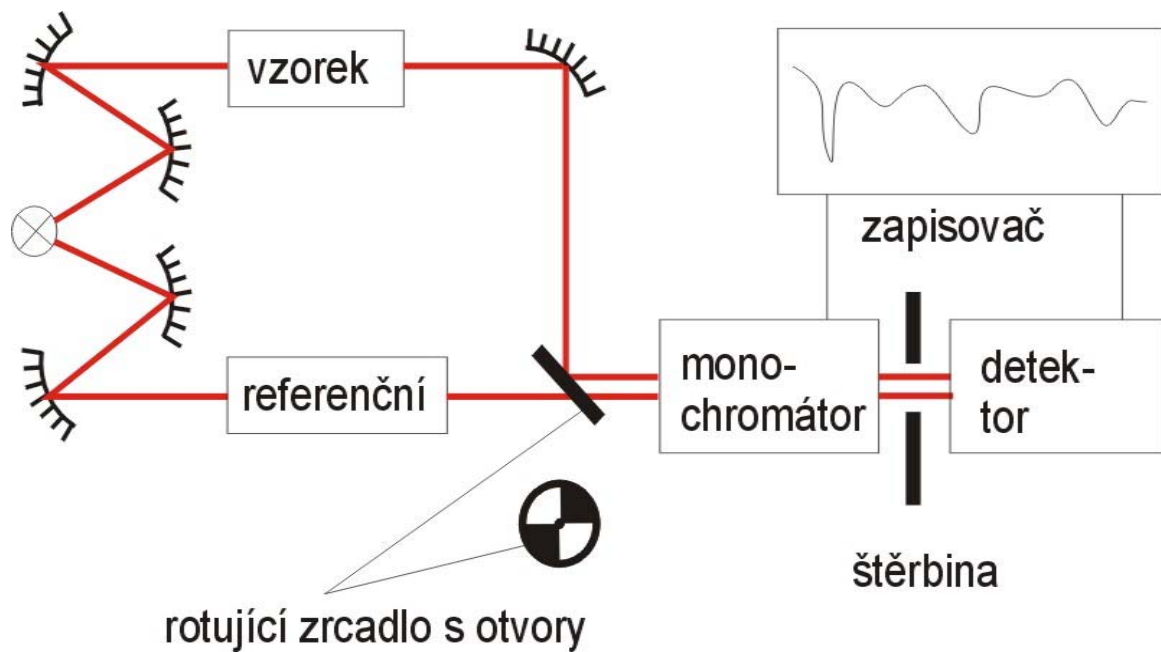




# Organická chemie pro biochemiky II

část 21-A

fyzikálně chemické metody v analýze  
organických látek



organická analýza speciální  
používá fyzikální jevy využitelné ke studiu organických látek  
instrumentální analýza

dotčené typy interakcí hmoty

záření - elektromagnetické vlnění od RTG ( $\approx 10$  nm) k radiofrekvencím ( $\approx 10^2$  m)  
- tok korpuskulárních částic (fotony, elektrony ... ionty, fragmenty molekul)

absorpce záření (excitace, polarizace, štěpení a formování vazeb),

emise záření,

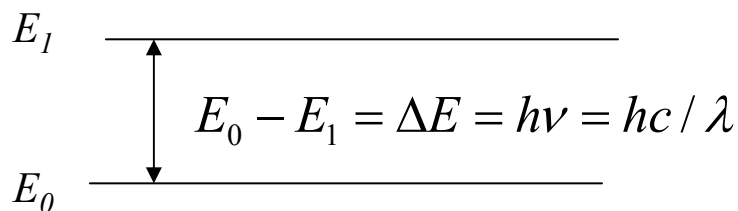
rozptyl (disperse),

ohyb (difrakce),

změna polarizace světla

ostatní metody jsou z pohledu tohoto předmětu „nespeciální“  
odbourávání, chemické korelace, methylační analýza ...

metody však nelze oddělovat, v praxi se prolínají, jde o metodický aspekt



h - Planckova konst.	$6,626 \times 10^{-34}$ Js
$\nu$ - frekvence	$s^{-1}$
c - rychlost světla	$2,997 \times 10^8$ ms <sup>-1</sup>
$\lambda$ - vlnová délka	m

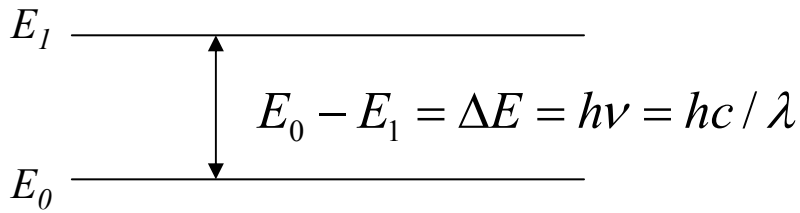
## Planck a Einstein

absorpce záření v oblasti UV a viditelného světla vyvolává přechody vazebných a nevazebných elektronů do vyšších stavů, proces analyzuje  
 absorpční elektronová spektroskopie

záření menší energie mění vibrační a rotační stavy molekul, procesem se zabývá  
 vibrační (infračervená) spektroskopie

elektromagnetické záření interaguje se spinovým stavem, jev analyzuje  
 jaderná (nukleární) magnetická spektrometrie

interakce polarizovaného světla s chirální látkou zkoumají  
 chiroptické metody



h - Planckova konst.	$6,626 \times 10^{-34}$ Js
$\nu$ - frekvence	$s^{-1}$
c - rychlost světla	$2,997 \times 10^8$ ms <sup>-1</sup>
$\lambda$ - vlnová délka	m

## Planck a Einstein

proud energeticky bohatých částic (elektronů, iontů aj.) může vést po předání energie k ovlivnění vazeb (rozpadu, štěpení) - jevem se zabývá

hmotnostní spektrometrie

RTG paprsky se ohýbají na elektronových obalech atomů, jevem se zabývá

rentgenostrukturní analýza

přechody energetických stavů valenčních elektronů jimž byla v „atomárním“ stavu zvnějšíku dodána energie se zabývá

atomová spektrometrie (spektroskopie)

neelastický rozptyl monochromatického záření po inerakci protonu a molekuly sleduje

Ramanova spektroskopie

***Webster:***

**spectrometer**

an instrument used for measuring wavelengths of light spectra

any of various analytical instruments in which an emission (as of particles or radiation) is dispersed according to some property (as mass or energy) of the emission and the amount of dispersion is measured <nuclear magnetic resonance spectrometer>

*(někteří autoři ale soudí, že spektrometr měří hmoty a velikosti (tj. typicky MS))*

*Joseph B. Lambert*

**spectroscop**

an instrument for forming and examining spectra especially in the visible region of the electromagnetic spectrum

*(někteří autoři ale soudí, že spektroskop pozoruje hodnoty (tj. typicky  $h\nu$ ))*

*Joseph B. Lambert*

organické látky jsou obecně sloučeniny uhlíku  
téměř vždy je přítomen vodík, často kyslík, dusík, halogeny, síra a fosfor

pro uhlíkové sloučeniny je typický řetězec  
*Kekulé, Butlerov, Loschmidt, Crum Brown*

konstituce - způsob pospojování atomů v molekule

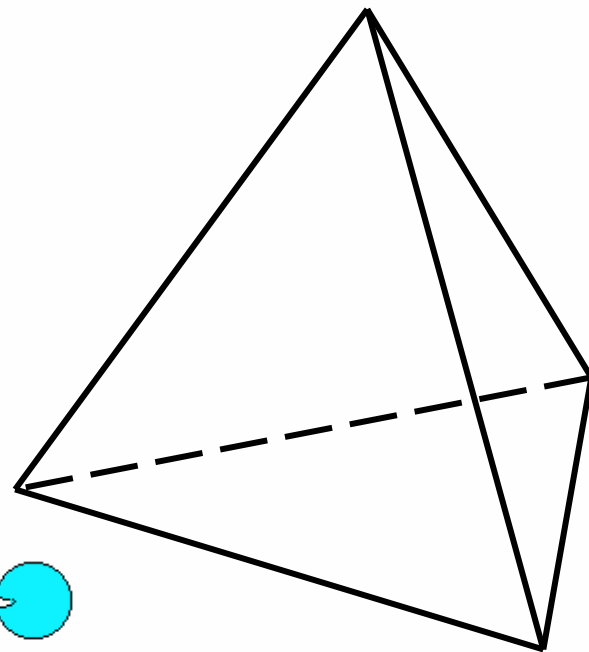
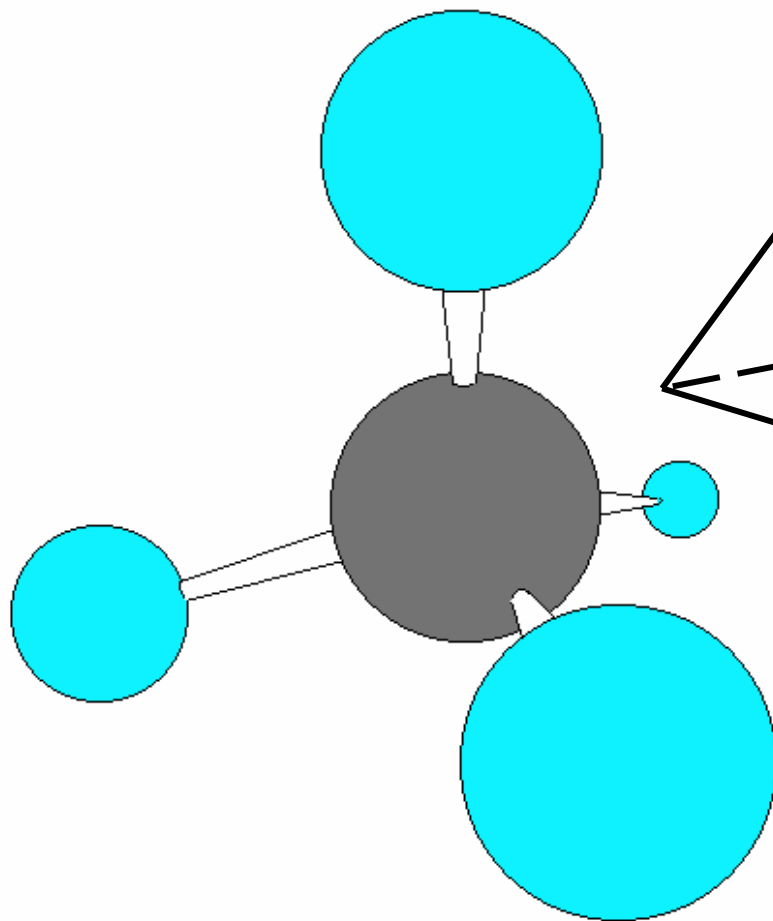
- vazebné úhly v trojrozměrném modelu (též vazebné délky)  
*van 't Hoff*

konfigurace - vzájemné prostorové uspořádání atomů v molekule

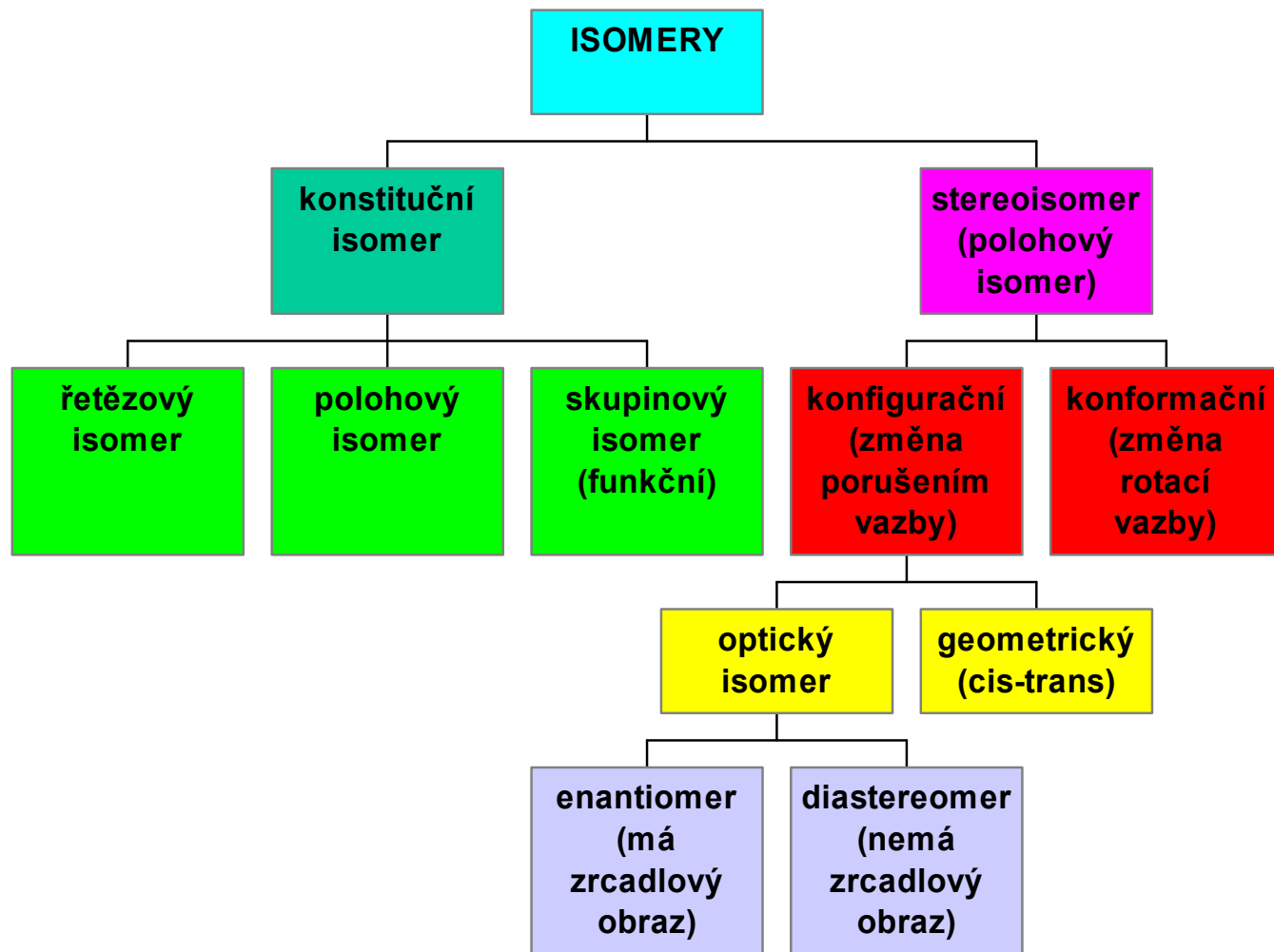
konformace – vzájemné prostorové vztahy na spojnici mezi atomy

struktura

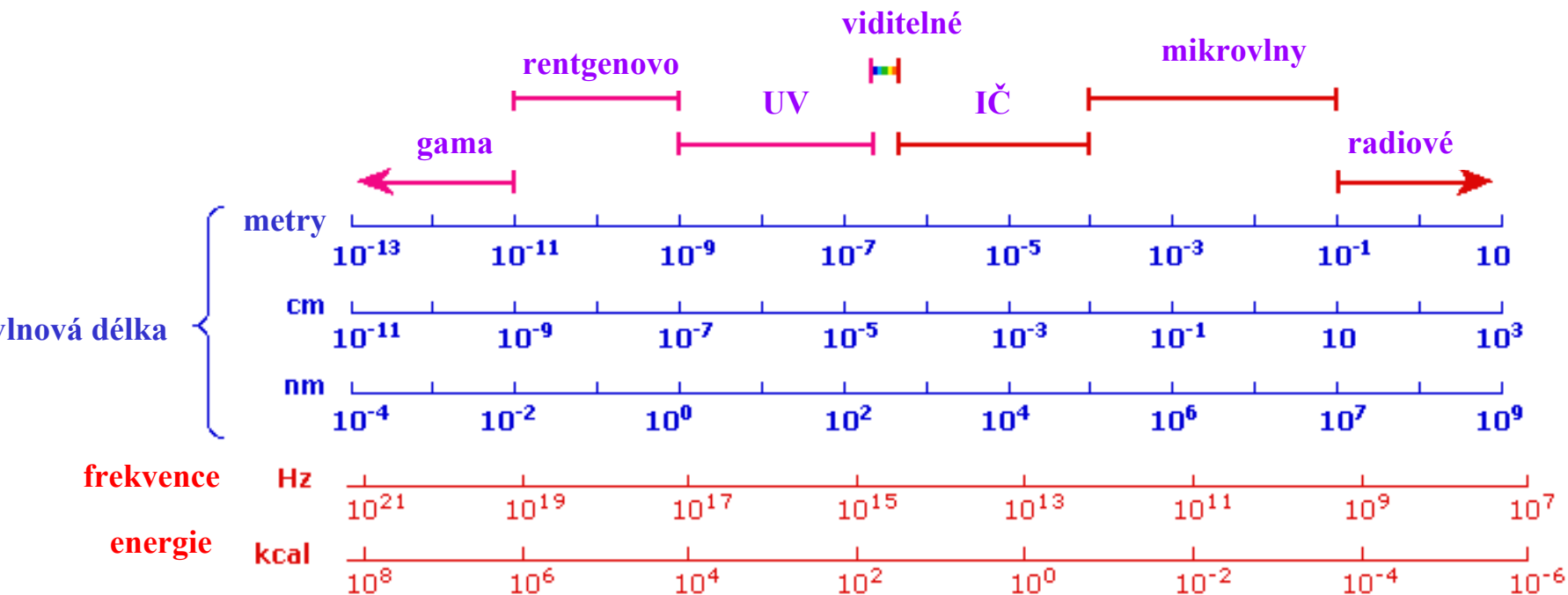
# Struktura organických látek





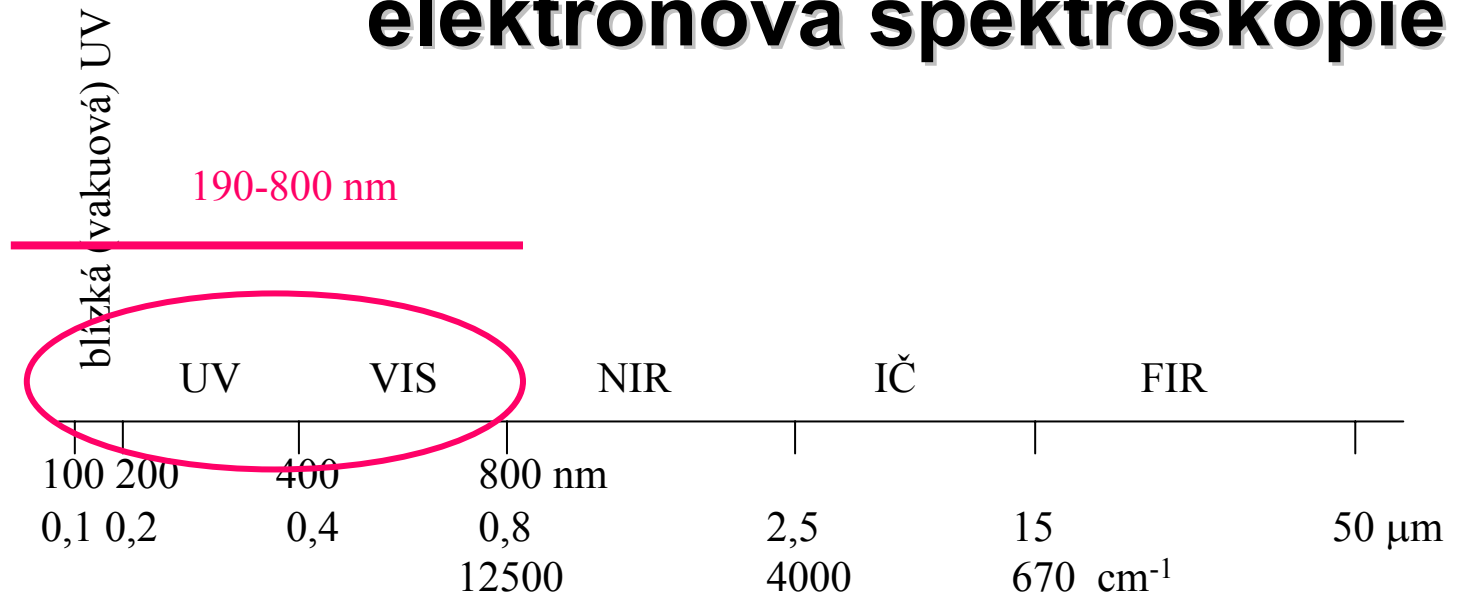


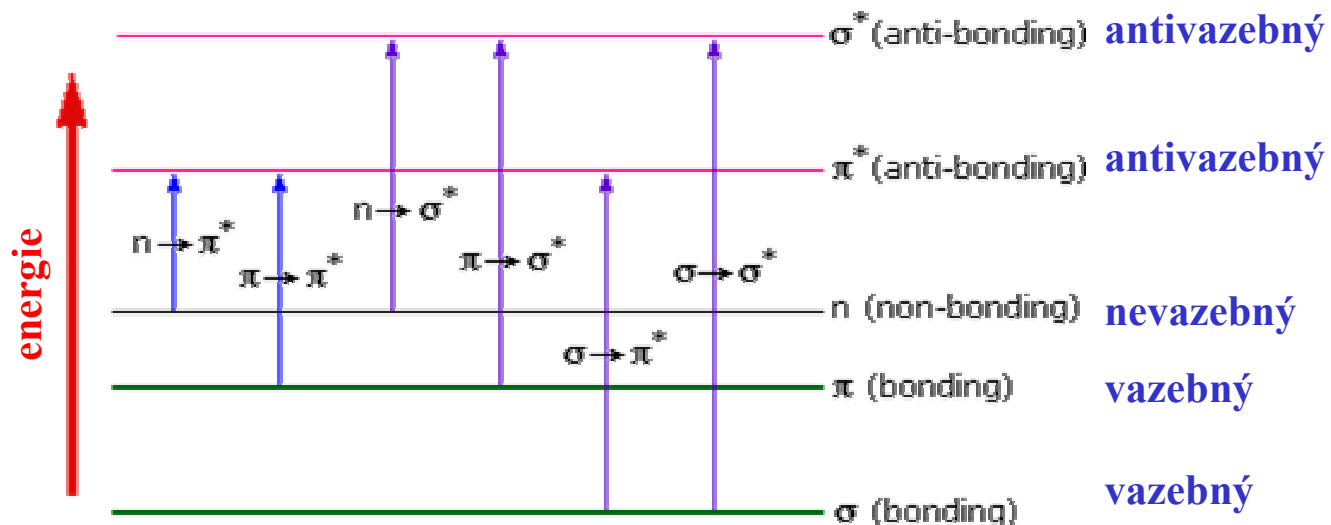
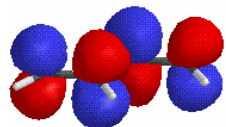
# spektrum elektromagnetických vln



# UV/VIS

## elektronová spektroskopie

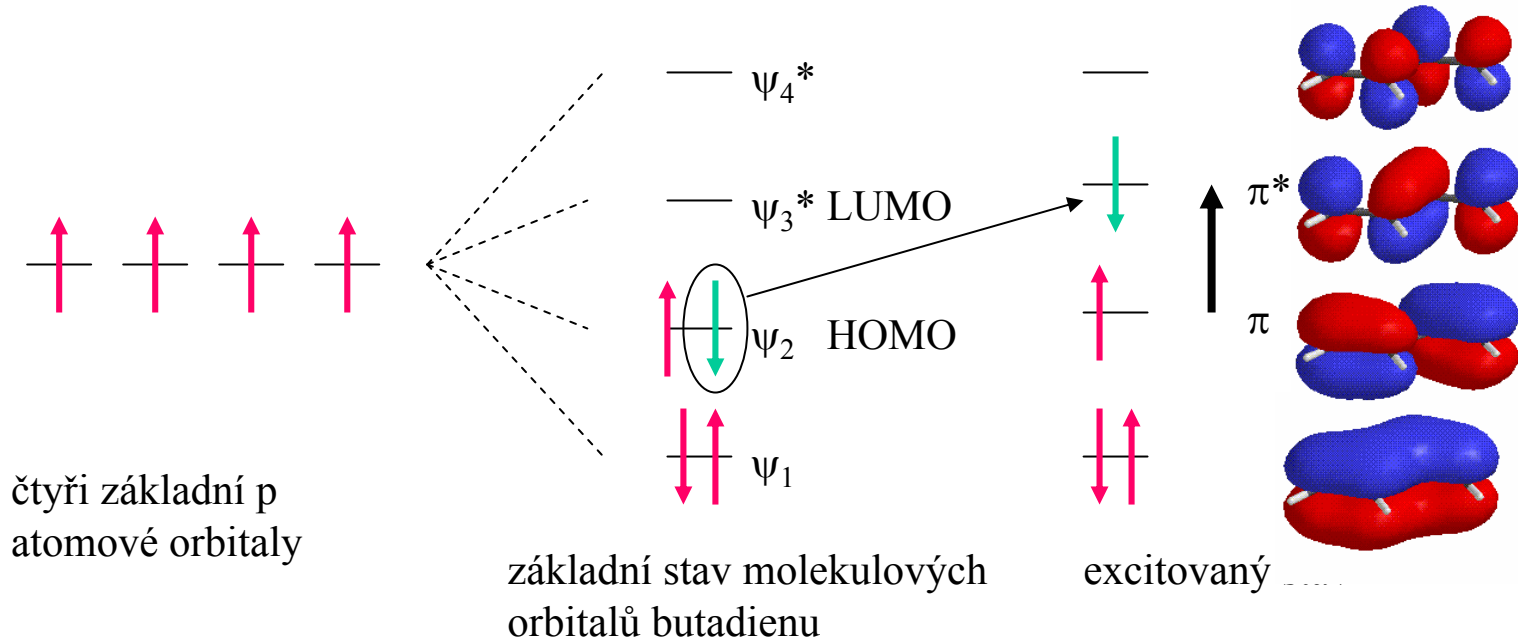


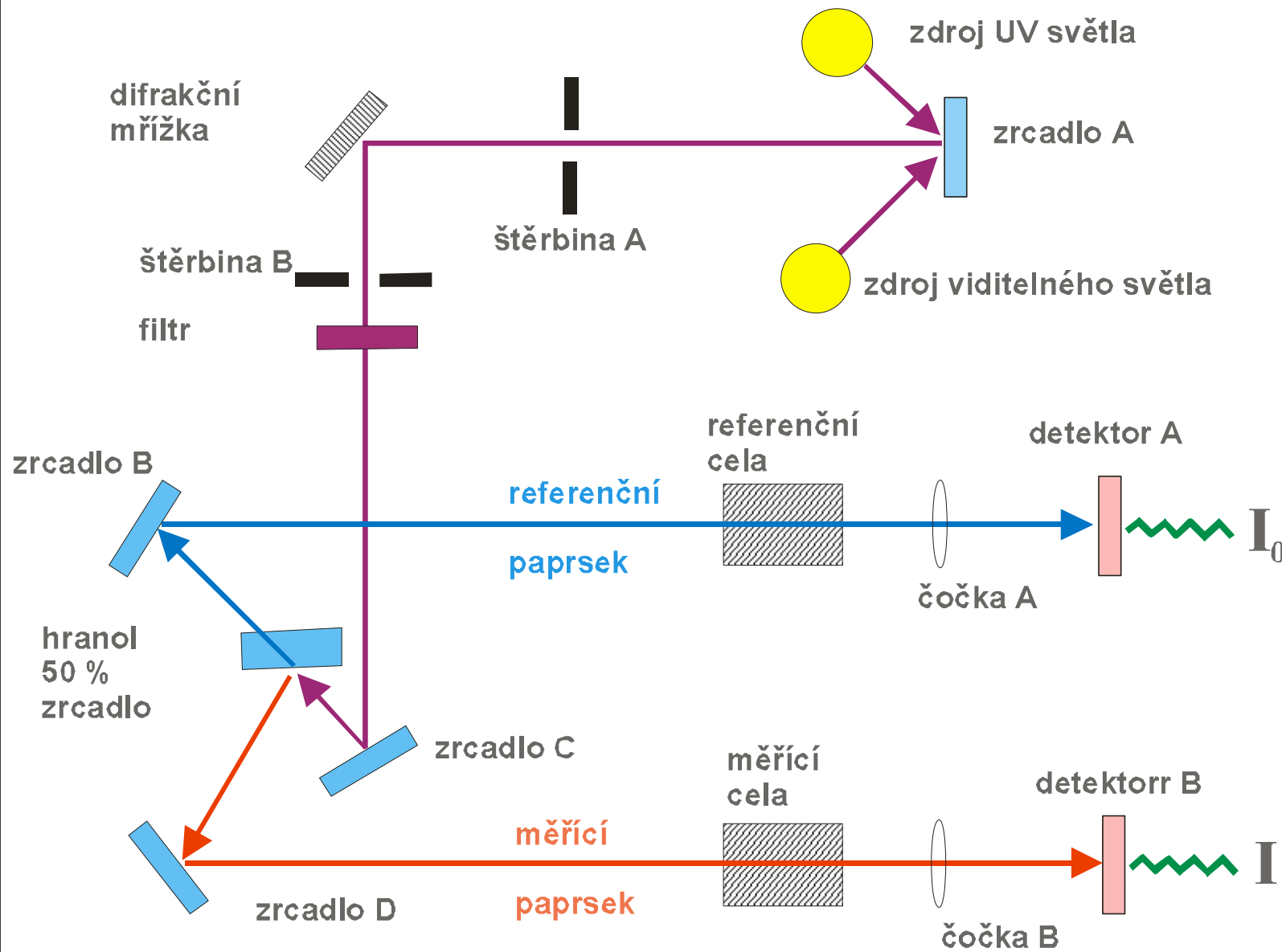


energetické přechody elektronů  
v závorkách anglické názvy hladin

energie záření, které prochází vzorkem je absorbováno a využito k doplnění energie elektronů tak, že mohou vystoupit na vyšší (excitovanou) hladinu

podívejme se, jak taková excitace proběhne např. u butadienu

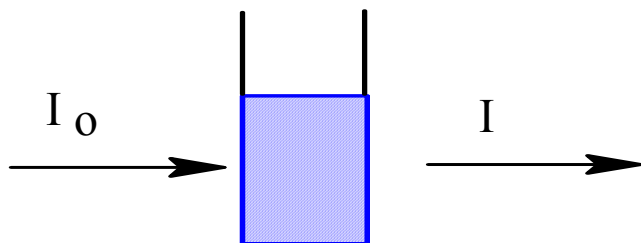




schema dvoupráskového UV-VIS spektrometru



propustnost (transmittance) a pohltivost (absorbance)



vzorek v kyvetě

$$T = \frac{I}{I_0}$$

$$\%T = T \times 100\%$$

$$A = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = \log\left(\frac{1}{T}\right)$$

množství světla absorbované vzorkem je určeno **molární absorptivitou**  $\epsilon$  (absorbční koeficient), což je veličina používaná při srovnávání spekter různých sloučenin; je definována jako:

$$\epsilon = A / c \times l$$

(kde  $A$  = absorbance,  $c$  = koncentrace vzorku v molech / liter a  $l$  = dráha paprsku záření procházející vzorkem v cm)



## Příprava vzorku

plyny se naplní do kyvety z křemene (180-400 nm), skla či plastu (400-800 nm)

kapaliny se naplní do kyvety z křemene (180-400 nm), skla či plastu (400-800 nm)

pevná látka se rozpustí ve vhodném rozpouštědle (ethanol (do 205 nm), voda (do 190 nm) nebo hexan (do 201 nm))

Beerův zákon říká, že absorpce je proporcionální počtu absorbujících molekul

Lambertův zákon říká, že procento absorbovaného záření nezávisí na jeho intenzitě

spojením vzniká **Lambertův-Beerův zákon**

$I_0$  je intenzita dopadajícího záření

$I$  je intenzita záření procházejícího

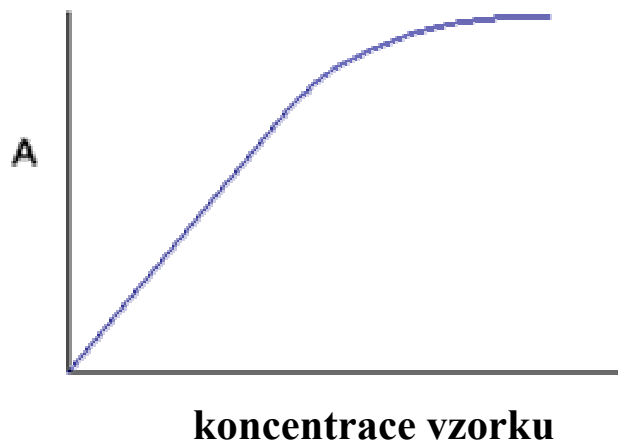
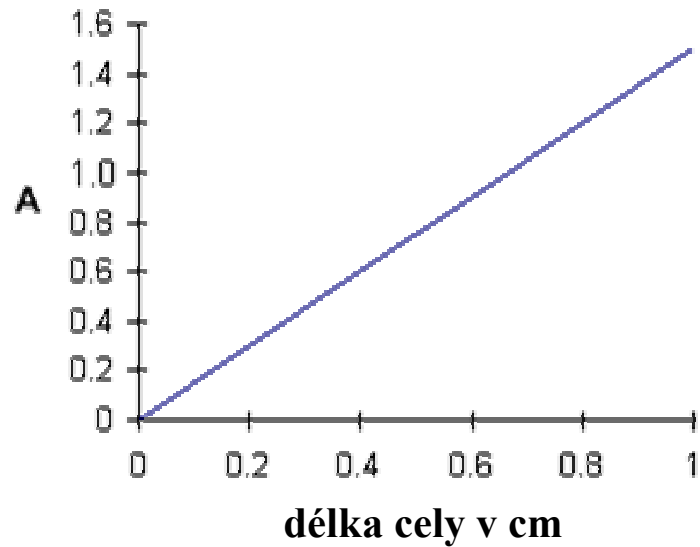
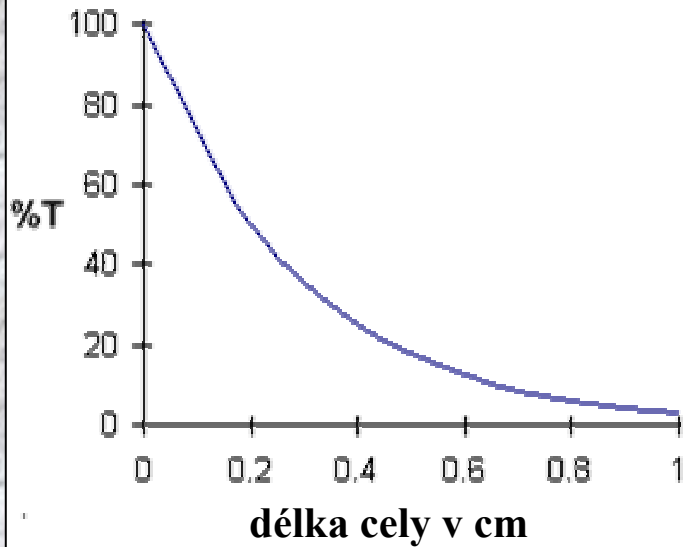
$\varepsilon$  je absorpční koeficient (dř. extinkční)

$l$  je délka absorbujícího prostředí

$c$  je koncentrace vzorku v mol dm<sup>-1</sup>

$$\log_{10} \frac{I_0}{I} = \varepsilon l c$$





platnost Lambertova-Beerova zákona

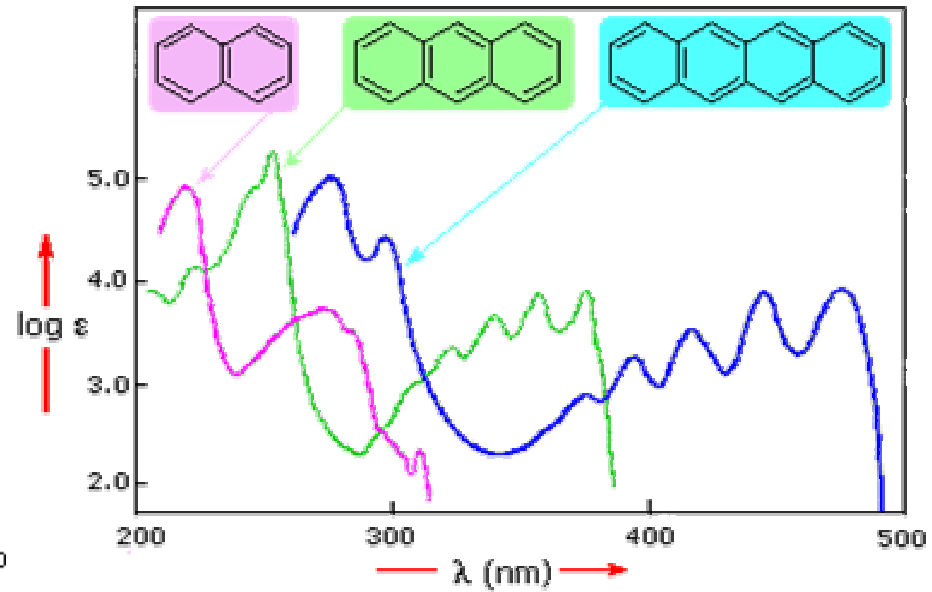
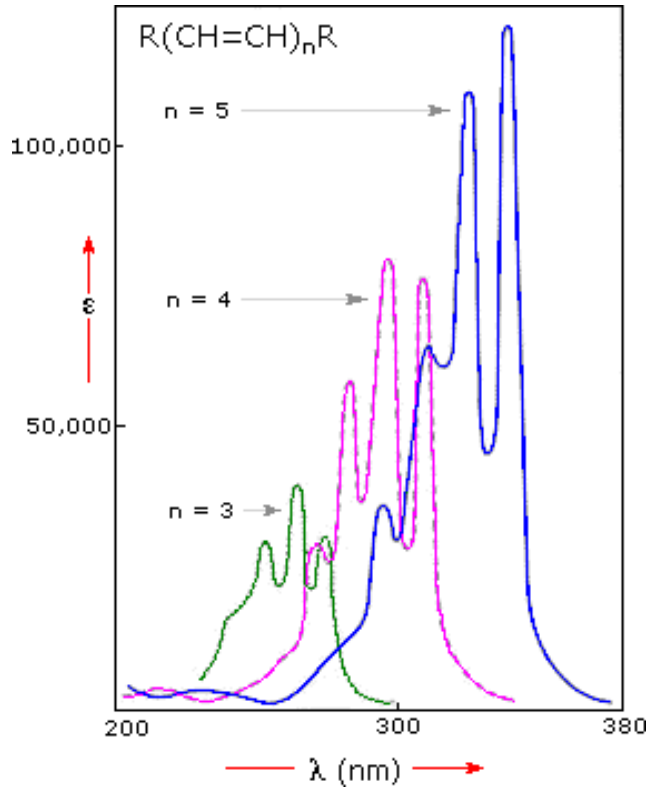
u koncentrace při vyšších hodnotách  
přestává v reálné situaci platit  
také platí jen pro monomerní látky  
u asociátů neplatí (je nelineární)

## příklady některých typických chromoforů

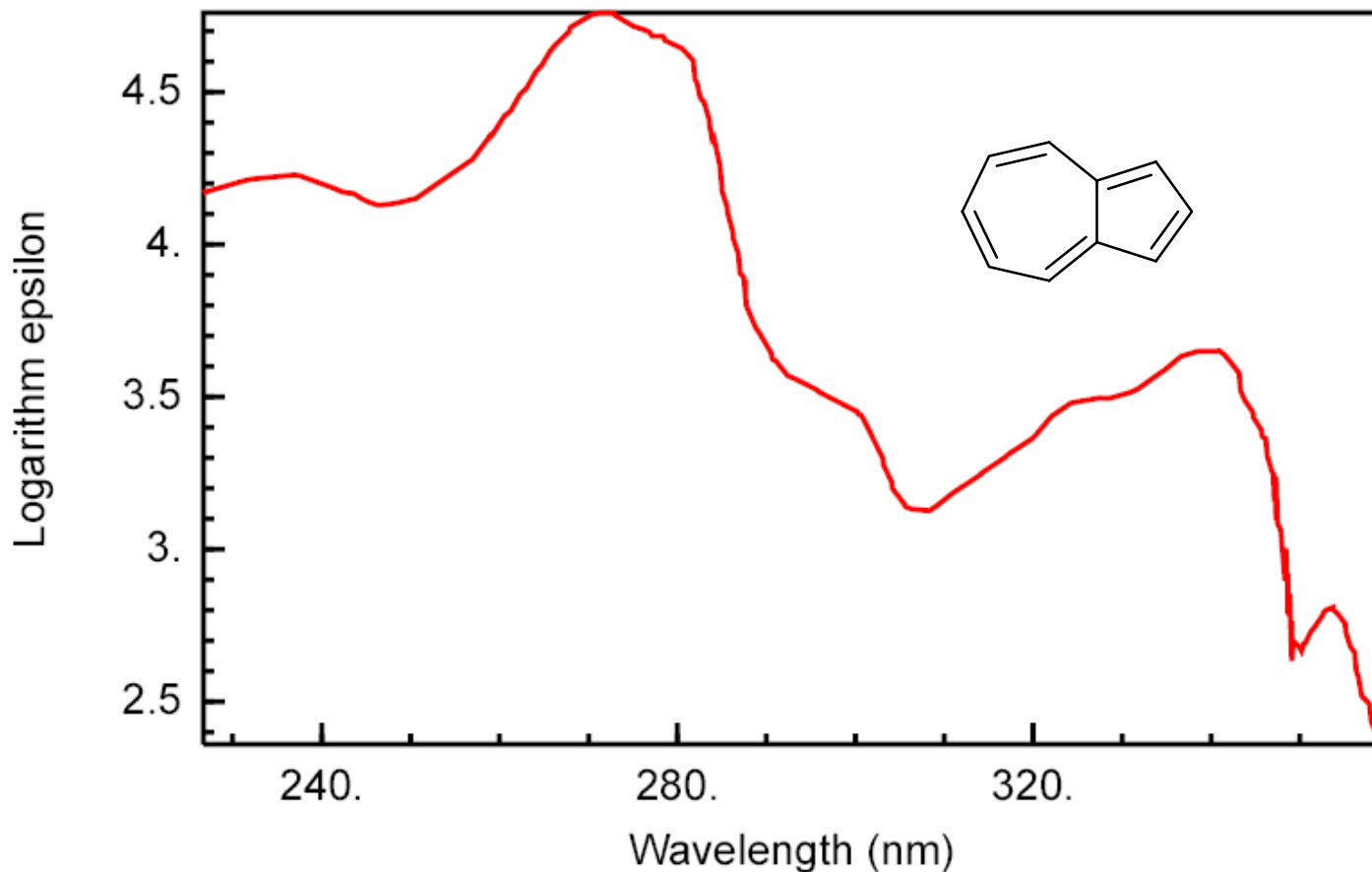
chromofor	látka	excitace	$\lambda_{\max}$ , nm	$\epsilon$	rozpouštědlo
C=C	ethene	$\pi \rightarrow \pi^*$	171	15	hexan
C $\equiv$ C	1-hexyn	$\pi \rightarrow \pi^*$	180	10	hexan
C=O	ethanal	$n \rightarrow \pi^*$	290	15	hexan
		$\pi \rightarrow \pi^*$	180	10	hexan
N=O	nitromethan	$n \rightarrow \pi^*$	275	17	ethanol
		$\pi \rightarrow \pi^*$	200	5	ethanol
C-X	X=Br methylbromid	$n \rightarrow \sigma^*$	205	200	hexan
	X=I methyljodid	$n \rightarrow \sigma^*$	255	360	hexan

## konjugace dvojných vazeb

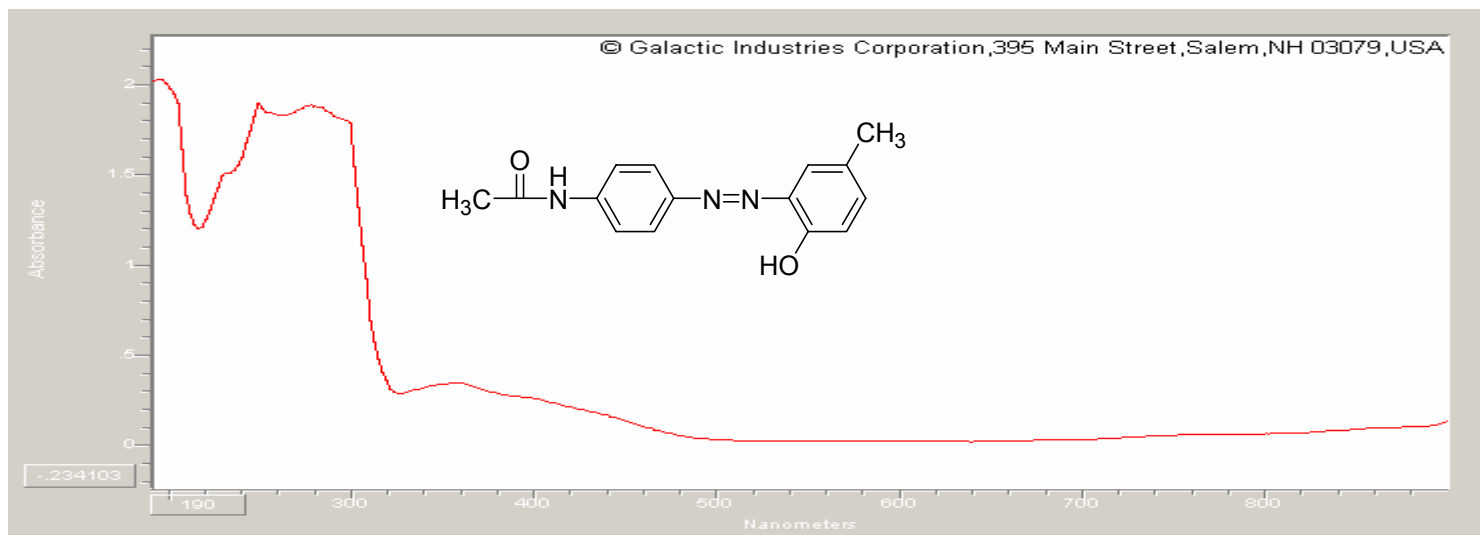
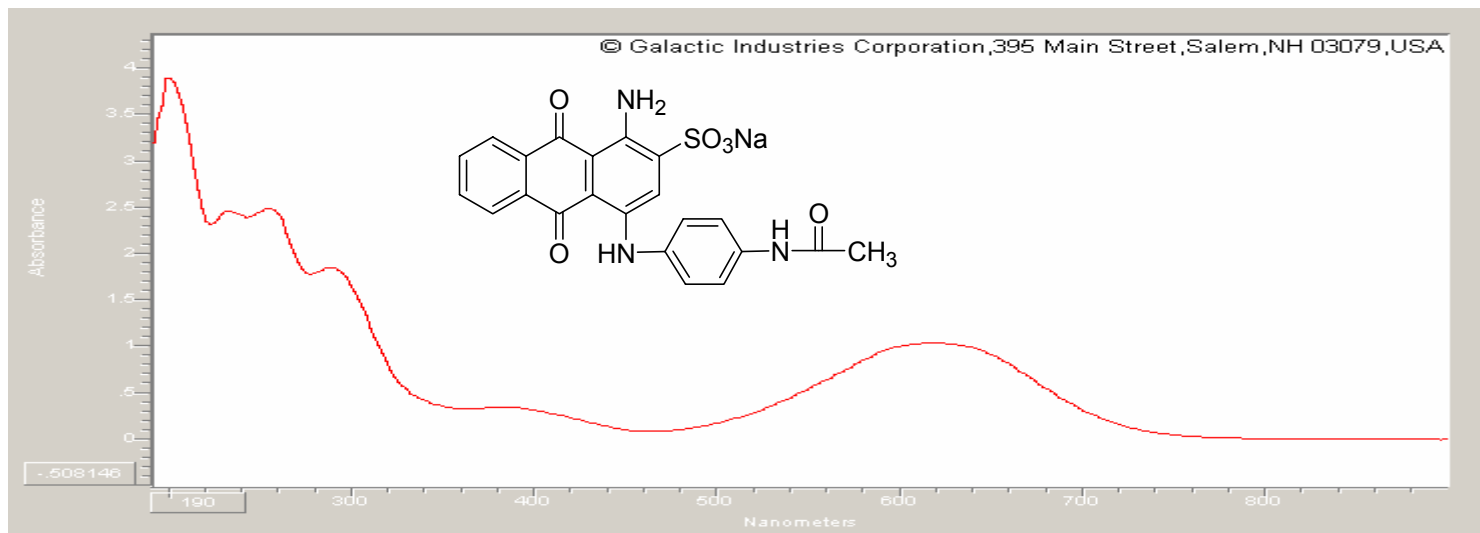
čím více dvojných vazeb tím více je  
přechodů k dispozici




Azulene  
UV/VIS SPECTRUM



NIST Chemistry WebBook (<http://webbook.nist.gov/chemistry>)





# **Infračervená (vibrační) spektra**

## Vibračně-rotální spektrometrie

nebo též infračervená spektroskopie může být použita k důkazu funkčních skupin ve vzorku, někdy i o jejich vzdálenosti, v některých případech umožňuje získat údaj o množství vzorku a někdy se používá i k důkazu identity

každý atom v molekule vibruje kolem své rovnovážné pozice

frekvence vibrací závisí na hmotě zúčastněných částic síle jejich vazeb

molekulární vibrace mohou rezonovat s frekvencemi záření z okolí a energii tohoto záření absorbovat

frekvence takového záření jsou cca  $1,20 \times 10^{13}$  až  $1,20 \times 10^{14}$  Hz, což  $\approx$  IČ záření z elektromagnetického spektra

aby získaná čísla byla snadněji obrobitelná pracujeme s jednotkami  $\text{cm}^{-1}$

frekvence $\nu$ [Hz]	vlnová délka $\lambda$ [m]	vlnočet [ $\text{cm}^{-1}$ ]	energie $E$ [kJ mol $^{-1}$ ]
$1,20 \times 10^{13}$	$2,50 \times 10^{-5}$	400	$4,79 \times 10^3$
$1,20 \times 10^{14}$	$2,50 \times 10^{-6}$	4000	$4,79 \times 10^4$

$c = \nu\lambda$  vztah mezi frekvencí a vlnovou délkou ( $c$  je rychlost světla  $3 \times 10^8 \text{ ms}^{-1}$ )

$E = h\nu L$  energie molu fotonů ( $h$  Planckova konstanta  $6,63 \times 10^{-34} \text{ Js}$   
 $L$  Avogadrovo číslo  $6,02 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$ )



## Vibračně-rotační spektrometrie

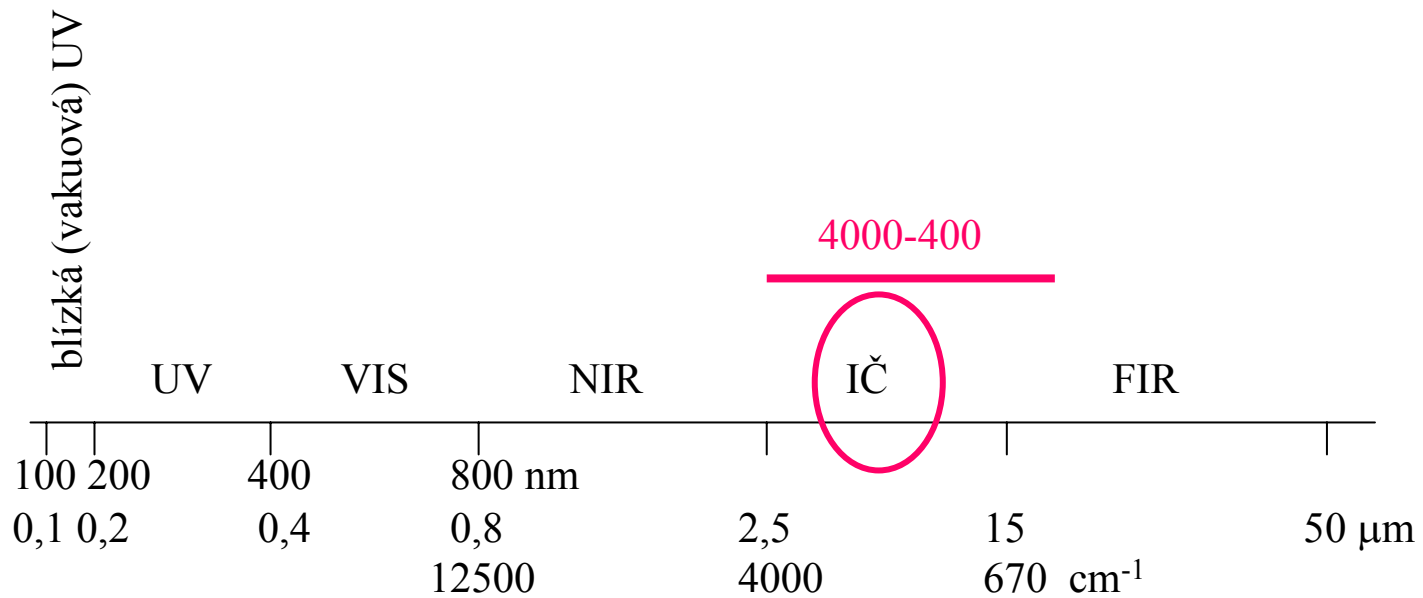
nezávisle na struktuře, konstituci, konfiguraci, konformaci a dalších aspektech chemické vazby lze u téže sloučeniny za analogických podmínek pro každou vibraci změřit v IČ spektru (přibližně) stejný absorpční pás, bez ohledu na okolnosti

naopak, lze na strukturu, konstituci, konfiguraci, konformaci z IČ spekter usuzovat

IČ spektra nepopisují pouze organické sloučeniny ale obecně každou látku či materiál, kompozit či směs a dokonce i výrobek či buňku a podobně

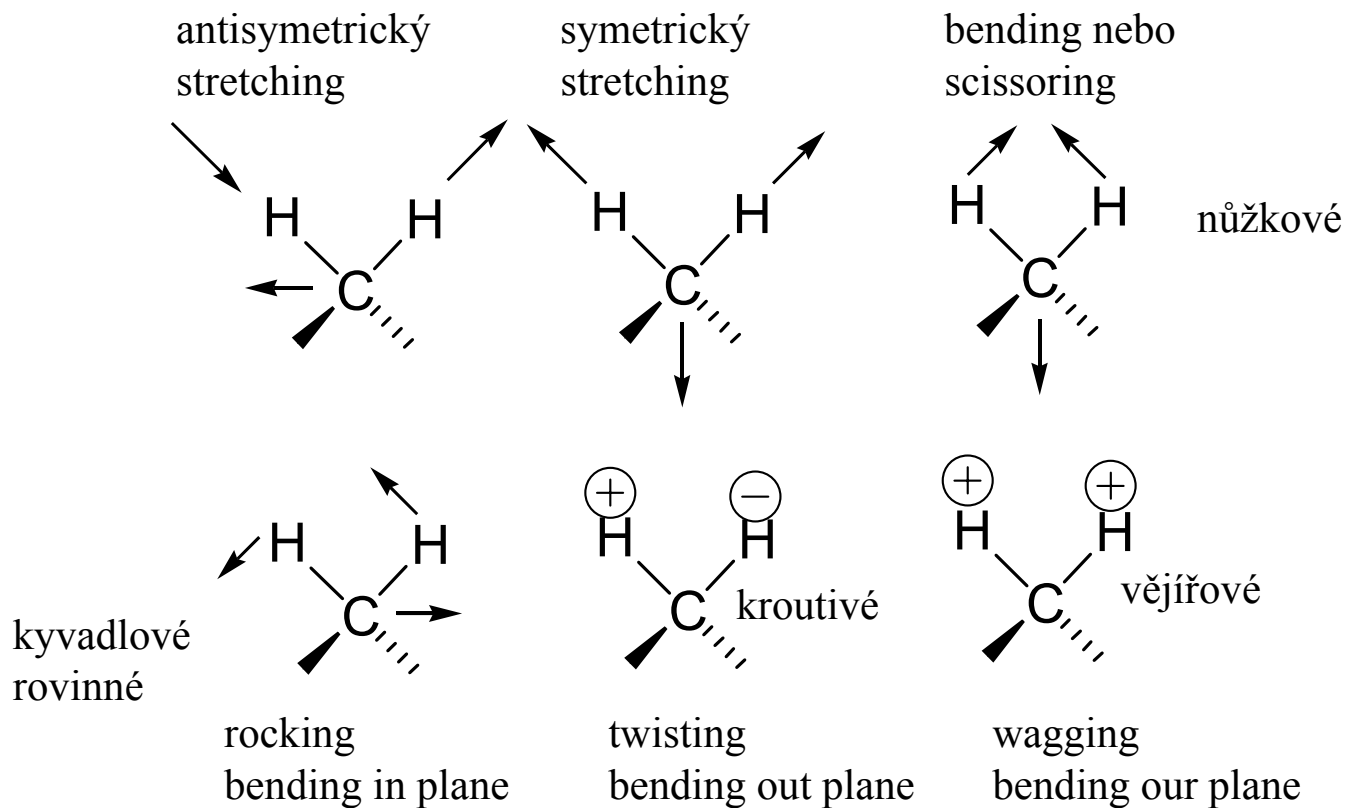
přestože lze IČ záření popisovat různě, ustálil se popis pomocí „recipročných centimetrů“ [ $\text{cm}^{-1}$ ]

popis intenzity absorpce se obvykle uvádí v procentualitě propustnosti (transmittance, T [%]) na dekadické logaritmické škále, protože zobrazuje ilustrativně (v jednom interpretovatelném záznamu) stejně jak silné tak slabé absorpce signál je representován minimem na záznamu, jím že nejnižší bod, odpovídající propustnosti pro daný pás

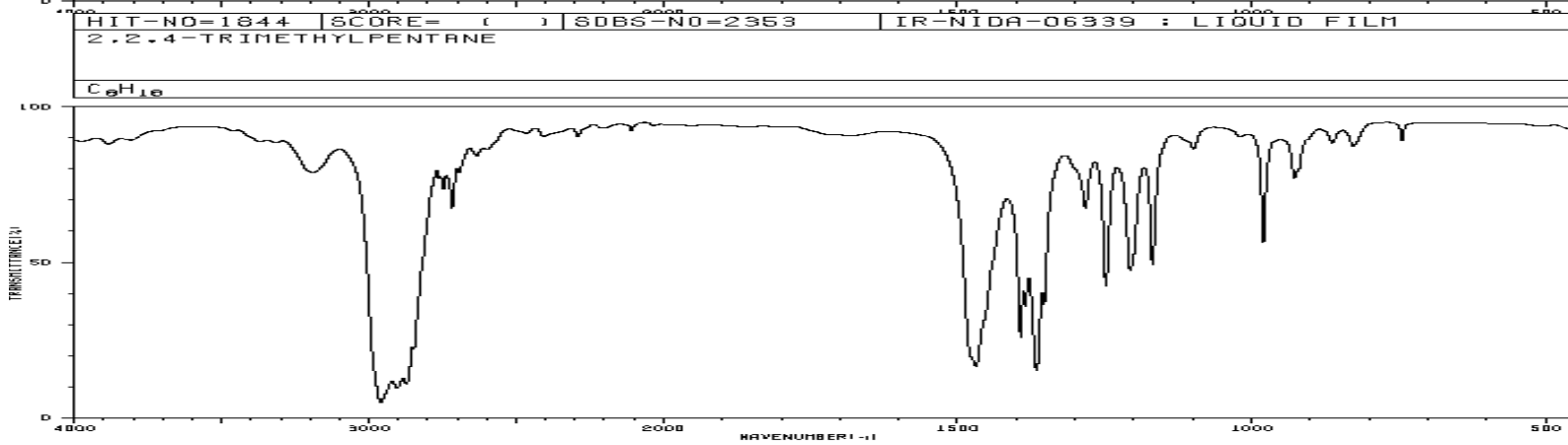


pro většinu případů můžeme modelovat každou vibraci jako nezávislou a atomy jako jednoduché harmonické oscilátory

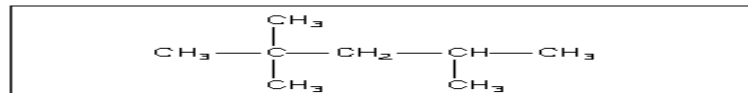
Můžeme si představit řadu vibrací (střed hmot zůstává na místě) např.:



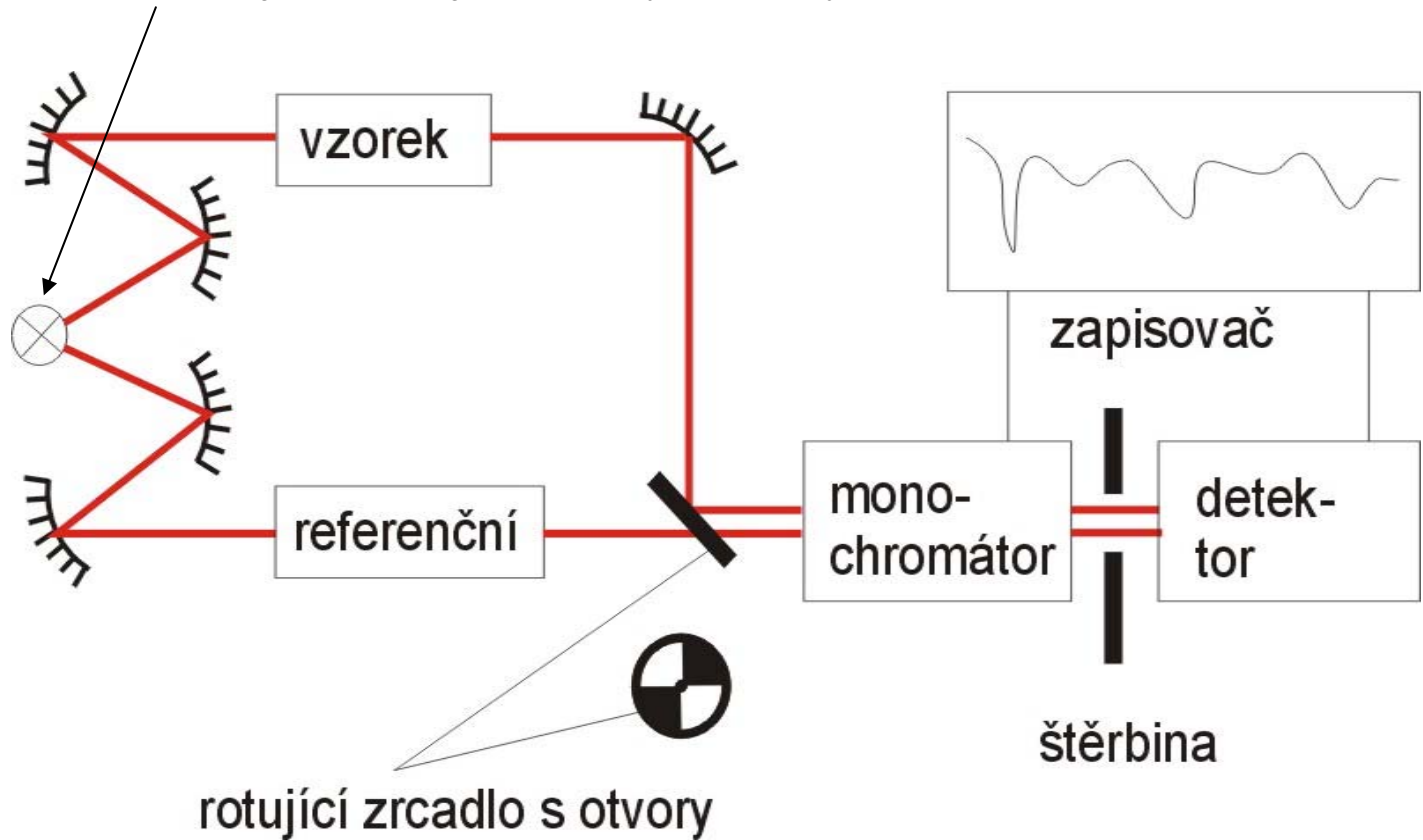
pokud si představu o jednotlivých C-H vibracích promítneme do dvou uhlovodíků heptanu a 2,2,4-trimethylpentanu vidíme, že v komplexnější molekule můžeme očekávat více vibračních pásů (symetrie naopak může někdy tyto pásy „zestručnit“)



3886	84	2884	77	1263	64	980	53
3189	77	2632	81	1248	41	928	74
2959	4	1459	15	1207	46	853	64
2904	9	1394	24	1169	47	827	64
2872	10	1365	34	1113	85	745	85
2747	70	1360	14	1108	85		
2717	64	1353	35	1098	84		



zdrojem záření je elektricky zahříváný kov



schema dvoupraskového infračerveného spektrometru

HIT-NO-1229

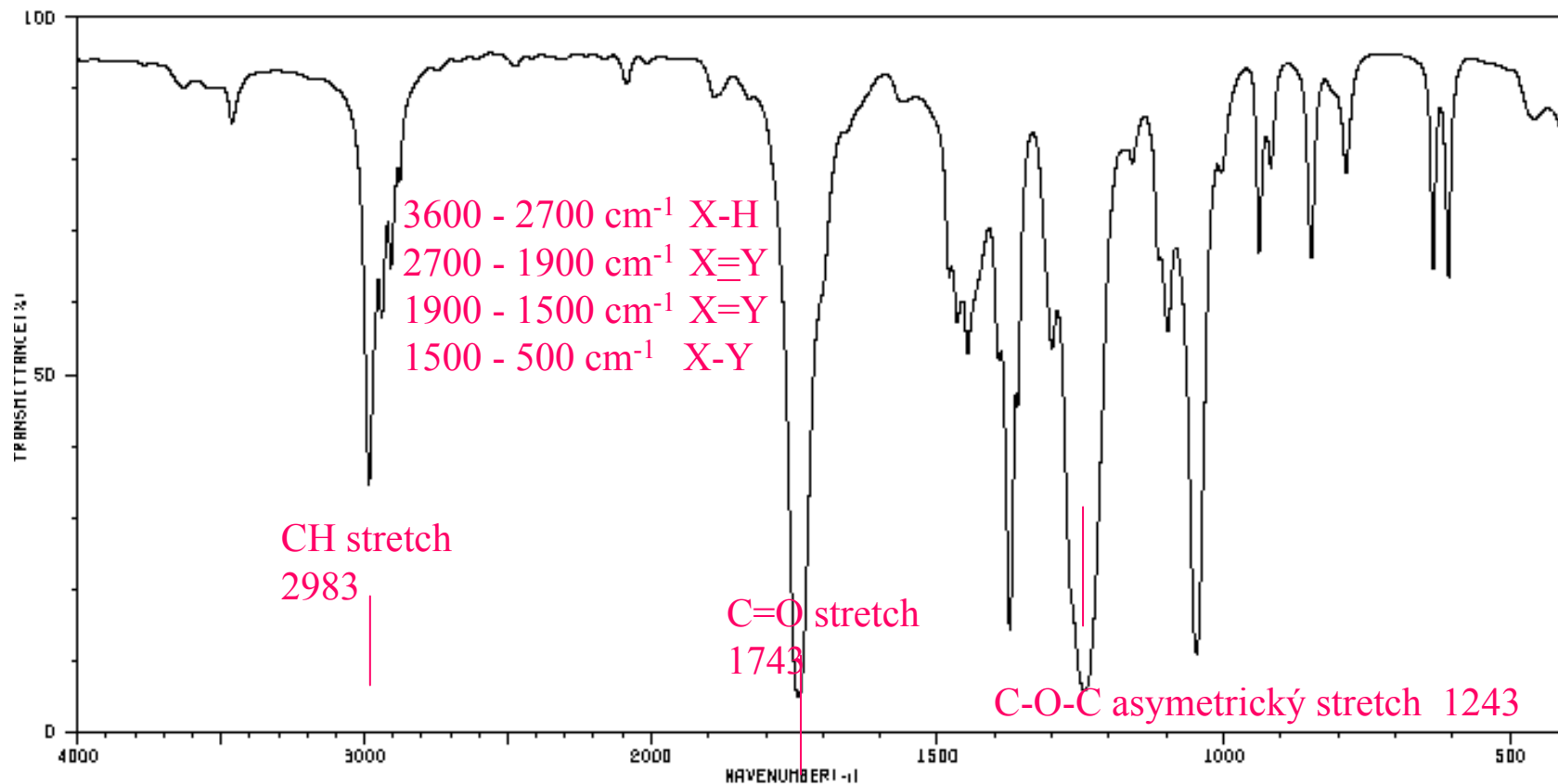
SCORE= ( )

SDBS-NO=889

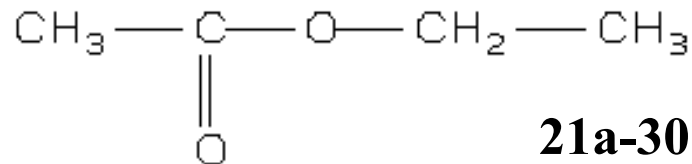
IR-NIDA-01804

: LIQUID FILM

ETHYL ACETATE

 $C_4H_8O_2$ 

3462	81	1480	60	1243	6	847	64
2983	33	1466	55	1160	77	786	74
2940	55	1448	50	1111	84	634	62
2908	62	1393	60	1098	63	608	60
2877	74	1374	13	1048	10	457	81
1889	86	1360	49	939	84		
1743	4	1301	62	917	77		



21a-30

FTIR, infračervená spektra měřená za pomoci Fourierovy transformace

na rozdíl od konvenčních spekter, je u FTIR jeden paprsek obsahující všechny požadované frekvence najednou

k rozluštění spektra je potom potřeba matematická operace zvaná Fourierova transformace, spektrum je možno měřit (několik sekund) mnohokrát za sebou a odečítat náhodný šum

FTIR spektra mohou být lehce odlišná od klasických měření, rozdíly však většinou nejsou signifikantní

lze pak např. spojit HPLC kolonu s IČ spektrometrem a použít jej jako detektor

spektrum rozpouštědla, pozadí či známé nečistoty může být elektronicky odečteno

pro změření spektra stačí mnohem méně vzorku, např. 1 kapka roztoku po měření NMR usušená na tabletě KBr proudem dusíku (neat)

## Příprava vzorku

plyny se naplní do kyvety obvykle 10 cm dlouhé

kapaliny se rozetřou na tenký film mezi dvě tablety KBr (neabsorbují v dané oblasti záření) či u zředěných roztoků nalije do cely s okénky z KBr

pevná látka se rozetře s KBr a ze směsi se udělá velkým tlakem v lisu tableta

může se rozpustit ve vhodném rozpouštědle (chloroform, tetrachlor) či rozetřít v nujolu

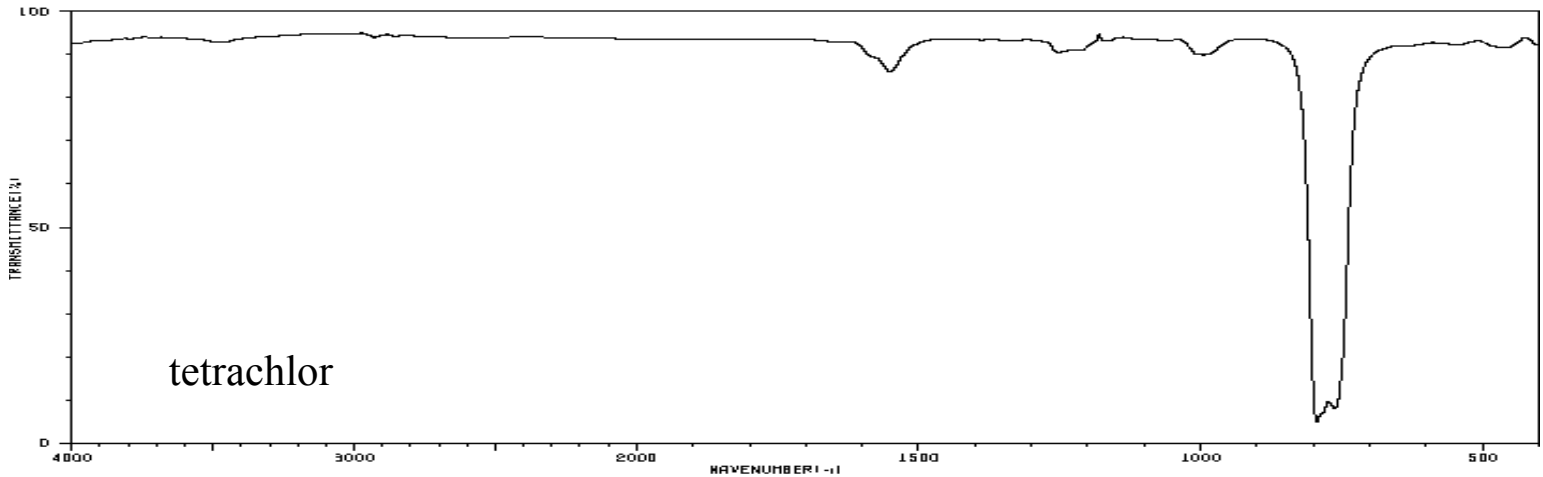
Beerův zákon říká, že absorpce je proporcionální počtu absorbujících molekul

Lambertův zákon říká, že procento absorbovaného záření nezávisí na jeho intenzitě  
spojením vzniká Lambertův-Beerův zákon



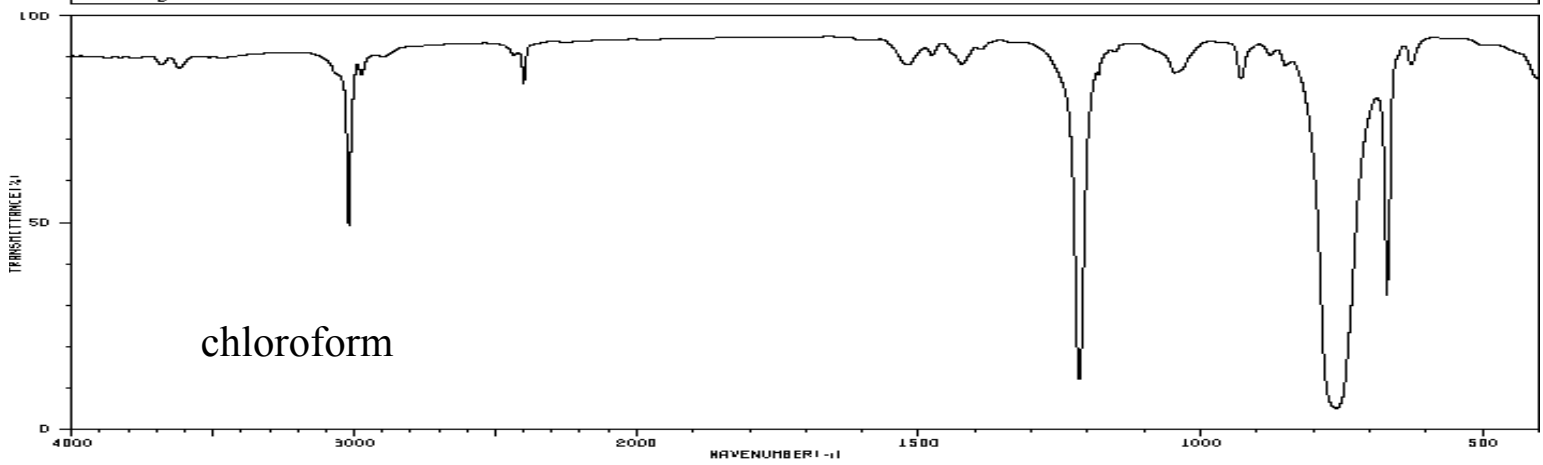
HIT-NO=1394 SCORE= ( ) SDBS-NO=1321 IR-NIDA-06337 : LIQUID FILM  
TETRACHLOROMETHANE

CCL<sub>4</sub>

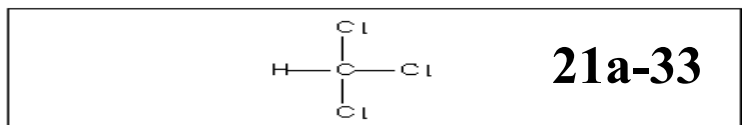


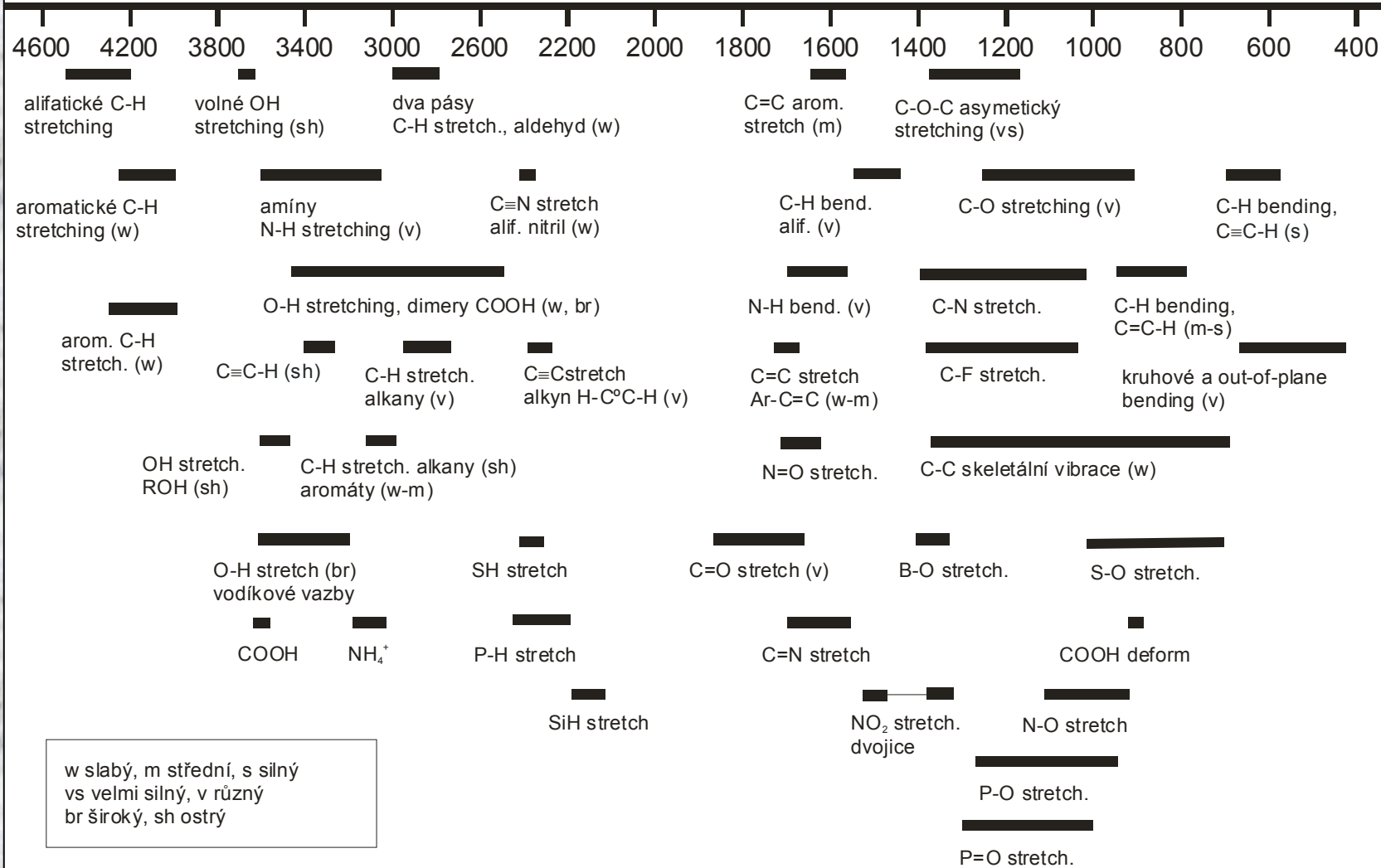
HIT-NO=1233 SCORE= ( ) SDBS-NO=894 IR-NIDA-01674 : LIQUID FILM  
CHLOROFORM

CHCL<sub>3</sub>



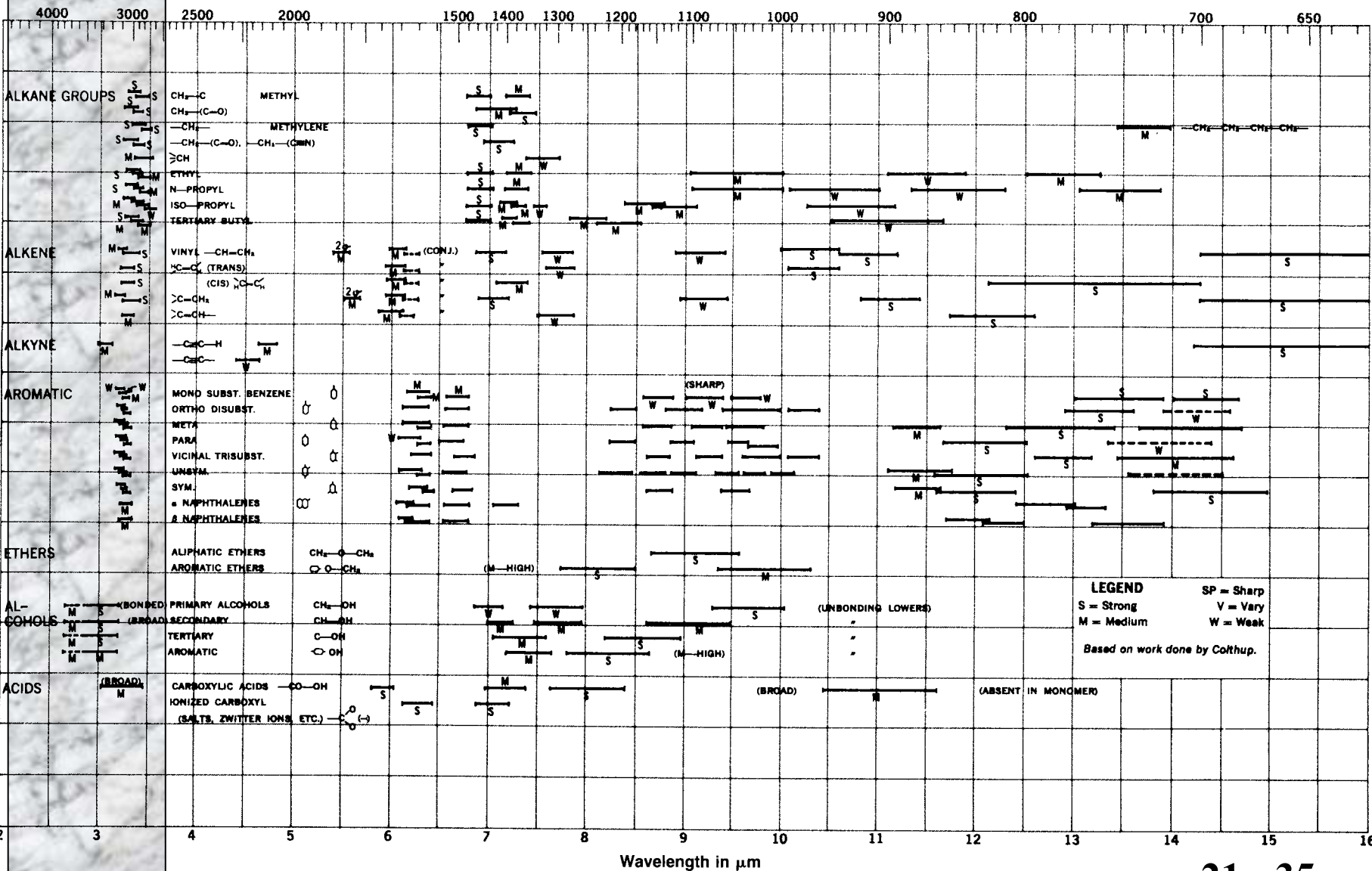
3683	84	1218	11
3618	84	1047	84
3019	47	1041	84
2976	81	929	81
2400	79	760	4
1520	84	671	31
1423	84	627	84

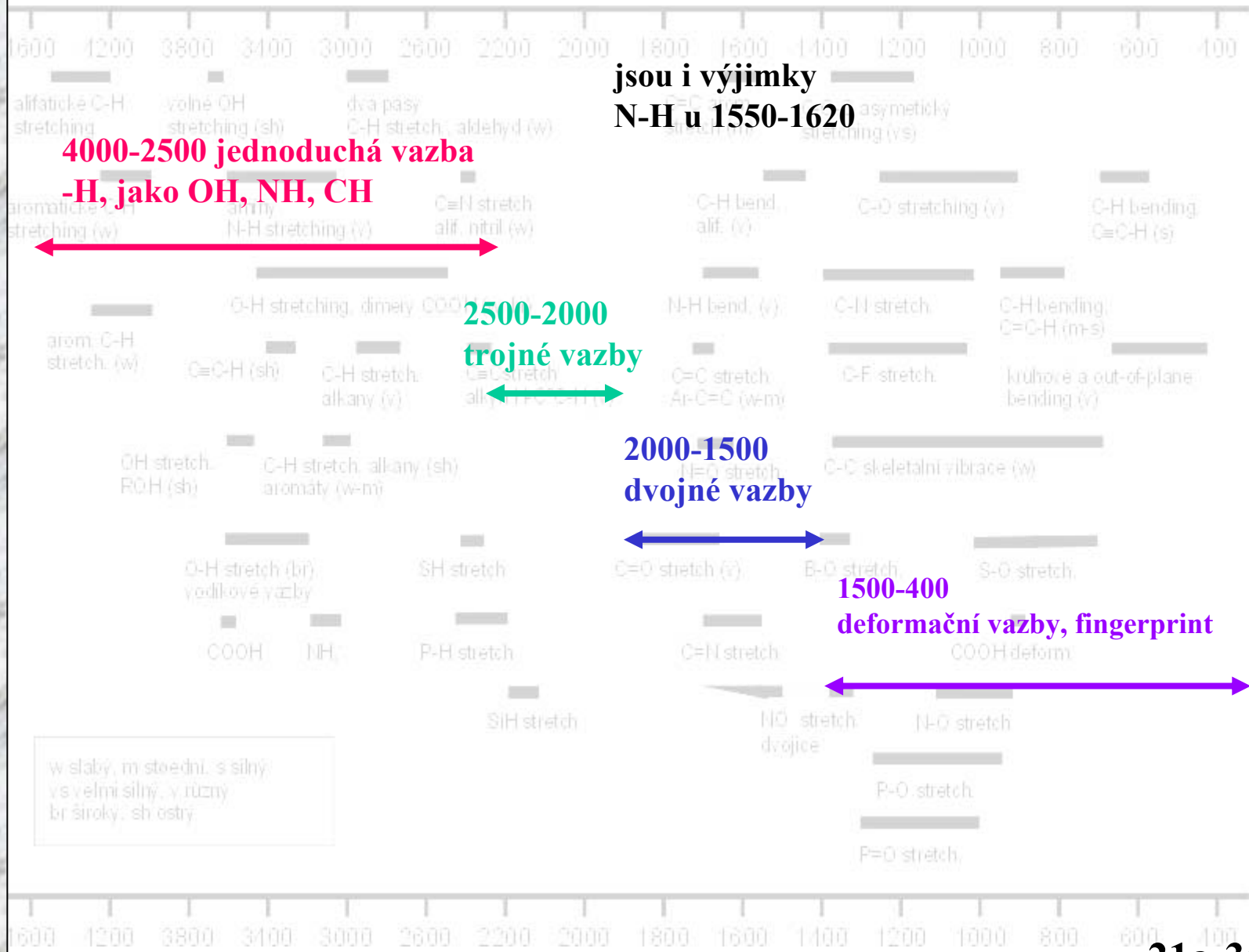


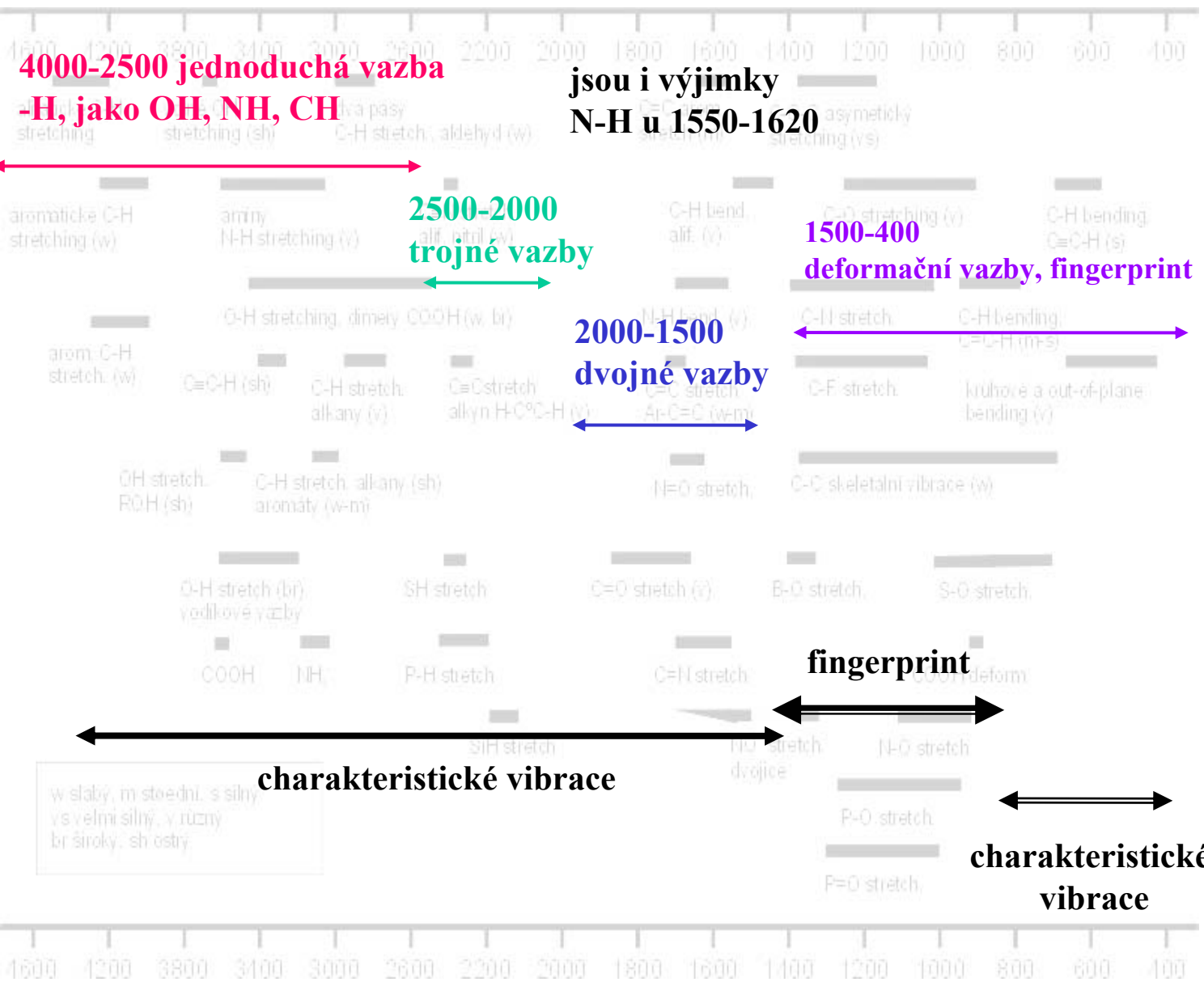


# INFRARED CORRELATION CHARTS

Wavenumber in  $\text{cm}^{-1}$





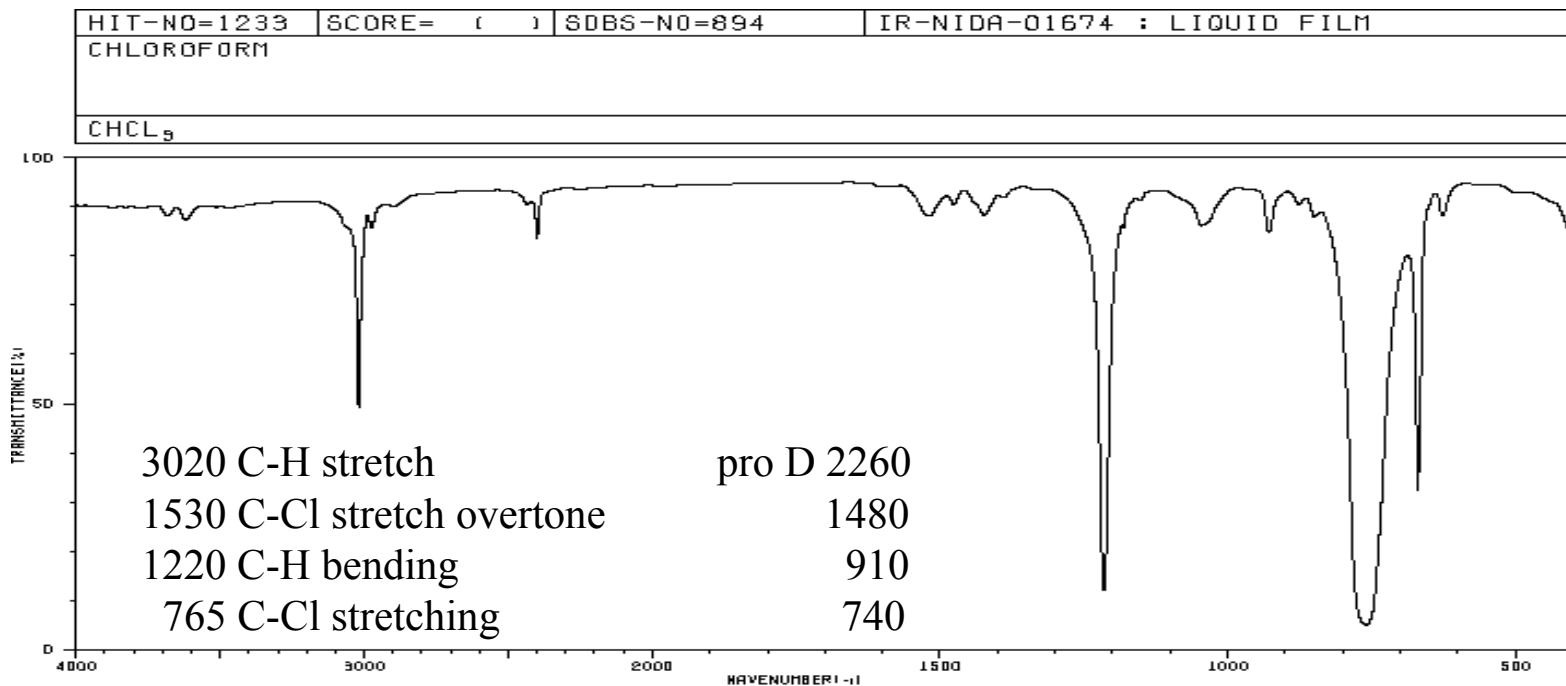


jsou i výjimky  
N-H u 1550-1620

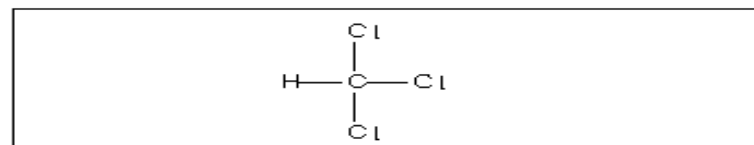
4000-2500  $\text{cm}^{-1}$

velká frekvence je vysvětlitelná malou hmotou vodíku  
spektra se mění je-li místo vodíku přítomno deuterium

$\text{CHCl}_3$



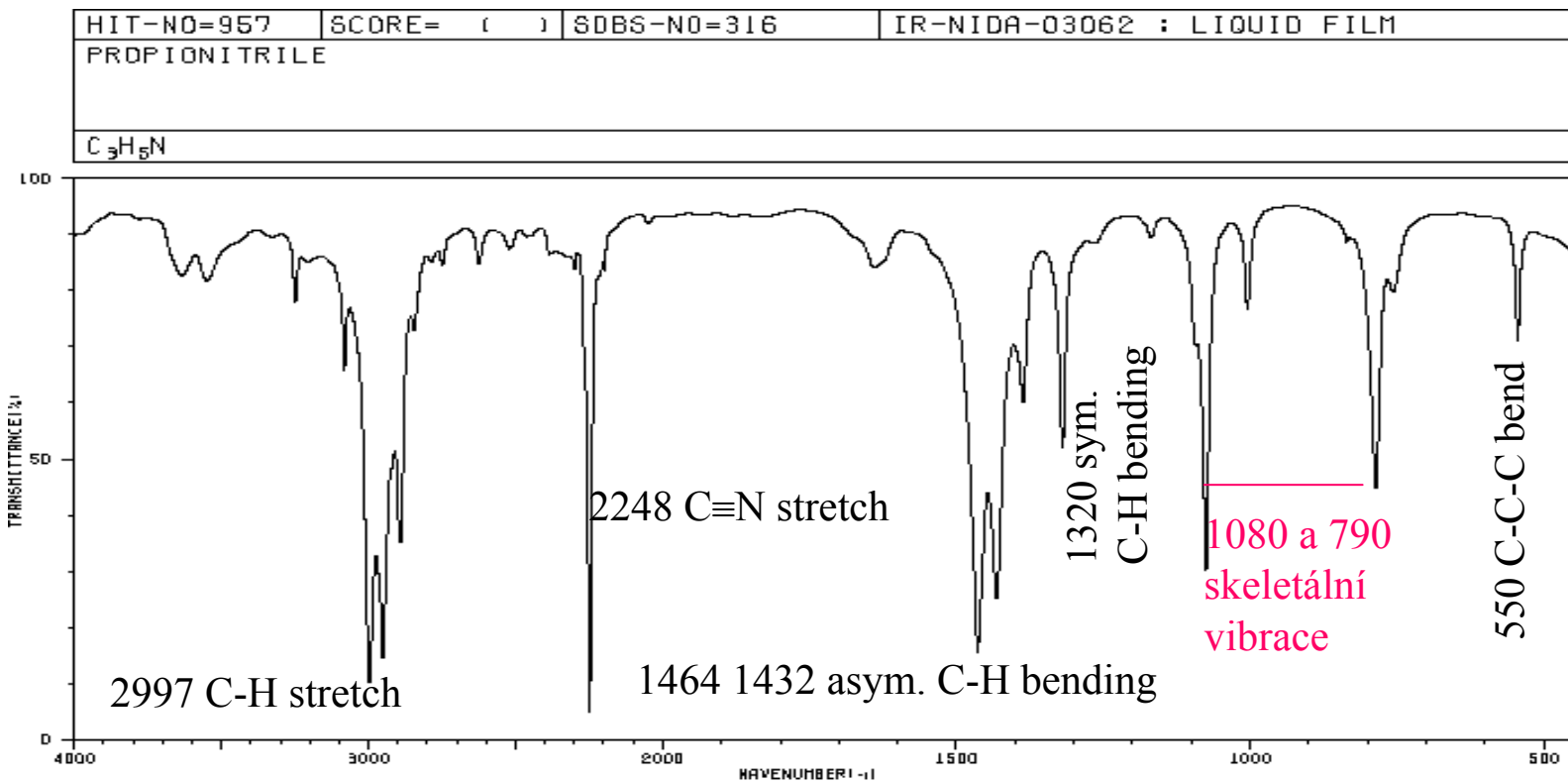
3683	84	1216	11
3618	84	1047	84
3019	47	1041	84
2976	81	929	81
2400	79	760	4
1520	84	671	31
1423	84	627	84



**21a-38**

2500-2000  $\text{cm}^{-1}$

relativně velká frekvence je nutná pro způsobené vibrací v  
trojné vazbě

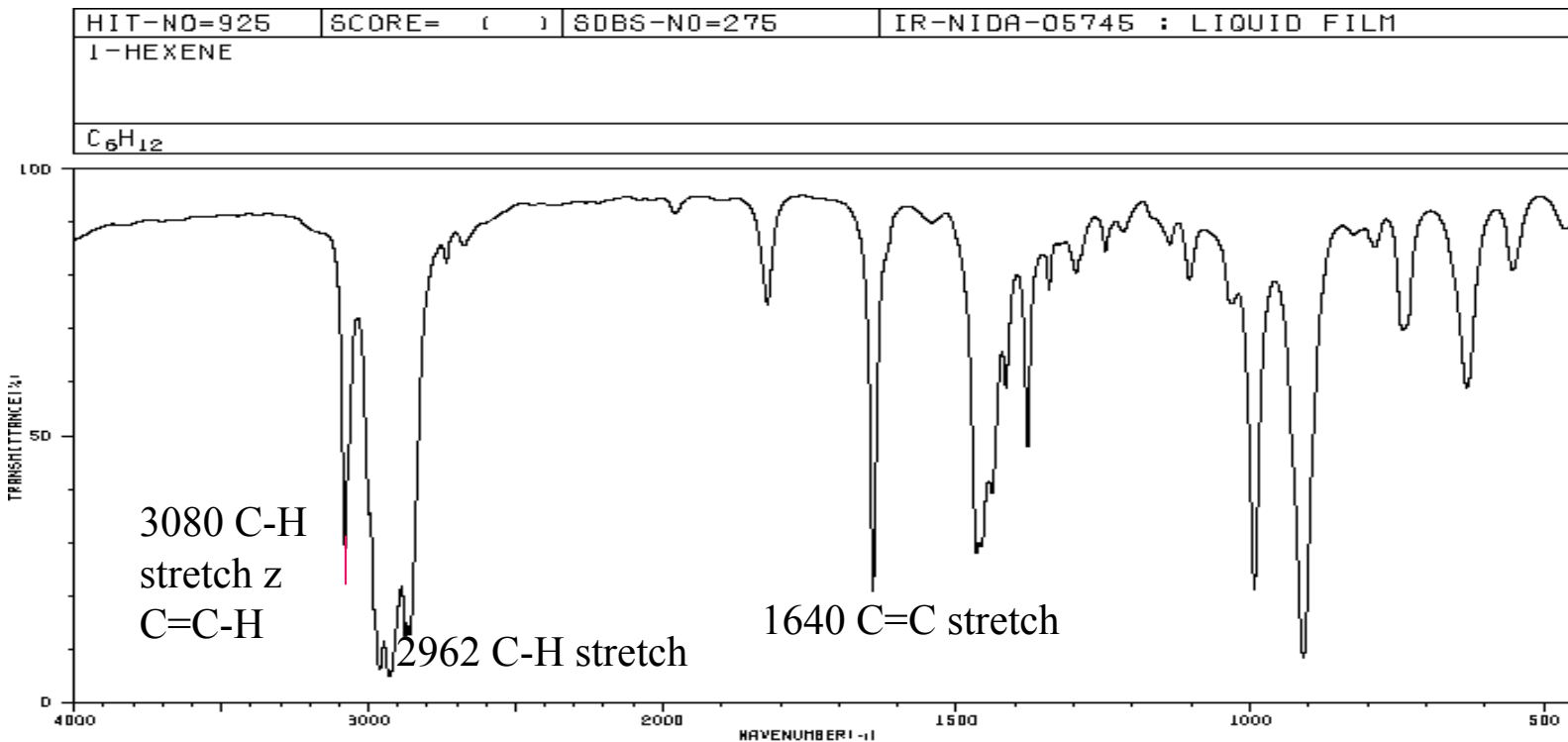
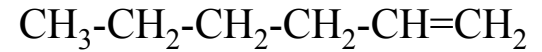


3632	79	2844	70	2299	81	1320	60	545	68
3548	79	2787	81	2248	4	1170	86		
3249	74	2749	81	2198	81	1075	29		
3082	64	2624	81	1639	81	1006	74		
2997	10	2521	84	1464	14	836	84		
2952	13	2461	86	1432	23	786	49		
2891	34	2460	86	1387	68	767	77		

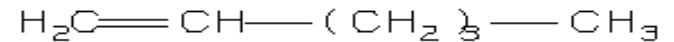
21a-39

2000-1500  $\text{cm}^{-1}$

v této oblasti obecně vibrují dvojně vazby  
jako např. hexen, dále C=O, C=N



3080	27	2863	84	1416	67	1103	77	631	67
2962	5	1821	72	1379	46	1031	72	554	77
2929	4	1642	20	1343	74	993	20	462	66
2876	12	1642	86	1297	77	910	7		
2861	12	1467	26	1247	81	824	84		
2735	79	1459	28	1216	84	787	81		
2676	81	1439	37	1137	81	741	66		



21a-40



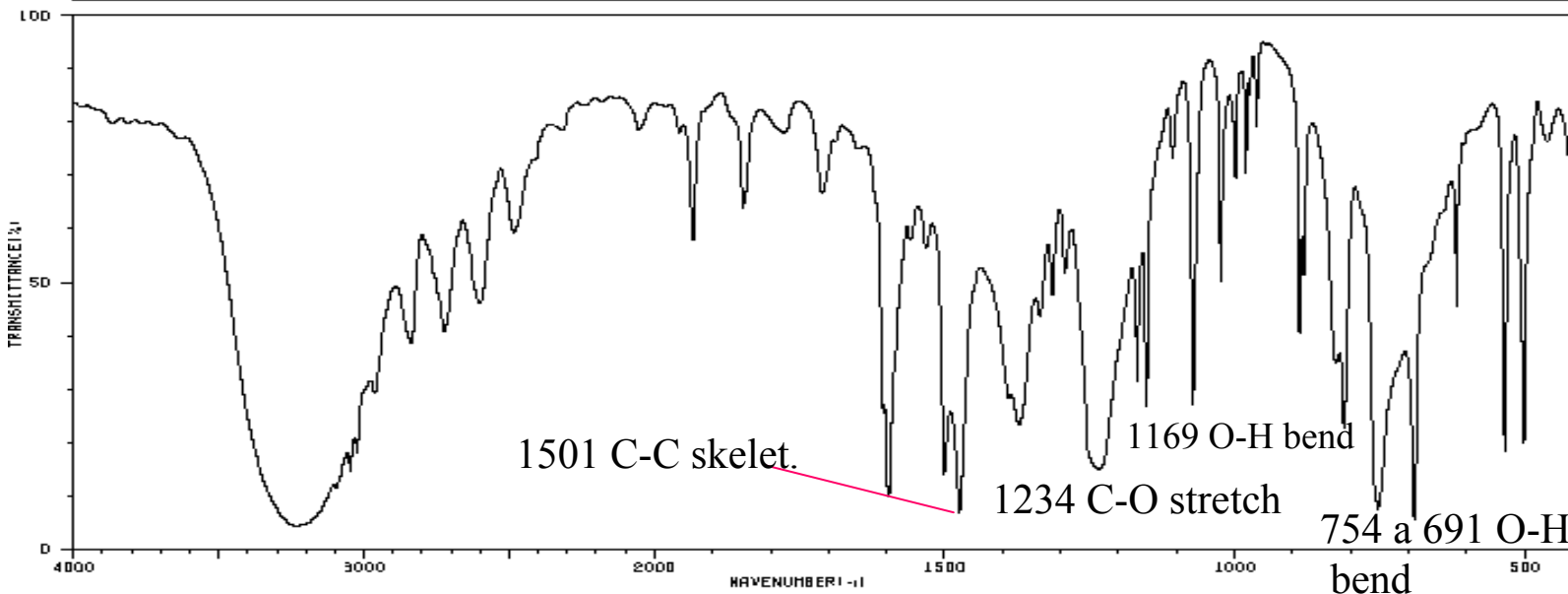
1500-400  $\text{cm}^{-1}$

absorbce v této oblasti odpovídají rotacím, střihání a některým ohybům tato část vibrací molekuly (zejm. 1300-900) je unikátní pro každou molekulu a jmenuje se „fingerprint“ pro určování skupin se až na výjimky nepoužívá

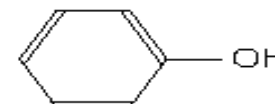
HIT-NO=1060 SCORE= ( ) SDBS-NO=554 IR-NIDA-29806 : LIQUID FILM

PHENDL

$\text{C}_6\text{H}_6\text{O}$



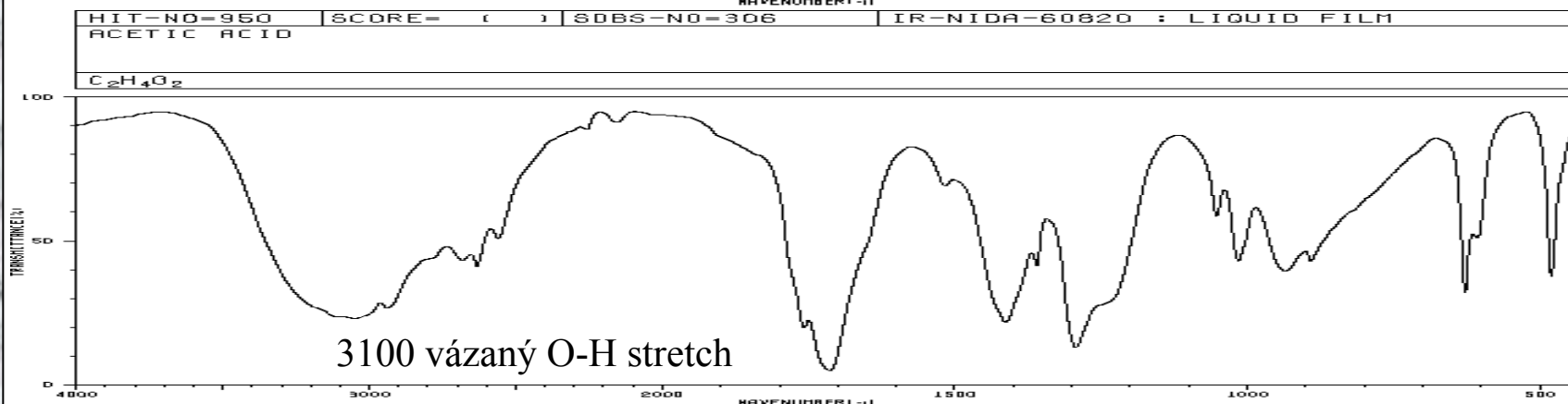
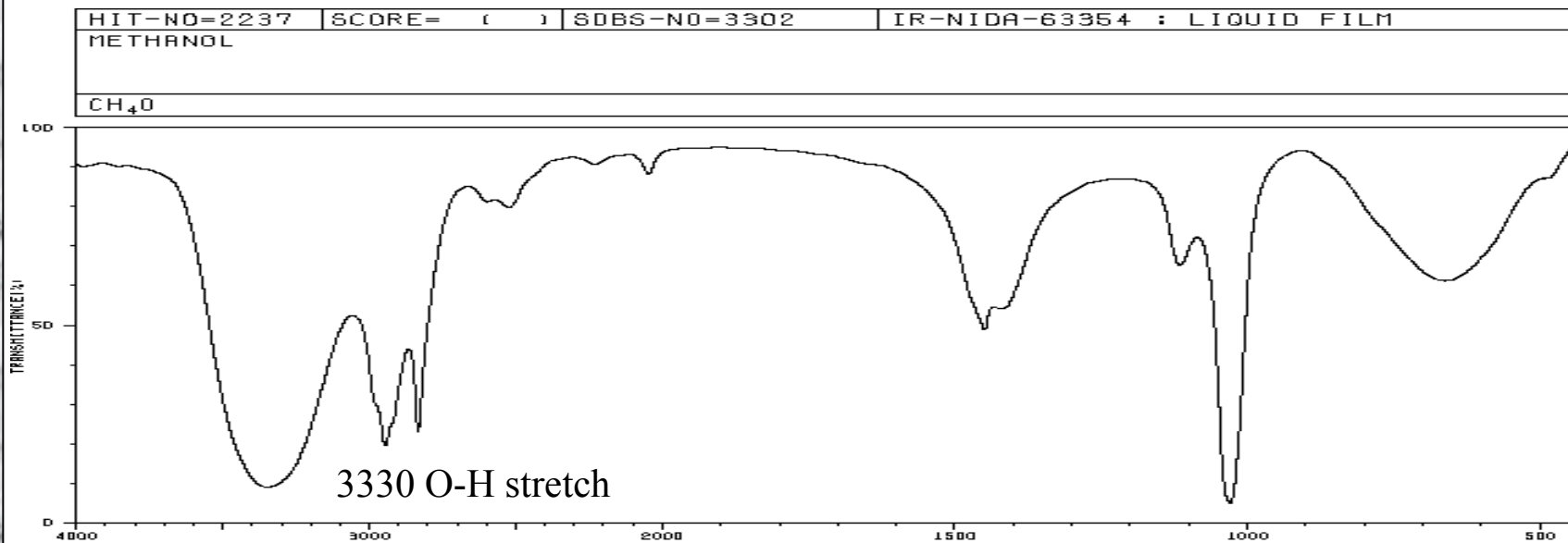
3229	4	2484	58	1632	66	1234	16	826	36
3048	15	1933	57	1501	14	1169	31	812	23
3023	16	1847	62	1474	7	1153	26	754	6
2962	29	1711	64	1372	23	1072	27	691	6
2837	38	1606	26	1336	43	1024	49	617	44
2723	41	1598	10	1315	47	889	41	535	18
2699	46	1669	67	1293	60	881	60	502	20



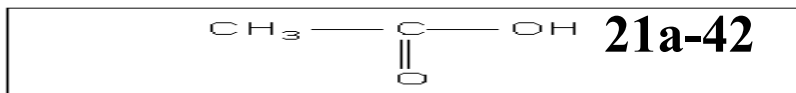
21a-41

vodíková vazba  
komplikuje měření neboť signály jsou široké

methanol  
kyselina octová



2090.97	20	1411.4	30	602.9	31
2088.04	13	1366.0	30	602.7	30
2085.01	13	1059.4	100	401.7	50
1758.8	40	1015.4	100	401.3	50
1714	100	577.1	50		
1617	64	477.1	41		



vodíkové mosty

vyžadují měření gradientu koncentrace a srovnání intenzity intermolekulárních a intramolekulárních vazeb

absorbce, která se se snižující koncentrací snižuje je ovlivněna intermolekulární vazbou

3330 O-H stretch                      pro methanol

3100 vázaný O-H stretch              pro kyselinu octovou

srovnávání síly pásů asociovaných a neasociovaných OH ukazuje na sílu vodíkové vazby

pokrok v instrumentaci umožňuje

měřit malé koncentrace v reflexních celách, kde záření mnohokrát prochází vzorkem (Lambertův Beerův zákon)

měřit IČ spektra ve vodě a spektrum (absorpci vody) matematicky odečíst

tudíž měřit IČ spektra bílkovin

zkoumat na pH, rozpouštědle, teplotě a dalších faktorech závislou sekundární strukturu bílkovin

signifikantní oblasti spektra pro studium  $\alpha$ -helixu, skládaného listu a neuspořádaného proteinu je 1670-1620 a 1305-1200  $\text{cm}^{-1}$

zkoumání olejů na míru nenasycenosti (3009 či 2854  $\text{cm}^{-1}$ )

identifikovat kultury bakterií, virů, hub, kvasinek, prvoků u kolonií o méně než  $10^4$  jedinců o rozměrech  $4 \times 10^{-5}$  m

zkoumat „za chodu“ rozklad gumy a plastických hmot (po rozdrcení za teploty kapalného dusíku) v emulzi

IČ spektra měřená na přístrojích s Fourierovou transformací (FT-IR) mohou sledovat vybrané objekty pod optickým mikroskopem

použití v potravinářství, kriminalistice

- měření procházejícího světla
- měření odraženého světla

opakované měření spekter (s odečtením náhodného šumu)

příklady aplikací

studium prachových částic z filtrů

výzkum krystalizace tuků (na stupni krystalizace závisí chuťové vlastnosti)

důkaz identity vláken a vzorků barev

průkaz příměsí ve vzorcích („řezání“ potravin a drog)

průkaz alkoholu ve vzorku dechu (poměr běžné koncentrace v krvi a dechu je 2300:1)

policie používá malé spektrometry zkoumající OH stretching vibraci u  $3340\text{ cm}^{-1}$  a

CH stretching vibraci ethanolu u  $2950\text{ cm}^{-1}$ ; samotná OH u  $3340$  nemůže být vzata v potaz, neb může být maskována vibrací vody; vibrace u  $2950$  může být způsobena také butanem, který však za 20 min z dechu zmizí, vážnější je  $2950$  vibrace u propanolu vyskytujícím se v dechu diabetiků

## **Infračervená spektrometrie**

pouze zřídka dochází k tomu, že pouze na základě IČ spekter může být určena neznámá struktura

obvyklé je zjištění charakteristických funkčních skupin pomocí IČ spektrometrie a potvrzení struktury jinými technikami

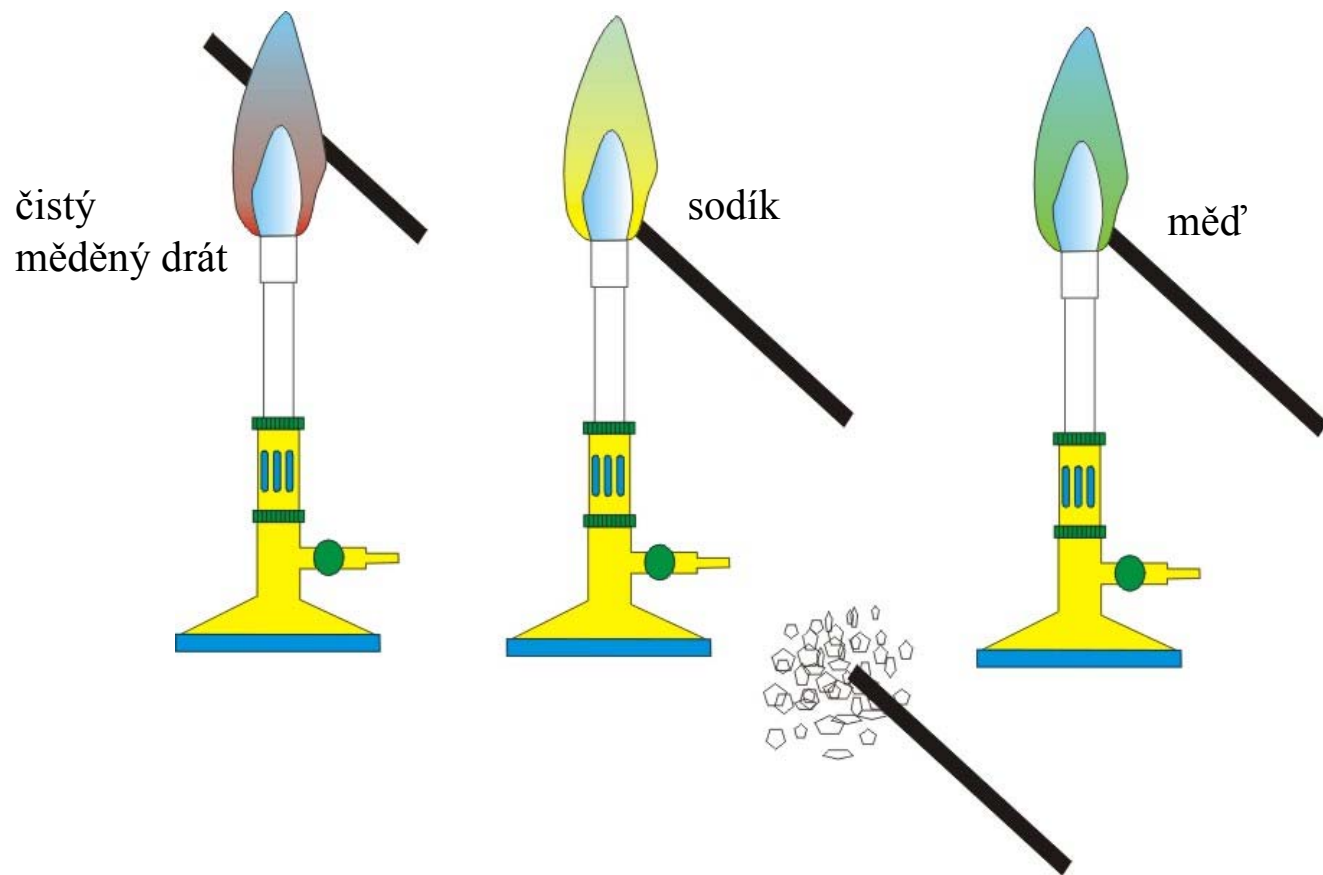
struktura navržená jinými metodami může být IČ spektrometrií potvrzena

může být zkoumán subtilní pozadí chování sloučenin (vodíkové vazby, pevnost konformací, vzájemné interakce ... ..)

pomocí fingerprintu je možno určit přítomnost daného „individua“ asi tak, jakopodle otisku prstu u lidí; tohoto fenoménu se používá při počítačové identifikaci spekter

za použití určité logické úvahy (např. typu ZEBRA) je možno použít IČ k zjištění mnohých konkrétních vlastností dané látky (nemusí vždy jít o sloučeninu)

Beisteinova zkouška, organická látka obsahující halogen utvoří s mědí halogenid, který obarví „nesvítivý“ plamen do zelena



(atomová emisní spektrometrie)

Ramanova spektroskopie je metodou, která doplňuje vibrační spektroskopii. Je to metoda, která zkoumá nikoli světlo procházející (absorbované) ale Světlo na vzorku rozptýlené (neelastický rozptyl).

Doplňuje IČ spektrometrii asi tak, že často ta vibrace, která se neprojeví v IČ je vidět ve spektru Ramanově a naopak.

Prvé pozorování nelastického rozptylu bylo popsáno v Kalkatě Ramanem a jeho spolupracovníkem Krishnanem a téměř ve stejnou dobu Landsbergem a Mandelstamem v Moskvě v r. 1928. Dva roky poté Raman obržel za svoji práci Nobelovu cenu a obor spektrometrie byl pojmenován po něm.

**SIR CHANDRASEKHARA VENKATA RAMAN**





Ramanova spektroskopie se používá m.j. i v přímých aplikacích v medicíně v klinické praxi *ex vivo* a *in vivo* k řešení řady biomedicínckých otázek jako

časná detekce rakoviny,

monitoring efektů různých látek na kůži,

analýza složení atherosklerotického plaku (usazeniny lipofilních materiálů na stěnách arterií),

rychlá identifikace patogenních mikroorganismů,

studium bioresorbovatelných a nebioresorbovatelných (semi-krystalických a

amorfních) polymerů; mezi bioresorbovatelnými se studují např. homopolymery a

kopolymery poly(mléčné kyseliny), poly(glykolové kyseliny) a poly( $\epsilon$ -kaprolaktonu);

jako nedestruktivní technika, přispívá ke studiu molekulární struktury, míry oxidace

a krystalinity jako např. u PE „ultra-high molecular weight polyethylene (UHMWPE)“

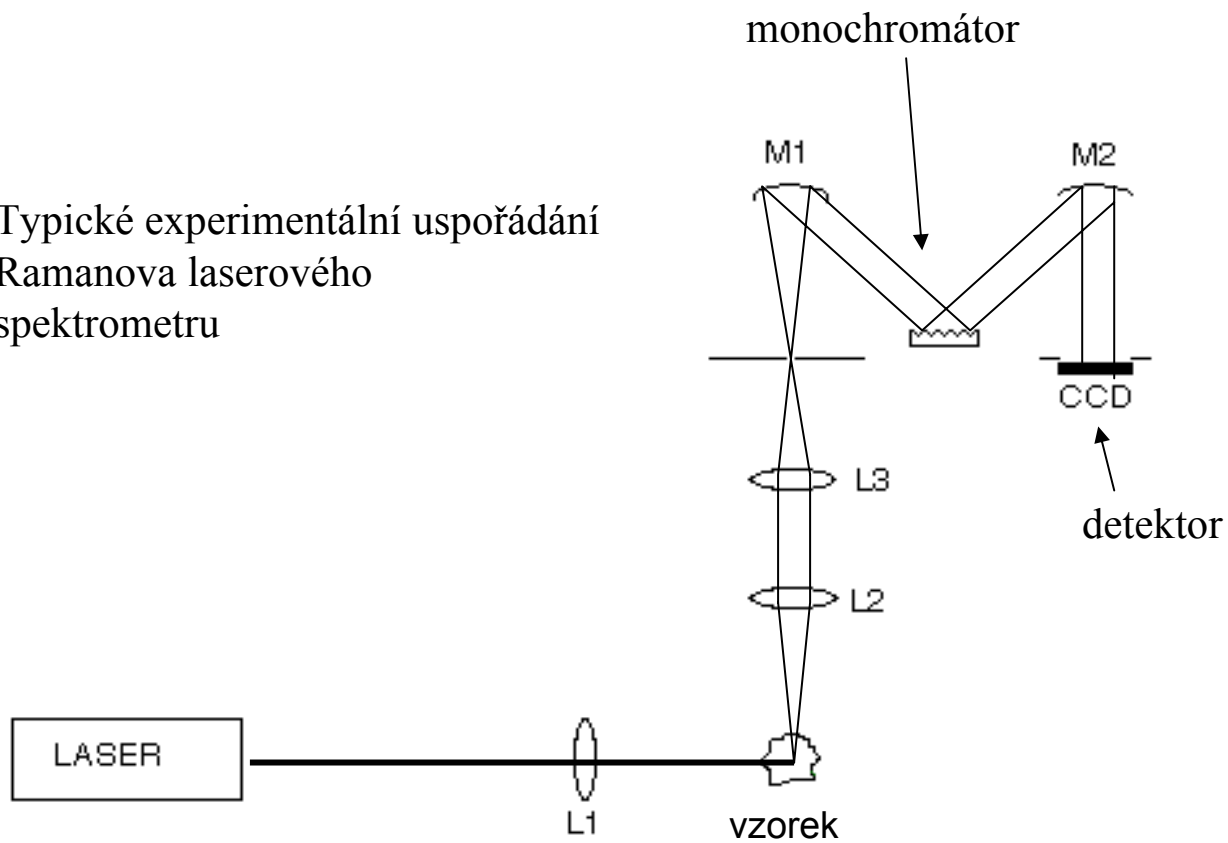
v ortopedických implantátech (kyčelní a kolenní náhrady),

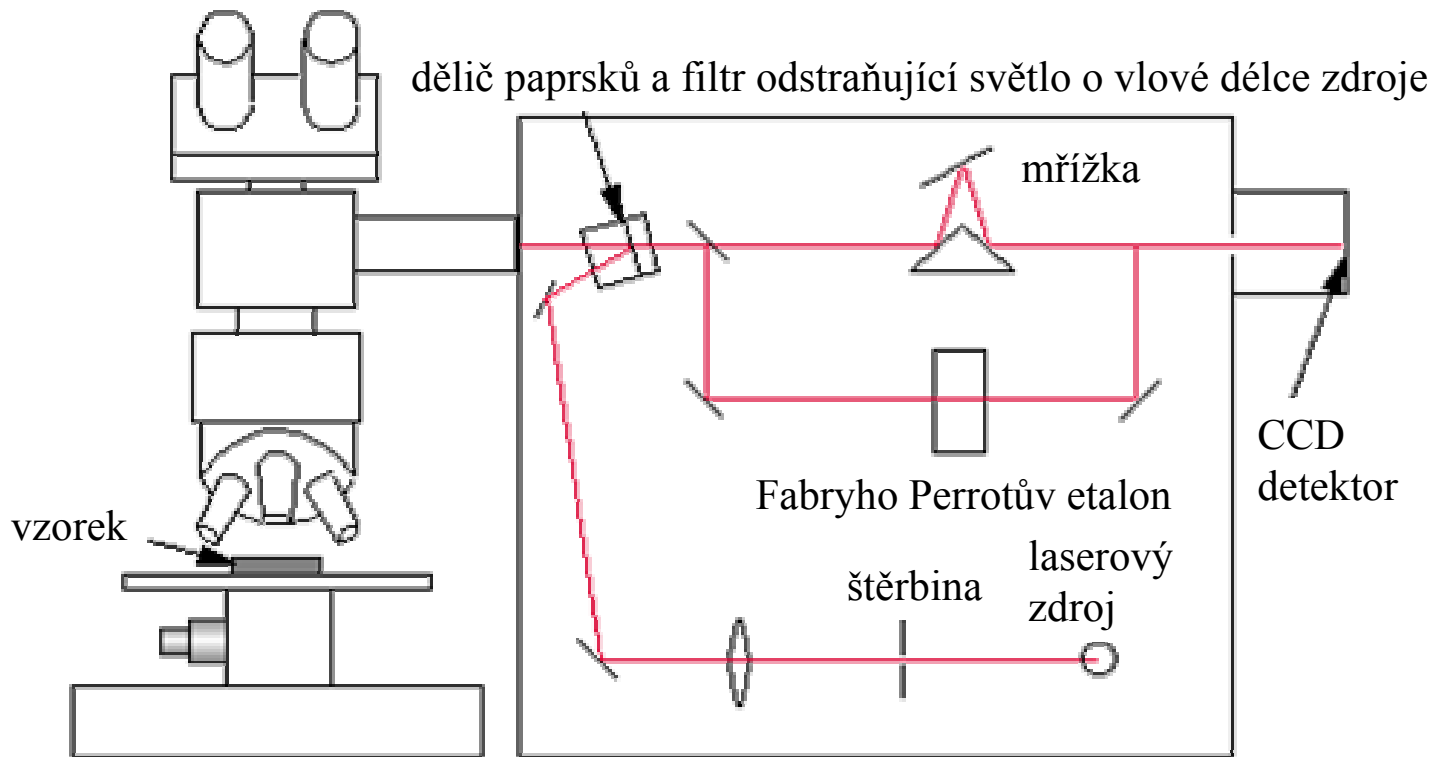
dále se může použít k analýze povrchů

jako například po nitridaci GaN, AlGaN a AlN

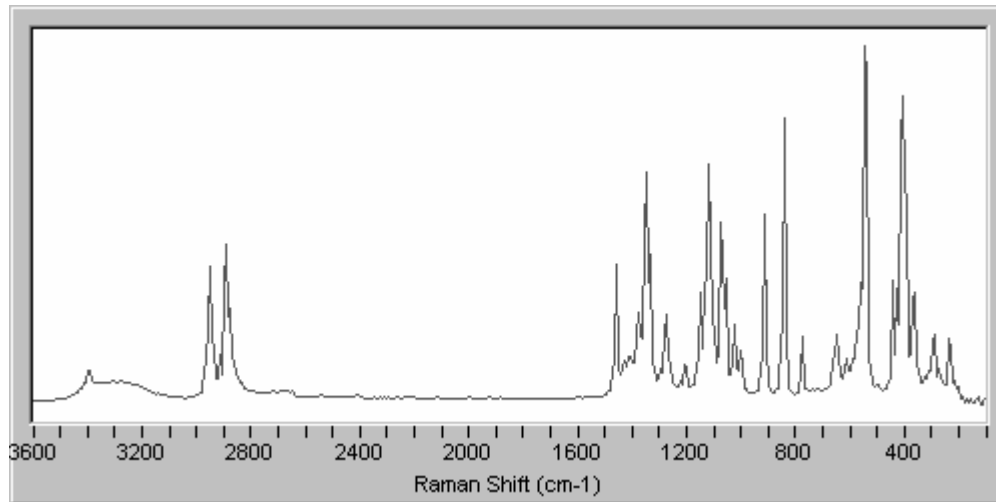
ve spojení s IČ spektrometrií poslouží při studiu komplexních polymerů při studiu jejich složení, struktury, konformací a intermolekulárních interakcí.

Typické experimentální uspořádání  
Ramanova laserového  
spektrometru

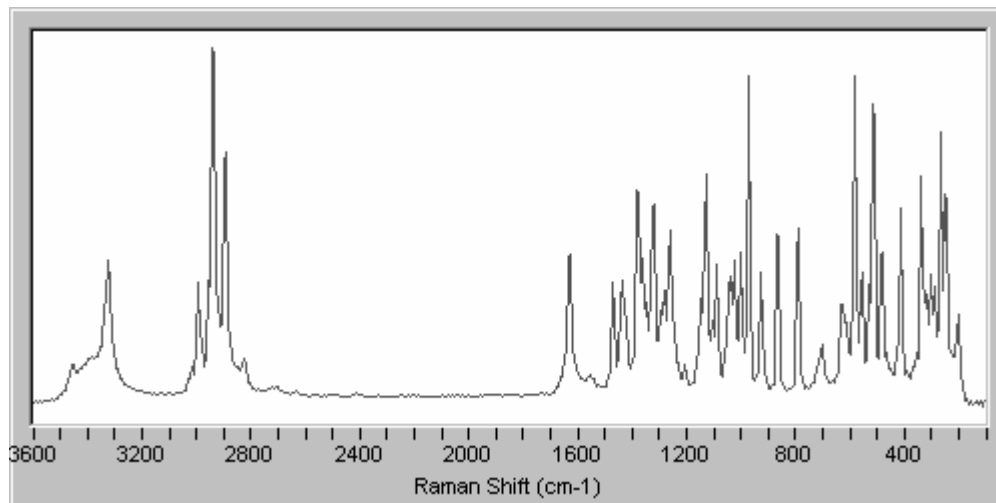




**CCD Charge-Coupled Device**  
 optický bodový sensor -  
 zařízení (device), které pracuje s  
 propojeným nábojem (coupled  
 charge)



D(+)-glukopyranosa



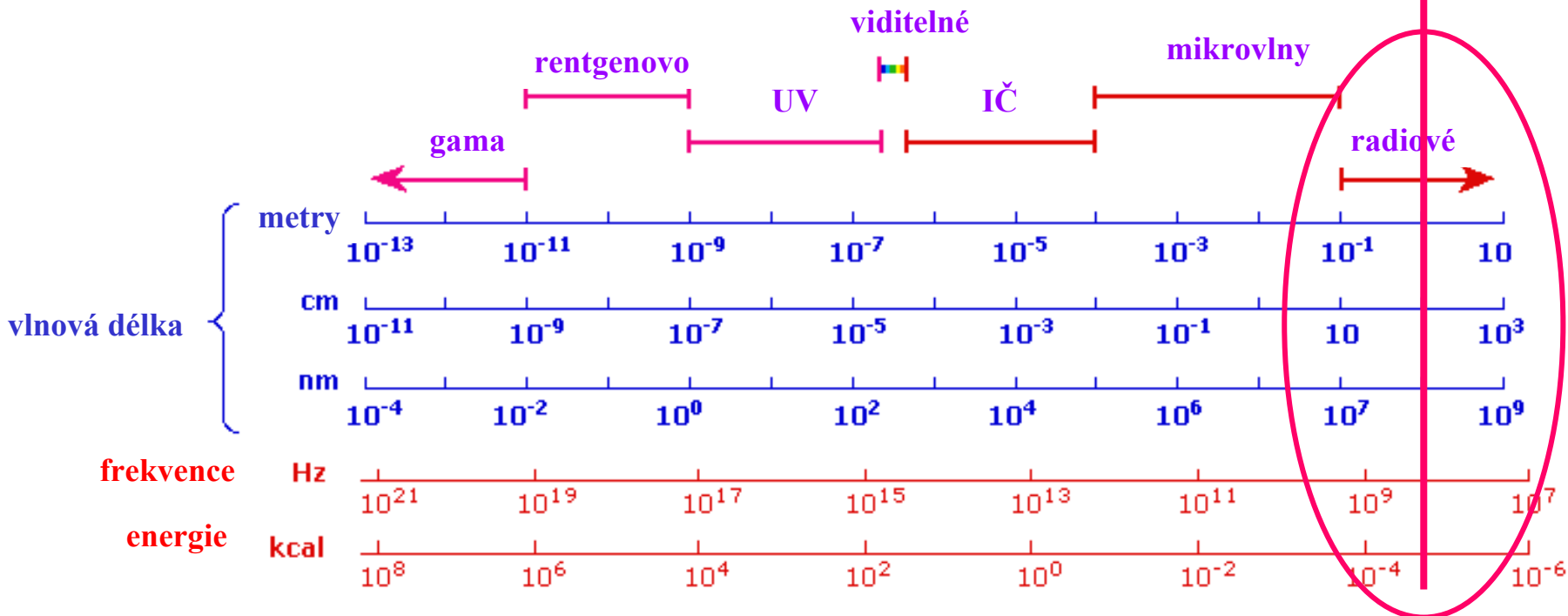
N-acetyl-D-glukosamin

# **Vodíková nukleární magnetická rezonance**

**Proton Nuclear Magnetic Resonance  
(<sup>1</sup>H-NMR, PMR)**



# spektrum elektromagnetických vln



výzkum radiovlenných (NMR) spektroskopií se odvětvil od výzkumu a vývoje radaru za II. světové války, začátek se datuje kolem r. 1946



výzkum radiovlánných (NMR) spektroskopí se odvětvil od výzkumu a vývoje radaru za II. světové války, začátek se datuje kolem r. 1946

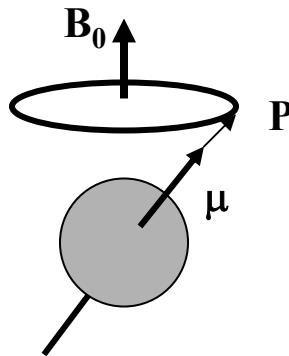
- 1945      prvé signály vody a parafinu
- 1951      „rozepsané“ spektrum ethanolu
- 1953      prvý komerční stroj fy Varian
- 1957      prvá spektra uhlíku
- 1965      širokopásmový decoupling
- 1969      prvý FT přístroj vyvíjený od roku 1957
- 1980      2D a 3D spektra
- 1978      NMR tomografie

jádra atomů se skládají z protonů a neutronů majících spin

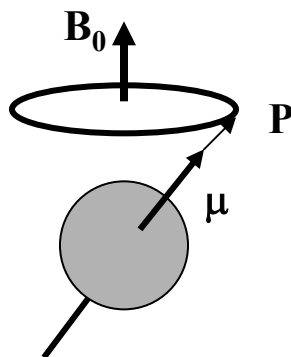
tento spin se skládá (jako např. moment otáčivosti) do hodnoty, kterou si představujeme jako úhrnný spin jádra

tento úhrnný spin může být nulový, tak, jak se skládají spárované spiny

tento jaderný spin, kupříkladu hodnoty  $1/2$ , se v magnetickém poli chová jako strelka kompasu v magnetickém poli Země

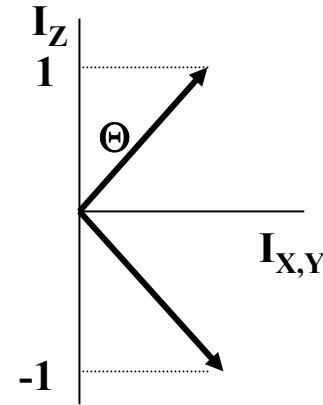
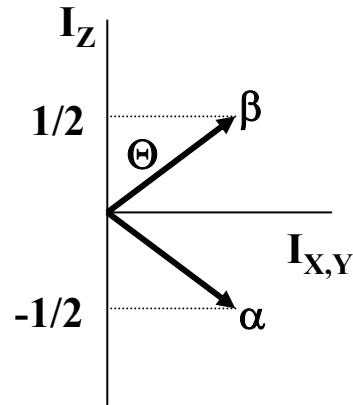
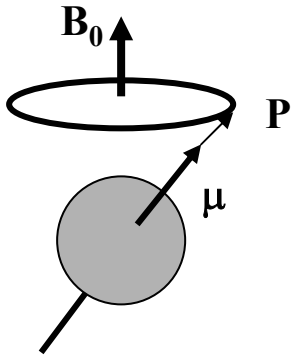






jádro	spin $I$	zastoupení %	NMR frekvence
$^1\text{H}$	$1/2$	99,985	100
$^2\text{H}$	1	0,015	15,351
$^{12}\text{C}$	0	98,9	-
$^{13}\text{C}$	$1/2$	1,108	25,144
$^{14}\text{N}$	1	99,63	7,224
$^{15}\text{N}$	$1/2$	0,37	10,133
$^{16}\text{O}$	0	99,96	-
$^{19}\text{F}$	$1/2$	100	94,077
$^{31}\text{P}$	$1/2$	100	40,481

NMR frekvence MHz při  $B_0=2,3488$  T



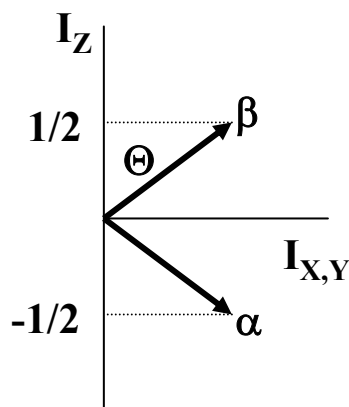
*Orientace spinu 1/2 a 1 v homogenním magnetickém poli s absolutní hodnotou*

V magnetickém poli jsou  $I$  a  $I_z$  kvantovány  
jaderný spin může být orientován  $2I+1$  způsoby, s kvantovým číslem  $m_1$  v rozsahu od  $-I$  do  $I$  ( $-I, -I+1, -I+2, \dots I$ )

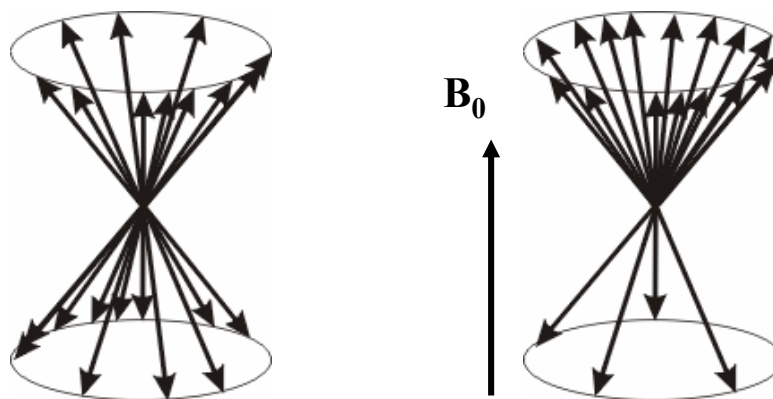
Z kvantování podle osy  $I_z$  plyne úhel  $\Theta$   $54,73^\circ$  pro spin  $1/2$  a  $45^\circ$  pro spin  $1$

přechod z jednoho stavu jaderného spinu do druhého odpovídá energii elmgm záření z oblasti radiových vln

Nejdůležitější jádra zkoumaná v organické chemii mají jaderný spin 1/2, jsou to  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{19}\text{F}$  a  $^{31}\text{P}$



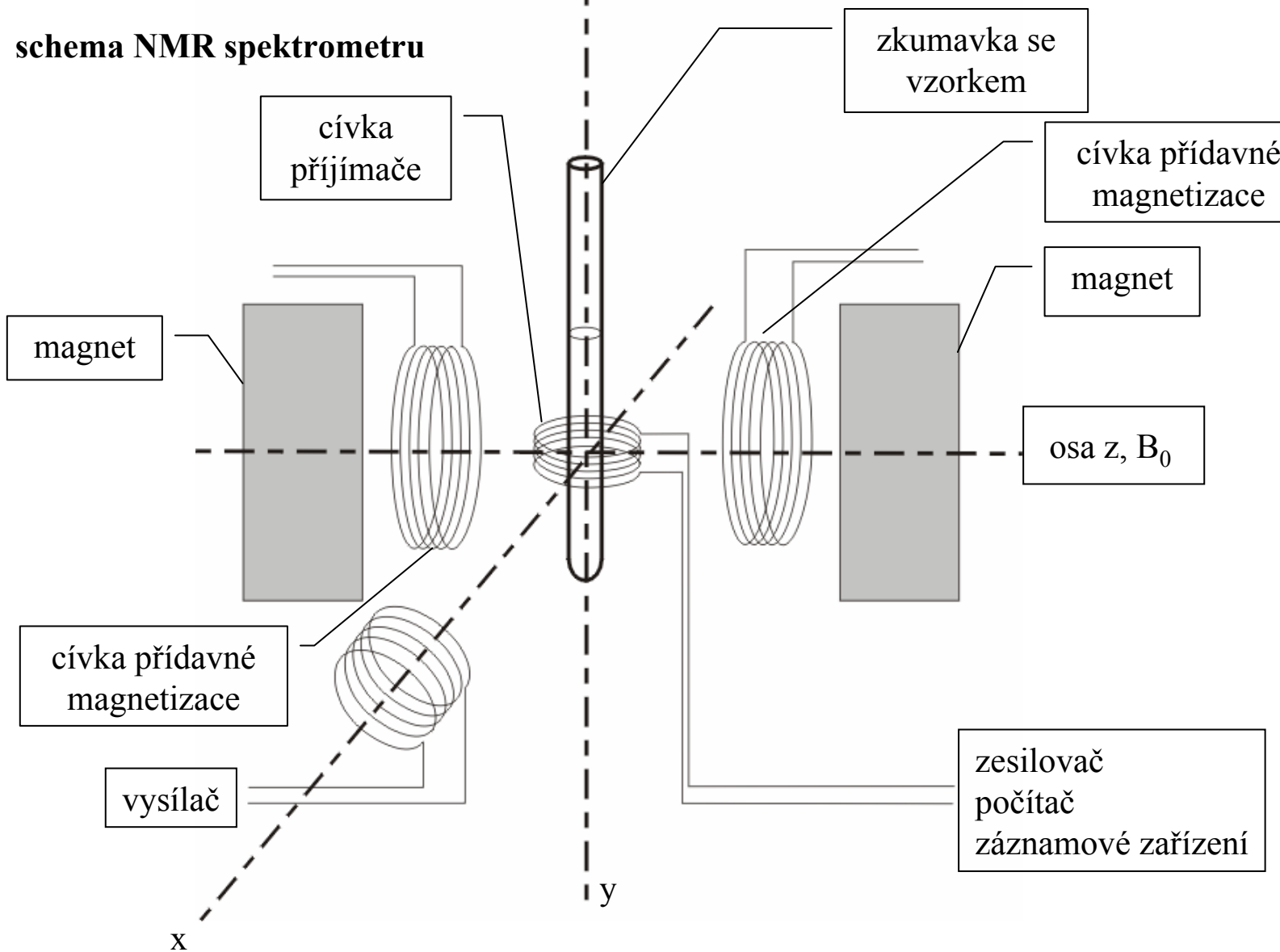
se spinem 1/2 mohou jádra v magnetickém poli nabývat dvou stavů  $\alpha$  ( $m_I = -1/2$ ) a  $\beta$  ( $m_I = +1/2$ )



Distribuce jaderných dipólů je v nepřítomnosti vnějšího magnetického pole statistická;

při vložení pole se podle tohoto pole (síly a směru) upraví, dojde k makroskopické magnetizaci

# schema NMR spektrometru



do let kolem 1970 byly všechny NMR přístroje tzv. **Continuous Wave (CW)**

to znamenalo, že

a/ za konstantní frekvence  $\nu_1$  bylo měněno magnetické pole  $B_0$  (field sweep mode)

b/ za konstantního pole  $B_0$  se mění frekvence  $\nu_1$  (frequency sweep mode)

v okamžiku rezonance se v cívce přijímače indukuje signál, pole  $B_1$  je malé a stále

takové uspořádání se hodí pro měření  $^1\text{H}$ ,  $^{19}\text{F}$  či  $^{31}\text{P}$  (citlivých jader)

rozvoj technologií vedl ke zvyšování magnetických polí, nejprve permanentních, poté elektromagnetů cívkových

další zlepšení přivedla aplikace supravodivých kryomagnetů

doba nastala k tomu, aby bylo možno měřit NMR tzv. **pulsní technikou**

generátor vyšle krátký puls (po dobu  $\tau_p$  několik  $\mu\text{s}$ ) o frekvenci nikoli jen  $\nu_1$  ale o spektru frekvencí symetricky kolem frekvence  $\nu_1$  uspořádaného

efektivní frekvenční rozsah je úměrný  $\tau_p^{-1}$  potom puls o  $\tau_p=10^{-5}$  s odpovídá frekvenčnímu svazku o šířce  $10^5$  Hz

výběr frekvencí závisí na síle magnetického pole, tak poli o  $B_0=4,7$  T je frekvence pro pozorování protonů 200 MHz, a  $^{13}\text{C}$  50,3 MHz

Aby bylo „pole homogenní“ musí být měřený vzorek relativně malý a je jím rychle otáčeno (zkumavka je nasazena na turbínku, která proudem je vzduchu držena v měřící poloze a zároveň rychle otáčena)

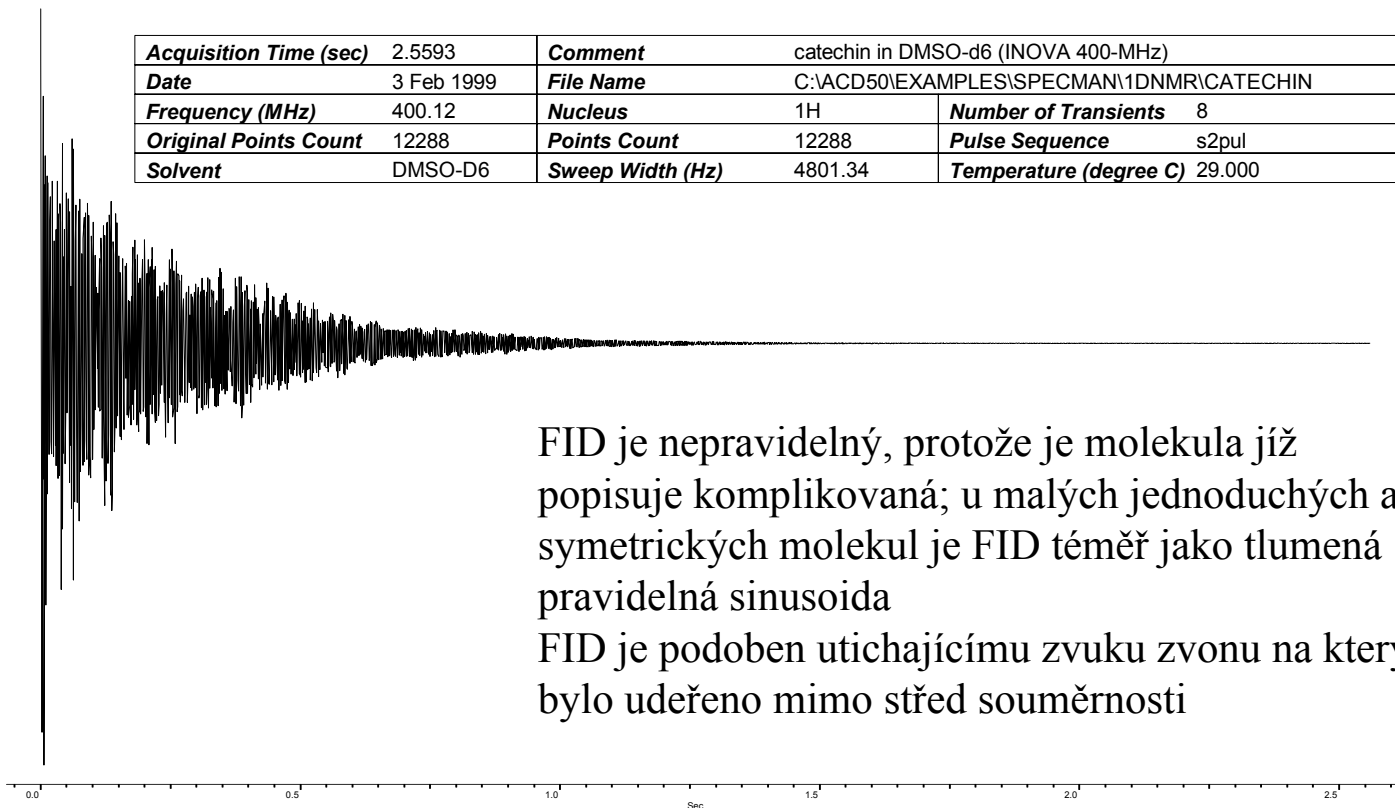
bohužel  $B_0$  se rotací vzorku nehomogenizuje a absorpční signál není tedy úsečka ale obezná Gausova křivka o určité šířce, charakterizujeme jí tzv. pološířkou, tj. šířkou pásu v polovině jeho výšky ( $W_{1/2}$ ), nebo šířkou u paty ( $W$ )

Relaxace může být buď u jednoho jádra (změnou stavu, spin lattice relaxation)  $T_1$ ,  
anebo u dvou jader („výměnou stavu“, spin-spin relaxation)  $T_2$

při pulsní metodě ale nemůžeme přímo zaznamenat spektrum, zaznamenáme jej, ale v odlišné podobě, než jsme zvyklí spektrum bude v tzv. časové doméně, ve tvaru křivky volného útlumu indukce (Free Induction Decay FID)

9 Mar 2000

<b>Acquisition Time (sec)</b>	2.5593	<b>Comment</b>	catechin in DMSO-d6 (INOVA 400-MHz)	
<b>Date</b>	3 Feb 1999	<b>File Name</b>	C:\ACD50\EXAMPLES\SPECMAN\1DNMR\CATECHIN	
<b>Frequency (MHz)</b>	400.12	<b>Nucleus</b>	1H	<b>Number of Transients</b> 8
<b>Original Points Count</b>	12288	<b>Points Count</b>	12288	<b>Pulse Sequence</b> s2pul
<b>Solvent</b>	DMSO-D6	<b>Sweep Width (Hz)</b>	4801.34	<b>Temperature (degree C)</b> 29.000



FID je nepravidelný, protože je molekula již popisuje komplikovaná; u malých jednoduchých a symetrických molekul je FID téměř jako tlumená pravidelná sinusoida

FID je podoben utichajícímu zvuku zvonu na který bylo udeřeno mimo střed souměrnosti

FID obsahuje všechny informace pro zobrazení spektra, lze jej převést matematickou operací zvanou Furierova Transformace (FT)

výpočet je relativně náročný a rozvoj počítačové techniky umožnil spolu s vyvinutím supravodivých kryomagnetů rozvoj této techniky

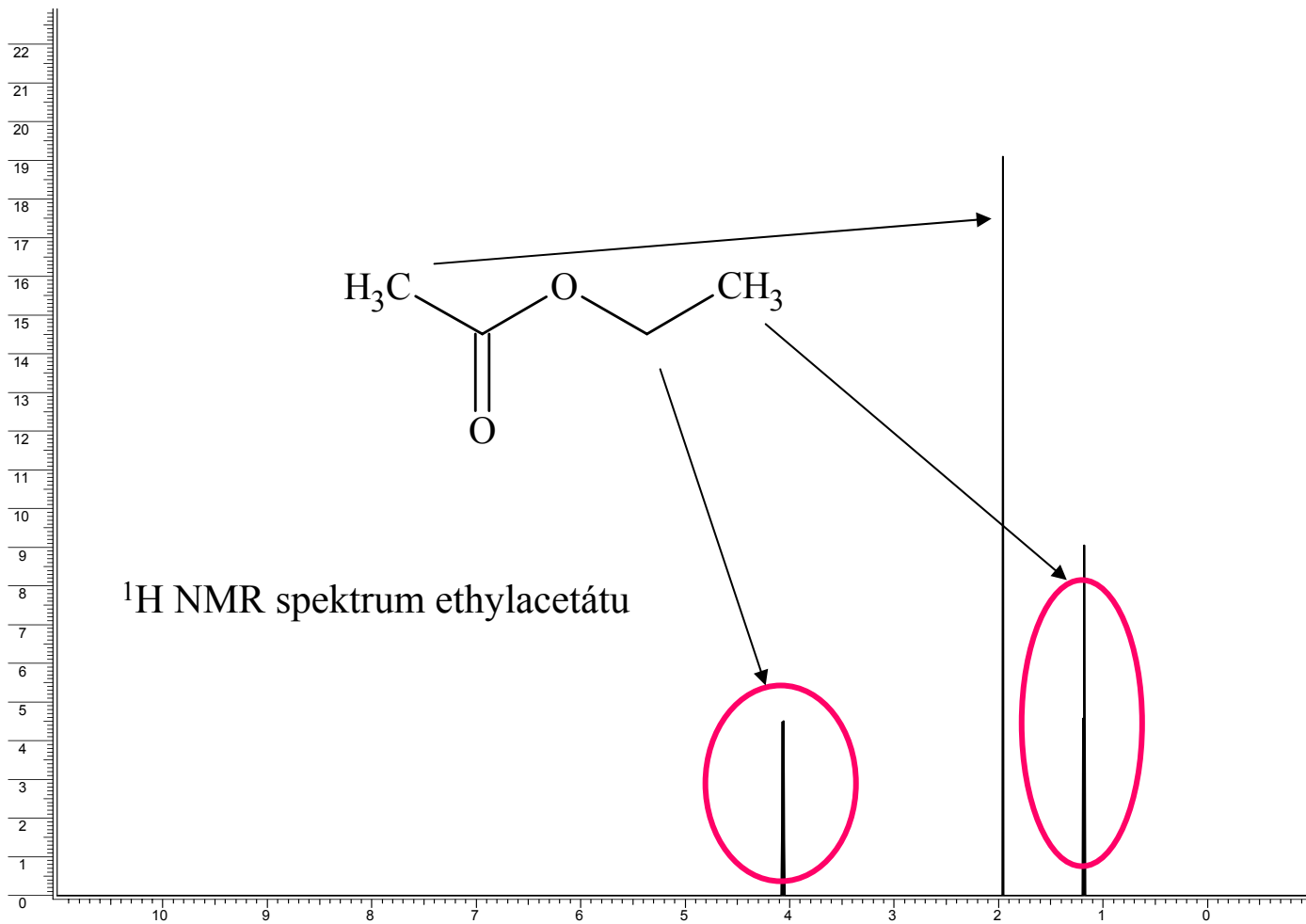
dnes potřebuje obyčejné PC několik sekund k tomu, aby přepočítalo data z FIDu na klasické spektrum (v tzv. frekvenční doméně)

výhoda této metody je, že signál může být měřen opakovaně a významové signály, které se opakují se načítají a šum je eliminován

poměr signál-šum roste s druhou odmocninou počtu takto akumulovaných měření (skenů), z druhého zákona termodynamiky ale plyne, že s množstvím akvizic získáváme na rozlišení ale ztrácíme na citlivosti

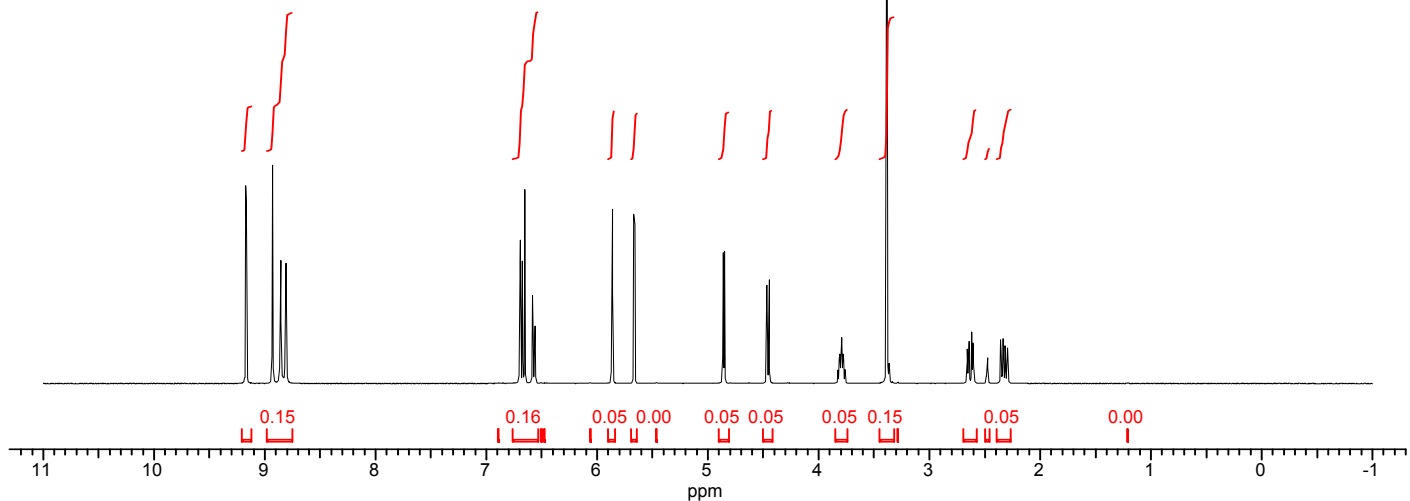
gyromagnetický poměr  $\gamma$  je pro  $^{13}\text{C}$  pouze 25 % hodnoty pro vodík, množství přírodního izotopu  $^{13}\text{C}$  je v uhlíku pouze 1,11 %, pro změření spektra jader  $^{13}\text{C}$  potřebujeme tedy 5700x to „samé“ měření, jako pro  $^1\text{H}$





<b>Acquisition Time (sec)</b>	2.5593	<b>Comment</b>	catechin in DMSO-d6 (INOVA 400-MHz)	
<b>Date</b>	3 Feb 1999	<b>File Name</b>	C:\ACD50\EXAMPLES\SPECMAN\1DNMR\CATECHIN	
<b>Frequency (MHz)</b>	400.12	<b>Nucleus</b>	1H	<b>Number of Transients</b> 8
<b>Original Points Count</b>	12288	<b>Points Count</b>	16384	<b>Pulse Sequence</b> s2pul
<b>Solvent</b>	DMSO-D6	<b>Sweep Width (Hz)</b>	4801.34	<b>Temperature (degree C)</b> 29.000

No.	(ppm)	Value	Absolute Value	No.	(ppm)	Value	Absolute Value
1	[1.21 .. 1.21]	0.000	5.47158e+5	11	[5.64 .. 5.69]	0.049	1.22190e+8
2	[2.26 .. 2.39]	0.054	1.33527e+8	12	[5.84 .. 5.90]	0.052	1.30394e+8
3	[2.46 .. 2.50]	0.012	2.88220e+7	13	[6.06 .. 6.07]	0.000	5.49753e+5
4	[2.57 .. 2.69]	0.054	1.33215e+8	14	[6.47 .. 6.48]	0.000	4.61618e+5
5	[3.28 .. 3.29]	0.000	3.99226e+5	15	[6.50 .. 6.51]	0.000	1.08912e+6
6	[3.32 .. 3.45]	0.154	3.82297e+8	16	[6.53 .. 6.76]	0.159	3.96034e+8
7	[3.74 .. 3.85]	0.054	1.33443e+8	17	[6.89 .. 6.89]	0.000	5.03669e+5
8	[4.41 .. 4.50]	0.053	1.31474e+8	18	[8.75 .. 8.98]	0.150	3.72566e+8
9	[4.81 .. 4.90]	0.051	1.25827e+8	19	[9.12 .. 9.21]	0.048	1.20555e+8
10	[5.46 .. 5.47]	0.000	6.25519e+5				



chemický posun

$$\nu_1 = \frac{\gamma}{2\pi} (1 - \sigma) B_0$$

z rezonanční podmínky vidíme, že neekvivalentní protony (jádra) budou mít signál u jiné frekvence

v praxi neudáváme polohu těchto signálů v frekvenci  $\nu_1$  nebo ve velikosti stínící konstanty  $\sigma$ , ale používáme hodnotu změny frekvence  $\Delta\nu$  mezi rezonanční frekvencí našeho jádra a standardu

pro  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  NMR spektrometrii používáme jako standard tetramethylsian (TMS), jemuž je definicí určena hodnota 0

protože je  $\Delta\nu$  závislá na velikosti  $B_0$ , používáme bezrozměrnou veličinu  $\delta$  definovanou

$$\delta = 10^6 \times (\Delta\nu / \text{pozorovací frekvence})$$

Faktor  $10^6$  se používá, protože změny frekvence se pohybují v  $1/10^6$ , tj. v p.p.m.

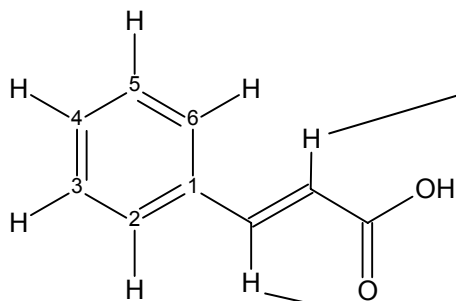
Referenční sloučenina (TMS) se obvykle přidává přímo do vzorku; pokud se použije jiný standard, např. kvůli rozpustnosti, jsou posuny na TMS přepočítány

Běžný rozsah chemických posunů je 10 až -2 ve stupnici  $\delta$

dříve se používala i stupnice  $\tau$ , která byla definována jako  $\tau = 10 - \delta$

spin spin interakce (AX)

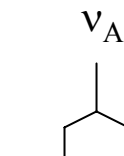
mějme dva protony  $H^A$  a  $H^X$   
**skořicové kyseliny**,  
dvouspinového systému AX



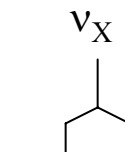
každé z jader  $H^A$  a  $H^X$  má populaci spinových stavů v  $+1/2$  a  $-1/2$  v našem „gyromagnetickém modelu“ což má vliv na okolí tak, že to dalším malým příspěvkem přispívá k magnetickému poli dojde ke štěpení linií:

$H^A$

$H^X$



↑ ↓ spiny X



↑ ↓ spiny A

14

12

10

8

6

4

2

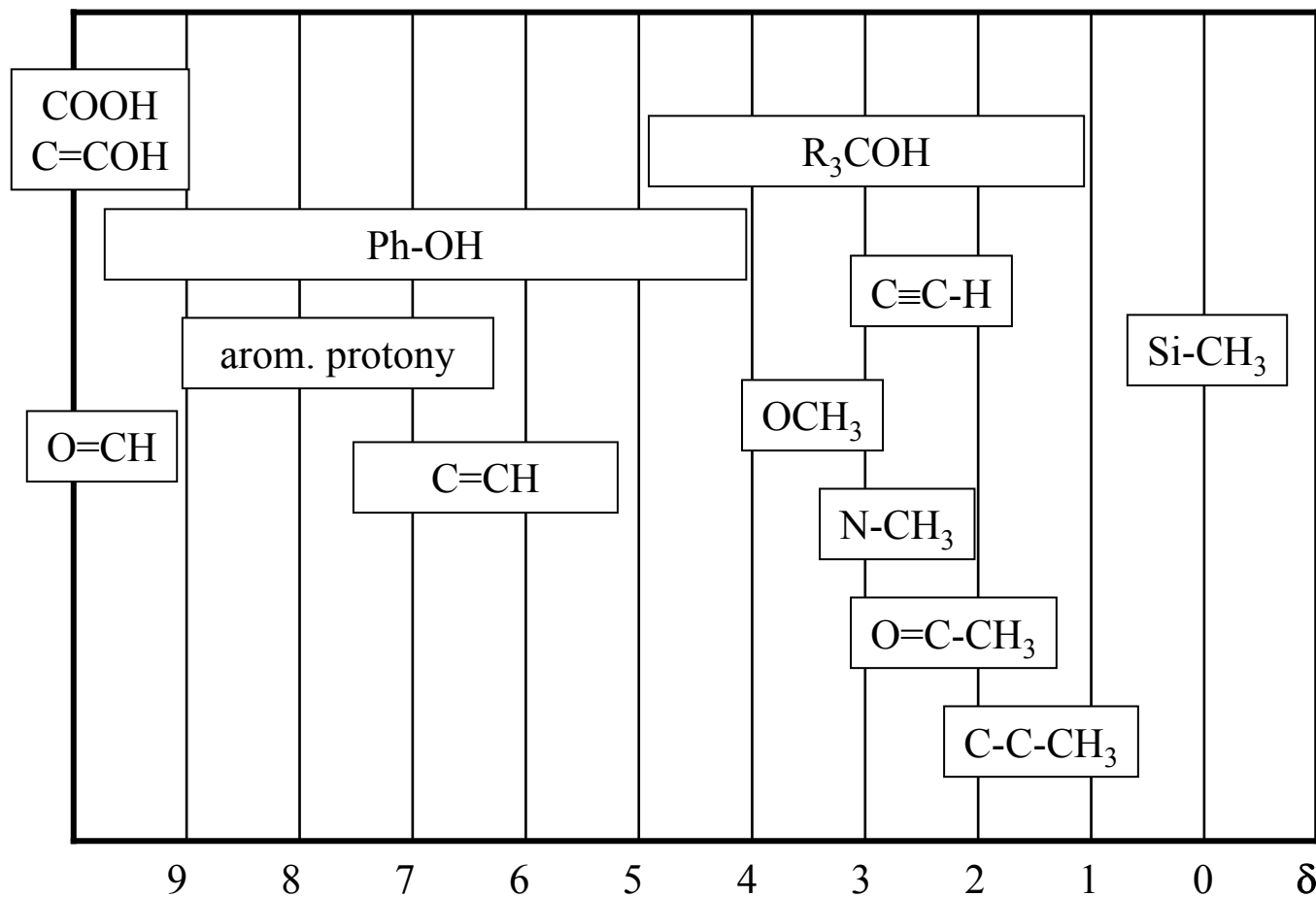
0

HSP-41-786

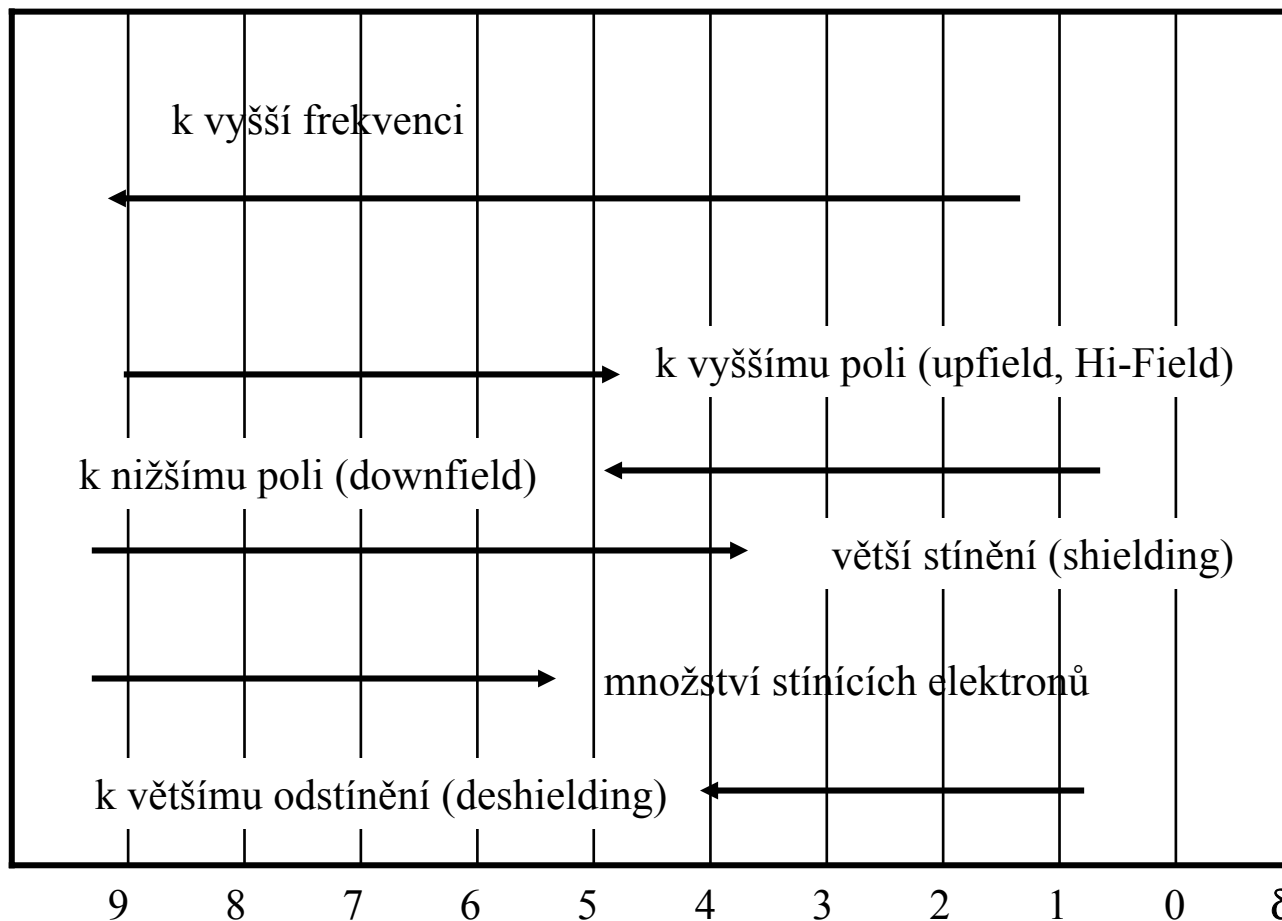
ppm

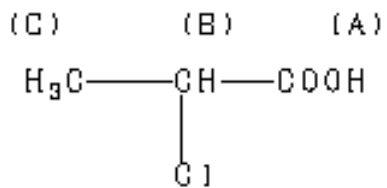
21a-68

Některé důležité chemické posuny v  $^1\text{H}$  NMR spektru

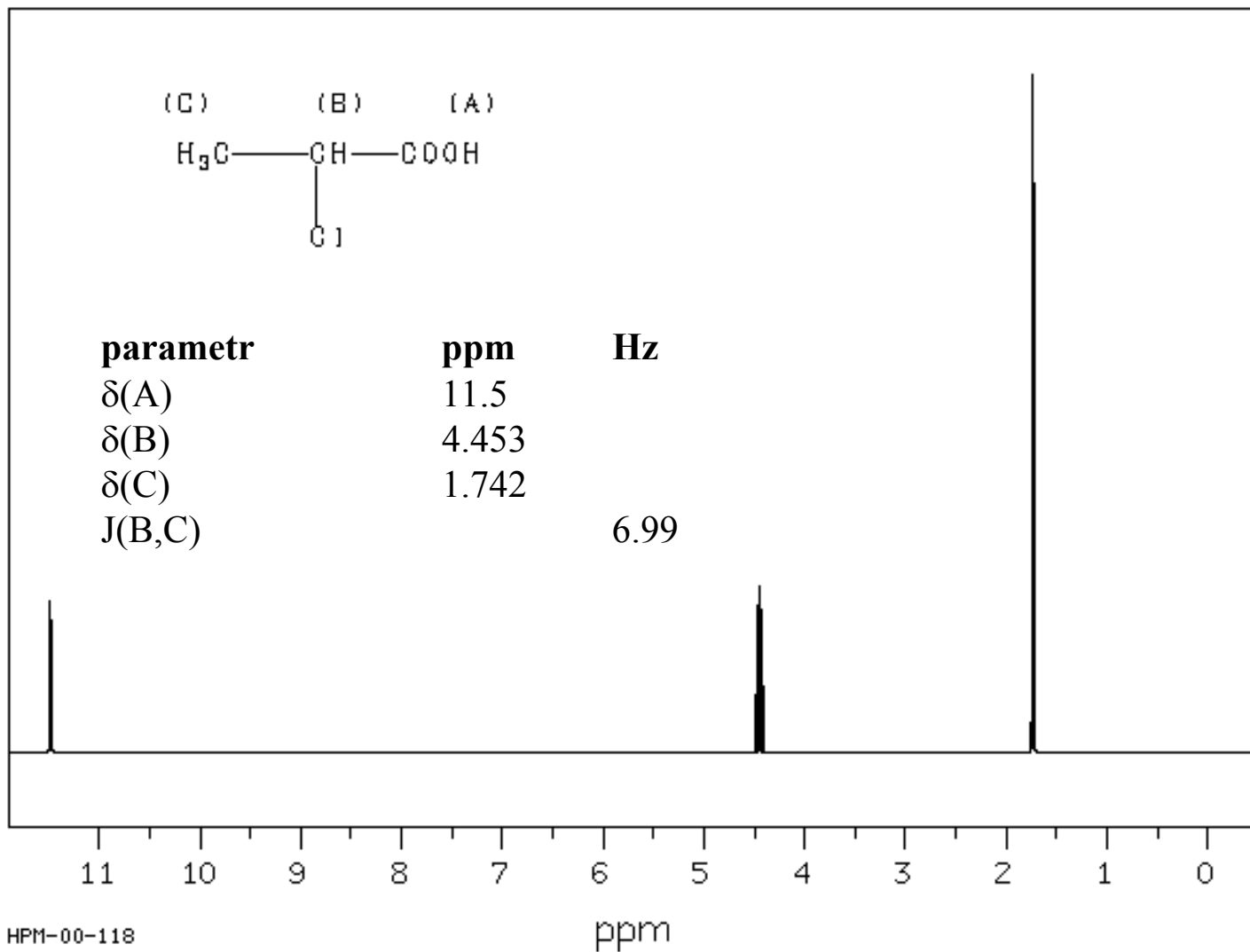


## Některé důležité termíny a efekty v popisu NMR spektra



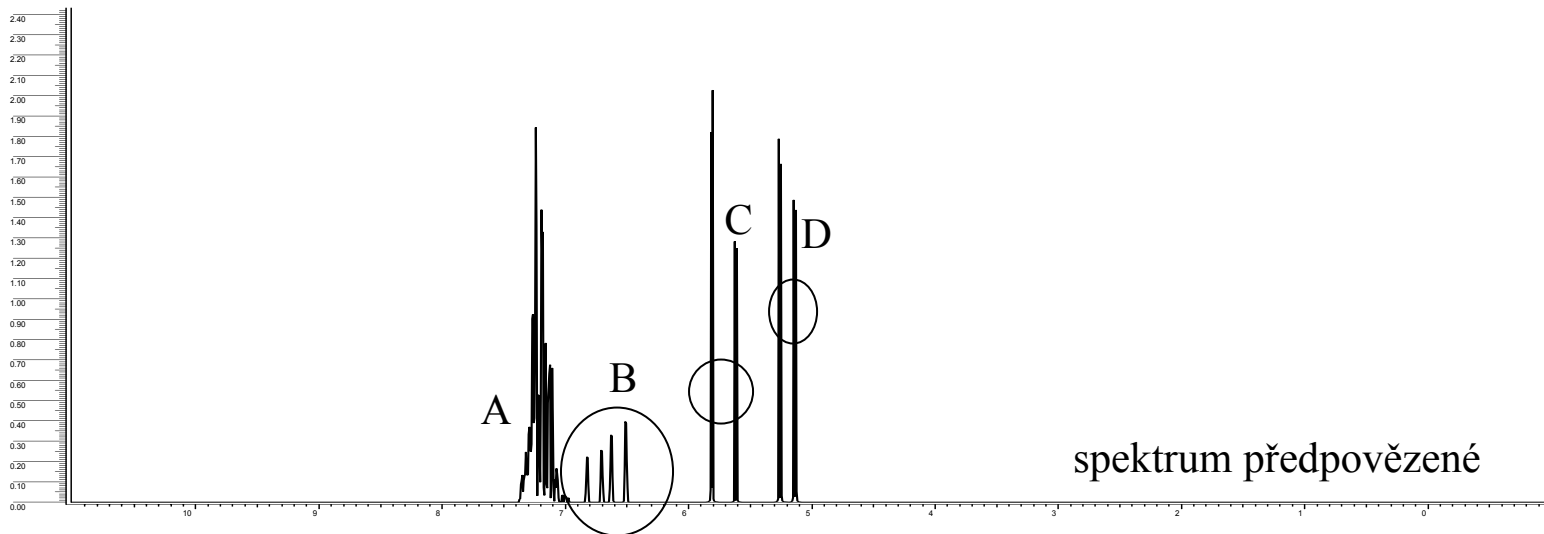
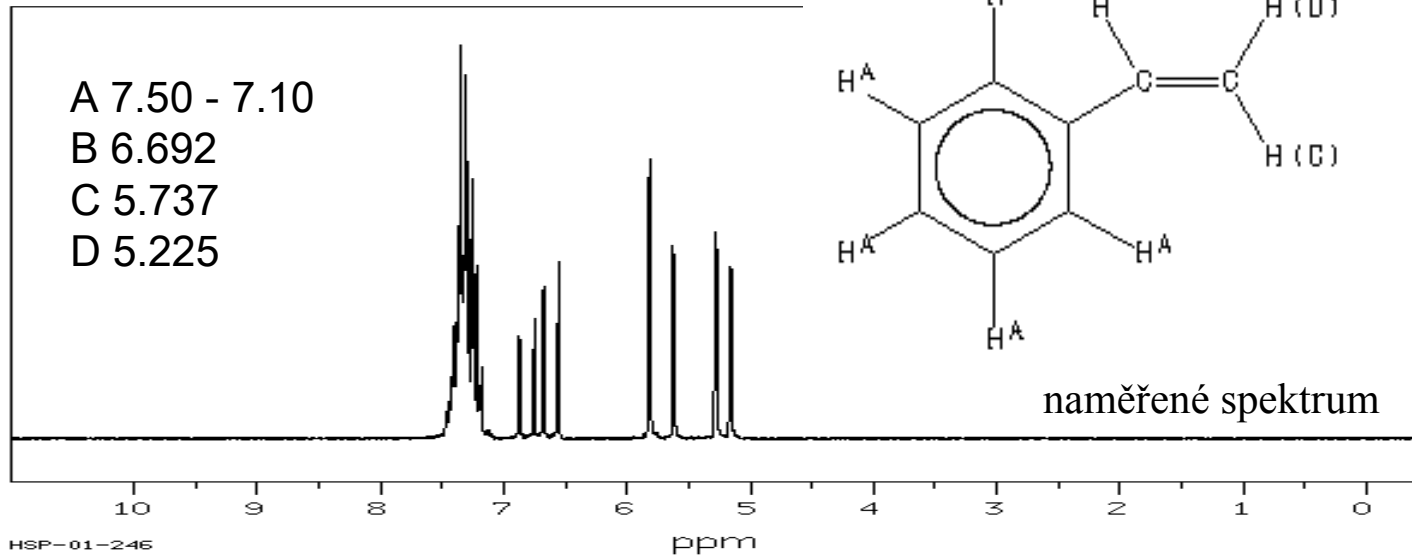


parametr	ppm	Hz
$\delta(\text{A})$	11.5	
$\delta(\text{B})$	4.453	
$\delta(\text{C})$	1.742	
$J(\text{B,C})$		6.99



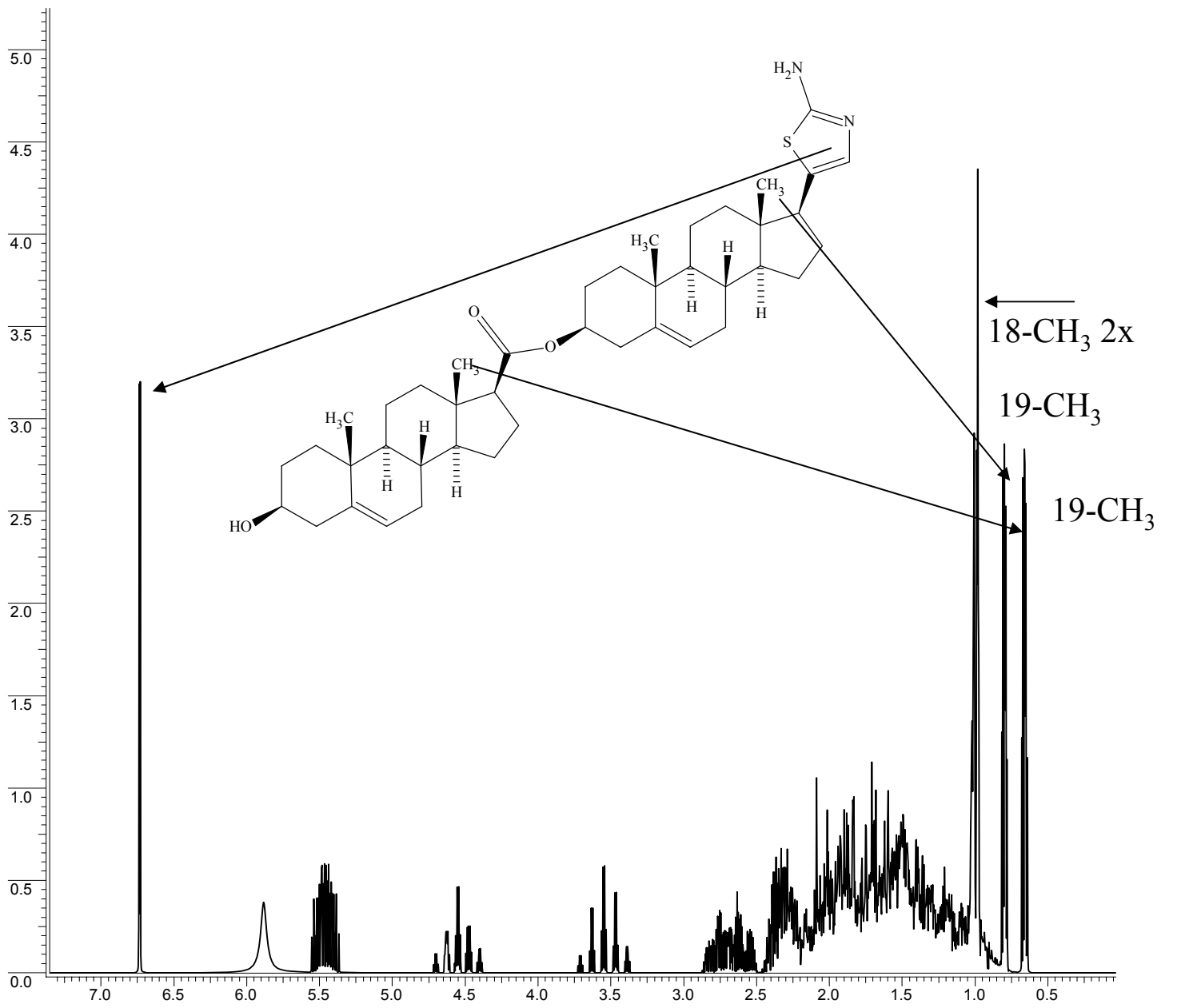
HPM-00-118

21a-71



21a-72





21a-73

Chemical Shift Calculation Protocol (right-click on an atom in the structure)

Calculated value: 5.44      Average experimental value: 5.36  
 Estimated error: 0.03      Values range: 5.27 - 5.43  
 Incremental value: 5.37      Standard deviation: 0.03  
 Hits selected from DB: 58      Average incremental value: 5.29

Proton Mark :

7 15 2 1

5.47 5.29 5.32 5.24 5.17

Shift     [Increment]     Weight

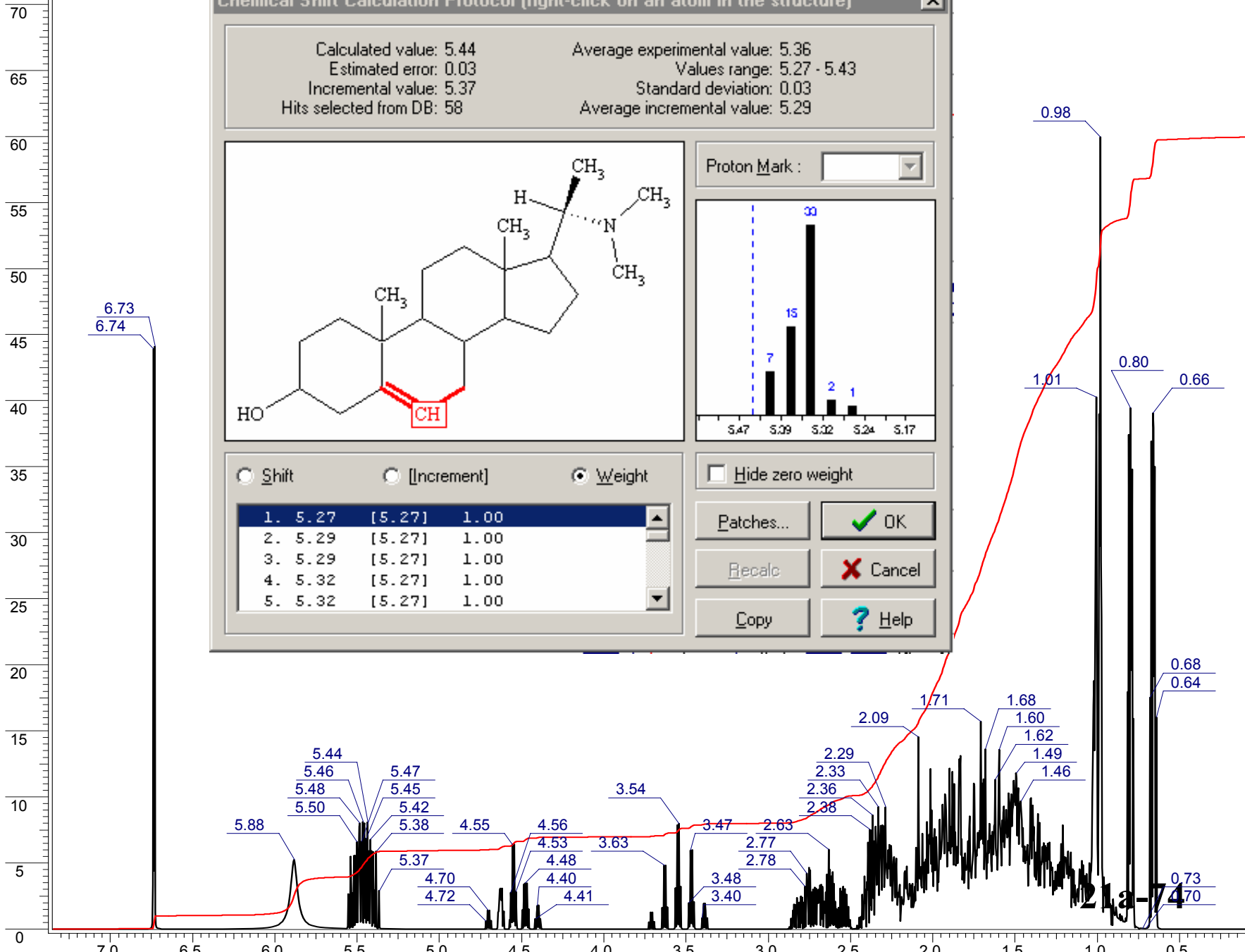
1.	5.27	[5.27]	1.00
2.	5.29	[5.27]	1.00
3.	5.29	[5.27]	1.00
4.	5.32	[5.27]	1.00
5.	5.32	[5.27]	1.00

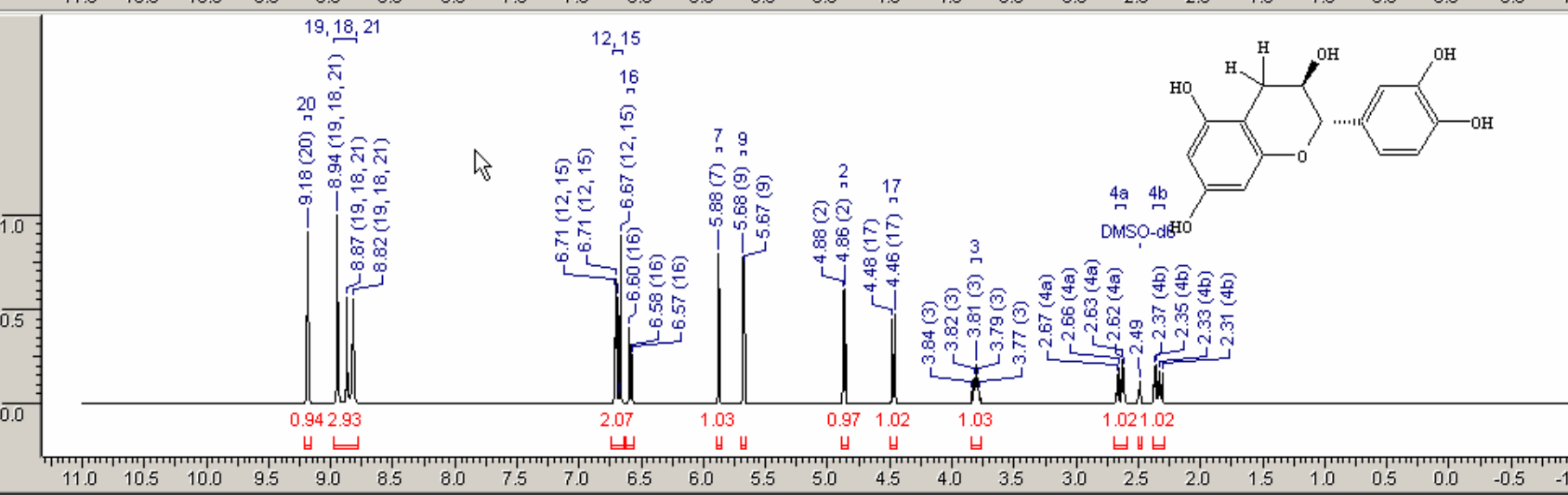
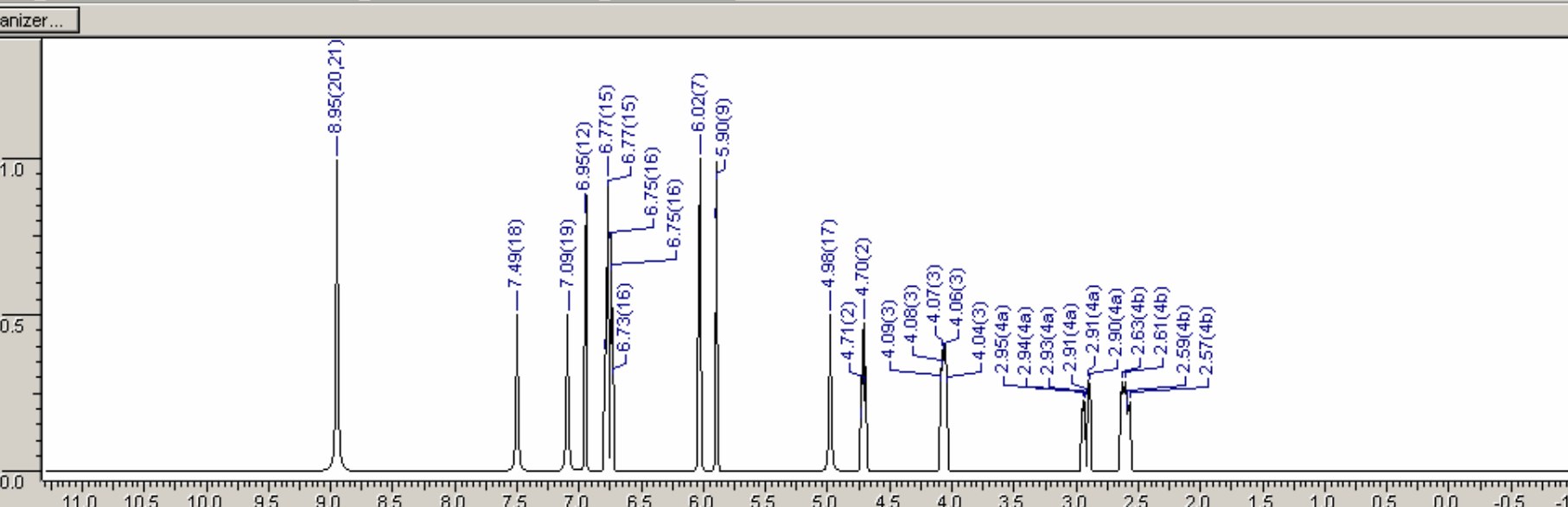
Hide zero weight

Patches...     OK

Recalc     Cancel

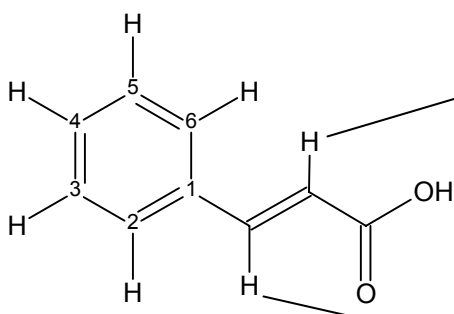
Copy     Help



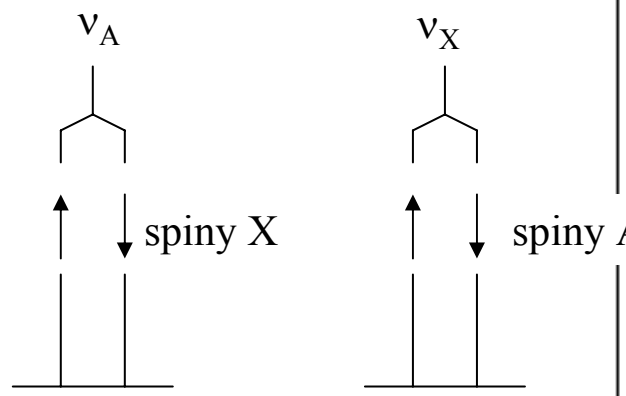
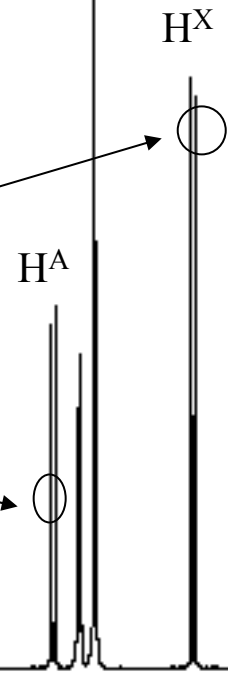


spin spin interakce (AX)

mějme dva protony  $H^A$  a  $H^X$   
**skořicové kyseliny,**  
dvouspinového systému AX



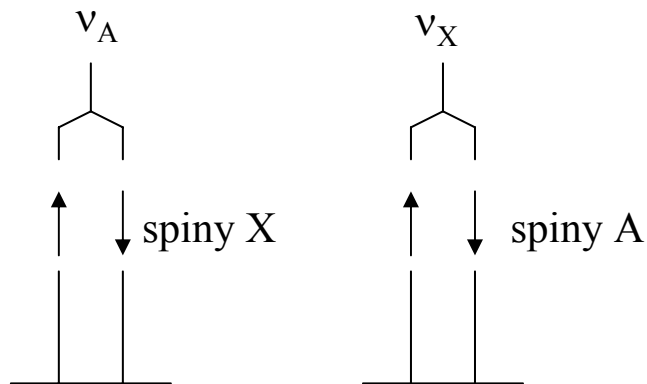
každé z jader  $H^A$  a  $H^X$  má populaci spinových stavů v  $+1/2$  a  $-1/2$  v našem „gyromagnetickém modelu“ což má vliv na okolí tak, že to dalším malým příspěvkem přispívá k magnetickému poli dojde ke štěpení linií:



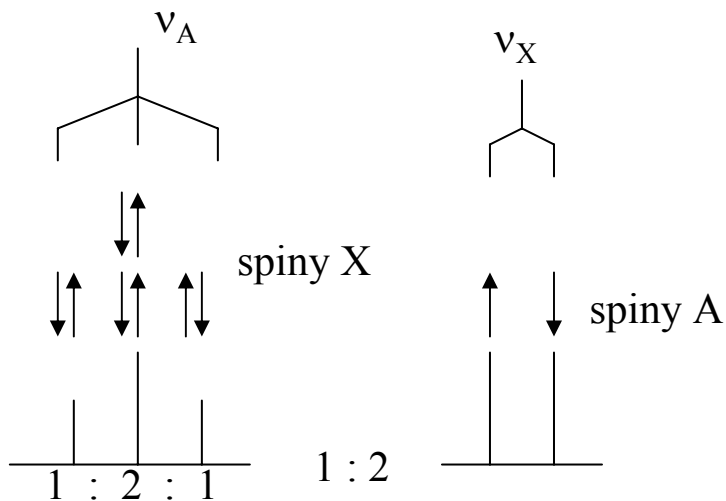
HSP-41-786

ppm

21a-76



dvouspinový systém AX



třispinový systém AX<sub>2</sub>  
 má k dispozici více neekvivalentních  
 spinových gyromagnetů, které na sebe  
 navzájem působí

můžeme odvodit pravidlo, že pro systémy se spinem  $I=1/2$  je multiplicita linií

$$M = n + 1$$

kde  $n$  je počet ekvivalentních sousedících jader  
obecnější případ můžeme odvodit ze vzorce

$$M = 2nI + 1$$

pro spinové interakce u jader se spinem  $1/2$  můžeme nakreslit binomický Pascalův trojúhelník (čísla udávají relativní intenzity signálů v multipletu):

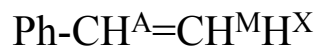
n=0	1
n=1	1 1
n=2	1 2 1
n=3	1 3 3 1
n=4	1 4 6 4 1

jednoduchá štěpení interakcemi prvního řádu, vyšší štěpení nemusí být vždy interpretovatelná

## **spin-spinové interakce prvního řádu a $I=1/2$**

- štěpení mezi ekvivalentními jádry nepozorujeme,
- multiplicita je dána vztahem  $M=n+1$ ,
- intenzity signálů v multipletu jsou dány Pascalovým trojúhelníkem,
- interakční konstanty nezávisí na magnetickém toku  $B_0$  a jsou tudíž udávány v Hz
- u nasycených sloučenin jsou interakce protonů oddělených více než třemi vazbami příliš malé na to, aby byly pozorovatelné,

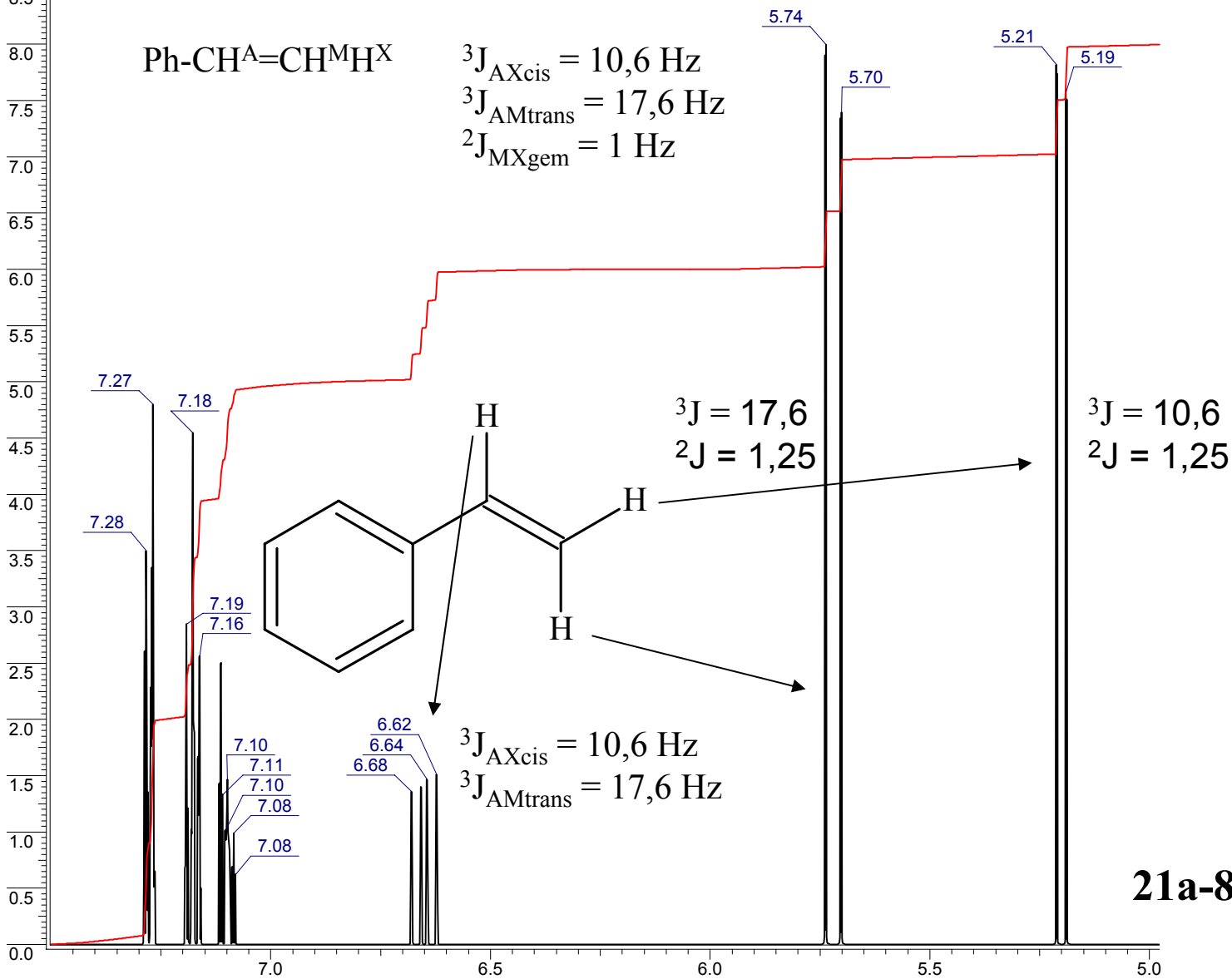
příklady „typických“ interakčních konstant



$${}^3J_{AXcis} = 10,6 \text{ Hz}$$

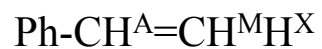
$${}^3J_{AMtrans} = 17,6 \text{ Hz}$$

$${}^2J_{MXgem} = 1 \text{ Hz}$$





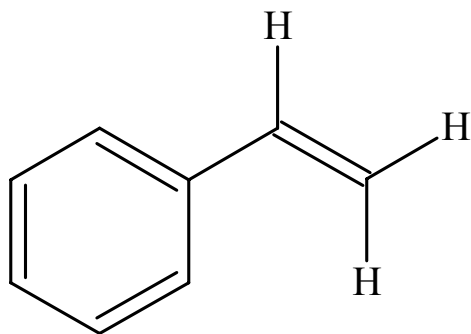
příklady „typických“ interakčních konstant



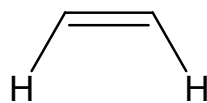
$${}^3J_{AXcis} = 10,6 \text{ Hz}$$

$${}^3J_{AMtrans} = 17,6 \text{ Hz}$$

$${}^2J_{MXgem} = 1 \text{ Hz}$$

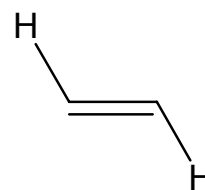


${}^2J$  a  ${}^3J$  H,H interakční konstanty v alkenech



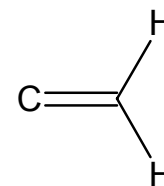
$${}^3J_{cis} = 6-14 \text{ Hz}$$

obvykle 10



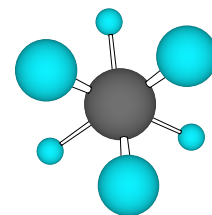
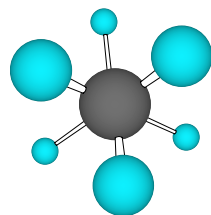
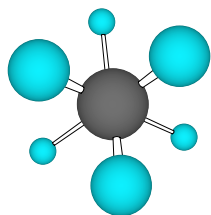
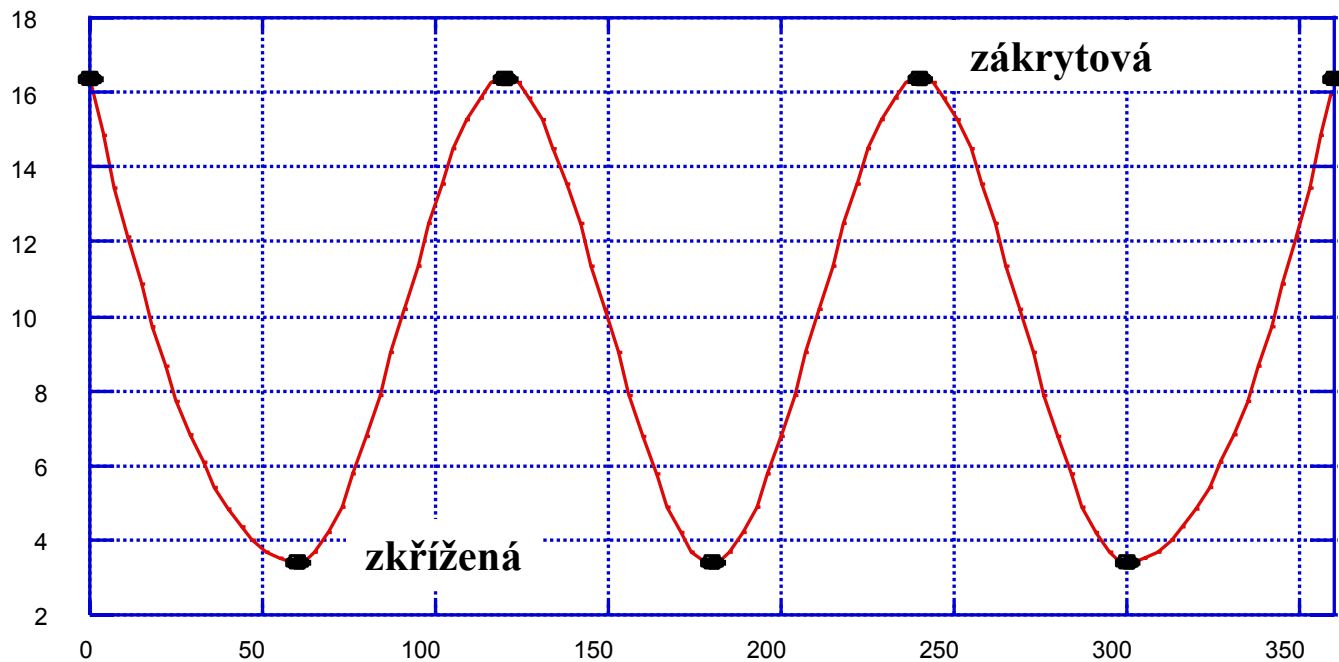
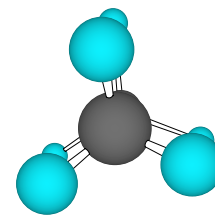
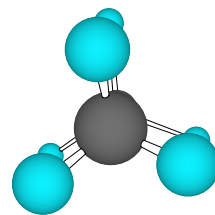
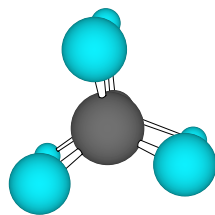
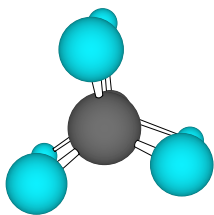
$${}^3J_{trans} = 14-20 \text{ Hz}$$

obvykle 16



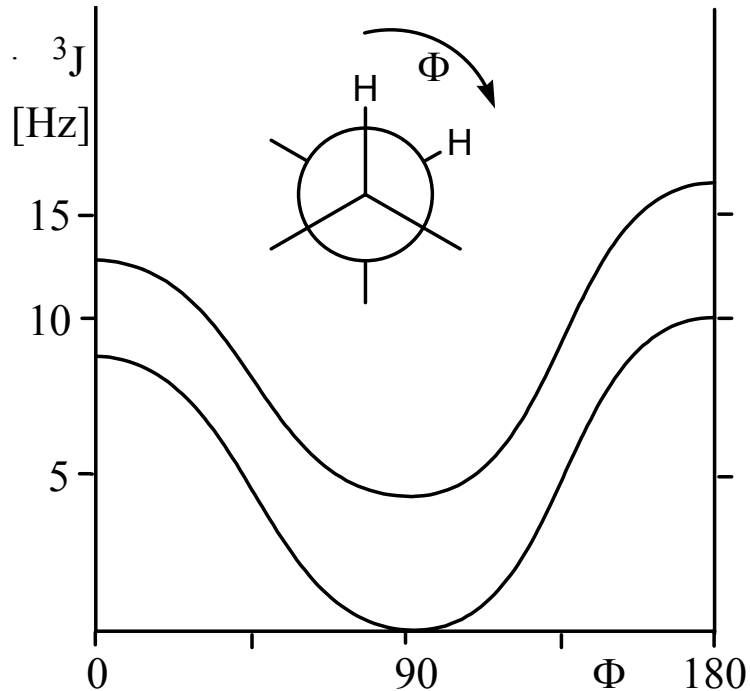
$${}^2J_{gem} = 0-3$$

obvykle 0-2



## Karplusova rovnice,

jde o zvláštní případ konformační analýzy, kdy je jako pozorovatelná veličina použit velikost interakční konstanty (vzájemného ovlivnění jader v magnetickém poli, studované v oblasti absorpcí AM radiofrekvenčního elektromagnetického záření); sledována je tzv vicinální interakční konstanta  ${}^3J$



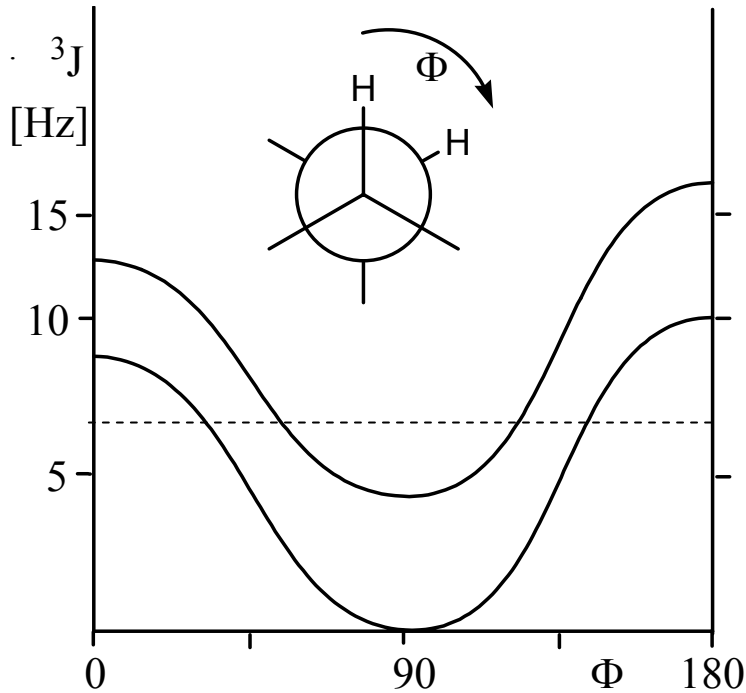
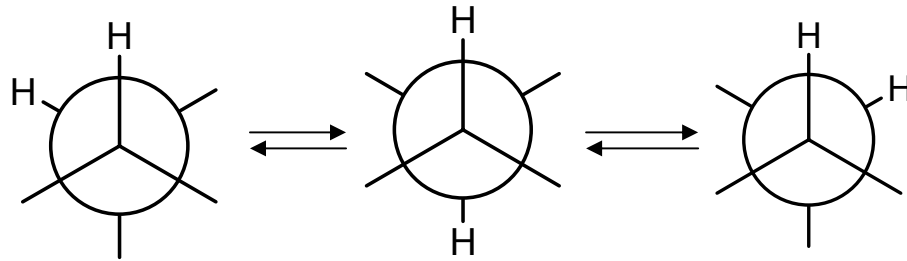
Hodnoty interakčních konstant jsou pro  $0^\circ$  a  $180^\circ$  největší, zatímco pro  $90^\circ$  nejmenší.

Pro zkřížené konformace jsou interakční konstanty u ethanu kolem 7 Hz.

$${}^3J_{H,H} = A + B(\cos\Phi) + C(\cos^2\Phi)$$

A, B, C jsou empirické konstanty

Pro zkřížené konformace jsou interakční konstanty u ethanu kolem 7 Hz, dihedrální úhel 30 °.



$J=7$  Hz je i průměrná hodnota všech tří zastoupených energeticky nejvýhodnějších zkřížených konformací

$${}^3J_{\text{gauche}}=3-5 \text{ Hz}; {}^3J_{\text{ap}}=10-16 \text{ Hz}$$

$${}^3J=1/3(2{}^3J_{\text{gauche}}+{}^3J_{\text{ap}})=\text{cca } 7 \text{ Hz}$$

# **Uhlíková nukleární magnetická rezonance**

**Carbon Nuclear Magnetic Resonance  
(<sup>13</sup>C-NMR)**

Chemické posuny uhlíků v organických sloučeninách se pohybují mezi  $\delta = -20$  až  $400$

obecně lze říci, že

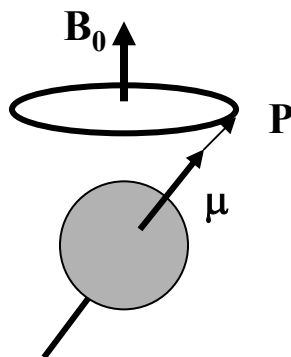
C(sp <sup>3</sup> )	-20 až 100
C(sp)	70 až 130
C(sp <sup>2</sup> )	120-240

elektronový deficit vede k významnému posunu a tak např.

karboniové ionty      250 až 400

substituenty přitahující elektrony, heteroatomy a alkyly způsobují posun uhlíků C<sub>α</sub> a C<sub>β</sub> k nižšímu poli, v poloze C<sub>γ</sub> opačný než u uhlíků C<sub>α</sub> a C<sub>β</sub> a v poloze C<sub>δ</sub> je efekt již zanedbatelný

vliv stereochemického uspořádání je významný (různé stínění)  
nahrazení sousedního atomu izotopem má malý vliv, malý vliv mají i anizotropní substituenty (fenyl)

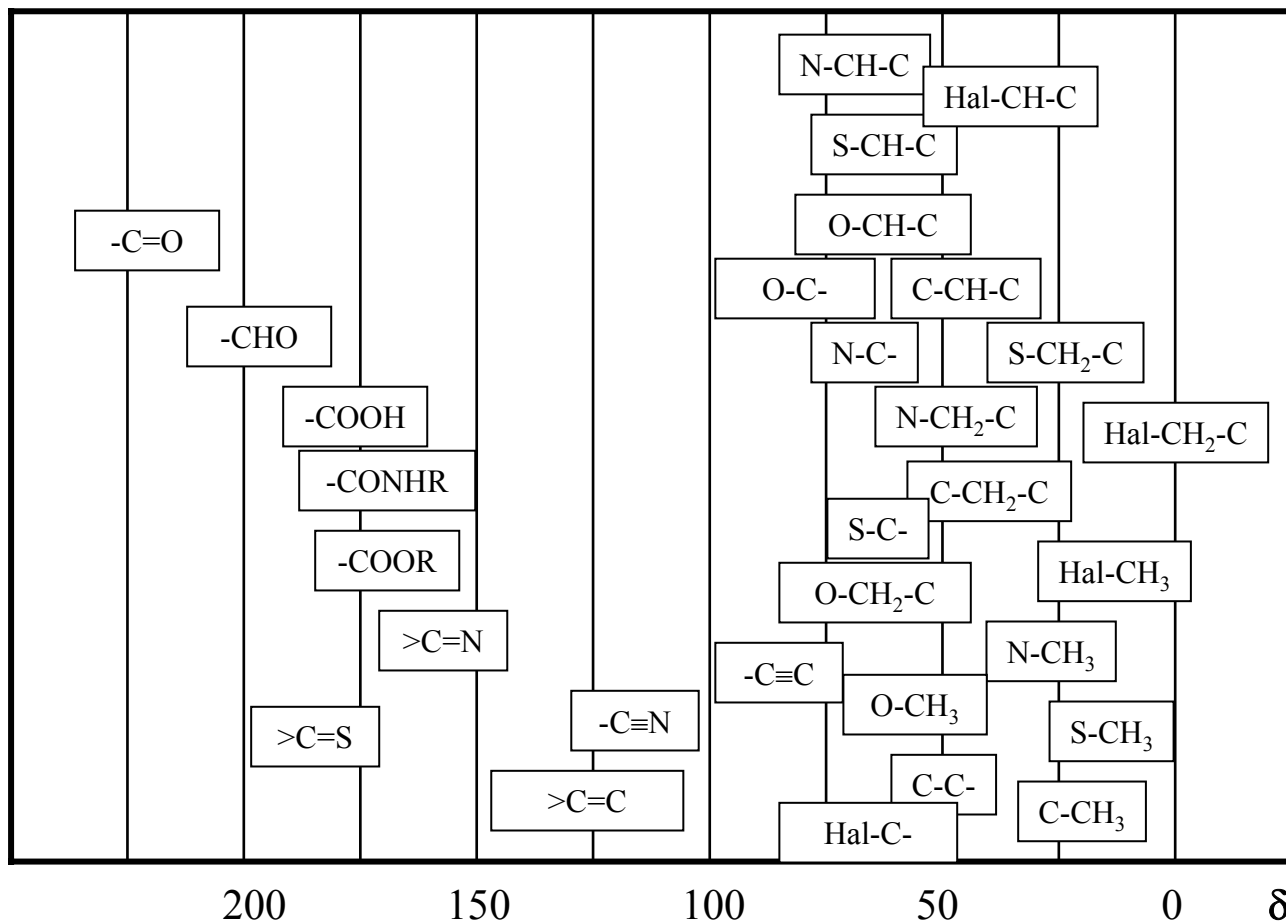


ze zastoupení  $^{13}\text{C}$  v přírodě je  
jen 1,1 %  
z toho plyne experimentální  
obtíž  
FT spektra je nutno měřit  
mnohokrát

jádro	spin $I$	zastoupení %	NMR frekvence
$^1\text{H}$	1/2	99,985	100
$^2\text{H}$	1	0,015	15,351
$^{12}\text{C}$	0	98,9	-
$^{13}\text{C}$	1/2	1,108	25,144
$^{14}\text{N}$	1	99,63	7,224
$^{15}\text{N}$	1/2	0,37	10,133
$^{16}\text{O}$	0	99,96	-
$^{19}\text{F}$	1/2	100	94,077
$^{31}\text{P}$	1/2	100	40,481

NMR frekvence MHz při  $B_0=2,3488$  T

Některé důležité chemické posuny v  $^{13}\text{C}$  NMR spektru





## Interakční konstanty

interakce C-C nejsou v  $^{13}\text{C}$  NMR spektrech látek s přirozeným zastoupením izotopů pozorovány

interakce C-H jsou významným fenoménem

$^1\text{J}(\text{C},\text{H})$  přímé (jsou ovlivněny počtem a elektronegativitou substituentů)

-C-H	125	=C-H	165	≡C-H	250
------	-----	------	-----	------	-----

$^2\text{J}(\text{C},\text{H})$  geminální:

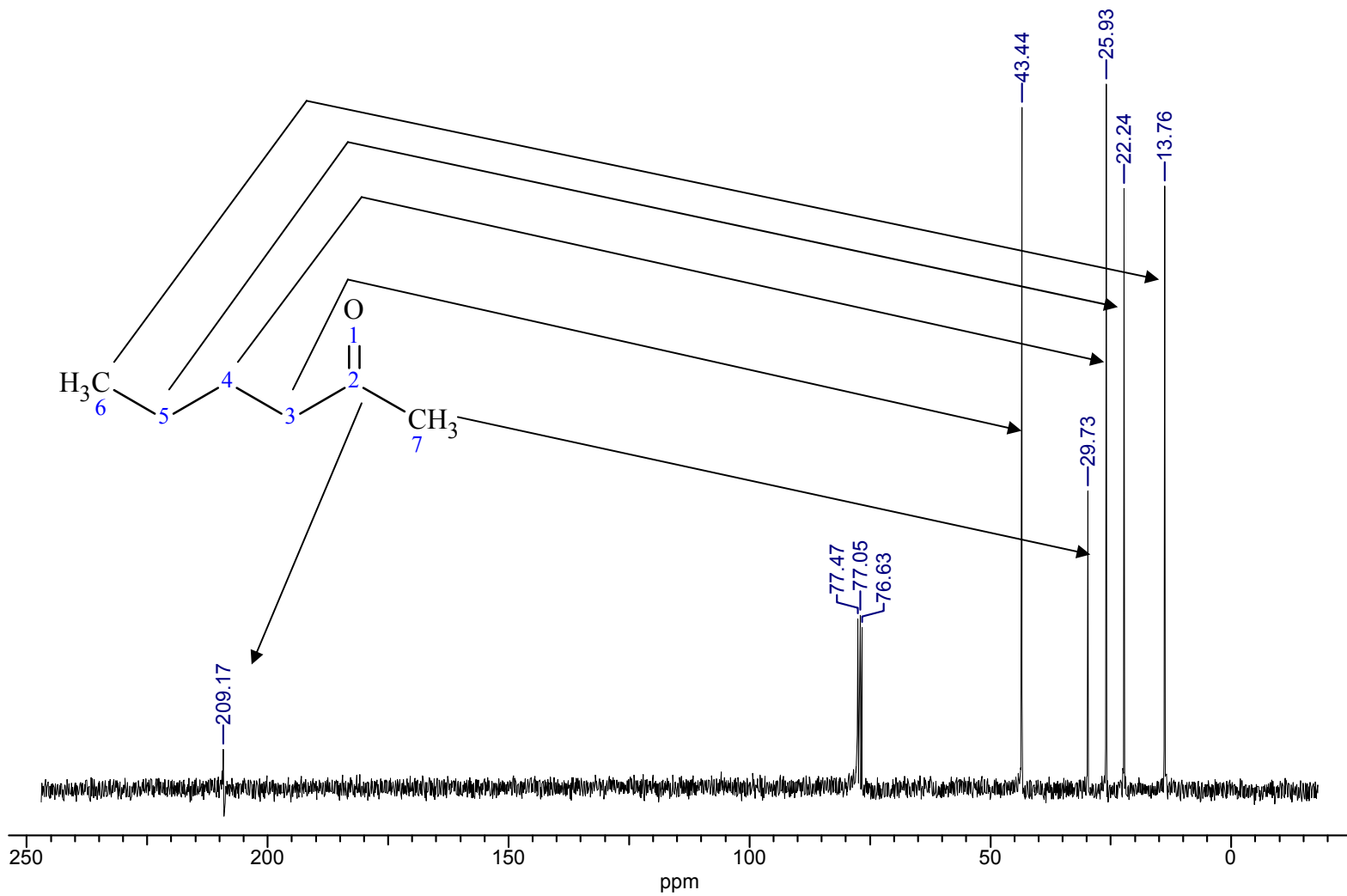
-C-C-H	1-6	-C=C-H	1-16	-C≡C-H	40
-CO-C-H	8	-C-CO-H	20-25		

$^3\text{J}(\text{C},\text{H})$  vicinální (závislé na dihedrálním úhlu)

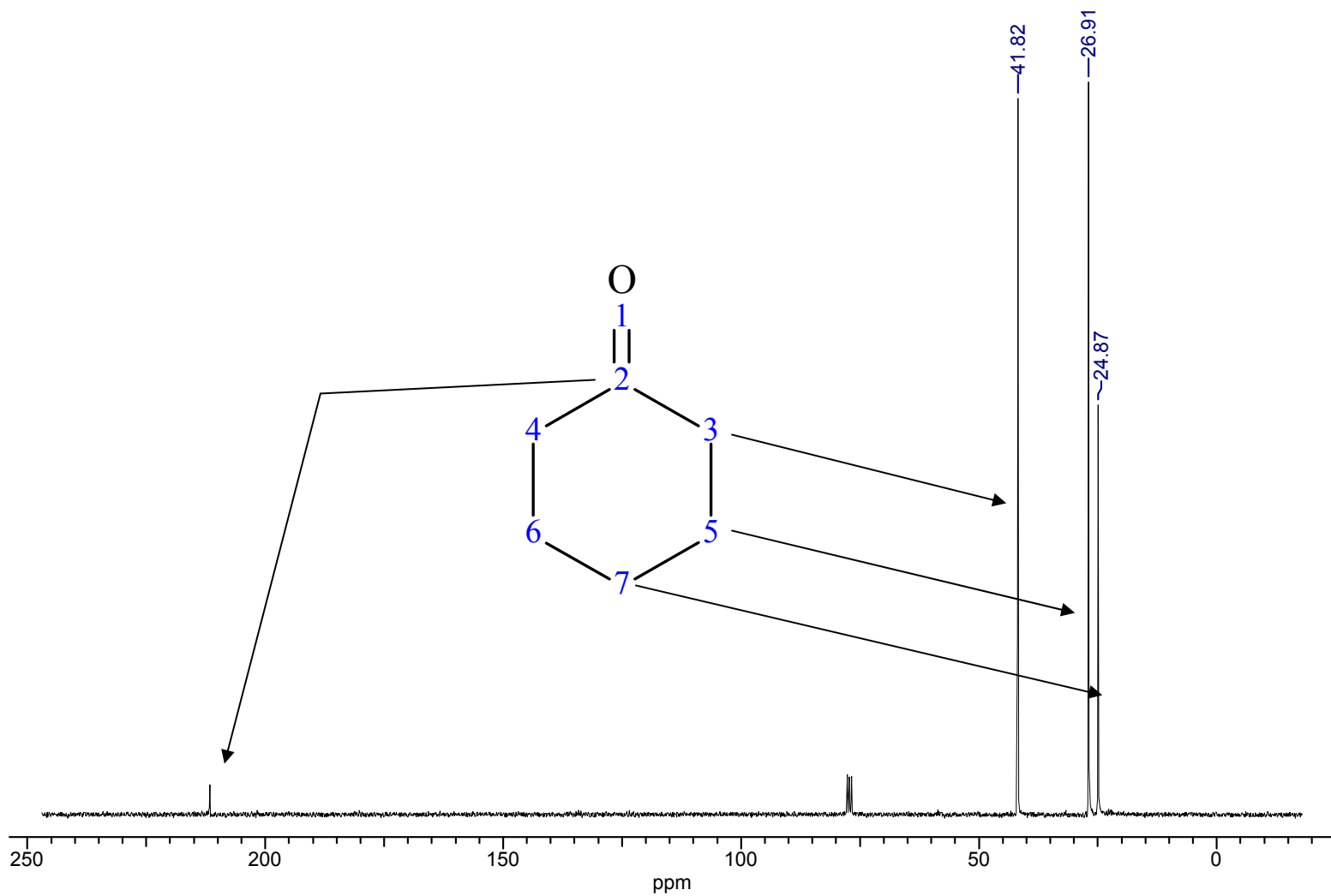
-C-X-C-H	gauche	<2	-C-C=C-H	cis	≤12
(X=C N O)	trans	5-7		trans	≤18

interakce geminální a vicinální na aromátech a heterocyklech v rozsahu 1-15 Hz

u běžných  $^{13}\text{C}$ -NMR spekter C-H interakce potlačujeme



**21a-90**



**21a-91**

**... a to je pro tuto část konec.**

