farmaceutických preparátů.



Obr. 43. MR sken hlavy.

Principem NMR spektroskopie je detekce absorpce RF záření jádry atomů v molekule vloženými do velmi silného magnetického pole. RF záření jsou schopny absorbovat (tedy jsou aktivní v NMR experimentu) pouze jádra s nenulovým jaderným spinem ($I \neq 0$):

Rozdělení jader podle magnetických vlastností (podle spinového kvantového čísla, I):

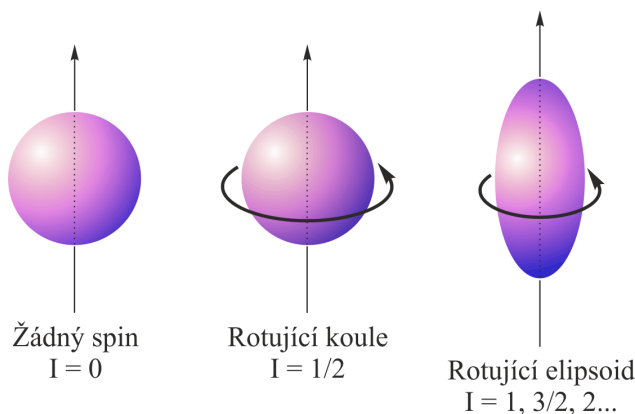
$I = 0$... jádra se sudým počtem protonů i neutronů (sudé A a Z), nemají magnetický moment (spiny spárovány), neposkytují NMR signál (^{12}C , ^{16}O)

$I > 0$... jádra s lichým počtem protonů, neutronů nebo obojího, mají magnetický moment, jsou aktivní v NMR experimentu

$I = \frac{1}{2}$... rotující koule, velmi vhodné pro NMR (^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F , ^{29}Si , ^{31}P)

$I \geq 1$... rotující elipsoid, kvadrupolární jádra (^2H , ^{11}B , ^{14}N , ^{17}O , ^{33}S , ^{35}Cl)

Spinové stavy jader jsou kvantovány; $m = I, (I-1), (I-2), \dots, -I$; celkem $(2I+1)$ stavů, $m =$ magnetické kvantové číslo, takže pro jádra s $I = \frac{1}{2} \rightarrow m = \frac{1}{2}, -\frac{1}{2}$ (pro tato existují pouze dvě energetické hladiny, $2\frac{1}{2}+1$).



Obr. 44. Tři typy jader podle velikosti spinového kvantového čísla I.

Důležitou vlastností částic s nábojem, tedy i jader s $I \neq 0$, je *magnetický moment* μ . Vzniká v důsledku rotace jádra (jaderného spinu) a náboje jádra \rightarrow rotující náboj indukuje dipolární magnetický moment; je to vektorová veličina, má velikost i směr. Může být vyjádřen:

$$\mu = \gamma \cdot \hbar \cdot I$$

$$\mu = \gamma \cdot I \cdot (h/2\pi)$$

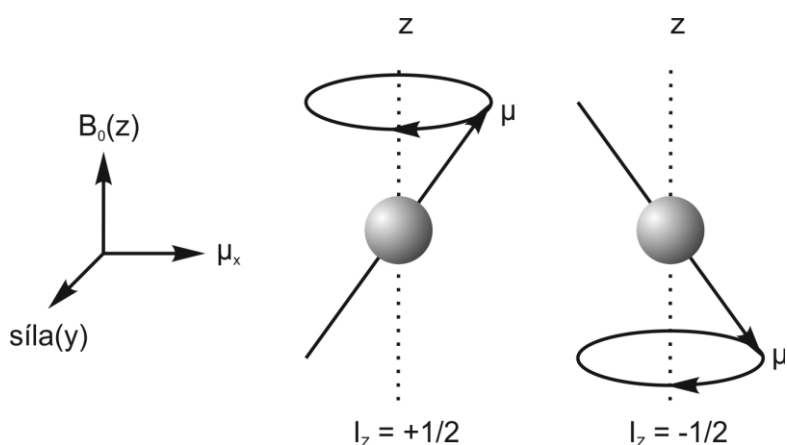
h ... Planckova konstanta

γ ... gyromagnetický poměr (konstanta), je závislá na povaze jádra, je pro ně charakteristická

\hbar ... redukovaná Planckova konstanta

V základním stavu nejsou jaderné spiny uspořádány a neexistuje mezi nimi žádný energetický rozdíl.

NMR experiment: Jádru vložíme do silného externího magnetického pole B_0 (T), čímž dojde k uspořádání magnetických momentů ve směru a proti směru magnetického pole, přičemž mírně převažuje orientace $+z$ nad $-z$ (pro jádra s $I = 1/2$ jsou možné pouze tyto dvě orientace, spiny se rozdělí do dvou skupin = tzv. Zeemanův jev). Z pohledu klasické mechaniky vykonává vektor magnetického momentu precesní pohyb (opisuje kružnici) kolem osy z (směru vnějšího magnetického pole).



Obr. 45. Interakce rotujícího jádra s externím magnetickým polem.

Vlivem vnějšího magnetického pole vzniknou dva spinové stavy $I_z = +1/2$ ($+z$) a $I_z = -1/2$ ($-z$), tedy vytvoří se energetický rozdíl mezi spinovými stavy orientovanými ve směru a proti směru působení vnějšího magnetického pole. Stav orientovaný souhlasně s B_0 má mírně nižší energii, proto je zde vždy malý přebytek ($<10^{-5}$) jader, který umožňuje absorpci energie a je proto nezbytný pro NMR experiment. Rozdíl v populacích jednotlivých stavů je dán rozdílem v jejich energiích a řídí se Boltzmanovým zákonem:

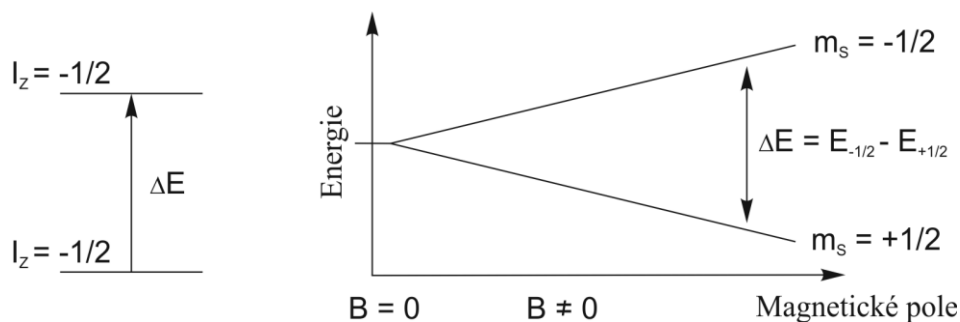
$$n(+1/2)/n(-1/2) = \exp(\Delta E/kT)$$

n ... populace spinového stavu

T ... teplota (K)

ΔE ... energetický rozdíl mezi stavy

k ... Boltzmannova konstanta



Obr. 46. Energetický rozdíl mezi spinovými stavy jako funkce externího magnetického pole B_0 pro jádro s $I=1/2$.

Pro jádra ^1H při 400 MHz ($B_0 = 9,4 \text{ T}$): $\Delta E = 3,8 \cdot 10^{-5} \text{ Kcal/mol} \rightarrow n(+1/2)/n(-1/2) = 1,000064$, tedy rozdíl v populacích je ve srovnání s ostatními spektroskopickými technikami velmi malý. Energie (jednoho spinu) je přímo úměrná magnetickému momentu jádra a velikosti vnějšího magnetického pole:

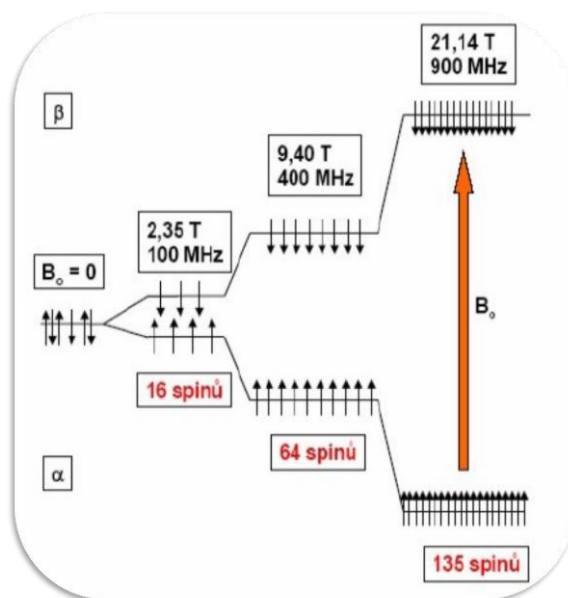
$$E = \mu \cdot B = \gamma \hbar \cdot I \cdot B$$

Pro oba stavy platí: $E_1 (I_z = -1/2) = -1/2 \cdot \gamma \hbar \cdot B_0$

$$E_2 (I_z = +1/2) = +1/2 \cdot \gamma \hbar \cdot B_0$$

$$\Delta E = E_2 - E_1 = \gamma \hbar \cdot B_0 = \gamma h \cdot B_0 / 2\pi$$

ΔE označuje, jak velký je energetický rozdíl mezi jednotlivými jadernými energetickými hladinami, tedy množství energie, jaké je jádro schopno absorbovat. Z rovnic vyplývá, že čím vyšší externí magnetické pole (B_0), tím vyšší bude energetický rozdíl mezi hladinami i větší rozdíl jejich populací. Proto větší magnety (vyšší B_0) způsobují vyšší citlivost NMR přístrojů.



Obr. 47. Vliv vyššího magnetického pole na populaci obou spinových stavů α i β pro jádro ^1H
[\[http://www.vscht.cz/nmr/predmet/lekce/NMR-lekce1.pdf\]](http://www.vscht.cz/nmr/predmet/lekce/NMR-lekce1.pdf)

ΔE je také přímo úměrná jadernému gyromagnetickému poměru γ , tedy jádra s vyšším γ absorbují více energie a jsou tudíž citlivější (proton má jeden z největších γ).

Energie je také přímo úměrná frekvenci elektromagnetického záření:

$$\Delta E = h \cdot \nu_0 \rightarrow \nu_0 = (\gamma B_0) / 2\pi$$

Pro jádro ^1H je tato frekvence při využití komerčně dostupných magnetů (2,35–21,14 T) v rozsahu 100–900 MHz.

Když se vrátíme k pohybu magnetického momentu vloženého do vnějšího magnetického pole kolem osy z (precesní pohyb, který je výslednicí síly, která se snaží přimět vektor μ

k souhlasné nebo nesouhlasné orientaci s vektorem B_0 , a síly udržující jej v rotaci), můžeme frekvenci tohoto pohybu vyjádřit pomocí úhlové frekvence:

$$\omega = 2\pi\nu$$
$$\nu_0 = (\gamma B_0)/2\pi \rightarrow \omega_0 = \gamma B_0$$

ω_0 ... *Larmorova frekvence* – frekvence precesního pohybu (rad/s) kolem B_0 .

Po vložení silného externího magnetického pole je systém připraven k absorpci energie. NMR experiment tedy pokračuje vložением druhého, radiofrekvenčního pole B_1 . Když B_1 dosáhne Larmorovy frekvence ω_0 daného jádra, nastane absorpce. Tento proces se nazývá *rezonance*.

$$\gamma B_0 = 2\pi\nu \dots \text{REZONANČNÍ PODMÍNKA}$$

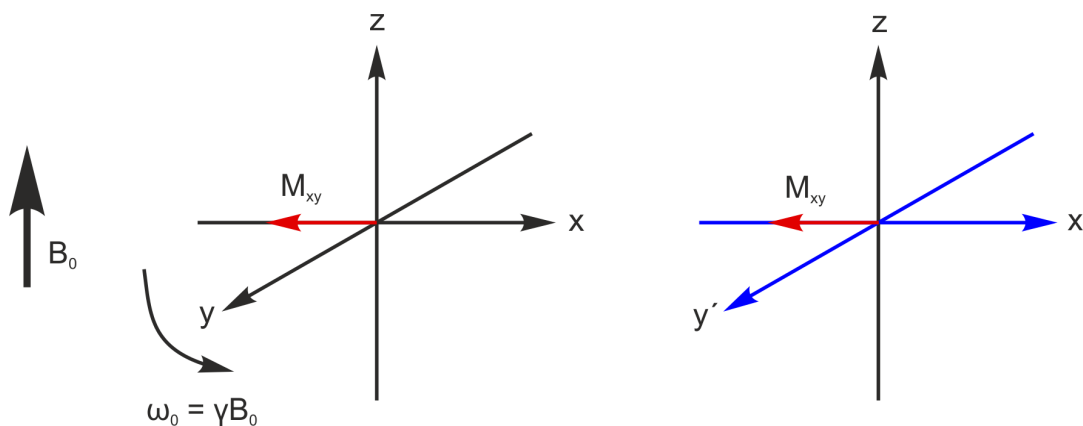
Jádra mohou absorbovat energii, jen je-li tato podmínka splněna, toho lze dosáhnout buď změnou vloženého magnetického pole, nebo změnou frekvence radiofrekvenčního záření (ν). Je zřejmé, že různá jádra absorbují elektromagnetické záření o různých ν .

Během rezonance dochází k vyrovnávání obou populací (poté co dojde k jejich vyrovnání, vymizí NMR signál) \rightarrow čím větší je rozdíl populací, tím více energie systém absorbuje, tím intenzivnější dostáváme signál a o to citlivější měření lze provést.

Z hlediska vlastního měření je rozhodující chování vektoru *makroskopické magnetizace* M , která je vektorovým součtem magnetických momentů a v rovnovážném stavu je rovnoběžná se směrem vnějšího magnetického pole B_0 (protože z důvodu nižší energie je více populován směr souhlasný s vektorem B_0). Každý vektor μ může být rozložen na složku v ose z a v rovině xy . Distribuce komponent v rovině xy je ale náhodná, takže se vyprůměrují a navzájem vyruší. Velikost M_0 je pak přímo úměrná rozdílu populací v nižší a vyšší energetické hladině.

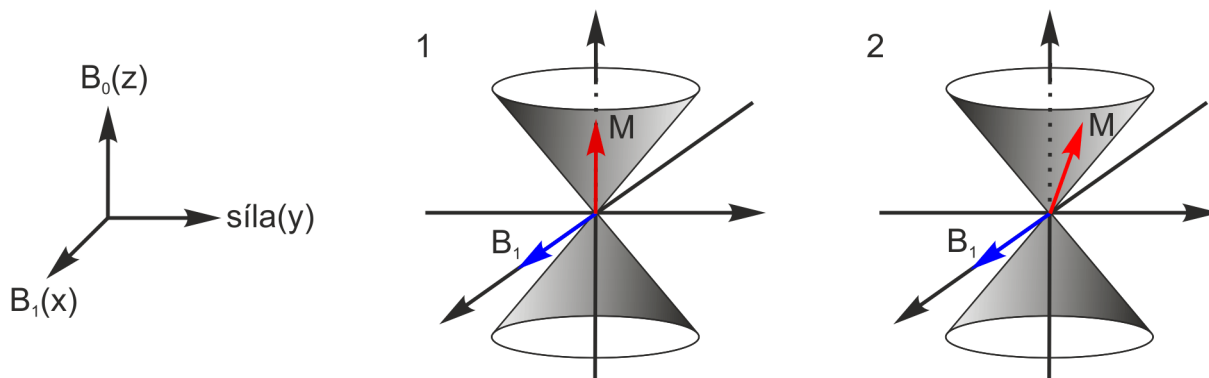
Pro popis změn vektoru magnetizace po aplikaci RF pole je vhodné zavést *rotující soustavu souřadnic*. Dosud jsme používali laboratorní soustavu souřadnic, což je fixní systém, a tedy jaderné spiny rotují rychlostí ω_0 (což znesnadňuje další popis). Řešením je rotující soustava souřadnic, která sama rotuje rychlostí ω_0 , čímž se odstraní vliv pole B_0 :

- M_{xy} se v rezonanci nepohybuje (ω pole B_1 je rovna ω_0)
- mimo rezonanci je pohyb M_{xy} stále pomalý vůči ω_0
- M „zmrazíme“ – zanedbáme jeho vlastní precesi kolem osy z , necháme osy x a y rotovat s frekvencí B_1 (kolem z)



Obr. 48. Laboratorní a rotující soustava souřadnic.

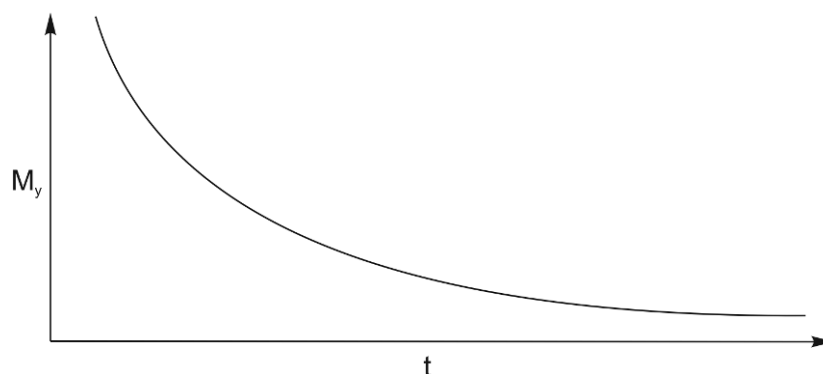
Při rovnováze před vložení B_1 působí pouze B_0 , M je v ose z (tedy $M_x = M_y = 0$). Po vložení pole B_1 v ose x (oscilující vpřed a vzad) dojde k absorpci energie systémem, pouze pokud je frekvence RF pole a Larmorova frekvence M_0 stejná (je dosaženo rezonanční podmínky). Některé spiny $+1/2$ přejdou na $-1/2 \Rightarrow M_0$ klesá; vzájemnou interakcí vektoru B_1 a vektoru M_0 dojde k překlpení vektoru magnetizace k ose y o určitý úhel, který odpovídá velikosti dodané energie a době působení RF pole. Sklápění vektoru magnetizace do osy y znamená, že klesá složka M_0 a vznikají složky M_x a M_y . Přechod jader $+1/2$ do $-1/2$ spojený s absorpcí E není měřitelný přímo. Oscilace vektoru M_{xy} vytváří fluktuující magnetické pole, které generuje elektrický proud v přijímací cívce, takže vlastně detekujeme složku magnetizace v rovině xy jako rezonanci.



Obr. 49. Vektor magnetizace v rovnováze (1) a jeho sklopení k ose y po aplikaci RF pole B_1 (2).

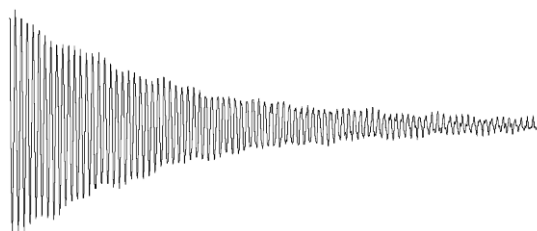
Po vypnutí RF pole B_1 se systém snaží přejít zpět do rovnováhy, tedy se odklon vektoru magnetizace od osy z postupně zmenšuje, tedy se také zmenšuje průmět vektoru magnetizace do roviny xy . Systém se tedy snaží obnovit původní distribuci populací v jednotlivých energetických hladinách. Tento proces se nazývá *relaxace*. Zmenšováním vektoru M_{xy} klesá i indukovaný proudový signál v přijímací cívce. Relaxace vektoru magnetizace v rovině xy je

exponenciální. V přijímací cílce pak detekujeme v čase zanikající kosinový signál (periodicky fluktující vektor magnetizace v rovině xy). Získáváme tak závislost intenzity signálu na čase v podobě FIDu (Free Induction Decay).

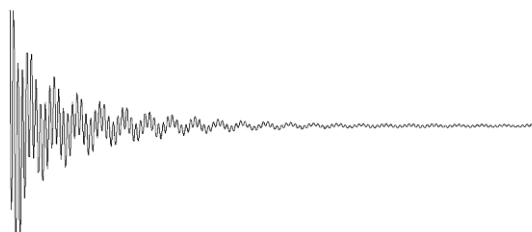


Obr. 50. Exponenciální pokles indukce magnetizace v ose y při relaxaci v čase.

Reálný vzorek nikdy neobsahuje pouze jeden typ jader a každý typ má svoji rezonanční frekvenci. Protože jsme excitovali všechny tyto spiny, dostaneme kombinaci signálů o různé frekvenci.

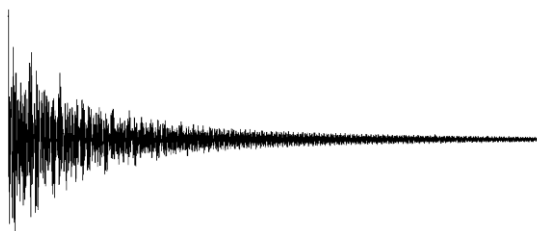


a) FID protonů vody



b) Komplexní FID protonů etanolu

- 2 typy protonů, dvě rezonanční frekvence
- překrytí, zesílení a interference dílčích obrazů



c) Komplexní FID adeninu:

- 4 typy protonů
- téměř nemožné rozluštit jednotlivé frekvence

Obr. 51. FID ^1H spektra (400 MHz) vody (a), etanolu (b) a adeninu (c).

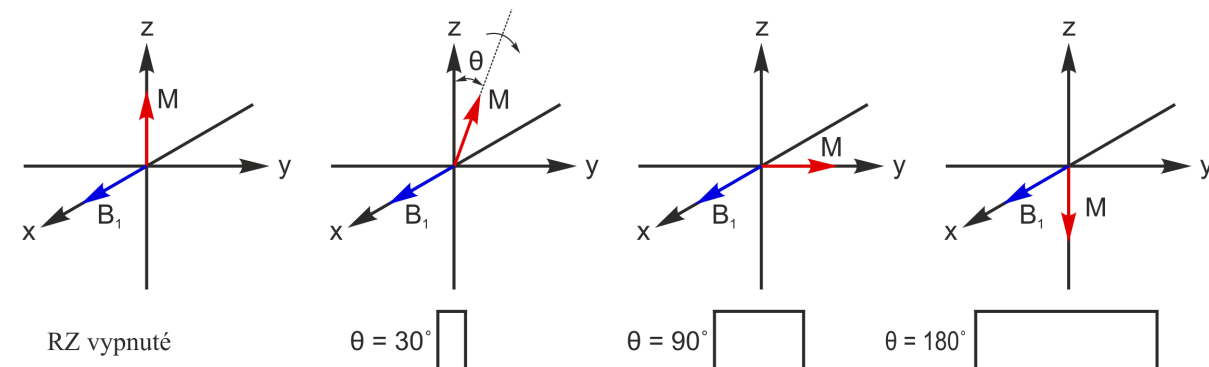
FID obsahuje všechny nezbytné informace (frekvence a šířky linií, intenzity signálů) a je záznamem závislosti odezvy vzorku na čase (= časová doména). Klasické spektrum je však

vyjádřením závislosti na frekvenci (= *frekvenční doména*). FID převedeme na spektrum Fourierovou transformací.

Výše popsaným způsobem získáme spektrum na moderních NMR spektrometrech, které využívají k excitaci systému krátké RF pulzy a následnou Fourierovu transformaci. Ale je nutné zmínit i druhou technologii měření NMR spekter, a to NMR spektrometry pracující s kontinuální vlnou (postupná změna ν), které měří frekvenční charakteristiku systému okamžitým měřením odezvy bod po bodu (frekvenci po frekvenci). Oba způsoby, tzn. spektrometry pracující s kontinuální vlnou i využívající pulsy k excitaci spinového systému a následnou Fourierovu transformaci dávají shodné výsledky. Výraznou výhodou pulzních spektrometrů je to, že měření trvá pouze několik sekund, zatímco měření spektra na spektrometru s kontinuální vlnou několik minut, takže za tuto dobu lze měření na FT NMR spektrometru mnohonásobně opakovat, dílčí výsledky sečíst a tím dosáhnout mnohonásobně vyšší citlivosti na stejném vzorku za stejný čas oproti spektrometru s kontinuální vlnou. V dnešní době se jiné než FT NMR spektrometry pro NMR spektroskopii vysokého rozlišení již nepoužívají, proto si takový spektrometr popíšeme blíže.

Jak tedy pracuje FT NMR spektrometr?

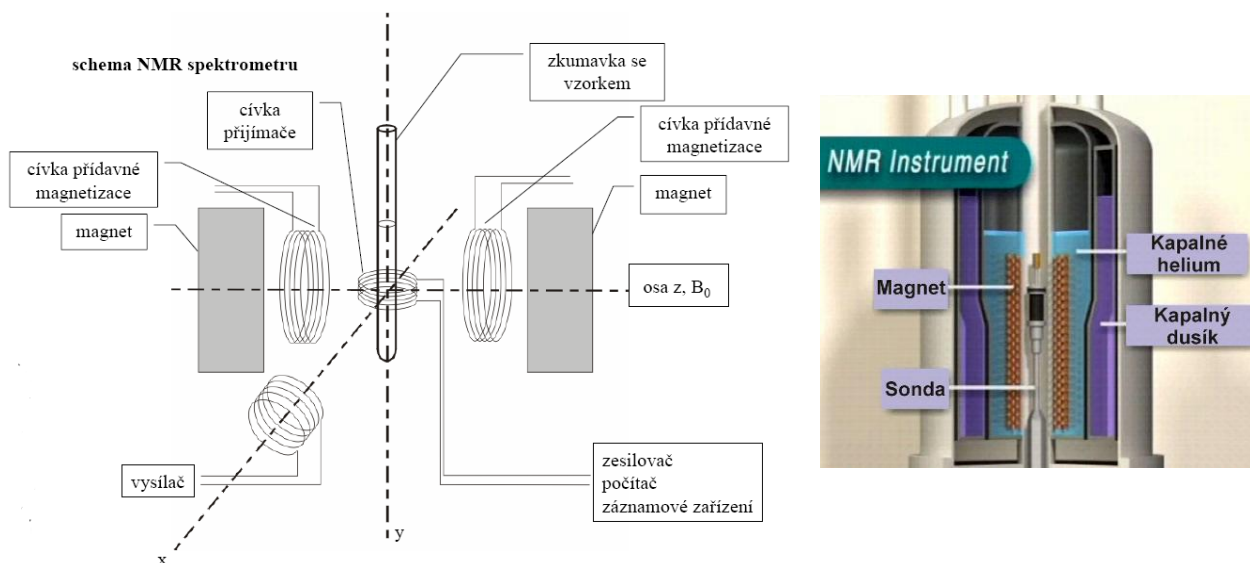
- vzorek je ozářen frekvencí blízkou rezonanční ν na velmi krátkou dobu (RF pulz)
- během trvání pulzu vektor B_1 (ve směru x) vyvolává sílu působící na M_0 , který se sklápí od osy z o úhel θ
- ve výsledku se vektor magnetizace pohybuje od osy x k ose y (můžeme i říct, že složka M_y osciluje v ose y)
- jak dlouho působí silné pole B_1 , tak dlouho pokračuje M v rotaci kolem B_1



Obr. 52. Pohyb M v závislosti na době trvání RF pulzu (RZ = radiofrekvenční záření).

S rostoucí délkou pulsu roste velikost sklápěcího úhlu θ , takže např. pokud je délka pulzu dostatečná, aby byl sklápěcí úhel 90° , M přejde do osy y . Při dvojnásobné době působení bude

úhel roven 180° , M přejde do $-z$, což znamená, že došlo k inverzi populací, tedy nastal přebytek spinů $-1/2$.



Obr. 53. Schematické znázornění částí NMR spektrometru se zobrazením os x , y a z .
[artemis.osu.cz/biofyzika/Studium/Studmat/material/NMR.pptx]

Součástmi FT-NMR spektrometru je supravodivý elektromagnet, měřící sonda, konzola spektrometru, nadřazený řídicí počítač a zdroj stlačeného suchého vzduchu.

Supravodivý magnet

- Supravodivá cívka (Nb-Ti nebo Nb-Sn)
- Kapalně helium (4,2 K)
- Kapalně dusík (izolace, snížení odparu He)
- Stínění (magnety)
- Shora dolů prochází magnetem kruhový otvor (pokojová teplota, 53 nebo 89 mm) pro vložení květy se vzorkem
- Robustní konstrukce, podstavec, odpružení, antivibrační systém

Měřící sonda

- Dutina magnetu (pokojová T)
- Vybuzení spinového systému a snímání odezvy vzorku
- Kovová trubka s patičí
- Radiofrekvenční obvody (vysílací a snímací cívky, cívky vytvářející gradienty magnetického pole, obvody pro lockování signálu)
- Měřící a lockovací kanály
- Topná spirála, termočlánek

Konzola spektrometru

Skříň obsahující elektronické obvody (vysílací a přijímací obvody, převodníky, zdroje pro napájení a ovládání korekčních cívek, modulátory, tvarovače RF pulzů, moduly vytvářející gradienty magnetického pole, akviziční – řídicí počítač, teplotní jednotka)

Nadřazený počítač

Výkonná pracovní stanice vybavená ovládacím a procesním softwarem, která umožňuje řízení obvodů a modulů v konzoli (přímé řízení elektronických obvodů). Umožňuje operátorovi ovládání přístroje během jednotlivých přípravných fází (ladění sondy, lockování signálu rozpouštědla, ladění vzorku) a vlastního měření (průběžná kontrola spektra). Zpracovává naměřená a digitalizovaná data, zpracovává spektra (Fourierova transformace, fázování, integrace ...). Umožňuje diagnostikovat spektrometr (propojení, správná funkce jednotlivých modulů).

Rezonanční frekvence různých jader jsou si velmi vzdálené (^1H , ^{13}C , ^{15}N). Frekvenční rozsah měření umožňuje sledovat jen jeden typ jader, např. jen ^1H , ale proč tedy NMR spektrum neobsahuje jen jeden signál? Neměříme totiž jen samotná jádra, ale reálné molekuly, jejichž atomy mají jádro i elektronový obal. Elektrony svým pohybem zesilují či zeslabují magnetické pole B_0 – rezonanční frekvence konkrétního jádra je poté posunuta v závislosti na elektronovém uspořádání jeho okolí \rightarrow stejnou frekvenci mají jen jádra chemicky ekvivalentní. Změna B_0 vlivem okolních elektronů se nazývá **stínění** – σ (konstanta magnetického stínění). V místě jádra tedy působí tzv. efektivní magnetické pole B_{ef} , které je tvořeno externím magnetickým polem a B_0 a lokálním magnetickým polem B_{loc} .

$$B_{\text{ef}} = B_0 - B_{\text{loc}} = B_0(1 - \sigma) \rightarrow \omega_0 = \gamma \cdot B_0 \cdot (1 - \sigma)$$

Růst stínění vede k nižší rezonanční frekvenci. Ve spektru frekvence roste zprava doleva, stínění roste zleva doprava. Běžně se ale jednotky frekvence ve spektrech nepoužívají. Změny magnetického pole, tedy i rezonanční frekvence jader s různým chemickým okolím, jsou velmi malé, na frekvenční škále by se tak muselo pracovat s číselně velmi malými rozdíly (např. 300,000764 MHz). Navíc rezonanční frekvence závisí na vnějším magnetickém poli (problém při porovnávání spekter z různých spektrometrů). Proto byl pro každé jádro zaveden standard, jehož relativní frekvence je dohodou rovna nule a vztahujeme posun každého signálu k tomuto referenčnímu signálu standardu. Pro proton a uhlík je standardem *tetramethylsilan* (TMS, $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$, Me_4Si), který je nereaktivní, těžký a rozpustný v

organických rozpouštědlech, rezonuje při velmi nízkých frekvencích a **chemický posun** TMS v ^1H a ^{13}C spektru odpovídá počátku (0 ppm).

Z výše uvedených důvodů se zavádí **chemický posun** δ (ppm)

$$\text{Pro libovolné jádro } i \text{ platí: } \nu_i = \gamma B_0(1 - \sigma_i)/2\pi$$

$$\text{Pro standard } r \text{ (TMS): } \nu_r = \gamma B_0(1 - \sigma_r)/2\pi$$

Vzdálenost mezi rezonancemi jader i a r :

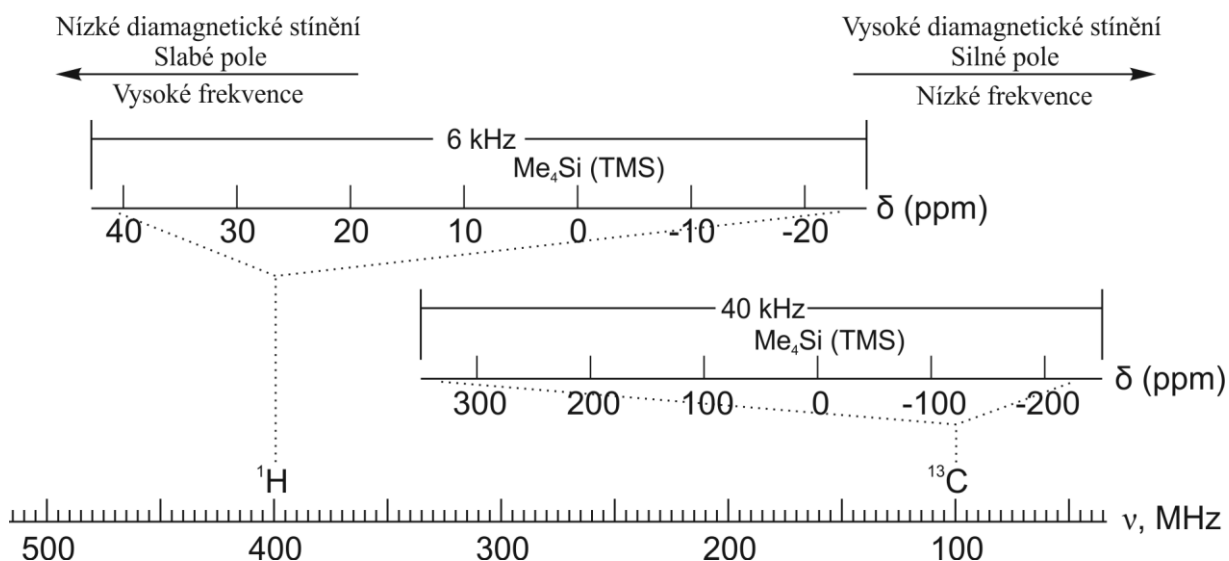
$$\nu_\Delta = \nu_i - \nu_r = \gamma B_0(\sigma_r - \sigma_i)/2\pi = \gamma B_0 \Delta\sigma / 2\pi$$

Chemický posun:

$$\delta = \nu_i - \nu_r / \nu_r = (\sigma_r - \sigma_i)/(1 - \sigma_r) \sim \sigma_r - \sigma_i$$

Chemický posun nezávisí na pracovní frekvenci spektrometru.

Absolutní hodnoty rezonančních frekvencí jsou řádově v MHz, ale rozdíl (posun) rezonančních frekvencí způsobený stíněním je řádově v Hz \rightarrow výsledky vztahu $\delta = \nu_\Delta/\nu_r$ by byla velmi malá čísla [Hz/MHz], proto se jako jednotka používá ppm (parts per million) = miliontiny vnějšího pole.



Obr. 54. Spektrální zásady (růst frekvence, stínění).

Hlavními faktory ovlivňujícími velikost chemického posunu (tedy stínění) jsou indukční a mezomerii efekty (stínění je způsobeno přítomností elektronů) a anizotropie chemického posunu (skupina nemá tvar koule). Nejčastěji měřenými jádry jsou ^1H a ^{13}C .

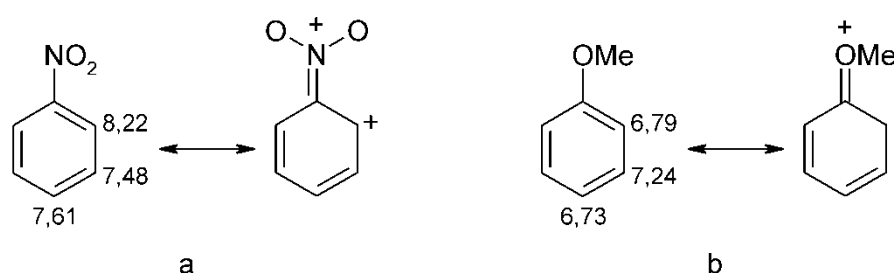
Vzhledem k vysokému gyromagnetickému poměru a přirozenému zastoupení jader ^1H , stačí k proměření **vodíkového spektra** několik sekund. Na chemický posun má vliv *indukční efekt*,

jinými slovy s rostoucí elektronegativitou připojeného atomu (nebo skupiny atomů), klesá stínění (roste chemický posun):

CH_4 (0,23 ppm), CH_3Cl (3,05 ppm), CH_2Cl_2 (5,30 ppm) a CHCl_3 (7,27 ppm).

Výrazný indukční efekt mají také skupiny $-\text{NO}_2$, $-\text{OH}$, $-\text{SH}$, $-\text{NH}_2$.

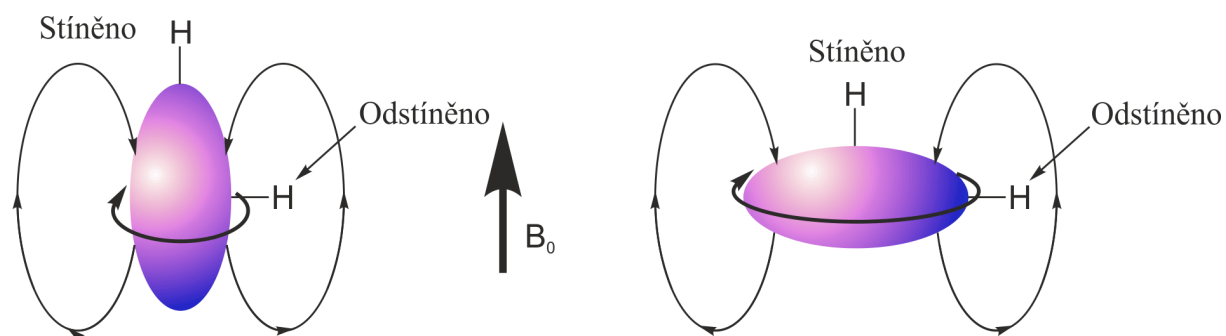
Také musíme zvážit vliv *mezomerního efektu* na elektronovou hustotu v okolí měřeného jádra. Např. v případě nitrobenzenu, skupina $-\text{NO}_2$ má výrazný záporný mezomerní efekt, takže elektronová hustota na aromatickém kruhu klesá a zmenšuje se i stínění (roste chemický posun). Naopak v případě anizolu (methoxybenzen), $-\text{OCH}_3$ skupina vykazuje +M efekt, tedy dodává elektrony do aromatického systému a zvyšuje se stínění proti vodíkům benzenu (7,24 ppm).



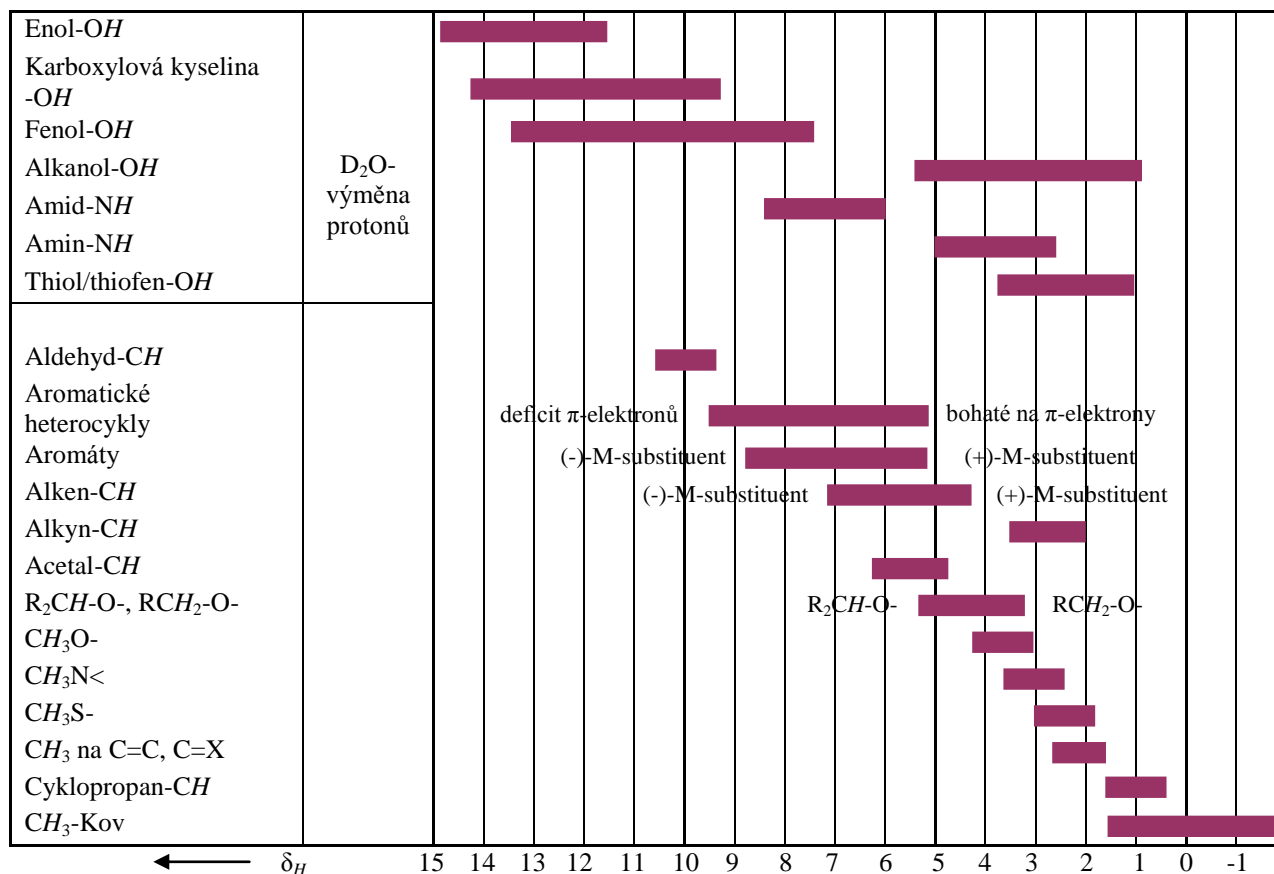
Obr. 55. Chemické posuny vodíků na aromatickém kruhu ovlivněné mezomeriím efektem substituentů, nitrobenzen (a) a anizol (b).

Na stínění protonu mají však také vliv nelokální proudy – čistě magnetický vliv, pokud skupina nemá tvar koule (Me, Ph, karbonyl) = *anizotropie chemického posunu*.

Např. jednoduchá a dvojná vazba $\text{C}-\text{C}$ a $\text{C}=\text{C}$ mají válcovou symetrii. Elektrony jsou částečně náchylné k proudění kolem válce a indukované pole stíní proton ležící v delší ose.



Obr. 56. Stínění protáhlého elipsoidu – model chemické vazby.



Tabulka 7. Rozsah chemických posunů (δ ppm) v ^1H NMR spektrech běžných organických sloučenin.

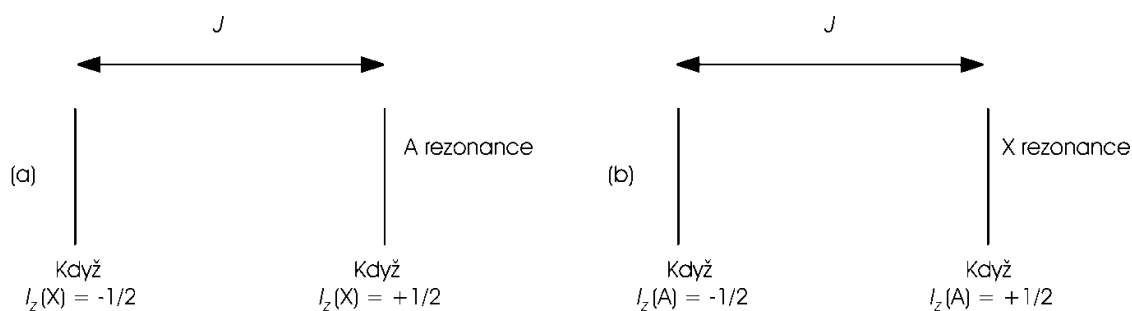
Dalšími důležitými **parametry vodíkového NMR spektra** jsou kromě *chemického posunu*, *počet signálů*, *relativní integrální intenzita jednotlivých signálů* a *multiplicita signálů*.

Počet signálů ve spektru udává počet skupin vzájemně neekvivalentních vodíků (s různým chemickým posunem). Rozlišujeme chemickou a magnetickou ekvivalenci. Dvě jádra jsou chemicky ekvivalentní, pokud je možné je zaměnit operací symetrie (např. 3 vodíky methylové skupiny mají stejnou rezonanční frekvenci, lze vzájemně zaměnit rotací kolem jednoduché vazby, také všech 6 vodíků benzenu má ve spektru jeden signál). Dvě jádra jsou magneticky ekvivalentní, pokud jsou chemicky ekvivalentní a mají identické interakční konstanty (vysvětleno níže) se všemi dalšími jádry v molekule.

Relativní integrální intenzita je cenou pomůckou při interpretaci ^1H NMR spektra, protože detekovaný signál je přímo úměrný počtu přítomných spinů (jader). Je dána plochou píku. Např. protony CH_3 skupiny mají $3\times$ větší intenzitu než vodík CH.

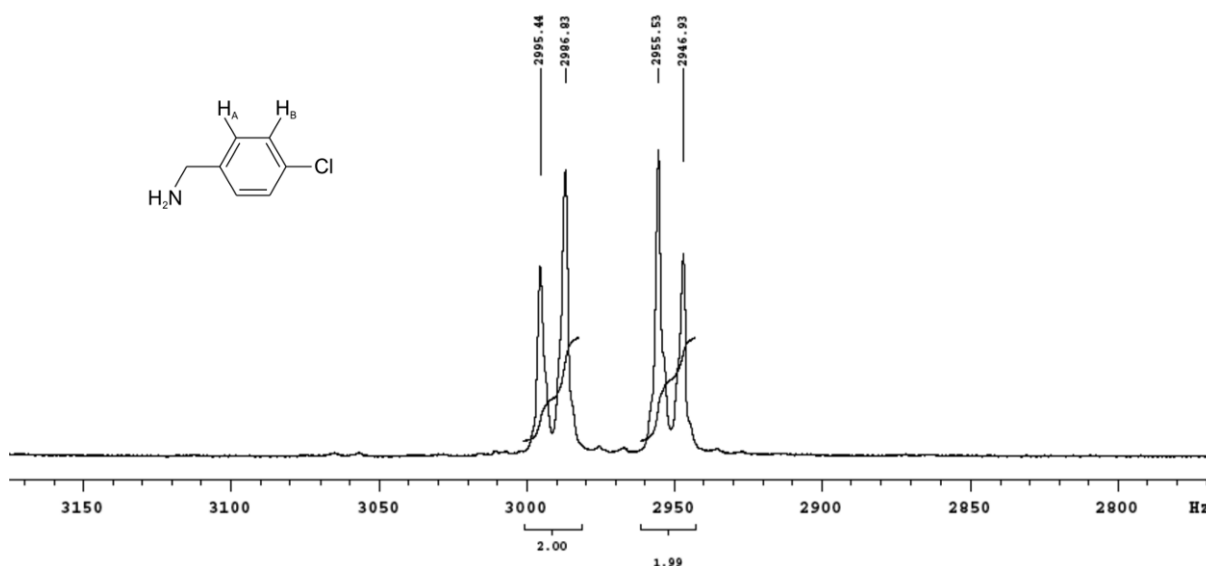
Multiplicita signálů je důsledkem jemných interakcí spinů v molekule, závisí na typu a počtu okolních atomů. Energetické hladiny jednotlivých jader jsou ovlivňovány spinovými stavy jader v okolí, což nazýváme *nepřímou spin-spinovou interakcí*. Nepřímá interakce je to proto, že je zprostředkována vazebnými elektrony. Například v systému dvou interagujících spinů

AX (4-chlorbenzylamin) protony A a X mají spin $\frac{1}{2}$, polovina jader A sousedí s jádrem X $+\frac{1}{2}$ a druhá polovina sousedí s jádrem X $-\frac{1}{2}$, magnetické okolí způsobené dvěma typy protonů X rozštěpí linii jádra A na 2 (a), ze stejného důvodu bude signál X také rozštěpen na dvě linie (b). Vliv sousedních spinů na multiplicitu píků označujeme *spin-spinové štěpení* (nepřímé štěpení) a vzdálenost (v Hz) mezi rozštěpenými liniemi J se nazývá *interakční konstanta*.



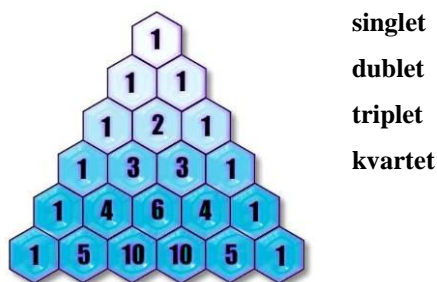
Obr. 57. Čtyři spektrální linie dvoispinového systému (AX).

Interakční konstanta je vlastně vzdálenost píků jedné rezonance, vyjadřuje, jak silně jsou jádra navzájem ovlivněna, pro signály A a X je J stejná, neboť se obě jádra štěpí navzájem. J závisí pouze na vlastnostech jader, nikoli na $B_0 \rightarrow$ na přístrojích s různou pracovní frekvencí bude interakční konstanta vždy stejná. J reprezentuje interakci přes vazby (zprostředkována vazebnými elektrony), proto nese informace o síle vazby a prostorovém uspořádání.



Obr. 58. ^1H spektrum (400 MHz) 4-chlorbenzylaminu v $\text{DMSO-}d_6$ (dimethyl sulfoxid); detail.

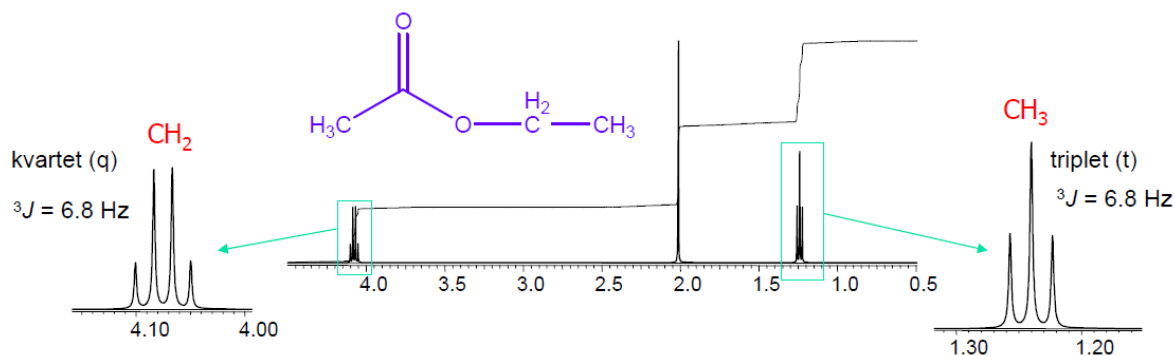
Je-li jádro A interakci s n jádrem, která mají spin I , platí pro počet rozštěpených čar multipletu A: $2nI + 1$, tedy pro jádra s $I = \frac{1}{2}$: $n+1$. Vzdálenost jednotlivých čar multipletu je rovna interakční konstantě v Hz. Poměr intenzit jednotlivých čar multipletu se řídí binomickým rozvojem. Pro rychlou orientaci slouží tzv. Pascalův trojúhelník (obr. 59).



Obr. 59. Pascalův trojúhelník.

Multiplicita signálů se značí: singlet (s), dublet (d), triplet (t), kvartet (q / qr), kvintet (qn), sextet (sx), septet (sp), bs (broad signal), m (obecně multiplet, většinou pro signály s těžko rozlišitelnou přesnou multiplicitou).

Příklady interpretace ^1H NMR spekter:



Obr. 60. ^1H spektrum ethylacetátu pro ukázkou interpretace [http://www.vscht.cz/nmr/predmet/metody_urcovani-nmr.html].

Počet signálů ve spektru: 3 (tři skupiny neekvivalentních protonů)

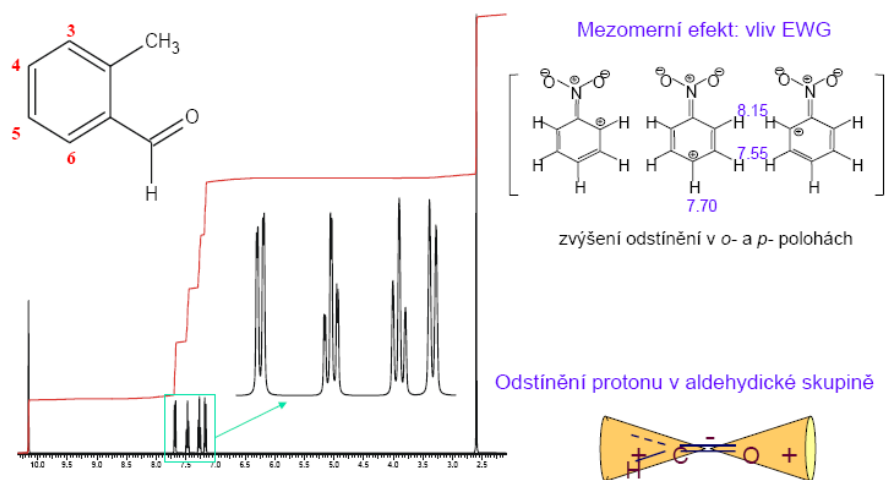
Integrální intenzita: kvartet (2), singlet (3), triplet (3, nižší intenzita oproti singletu je způsobena nárůstem multiplicity, plocha píků je ale stejná)

Chemický posun: hodnota chemického posunu (ppm) se odečítá ve středu multipletu, methylen v sousedství elektronegativního kyslíku je nejvíce odstíněn

Multiplicita: počet složek multipletu pro $I = \frac{1}{2}$: $n + 1 \rightarrow$ kvartet: signál vodíků, které musí mít v okolí 3 interagující jádra ($-\text{CH}_2-\text{CH}_3$), singlet – v okolí nejsou žádné interagující jádra, triplet – v okolí 2 interagující jádra.

Vzdálenost složek multipletu – interakční konstanta, je stejná pro kvartet i triplet \rightarrow jsou to signály vzájemně interagujících jader.

Závěr: kvartet = signál odstíněného methyleny, sousedící methylová skupina = triplet, singlet = izolovaný methyl.



Obr. 61. ^1H spektrum 2-methylbenzaldehydu [http://www.vscht.cz/nmr/predmet/metody_urcovani-nmr.html].

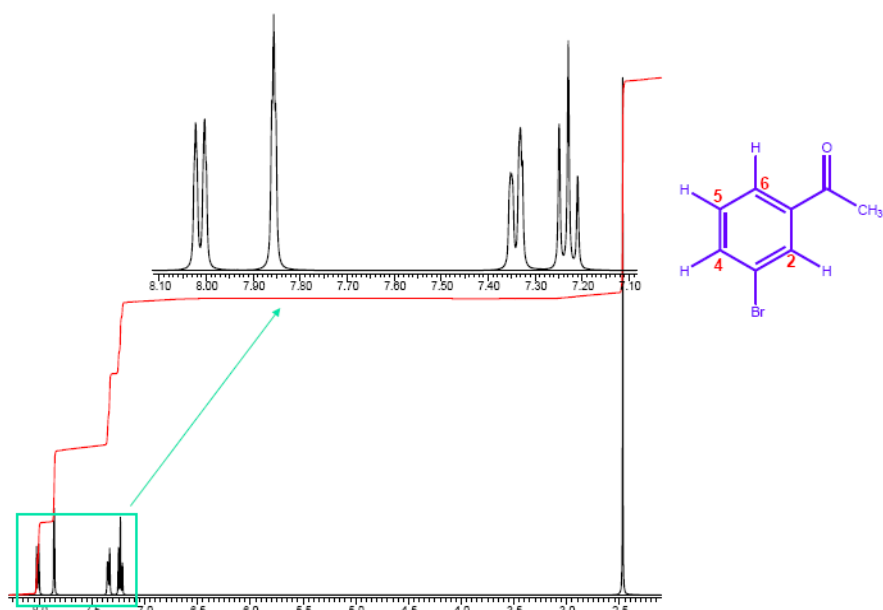
Počet signálů ve spektru: 6

Integrální intenzita: kromě singletu v 2,6 ppm (3) všechny signály 1

Chemický posun: největší chemický posun má proton v aldehydicke skupině (kyslík silný indukční efekt, navíc anizotropie chemického stínění, viz vpravo dole), uprostřed vodíky na aromatickém kruhu, ovlivněno mezomerním efektem – skupiny s +M (CH_3) i –M efektem (CHO), takže nejvíce odstíněn vodík 6, nejméně 3, vodík 5 stíněn více než 4

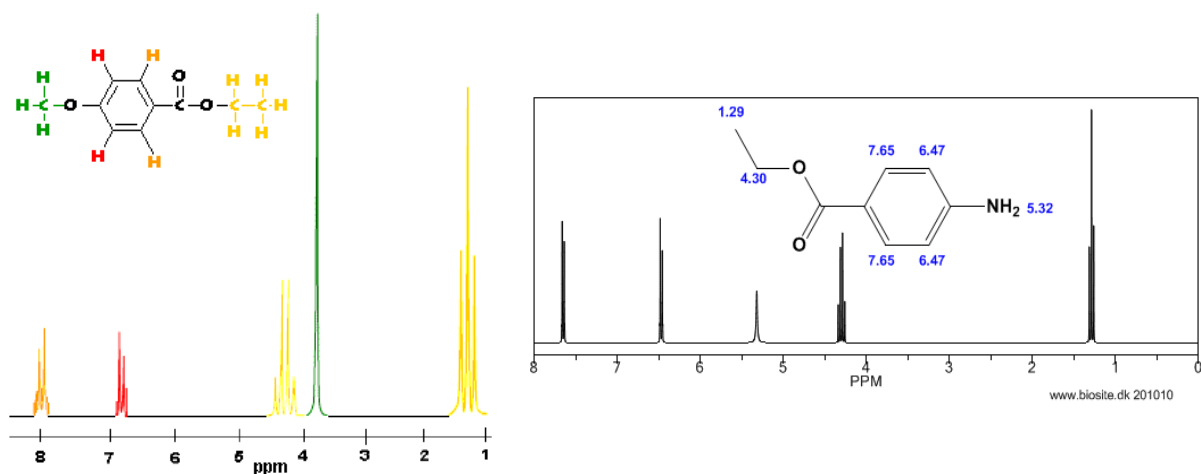
Multiplicita: dublet: signál vodíků, které musí mít v okolí 1 interagující jádro (3, 6), triplet – 2 interagující jádra (4, 5)

Závěr: singlet s velkým chemickým posunem cca. 10,3 ppm = signál aldehydickeho protonu, singlet cca. 2,6 ppm = methyl v poloze 2, dublety = větší chemický posun vodík 6, menší vodík 3, triplety = větší chemický posun má vodík 4, menší 5.



Obr. 62. ^1H spektrum 3-bromfenylmethylketonu [http://www.vscht.cz/nmr/predmet/metody_urcovani-nmr.html].

Singlet s trojnásobnou integrální intenzitou náleží protonům methylové skupiny. Další singlet (7.85 ppm) může být jen vodík 2. Triplet může patřit jen vodíku 5 (dvě sousedící jádra 4 a 6). Zbývají dva dublety vodíků 4 a 6. Z důvodu výrazného $-M$ efektu karbonylové skupiny je více odstíněn (8 ppm) vodík 6.



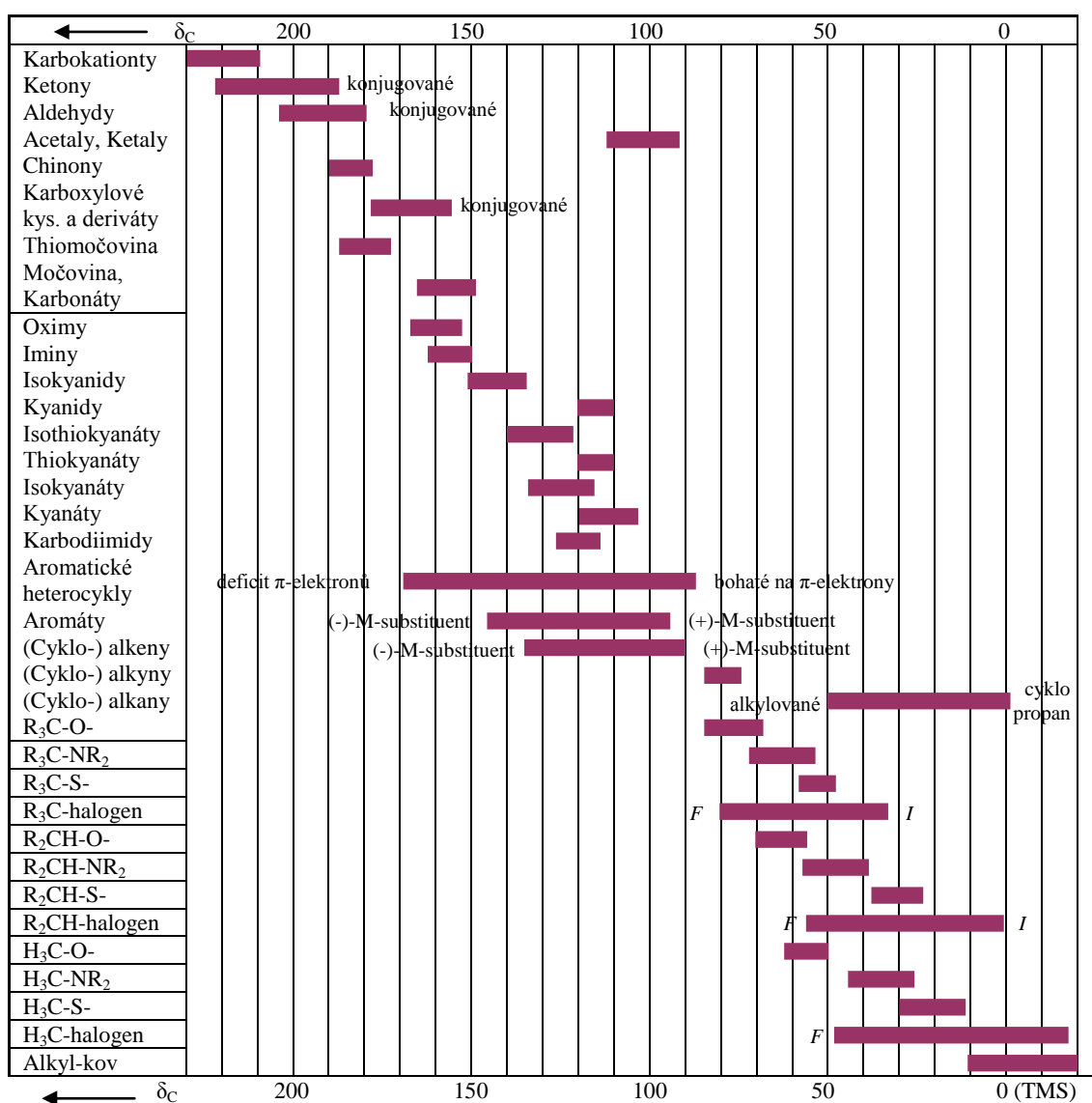
Obr. 63. Další příklady interpretovaných ^1H spekter.

[http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/3/anc/nmr_spek/spektrenordnung.vlu/Page/vsc/de/ch/3/anc/nmr_spek/m_18/nmr_4_8/spekkordnung_m18te1100.vscml.html, http://www.biosite.dk/leksikon/benzocain.htm]

V případě **uhlíkových NMR spekter** ^{13}C , je rozsah chemických posunů výrazně větší (0 – 300 ppm) než u vodíkových spekter (0 – 15 ppm), proto jsou signály lépe rozlišitelné. Převažující nuklid je ^{12}C , ale má $I = 0$. Přirozené zastoupení ^{13}C ($I = \frac{1}{2}$) je velmi nízké (1,1%), proto počet akumulací spekter při měření musí být stovky až tisíce, takže doba měření je v rozsahu minut až hodin. Vzhledem k nízkému přirozenému zastoupení jsou interakce

^{13}C – ^{13}C nepozorovatelné. Lze ovšem sledovat nepřímou spin-spinovou interakci ^1H – ^{13}C , která komplikuje interpretaci spekter. Běžně se proto používá dekapling (širokopásmové ozáření vodíkových jader, u nichž pak nedochází k absorpci záření, nejsou tedy „vidět“, potlačí se interakce H–C), takže pozorujeme všechny signály jako singlety a analýza spektra je mnohem jednodušší. V dekatovaném spektru ale nejsou intenzity úměrné počtu odpovídajících jader ^{13}C vzhledem k rozdílným relaxačním časům jednotlivých uhlíků a vlivu dekaplingu.

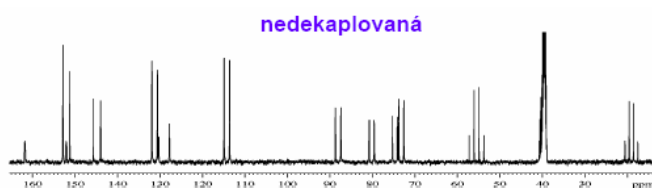
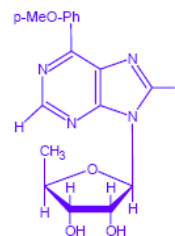
Chemické posuny závisí na hybridizaci daného uhlíku ($sp^3 < sp^2 < sp$) a na povaze sousedních skupin (I a M efekty).



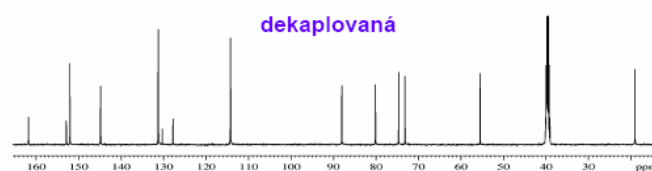
Tabulka 8. Rozsah chemických posunů (δ ppm) v ^{13}C -NMR běžných organických sloučenin.

Dalším NMR experimentem hojně využívaným pro zjednodušení interpretace ^{13}C spektra je *APT* (Attached Proton Test) experiment. Kombinací různých délek pulzů docílíme rozlišení uhlíků podle počtu připojených vodíků (hybridizace). Kvartérní a methylenové uhlíky (sudý počet vodíků) budou mít pozitivní signály, zatímco methylové a methinové uhlíky (lichý počet) budou záporné (vodíky jsou dekaplovány).

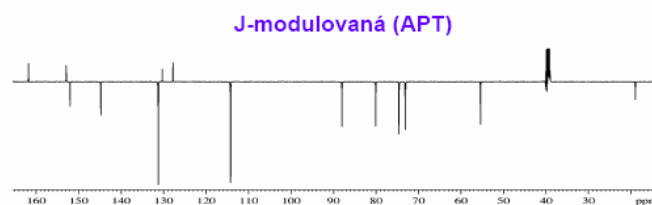
Různé modifikace ^{13}C spekter



zachování multiplicity,
ale značné snížení intenzity



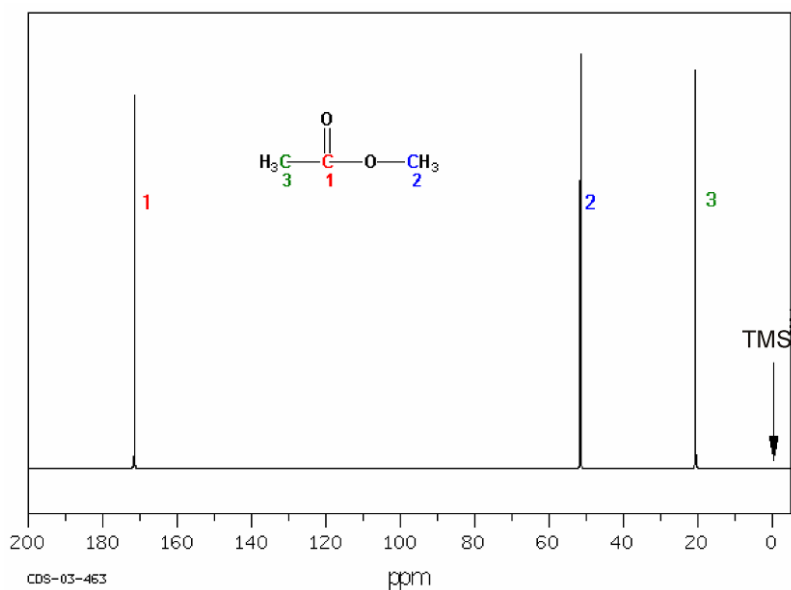
odstranění interakce s protony,
přehlednější spektrum,
zvýšení intenzity signálů



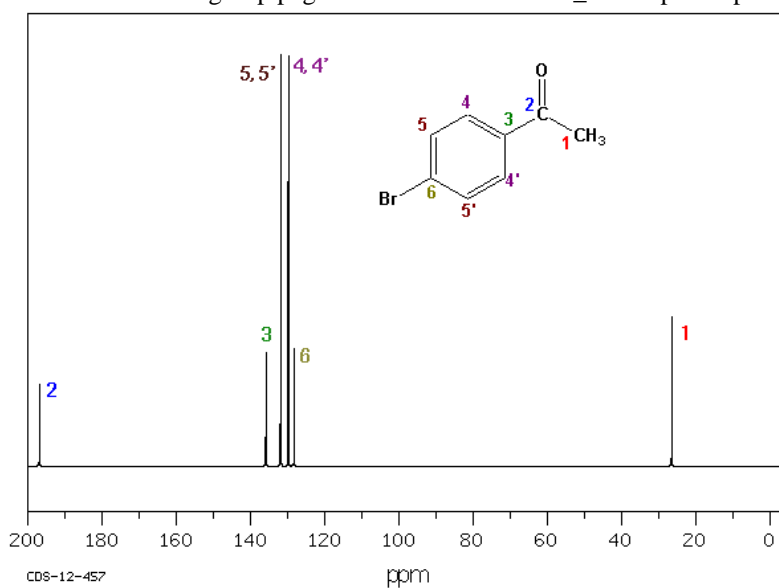
podle počtu připojených
protonů pozitivní (C, CH₂) nebo
negativní (CH, CH₃) amplituda

Obr. 64. Různé modifikace ^{13}C spekter 6-(p-methoxyfenyl)-9-D-ribofuranosidopurinu
[http://www.vscht.cz/nmr/predmet/metody_urcovani-nmr.html].

Příklady ^{13}C NMR spekter

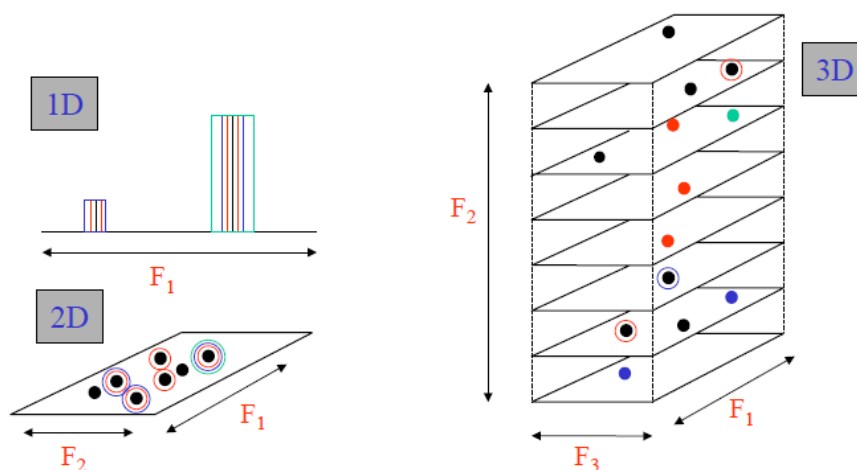


Obr. 65. ^{13}C spektrum methylacetátu s interpretací píků.
[http://www.oci.uzh.ch/group/pages/robinson/lectures/AC_BII/Kap18/kap18.html]



Obr. 66. ^{13}C spektrum *p*-bromfenylmethylketonu s interpretací píků.
[http://www.oci.uzh.ch/group/pages/robinson/lectures/AC_BII/Kap18/kap18.html]

Ke kompletnímu a jednoznačnému přiřazení signálů ovšem často, zejména u složitějších molekul, jednoduché jednodimenzionální NMR experimenty jako ^1H , ^{13}C a APT nestačí. Signálů může být hodně, mohou být blízko sebe nebo se překrývat, což znesnadňuje interpretaci. V takovém případě nastoupí více-dimenzionální NMR spektroskopie, zejména pak **2D NMR spektroskopie**.



Obr. 67. Zobrazení frekvenčních dimenzí v 1D, 2D a 3D NMR spektroskopii.
[\[http://www.vscht.cz/nmr/predmet/metody_urcovani-nmr.html\]](http://www.vscht.cz/nmr/predmet/metody_urcovani-nmr.html)

Když porovnáme vznik 1D a 2D spekter:

1D NMR spektrum: FID je funkcí *jedné časové proměnné*, po Fourierově transformaci obdržíme spektrum jako frekvenční závislost intenzity NMR linií (charakterizace jader z hlediska chemického posunu a interakcí).

2D NMR spektrum: principem je, že se do pulsní sekvence zavede další časová proměnná, která se průběžně zvětšuje (inkrementuje s určitým časovým krokem). Obdržíme tak sérii FIDů, které se liší podle toho, jak se spinový systém během této další časové proměnné, kterou nazýváme evoluční čas, vyvíjel. Naměřená data tvoří vlastně matici, na níž můžeme aplikovat Fourierovu transformaci podél obou časových proměnných a obdržíme 2D spektrum s dvěma frekvenčními osami.



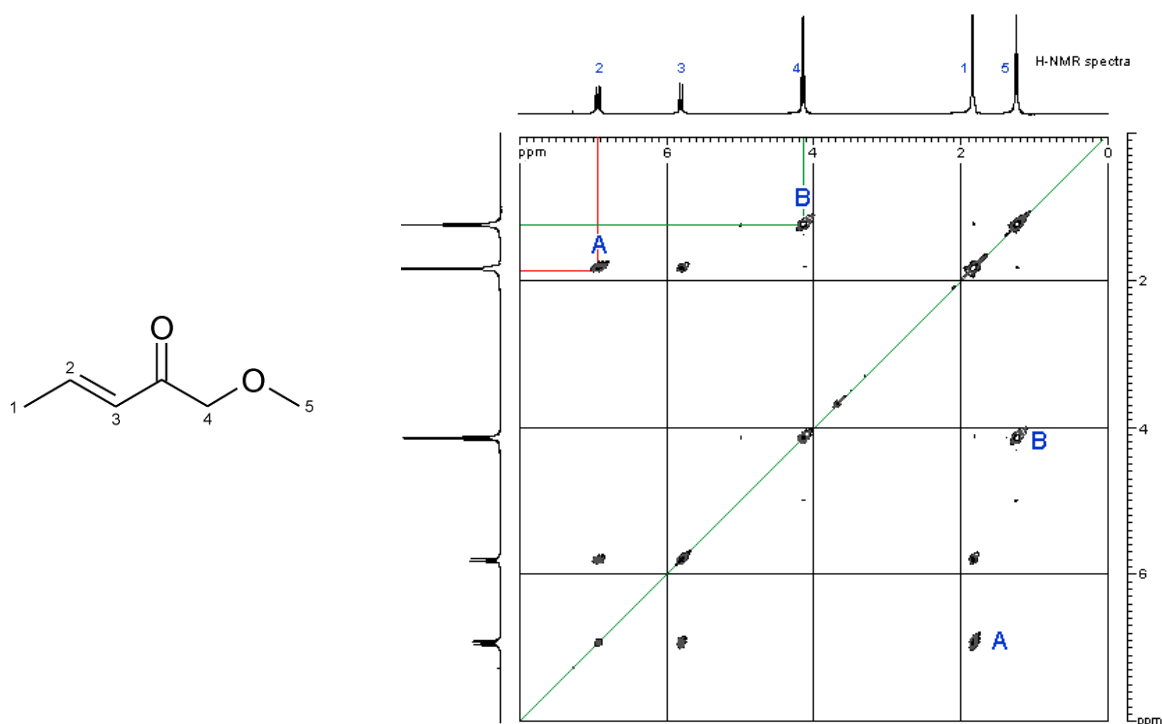
Obr. 68. Znázornění série různých délek evolučních časů (t_1) při zisku 2D NMR spekter.
[\[http://www.vscht.cz/nmr/predmet/metody_urcovani-nmr.html\]](http://www.vscht.cz/nmr/predmet/metody_urcovani-nmr.html)

Jakékoliv 2D spektrum zahrnuje opakování 1D sekvence za současného prodlužování proměnné t_1 (Obr. 68).

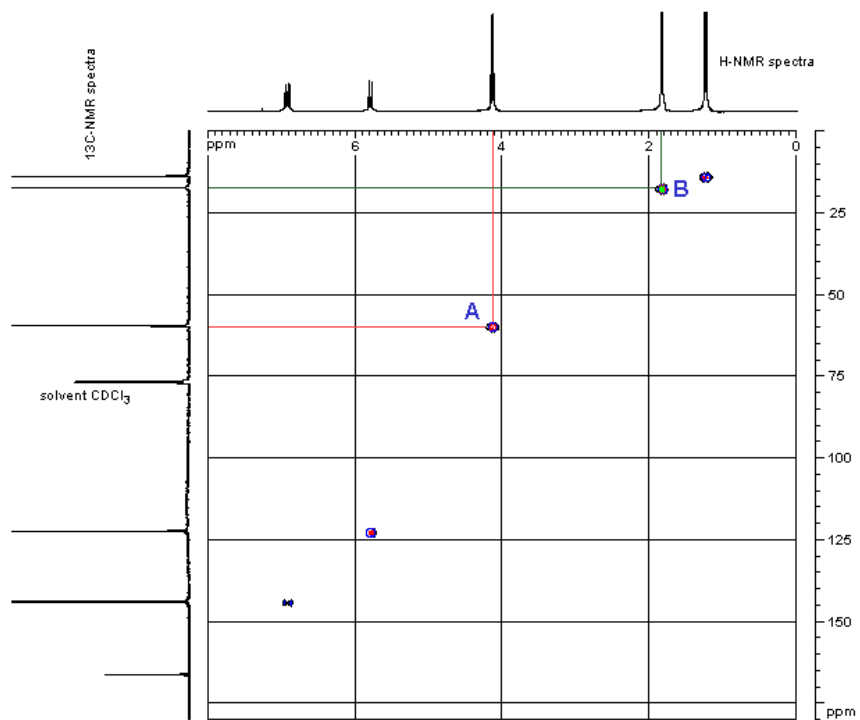
Existuje obrovské množství 2D NMR experimentů s různě složitými pulsními sekvencemi. Můžeme měřit spektra korelací homonukleárních (obě frekvenční dimenze jsou rozsahu

rezonancí jednoho jádra, např. korelace ^1H – ^1H) nebo heteronukleárních (např. korelace ^1H – ^{13}C). Základem korelační spektroskopie je vzájemná korelace NMR parametrů (chemický posun, interakční konstanta, ...) určitých jader. Korelaci lze realizovat přenosem polarizace (magnetizace, informace) z jednoho jádra (to je excitováno, zdroj) na jádro jiné (příjemce). Uvažujeme tak magnetické interakce mezi jádry prostřednictvím strukturní konektivity (vazby), prostorové blízkosti nebo kinetické výměny.

Níže jsou pro příklad uvedena spektra homonukleární; ^1H – ^1H COSY (COrelation SpectroscopY, pozorujeme korelace vodíků přes 2 až 3 vazby, na diagonále jsou signály se stejnými rezonančními frekvencemi na obou frekvenčních osách, mimo diagonálu jsou krosníky ukazující, která jádra jsou v korelaci, Obr. 69); a heteronukleární; ^1H – ^{13}C HETCOR (HETeronuclear COReletion, pozorujeme korelaci před 1 vazbu, zjistíme tak, který vodík je vázán na který uhlík, Obr. 70). Studovaná molekula: methylbut-2-enoát.



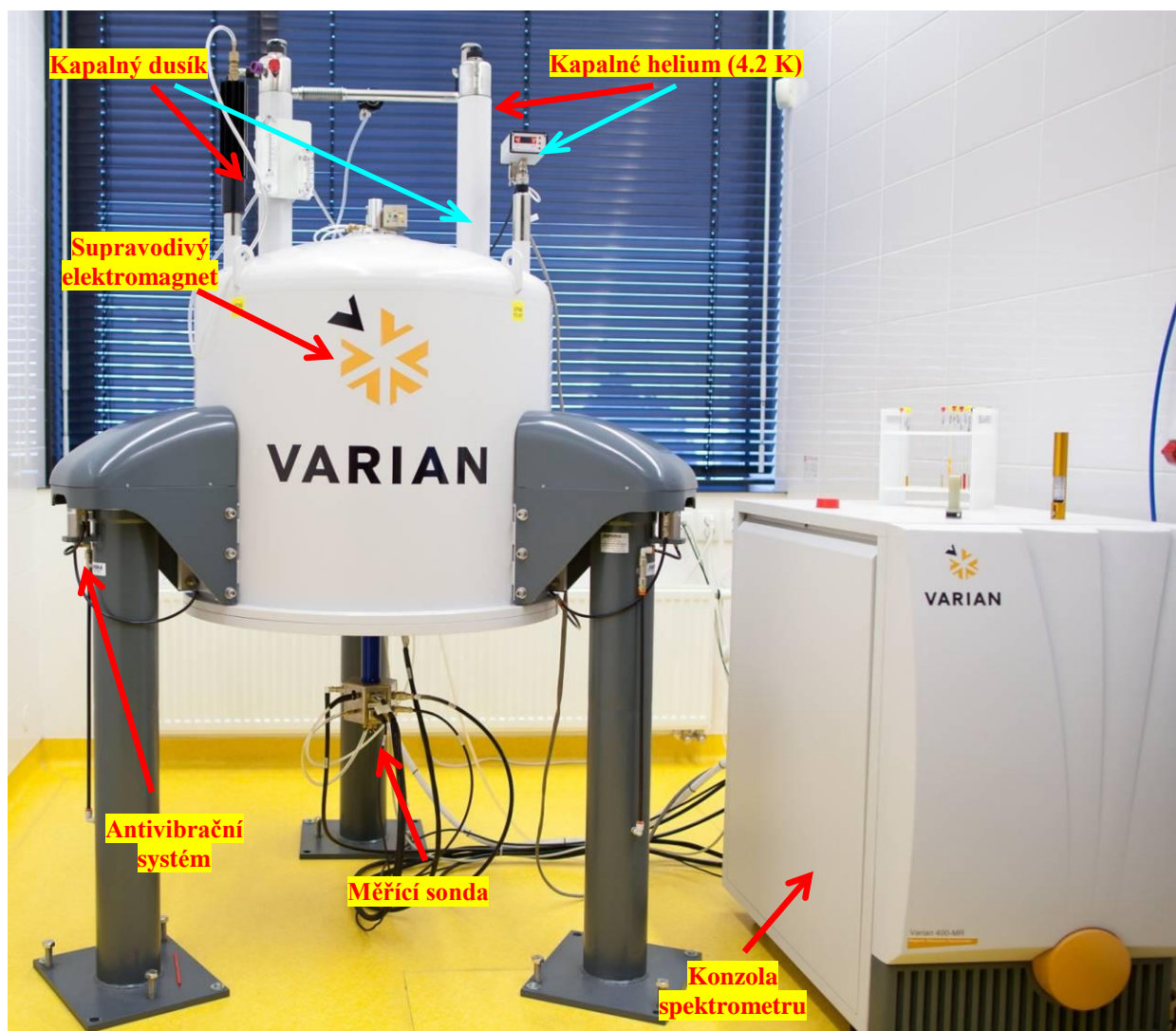
Obr. 69. COSY spektrum methylbut-2-enoátu, v korelaci jsou vodíky 1, 2 (krosník A), 4, 5 (krosník B) atd. [<http://www.chem.ucalgary.ca/courses/351/Carey5th/Ch13/ch13-2dnmr-1.html>]



Obr. 70. ^1H - ^{13}C HETCOR spektrum methylbut-2-enoátu, jednoznačně určíme chemické posuny jednotlivých uhlíkových atomů (nekvarterních). [<http://www.chem.ucalgary.ca/courses/351/Carey5th/Ch13/ch13-2dnmr-1.html>]

Teorie 2D NMR spektroskopie a jednotlivých jejích experimentů je relativně složitá, v případě zájmu doporučujeme se odkázat na doporučenou literaturu.

Praktická práce s 400 MHz NMR spektrometrem Varian



Obr. 71: NMR spektrometr (400 MHz, Varian).

Příprava vzorku pro kapalinovou NMR spektroskopii

Vzorek musí být rozpuštěn v deuterovaném rozpouštědle a umístěn do NMR kyvety. Takže navážíme vzorek do plastové zkumavky (ependorfky), přidáme rozpouštědlo a působením ultrazvuku důkladně rozpustíme. Nutno odstranit nerozpuštěné zbytky filtrací nebo centrifugací! Nerozpuštěné části narušují homogenitu magnetického pole.

Množství vzorku: zpravidla 1–100 mg látky v 0,5–1,0 ml rozpouštědla (dle experimentu a typu látky). Pozor! Objem vzorku v kyvetě není libovolný, pro kyvety 5 mm nutno mít 0,5–0,65 ml roztoku, protože při menším objemu je ovlivněna homogenita pole a při přeplnění se sníží poměr S/N (signál : šum, část vzorku mimo přijímací cívky).

NMR kyveta: skleněná trubice 15–20 cm × 5 mm (přísné požadavky) s plastovou zátkou, v případě těkavých a hygroskopických rozpouštědel musíme přelepit zátku parafilmem (existují

i kyvety průměru 1,7–30 mm pro objem vzorku 25 µl až několik ml). Kyveta musí být čistá a suchá před vnesením vzorku. Pozor! Nečistit chromsírovou směsí (zbytky paramagnetického Cr na skle!). Kyvetu po čištění sušíme opatrně (při vysoké teplotě se může zkroutit).

Plně deuterované rozpouštědlo: nutné z důvodu minimalizace signálu rozpouštědla, které je samozřejmě ve velkém nadbytku, v ^1H spektru (objeví se pouze zbytkové nedeuterované rozpouštědlo). Navíc je signál deuteria využit pro lockování (kontrola rezonanční podmínky během měření, oprava zpětnou vazbou). Např. D_2O , $\text{DMSO-}d_6$, $\text{DMF-}d_7$, CDCl_3 , C_6D_6 , aceton- d_6 , methanol- d_4 ... Musíme vzít ohled na fyzikální vlastnosti (t.t., t.v. – vybrat dle teploty měření) a různé rozpouštěcí schopnosti (DMSO, DMF...), ale musíme dát i pozor na reaktivitu se studovanou sloučeninou (např. DMSO rozkládá komplexy Pt). Nevýhodou je vysoká cena (D_2O – 1500 Kč/100 ml, DMSO – 2400 Kč/50 ml, DMF – 5760 Kč/10 g).

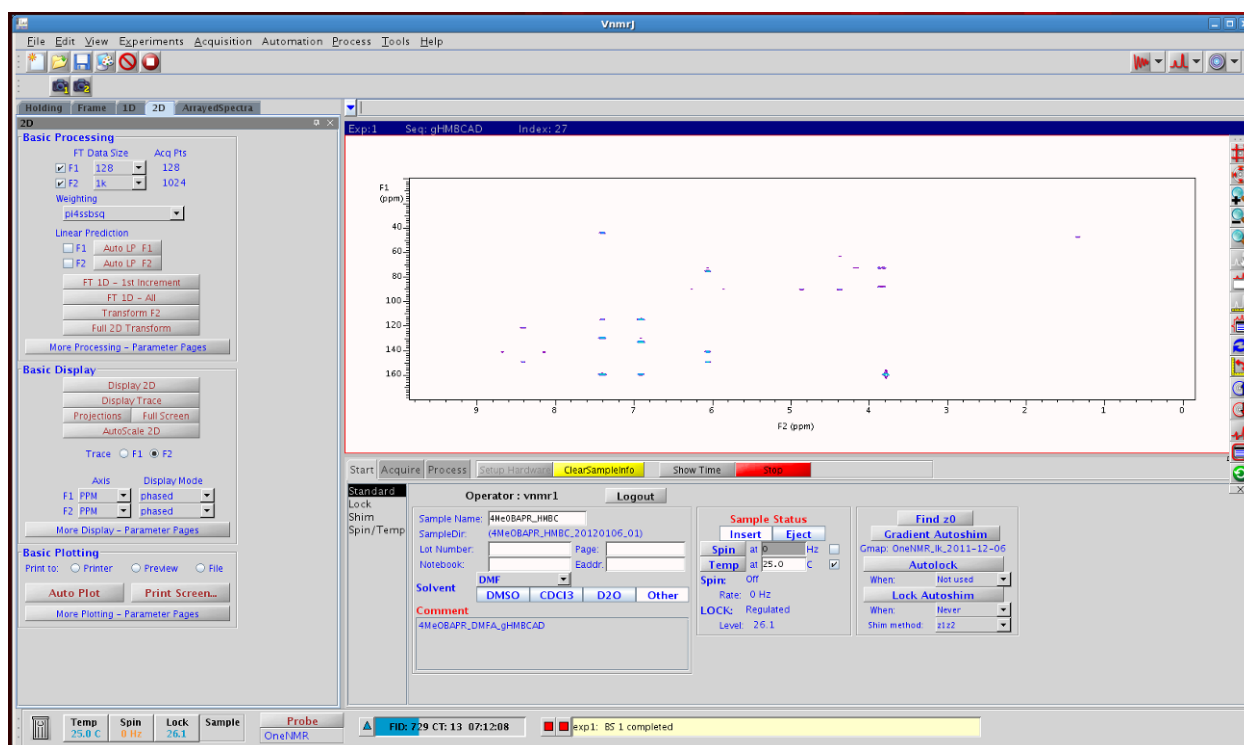
Postup měření

1. Podle výše popsaného postupu připravíme vzorek, kyvetu vložíme do speciálního držáku a spustíme ji do měřicího prostoru.



Obr. 72. Vkládání kyvety se vzorkem do přístroje.

2. Nastavíme akviziční a procesní parametry podle typu experimentu. Přístroj se ovládá softwarem VnmrJ. Obrázek 73 ukazuje okno tohoto softwaru (v průběhu měření 2D spektra).



Obr. 73. Okno softwaru VnmrJ.

3. Provedeme „zalockování“ signálu rozpouštědla (lock) (kompenzace driftu magnetického pole pomocí elektronického uzamčení pole na rezonanci sloučeniny obsažené ve vzorku – nesmí být měřeným ani dekaplovaným jádrem, proto se využívá signál D). Stabilita závisí na homogenitě mg. pole, výkonu vysílače a fázi signálu. Signál nesmí kolísat (nepravidelně – např. to znamená, že jsou ve vzorku pevné částice).

4. Dále je nutné „naladit“ vzorek = SHIMMING – optimalizace homogenity magnetického pole pomocí přídavných korekčních cívek, které jsou umístěny v dutině magnetu. Shimovací cívky vytvářejí opravné gradienty v osách x , y , z , z^2 , xz , yz , $x^2 - z^2$... V případě měření s rotací vzorku (20–25 Hz) ladíme pouze z -korekce. Dobře naladěný vzorek poskytuje úzké a symetrické signály v ^1H NMR spektru.

5. Následuje naladění sondy kvůli vylepšení citlivosti a rozlišení, proto musí být sonda pečlivě naladěna specifickou frekvencí vzorku a dielektrickou konstantu rozpouštědla. V první fázi (TUNING = frekvence) se cívka naladí na radiofrekvenci studovaného jádra (dá se přirovnat ladění stanice na rádiu). Druhá fáze (MATCHING = intenzita) celkový efektivní odpor, tak aby maximální možná RF energie prošla z vysílače na vzorek a pak na přijímač. Nastavení parametrů zesilovače se provede automaticky.

6. Nyní máme přístroj připraven na měření a můžeme spustit akvizici, která může trvat sekundy, minuty, hodiny až dny.

7. Po ukončení měření následuje zpracování naměřeného FIDu a spektra – Fourierova transformace, fázování spektra, integrace spektra (^1H), korekce základní linie.

Zpracování naměřeného FIDu.

Jak vyplývá z popisu FIDu, velikost signálu na frekvenční ose ve spektru je úměrná počáteční amplitudě FIDu a čím déle FID trvá a jeho doznívání je pomalejší, tím užší je linie ve spektru po Fourierově transformaci. Proto lze zjednodušeně říci, že počáteční část FIDu udává intenzity NMR linií, zatímco v pravé části FIDu jsou „zakódovány“ šum a rozlišení. Tohoto se využívá hojně v přídavném matematickém zpracování FIDu před FT, FID lze totiž kombinovat s matematickými funkcemi tak, aby se buď zvýšila intenzita signálu anebo rozlišení signálů.

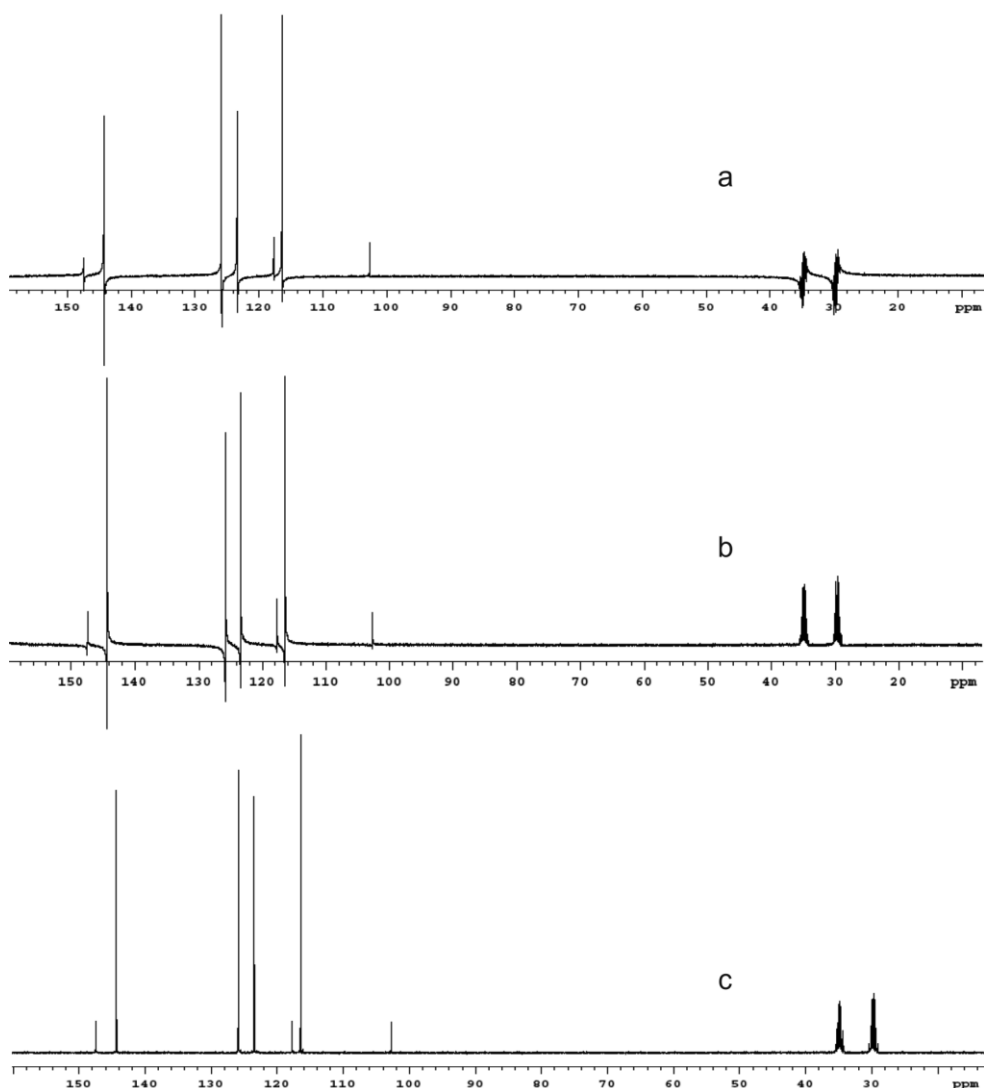
Zpracování NMR spektra

Fázová korekce (obr. 74)

Nezbytný krok následující po Fourierově transformaci, protože je nutné převést signály do čistě absorpčního módu. V NMR totiž detekujeme absorpční signál (kolmý k B_1) a disperzní signál (rovnoběžný s B_1) a fázové chyby jsou projevem disperzního charakteru signálu. Proto se aplikují fázové korekce nultého řádu (frekvenčně nezávislá – stejný stupeň disperzity všech rezonancí přes celé spektrum) a korekce prvního řádu (závislá na frekvenci – měnící se stupeň disperzity přes celé spektrum). Vybereme nejintenzivnější signál a na ten aplikujeme fázovou korekci nultého řádu. Ve spektru vzdálené signály (vlevo či vpravo) pak opravíme fázovou korekcí prvního řádu (moderní přístroje jsou vybaveny automatickými rutinami provádějícími fázování).

Kalibrace osy chemického posunu

Kalibraci provádíme pomocí interního nebo externího standardu (např. TMS pro ^1H , ^{13}C , ^{29}Si). Interní standard je přímo v měřeném vzorku (součást rozpouštědla) a externí standard je umístěn v odděleném prostoru (kapilára, koaxiální systém = kyveta menšího průměru vložena do 5 mm kyvety (standard ve vzniklém plášti, např. 85% roztok H_3PO_4 pro ^{31}P -NMR spektroskopii). Pokud je to možné, volí se sloučenina snadno dostupná a s vhodnými NMR vlastnostmi (intenzivní a úzká linie, jednoduchý signál – singlet). TMS je ideální (těkavá kapalina, nereaktivní, úzký singlet v oblasti, kde se běžně nevyskytují žádné další signály). TMS je standard primární. Často se používá sekundární referencování na signál zbytkových protonů deuterovaného rozpouštědla (např. CHCl_3 v CDCl_3 s posunem 7,26 ppm).



Obr. 74. ^{13}C spektrum (400 MHz) 3-chlor-7-azaindolu v $\text{DMF-}d_7$ s fázovou chybou 0. řádu (a); fázovou chybou 1. řádu (b); zfázované spektrum (c).

Získání důležitých parametrů ze spekter

U ^{13}C NMR spekter přiřazení chemického posunu jednotlivým signálům provede software (automatický peak-picking program) nebo odečteme pomocí kurzoru. V případě ^1H spekter chemický posun i hodnotu interakční konstanty můžeme odečíst ručně nebo automaticky.

Integrace spektra

V módu integrace (typicky i ^1H spekter) postupně označíme počátek a konec všech integrovaných signálů, nakonec nakalibrujeme hodnotu integrálu známého signálu na požadovanou hodnotu (např. jedna methylová skupina = 3, integrace se dá provést i automaticky). Před integrací je nezbytné dobré zřazování spektra, resp. korekce základní linie.

Praktické úkoly:

A. ^1H NMR spektroskopie jednoduchých organických látek.

Úkol: Připravte vzorky vybraných organických látek na měření ^1H NMR spekter, vložte kyvety do přístroje a osvojte si postup měření na 400 MHz NMR spektrometru Varian.

Pomůcky a chemikálie: NMR kyvety, chemické váhy, mikropipeta, ultrazvuková lázeň, centrifuga, špachtle, 400 MHz NMR spektrometr Varian

kyselina benzoová, kyselina anthranilová, bis(3-aminopropyl)amin, 6-chlorpurin

Postup: Podle výše popsaného návodu připravíme vzorek na měření a podle instrukcí pověřeného pracovníka vložíme kyvetu do přístroje. Nastavení parametrů měření a zpracování spektra vyžaduje určité zkušenosti, takže sledujte demonstraci, kterou provede pověřený pracovník. Do protokolu popište postup práce na NMR spektrometru, přiložte naměřená ^1H spektra organických látek a zinterpretujte je.

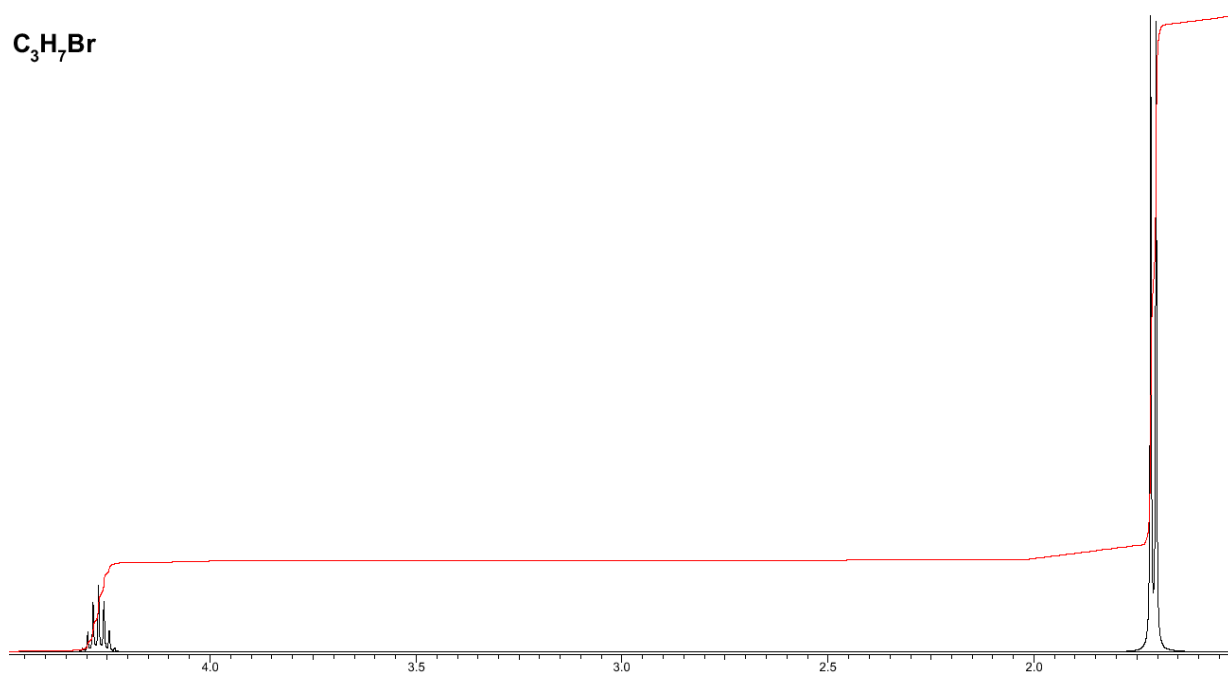
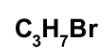
B. Interpretace ^1H a ^{13}C NMR spekter neznámých látek.

Úkol: Proveďte interpretaci následujících spekter neznámých látek, u kterých znáte sumární vzorec.

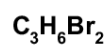
Pozn. Při interpretaci může pomoci tzv. číslo nenasycenosti, které se počítá ze sumárního vzorce. Udává počet násobných vazeb a kruhů.

$UN = n(\text{C}) - n(\text{H})/2 + n(\text{N})/2 + 1$, kde $n(\text{C})$ je počet atomů uhlíku (obecně čtyřvazných atomů), $n(\text{H})$ je počet atomů vodíku (obecně jednovazných atomů, tedy i X), $n(\text{N})$ je počet atomů dusíku (obecně trojvazných atomů). Např. ethan $UN = 0$, ethen $UN = 1$, ethyn $UN = 2$, benzen $UN = 4$ (1 kruh + 3 dvojně vazby).

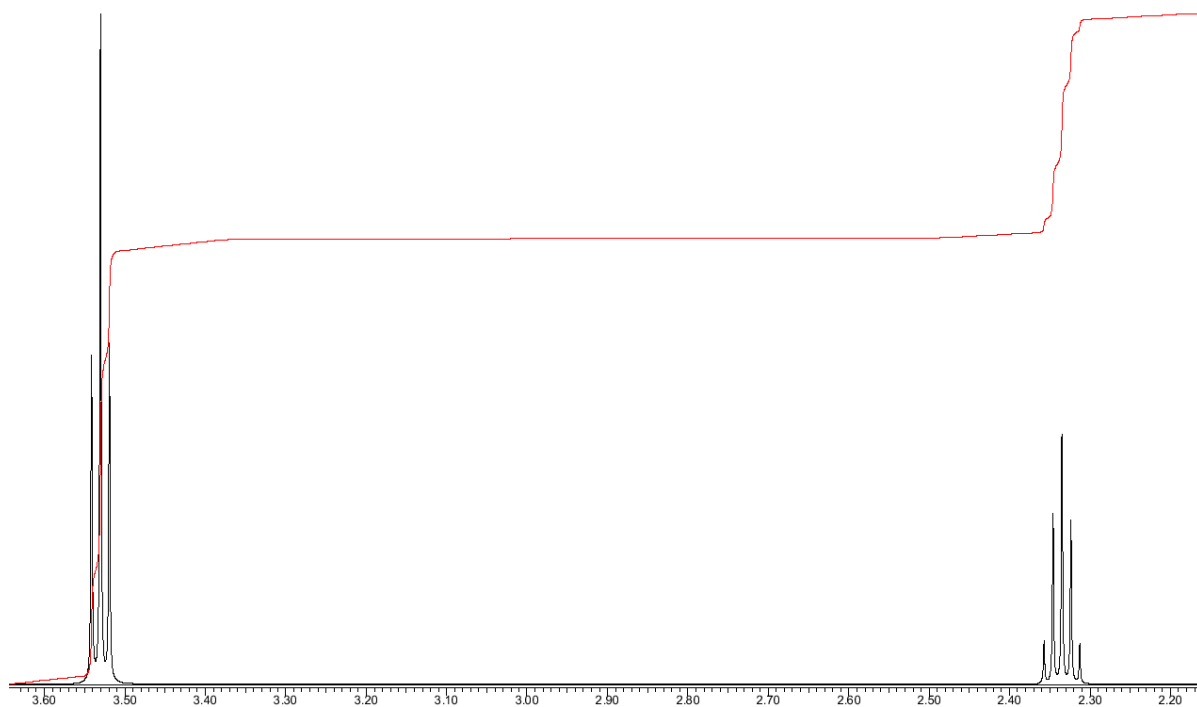
Příklad 1:



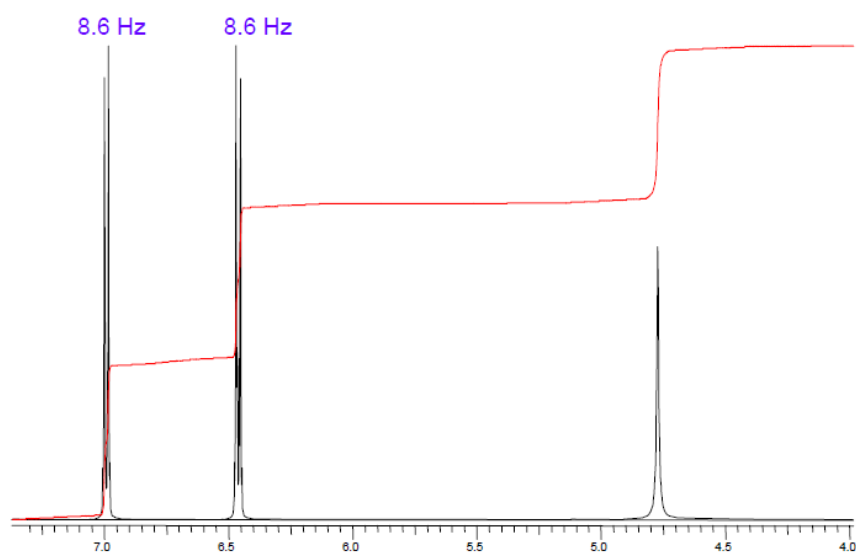
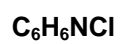
Příklad 2:



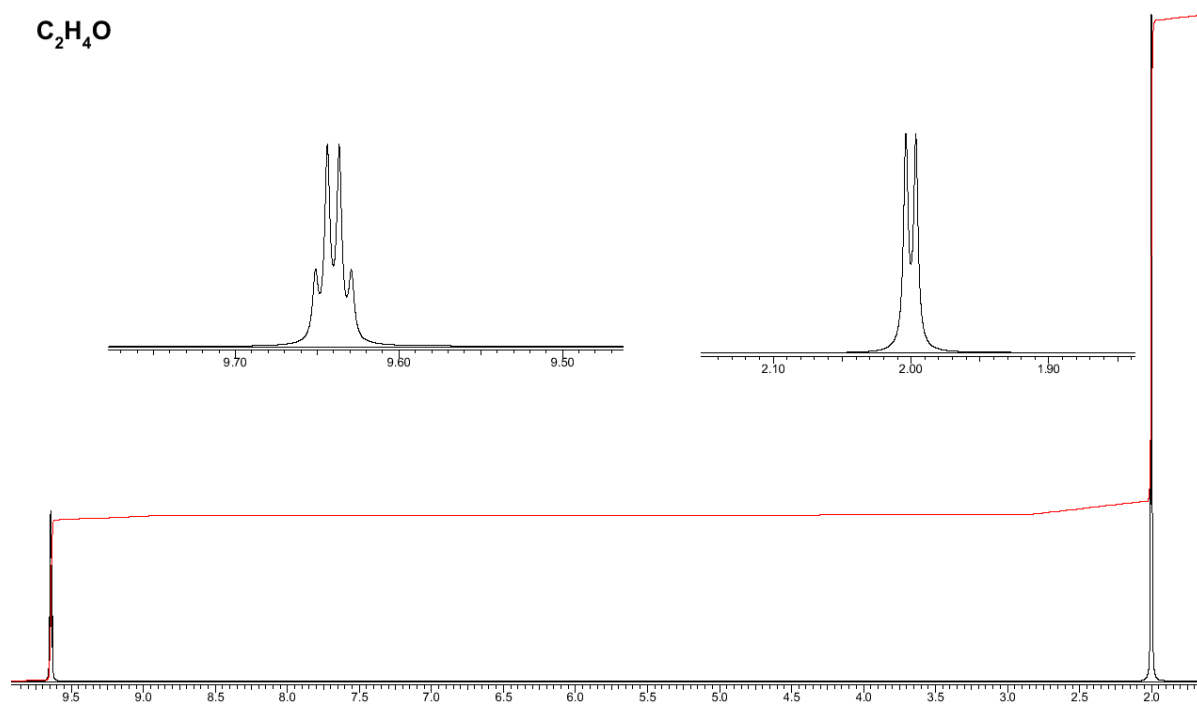
P2



Příklad 3:



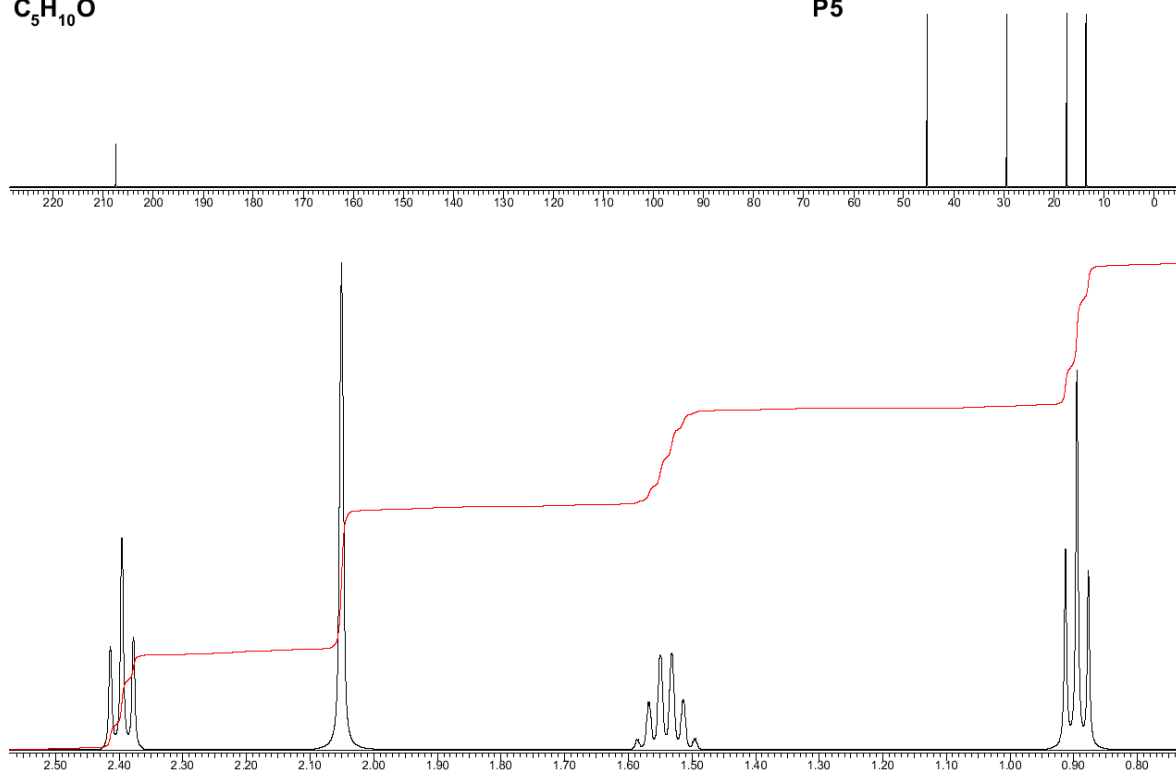
Příklad 4:



Příklad 5 (^{13}C i ^1H spektrum):

$\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}$

P5



Praktické příklady převzaty z <http://www.vscht.cz/nmr/predmet/priklady/priklady.html>, kde lze nalézt i další spektra k procvičování.

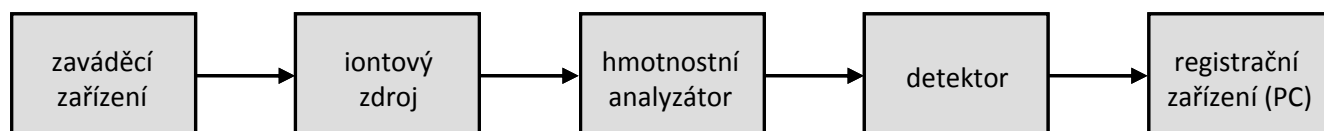
Použitá a doporučená literatura:

1. J. Lindon, D. Koppenaal: *Encyclopedia of spectroscopy and spectrometry*, 2nd Ed., Academic Press; 2010.
2. J. Keeler: *Understanding NMR spectroscopy*, 2nd Ed., John Wiley and Sons; 2010.
3. J. B. Lambert, E. P. Mazzola: *Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. An Introduction to Principles, Applications, and Experimental Methods*. Pearson Education; 2004.
4. E. Breitmaier: *Structure Elucidation by NMR in Organic Chemistry: A Practical guide*. John Wiley & Sons; 2002.
5. Elektronické přednášky VŠCHT Praha, http://www.vscht.cz/nmr/predmet/metody_urcovani-nmr.html.

Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (MS = mass spektrometry) je fyzikálně chemická metoda určování hmotností atomů, molekul a molekulových fragmentů po jejich převedení na ionty. Nepatří mezi spektroskopické techniky, nevyužívá totiž interakci elektromagnetického záření s látkou, při které dochází k výměně energie. Ale výsledkem je hmotnostní spektrum. **Podstatou** této metody je rozdílné chování iontů s různou hmotností v elektromagnetickém poli. Tato metoda má velmi dobrou vypovídací schopnost o struktuře analyzovaných látek, hlavní oblastí jejího analytického využití je zejména stopová analýza organických látek s důrazem na zjištění jejich struktury. Umožňuje také určit izotopový poměr prvků v analyzovaném vzorku ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^2\text{H}/^1\text{H}$, $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$, $^{17}\text{O}/^{16}\text{O}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$, $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$, $^{33}\text{S}/^{32}\text{S}$). Hmotnostní spektrometry nízkého i vysokého rozlišení lze provozovat v běžných podmínkách analytických laboratoří, jejich spojení s moderními separačními metodami (nejčastěji HPLC) umožňuje provádět kvalitativní i kvantitativní analýzu látek.

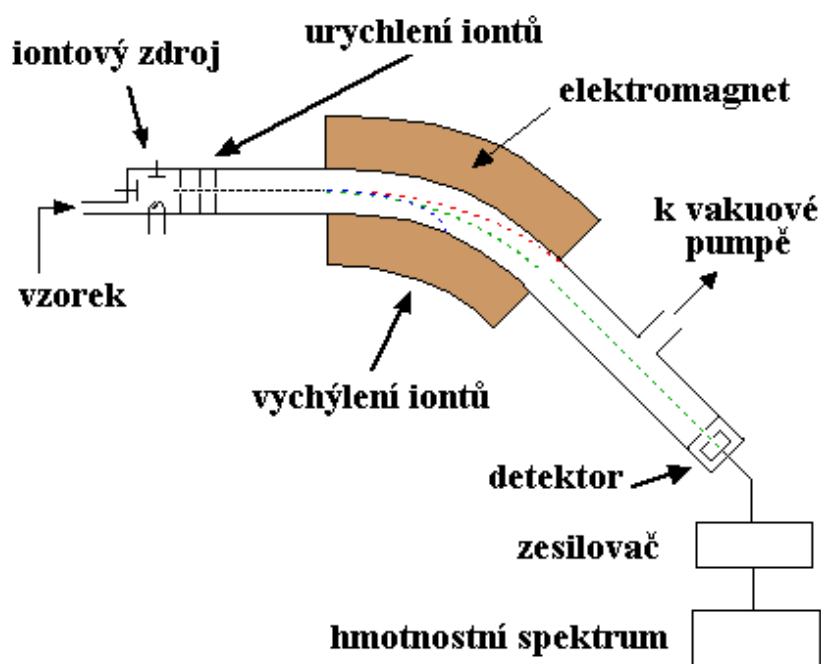
Experimentální uspořádání



Obr. 75. Blokové schéma hmotnostního spektrometru.

Všechny **hmotnostní spektrometry** jsou složeny ze stejných základních součástí:

1. Iontový zdroj
2. Hmotnostní analyzátor
3. Detektor
4. Řídící počítač



Obr. 76. Části hmotnostního spektrometru.

Hmotnostní spektrometry pracují v prostředí silného vakua. Iontový zdroj slouží k převedení analyzované látky do ionizovaného stavu, zde dochází k většině fragmentačních reakcí. Hmotnostní analyzátor umožňuje rozdělit v prostoru nebo v čase směs iontů o různých hmotnostech. Detektor poskytuje analogový signál úměrný počtu dopadajících iontů. Získaný signál je poté převeden do počítače a následně zpracován do formy hmotnostního spektra. Nedílnou součástí každého hmotnostního spektrometru je výkonný vakuový systém, který umožňuje udržet dostatečně nízký tlak za provozních podmínek.

Ionizace a iontové zdroje v MS

Veškeré informace poskytované hmotnostním spektrometrem se týkají pouze částic nesoucích náboj (iontů), proto je třeba elektroneutrální molekuly ionizovat. Podle množství dodané energie se ionizační techniky dělí na měkké a tvrdé - při měkkých technikách ionizace je energetický přebytek dodaný molekule malý a pravděpodobnost fragmentace primárně vzniklého iontu je nízká, naopak, při použití tvrdých ionizačních technik dodaná energie způsobí rozsáhlejší fragmentaci primárně vzniklého iontu. Studovaná látka je většinou analyzována v plynné fázi (je předem odpařena do vakua), techniky ionizace z fáze kondenzované (kapalně) jsou vhodné pro analýzu netěkavých látek. Nejčastěji se používají ionizace:

1. Ionizace nárazem elektronů (EI) je tvrdou ionizační technikou z plynné fáze, při které analyzovaná látka interaguje s proudem urychlených elektronů za vzniku radikalkationtu. Jako zdroje elektronů se nejčastěji používá elektricky žhavené rheniové nebo wolframové vlákno. Proud elektronů je směřován prostorem iontového zdroje směrem k anodě.

2. Ionizace elektrickým polem (FI) je příkladem měkké ionizace z plynné fáze. K vytržení valenčního elektronu z molekuly dojde působením nehomogenního elektrického pole mezi hrotem pracovní elektrody a výstupní štěrbinou zdroje. Podmínkou úspěšnosti FI je vysoká intenzita pole v okolí elektrody (10^7 V/cm).

3. Ionizace desorpcí polem (FD) patří mezi techniky ionizace z kondenzované fáze. Analyzovaná látka je nanесena přímo na povrch pracovní elektrody. Tato technika umožňuje ionizaci látek netěkavých, které není možné odpařit do vakua.

4. Nárazem rychlými atomy nebo ionty (FAB) – při této měkké ionizační technice z kondenzované fáze se k ionizaci analytu používají urychlené atomy vzácných plynů (Ar, Xe). Jejich využití spočívá zejména při analýzách tepelně nestálých netěkavých látek.

5. Chemická ionizace (CI) je měkkou ionizační technikou z plynné fáze. Primárním zdrojem energie je proud urychlených elektronů. Energie elektronů je přenášena na analyzovanou látku zprostředkovaně přes reakční medium (methan, propan, vodík, voda, amoniak, vodík/helium). Reakční kationty (CH_5^+ a C_2H_5^+) interagují s molekulou analytu M za vzniku kvazi-molekulárního iontu MH^+ .

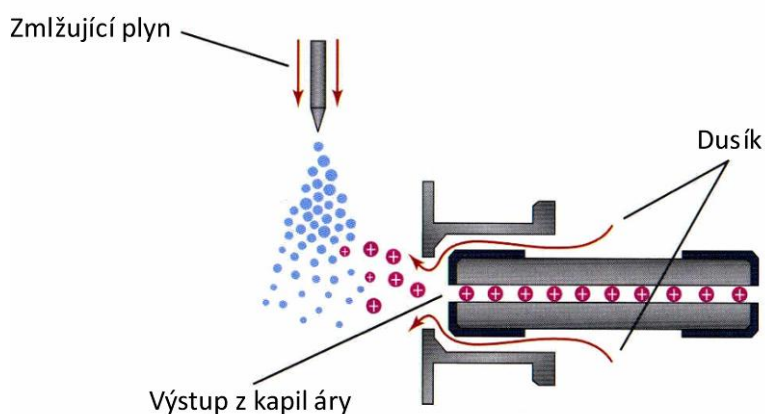
6. Ionizace elektrosprejem nebo termosprejem (ESI, TSI) patří mezi nejměkčí ionizační techniky z kapalné fáze.

Převodu iontů z kapalné fáze do vakua je dosaženo rychlým odsušením mikrokapiček. Je-li proces odsušení dostatečně rychlý, povrchový náboj kapének postačí k převodu iontů z roztoku do vakua bez nutnosti dodání vnější energie.

Sprejové ionizační techniky se

dobře uplatňují při spojení MS s průtokovými analytickými technikami (HPLC-MS).

7. Ionizace MALDI (= matrix assisted laser desorption/ionization - tj. ionizace laserem za přítomnosti matrice) je měkká ionizační technika z kondenzované fáze využívající záření o vhodné vlnové délce a dostatečné intenzitě. Jako zdroje záření se používají lasery pracující



Obr. 77. Schéma ionizace ESI.

v infračervené nebo viditelné části spektra. Nejčastěji se používá v kombinaci s průletovým hmotnostním analyzátozem (MALDI-TOF).

Typy hmotnostních analyzátozů

Hmotnostní analyzátoz umožňuje v čase a/nebo v prostoru separaci směsi iontů o různých hmotnostech. Rozlišujeme několik druhů hmotnostních analyzátozů:

1. Magnetický hmotnostní analyzátoz umožňuje prostorové rozdělení svazku iontů podle hodnoty m/z . Konstrukčně se jedná o elektromagnet, mezi jehož pólovými nástavci procházejí ionty. Ionty urychlené v iontovém zdroji mají kinetickou energii danou vztahem:

$$E_k = mv^2/2 = zV$$

kde m = hmotnost iontu, v = rychlost pohybu iontu, z = náboj iontu a V = urychlovací napětí iontového zdroje.

V homogenním magnetickém poli působí na ionty radiální Lorentzova síla, která je v rovnováze se silou odstředivou:

$$Bzv = mv^2/r$$

kde B = magnetická indukce a r = poloměr dráhy iontu.

Řešením uvedených rovnic se získá vztah pro hmotnostní spektrometr ve tvaru:

$$m/z = B^2 r^2 / (2V)$$

Ionty o rozdílném poměru m/z opisují dráhy o různých poloměrech a dochází tak k prostorové disperzi iontů podle jejich hmotnosti.

2. Kvadrupólový analyzátoz (filtr) bývá součástí hmotnostních spektrometrů s nízkým rozlišením vhodných pro spojení s plynovou chromatografií nebo HPLC. Konstrukčně se jedná o 4 kovové tyče hyperbolického nebo kruhového průřezu, které jsou připojeny ke zdrojům stejnosměrného a střídavého napětí. Ionty, které vlétnou do prostoru mezi tyčemi, se dostanou do střídavého elektrického pole a začnou oscilovat. Zařízení se chová jako filtr nastavený na určitou hodnotu m/z .

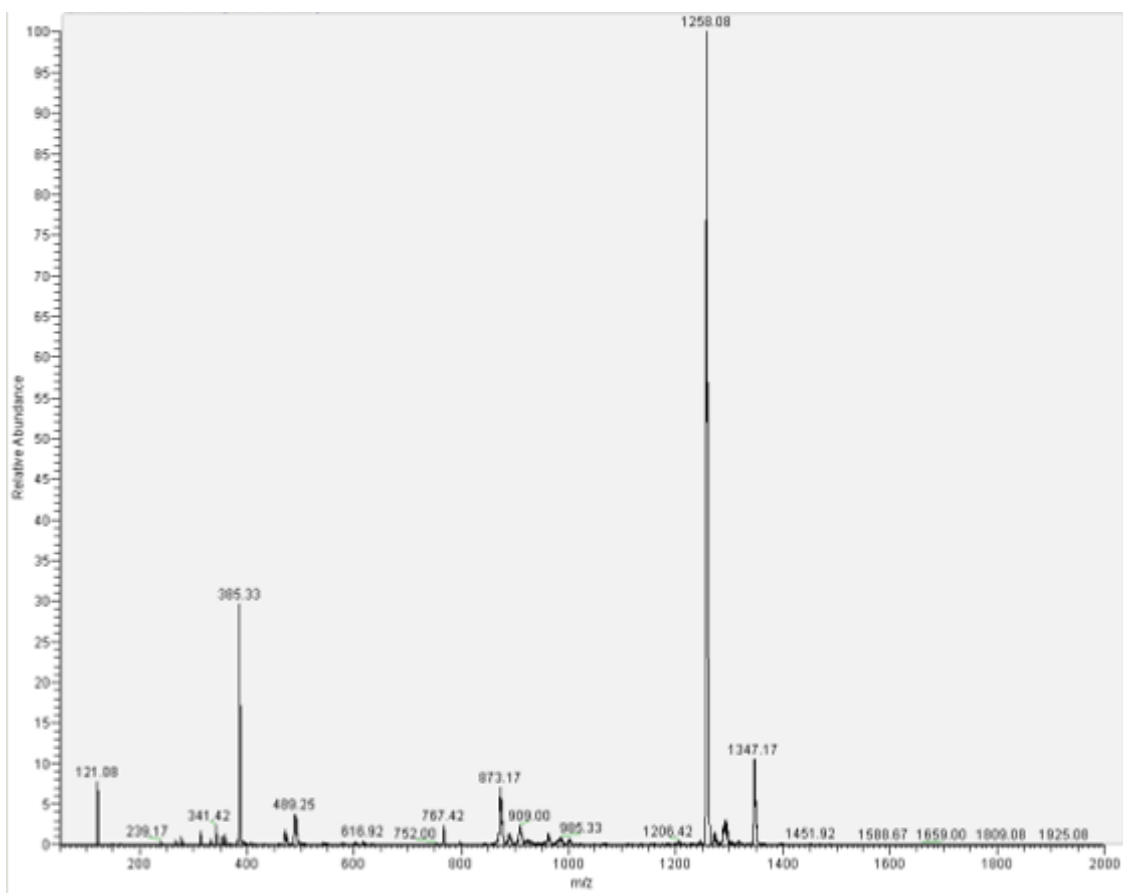
3. Iontová past je pomocné zařízení, které umožňuje uzavřít ionty v ohraničeném prostoru účinkem elektrického pole. Iontová past se skládá ze vstupní a z výstupní elektrody kruhového průřezu a z prstencové středové elektrody. Krajiní elektrody jsou uzemněny, na středovou elektrodu je vkládáno vysokofrekvenční napětí s proměnnou amplitudou. Ionty jsou

nuceny pohybovat se uvnitř iontové pasti po uzavřených kruhových drahách. S rostoucí amplitudou napětí se ionty s rostoucím m/z dostávají na nestabilní trajektorie a opouštějí prostor iontové pasti směrem do detektoru. Tento typ analyzátoru umožňuje tzv. MS^n analýzu látek (sekundární fragmentace iontu o vybrané hmotnosti; $n =$ malé celé číslo ≥ 2)

4. Průletový analyzátor TOF (= time of flight) je tvořen pouze evakuovanou trubicí. K časovému rozdělení iontů podle m/z dochází na základě jejich odlišné doby letu z iontového zdroje do detektoru. Těžší ionty se pohybují nižší rychlostí než ionty lehčí a dorazí do detektoru později. Dosažené rozlišení závisí na délce dráhy, kterou ionty v průletovém analyzátoru urazí.

Hmotnostní spektrum

Hmotnostní spektrum představuje závislost odezvy detektoru (intenzity iontového proudu) na hmotnosti iontu. Osa x je uváděna v jednotkách m/z , kde m je hmotnost iontu a z je počet elementárních nábojů. Na ose y je zaznamenáván vznikající iontový proud, který je ovšem většinou přepočten na procenta relativní intenzity jednotlivých iontů vzhledem k iontu nejintenzivnějšímu iontu spektra, kterému přísluší hodnota 100 %. V hmotnostním spektru většinou můžeme nalézt pík odpovídající molekulárnímu iontu a píky odpovídající iontům fragmentovým. Molekulární ion je ion, který má ve spektru nejvyšší hmotnost (pozor, například při ionizaci elektrosprejem mohou ve spektrometru vznikat adukty o vyšších hmotách!), ionty fragmentů s ním zpravidla korespondují (úbytky hmotnosti při fragmentaci musí být logické). Intenzita molekulárního iontu ve spektru odpovídá struktuře analyzované látky a také použité technice fragmentace.



Obr. 78. Hmotnostní spektrum komplexu $[Pd(ox)(L)_2]$, kde ox = oxalato, L = 2-chlor-N6-(2,4-dimethoxybenzyl)-9-isopropyladenin.

Praktická práce s MS spektrometrem ThermoScientific LCQ Fleet



Obr. 79. Hmotnostní spektrometr LCQ Fleet firmy ThermoScientific

LCQ Fleet je hmotnostní spektrometr s 3D iontovou pastí schopný vícestupňové (MS^n) fragmentace. Přístroj je vybaven zdroji pro ionizaci za atmosférického tlaku (ESI a APCI). Je možné využít široký rozsah m/z (15 - 4000 amu). LCQ Fleet umožňuje spojení s HPLC.

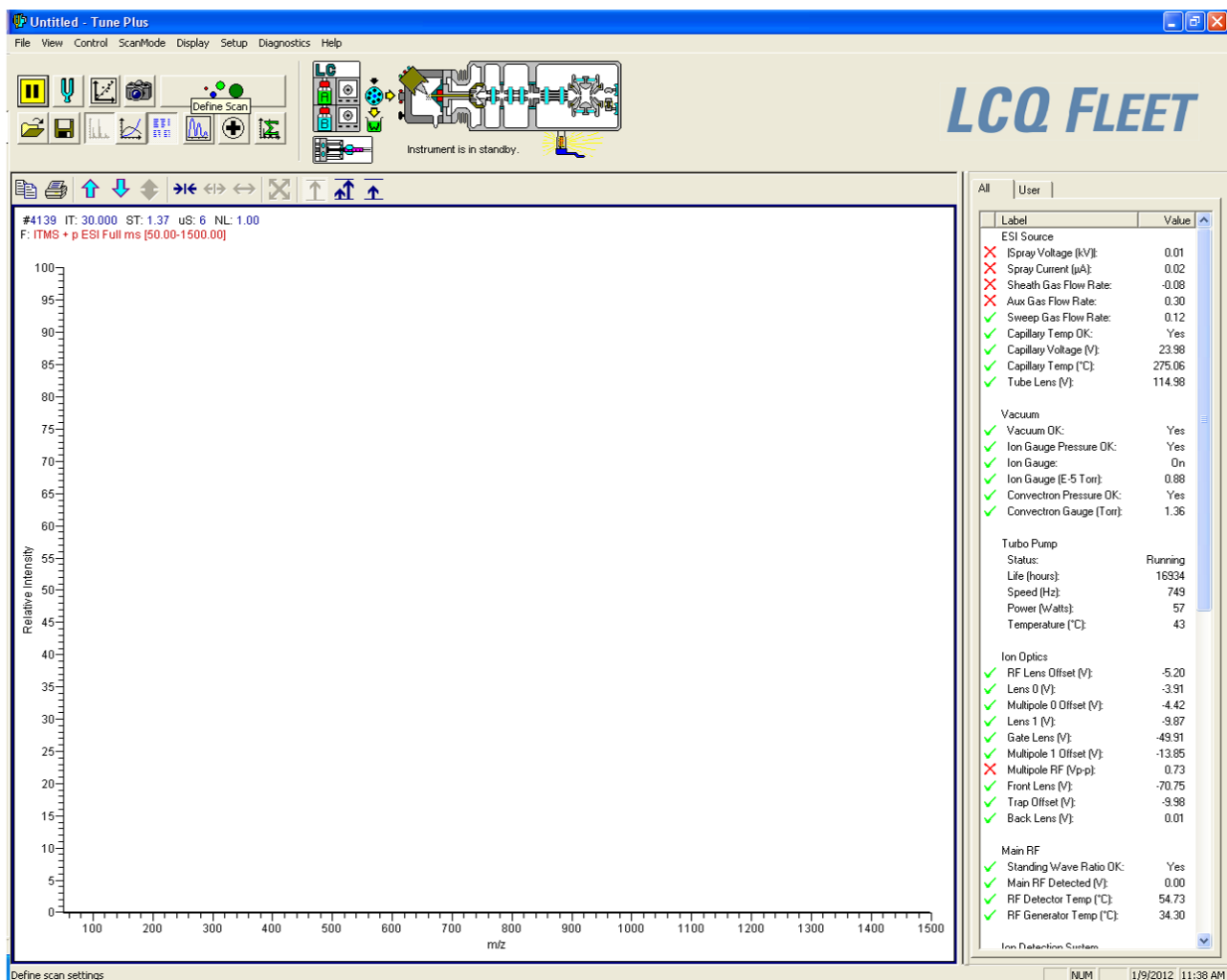
Základní postup práce při měření na spektrometru a obsluha softwaru Excalibur:

Na úvod je třeba zdůraznit, že vzhledem k citlivosti a ceně spektrometru přístroj obsluhuje pouze pověřená osoba, která také řídí veškerou činnost studentů v průběhu cvičení.

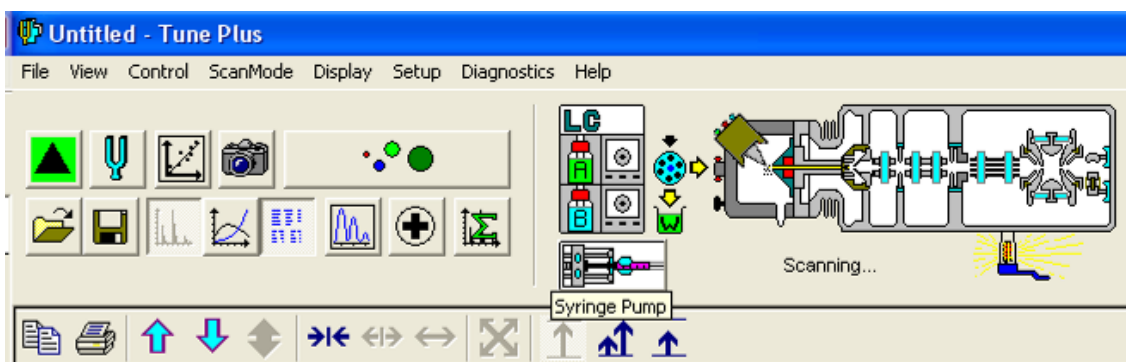
1. Připravíme roztok analyzované sloučeniny - do plastové mikrokumavky o objemu 1,5 ml vneseme malé množství vzorku („na špičku špachtle“), přidáme 1 ml rozpouštědla (zpravidla používáme methanol nebo acetonitril v HPLC čistotě) a pomocí ultrazvukové lázně připravíme roztok. Pozor, v případě neúplné homogenizace vzorku hrozí ucpání kapilár spektrometru!

2. Spektrometr se trvale (mimo vlastní měření) nachází ve „stand by“ režimu, což je v základním měřicím okně „Tune Plus“ indikováno černými čarami ve žlutém čtverečku. V tomto režimu jsou vypnuty některé funkce přístroje z důvodu šetření elektroniky, ale vakuové pumpy zůstávají v chodu. Tento režim změním na režim měřicí „on“ klepnutím

myši na výše zmíněný žlutý čtvereček, čímž se tento změní na zelený s černým trojúhelníkem. V tomto okamžiku je přístroj připraven pro vlastní měření.

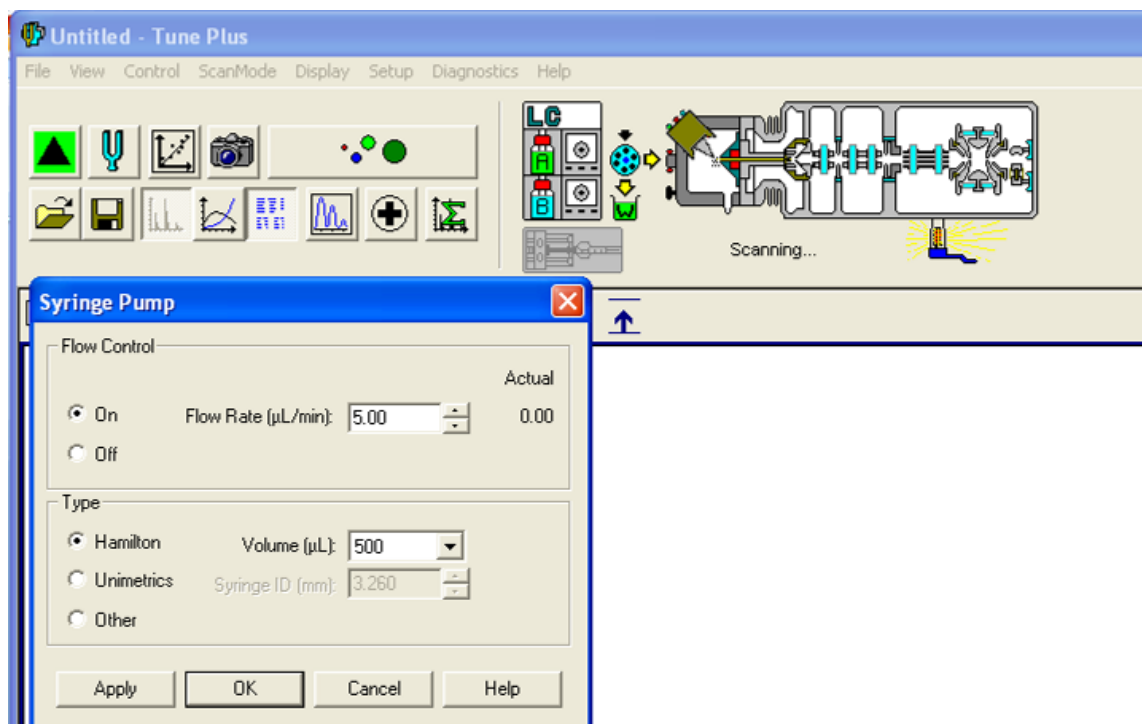


Obr. 80. Základní měřicí okno softwaru Excalibur (Tune Plus).



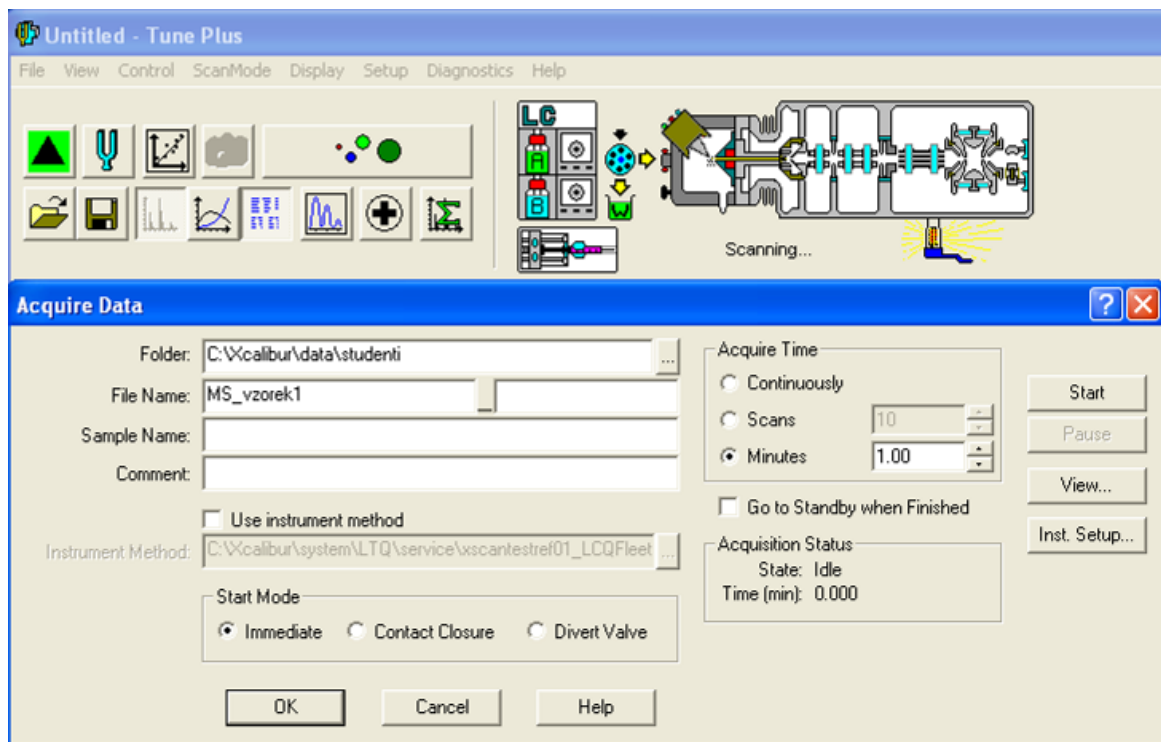
Obr. 81. Detail základního měřicího okna softwaru Excalibur (Tune Plus).

3. Připravený kapalný vzorek nabere do skleněné Hamiltonovy pipety 500 μl tak, aby neobsahoval vzduchové bubliny. Pipetu napojíme na kapiláru spektrometru (růžová barva) a upevníme v držáku na přední straně spektrometru. Klepnutím myši na obrázek v široké šedé liště okna „Tune Plus“ znázorňující vstřikování vzorku (Syringe Pump) otevřeme okno „Syringe pump“, kde nastavíme rychlost průtoku vzorku – „Flow rate“ (na začátku měření zpravidla 5 $\mu\text{l}/\text{min}$) a zvolíme tlačítko „on“ ve stejném okně.



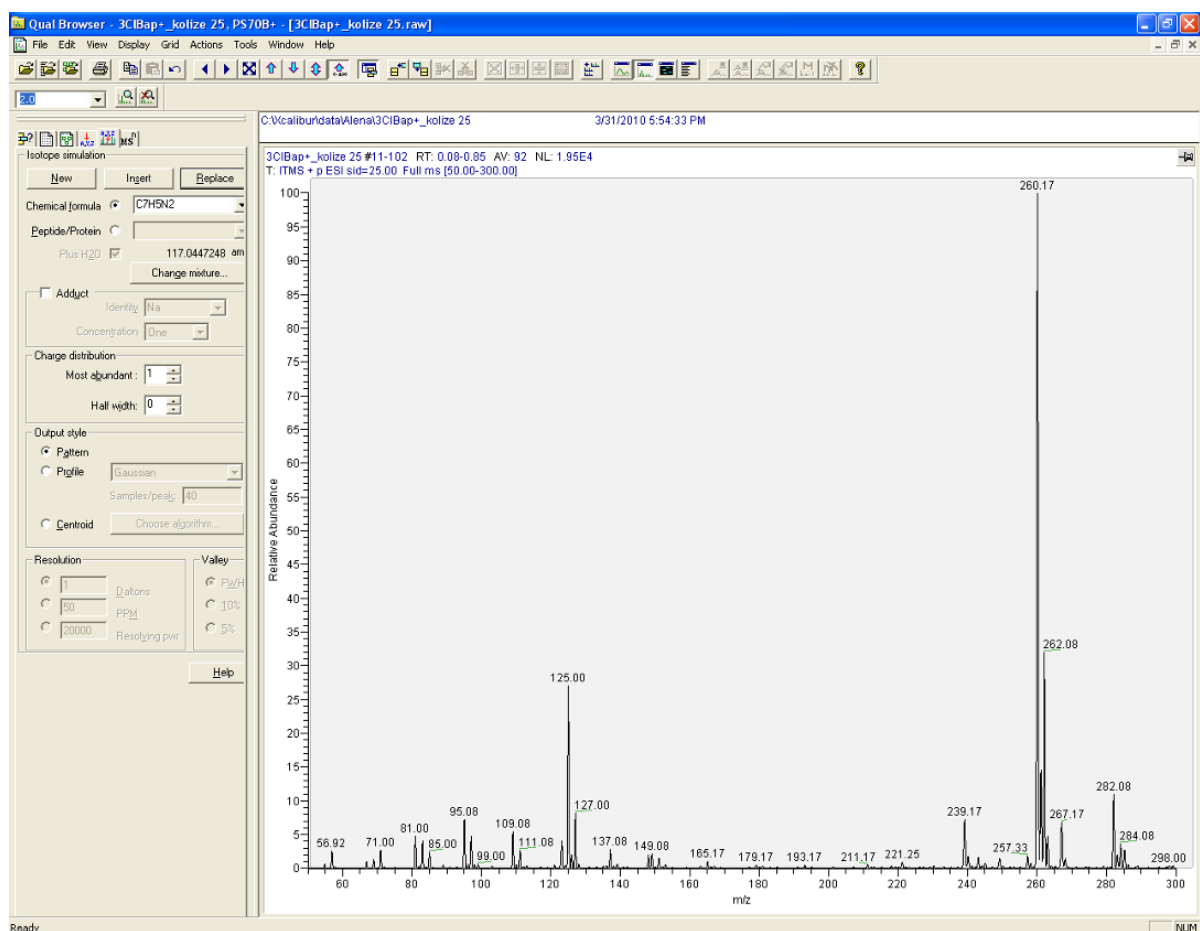
Obr. 82. Okno pro spuštění nástřiku vzorku do spektrometru.

4. Po krátké době se vzorek dostane do spektrometru, je ionizován a v okně „Tune Plus“ se objeví spektrum. Před uložením spektra je v první řadě třeba posbírat dostatek dat. To provedeme kliknutím na tlačítko s obrázkem fotoaparátu.



Obr. 83. Okno pro zahájení sběru dat a uložení MS spektra měřeného vzorku.

5. Po dostatečné době (cca 1 minuta) sběr dat ukončíme zmáčknutím tlačítka „stop“, spektrum je poté automaticky uloženo.
6. Po ukončení měření příslušné spektrum otevřeme v programu „Quality Browser“ (Qual Browser), kde je možné jej vyhodnotit.



Obr. 84. Základní vyhodnocovací okno softwaru Excalibur (Qual Browser).

Praktické úkoly:

ESI-MS spektrometrie 6-(3-fluorbenzylamino)purinu a 6-(3-chlorbenzylamino)purinu

Úkol 1: Změřte MS spektra předložených organických látek

Pomůcky a chemikálie: plastové mikrozkmavky 1,5 ml, automatická pipeta 1 ml + špičky, ultrazvuková lázeň, skleněná Hamiltonova pipeta, buničina, methanol pro HPLC, acetonitril pro HPLC, 6-(3-fluorbenzylamino)purin, 6-(2-fluorbenzylamino)purin

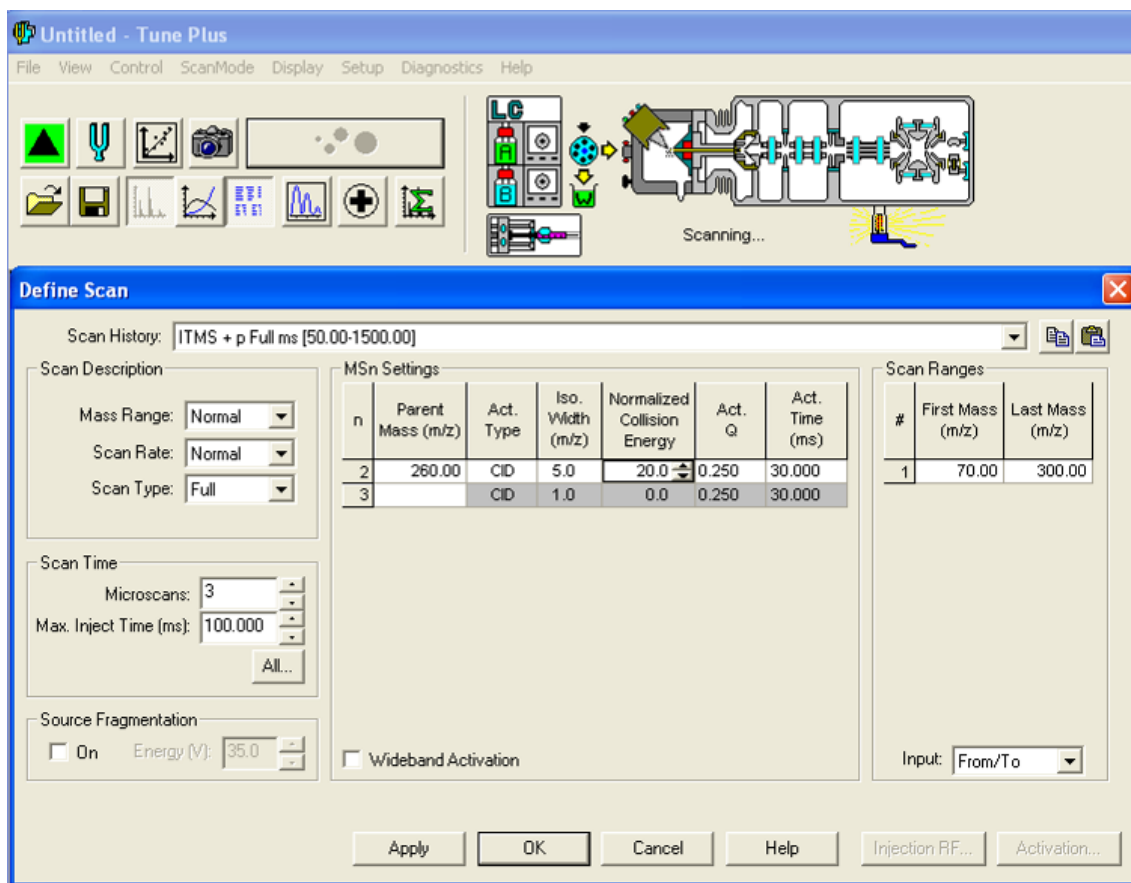
Postup: Dle výše uvedených pokynů a pokynů vedoucího cvičení změřte a vyhodnoťte MS spektra předložených látek a navzájem je porovnejte. (Fluor je prvek monoizotopický, chlor je zastoupen dvěma izotopy, diskutujte tento fakt v rámci získaných spekter.) Přiřaďte maximům ve spektru příslušné produkty fragmentace měřených sloučenin.

Úkol 2: Změřte MS² spektra roztoků použitých v úkolu 1

Pomůcky a chemikálie: stejné jako v úkolu 1

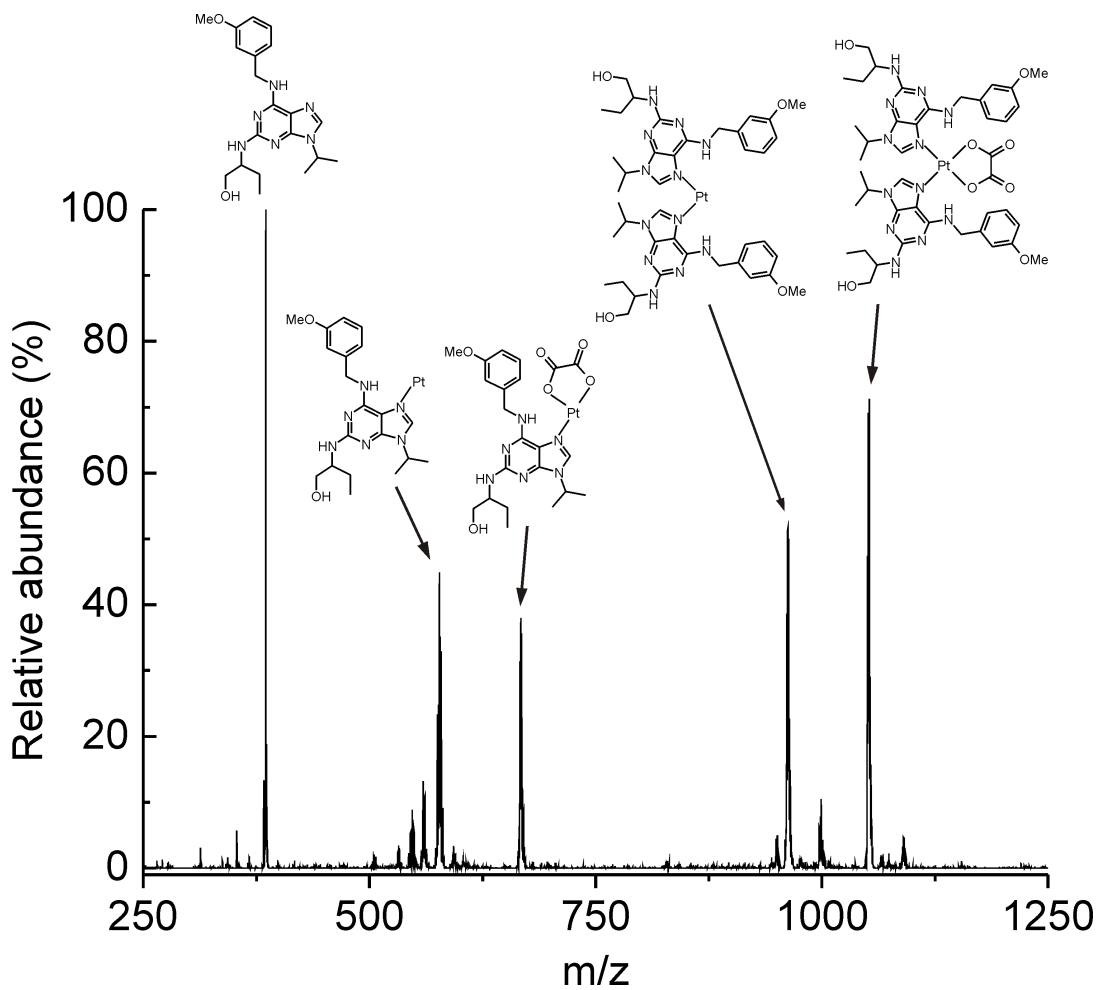
Postup: K měření použijte roztoky připravené pro úkol 1. Po vnesení vzorku do spektrometru zvolíme v šedé liště okna „Tune Plus“ tlačítko „Define Scan“ (šedý obdélník s barevnými

kroužky) a zvolíme hmotnost iontu, který má být dále fragmentován (sekundárně ionizován) - pro naše látky hmotnost odpovídající molární hmotnosti analyzovaných látek (molekulový ion). Analyzujte získaná spektra a přiřaďte maximům příslušné fragmenty.



Obr. 85. Okno pro nastavení hmotnosti iontu, který má být sekundárně fragmentován v MS² experimentu.

Poznámka: Mezi měřeními různých látek je třeba spektrometr včetně kapilár promývat čistým rozpouštědlem (Hamiltonova pipeta se naplní např. methanolem nebo acetonitrilem) až do vymizení spektra měřené látky (tj. až v „Tune Plus“ okně nevidíme charakteristické píky látky z předchozího měření).



Obr. 86. Vyhodnocené hmotnostní spektrum komplexu $[\text{Pt}(\text{ox})(\text{L})_2]$, kde ox = oxalato, L = 2-(1-ethyl-2-hydroxyethylamino)-N6-(3-methoxybenzyl)-9-isopropyladenin.

Použitá a doporučená literatura:

1. J. Lindon, D. Koppenaal: *Encyclopedia of spectroscopy and spectrometry*, 2nd Ed., Academic Press; 2010.
2. F. McLafferty, F. Tureček: *Interpretation of Mass Spectra*, 4th ed., University Science Books; 1993.
3. Manuál spektrometru LCQ Fleet (ThermoScientific).
4. Materiály firmy ThermoScientific.