

Министерство образования и науки Российской Федерации
Ярославский государственный университет им. П. Г. Демидова
Кафедра общей и физической химии

В. Н. Казин

**ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ
АНАЛИЗА**

Учебно-методическое пособие

Ярославль
ЯрГУ
2016

УДК 543.5(072)
ББК Г4я73
К14

*Рекомендовано
Редакционно-издательским советом университета
в качестве учебного издания. План 2016 года*

Рецензент
кафедра общей и физической химии ЯрГУ им. П. Г. Демидова

Казин, Вячеслав Николаевич.

К14 Физико-химические методы анализа : учебно-методическое пособие / В. Н. Казин ; Яросл. гос. ун-т им. П. Г. Демидова. — Ярославль : ЯрГУ, 2016. — 56 с.

В пособии изложены основы физико-химических методов анализа: люминесценция, спектроскопия магнитного резонанса, масс-спектрометрия. Рассмотрены условия и области применения методов, их возможности и достоинства, другие особенности и характеристики. Представлены принципиальные схемы основных установок и приборов. Приведены контрольные вопросы для собеседования, тестовые задания, список рекомендуемой литературы.

Предназначено для студентов, изучающих дисциплину «Физико-химические методы анализа».

УДК 543.5(072)
ББК Г4я73

© ЯрГУ, 2016

Введение

Развитие химии и биологии невозможно без широкого использования в химических и биохимических исследованиях достижений физики и ее новых методов исследования вещества. Использование физических методов позволяет изучать основные вопросы теории химического строения: последовательность и кратность химических связей, взаимное влияние атомов и групп атомов в молекуле, энергетические, электрические и другие молекулярные характеристики, промежуточные продукты и механизмы реакций.

Значительные затруднения, встречающиеся при выборе более общих признаков, не позволяют объединить отдельные группы методов в общую систему. Общепринятой классификации методов анализа пока нет. Количество физико-химических методов анализа довольно велико — несколько десятков.

Автор настоящего пособия ставил своей задачей рассмотреть особенности резонансных методов анализа, люминесценции и масс-спектрометрии и дать практические рекомендации, в каком случае возможно использование того или другого метода исследования.

Спектры люминесценции, как и инфракрасные и электронные спектры, применяются для качественного и количественного анализа, для изучения электронно-колебательных состояний молекул, физико-химических свойств растворов, газообразных, жидких и твердых образцов.

Резонансные методы анализа (ядерный магнитный резонанс и электронный парамагнитный резонанс) позволяют изучать структуру и динамику молекул, радикалов, ионов в конденсированных и газовой фазах вещества. Спектры ЯМР и ЭПР обладают высокой специфичностью и применяются для идентификации соединений, в структурно-аналитических целях, для изучения быстрых обменных процессов. Резонансные методы являются эффективными методами исследования химического строения молекул, стереохимической конфигурации и конформации, изучения структуры сложных биомолекул — пептидов, белков и нуклеиновых кислот.

Масс-спектрометрия широко используется для определения молекулярной массы и брутто-формулы веществ; установления строения вещества по характеру образующихся фрагментов; проведения количественного анализа веществ и смесей.

1. Люминесцентные методы анализа: флуоресценция и фосфоресценция

Люминесценцией называют свечение вещества, возникающее при переходе молекул из возбужденного состояния в основное.

Люминесценция — довольно распространенное явление. Перевод молекул в возбужденное состояние может осуществляться различными путями, как и расходование приобретенной при этом молекулами энергии. Если возбуждение происходит за счет поглощения электромагнитного излучения в оптической области, то испускание излучения называют *фотолюминесценцией*.

Хемилюминесценция представляет собой испускание света в результате протекания определенных химических реакций (например, окисление эфирных растворов *n*-бромфенилбромида магния вызывает зеленовато-голубое свечение).

К числу разновидностей люминесценции, которые наблюдаются в природе, относится молния (пример *электролюминесценции*).

Некоторые виды бактерий, ракообразных, рыб, грибов, медуз, моллюсков, губок, червей обладают способностью светиться (известный пример — светляки). Такое явление называется *биолюминесценцией*. Оно обусловлено реакцией кислорода с веществом, находящимся в организме, которое называют люциферинном. Эта реакция катализируется ферментом люциферазой.

1.1. Теоретические основы люминесценции

При нормальных условиях в отсутствие возбуждения молекулы находятся в основном синглетном (S_0) состоянии (рис. 1). На схеме изображен также ряд других энергетических уровней молекул: синглетные возбужденные состояния — S_1 , S_2 и т. д., для каждого синглетного состояния существует соответствующее триплетное состояние (T_1 , T_2 и т. д.) Каждый из этих электронных энергетических уровней имеет ряд подуровней, которые отвечают квантовым колебательным энергетическим состояниям.

Сплошными вертикальными линиями показаны поглощение или испускание излучения; пунктирными — безызлучательные переходы.

Энергия, поглощенная молекулой, вызывает переход на один из более высоких уровней (этот процесс обозначен на схеме цифрой 1). Если переход заканчивается на каком-либо колебательном подуровне возбужденного уровня S_1 , то молекула очень быстро переходит на уровень S_1 , при этом энергия выделяется в виде тепла (этот процесс обозначен цифрой 2 — безызлучательный переход).

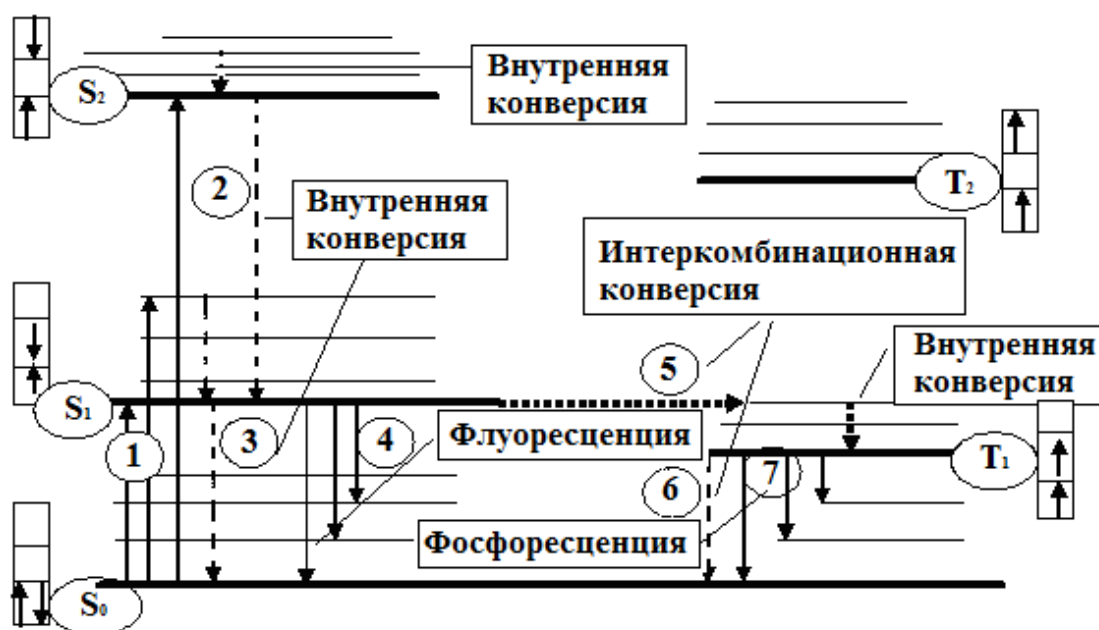


Рис. 1. Схематическое изображение изменений в уровнях энергии молекулы, которые могут происходить при поглощении излучения

Рассмотрим различия между возбужденным синглетным и соответствующим триплетным состояниями. Возбужденный электрон синглетного состояния имеет спин, антипараллельный электрону, с которым он был спарен. В триплетном состоянии два внешних электрона имеют один и тот же спин, т. е. они не могут подойти близко друг к другу без нарушения принципа Паули.

Принцип Паули: на каждом заполненном электрическом уровне могут находиться только два электрона, имеющие противоположные собственные магнитные моменты (спины).

Поскольку в этом случае электроны удалены друг от друга, происходит уменьшение электронного взаимодействия, поэтому триплетное состояние всегда обладает более низкой энергией, чем соответствующее синглетное состояние. Около каждого уровня в клетках (соответствующих разным орбиталям) показано направление возбужденного электрона по отношению к спине оставшегося электрона.

Если молекуле сообщить энергию (квант света), то произойдет переход одного электрона с заполненного уровня (S_0) на один из незаполненных уровней. Молекула при этом оказывается в электронно-возбужденном состоянии. При переходах между синглетными уровнями (S_1 , S_2 и т. д.) спин электрона не изменяется.

Молекула в возбужденном состоянии S_1 может с определенной вероятностью реализовать следующие пути превращения поглощенной энергии:

а) передача энергии возбуждения другой молекуле (колебательная релаксация);

б) превращение в тепло (безызлучательный переход — процесс 3): $S_1 \rightarrow S_0$;

в) фотохимическая реакция: $S_1 \rightarrow$ продукт;

г) испускание ее в виде излучения (на схеме — процесс 4): $S_1 \rightarrow S_0 + h\nu_{\text{фл.}}$

Излучение, испускаемое при переходе между состояниями, имеющую одинаковую мультиплетность, называется **флуоресценцией**;

д) переход молекулы с S_1 на один из колебательных подуровней (близкий по энергии) триплетного возбужденного состояния (T_1) с обращением спина электрона: $S_1 \rightarrow T_1$ (безызлучательный переход — процесс 5).

Переходы с изменением мультиплетности запрещены, это значит, что процесс возможен с малой вероятностью.

Процессы безызлучательного перехода происходят очень быстро (со временем порядка 10^{-3} – 10^{-12} с). К этим быстрым процессам относятся:

а) внутренняя конверсия;

б) интеркомбинационная конверсия.

Внутренней конверсией называется безызлучательный переход энергии из возбужденных состояний без изменения мультиплетности.

Это означает, что в какое бы возбужденное состояние ни попала молекула (например S_2), она очень быстро переходит в первое синглетное состояние (S_1). Внутренняя конверсия может происходить и между возбужденными триплетными состояниями ($T_2 \rightarrow T_1$).

Интеркомбинационной конверсией называются безызлучательные переходы между состояниями различной мультиплетности (например, $S_1 \rightarrow T_1$). На схеме процесс обозначен цифрой 5.

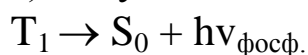
Рассмотрим молекулу, находящуюся в возбужденном триплетном состоянии T_1 . Существует несколько путей растраты энергии из данного состояния молекулы:

а) безызлучательный переход в S_0 с обращением спина электрона (интеркомбинационная конверсия): $T_1 \rightarrow S_0$ (процесс обозначен цифрой 6);

б) фотохимическая реакция;

в) передача энергии возбуждения другой молекуле;

г) испускание кванта фосфоресценции (процесс 7):



Излучение, испускаемое при переходе между состояниями с различной мультиплетностью, называется **фосфоресценцией**.

Время жизни флуоресценции органических молекул составляет 10^{-9} – 10^{-8} с, а время жизни фосфоресценции — от 10^{-3} с до нескольких секунд, потому что переходы между состояниями с различной мультиплетностью очень мало вероятны.

Обсудим более подробно происхождение спектров флуоресценции и фосфоресценции. Рассмотрим зависимость потенциальной энергии (E) двухатомной молекулы (для простоты) от межатомного расстояния (r). На рис. 2 изображены кривые потенциальной энергии и колебательные подуровни основного (S_0) и первого (S_1) синглетного состояния двухатомной молекулы.

Минимумы кривых потенциальных энергий в основном и возбужденном состоянии сдвинуты, поскольку орбиталь, заполняемая электронами в возбужденном состоянии, занимает большую область пространства, чем в основном состоянии, и по-

ложение равновесия в возбужденном состоянии соответствует большему межъядерному расстоянию.

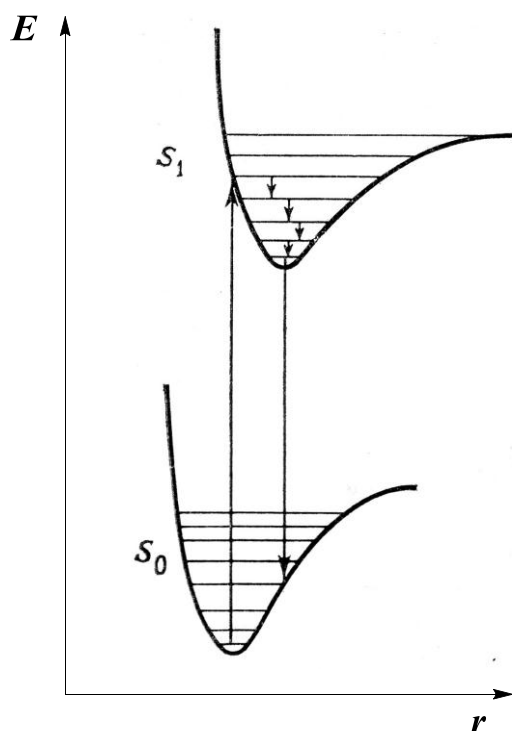


Рис. 2. Поглощение и флуоресценция двухатомной молекулой

Принцип Франка — Кондона: наиболее вероятным будет такой электронный переход, при котором не произойдет изменений ни в межъядерном расстоянии, ни в импульсе (принцип вертикальности перехода изображается вертикальной линией).

Из сопоставления длин стрелок на рис. 2 ясно, что фотоны испускаемого излучения обычно обладают меньшей энергией и, следовательно, большей длиной волны, чем фотоны возбуждающего излучения.

Если в соответствии с принципом Франка — Кондона представить состояния двухатомной молекулы, способной переходить в триплет, в виде потенциальных кривых, то кривые (S_1) и (T_1) должны пересекаться в некоторой точке М (рис. 3).

При поглощении света молекула переходит из основного состояния (S_0) в первое электронно-возбужденное состояние (S_1). Молекула быстро теряет избыток колебательной энергии. В точке пересечения (S_1) положения и импульсы ядер для возбужденного синглетного уровня и первого триплетного уровня (T_1) оказыва-

ются одинаковыми. Это означает, что молекула может перейти на соответствующий подуровень триплетного состояния. При этих условиях вероятность того, что такой переход произойдет, велика, несмотря на правило отбора, согласно которому переходы между состояниями с различной мультиплетностью запрещены. Далее потеря колебательной энергии в состоянии T_1 продолжается благодаря внутренней конверсии.

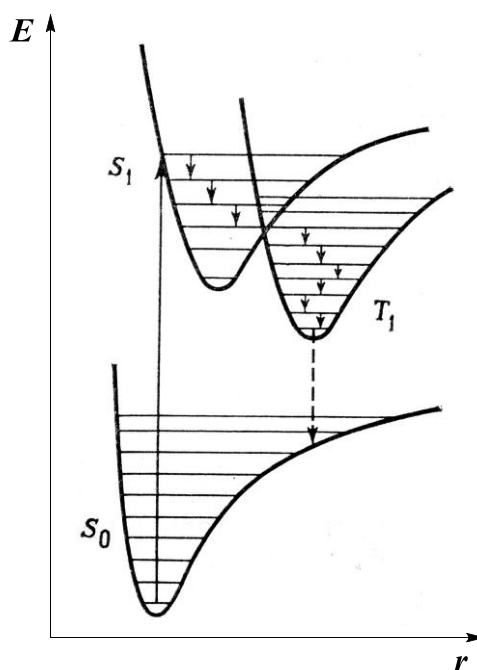


Рис. 3. Поглощение и фосфоресценция двухатомной молекулой

Поскольку состояние T_1 обладает более низкой энергией, чем состояние S_1 , спектр фосфоресценции наблюдается при больших длинах волн, чем спектр флуоресценции.

Таким образом, одним из способов отдачи энергии при переходе из возбужденного состояния в основное является испускание кванта света люминесценции. Чаще всего таким фотоэлектронном сложных органических молекул является π -электрон, участвующий в образовании делокализованных двойных сопряженных связей молекулы. Сами переходы с поглощением и испусканием света в системе π -электронов представляют переходы типа π - π^* и π^* - π между основным и возбужденным синглетным состоянием.

1.2. Параметры люминесценции и основные законы люминесценции

Главными параметрами люминесценции (флуоресценции) являются: спектр люминесценции, квантовый выход, время жизни молекулы в возбужденном состоянии, спектр возбуждения. Рассмотрим эти параметры.

Спектр флуоресценции — зависимость излучения от длины волны.

Квантовый выход (φ) — это отношение количества квантов, испускаемых с уровня S_1 , к количеству поглощенных квантов:

$$\varphi = n_{\text{фл}} / n_{\text{погл}} \quad (1.1)$$

Если бы все переходы вниз сопровождалось излучением, то квантовый выход $\varphi = 1$. Но за счет потерь рекомбинации (процессов, конкурирующих с флуоресценцией: тепловые потери и т. д.), он меньше единицы.

Определить квантовый выход можно по **методу Паркера — Рисса**. В одинаковых условиях снимается спектр неизвестного вещества и эталона с известным квантовым выходом (φ_0):

$$\varphi = \varphi_0 \times S \times D_0 / D \times S_0, \quad (1.2)$$

где D_0, D — оптические плотности эталона и исследуемого вещества;

S_0, S — площади под кривыми флуоресценции, соответственно.

В качестве эталона используют флуоресцин в растворе NaCl (0.1 М).

Время жизни молекулы в возбужденном состоянии (τ) определяется суммарной вероятностью его дезактивации:

$$\tau = 1 / (k_{\text{фл}} + k_{\text{вн.к}} + k_{\text{ин.к}}), \quad (1.3)$$

где $k_{\text{фл}}$ — константа скорости флуоресценции;

$k_{\text{вн.к}}$ — константа скорости внутренней конверсии;

$k_{\text{ин.к}}$ — константа скорости интеркомбинационной конверсии.

Спектром возбуждения флуоресценции называется зависимость интенсивности флуоресценции от длины волны возбуждающего света:

$$I_{\text{фл}} / I_0 = f(\lambda_{\text{в}}), \quad (1.4)$$

где $I_{\text{фл}}$ — интенсивность флуоресценции;
 I_0 — интенсивность падающего (возбуждающего) света;
 $\lambda_{\text{в}}$ — длина волны возбуждающего света.

Измерение спектров возбуждения флуоресценции имеет важное значение для решения целого ряда задач. Так, спектр возбуждения дает возможность установить спектр поглощения компонента, который флуоресцирует в исследуемой спектральной области, что позволяет идентифицировать этот компонент. Сравнительное изучение спектров возбуждения и флуоресценции позволяет обнаружить миграцию энергии возбуждения между различными компонентами в сложных системах. Так, если в двухкомпонентных системах флуоресцирует только один компонент, а в спектре возбуждения этой флуоресценции зарегистрированы полосы, соответствующие поглощению обоих компонентов, это означает, что в данной системе происходит миграция энергии с одного компонента на другой.

Явление флуоресценции описывается рядом законов.

Закон Вавилона: так как испускание флуоресценции происходит всегда с нижнего возбужденного энергетического уровня (S_1), то квантовый выход не зависит от длины волны возбуждающего света.

Правило Каша: так как испускание флуоресценции происходит всегда с нижнего возбужденного энергетического уровня (S_1), то форма спектра флуоресценции не зависит от длины волны возбуждающего света.

Закон Стокса: спектр флуоресценции будет расположен в более длинноволновой области, чем самый длинноволновый максимум в спектре поглощения.

Спектр флуоресценции сдвинут в длинноволновую сторону по сравнению с полосами поглощения, т. к. энергия поглощенного кванта частично растрачивается на тепловые колебания. Это приводит к тому, что энергия флуоресценции меньше, чем энергия поглощения кванта света.

1.3. Практическое применение люминесцентной спектроскопии

Спектры люминесценции, как и абсорбционные электронные спектры, применяются для качественного и количественного анализа, в структурных исследованиях, для изучения электронно-колебательных состояний молекул, физико-химических свойств растворов, газообразных, жидких и твердых образцов. Измерение люминесценции проводят на спектрофлуориметрах.

Если квантовый выход люминесценции больше 1 %, то такие соединения легко обнаруживаются люминесцентным методом. Когда мы имеем дело с сильно люминесцирующим веществом, то флуоресцентный анализ оказывается в тысячи (10^2 – 10^4) раз чувствительнее спектрофотометрического.

Кроме того, этот метод более селективен, поскольку флуоресцирует меньшее число соединений, чем поглощает. В связи с высокой чувствительностью химический люминесцентный анализ широко используется в различных областях промышленности, включая, химическую и нефтехимическую, в биологии, медицине, геологии, в пищевой промышленности, сельскохозяйственном производстве, дефектоскопии, археологии, криминалистике и т. д.

Так как чувствительность данного метода очень высока, его можно использовать только для очень разбавленных растворов, концентрация которых гораздо ниже, чем при измерении поглощения.

Регистрацию спектров осуществляют по собственной флуоресценции или с помощью флуоресцентных зондов или меток, вводимых в изучаемую микромолекулу. Различают **флуоресцентные зонды-красители**, которые связываются с макромолекулами нековалентно (электростатическими и ван-дер-ваальсовыми силами), и **флуоресцентные метки**, связанные химической связью. Измерение спектров флуоресценции таких присоединенных меток и зондов особенно важно при изучении свойств нуклеиновых кислот, вследствие малой интенсивности собственной флуоресценции.

К флуоресценции в видимой области способны в основном два класса веществ: 1) большое число минералов и неорганические твердые люминофоры; 2) органические и металлоорганические соединения, обладающие интенсивным поглощением в УФ-области.

Вопросы для собеседования

1. Понятие люминесценции, ее разновидности.
2. Теоретические основы люминесцентного метода анализа.
3. Понятие о синглете и триплете.
4. Внутренняя и интеркомбинационная конверсии.
- 4 Флуоресценция и фосфоресценция.
5. Принцип Франка — Кондона.
6. Квантовый выход. Определение квантового выхода.
7. Законы поглощения света, используемые для объяснения люминесценции: законы Стокса и Вавилова, правило Каши.
8. Применение люминесцентного метода анализа.

Тестовые задания

1. Различия между возбужденным синглетным и соответствующим триплетным состояниями состоят в следующем:

а) возбужденный электрон синглетного состояния имеет спин, параллельный электрону, с которым он был спарен; в триплетном состоянии два внешних электрона имеют один и тот же спин; триплетное состояние всегда обладает более низкой энергией, чем соответствующее синглетное состояние;

б) возбужденный электрон синглетного состояния имеет спин, параллельный электрону, с которым он был спарен; в триплетном состоянии два внешних электрона имеют антипараллельные спины; триплетное состояние всегда обладает более низкой энергией, чем соответствующее синглетное состояние;

в) возбужденный электрон синглетного состояния имеет спин, антипараллельный электрону, с которым он был спарен; в триплетном состоянии два внешних электрона имеют один и тот же спин; триплетное состояние всегда обладает более низкой энергией, чем соответствующее синглетное состояние;

г) возбужденный электрон синглетного состояния имеет спин, антипараллельный электрону, с которым он был спарен; в триплетном состоянии два внешних электрона имеют один и тот же спин; триплетное состояние всегда обладает более высокой энергией, чем соответствующее синглетное состояние.

2. Флуоресценцией называется

а) безызлучательный переход энергии из возбужденных состояний без изменения мультиплетности;

б) излучение, испускаемое при переходе между состояниями, имеющими одинаковую мультиплетность;

в) безызлучательные переходы между состояниями различной мультиплетности;

г) излучение, испускаемое при переходе между состояниями с различной мультиплетностью.

3. При каких длинах волн наблюдается спектр флуоресценции и фосфоресценции? Дайте объяснение.

а) триплетное состояние обладает более низкой энергией, чем соответствующее синглетное состояние, поэтому спектр фосфоресценции наблюдается при больших длинах волн, чем спектр флуоресценции;

б) триплетное состояние обладает более высокой энергией, чем соответствующее синглетное состояние, поэтому спектр фосфоресценции наблюдается при больших длинах волн, чем спектр флуоресценции;

в) триплетное состояние обладает более низкой энергией, чем соответствующее синглетное состояние, поэтому спектр фосфоресценции наблюдается при меньших длинах волн, чем спектр флуоресценции;

г) триплетное состояние обладает более низкой энергией, чем соответствующее синглетное состояние, поэтому спектр флуоресценции наблюдается при больших длинах волн, чем спектр фосфоресценции.

4. Внутренней конверсией называется:

а) излучение, испускаемое при переходе между состояниями, имеющую одинаковую мультиплетность;

б) излучение, испускаемое при переходе между состояниями с различной мультиплетностью;

в) безызлучательный переход энергии из возбужденных состояний без изменения мультиплетности;

г) излучение, испускаемое при переходе между состояниями с различной мультиплетностью.

5. Фосфоресценцией называется:

а) излучение, испускаемое при переходе между состояниями с различной мультиплетностью;

б) безызлучательные переходы между состояниями различной мультиплетности;

в) излучение, испускаемое при переходе между состояниями, имеющую одинаковую мультиплетность;

г) безызлучательный переход энергии из возбужденных состояний без изменения мультиплетности.

6. Интеркомбинационной конверсией называется:

а) излучение, испускаемое при переходе между состояниями, имеющую одинаковую мультиплетность;

б) безызлучательный переход энергии из возбужденных состояний без изменения мультиплетности;

в) излучение, испускаемое при переходе между состояниями с различной мультиплетностью;

г) безызлучательные переходы между состояниями различной мультиплетности.

7. При каких длинах волн наблюдается спектр поглощения и флуоресценции? Дайте объяснение.

а) спектр флуоресценции сдвинут в коротковолновую область по сравнению с полосами поглощения, т. к. энергия поглощенного кванта частично растрачивается на тепловые колебания;

б) спектр флуоресценции сдвинут в длинноволновую сторону по сравнению с полосами поглощения, т. к. энергия поглощенного кванта частично растрачивается на тепловые колебания, поэтому энергия флуоресценции меньше, чем энергия поглощения кванта света;

в) спектр флуоресценции сдвинут в коротковолновую сторону по сравнению с полосами поглощения, т. к. энергия поглощенного кванта частично растрачивается на тепловые колебания, поэтому энергия флуоресценции больше, чем энергия поглощения кванта света;

г) спектр флуоресценции сдвинут в длинноволновую сторону по сравнению с полосами поглощения, т. к. энергия поглощенного кванта меньше, чем энергия флуоресценции.

2. Ядерный магнитный резонанс

Спектроскопия магнитного резонанса отличается от других видов спектроскопии тем, что расщепление энергетических уровней осуществляется только в присутствии магнитного поля. Взаимодействие можно наблюдать, помещая образец одновременно в два магнитных поля: одно постоянное, другое радиочастотное (переменное). При определенном сочетании полей образец поглощает (или выделяет) энергию, что приводит к изменению сигнала на выходе высокочастотного усилителя и детектора.

К резонансным методам спектроскопии относятся ядерный магнитный резонанс (ЯМР) и электронный парамагнитный резонанс (ЭПР). Спектры ЯМР и ЭПР дают богатую структурную информацию, что делает их незаменимыми в химии, биологии, медицине.

Открытие ЯМР имеет весьма длинную и захватывающе интересную предысторию. Представления о том, что электрон и атомные ядра имеют собственные магнитные моменты, было введено в физику В. Паули (Нобелевская премия по физике в 1945 г.). Отто Штерн вместе с Вальтером Герлахом экспериментально подтвердили это в опытах с атомными и молекулярными пучками. Отто Штерн был удостоен Нобелевской премии по физике в 1943 г. с формулировкой: «за вклад в развитие метода молекулярных пучков, открытие и измерение магнитного момента протона». И. Раби активно и успешно развивал это направление. Он впервые наблюдал явление ЯМР в молекулярных пучках и получил Нобелевскую премию по физике в 1944 г. «за резонансный метод записи магнитных свойств атомных ядер». Нобелевская премия по физике в 1952 г. была присуждена двум американцам: Феликсу Блоху (Стенфордский университет) и Эдварду Перселлу (Гарвардский университет) «за развитие новых методов для точных ядерных магнитных измерений и связанные с этим открытия».

2.1. Теоретические основы метода

Принципы, на которых основана ЯМР-спектроскопия, весьма просты. Как известно, атомы состоят из атомных ядер и электронных оболочек. Каждое атомное ядро несет положительный заряд, кратный заряду ядра водорода (протона). Представим себе ядро в виде шарика, в котором более или менее равномерно распределен положительный заряд. Если предположить, что этот шарик вращается, то его заряд будет двигаться по круговой орбите вокруг оси вращения. Таким образом возникает круговой электрический ток. Известно, что электрический ток связан с магнитным полем. Следовательно, вращающееся ядро индуцирует магнитное поле, т. е. является магнитом. Ядра имеют собственный момент количества движения, который называется спином ядра (I). Магнетизм ядра количественно выражается магнитным моментом. Если атомное ядро имеет спин, то оно имеет также магнитный момент.

В ЯМР-спектроскопии определяют энергию, требующуюся для изменения направления магнитных ядер в магнитном поле. Экспериментально установлено, что не все атомные ядра имеют магнитный момент. Например, ядра ^{12}C , ^{16}O , ^{32}S и др. не обладают магнитными свойствами и не имеют спина — это ядра с четным числом нейтронов и протонов. Магнитными свойствами всегда обладают ядра с массой, выражаемой нечетным числом: ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{17}O , ^{19}F , ^{31}P и т. д., и ядра с массой, выражаемой четным числом, но с нечетным атомным номером (т. е. с нечетным числом протонов): ^2H (^2D), ^{10}B , ^{14}N и т. д. Спин ядра (I) с нечетным массовым числом равен нечетному целому числу, умноженному на $1/2$. Спин ядра с четным массовым числом, но нечетным числом протонов равен (1, 2, 3), как правило, единице.

Пример:

Ядро	^1H	^2D	^7Li	^{13}C	^{14}N	^{15}N	^{17}O	^{19}F	^{23}Na
Спин, I	$1/2$	1	$3/2$	$1/2$	1	$1/2$	$5/2$	$1/2$	$3/2$

Одним из распространенных ядер, сигналы которого применяются в методе ЯМР, является ядро водорода ^1H , спин которого равен $1/2$, и резонансные линии в спектрах растворов получают

узкими, что упрощает их интерпретацию. Ядро ${}^1\text{H}$ имеет самый высокий магнитный момент среди всех других ядер. Именно величина магнитного момента определяет интенсивность сигнала при одном и том же магнитном поле. Кроме того, естественное содержание ${}^1\text{H}$ в природе составляет почти 100 % (в отличие от ядер других атомов, способных к проявлению эффекта ЯМР). Мы будем рассматривать в основном ЯМР-спектры ядер водорода (${}^1\text{H}$). Они называются спектрами ПМР (протонного магнитного резонанса). ПМР основан на переориентации осей вращения ядер водорода. Протон и нейтрон имеют спин, равный $\frac{1}{2}$. Согласно квантовой механике ядра, взаимодействующие с внешним магнитным полем, имеют $2I+1$ возможных ориентаций и, следовательно, столько же энергетических уровней. Таким образом, если ядра водорода помещены в постоянное магнитное поле с напряженностью H_0 с направлением «Z», то они могут быть расположены только по направлению поля ($I_z = +\frac{1}{2}$) или против него ($I_z = -\frac{1}{2}$). Наиболее энергетически выгодным является направление, совпадающее с направлением поля (рис. 4).

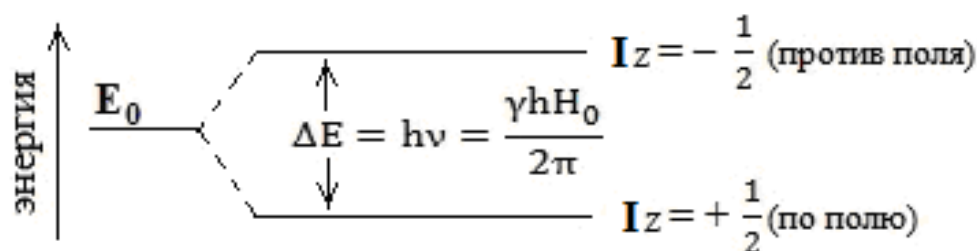


Рис. 4. Уровни энергии протона в магнитном поле (E_0 — энергия ядра в отсутствие поля)

Таким образом, магнитные ядра во внешнем (постоянном) магнитном поле могут находиться на разных магнитных энергетических уровнях, переходы между которыми должны сопровождаться поглощением или излучением энергии. Разность энергий между этими двумя состояниями (ΔE) должна быть пропорциональна напряженности поля H_0 , действующего на ядро:

$$\Delta E = \gamma h H_0 / 2\pi,$$

где h — постоянная Планка,

H_0 — напряженность постоянного магнитного поля,

γ — константа пропорциональности, характерная для каждого типа ядра (^1H , ^{13}C , ^{15}N и т. д.).

В ЯМР-спектроскопии определяется энергия, необходимая для изменения направления магнитных ядер в магнитном поле. При воздействии на систему ядер электромагнитного излучения (облучение радиоволнами, $\Delta E = h\nu$), соответствующего разности энергий соседних уровней, происходит изменение ориентации магнитных ядер вещества относительно направления внешнего поля. Если перпендикулярно направлению силовых линий сильного постоянного поля приложить относительно небольшое вращающееся магнитное поле и изменять его частоту, то при совпадении частот вращения поля и ядра будет наблюдаться явление резонанса, выражающееся в переориентации осей вращения ядер.

Вероятность переходов на верхний и нижний уровни одинакова. Однако число магнитных ядер, находящихся на каждом из уровней, различно: заселенность нижнего уровня выше, поскольку система всегда стремится перейти в состояние с более низкой энергией. Такая переориентация может быть легко зарегистрирована. Прибор регистрирует сигнал ПМР. В результате кривая поглощения энергии в зависимости от напряженности (H) имеет вид пика, максимум которого располагается в точке:

$$\nu = \gamma H_0 / 2\pi. \quad (2.1)$$

Обнаружение индуцированных переходов между ядерными магнитными уровнями с помощью облучения образца переменным магнитным полем называется **ядерным магнитным резонансом**.

Спектры ЯМР характеризуются следующими основными параметрами: химическим сдвигом, константой спин-спинового взаимодействия, шириной, формой и интегральной интенсивностью сигналов.

2.2. Химический сдвиг

Согласно уравнению (2.1) резонансный сдвиг протона должен иметь только одну характеристическую частоту для заданной напряженности поля. Однако в действительности резонансный

сигнал протона наблюдается при разных частотах, в зависимости от того, в каком химическом окружении он находится.

Сдвиг резонансных сигналов обусловлен тем, что ядра водорода в органических молекулах окружены электронами. Вращение электронов создает свое поле, которое накладывается на внешнее поле (H_0), действующее на ядро. Электроны экранируют ядро от внешнего магнитного поля, поэтому напряженность поля в непосредственной близости к ядру отличается от напряженности внешнего магнитного поля. В результате этого условие резонанса ядра выражается не уравнением (2.1), а уравнением (2.2):

$$\nu = \gamma H_0 (1 - \sigma) / 2\pi, \quad (2.2)$$

где σ — безразмерное число, называемое константой экранирования.

Расстояние между резонансными сигналами различных протонов называется *химическим сдвигом*. Абсолютный химический сдвиг (смещение сигнала по отношению к сигналу неэкранированного протона) экспериментально определить невозможно, поэтому химический сдвиг измеряется по отношению к сигналу эталонного вещества.

В качестве стандартов используют тетраметилсилан (ТМС) или гексаметилдисилоксан (ГМДС), которые удобны тем, что дают узкие и сильные резонансные сигналы в области, где поглощают только очень немногие виды протонов. Вводимый в раствор вещества эталон должен обладать низкой реакционной способностью, хорошей растворимостью и давать один четкий сигнал в спектре. Преимуществом ТМС $(CH_3)_4Si$ является положение резонансного сигнала в более сильном поле, чем у подавляющего большинства органических веществ, а также большое количество протонов на единицу массы (12 структурно эквивалентных сильно экранированных протонов), что позволяет использовать эталон в минимальных количествах.

Расстояние между сигналами образца и эталона зависит от напряженности приложенного поля или частоты. Химический сдвиг выражается в миллионных долях величины напряженности внешнего поля или резонансной частоты. Обозначается δ (дельта):

$$\delta = [(v - v_3) / v_0] \times 10^6 = [(H - H_3) / H_0] \times 10^6 \text{ [м. д.]},$$

где v — резонансная частота данного протона, [Гц — герц];

v_3 — резонансная частота протонов эталона, [Гц];

v_0 — рабочая частота прибора [МГц — мегагерц].

H — напряженность поля, при которой наблюдается резонанс данного протона [Гс — гаусс];

H_3 — напряженность поля, при которой наблюдается резонанс эталона [Гс];

H_0 — напряженность основного внешнего поля, [кГс — килогаусс].

Это отношение (безразмерная величина) имеет порядок 10^{-6} , поэтому для удобства умножают на 10^6 . Полученная единица измерения называется миллионная доля (м. д.). Химические сдвиги, выраженные в м. д., не зависят от условий съемки.

В протонном магнитном резонансе применяются две шкалы химических сдвигов: δ и τ . В шкале δ за нуль принимается сигнал тетраметилсилана и химические сдвиги увеличиваются в сторону слабого поля, т. е. в сторону уменьшения степени экранирования данного протона.

Спектр поглощения представляет собой зависимость интенсивности поглощения от величины δ . Обычно спектр выглядит как набор узких резонансных сигналов, соответствующих отдельным типам протонов. Важное значение имеет также интенсивность сигналов (площадь под сигналом), т. к. поглощение энергии при данной частоте пропорционально числу протонов, для которых при этой частоте наблюдается явление резонанса. Это позволяет установить, сколько протонов образуют каждый сигнал. Таким образом, спектр ПМР позволяет определить количество неэквивалентных типов протонов и число протонов данного типа. Для определения интенсивности сигналов современные приборы снабжены устройством для электронного интегрирования спектров, т. е. для записи интегральной кривой, преобразующей площади пиков в линейные отрезки.

Значения химических сдвигов относительно ТМС различных типов протонов приводятся в таблицах. Для ПМР, так же, как и для УФ- и ИК-спектроскопии, составлены атласы спектров.

Рассмотрим в качестве примера спектр ПМР уксусной кислоты (рис. 5). В спектре уксусной кислоты соотношение длин отрезков, соответствующих площади сигналов при $\delta = 2,0$ и $\delta = 11,5$ м. д., составляет 3:1. Это указывает на число атомов водорода: три эквивалентных протона метильной группы и один протон карбоксильной группы, сильно различающиеся по химическому сдвигу.

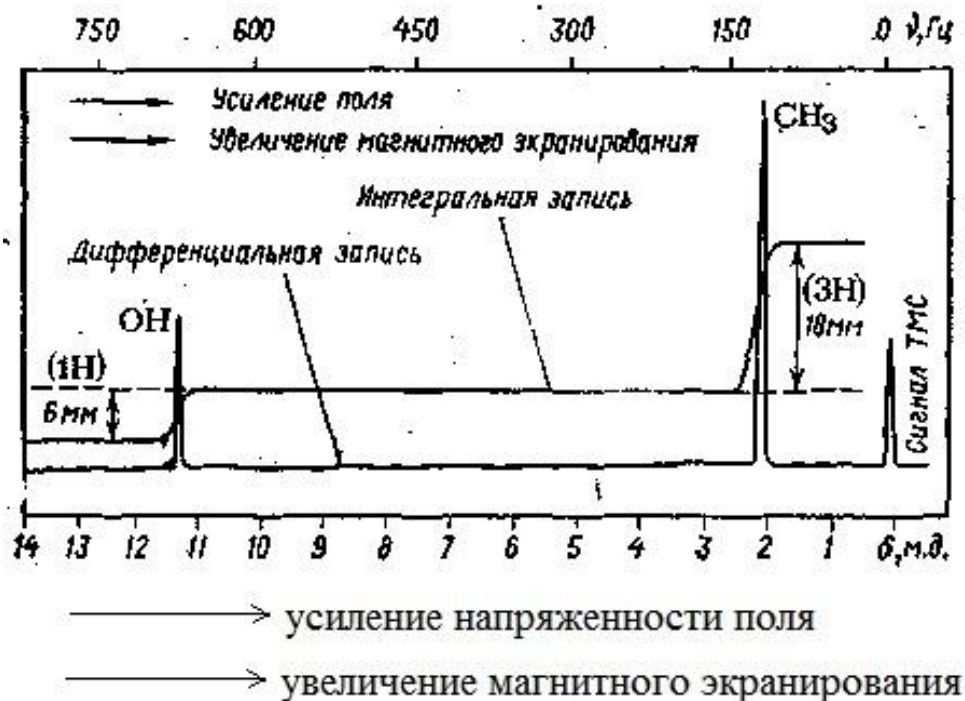


Рис. 5. ПМР-спектр уксусной кислоты

В шкале τ сигнал тетраметилсилана принят за 10: $\tau = 10 - \delta$. Значение химических сдвигов увеличивается в сторону сильного поля.

Химический сдвиг является основной характеристикой ПМР и зависит от структуры молекулы. На величину химического сдвига влияют: 1) электронная плотность у протона; 2) вторичные магнитные поля, возникающие в результате циркуляции электронов в соседних атомах и связях. Оба фактора непосредственно связаны со структурой молекулы. Электронная плотность у протонов определяется характером химической связи и индукционными эффектами окружающих групп, вследствие чего экранирование протонов будет различным и их сигналы появятся в разных областях спектра. Чем выше электронная плотность, тем больше её влияние на внешнее поле и, следовательно,

тем в более сильном поле проявится резонансный сигнал. Влияние этого фактора соответствует тому, что протон, обладающий более кислыми свойствами (с меньшей плотностью электронной оболочки) резонирует в более слабом поле.

Пример: сравним величины химических сдвигов протонов следующих группировок: $>CH-$, $-CH_2-$ и $-CH_3$ (из таблиц химических сдвигов протонов):

$-CH_2-CH<$	$-CH_2-CH_2-$	$-CH_2-CH_3$
$\delta = 1,5$ м. д.	$\delta = 1,3$ м. д.	$\delta = 0,9$ м. д.

На электронную плотность вблизи ядра существенно влияет индукционный эффект заместителя и присутствие соседних не-предельных группировок (эффект сопряжения). Например, атом хлора обладает отрицательным индукционным эффектом ($-I_S$). Галоген смещает электронную плотность на себя, что приводит к появлению резонансных сигналов протонов в более слабом поле:

$Cl-CH<$	$Cl-CH_2-$	$Cl-CH_3$
$\delta = 4,1$ м. д.	$\delta = 3,5$ м. д.	$\delta = 3,1$ м. д.

2.3. Спин-спиновое взаимодействие

Влияние на магнитное экранирование протона спина другого неэквивалентного протона, расположенного при соседнем углеродном атоме, называется **спин-спиновым взаимодействием**. Это явление приводит к усложнению спектра.

В общем случае, если данный протон взаимодействует с « n » эквивалентными протонами, находящимися у соседнего углеродного атома, то его резонансный сигнал должен состоять из $n+1$ компонент (линий поглощения).

$$\text{Мультиплетность сигнала} = n+1,$$

где n — число протонов при соседних атомах углерода.

Мультиплетность — это число линий в резонансном сигнале, которые появляются в результате спин-спинового расщепления.

Таким образом, в простейших случаях по мультиплетности сигнала в спектре ПМР можно определить число протонов при соседних углеродных атомах. Следовательно, спин-спиновое

взаимодействие дает дополнительную ценную информацию о строении исследуемого вещества.

Пример: если протон при соседнем углеродном атоме отсутствует (например, уксусная кислота), то спин-спиновое взаимодействие не проявляется. В спектре (рис. 5) возникает одиночный сигнал (одна линия) или синглет.

При наличии «соседних» протонов наблюдается расщепление сигналов.

Пример. Система $>CH_2 - CH -$ существует, например, в соединении $Cl_2CH - CH_2Cl$. Здесь два типа протонов «а» и «b». Сигнал эквивалентных протонов метиленовой группы (а) расщепится на два компонента (линии) равной интенсивности, т. е. превратится в дублет. Сигнал от протона (b) расщепится на три линии с соотношением интенсивностей 1:2:1, т. е. будет иметь форму триплета.

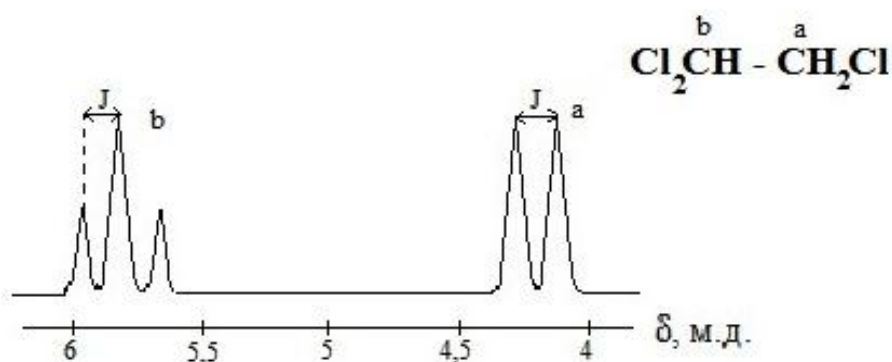


Рис. 6. Система $>CH_2 - CH -$
 J — константа спин-спинового взаимодействия

Константы спин-спинового взаимодействия (J) можно различать по знаку как положительные или отрицательные в зависимости от относительной энергетической выгоды той или иной взаимной ориентации ядерных спинов во внешнем магнитном поле. Константы спин-спинового взаимодействия тяжелых элементов меняются по абсолютной величине от нуля до нескольких тысяч. Величины расщеплений сигналов в спектрах ПМР, т. е. константы спин-спинового взаимодействия используются для идентификации соединений, для определения положения заместителя, наряду с химическим сдвигом.

Химические сдвиги протонов при наличии спин-спинового расщепления определяются расстоянием от центра мультиплета

до сигнала эталона. Спектр ПМР соединения с брутто-формулой $C_2H_3Cl_2$ можно описать так: Д ($\sim 4,2$ м. д.) – CH_2 ; Т ($\sim 5,8$ м. д.) – CH .

Пример. Система $>CH - CH_3$ реализуется, например, в соединении $Cl_2CH - CH_3$. По аналогии с описанным выше, сигнал от трёх протонов метиловой группы (а) будет представлять собой дублет. Сигнал протона (b) расщепится на четыре компонента и будет представлять собой квинтет с соотношением интенсивностей 1:3:3:1.

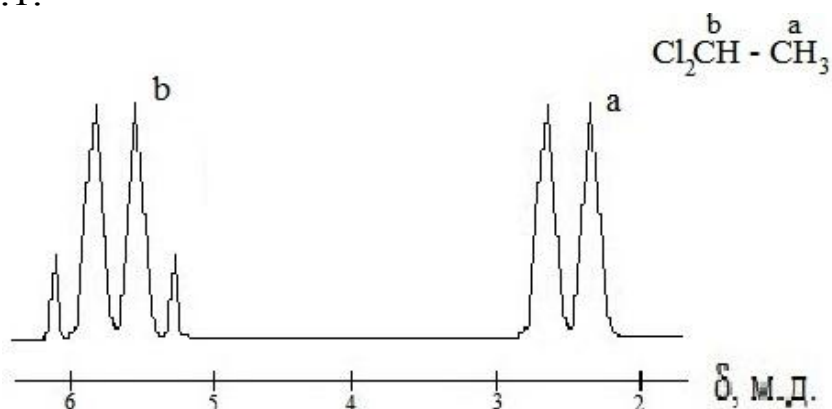


Рис. 7. Система $>CH - CH_3$

Распределение интегральных интенсивностей линий в мультиплете представлено в таблице.

Таблица

Распределение интегральных интенсивностей линий

Вид сигнала	Число линий	Распределение интенсивностей
Синглет	1	1
Дублет	2	1 : 1
Триплет	3	1 : 2 : 1
Квартет (квадруплет)	4	1 : 3 : 3 : 1
Квинтет	5	1 : 4 : 6 : 4 : 1
Секстет	6	1 : 5 : 10 : 10 : 5 : 1
Септет	7	1 : 6 : 15 : 20 : 15 : 6 : 1

Аналогичным образом может быть рассчитана форма сигналов в более сложных спин-спиновых системах. В том случае, когда взаимодействие протонов происходит с несколькими группами не-

эквивалентных протонов, мультиплетность сигнала определяется произведением мультиплетностей, которые характерны для каждой из групп, $(n+1)(m+1)$. Интенсивности крайних компонентов больших мультиплетов ($n > 5$) часто бывают настолько малы, что находятся на уровне шумов и в реальных спектрах неразличимы.

Таким образом, спектр ПМР дает нам пять основных аналитических критериев: 1) общее число сигналов (число типов неэквивалентных протонов); 2) интенсивность сигналов (число протонов каждого данного типа); 3) химический сдвиг (положение протона в молекуле); 4) мультиплетность сигнала (число протонов при соседних углеродных атомах); 5) константы спин-спинового взаимодействия (особенности расположения протонов в пространстве: цис-, транс-формы; о-, м-, п-замещение в ароматическом кольце). Указанные критерии позволяют получить ценные сведения о строении вещества.

Спектроскопия ЯМР является одним из наиболее информативных используемых в настоящее время физико-химических методов исследования структуры веществ.

2.4. Измерение спектров протонного магнитного резонанса

В ЯМР-спектроскопии на исследуемое вещество действуют одновременно два магнитных поля: одно постоянное, а другое — радиочастотное. Образец помещают в датчик спектрометра между полюсными наконечниками магнита (рис. 8).

Магнит вызывает расщепление энергетических уровней магнитных ядер, т. е. создает необходимые условия для поглощения радиочастотного излучения. Радиочастотный генератор возбуждает переменное магнитное поле, перпендикулярное к постоянному полю. При определенном соотношении этих полей наступает резонансное поглощение энергии, которое регистрируется радиочастотным детектором. Условия резонанса можно достичь либо изменением напряженности постоянного магнитного поля, либо изменением частоты генератора. На практике используется первый принцип.

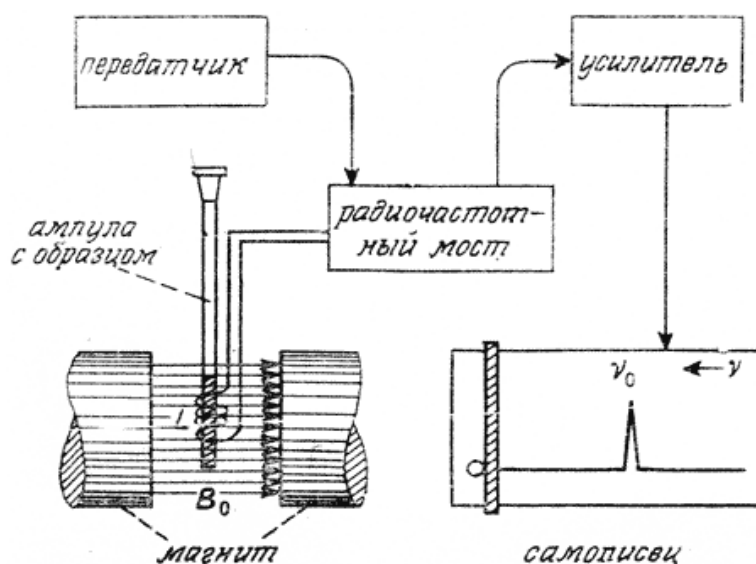


Рис. 8. Принципиальная схема простейшего ЯМР-спектрометра

В настоящее время в зависимости от целей исследования используются спектрометры протонного магнитного резонанса с рабочей частотой от 100 до 500 МГц. В последние годы все шире используются импульсные спектрометры ЯМР с преобразованием Фурье, использование которых открывает новые возможности перед исследователями, особенно в области повышения чувствительности.

Вещество в первую очередь должно растворяться в выбранном растворителе. Растворители для ПМР-спектроскопии не должны содержать протонов, это может быть четыреххлористый углерод (CCl_4), сероуглерод (CS_2) или дейтерированные растворители. Для неполярных соединений почти всегда можно использовать CCl_4 , а для полярных соединений подходит хлороформ (CHCl_3 , резонансный сигнал $\delta = 7,23$ м. д.). Лучше использовать дейтерированный хлороформ для избежания наложения сигнала обычного хлороформа на ароматические протоны химических соединений. Если продукт не растворяется в хлороформе, используют другие дейтерированные растворители: диметилсульфоксид- d_6 , ацетон- d_6 , ацетонитрил- d_3 , бензол- d_6 и D_2O . Измерения, проводимые в различных растворителях или с использованием различных стандартов, приводят к одним и тем же результатам, если отсутствуют специфические взаимодействия между растворителем и стандартом или исследуемым продуктом.

Измерение ПМР-спектров органических соединений, полученных на приборах без накопителей сигналов, проводится для растворов достаточно высокой концентрации (5–20 %). Исследуемый продукт растворяют в растворителе и помещают в ампулу. В качестве стандарта выбирают тетраметилсилан (ТМС), гексаметилдисилоксан (ГМДС), а используются циклогексан, метилхлорид или бензол. Стандарт может быть внутренним (непосредственно добавляется в анализируемый раствор) или внешним, когда стандарт находится в коаксиальном капилляре, расположенном внутри исследуемого образца.

Влияние на качество спектров, а именно на наблюдаемую ширину и релаксационные свойства образца, оказывает вязкость растворителя. Можно разделить растворители для ЯМР-спектроскопии на вязкие (бензол, ДМФА, ДМСО, пиридин, толуол и вода) и невязкие (ацетон, ацетонитрил, хлороформ, хлористый метилен и метанол). Достаточно высокое разрешение можно получить только в невязких растворителях, например в ацетоне.

Качественные спектры регистрируют только на веществах, свободных от твердых частиц и от взвешенной пыли, поэтому необходимо проводить фильтрование растворов образца непосредственно при их переносе в ампулу.

2.5. Применение ПМР

1. Качественный анализ.

Вскоре после открытия явления ЯМР в конденсированных средах стало ясно, что ЯМР будет основой мощного метода исследования строения вещества и его свойств. Действительно, исследуя спектры ЯМР, мы используем в качестве резонирующей систему ядер, чрезвычайно чувствительных к магнитному окружению. Локальные же магнитные поля вблизи резонирующего ядра зависят от внутри- и межмолекулярных эффектов, что и определяет ценность этого вида спектроскопии для исследования строения и поведения молекулярных систем.

В настоящее время трудно указать такую область естественных наук, где бы в той или иной степени не использовался ЯМР. Методы спектроскопии ЯМР широко применяются в химии, молекулярной физике, биологии, агрономии, медицине, при изуче-

нии природных образований (слюд, янтаря, полудрагоценных камней, горючих минералов и другого минерального сырья), т. е. в таких научных направлениях, в которых исследуются строение вещества, его молекулярная структура, характер химических связей, межмолекулярные взаимодействия и различные формы внутреннего движения.

2. Количественный анализ. При использовании ЯМР как метода количественного анализа нет необходимости в чистом образце определяемого вещества. Однако используется какое-либо индивидуальное вещество в качестве внутреннего стандарта.

3. Применение ЯМР в биологии и медицине.

В настоящее время получены спектры ЯМР многих белков; используется для наблюдения за структурными изменениями, сопровождающими функционирование белков. Метод ЯМР широко используется для изучения состояния воды в разнообразных биологических объектах.

В ЯМР-спектрометрах магнитное поле стараются сделать как можно более однородным, это нужно для улучшения спектрального разрешения. Но если магнитное поле внутри образца, наоборот, сделать очень неоднородным, это открывает принципиально новые возможности для использования ЯМР. Неоднородность поля создается так называемыми градиентными катушками, которые работают в паре с основным магнитом. В этом случае величина магнитного поля в разных частях образца будет разная, а это значит, что сигнал ЯМР можно наблюдать не от всего образца, как в обычном спектрометре, а только от его узкого слоя, для которого соблюдаются резонансные условия, т. е. нужное соотношение магнитного поля и частоты. Меняя величину магнитного поля (или, что по сути то же самое, частоту наблюдения сигнала), можно менять слой, который будет давать сигнал.

Таким образом, можно «просканировать» образец по всему объему и «увидеть» его внутреннюю трехмерную структуру, не разрушая образец каким-либо механическим способом. К настоящему времени разработано большое число методик, позволяющих измерять различные параметры ЯМР (спектральные характеристики, времена магнитной релаксации, скорость самодиффузии и некоторые другие) с пространственным разрешением внутри образца.

Самое интересное и важное с практической точки зрения применение ЯМР-томографии нашлось в медицине. В этом случае исследуемым «образцом» является человеческое тело. ЯМР-томография является одним из самых эффективных и безопасных (но также и дорогих) диагностических средств в различных областях медицины, от онкологии до акушерства.

Вопросы для собеседования

1. Ядра, имеющие магнитный момент.
2. Теоретические основы метода.
3. Химический сдвиг. Эталонное вещество. Факторы, влияющие на величину химического сдвига.
4. Спин-спиновое взаимодействие.
5. Аналитические параметры ПМР-спектра.
6. Приборы. Применение ПМР.

Тестовые задания

1. В ЯМР-спектроскопии определяют:
 - а) напряженность поля;
 - б) энергию поля;
 - в) магнитную восприимчивость;
 - г) магнитную индукцию.
2. Химический сдвиг определяется по формуле:
 - а) $\delta = (\Delta\nu/\nu_0) \cdot 10^6 = (\Delta H/H_0) \cdot 10^6$;
 - б) $\delta = (\Delta\nu/\nu_0)$;
 - в) $\delta = (\Delta H/H_0)$;
 - г) $\delta = (\Delta\nu/\nu_0)/(\Delta H/H_0)$.
3. Вклад в константу экранирования, влияющий на значения химического сдвига, обусловлен:
 - а) парамагнитной составляющей;
 - б) диамагнитной составляющей;
 - в) разницей составляющих;
 - г) суммой составляющих.
4. Структура соединения в ЯМР-спектроскопии устанавливается по следующим основным характеристикам:
 - а) мультиплетностью;
 - б) химическим сдвигом;
 - в) интегральной интенсивностью;
 - г) всеми перечисленными.
5. Положение сигнала протона гидроксильной группы в ЯМР-спектре зависит
 - а) от мультиплетности групп;
 - б) концентрации, температуры;

- в) числа протонов продукта;
- д) рабочей частоты спектрометра.

6. В ПМР-спектре смеси циклогексана, тетраметилсилана и бензола содержатся три пика при $\delta = 0$; 7,27; и 1,4 м. д. Определите, какой сигнал относится к какому растворителю:

а) 0 м. д. — циклогексан; 1,4 м. д. — тетраметилсилан; 7,27 м. д. — бензол;

б) 1,4 м. д. — циклогексан; 0 м. д. — тетраметилсилан; 7,27 м. д. — бензол;

в) 7,27 м. д. — циклогексан; 0 м. д. — тетраметилсилан; 1,4 м. д. — бензол;

г) 7,27 м. д. — циклогексан; 7,27 м. д. — тетраметилсилан; 0 м. д. — бензол.

7. В ПМР-спектре наблюдается система сигналов, относящихся к алифатическому соединению: дублет и квартет. Определите сочетание групп:

- а) $-\text{CH}_2 - \text{CH}_2 -$; б) $-\text{CH}=\text{CH}_2$; в) $-\text{CH} - \text{CH}_3$; г) $\text{CH}_3 - \text{CH}_3$.

8. В ПМР-спектре наблюдаются три синглета при химических сдвигах δ , равных 7,27; 7,33; 2,5 м. д. Установлено, что это смесь из трех растворителей. Выберите растворители:

а) гексаметилдисилоксан, хлороформ; ацетон;

б) бензол, хлороформ, ацетон;

в) хлороформ, диметилформамид, бензол;

г) ацетон, этиловый спирт, бензол.

9. Гомоядерной называется система, образованная:

а) только протонами; в) протоном и фтором;

б) протоном и углеродом; г) протоном и азотом.

10. На качество спектров оказывает влияние следующее свойство растворителя:

а) вязкость;

б) показатель преломления;

в) сольватационные свойства;

г) вязкость, сольватационные свойства.

3. Метод электронного парамагнитного резонанса

Теория магнитного резонанса применима не только к ядрам, но и к электронам, поскольку они также имеют спин (S) и магнитный момент. Явление электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) было открыто в 1944 г. Е. К. Завойским в Казани. Этот метод в основном применяется для свободных радикалов (частицы, имеющей неспаренный электрон).

3.1. Принцип метода

Нескомпенсированный магнитный момент неспаренного электрона делает всю молекулу парамагнитной. При отсутствии внешнего магнитного поля магнитные моменты неспаренных электронов ориентированы хаотически.

В общем случае разрешены всего $2S + 1$ значений магнитного квантового числа (M_s). Если образец помещается во внешнее постоянное магнитное поле, то энергетический уровень электрона со спином $S = 1/2$ расщепляется на два подуровня. Магнитный момент неспаренного электрона может ориентироваться либо параллельно по отношению к внешнему магнитному полю ($S = -1/2$, при этом энергия электронов уменьшается) или антипараллельно ($S = +1/2$, энергия возрастает).

Поскольку электрон имеет отрицательный заряд, его магнитный момент направлен противоположно спиновому моменту, а не в том же направлении, как для ядра. Электронное спиновое квантовое число, в отличие от случая ядер, для нижнего уровня равно $S = -1/2$ (рис. 9).

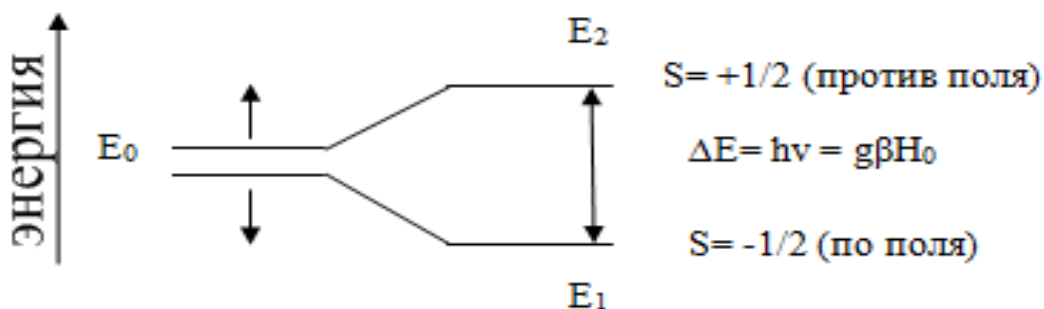


Рис. 9. Энергетические уровни электрона в магнитном поле

Разность энергетических уровней составляет:

$$\Delta E = E_2 - E_1 = g\beta H_0,$$

где g — безразмерная постоянная, так называемый g -фактор (для свободного электрона $g_e = 2,002322$);

β — магнетон Бора;

H_0 — напряженность внешнего магнитного поля.

Наложим теперь на образец, помимо постоянного (H_0), и переменное магнитное поле с частотой ν , перпендикулярное постоянному полю. Допустим, подействуем монохроматическим электромагнитным излучением ($E = h\nu$).

При условии $h\nu = g\beta H_0$ (условие резонанса) происходит поглощение квантов излучения и переориентация спинов, т. е. переход из нижнего энергетического состояния в верхнее (резонансное поглощение энергии переменного поля) и наоборот. Заселенность нижнего уровня выше, чем заселенность верхнего состояния. В силу этого количество переходов снизу вверх больше числа переходов сверху вниз. Это явление называется **электронным парамагнитным резонансом**.

Таким образом, если частота переменного магнитного поля попадает в диапазон энергии частиц, то энергия поглощается, и мы снимаем кривую поглощения. Спектр ЭПР представляет зависимость интенсивности поглощения I от напряженности магнитного поля. По техническим причинам на ЭПР-спектрографах регистрируют не сам спектр поглощения, а его первую производную от напряженности внешнего магнитного поля (рис. 10).

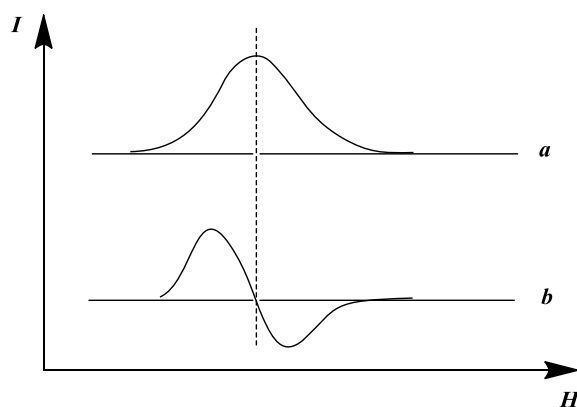


Рис. 10. Спектр ЭПР:

a — линия поглощения; b — первая производная от напряженности внешнего магнитного поля

Так как линии ЭПР поглощения широки, то первая производная дает лучшее представление о характере спектра.

Ось абсцисс — величина напряженности постоянного магнитного поля (H), которая плавно меняется при постоянной частоте СВЧ-поля до достижения значений, соответствующих условию резонансного поглощения (максимум). Значение первой производной равно нулю в точке максимума резонансного сигнала.

3.2. Параметры спектров ЭПР

При анализе свободных радикалов учитывают следующие параметры спектров ЭПР.

1. Положение линии поглощения в спектре (g -фактор, зависит от электронной структуры окружения).

Магнитное поле, действующее на электрон, может отличаться от приложенного поля ввиду того, что последнее индуцирует локальные поля. Измерение положения линии в спектре позволяет определить g -фактор, а т. к. он зависит от электронного строения парамагнитных частиц, можно сделать некоторые выводы о структуре. Характерные значения g -фактора у органических и неорганических радикалов позволяют проводить идентификацию этих частиц.

2. Ширина полосы поглощения.

Форма линий зависит от характера движения радикалов, т. к. она определяется процессами релаксации. Ширина сигнала определяется двумя видами взаимодействия.

А. Спин-решеточное взаимодействие — процесс обмена энергией между системой спинов и решеткой, т. е. средой, в которой находятся парамагнитные частицы.

Безызлучательные переходы между двумя состояниями спинов, сопровождающие взаимодействие с окружением, называют **спин-решеточной релаксацией**. Характеристикой этих процессов является так называемое время спин-решеточной релаксации (T_1), которое отражает среднее время жизни данного спинового состояния.

Ширина линии поглощения обусловлена тем, что вследствие процессов релаксации состояние спина имеет определенное время жизни, что вызывает уширение резонансного сигнала. Вели-

чина T_1 сильно зависит от температуры, увеличиваясь при замораживании. Чем больше T_1 , тем уже линия.

Б. Спин-решеточная релаксация не единственный процесс, определяющий ширину линии. Существуют процессы, вызывающие изменения относительных энергий спиновых состояний за счет обмена энергией в самой системе спинов. Это так называемые *процессы спин-спинового взаимодействия*, которые характеризуются временем спин-спиновой релаксации (T_2). Чем больше T_2 , тем уже линия. Эффект уширения исчезает с увеличением подвижности радикалов.

3. Сверхтонкая структура (СТС) спектров ЭПР.

Надо учитывать, что электрон движется в поле ядер, а они имеют свой магнитный момент. Магнитные моменты ядер, входящих в состав радикальной частицы, создают локальные поля, которые складываются с внешним полем H_0 и тем самым влияют на линии ЭПР, вызывая их расщепление.

Взаимодействие магнитных моментов неспаренных электронов с магнитными моментами ядер — это *сверхтонкое взаимодействие*, которое приводит к расщеплению линий и появлению сверхтонкой структуры в спектрах ЭПР.

В органических радикалах такими ядрами являются, как правило, протоны. Так, суммарное магнитное поле, действующее на неспаренный электрон в случае влияния одного протона, будет расщеплять каждый энергетический уровень на два подуровня. В спектре ЭПР будет наблюдаться уже не одна, а две полосы поглощения. Если влияют два эквивалентных протона, то полос будет три с соотношением интенсивностей 1:2:1, а если протонов три, то полос четыре с соотношением интенсивностей 1:3:3:1.

В случае « n » эквивалентных протонов в спектре ЭПР будут наблюдаться ($n+1$) линии.

Помимо протонов к сверхтонкому расщеплению спектра ЭПР приводит взаимодействие неспаренного электрона с другими ядрами. В общем случае если в радикале содержится « n » эквивалентных ядер, обладающих ядерным спином (I), то число компонентов сверхтонкой структуры определяется по формуле:

$$N_{СТС} = 2nI + 1.$$

Например, одно взаимодействие неспаренного электрона с ядром азота N^{15} , имеющим $I=1$, приводит к появлению в спектре ЭПР трех линий.

4. Интенсивность линии поглощения.

Интенсивность линии поглощения прямо связана с концентрацией парамагнитных частиц в образце: площадь под кривой поглощения пропорциональна концентрации неспаренных электронов. Обычно для определения концентрации используют сравнение сигналов ЭПР исследуемого образца и эталона с известным количеством парамагнитных частиц.

3.3. Спектрометры ЭПР

Резонансное поглощение можно наблюдать, изменяя частоту электромагнитного излучения при постоянстве напряженности магнитного поля или напряженность при постоянстве частоты. Так же, как и в ЯМР-спектрометре из практических соображений применяют второй способ регистрации резонансного поглощения.

Спектрометр ЭПР (рис. 9) состоит из электромагнита, создающего стабильное магнитное поле; источника радиочастотного излучения; системы, позволяющей подвести радиочастотное излучение к образцу и зарегистрировать резонансное поглощение; системы усиления и обработки сигнала.

В качестве источников постоянного магнитного поля применяют электромагниты. В спектрометрах ЭПР содержатся схемы, позволяющие проводить линейное и плавное изменение напряженности поля с заданной скоростью и в заданном диапазоне.

Источниками радиочастотного излучения служат специальные генераторные лампы (*клистроны*). Питание клистронов осуществляется от стабилизированных источников, с тем чтобы избежать изменений частоты генерируемого излучения.

Для передачи СВЧ-излучения к образцу используют *волноводы* — металлические трубки определенного сечения. Электромагнитное излучение от клистрона проходит по волноводу в полый *резонатор*. Резонатор расположен между полюсами электромагнита, и именно в нем помещен образец. Назначение резонатора состоит в концентрировании на образце энергии излучения, приходящего от клистрона по волноводам. Чаще всего при-

меняют цилиндрические или прямоугольные резонаторы. В цилиндрические резонаторы образцы обычно помещают в тонких капиллярах, а в прямоугольных используют плоские кюветы. В условиях, когда в образце имеют место переходы между электронными спиновыми уровнями, энергия излучения поглощается и на детектор падает меньше энергии. Обычно сигнал ЭПР можно наблюдать на осциллографе или регистрировать на ленте самописца (получают первую производную линии поглощения).

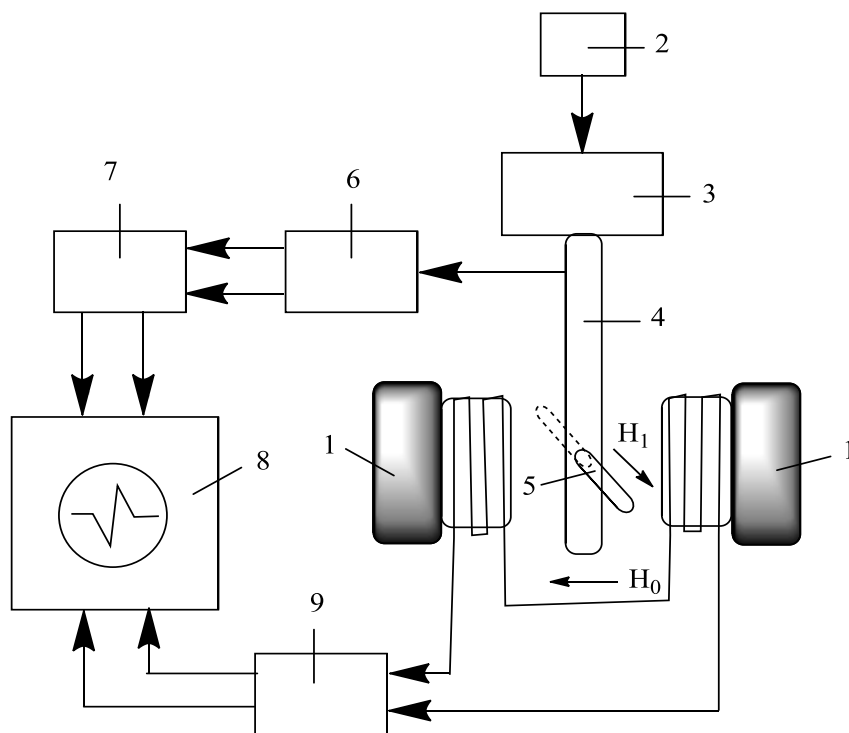


Рис. 9. Блок-схема спектрометра ЭПР:

H_0 — постоянное магнитное поле; H_1 — переменное магнитное поле, перпендикулярное постоянному полю; 1 — электромагнит; 2 — питание клистрона; 3 — клистрон; 4 — волновод; 5 — резонатор; 6 — детектор; 7 — усилитель; 8 — осциллограф; 9 — генератор качающейся частоты

3.4. Применение ЭПР-спектроскопии

Метод ЭПР приобрел большое значение в химии, физике, биологии, медицине, поскольку позволяет определять структуры и концентрации органических и неорганических свободных

радикалов. Свободные радикалы могут быть созданы химическим методом, фотохимически или при действии излучения высокой энергии.

Спектр ЭПР дают свободные радикалы, молекулы с нечетным числом электронов, триплетные состояния органических молекул, парамагнитные ионы переходных металлов и их комплексы.

Метод ЭПР начал применяться в биологических исследованиях в 1950-е гг. Благодаря довольно высокой чувствительности и возможности в определении природы парамагнитных частиц этот метод нашел широкое применение для изучения целого ряда биологических процессов.

Помимо сигналов свободных радикалов в тканях наблюдается целый ряд сигналов металлов (Fe, Cu, Mn, Ni, Co). Эти металлы входят в состав металлопротеинов, принимающих участие в целом ряде ферментативных процессов. Железосодержащие белки (цитохромы, ферредоксины) являются компонентами электрон-транспортных цепей в митохондриях и хлоропластах.

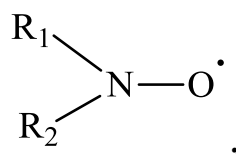
Методом ЭПР исследован целый ряд ферментативных систем, обнаружены свободно-радикальные продукты субстратов. В ряде случаев оказалось возможным наблюдать за окислительно-восстановительными превращениями ионов металлов, входящих в активный центр фермента.

ЭПР-спектроскопия широко применяется в исследованиях фотосинтеза: изучается механизм первичных стадий разделения зарядов в реакционных центрах и дальнейший перенос электрона по цепи электронного транспорта.

Помимо изучения механизмов реакций, протекающих с участием парамагнитных частиц, метод ЭПР широко используют и для исследования структурно-динамических свойств макромолекул и биомембран.

В последнее время для изучения биологических и полимерных систем часто используются методы «парамагнитного зонда», «спиновых меток» и «спиновых ловушек». Все они основаны на использовании стабильных азотнокислых радикалов различного строения, а точнее на анализе изменений ширины линий спектров ЭПР, вызванных вращательной и поступательной диффузией этих радикалов.

Основная идея метода спиновых меток и зондов состоит в присоединении к той или иной функциональной группе белка свободного радикала и изучению характеристик его сигналов ЭПР. Наиболее удобны в этом отношении нитроксильные радикалы, содержащие свободнорадикальную группу:



где R_1 и R_2 — различные химические группировки.

Метод «спиновых меток» заключается в том, что к непарамагнитной молекуле стабильный радикал прикрепляется ковалентной или какой-либо другой связью так, чтобы свободная валентность оказалась незатронутой. Характер движения отчетливо проявляется в форме спектра и служит важным источником информации об исходной молекуле.

Если молекула встраивается в белковую молекулу и там удерживается с помощью электростатических сил или гидрофобных взаимодействий, то такая молекула называется **спиновым зондом**. Метод основан на исследовании вращательной и поступательной подвижности радикала-зонда в водных или органических средах или в матрице полимера. Подвижность радикала зависит от подвижности молекул окружающей среды, поэтому радикал является своеобразным молекулярным датчиком структурной и динамической информации о локальном окружении.

Форма сигнала ЭПР, даваемого спиновой меткой или зондом, зависит от микроокружения нитроксильного радикала, в первую очередь от вращательной подвижности той группы, в состав которой он входит.

Основной недостаток спиновых меток и зондов заключается в том, что, хотя эти молекулы и невелики, включаясь в липидный бислой, они несколько изменяют его свойства.

В основе метода **«спиновых ловушек»** лежит реакция специально вводимой в исследуемую систему непарамагнитной молекулы (ловушки) с короткоживущим радикалом, при этом образуется стабильный радикал. Кинетическое поведение образующего-

ся стабильного радикала и его структура дают сведения о кинетике и механизме процессов в изучаемой системе.

Объектами исследования в химии с применением ЭПР-спектроскопии являются: 1) свободные радикалы в промежуточных продуктах органических реакций; 2) кинетика реакций; 3) химия поверхностных явлений; 4) разрушение, происходящее в результате облучения; 5) полимеризация, обусловленная свободными радикалами; 6) свободные радикалы, замороженные при низких температурах; 7) металлы переменной валентности и их комплексы.

Метод ЭПР эффективен в исследовании кинетики и механизмов химических реакций. Во-первых, измерение ширины линий в спектрах ЭПР можно использовать для определения констант скорости процессов с участием парамагнитных частиц, характеристическое время жизни которых лежит в интервале 10^{-5} – 10^{-10} с. Во-вторых, метод ЭПР позволяет регистрировать с высокой чувствительностью в разных условиях парамагнитные частицы, что дает ценную информацию о механизмах реакций. В-третьих, спектрометр ЭПР можно использовать как аналитический прибор для детектирования в ходе реакций концентрации реагирующих парамагнитных молекул. Количество парамагнитных центров в образце пропорционально площади под спектром поглощения.

Метод ЭПР широко используется для исследования быстрых процессов, связанных с изменением молекулярной структуры радикалов. Эти процессы включают заторможенное вращение и конформационные переходы.

Для короткоживущих радикалов чувствительность метода может быть повышена путем использования проточной системы или непрерывного облучения. Спектры ЭПР нестабильных радикалов можно получить, зафиксировав их в стеклах, матрицах замороженных благородных газов или кристаллах.

Вопросы для собеседования

1. Теоретические основы метода ЭПР.
2. Аналитические параметры ЭПР-спектра.
3. Спектрометры ЭПР.
4. Применение ЭПР.

Тестовые задания

1. Условие резонанса в методе ЭПР:

а) $\nu = \gamma H_0 (1 - \sigma) / 2\pi$;

б) $\delta = (\Delta H / H_0)$;

в) $h\nu = g\beta H_0$;

г) $\delta = (\Delta\nu / \nu_0) / (\Delta H / H_0)$.

2. В момент резонанса в методе ЭПР:

а) происходит поглощение квантов излучения, переориентации спинов не происходит;

б) происходит поглощение квантов излучения и переориентации спинов, т. е. переход из нижнего энергетического состояния в верхнее и наоборот. Количество переходов снизу вверх больше числа переходов сверху вниз;

в) происходит поглощение квантов излучения и переориентации спинов, т. е. переход из нижнего энергетического состояния в верхнее и наоборот. Количество переходов сверху вниз больше числа переходов снизу вверх.

3. Параметры спектров ЭПР:

а) g-фактор, ширина полосы поглощения, интенсивность линии поглощения;

б) общее число сигналов, интенсивность сигналов, химический сдвиг, мультиплетность сигнала;

в) g-фактор, ширина полосы поглощения, интенсивность линии поглощения, СТС спектров ЭПР.

4. Масс-спектрометрия

Данный метод принципиально отличается от спектроскопических методов. Методы масс-спектрометрии основаны на ионизации вещества, разделении ионов, согласно отношению (m/z), и регистрации массы образующихся осколков.

Теоретические и экспериментальные основы масс-спектрометрии были заложены еще Д. Д. Томсоном, который впервые в 1912 г. создал прибор для получения масс-спектра положительных ионов. Однако его прибор имел низкое разрешение. Его ученик Ф. Астон в 1918 г. существенно повысил разрешение и на своем приборе открыл изотопы элементов. Практически одновременно с Ф. Астоном в Чикаго А. Демпстер сконструирован первый масс-спектрометр, в котором анализатором служило поперечное магнитное поле, а ионные токи измерялись электрическими методами. Схема его используется и в современных приборах.

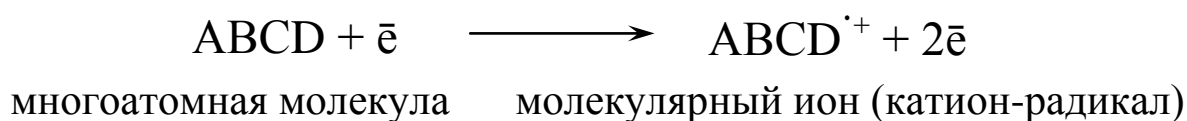
Ионизация молекул должна проводиться в таких условиях, при которых образовавшийся ион вне зависимости от метода ионизации не претерпевал бы никаких столкновений с другими молекулами или ионами. Это необходимо для установления взаимосвязи между свойствами иона и молекулы.

4.1. Методы ионизации

Ионизация может проводиться различными методами.

1. Метод ионизации электронным ударом (ЭУ)

Это наиболее распространенный метод получения ионов в связи с простотой и доступностью источников ионов и их высокой эффективностью. Допустим, что через пары вещества проходит поток электронов, энергию которых можно постепенно увеличивать. Если эта энергия достигнет определенного уровня, то при столкновении электрона с молекулой может произойти «выбивание» из нее электрона с образованием молекулярного иона:



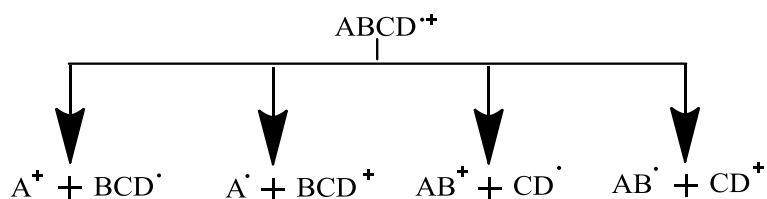
Наименьшая энергия бомбардирующих электронов, при которой возможно образование из данной молекулы иона, называется *энергией ионизации вещества*. Энергия ионизации является мерой прочности, с какой молекула удерживает наименее связанный с ней электрон. Для органических молекул энергия ионизации составляет $9 \div 12$ эВ.

Если энергия электронов значительно превышает энергию ионизации, то образующийся молекулярный ион получает избыточную энергию, которой может оказаться достаточно для разрыва в нем связей. Происходит распад молекулярного иона на частицы меньшей массы (фрагменты). Такой процесс называется *фрагментацией*. В практике масс-спектрометрии используются электроны с энергией $30 \div 100$ эВ, что обеспечивает фрагментацию молекулярного иона.

Молекулярные ионы — это такие ионы, массы которых равны массе ионизируемой молекулы. К сожалению, нет прямых методов определения структуры ионов. Поэтому часто используют предположение о тождественности структуры молекулярного иона (M^{+}) и нейтральной молекулы (M). Вероятность образования молекулярного иона больше для простых, малых молекул. С увеличением числа атомов в молекуле увеличивается вероятность фрагментации молекулярного иона.

Известны два основных типа фрагментации молекулярного иона — диссоциация и перегруппировка.

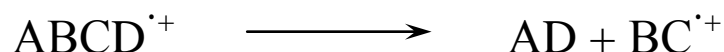
Диссоциация — распад молекулярного иона с сохранением последовательности связей. В результате процесса образуются катион и радикал:



Диссоциация углеводородов приводит к фрагментам с нечетными значениями отношения m/z .

Перегруппировка сопровождается изменением последовательности связей, в результате чего образуется новый катион-

радикал меньшей массы и нейтральная устойчивая молекула (H_2O , CO , CO_2 и т. д.):



Перегруппировка углеводородов и кислородсодержащих соединений приводит к фрагменту с четным значением отношения m/z . Измерение массы образующихся осколков и их относительного количества позволяет получить ценную информацию о строении органических соединений.

Рассмотрим устройство масс-спектрометра (рис. 10). Масс-спектрометр должен содержать узлы для выполнения следующих функций: 1) ионизации пробы, 2) ускорения ионов электрическим полем, 3) распределения ионов согласно отношению m/z , 4) детектирования ионов по соответствующему электрическому сигналу.

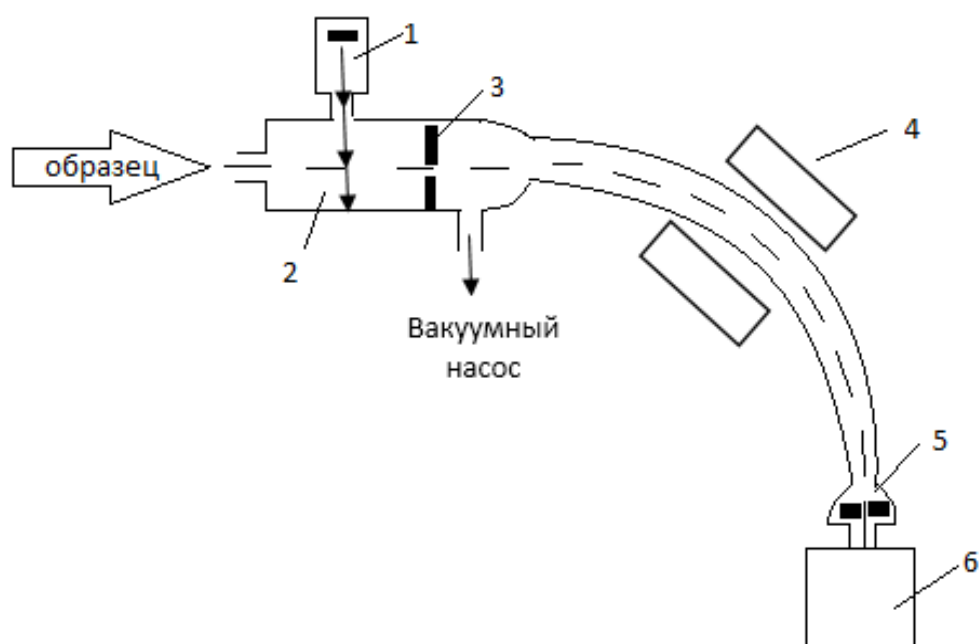


Рис.10. Устройство масс-спектрометра:

- 1 — источник электронов; 2 — ионизационная камера;
- 3 — ускорительные пластины (отрицательный потенциал);
- 4 — магнит; 5 — щель; 6 — коллектор ионов (детектор ионов)

Для получения масс-спектра пары вещества небольшими количествами с помощью специальной системы напуска вводятся в ионизационную камеру (2), где поддерживается глубокий ваку-

ум (давление 10^{-6} мм рт. ст.). Молекулы вещества бомбардируются потоком электронов, излучаемых раскаленным катодом (1). Образующиеся ионы выталкиваются из ионизационной камеры небольшой разностью потенциалов (3). Получаемый поток ионов ускоряется, фокусируется сильным электрическим полем и попадает в магнитное поле (4).

В результате бомбардировки молекул вещества электронами образуются частицы, имеющие положительный или отрицательный заряд, а также нейтральные частицы. При прохождении потока частиц через магнитное поле нейтральные частицы не изменяют направления, а положительные и отрицательные отклоняются в разные стороны. Величины отклонения ионов пропорциональны заряду и обратно пропорциональны их массе.

Каждый отдельный ион, характеризуемый конкретной величиной m/z , при данной напряженности магнитного поля движется по собственной траектории. Интервал сканирования масс можно изменять, варьируя либо напряженностью магнитного поля, либо потенциалом электрического поля.

В обычной масс-спектрометрии принято регистрировать только частицы, имеющие положительный заряд, т. к. при бомбардировке молекул электронами положительно заряженных ионов обычно больше, чем отрицательно заряженных. Если необходимо изучать и отрицательно заряженные ионы, следует изменить знак потенциала ускорения (ускорительные пластины).

Если на выходе ионов из магнитного поля установить регистрирующее устройство, то частицы, различающиеся значениями m/z , будут давать отдельные сигналы. Интенсивность сигналов будет пропорциональна количеству частиц с данным значением m/z . Интенсивность сигналов определяется как их высота, выраженная в мм. Высота пика с максимальной интенсивностью принимается за 100 % (базовый пик), интенсивность остальных пиков пересчитывается пропорционально и выражается в процентах.

С ростом отношения m/z разница в отклонении магнитным полем частиц, различающихся на одну атомную единицу массы, уменьшается. В связи с этим важной характеристикой масс-спектрометров является их *разрешающая способность (R)*, определяющая максимальную массу ионов, различающихся

на одну атомную единицу массы (для которой прибор разделяет пики не менее чем на 90 %):

$$R = M / \Delta M,$$

где M — максимальная масса, для которой перекрывание пиков менее 10 %; ΔM — одна атомная единица массы.

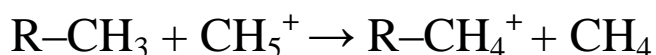
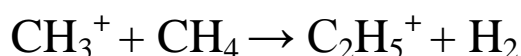
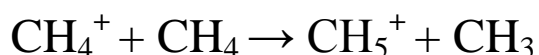
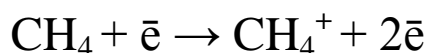
Стандартные приборы имеют $R \approx 5000/1$, а для приборов с двойной фокусировкой потока ионов $R \approx 10000/1$ и даже больше. Такие приборы способны уловить разницу в молекулярной массе ионов до 0,0001. Масс-спектрометр с двойной фокусировкой может легко разделить пики ионов с одинаковыми номинальными величинами молекулярных масс, но разным элементарным составом. Например, может различить N_2 (28,0061), CO (27,9949), и C_2H_4 (28,0313).

Установление эмпирической формулы по данным масс-спектров — задача не простая, но ее можно решить, используя подходящий алгоритм. Для получения масс-спектра требуется ничтожно малое количество вещества — около 1 мкг.

2. Химическая ионизация (ХИ)

В этом методе образец до облучения пучком электронов разбавляют большим избытком «газа-реагента». Вероятность первичных ионизирующих столкновений между электронами и молекулами образца после этого настолько мала, что первичные ионы образуются почти исключительно из молекул реагента. В качестве реагентов обычно используют газы с низкой молекулярной массой, например, CH_4 , изо- C_4H_{10} , NH_3 и инертные газы (Ar , He). Вторичные ионы образуются в результате переноса атома водорода или электрона.

Если газом-реагентом служит метан, то реакции протекают в такой последовательности:



где R-CH₃ — молекула исследуемого вещества.

Исследования показали, что частицы CH₅⁺ и C₂H₅⁺ в сумме составляют около 90 % ионов, присутствующих в этой системе. Масс-спектры, получаемые после химической ионизации, намного проще, содержат меньше пиков, и поэтому их часто легче интерпретировать.

3. Ионизация электрическим полем

Ионизация этим методом достигается на электродах в виде острия или тонкой проволоки. Под влиянием сильного неоднородного поля происходит переход электрона от молекулы к аноду за 10⁻¹² с и образуется положительный ион-радикал. Обычно при ионизации электрическим полем не происходит значительной фрагментации и наблюдают в основном молекулярные ионы.

4. Масс-спектрометрия вторичных ионов

В этом методе твердый образец обрабатывают пучком ионов от внешнего источника. Образование ионов любого знака может происходить по различным механизмам. Во-первых, исходная молекула (M) может присоединиться к заряжаемому атому металлического субстрата (Ag⁺), образуя металлоорганическую частицу (Ag+M)⁺. Во-вторых, молекула может ионизироваться в процессе электронного перехода с образованием ион-радикалов (M^{•+} или M^{•-}).

5. Бомбардировка быстрыми атомами

В этом случае облучающий поток состоит из нейтральных атомов, а не из ионов. Ионы имеют возможность реагировать с нейтральными атомами или вторичными электронами, так что они теряют свой заряд и сохраняют момент количества движения. Подходящий пучок образуют атомы аргона, но более высокую чувствительность достигают при использовании более дорогого ксенона. Метод бомбардировки быстрыми атомами весьма успешно применяется при изучении сложных молекул, соединений, участвующих в биохимических процессах, и лекарственных средств.

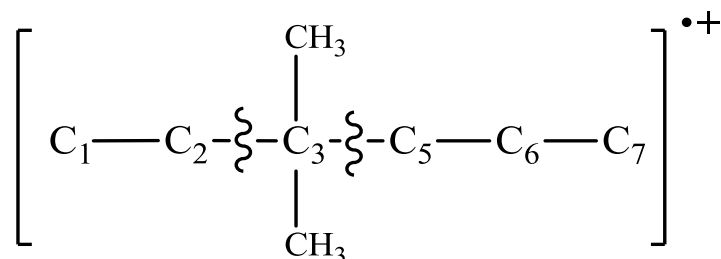
4.2. Закономерности фрагментации

Распад молекулярного иона осуществляется всегда значительно легче, т. к. он менее стабилен по сравнению с исходной молекулой. С ростом длины и особенно разветвленности цепи углеводородного радикала увеличивается число вероятных направлений распада молекулярного иона и соответственно уменьшается интенсивность его пика.

Дальнейший ход расшифровки масс-спектра основывается на закономерностях фрагментации. Предполагаемый путь фрагментации проверяют анализом положений пиков неустойчивых ионов.

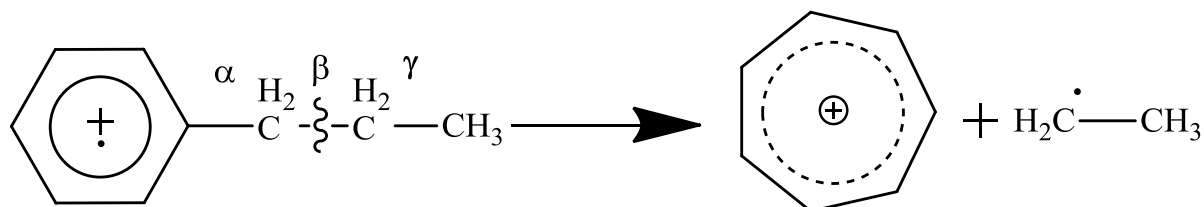
Примером установленных закономерностей фрагментации являются следующие схемы разрыва связей.

1. В разветвленных углеводородах наиболее вероятен разрыв связей у места ветвления:

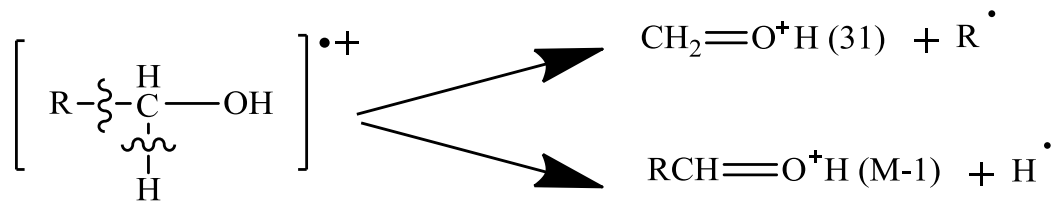


2. Вероятность разрыва связи С–Н уменьшается с увеличением цепи углеводорода. Энергия разрыва связи С–С меньше, поэтому сначала происходит ее разрыв.

3. В ароматических производных наиболее вероятен разрыв β-связи с образованием перегруппировочного тропилиевого иона (C_7H_7^+) по схеме:

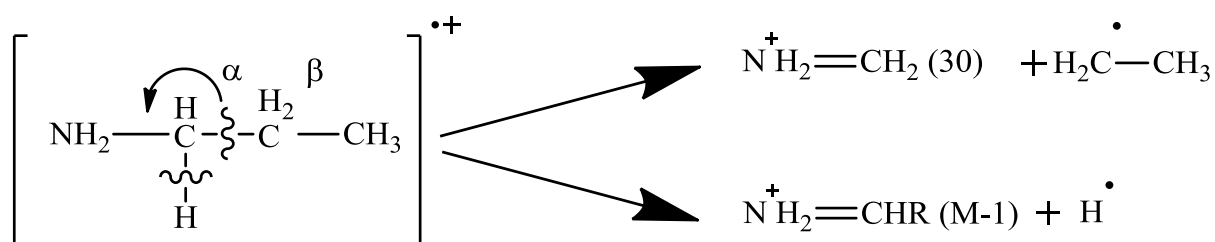


4. В масс-спектрах спиртов характерными осколочными ионами являются фрагменты с массами 31 и M-1, которые соответствуют следующей схеме разрыва связей:

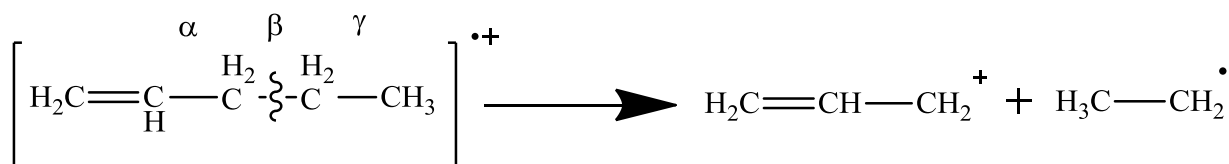


Предполагают, что при образовании ионов происходит стабилизация за счет образования кратной связи $\text{CH}_2=\text{O}^+\text{H}(31)$ или $\text{RCH}=\text{O}^+\text{H}(M-1)$.

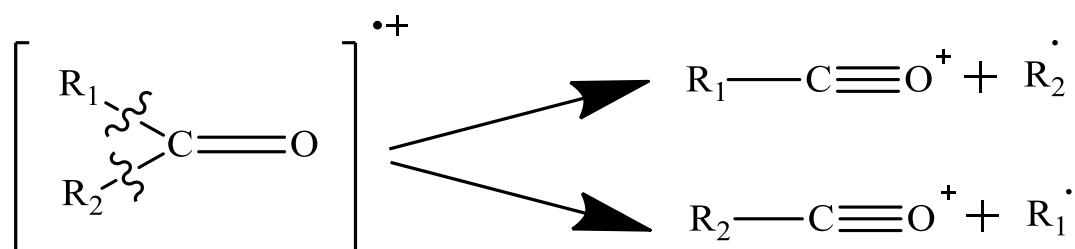
5. Для аминов $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{R}$ характерен разрыв связи с образованием иона $\text{N}_2\text{H}=\text{CH}_2$ (30). Значительным по интенсивности также является пик для иона $\text{H}_2\text{N}^+=\text{CHR}$ (M-1):



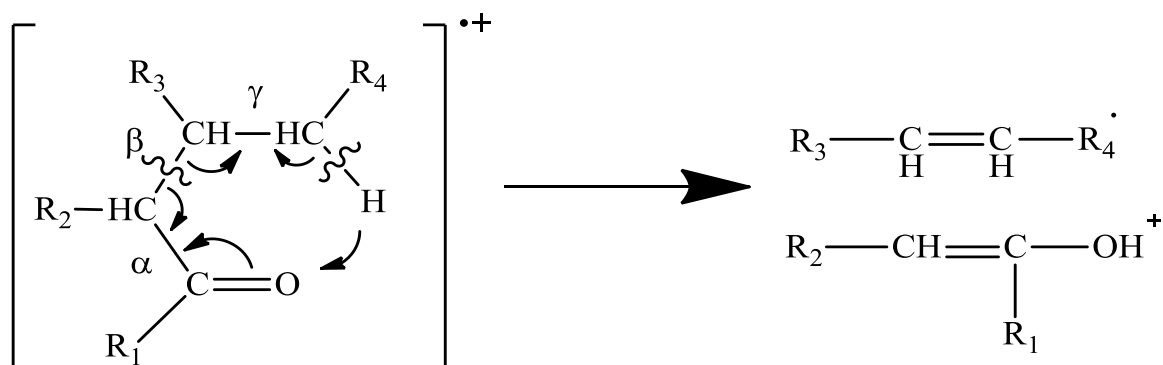
6. В непредельных системах углеводородная цепь разрывается в β -положении к двойной связи и образуется устойчивый аллильный радикал:



7. Масс-спектр кетонов содержит сигналы ионов и радикалов:



Если алкильная цепь содержит три атома углерода или более, то происходит разрыв β -связи и далее перегруппировка с участием атома водорода:



Подобные и более детальные закономерности установлены для многих классов соединений. Они позволяют в определенной мере объяснить и предсказать фрагментацию молекулярных ионов и на основании масс-спектра установить химическое строение молекул.

4.3. Возможности масс-спектрометрии

По масс-спектру можно определить молекулярную массу вещества. Это необходимо для установления молекулярной формулы вещества (брутто-формулы). Масса атома, измеренная с высокой точностью, отличается от массового числа. Так, для CO_2 и C_3H_8 массовое число равно 44, но их точные относительные молекулярные массы равны соответственно 43,989828 и 44,062600, т. е. разница составляет 0,072772 а. е. м. Масс-спектрометр позволяет разделить пучки ионов CO_2^+ и C_3H_8^+ , когда они получаются одновременно.

Определение атомного состава по точному значению массы проводится с использованием таблиц точных масс для различных соотношений числа атомов С, Н, О и N как наиболее распространенных элементов. Точное измерение масс не заменяет элементного анализа. Оба метода взаимно дополняют друг друга.

При исследовании масс-спектра дополнительно к определению типа молекулярного иона (M^+) измеряют пики и для изотопных ионов, включающих более легкие или более тяжелые изотопы (с массовыми числами $\text{M} \pm 1$, $\text{M} \pm 2$, $\text{M} \pm 3$ и т. п.). Одновременное наличие нескольких изотопов в молекуле маловероятно, т. к. естественная распространенность более тяжелых изотопов С, Н, О и N незначительна. Например, $^{13}\text{C} : ^{12}\text{C} = 1 \times 10^{-2}$;

$^2\text{H} : ^1\text{H} = 1,6 \times 10^{-4}$; $^{15}\text{N} : ^{14}\text{N} = 4 \times 10^{-3}$ и т. д.

Однако для хлора $^{35}\text{Cl} : ^{37}\text{Cl} = 3:1$; для брома $^{79}\text{Br} : ^{81}\text{Br} = 1:1$. Следовательно, в масс-спектре наряду с ионом M^+ будет присутство-

вать ион $(M+1)^+$ с интенсивностью, пропорциональной распространенности изотопов. В широко используемых справочных таблицах приводятся обычно соотношения интенсивностей пиков молекулярных ионов с массовыми числами $M+1$ и $M+2$.

Максимальное значение m/z в масс-спектре вещества может иметь молекулярный ион (M^+), масса которого равна молекулярной массе исследуемого соединения. Интенсивность пика молекулярного иона (M^+) тем выше, чем этот ион стабильнее.

Практически редко удается установить полную структуру соединения только на основе масс-спектра. Наиболее эффективно совместное использование нескольких физико-химических методов. Масс-спектрометрия, особенно в сочетании с хроматографией, является одним из наиболее информативных методов исследования структуры вещества (хроматомасс-спектрометрия).

Таким образом, возможности метода: определение молекулярной массы и брутто-формулы веществ; установление строения вещества по характеру образующихся фрагментов; количественный анализ смесей, включая определение микропримесей; определение степеней чистоты вещества; определение изотопного состава вещества.

Рассмотрим в качестве примера масс-спектр этанола (рис. 11). Обычно спектр представляют в виде гистограмм.

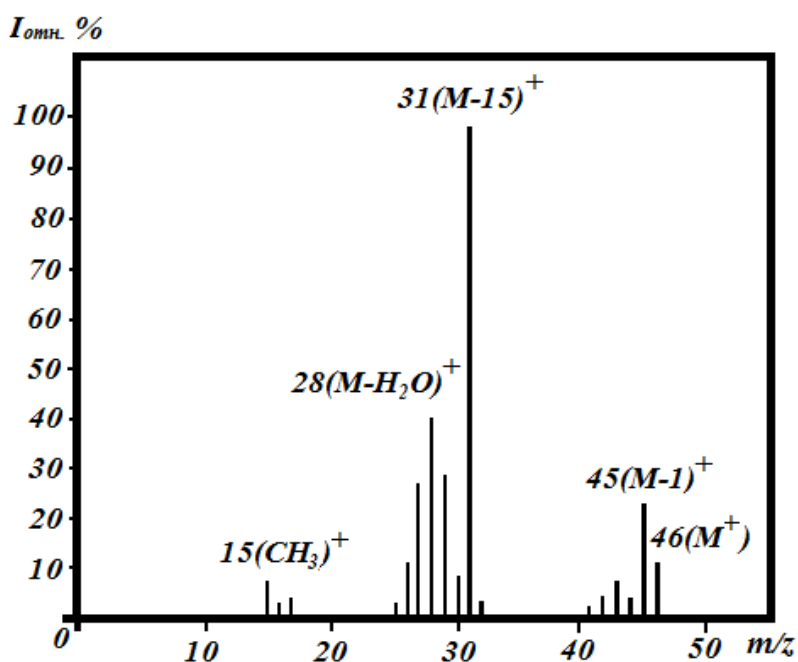


Рис. 11. Масс-спектр этанола

В современных приборах обработка интенсивности электрических импульсов, соответствующих пикам с различающимися значениями m/z , производится с помощью компьютера.

Масс-спектры приводят в такой записи: указывают значения m/z , а в скобках относительную интенсивность (%). Например, для этанола:

C_2H_5OH -масс-спектр (m/z): 15(9), 28(40), 31(100), 45(25), 46(14).

Вопросы для собеседования

1. Теоретические основы метода.
2. Энергия ионизации. Типы фрагментации.
3. Принципиальная схема масс-спектрометра.
4. Методы ионизации: электронный удар, химическая ионизация и др.
5. Закономерности фрагментации молекулярного иона.
6. Возможности масс-спектрометрии.

Тестовые задания

1. Типы фрагментации молекулярного иона:

а) диссоциация — распад молекулярного иона с сохранением последовательности связей. В результате процесса образуются катион и радикал, образуются фрагменты с четными значениями отношения m/z ;

перегруппировка — изменение последовательности связей, образуется новый катион-радикал меньшей массы и нейтральная устойчивая молекула, фрагменты характеризуются нечетным значением отношения m/z ;

б) перегруппировка — распад молекулярного иона с сохранением последовательности связей. В результате процесса образуются катион и радикал, образуются фрагменты с нечетными значениями отношения m/z ;

диссоциация — изменение последовательности связей, образуется новый катион-радикал меньшей массы и нейтральная устойчивая молекула, фрагменты характеризуются четным значением отношения m/z ;

в) диссоциация — распад молекулярного иона с сохранением последовательности связей. В результате процесса образуются катион и радикал, образуются фрагменты с нечетными значениями отношения m/z ;

перегруппировка — изменение последовательности связей, образуется новый катион-радикал меньшей массы и нейтральная устойчивая молекула, фрагменты характеризуются четным значением отношения m/z .

2. Возможности метода масс-спектрометрии:

а) определение молекулярной массы и брутто-формул веществ, количественный анализ смесей;

б) установление строения вещества по характеру образующихся фрагментов, определение изотопного состава вещества;

в) определение молекулярной массы и брутто-формул веществ; установление строения вещества по характеру образующихся фрагментов; количественный анализ смесей, включая определение микропримесей; определение степеней чистоты вещества; определение изотопного состава вещества.

3. Выберите правильный ответ:

а) вероятность разрыва связи C–H уменьшается с увеличением цепи углеводорода; энергия разрыва связи C–C меньше; в ароматических производных наиболее вероятен разрыв β -связи с образованием перегруппировочного тропилиевого иона;

б) вероятность разрыва связи C–H уменьшается с увеличением цепи углеводорода; энергия разрыва связи C–C больше; в ароматических производных наиболее вероятен разрыв β -связи с образованием перегруппировочного тропилиевого иона;

в) вероятность разрыва связи C–H уменьшается с увеличением цепи углеводорода; энергия разрыва связи C–C меньше; в ароматических производных наиболее вероятен разрыв α -связи с образованием перегруппировочного тропилиевого иона.

Список рекомендуемой литературы

1. Казин, В. Н. Физико-химические методы исследования в экологии и биологии : учеб. пособие / В. Н. Казин, Г. А. Урванцева. — Ярославль : ЯрГУ, 2002.
2. Аналитическая химия и физико-химические методы анализа : в 2 т. / Н. В. Алов и др. ; под ред. А. А. Ищенко. — М. : Академия, 2012.
3. Васильев, В. П. Аналитическая химия. Кн. 2 : Физико-химические методы анализа / В. П. Васильев. — М. : Дрофа, 2007.
4. Харитонов, Ю. Я. Аналитическая химия / Ю. Я. Харитонов. — М. : Высшая школа, 2008. — Кн. 1 ; кн. 2.
5. Отто, М. Современные методы аналитической химии : в 2 т. / М. Отто. — М. : Техносфера, 2008.
6. Основы аналитической химии / под ред. Ю. А. Золотова. — М. : Высшая школа, 2004.
7. Васильев, В. П. Аналитическая химия. Кн. 2 : Физико-химические методы анализа / В. П. Васильев. — М. : Дрофа, 2009.
8. Казин, В. Н. Физико-химические методы анализа : лабораторный практикум / В. Н. Казин, Т. Н. Орлова, И. В. Тихонов. — Ярославль : ЯрГУ, 2011.

Оглавление

Введение.....	3
1. Люминесцентные методы анализа: флуоресценция и фосфоресценция	4
1.1. Теоретические основы люминесценции.....	4
1.2. Параметры люминесценции и основные законы люминесценции.....	10
1.3. Практическое применение люминесцентной спектроскопии	12
Вопросы для собеседования	13
Тестовые задания.....	13
2. Ядерный магнитный резонанс	16
2.1. Теоретические основы метода	17
2.2. Химический сдвиг	19
2.3. Спин-спиновое взаимодействие.....	23
2.4. Измерение спектров протонного магнитного резонанса	26
2.5. Применение ПМР	28
Вопросы для собеседования	30
Тестовые задания.....	30
3. Метод электронного парамагнитного резонанса.....	32
3.1. Принцип метода.....	32
3.2. Параметры спектров ЭПР	34
3.3. Спектрометры ЭПР	36
3.4. Применение ЭПР-спектроскопии	37
Вопросы для собеседования	40
Тестовые задания.....	41
4. Масс-спектрометрия	42
4.1. Методы ионизации	42
4.2. Закономерности фрагментации	48
4.3. Возможности масс-спектрометрии	50
Вопросы для собеседования	52
Тестовые задания.....	52
Список рекомендуемой литературы.....	54

Учебное издание

Казин Вячеслав Николаевич

Физико-химические методы анализа

Учебно-методическое пособие

Редактор, корректор М. Э. Левакова
Верстка М. Э. Леваковой

Подписано в печать 30.06.16. Формат 60×84 1/16.

Усл. печ. л. 3,25. Уч.-изд. л. 2,5.

Тираж 4 экз. Заказ

Оригинал-макет подготовлен
в редакционно-издательском отделе ЯрГУ

Ярославский государственный университет
им. П. Г. Демидова.

150000, Ярославль, ул. Советская, 14.