

ІІТМО

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРОДУКТОВ ОРГАНИЧЕСКОГО СИНТЕЗА



Санкт-Петербург
2026

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

УНИВЕРСИТЕТ ИТМО

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРОДУКТОВ ОРГАНИЧЕСКОГО СИНТЕЗА

УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКОЕ ПОСОБИЕ

РЕКОМЕНДОВАНО К ИСПОЛЬЗОВАНИЮ В УНИВЕРСИТЕТЕ ИТМО
по направлению подготовки 18.04.02

в качестве Учебно-методического пособия для реализации основных
профессиональных образовательных программ высшего образования магистратуры

ИТМО

Санкт-Петербург

2026

Методы исследования продуктов органического синтеза / Морозов Н.А., Карцев Д.Д., Талена Т.Ш. [и др.] – СПб: Университет ИТМО, 2026. – 65 с.

Рецензент: Масалович Мария Сергеевна, кандидат химических наук, доцент научно-образовательного центра Инфохимии, научный сотрудник лаборатории интеллектуальных технологий в инфохимии.

В учебно-методическом пособии рассмотрены основы хроматографии и спектральных методов исследования, их физические принципы, области применения и приборная реализация. Предназначено для студентов магистратуры, обучающихся по направлению 18.04.02 «Энерго- и ресурсосберегающие процессы в химической технологии, нефтехимии и биотехнологии», включает контрольные вопросы и рекомендации для углубленного изучения.

ИТМО

ИТМО (Санкт-Петербург) – национальный исследовательский университет, научно-образовательная корпорация. Альма-матер победителей международных соревнований по программированию. Приоритетные направления: IT и искусственный интеллект, фотоника, робототехника, квантовые коммуникации, трансляционная медицина, Life Sciences, Art&Science, Science Communication.

Лидер федеральной программы «Приоритет-2030», в рамках которой реализуется программа «Университет открытого кода». С 2022 ИТМО работает в рамках новой модели развития – научно-образовательной корпорации. В ее основе академическая свобода, поддержка начинаний студентов и сотрудников, распределенная система управления, приверженность открытому коду, бизнес-подходы к организации работы. Образование в университете основано на выборе индивидуальной траектории для каждого студента.

ИТМО пять лет подряд – в сотне лучших в области Automation & Control (кибернетика) Шанхайского рейтинга. По версии SuperJob занимает первое место в Петербурге и второе в России по уровню зарплат выпускников в сфере IT. Университет в топе международных рейтингов среди российских вузов. Входит в топ-5 российских университетов по качеству приема на бюджетные места. Рекордсмен по поступлению олимпиадников в Петербурге. С 2019 года ИТМО самостоятельно присуждает ученые степени кандидата и доктора наук.

© Университет ИТМО, 2026

© Морозов Н.А., Карцев Д.Д., Талена Т.Ш.,
Кривошапкина Е.Ф., Морозов М.И. 2026

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
РАЗДЕЛ 1. ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ РАЗДЕЛЕНИЯ	6
1.1 Разновидности хроматографии	7
1.2 Жидкостная хроматография	8
1.2.1 Высокоэффективная жидкостная хроматографии (ВЭЖХ)	8
1.2.2 Тонкослойная хроматография (ТСХ)	11
1.3 Газовая хроматография	13
1.3.1 Подача газа-носителя	13
1.3.2 Пробоподготовка и системы ввода	14
1.3.3 Система разделения компонентов	15
1.3.4 Детекторы газовой хроматографии	18
Контрольные вопросы	22
Рекомендуемая литература	23
РАЗДЕЛ 2. СПЕКТРАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА	24
2.1 Общие сведения и классификация.	24
2.2 Спектроскопия инфракрасного излучения	25
2.3 Спектроскопия комбинационного рассеяния	31
2.4 Спектроскопия видимого и ультрафиолетового диапазона	37
2.5 Спектрофлуориметрия	40
Контрольные вопросы	46
Рекомендуемая литература	47
РАЗДЕЛ 3 СПЕКТРОСКОПИЯ ЯДЕРНОГО МАГНИТНОГО РЕЗОНАНСА (ЯМР)	49
3.1 Физические основы метода	49
3.2 Количественный и качественный анализ. Химический сдвиг.	51
3.3 Факторы, влияющие на качественные и количественные характеристики ЯМР-спектров.	55
3.4 Пробоподготовка	61
Контрольные вопросы	63
Рекомендуемая литература	65

ВВЕДЕНИЕ

Органические соединения повсеместно присутствуют в нашей жизни и окружающем мире. Их широкое многообразие и практическая значимость обуславливает высокий исследовательский интерес не только в сфере органической химии, но и в ряде смежных областей, включая нефтегазовую индустрию, фармацевтику, биотехнологию, пищевое производство и многие другие.

Характерной особенностью органических соединений является их сложное молекулярное строение, связанное с практически неограниченной возможностью углерода образовывать длинные разветвлённые цепочки ковалентных связей. Эта особенность приводит к значительному разнообразию всевозможных органических веществ. Сложное молекулярное строение органических веществ обуславливает большое количество реакционных центров и, как следствие, возможных продуктов химических реакций. На практике, в процессе органического синтеза образуется многокомпонентная смесь продуктов с различным химическим составом или строением.

Для *выделения чистого продукта* используются разнообразные физико-химические методы разделения органических веществ. В их основу заложен принцип использования различия свойств разделяемых веществ. К таким методам относятся перегонка (различие в температуре кипения), возгонка (различие в силе межмолекулярного взаимодействия), перекристаллизация (различие в растворимости), хроматография (различие в адсорбционном и абсорбционном взаимодействии с субстратом) и другие. Среди перечисленных методов *хроматография* является наименее производительным способом, но обеспечивает наиболее высокую чистоту разделяемых продуктов. Благодаря этой особенности она получила широкое применение как в лабораторных исследованиях, так и в производственной сфере, включая фармацевтику, парфюмерию и другие отрасли, требующие высокого качества анализа и чистоты получаемых продуктов.

Анализ продуктов органического синтеза является предметом особого рассмотрения. Его целью является выяснение не только количественного химического состава, но и характерных структурных особенностей анализируемых соединений. Это связано с возможностью существования различных структурных изомеров и стереоизомеров. Поэтому особое место в анализе продуктов органического синтеза занимают *спектральные методы*, наиболее чувствительные к молекулярному строению (квантовым состояниям молекул, атомов и ядер). К их числу относятся *спектрофотометрические методы*, в основу которых заложен принцип измерения поглощения либо рассеяния света при прохождении через образец. При этом различают *спектроскопию* в ультрафиолетовом, видимом и инфракрасном диапазоне. Существуют также методы, основанные на анализе испускаемого излучения характерного диапазона, к числу которых относится *спектрофлуориметрия*. Наиболее информативным методом для определения структуры органических

соединений является *спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР)*. На сегодняшний день ЯМР является «золотым стандартом» структурной характеристики органических соединений.

В настоящем учебно-методическом пособии рассмотрены основы хроматографических методов разделения продуктов органического синтеза и представлены основные спектральные методы их анализа, включая физические основы, способы применения и приборную реализацию. Приведены контрольные вопросы к каждому из основных разделов, а также перечень рекомендуемой для дополнительного изучения литературы.

Пособие предназначено для обучающихся магистратуры Передовой инженерной школы интердисциплинарного инжиниринга ИТМО по образовательной программе «Химия для энергетических технологий». Изучение методов разделения продуктов органического синтеза и их анализа предусмотрено в основных разделах дисциплины «Экспериментальные методы исследования флюидов и реагентов». Вместе с тем ознакомление с представленными методами также может быть рекомендовано для самостоятельного изучения в составе дисциплин «Передовые методы характеристики материалов» и «Современное материаловедение в индустрии», что особенно востребовано при их освоении обучающимися, выполняющими индивидуальные проекты, связанные с органическим синтезом либо анализом продуктов органического синтеза в рамках научно-исследовательской, производственной, преддипломной практики. Факультативное изучение методов разделения продуктов органического синтеза и их анализа может проводиться как в форме тематических семинаров, так и посредством формирования индивидуальных заданий и контроля приобретенных знаний. Также пособие может быть рекомендовано для студентов бакалавриата, изучающих дисциплину «Органический синтез».

Учебно-методическое пособие является вспомогательным материалом и направлено на приобретение обучающимися компетенций, связанных с пониманием и практическим освоением методов физико-химического анализа для исследования продуктов органического синтеза, в том числе: *знаний* о самих методах исследования, физико-химических принципов, заложенных в их основу, устройстве приборов, используемых для их реализации; *умений* применения современных методик и методов для проведения экспериментов и испытаний, анализа получаемых результатов и их корректной интерпретации; а также *навыков* лабораторной практики, включая надлежащую пробоподготовку и корректное обращение с аналитическими приборами и лабораторным оборудованием.

РАЗДЕЛ 1. ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ РАЗДЕЛЕНИЯ

Хроматография как аналитический метод была предложена русским ботаником Михаилом Семёновичем Цветом в начале XX века. В 1903 году, работая в Варшаве, он впервые продемонстрировал разделение растительных пигментов (хлорофиллы и каротиноиды) на характерные цветные зоны в адсорбционной колонке, заполненной карбонатом кальция. Позднее, в научных публикациях 1906 года, им было дано название такому цветографическому методу адсорбционного разделения органических веществ – «хроматография». Несмотря на новизну и наглядность экспериментов, его работы не получили широкого признания, и метод оставался практически забытым до 1930-х годов, когда к нему вновь обратились исследователи.

В 1930-х годах начался новый этап развития, связанный с упрощением и расширением практического применения метода. В 1938 году Николай А. Измайлов и Мария С. Шрайбер предложили метод тонкослойной хроматографии, позволивший проводить быстрый и наглядный анализ с минимальным количеством образца. Существенный теоретический прорыв произошёл в 1941 году, когда Арчер Джон Портер Мартин и Ричард Лоренс Миллингтон Синг разработали распределительную хроматографию, основанную на равновесном распределении веществ между двумя жидкими фазами. Этот подход заложил фундамент современной теории хроматографического разделения и был отмечен Нобелевской премией по химии в 1952 году.

В 1950-е годы произошло бурное развитие инструментальных методов, прежде всего газовой хроматографии, в становлении которой важную роль сыграл Энтони Т. Джеймс. Газовая хроматография позволила эффективно анализировать летучие и термостабильные соединения, что сделало её незаменимой в нефтехимии и анализе органических веществ. Параллельно совершенствовались детекторы и колоночные технологии, что значительно повысило чувствительность и точность измерений.

В 1960–1970-х годах сформировалась высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), связанная с именами Чаба Хорвата и Сеймура Р. Липски. Применение высокого давления, мелкодисперсных сорбентов и автоматизированных систем подачи подвижных компонентов (жидкостей, газов) позволило анализировать сложные смеси нелетучих и термолабильных соединений с высокой точностью и воспроизводимостью. Этот этап стал ключевым для внедрения хроматографии в фармацевтику, биохимию и экологический контроль.

Дальнейшее развитие метода сопровождалось появлением специализированных направлений. В 1968 году была предложена аффинная хроматография для селективного выделения биомолекул, а в 1975 году Хэмиш Смолл разработал ионную хроматографию, ориентированную на анализ неорганических ионов. В конце XX века интеграция хроматографии с масс-спектрометрией, развитие компьютерного управления и автоматизации превратили её в универсальный высокоточный инструмент анализа различных

объектов. Таким образом, эволюция хроматографии прошла путь от простых лабораторных экспериментов к мощным аналитическим системам, играющим ключевую роль в современной науке и промышленности.

1.1 Разновидности хроматографии

К основным понятиям хроматографии относятся: подвижная и неподвижная фазы (подвижную фазу также называют *элюентом* или *элюирующим* агентом); *элюат* – раствор, выходящий из колонки, содержащий разделенные компоненты и элюент; *элюирование* – процесс вымывания компонентов. В зависимости от агрегатного состояния подвижной и неподвижной фаз, способа распределения сорбатов между ними, а также техники исполнения различают несколько видов хроматографии. По этим значимым отличительным особенностям разновидности хроматографии классифицируются следующим образом.

По физической природе неподвижной и подвижной фаз:

1) *Жидкостная* хроматография (когда подвижная фаза жидкая), в зависимости от агрегатного состояния неподвижной фазы подразделяется на твёрдо-жидкофазную (ТЖХ) и жидко-жидкофазную хроматографию (ЖЖХ), также называемую распределительной хроматографией.

2) *Газовая* хроматография (когда подвижная фаза газ) подразделяется на *газоадсорбционную* (газо-твёрдофазную), где неподвижной фазой является твёрдый носитель (силикагель, уголь, оксид алюминия) и *газожидкостную*, где неподвижной фазой является жидкость, нанесённая на поверхность инертного носителя. В таком случае разделение газовой смеси происходит вследствие различной растворимости компонентов пробы в жидкости или различной стабильности образующихся комплексов.

В зависимости от *процесса распределения сорбатов* между подвижной и неподвижной фазами различают следующие разновидности *жидкостной* хроматографии:

1. *Адсорбционная* хроматография – разделение основано на различии связывания (сорбции) компонентов смеси на данном адсорбенте.

2. *Распределительная* хроматография – разделение основано на различии в растворимости сорбатов в подвижной и неподвижной фазах или на различии в стабильности образующихся комплексов.

3. *Ионообменная* хроматография – разделение основано на различии ионного взаимодействия сорбата и якорных групп неподвижной фазы.

4. *Аффинная* хроматография – основана на биоспецифическом взаимодействии сорбата с якорными группами неподвижной фазы.

5. *Эксклюзионная* хроматография – разделение основано на различии в проницаемости неподвижной фазы для молекул разделяемых веществ. Компоненты элюируются в порядке уменьшения их молекулярной массы.

В зависимости от техники выполнения жидкостной хроматографии различают:

1. *Колоночная* хроматография (неподвижная фаза находится в колонке).

2. *Планарная* хроматография – бумажная и тонкослойная (неподвижная фаза – лист бумаги или тонкий слой сорбента на стеклянной или металлической пластинке).

3. *Капиллярная* хроматография (разделение происходит в плёнке жидкости или слое сорбента неподвижной фазы, размещённых на внутренней стенке трубки).

Далее будут рассмотрены наиболее используемые для разделения и анализа органических веществ методы жидкостной и газовой хроматографии, включая высокоэффективную жидкостную хроматографию и тонкослойную хроматографию.

1.2 Жидкостная хроматография

Для низкомолекулярных органических соединений на практике наиболее часто используются методы адсорбционной жидкостной хроматографии, которые будут подробно рассмотрены в этом подразделе. Из них наибольшее внимание заслуживают колоночный метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и планарный метод тонкослойной хроматографии (ТСХ). Заметим, что для полимеров и высокомолекулярных соединений используются преимущественно методы эксклюзионной хроматографии. Аффинная хроматография наиболее удобна для разделения и анализа биологически активных органических веществ.

1.2.1 Высокоэффективная жидкостная хроматографии (ВЭЖХ)

Метод ВЭЖХ является одним из методов жидкостной хроматографии, который обеспечивает наиболее высокопроизводительный анализ и разделение сложных смесей. Отличительной особенностью ВЭЖХ является использование высокого давления (до 400 бар) и мелкозернистых сорбентов (до 1,8 мкм). Это позволяет разделять сложные смеси веществ быстро и полно (среднее время анализа от 3 до 30 минут). За счёт значительно более развитой поверхности сорбента достигается высокая эффективность разделения. Достаточной скорости движения жидкой фазы в подобном сорбенте возможно достичь только посредством приложения высокого давления.

Вещества выходят из колонки в разное время (время удерживания T_R) в зависимости от взаимодействия их с поверхностью твердой фазы. В зависимости от природы неподвижной фазы метод ВЭЖХ может являться адсорбционным, ионообменным или эксклюзионным. В свою очередь, адсорбционная ВЭЖХ бывает **обратно-фазовая** и **нормально-фазовая**. Основные характеристики и применения различных типов ВЭЖХ представлены в Таблице 1.

В схеме ВЭЖХ содержатся основные узлы, показанные на Рисунке 1.

Емкость с элюентом. Обычно используют 2–4 растворителя разной полярности для увеличения степени разделения путём создания градиента полярности жидкой среды.

Насос. Обеспечивает стабильный поток элюента через твердую фазу.

Таблица 1 Основные виды ВЭЖХ, их характеристики и применение

Вид ВЭЖХ	Неподвижная фаза	Подвижная фаза	Типичные объекты анализа	Пример практического применения
Обратно-фазовая	Материал с низкой адгезией (неполярный)	Полярные растворители (вода + CH_3CN или CH_3OH)	Низкомолекулярные органические вещества (высокая полярность)	Определение парацетамола и примесей в таблетках
Нормально-фазовая	Материал с высокой адгезией (полярный), как правило, SiO_2	Неполярные растворители (гексан + изопропанол)	Низкомолекулярные органические вещества (низкая полярность)	Разделение стероидов
Ионообменная	Ионообменный материал	Буферный раствор	Аминокислоты, ионы, белки	Анализ аминокислотного состава белка
Эксклюзионная	Пористый гель	Буферный раствор или органические растворители (ТГФ, ДМФА)	Полимеры, биополимеры (белки)	Определение молекулярной массы полисахаридов

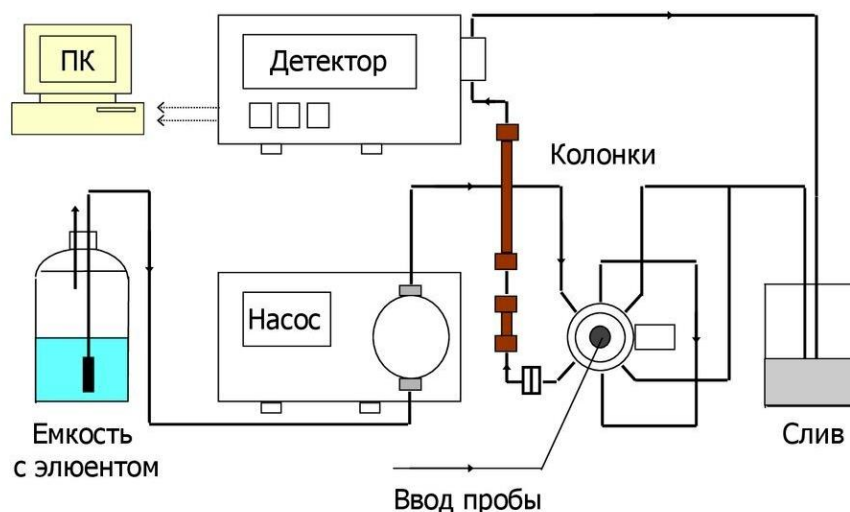


Рисунок 1 Основные узлы ВЭЖХ

Инжектор. Представляет собой 6-портовый кран, необходимый для точного дозирования пробы. При ручном дозировании возможно «переполнение» колонок. Эффект переполнения заключается в том, что у любой твердой фазы при возрастании концентрации разделяемых веществ достигается точка насыщения, при которой между процессами адсорбции и десорбции будет наблюдаться равновесие. Если на участке колонки достигнуто насыщение, дальнейшая адсорбция будет затруднена, и растворённое в элюенте вещество будет проходить дальше по колонке, адсорбируясь на её свободных частях. Этот

эффект приводит к уширению полос отдельных веществ в колонке, к их перекрытию и, как следствие, к уменьшению точности разделения и анализа веществ. Точное дозирование инжектором позволяет предотвратить данный эффект.

Хроматографическая колонка является основным функциональным элементом ВЭЖХ.

Детектор. Предназначен для определения состава смеси и её эффективного разделения. Для детекции применяют спектрофотометрические методы (спектроскопию в ультрафиолетовой, видимой или инфракрасной областях), а также флуоресцентные и рефрактометрические методы. Самым чувствительным и информативным методом детекции является масс-спектрометрический.

Система сбора и обработки данных. По результату проведённого анализа строится хроматограмма – график зависимости сигнала детектора от времени. Интенсивность пиков на хроматограмме зависит от концентрации вещества и его природы. Таким образом, количественный анализ по интегральной интенсивности пиков на хроматограмме возможен после калибровки анализатора по пробам с известной концентрацией соответствующих веществ.

Помимо анализа, метод ВЭЖХ может быть применен для разделения смесей органических веществ. Такой метод имеет название *препаративной ВЭЖХ*. В приборе для препаративной ВЭЖХ используются колонки большего размера. Вещество для разделения подаётся в виде раствора в элюенте с большой скоростью (10–200 мл/мин). При такой скорости подачи невозможно получение узких пиков на хроматограмме, поэтому разделение сопровождается только качественным анализом. Система автоматически разделяет вещества на фракции, опираясь на данные детектора. Для сравнения методы аналитической и препаративной ВЭЖХ сопоставлены в Таблице 2.

Таблица 2 Сравнение аналитической и препаративной ВЭЖХ

Параметр	Аналитическая ВЭЖХ	Препаративная ВЭЖХ
Основная цель	Анализ (идентификация и количественное определение)	Очистка и выделение (изоляция) чистых соединений
Масса пробы	Микрограммы (µg)	1 мг – 10 г (или больше в промышленном применении)
Диаметр колонки	2 – 4,6 мм	10 – 100 мм (или больше в промышленном применении)
Скорость потока	0,1 – 5 мл/мин	10 – 200 мл/мин
Размер частиц сорбента	1,7 – 5 мкм (высокая эффективность)	5 – 20 мкм (для более низких давлений и более высоких нагрузок)
Детектирование	УФ, МС и др. (предпочтительно неразрушающие)	УФ, МС и др. (предпочтительно неразрушающие), коллектор фракций
Результат	Хроматограмма и результат качественного анализа	Собранные чистые фракции

1.2.2 Тонкослойная хроматография (ТСХ)

Тонкослойная хроматография (ТСХ) является одним из широко применяемых методов качественного и полуколичественного анализа сложных природных, фармацевтических, биологических и химических объектов. Метод основан на распределении компонентов анализируемой смеси между неподвижной фазой, представляющей собой слой сорбента, нанесенный на подложку, и подвижной фазой, перемещающейся по поверхности слоя за счет капиллярных сил. В зависимости от направления движения подвижной фазы различают восходящую, нисходящую и горизонтальную хроматографию.

Благодаря простоте реализации, высокой гибкости в выборе условий разделения и возможности одновременного анализа нескольких образцов ТСХ широко используется как самостоятельный метод, а также как предварительный этап перед применением более чувствительных методов анализа.

Классическая методика ТСХ включает несколько последовательных этапов: нанесение анализируемой пробы на слой сорбента, разделение компонентов в потоке подвижной фазы, обнаружение образовавшихся зон и их количественную оценку. Положение вещества на хроматограмме характеризуется коэффициентом удерживания R_f :

$$R_f = \frac{x}{L},$$

где x – расстояние от стартовой линии до центра зоны вещества, L – расстояние от стартовой линии до фронта растворителя (Рисунок 2).

Значение R_f является воспроизводимой характеристикой для данного соединения при фиксированных условиях и используется для идентификации компонентов смеси.

Далее будут рассмотрены основные компоненты ТСХ.

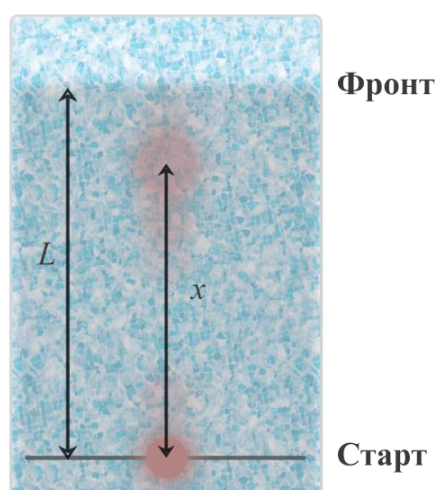


Рисунок 2 Определение коэффициента удерживания на пластине для ТСХ

В качестве *неподвижной фазы* в ТСХ используют различные сорбенты, нанесенные на подложку из стекла, алюминиевой фольги или полимерных материалов. Сорбенты должны обладать химической и физической

стабильностью, не взаимодействовать с анализируемыми веществами, не растворяться в подвижной фазе и не содержать примесей, мешающих анализу. Для закрепления слоя сорбента применяют связующие вещества, такие как гипс, силикаты или полимерные соединения.

Наиболее распространенными сорбентами являются силикагель и оксид алюминия. Силикагель представляет собой полярный адсорбент с развитой поверхностью и активными силановыми и силанольными группами, благодаря чему широко применяется для разделения соединений различной полярности. Оксид алюминия также является полярным сорбентом. Помимо этого, используются флорисил, полиамиды и модифицированные силикагели с привитыми функциональными группами.

Эффективность разделения существенно зависит от характеристик сорбента, таких как размер частиц (обычно 5–20 мкм), распределение пор, толщина слоя и содержание влаги. Важным параметром является активность сорбента, которая уменьшается при увеличении содержания воды. Для повышения удобства детектирования в сорбент часто вводят флуоресцентные индикаторы, позволяющие визуализировать зоны веществ в ультрафиолетовом свете.

Подвижная фаза в ТСХ представляет собой индивидуальный растворитель или смесь растворителей, состав которой подбирается с учетом полярности анализируемых соединений и их взаимодействия с сорбентом. В большинстве случаев применяются многокомпонентные системы растворителей, позволяющие регулировать элюирующую способность и селективность разделения. Растворители должны быть высокой степени чистоты и не содержать примесей, так как их присутствие может существенно влиять на результаты анализа.

Количество наносимой пробы (обычно 0,1–50 мкг), а также свойства растворителя, используемого для ее приготовления, оказывают влияние на размер пятна и величину R_f . При нанесении важно обеспечить быстрое испарение растворителя и достаточную растворимость анализируемых веществ. Пробу наносят в виде точек или полос на стартовую линию, расположенную на расстоянии около 1–1,5 см от края пластинки, после чего пластинку помещают в камеру с подвижной фазой.

Проявление и детекция. После завершения разделения необходимо обнаружить зоны компонентов на хроматограмме. Для этого применяют физические и химические методы детектирования. Физические методы основаны на поглощении света и флуоресценции. Для их реализации используют источники ультрафиолетового излучения с длинами волн 254 нм, при котором анализируемые вещества поглощают и образуют темные пятна на светящемся сорбенте, и 365 нм, при котором, напротив, возникает свечение анализируемой пробы. Данный анализ возможен только в случае, если на используемый силикагель предварительно нанесён флуоресцентный краситель.

Химические методы основаны на обработке хроматограммы реагентами, образующими окрашенные соединения с анализируемыми веществами.

Используются как универсальные, так и селективные реагенты, позволяющие выявлять определенные классы соединений.

Количественная оценка результатов может проводиться различными способами, включая визуальное сравнение интенсивности пятен со стандартами, извлечение зон с последующим анализом, а также инструментальные методы. Наиболее точными являются методы денситометрии и видеоденситометрии, основанные на регистрации оптических характеристик зон и их цифровой обработке.

Таким образом, тонкослойная хроматография представляет собой универсальный, доступный и эффективный метод анализа, позволяющий решать широкий круг задач, связанных с разделением, идентификацией и предварительной оценкой состава сложных многокомпонентных систем.

1.3 Газовая хроматография

Разделение и идентификация компонентов в газовых смесях – важная задача, решение которой бывает необходимо в фармацевтике, пищевой промышленности, экологии и нефтехимии. Газовая хроматография, как и описанные выше методы хроматографии, основана на взаимодействии анализируемой пробы и неподвижной фазы, которой наполнена хроматографическая колонка. Важными параметрами работы прибора являются параметры хроматографической колонки, а именно ее диаметр и длина, а также состав неподвижной фазы. Они влияют как на объем допустимой к вводу пробы, так и на параметры температуры при измерении. Все эти параметры напрямую влияют на точность и воспроизводимость измерений.

Общая схема газового хроматографа представлена на Рисунке 3. Далее будет приведено подробное описание его основных узлов.

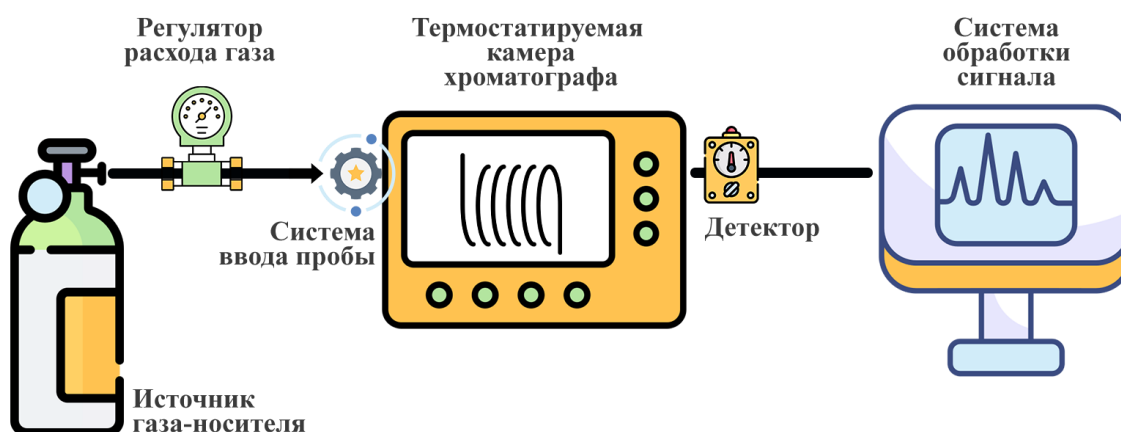


Рисунок 3 Основные узлы газового хроматографа

1.3.1 Поддача газа-носителя

Газ-носитель – это инертный газ, который транспортирует анализируемую пробу через хроматограф и при этом не вносит помех в анализ. Именно поэтому к чистоте используемых газов предъявляются строгие требования. Наличие даже

малейших примесей приведет к систематической ошибке в измерениях. Источником газа выступает высокочистый сжиженный газ в баллоне, где доля основного компонента составляет от 99.995% (марка 4.5) до 99.9999% (марка 6.0), либо же возможно применение генераторов газов, которые не только очищают газ, но и нагнетают его до необходимого давления.

Важным компонентом системы подачи газа является регулятор расхода газа, отвечающий за поддержание постоянного и контролируемого потока газа-носителя. Регулятор предотвращает резкие скачки давления, которые могут привести к изменению скорости движения компонентов в колонке. Поскольку геометрические размеры и длина применяемых колонок могут различаться, то используют понятие объемной скорости газа-носителя – такой объем газа, который проходит через колонку в единицу времени (мл/мин). Объемная скорость газа-носителя определяется на выходе из колонки с помощью расходомера. Газ-носитель выполняет только транспортную функцию, поэтому к нему необходимо подмешать анализируемую пробу. Выбор газа-носителя обусловлен используемым типом детектора и подробнее будет рассмотрен в разделе 1.3.4.

1.3.2 Пробоподготовка и системы ввода

Процесс газовой хроматографии начинается с ввода пробы. Несмотря на название «газовая хроматография», метод позволяет анализировать и жидкие пробы различных соединений, но для этого их необходимо перевести в газообразное состояние.

Один из способов – установка в прибор испарительного узла, где образец быстро переходит в газовую фазу, смешивается с газом-носителем и затем направляется в хроматографическую колонку. Температурный режим испарителя подбирают таким образом, чтобы он превышал температуру кипения наиболее высококипящего компонента смеси, но при этом оставался ниже температуры термического разложения анализируемых соединений. Как правило, температура испарителя устанавливается выше температуры колонки на 30–50 °С. Важно, чтобы материал, из которого изготовлен испаритель, был химически инертен к компонентам анализируемого образца. Другим подходом может быть анализ методом извлечения и улавливания, который заключается в пропускании «промывочного» газа через жидкую пробу, в результате чего легколетучие компоненты уносятся в специальную ловушку. Ловушка заполнена активированным углем, который адсорбирует эти компоненты, а затем, путем нагрева, контролируемо высвобождает их, после чего они смешиваются с газом-носителем.

Аналогичный принцип термодесорбции применим и для твердых образцов, однако требует специализированного оборудования, которое не будет рассматриваться в данном пособии.

После того как исследуемый образец переведен в газовую фазу, он должен быть перенесен в хроматографическую колонку. Для этого применяется система из инжектора и делительных клапанов. Их задача – равномерно и контролируемо

подавать анализируемый образец и газ-носитель в колонку. Можно как подавать всю пробу (режим Splitless), так и делить поток (режим Split). Выбор режима обусловлен ожидаемой концентрацией компонента в пробе: если его более 0,1%, то лучше разделить пробу; в противном случае лучше передать всю пробу в колонку. Делительный кран представляет собой шестипортовое устройство с поворотной втулкой внутри, которая плотно прижата к корпусу и отполирована для точного и плавного переключения между режимами работы. Схема работы представлена на Рисунке 4.

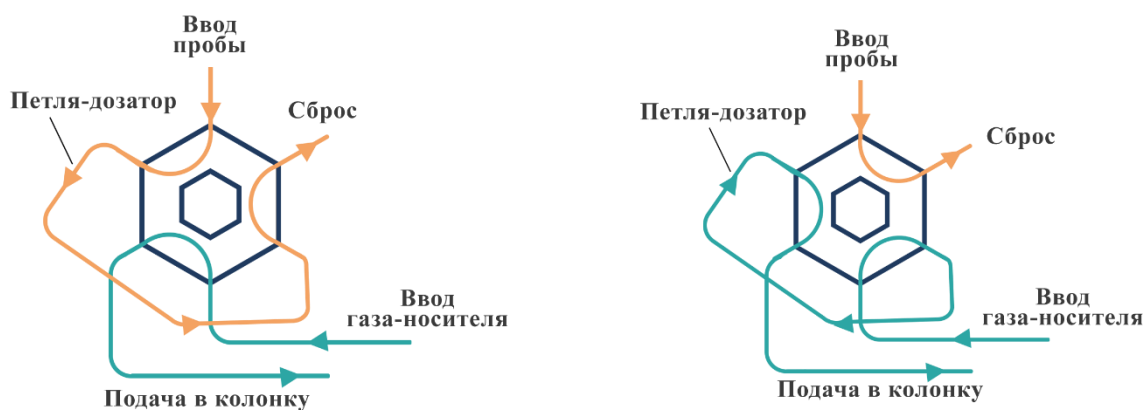


Рисунок 4 Режим отбора пробы (слева) и режим подачи отобранной пробы в колонку (справа)

В момент подачи пробы происходит заполнение откалиброванной петли-дозатора, а затем выполняется переключение потоков, и газ-носитель подхватывает отобранное и точно известное количество пробы для ее дальнейшего разделения. После того, как точное количество пробы отобрано, необходимо разделить компоненты, входящие в газовую смесь.

1.3.3 Система разделения компонентов

Система разделения включает в себя хроматографическую колонку и термостат. Непосредственно колонка выполняет функцию разделения компонентов, однако термостат не менее важен, так как он влияет на скорость выхода компонентов из колонки, а также на воспроизводимость результатов. Для этого точность регулирования температуры составляет 0,1 °С.

В зависимости от геометрических размеров выделяют насадочные и капиллярные колонки. Для насадочных колонок характерный внутренний диаметр 2–5 мм, а длина, как правило, составляет от 1 до 3 м. Форма колонок может быть прямая, U-образная или спиральная и зависит только от размеров термостата. В качестве материала для изготовления таких колонок используются нержавеющая сталь или алюминий, реже – стекло. Неподвижная фаза в таких колонках – гранулы сорбента, помещенные внутрь. Капиллярные колонки имеют диаметр 0,1–0,5 мм и длину от 10 до 100 м. Изготавливаются они преимущественно из стекла, а сорбент, уже не в виде гранул, находится на

стенках капилляра. Внешний вид камеры газового хроматографа с капиллярными колонками показан на Рисунке 5.

Ключевыми факторами, влияющими на эффективность и селективность разделения в газо-адсорбционной хроматографии, является совокупность структурных и химических свойств адсорбентов. К структурным параметрам относятся величина удельной площади поверхности, размер пор, распределение пор по размеру, суммарный объем пор, тогда как к химическим – гидрофобность или гидрофильность поверхности, а также наличие функциональных групп.



Рисунок 5 Термостатируемая камера газового хроматографа Agilent 7890b с двумя установленными капиллярными колонками

Эффективность работы колонки можно качественно оценить по форме пиков на хроматограмме: чем уже пик при том же времени удержания, тем лучше колонка разделяет компоненты. Если же время удержания увеличивается, то можно заключить, что данная колонка обладает большей селективностью (Рисунок 6). Количественно, эффективность колонки может быть рассчитана по формуле:

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

где N – число теоретических тарелок, t_R – время удержания, W_b – ширина пика у его основания, W_h – ширина пика на его полувисоте.

Другим количественным критерием качества колонки является H – высота, эквивалентная теоретической тарелке, которая рассчитывается по формуле:

$$H = L/N,$$

где L – длина колонки.

Значения N и H позволяют сравнивать эффективность колонок разных типов, разной длины, заполненных разными по природе и зернению сорбентами. Сравнивая N двух колонок одной длины, сопоставляют их эффективность. При сравнении H оценивают качество колонок с сорбентами одинаковой морфологии, но имеющими разную длину.

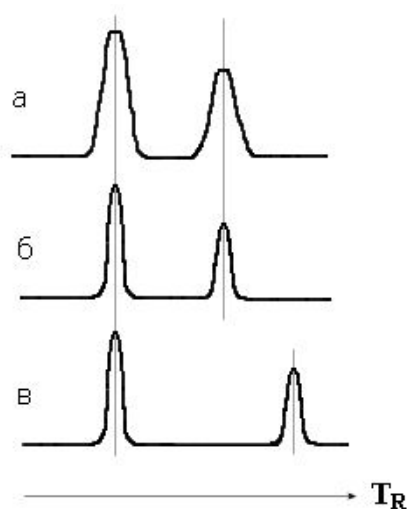


Рисунок 6 Форма пиков в зависимости от эффективности и селективности хроматографической системы: а – нормальная селективность, пониженная эффективность; б – нормальная эффективность и селективность; в – повышенная селективность, нормальная эффективность. T_R – время удержания

Селективность сорбента при заданной скорости потока, температуре колонки, а также размерах сорбента может быть оценена с использованием коэффициента селективности в отношении компонентов A и B по формуле:

$$K_S = \frac{2(t_{R(B)} - t_{R(A)})}{t_{R(B)} + t_{R(A)}}.$$

На основании эффективности колонки и ее селективности к компонентам A и B можно оценить степень разделения таких компонентов следующим образом:

$$R_S = 0,212 \cdot K_S \cdot \sqrt{N}.$$

Таким образом, для выбора оптимальной хроматографической системы разделения следует учитывать факторы, связанные как с конфигурацией самой колонки (насадочная или капиллярная, природа адсорбента, размеры частиц и плотность их упаковки в колонке, толщина пленки неподвижной жидкой фазы), так и с параметрами проведения процесса (скорость газа-носителя, температура). После того, как определены оптимальные колонки и компоненты газовой смеси разделены, их необходимо идентифицировать.

1.3.4 Детекторы газовой хроматографии

Хроматографические детекторы – устройства, которые обнаруживают и определяют количество компонентов смеси, выходящей из хроматографической колонки, преобразуя изменения свойств газового потока в электрический сигнал.

Современные детекторы являются дифференциальными: они фиксируют мгновенные изменения параметров потока, записывая их в виде пиков, площадь которых пропорциональна концентрации вещества.

Различают три основных рабочих параметра детекторов:

1) *Чувствительность* – отношение выходного сигнала к количеству вещества в пробе. Данный параметр определяет предел детектирования, то есть минимальную концентрацию анализируемого вещества в потоке газа-носителя, которая может быть зарегистрирована. Минимальным сигналом, поддающимся измерению, принято считать сигнал, амплитуда которого вдвое превышает уровень шума (Рисунок 7, слева).

2) *Линейность* – зависимость между концентрацией анализируемого вещества в потоке газа-носителя и сигналом детектора. Если построить зависимость сигнала от концентрации, то ее прямой участок является линейной областью детектирования. В пределах этого диапазона чувствительность детектора не зависит от концентрации. Участок перестает считаться линейным при отклонении от пропорциональности в 3–5 % (Рисунок 7, справа).

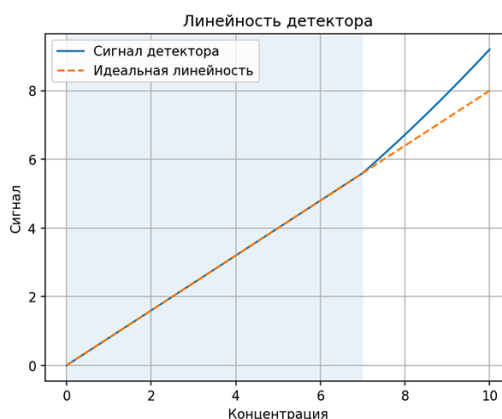
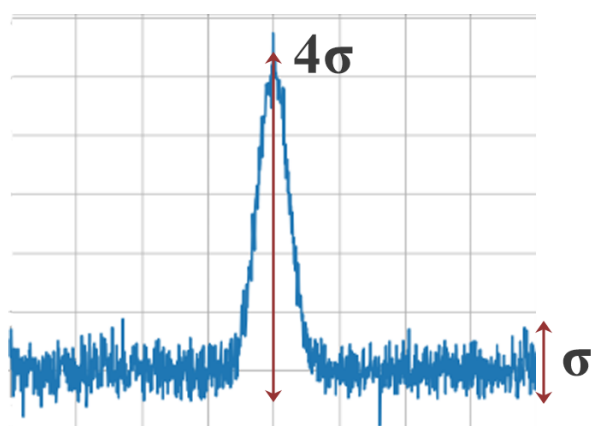


Рисунок 7 График аналитического сигнала с детектора – слева;
пример графика линейности детектора – справа.

3) *Селективность* – соотношение отклика детектора на одно вещество в присутствии другого при их одинаковом количестве. Селективные детекторы

зачастую являются узкоспециализированными и применяются в единичных методиках.

Детекторы делятся на два типа: *поточковые* (например, плазменно-ионный, пламенно-фотометрический), которые регистрируют весь объем вещества независимо от скорости потока, и *концентрационные* (например, детектор по теплопроводности, электронозахватный детектор), работа которых зависит от скорости потока: чем она выше, тем меньше актов взаимодействия с целевыми молекулами. Далее будут описаны основные типы детекторов и области их применения.

Детектор по теплопроводности (ДТП; англ. Thermo-conductive Detector, TCD). В основу работы этого не разрушающего пробу детектора заложен принцип передачи тепла от нагретого термочувствительного элемента к более холодному корпусу детектора за счет теплопроводности газового потока. При изменении газового состава потока меняется и его теплопроводность, а следовательно, и температура чувствительного элемента. Для большей точности применяют два параллельно включенных термочувствительных элемента, на один из которых подается чистый газ-носитель, а на второй – газ-носитель с анализируемой пробой, которая вышла из хроматографической колонки. Анализируемый сигнал представляет собой разницу в показаниях температуры каждого из термочувствительных элементов. ДТП детектор чувствителен ко всем газам, и чем больше разница в теплопроводности между анализируемым газом и газом-носителем, тем выше чувствительность. Чаще всего в качестве газа-носителя используют водород, гелий, аргон или азот. Данный детектор установлен в газовом хроматографе *Кристалл 2000* (производства Хроматэк, Россия), который функционирует в Передовой инженерной школе интердисциплинарного инжиниринга ИТМО.

Пламенно-ионизационный детектор (ПИД; англ. Flame Ionization Detector, FID) – детектор, разрушающий пробу, но обладающий высокой чувствительностью для анализа широкого класса органических соединений. Принцип работы заключается в измерении электрической проводимости водородного пламени между коллекторным электродом и горелкой. Водородное пламя само по себе плохо проводит электрический ток. Однако под воздействием тепла содержащие С-Н связи органические соединения ионизируются, что приводит к повышению проводимости водородного пламени. В результате возникает измеримый токовый сигнал, величина которого пропорциональна количеству органического вещества, сгоревшего в пламени детектора. В качестве газа-носителя обычно применяется гелий, азот, аргон, также для работы детектора требуются дополнительные газы: водород и воздух. Водород, как правило, получают от генератора водорода, а воздух – от компрессора, которые поставляются вместе с прибором. Данный детектор установлен в газовом хроматографе *Кристалл 2000* (производства Хроматэк, Россия), который функционирует в Передовой инженерной школе интердисциплинарного инжиниринга ИТМО.

Электронзахватный детектор (ЭЗД; англ. Electron Capture Detector, ECD) – не разрушающий пробу детектор, в котором установлен закрытый источник *бета-излучения* на основе изотопа ^{63}Ni (никель-63). Используется для анализа галогенорганических компонентов, которые имеют высокое сродство к электрону. Испускаемые источником бета-частицы (электроны) ионизируют газ-носитель, в результате чего возникает ток. Введение анализируемого газа в поток ионизированного газа-носителя приводит к поглощению части электронов (бета-излучения) и, как следствие, к изменению величины тока, что и детектируется прибором. В качестве газа-носителя чаще всего используется азот как наиболее легко ионизируемый газ, к которому предъявляют высокие требования чистоты, чтобы исключить влияние примесей кислорода.

Пламенно-фотометрический детектор (ПФД; англ. Flame Photometric Detector, FPD) – проборазрушающий детектор, селективный к серо- и фосфосодержащим газам. Принцип его работы основан на хемилюминесценции компонентов, образующихся в водородно-воздушном пламени, а именно S_2^* и HPO_2^- радикалов, которые люминесцируют на 394 нм и 526 нм, соответственно. Интенсивность свечения обрабатывается фотоумножителем и переводится в аналитический сигнал. Данный детектор отлично подходит для анализа малых концентраций серо- и фосфорсодержащих соединений, даже в условиях высоких концентраций различных углеводородов и других газов.

Фотоионизационный детектор (ФИД; англ. PhotoIonization detector, PID) – эффективный и недорогой детектор, предназначенный для измерения летучих органических компонентов газа в концентрациях от 1 ppb (parts per billion, частей на миллиард) до 10 000 ppm (parts per million, частей на миллион). В отличие от ЭЗД детектора, ионизация анализируемых соединений происходит за счет жесткого ультрафиолетового излучения, энергии которого хватает для ионизации органических соединений, но недостаточно для газа-носителя. Образующийся в ходе ионизации ток пропорционален концентрации компонента и регистрируется детектором. Чувствительность ФИД зависит от химического строения молекул – величины углеродного скелета, изомерии и положения функциональных групп, наличия двойных и сопряженных связей. При этом важным плюсом данного детектора является возможность проведения непрерывного измерения концентрации компонента в потоке газа-носителя.

Масс-селективный детектор (МСД; англ. Mass-Selective Detector, MSD). Данный детектор превосходит все вышеописанные в качественном анализе, так как его применение позволяет анализировать пробы не только по времени удержания компонентов, но и по масс-спектрам, которые возможно сравнивать с библиотечными данными. Сами библиотеки масс-спектров насчитывают сотни тысяч различных соединений, а встроенное программное обеспечение позволяет сравнивать с ними полученные данные за считанные секунды. Стоит отметить, что данный детектор – это программно-аппаратный комплекс, который, как уже было отмечено, включает как базу данных масс-спектров, так и оборудование для их детекции. Типичная схема представлена на Рисунке 8.

После выхода из хроматографической колонки анализируемое вещество подается в камеру ионизации, где подвергается бомбардировке электронами. Источником электронов является катод – металлическая спираль из тугоплавкого металла, которая при сильном нагревании за счет пропускания электрического тока испускает электроны. Между катодом и ионизационной камерой создается разность потенциалов в 70 В, что приводит к ускорению электронов в электрическом поле, и их энергия составляет порядка 70 эВ, что является стандартной величиной, при которой и снимались большинство масс-спектров из библиотеки. Разогнанные таким образом электроны разбивают молекулы анализируемого газа на осколки – фрагментный ион и молекулярный ион, которые затем поступают в масс-анализатор.



Рисунок 8 Схема основных узлов масс-селективного детектора

Для того, чтобы анализировать полученные ионы, их необходимо предварительно разделить, для чего применяются масс-анализаторы, среди которых различают непрерывные и импульсные.

К непрерывным относятся магнитные анализаторы. Принцип их работы основан на том, что для различных ионов характерно различное отношение их массы к заряду (m/z). Пролетая через магнитное поле, они отклоняются вдоль его силовых линий по траекториям с разными радиусами, что позволяет разделять их и детектировать поочередно. Данный метод отличается высоким разрешением, но прибор имеет больший размер в сравнении с квадрупольным масс-анализатором. Квадрупольный масс-анализатор получил свое название ввиду использования в его конструкции четырех симметричных и параллельно расположенных электродов, каждый из которых создает свое монополе. На электроды попарно и перекрестно (формируя оси абсцисс и ординат) подается комбинация постоянного и высокочастотного переменного напряжения, которое можно выразить как

$$U_0 = U + V \cos(\omega t),$$

где U – постоянная составляющая напряжения, $V\cos(\omega t)$ – переменная составляющая с амплитудой V и угловой частотой ω .

Постоянное напряжение направляет ионы вдоль общей оси электродов, в то время как высокочастотное переменное заставляет их колебаться вдоль осей x и y , при этом возрастает только амплитуда этих колебаний без изменения направления полета. Ионы, чья амплитуда достигает высоких значений, нейтрализуются при контакте с электродами. Таким образом, варьируя отношение U/V , можно создавать сложные поля, в которых траектория ионов будет проходить через электроды и тем самым разделять ионы с различными отношением m/z .

К пульсовым масс-анализаторам относятся времяпролетный, ионно-циклотронного резонанса с Фурье-преобразованием и ионно-циклотронный с ионной ловушкой. Данные виды анализаторов не находят широкого применения в газовой хроматографии, поэтому приведены здесь исключительно для информации.

Заключительным блоком масс-селективного детектора является детектирующее устройство. На сегодняшний день основными вариантам исполнения являются динодные умножители, принцип работы которых основан на динодах – электродах, которые проявляют вторичную эмиссию электронов под действием первичных ионов. Каскад из таких динодов позволяет многократно усиливать сигнал и фиксировать его. Вторым вариантом является фотоумножители, которые фиксируют свечение люминофора под действием прилетающих ионов.

При этом важной частью всего масс-селективного детектора является вакуумная система, которая обеспечивает возможность пролета ионов от источника до детектора без столкновения с другими молекулами газа, что повлияло бы на точность измерений. Современные приборы способны поддерживать вакуум более чем $1 \cdot 10^{-10}$ атм. за счет использования последовательно включенных форвакуумного и высоковакуумного насосов.

В научно-образовательном центре "Газпром нефть – ИТМО" установлен газовый хроматограф *Кристалл 5000* (производства Хроматэк, Россия) с пиролитической приставкой для пробоподготовки и масс-селективным детектором для решения задач в области нефтехимии.

Контрольные вопросы

1. Назовите основные типы жидкостной хроматографии.
2. В чем состоит основная особенность методов ВЭЖХ?
3. Какие основные этапы проведения анализа методом ТСХ?
4. Чем ТСХ может быть полезен в фармацевтической области?
5. Какие факторы влияют на эффективность разделения веществ методом ТСХ?
6. Какие параметры используются для количественной оценки результатов?
7. Что необходимо изменить в капиллярной колонке, чтобы получить колонку насадочного типа?

8. Какие детекторы лучше использовать для анализа серосодержащих компонентов в газовой хроматографии и почему?
9. В чем особенность масс-селективного детектора в сравнении с остальными типами детекторов? Чем обуславливается выбор газа-носителя?
10. Можно ли использовать разные детекторы для определения одного и того же компонента газа?
11. Как изменится внешний вид хроматограмм при изменении длины колонки, при одинаковом составе сорбента?
12. Вы провели синтез поликапролактона. Какой метод вы бы предложили для анализа распределения молекулярных масс продуктов синтеза?

Рекомендуемая литература

1. Снайдер Л. Р., Киркленд Дж. Дж., Долан Дж. У. Введение в современную жидкостную хроматографию / пер. с англ. под науч. ред. А. Я. Яшина. – М. : Техносфера, 2020. – 960 с.
2. Столяров Б. В., Савинов И. М., Витенберг А. Г. [и др.]. Практическая газовая и жидкостная хроматография. – СПб. : Изд-во Санкт-Петербургского университета, 2002. – 616 с.
3. Юинг Г. Инструментальные методы химического анализа. – М. : Мир, 1989. – 608 с.
4. Гейсс Ф. Основы тонкослойной хроматографии (планарная хроматография). Т. 1 / пер. с англ. М. А. Кошевник, Б. Н. Лапина ; под ред. В. Г. Берёзкина. – М. : Мир, 1988. – 406 с.
5. Другов Ю. С., Родин А. А. Пробоподготовка в экологическом анализе. – М. : Бином. Лаборатория знаний, 2009. – 855 с.
6. Другов Ю. С., Родин А. А. Анализ загрязненных биосред и пищевых продуктов. – М. : Бином. Лаборатория знаний, 2007. – 294 с.

РАЗДЕЛ 2. СПЕКТРАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА

2.1 Общие сведения и классификация

Спектральные методы анализа (или спектроскопические методы) – представляют собою группу физических методов неразрушающего качественного и количественного определения состава вещества, основанных на изучении спектров его взаимодействия с электромагнитным излучением. Все спектральные методы опираются на то, что атомы и молекулы вещества имеют дискретные энергетические уровни. При взаимодействии с электромагнитным излучением происходят квантовые переходы между этими уровнями, сопровождающиеся поглощением, испусканием или рассеянием фотонов. Это взаимодействие – ключ к пониманию того, как устроены органические соединения, от простых красителей до сложных высокомолекулярных соединений.

Когда фотон определённой энергии встречается молекулу, он может быть поглощён, если его энергия точно соответствует разнице ΔE между энергетическими уровнями электронов, колебательными или вращательными состояниями.

Энергия фотона связана с частотой (ν) или длиной волны (λ) излучения по формуле Планка:

$$\Delta E = h\nu = \frac{hc}{\lambda},$$

где h – постоянная Планка, а c – скорость света.

Каждое вещество имеет уникальный спектр (набор линий или полос), что позволяет проводить как качественный анализ – идентифицировать элементы или соединения по положению спектральных линий или полос, так и количественный анализ – определять концентрацию по интенсивности сигнала, обычно линейно связанной с концентрацией по закону Ламберта–Бера.

Спектральные методы *классифицируются* по нескольким признакам.

1) *По характеру взаимодействия* электромагнитного излучения с веществом:

– *Абсорбция (поглощение излучения)*. Измеряется ослабление проходящего через пробу излучения. К таким методам относятся атомно-абсорбционная спектрометрия (ААС), спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой области спектра (УФ-Вид), инфракрасная (ИК) спектроскопия. ИК-спектроскопия имеет высокую чувствительность для полярных групп (C=O, O-H, N-H и др.).

– *Комбинационное рассеяние (КР)*. Измеряется изменение длины волны рассеянного света за счёт колебаний молекул. Также известна как *рамановская спектроскопия*. Дополняет ИК, имеет высокую чувствительность для неполярных и симметричных групп (C=C, C-S, S-S и др.). Удобна для водных растворов и твёрдых образцов. Как правило, не требует существенной пробоподготовки и позволяет анализировать включения через стекло.

– *Фотолуминесценция (флуоресценция, фосфоресценция)*. Вещество поглощает свет, а затем излучает его на другой длине волны. Измеряются длины волн и интенсивности поглощаемого и испускаемого веществом излучения.

– *Эмиссия (испускание)*. Определяются спектральные характеристики излучения вещества при его возбуждении не электромагнитными колебаниями (нагрев, плазма, дуга). Атомы или молекулы испускают свет при переходе с высших энергетических уровней на низшие. Пример: атомно-эмиссионная спектроскопия (АЭС), включая индуктивно-связанную плазменную (ИСП-АЭС).

2) *По объекту анализа:*

– *Атомная спектроскопия*. Позволяет определять элементный состав газов по спектрам атомов и ионов.

– *Молекулярная спектроскопия*. Позволяет определять молекулярный состав, структуру и функциональные группы по колебательным, вращательным и электронным переходам в молекулах.

3) *По области спектра (Рисунок 9):*

– *Ультрафиолетовая и видимая (УФ-Вид)*. Спектральный диапазон 200–800 нм. Соответствует электронным переходам в атомах и молекулах.

– *Инфракрасная (ИК)*. Спектральный диапазон включает ближний (0,7–5 мкм), средний (5–30 мкм) и дальний (30–1000 мкм). Соответствует энергетическим переходам при изменении колебательных и вращательных состояний молекул.

– *Рентгеновский*. Спектральный диапазон 5 нм – 10 нм. Соответствует характеристическому излучению, возникающему при переходах электронов на внутренних оболочках атомов. Частота характеристического излучения пропорциональна квадрату атомного номера, а спектры зависят от строения внутренних оболочек элемента.

– *Радиочастотная*. Спектральный диапазон 0,25–15 м (или 20 МГц – 1,2 ГГц). Соответствует энергетическим спиновым переходам ядер и электронов при воздействии на них внешнего магнитного поля. Используется в спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР) и электронного парамагнитного резонанса (ЭПР).

Для наглядности приведен Рисунок 9, отражающий основные области спектра и их параметры. А далее в разделе будут представлены основные аналитические методы исследования продуктов органического синтеза, основанные на взаимодействии вещества с излучением разной длины волны.

2.2 Спектроскопия инфракрасного излучения

Инфракрасная (ИК) спектроскопия – это аналитический метод, используемый для измерения поглощения инфракрасного излучения химическими связями в образце, что приводит к возбуждению колебательных переходов. Данный метод позволяет идентифицировать молекулярную структуру и функциональные группы, анализируя их характерные частоты поглощения, которые представлены в виде спектра зависимости поглощения или

пропускания от длины волны (λ) или волнового числа ($2\pi/\lambda$). ИК-спектроскопия широко применяется для идентификации и характеристики материалов на основе их инфракрасных спектров поглощения.

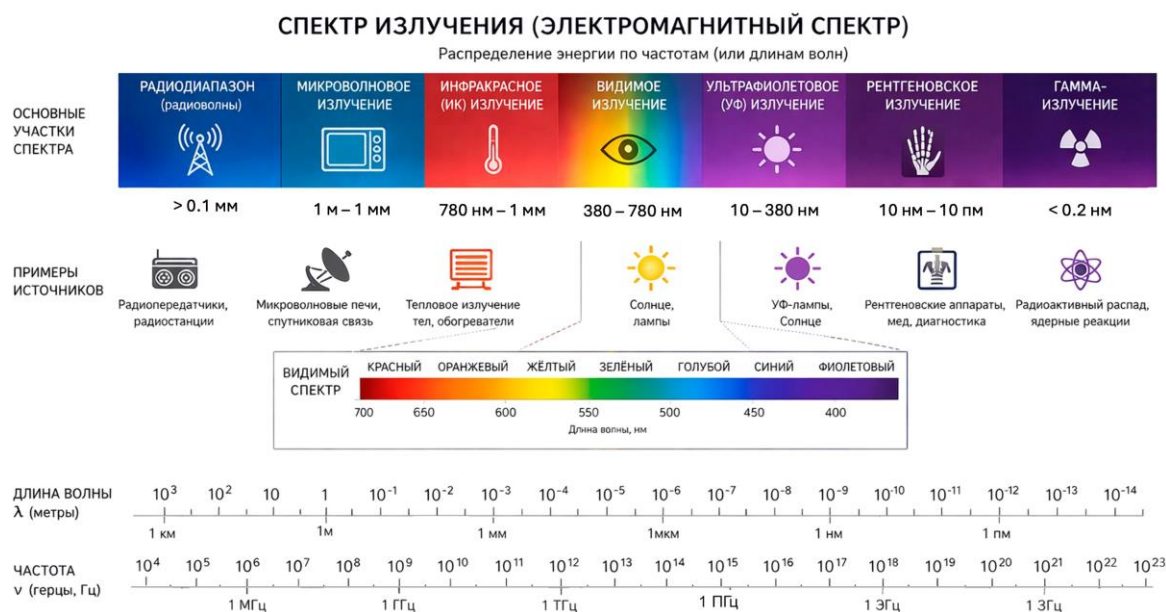


Рисунок 9 Спектральный диапазон электромагнитных волн

Метод обладает рядом существенных преимуществ. Во-первых, он является неразрушающим, что позволяет сохранить образец для последующих исследований. Во-вторых, он отличается высокой чувствительностью и способен выявлять даже незначительные изменения в молекулярной структуре. В-третьих, универсальность метода позволяет анализировать вещества во всех агрегатных состояниях: твёрдом, жидком и газообразном.

В процессе анализа образец облучается широким спектром инфракрасного излучения. В молекулах атомы находятся в постоянном движении и совершают колебания, подобно системе связанных пружин. Если частота падающего ИК-излучения совпадает с собственной частотой колебаний связи, происходит поглощение энергии, сопровождающееся изменением колебательного состояния. Поглощение возможно только в том случае, если колебание приводит к изменению дипольного момента молекулы.

Поглощение ИК-излучения вызывает два основных типа колебаний, представленных на Рисунке 10:

- 1) валентные (растяжение – симметричное и асимметричное);
- 2) деформационные (ножничные, маятниковые, качательные и крутильные).

Эти колебания являются «отпечатками пальцев» функциональных групп. Сигналы регистрируются интерферометром Майкельсона, который одновременно фиксирует все длины волн ИК-излучения, формируя интерферограмму. Полученные данные обрабатываются с использованием преобразования Фурье, что позволяет получить интерпретируемый спектр.

Полученный спектр может быть использован для качественного экспресс-анализа (метод «отпечатков пальцев»). В этом случае спектр сравнивается с эталонной базой данных для идентификации вещества.

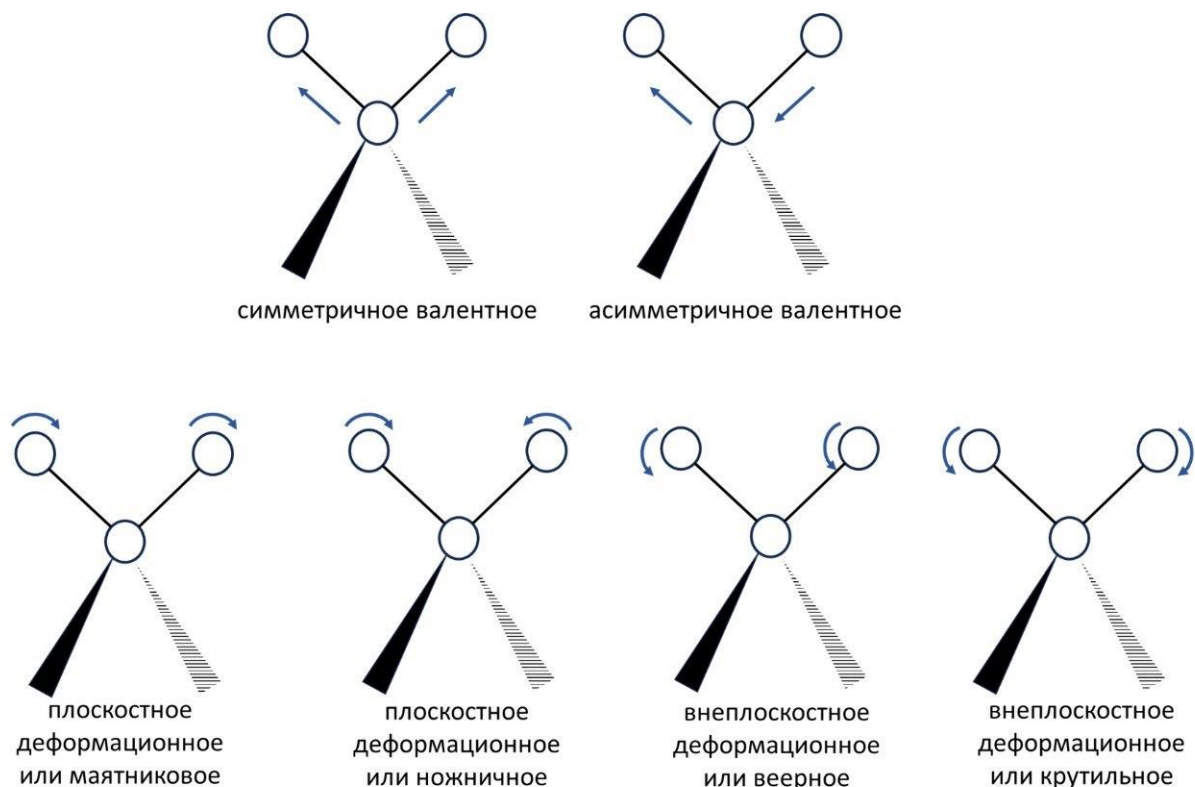


Рисунок 10 Виды растяжения и изгиба молекул

Также метод ИК-спектроскопии может быть использован для анализа молекулярного строения по характерным функциональным группам. Наличие определённых функциональных групп в молекуле проявляется в ИК-спектре в форме характерных полос поглощения. В Таблицах 3 и 4 приведены типичные частоты поглощения, а также соответствующие им функциональные группы и типы связей.

Существует несколько подходов к инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье. Одним из них является использование пропускающей кюветы, при котором инфракрасное излучение проходит непосредственно через образец, что позволяет получать спектральные данные с высоким разрешением и проводить количественный анализ. Данный метод широко применяется при анализе жидких, твердых и газообразных образцов, особенно в случаях, когда требуется строгий контроль длины пути излучения. Для облегчения этого процесса образец размещается между двумя окнами, пропускающими инфракрасное излучение. Падающий луч проходит через эту конструкцию, а интенсивность проходящего света впоследствии регистрируется детектором. Полученные спектры обычно являются спектрами пропускания и впоследствии преобразуются в спектры поглощения для детального анализа. Другим распространенным подходом является прессование таблетки бромида калия с образцом. Для этого небольшое количество анализируемого вещества (1–3 мг)

тщательно растирают в агатовой ступке с сухим бромидом калия (150–200 мг), не восприимчивым к ИК-излучению. Затем смесь прессуют под высоким давлением, получая таблетку. Преимуществом данного подхода является возможность анализа малого количества изучаемого вещества.

Таблица 3 Референтные характеристики поглощения некоторых функциональных групп

Функциональная группа	Связь	Волновое число (см ⁻¹)	Характеристики пика (интенсивность, форма)
спирты, фенолы	O-H	3650 – 3200	сильный, широкий
карбоновые кислоты	O-H	3300 – 2400	очень широкий
амины, амиды	N-H	3550 – 3060	средний, острый
алканы	C-H	3000 – 2850	сильный
алкены	C-H	3100 – 3000	средний
алкины	C-H	~3000	сильный, острый
нитрилы	C≡N	2260 – 2240	средний
ацилхлориды	C=O	~1800	сильный
сложные эфиры	C=O	1750 – 1730	сильный, узкий
альдегиды	C=O	1740 – 1720	сильный, узкий
кетоны	C=O	1725 – 1705	сильный, узкий
карбоновые кислоты	C=O	1730 – 1700	сильный, узкий
амиды	C=O	1690 – 1630	сильный
алкены	C=C	1680 – 1620	слабый - средний
арены	C=C	1600 – 1475	слабый - средний
нитросоединения	N=O	1550, 1350	сильный
спирты, простые эфиры	C-O	1300 – 1000	сильный

Таблица 4 Референтные характеристики поглощения некоторых типов связей.

Волновое число (см ⁻¹)	Связь	Тип колебания
1450 – 1350	C-H	деформационные колебания в алканах
1350 – 1200	C-O	валентные колебания в спиртах и эфирах
1300 – 1000	C-F, C-N, C-C	различные валентные колебания одинарных связей
1000 – 650	C-H	внеплоскостные деформационные колебания ароматических / алкеновых соединений
900 – 400	M-O, M-N, M-Hal	валентные колебания в неорганических оксидах / нитридах / галогенидах металлов
700 – 600	C-Cl	валентные колебания в алкилхлоридах
600 – 500	C-Br	валентные колебания в алкилбромиды
<500	C-I	валентные колебания в алкилиодидах

В зависимости от конкретных требований к образцу и эксперименту используются несколько различных типов пропускающих ячеек. Разборные кюветы состоят из двух прозрачных для ИК-излучения окон, например из бромида калия (KBr) или хлорида натрия (NaCl), разделенных прокладками, толщина которых может варьироваться от примерно 15 мкм до 500 мкм. Герметичные кюветы, с другой стороны, представляют собой постоянно

закрытые конструкции, оснащенные заливными отверстиями, что делает их подходящими для анализа летучих жидкостей или применений, требующих точной и воспроизводимой длины пути. Газовые ячейки представляют собой еще одну специализированную категорию, для которой характерны увеличенные длины пути, обычно составляющие от 10 см до 50 м. Эти ячейки оптимизированы для повышения чувствительности, что позволяет эффективно обнаруживать и количественно определять газообразные аналиты.

Еще одним методом является ИК-спектроскопия нарушенного полного внутреннего отражения (ИК-НПВО) – универсальная техника химического анализа, позволяющая получать спектральные данные путем прижатия образца к кристаллу с высоким показателем преломления. Как правило, в качестве кристалла для этого метода используются такие материалы, как алмаз, селенид цинка (ZnSe) или германий (Ge). В ходе процесса луч проходит через кристалл и отражается внутри него по крайней мере один раз на границе раздела, где расположена проба. Это взаимодействие генерирует затухающую волну, которая неглубоко проникает в пробу. Образец поглощает определенные частоты этой волны, что приводит к ослаблению, в результате которого получается спектр, напоминающий спектр, полученный с помощью стандартной просвечивающей спектроскопии.

Несмотря на то, что данный метод предлагает значительные преимущества, включая быстрый сбор данных, простоту в эксплуатации и неразрушающий анализ, необходимо учитывать определенные ограничения. Ограниченная глубина проникновения затухающей волны делает его наиболее эффективным для определения характеристик поверхности или образцов, в которых состав поверхности является характерным для материала в целом. Кроме того, данная методика иногда требует высокого контактного давления для эффективного взаимодействия между образцом и кристаллом, что может создавать риск повреждения последнего, особенно в случае хрупких или деликатных кристаллических материалов.

Исторически сложилось так, что преобладающим методом была просвечивающая спектроскопия, однако в настоящее время метод нарушенного полного внутреннего отражения в значительной степени вытеснил её в качестве основного подхода для рутинного качественного анализа как жидких, так и твердых веществ. Этот переход в первую очередь обусловлен простотой метода ИК-НПВО и отсутствием необходимости в трудоемкой подготовке проб. Тем не менее, просвечивающая спектроскопия по-прежнему остается лучшим методом в случаях, когда требуется высокоточная количественная оценка, при исследовании тонких пленок или при анализе газообразных проб.

Метод ИК-НПВО особенно полезен для жидких проб, поскольку позволяет получить подробную информацию о молекулярной структуре и составе. Жидкие пробы, как правило, однородны и просты в обращении, что обеспечивает получение точных и воспроизводимых спектральных данных.

Тип анализируемой жидкости и содержащиеся в ней аналиты определяют наиболее подходящий способ подготовки пробы и аналитический подход.

Правильный выбор метода имеет решающее значение, поскольку напрямую влияет на качество и достоверность как качественных, так и количественных результатов. Например, органические растворители относительно просты в анализе благодаря их низкому поглощению в ИК-диапазоне. Водные растворы, с другой стороны, могут быть более проблематичными, поскольку вода сильно поглощает ИК-излучение. В таких случаях ИК-НПВО является весьма эффективным, так как длина пути ИК-луча через жидкость значительно сокращается. С жидкостями с высокой вязкостью, такими как масла или полимеры, может быть сложно работать с использованием традиционных пропускающих кювет; и здесь ИК-НПВО предоставляет подходящее решение, требуя лишь небольшой капли жидкой пробы на поверхности кристалла.

К числу распространенных областей применения ИК-спектроскопии жидкости относятся: пищевая промышленность и производство напитков, где она используется для выявления фальсификаторов и определения питательной ценности напитков; фармацевтическая промышленность, где она применяется для проверки чистоты сырья и подтверждения состава жидких лекарственных форм; нефтехимическая промышленность, где она используется для определения характеристик различных растворителей, таких как глубокие эвтектические растворители, смазочные материалы и топлива; а также мониторинг окружающей среды для выявления загрязняющих веществ в водных объектах.

При газовом анализе методом ИК-спектроскопии инфракрасное излучение проходит через газовую пробу, размещенную в специальной газовой кювете. При этом используются принципы абсорбционной спектроскопии для идентификации и количественного определения соединений на основе их характерных молекулярных колебательных спектров. Данный метод требует использования приборов с высоким разрешением, а при анализе газов в низких концентрациях – кювет с большой длиной пути, составляющей от примерно 10 см до нескольких метров, для достижения необходимой чувствительности. Клетки с коротким путем прохождения, обычно длиной около 10 см, подходят для анализа газов, присутствующих в высоких концентрациях, тогда как многопроходные клетки с длинным путем прохождения необходимы для обнаружения следовых количеств газов в диапазоне частот на миллион или частот на миллиард. Кроме того, в применениях, связанных с мониторингом выбросов или анализом коррозионных газов, газовые ячейки часто нагреваются, зачастую до температур до 180 °С, чтобы предотвратить конденсацию и обеспечить точность измерений. Обычные области применения ИК-спектроскопии газов включают мониторинг выбросов, где он используется для анализа дымовых труб или автомобильных выхлопных газов; атмосферные исследования для измерения парниковых газов; анализ токсичных газов; и мониторинг процессов, где он используется для анализа чистоты или состава газа в режиме реального времени.

2.3 Спектроскопия комбинационного рассеяния

Спектроскопия комбинационного рассеяния (КР, в зарубежной литературе – *рамановская спектроскопия*) представляет собой неразрушающий метод анализа, который наряду с ИК-спектроскопией позволяет изучать колебательные, вращательные и другие низкочастотные моды молекул и кристаллов. Метод основан на эффекте неупругого (комбинационного) рассеяния света.

Эффекты комбинационного рассеяния были независимо открыты *Л. И. Мандельштамом* и *Г. С. Ландсбергом* в Московском государственном университете (МГУ) при изучении рассеяния света в кристаллах, а также *Ч. В. Раманом* и *К. С. Кришнаном* в Университете Калькутты (Индия) при изучении особенностей поляризации рассеянного света в дистиллированной воде и других прозрачных жидкостях. Обе группы представили экспериментальные результаты обнаружения спектральных линий, присущих новому эффекту, в 1928 году.

Физическая основа комбинационного рассеяния состоит в неупругом рассеянии очень незначительной доли фотонов (менее одной частицы на миллион) при их взаимодействии с веществом. В отличие от упругого (рэлеевского) рассеяния большей части фотонов, происходящего без изменения длины волны и потери энергии, неупругое (комбинационное) рассеяние происходит с изменением энергии фотона на величину, равную энергии колебательного или вращательного кванта молекулы.

Различают два основных типа комбинационного рассеяния:

Стоксово рассеяние (Stokes). Наиболее интенсивное при комнатной температуре. Молекула забирает энергию у фотона и переходит с основного колебательного уровня на возбуждённый. Рассеянный фотон имеет меньшую энергию и частоту, и соответственно, большую длину волны.

Антистоксово рассеяние (*anti-Stokes*). Менее интенсивное рассеяние. Молекула, изначально находящаяся в возбуждённом колебательном состоянии, при взаимодействии с фотоном отдаёт ему часть энергии и переходит в состояние с меньшей энергией колебаний. Соответственно, в результате такого взаимодействия рассеянный фотон имеет большую частоту и меньшую длину волны.

Принципиальным отличием от ИК-спектроскопии является сам физический принцип, заложенный в основе метода. В спектроскопии КР фотон не поглощается веществом, а «переизлучается» (молекула поглощает один фотон и почти сразу испускает другой).

В квантовой картине комбинационное рассеяние – это двухфотонный процесс. (1) Молекула поглощает фотон падающего света (частота ν_0) и переходит на виртуальный (нереальный) энергетический уровень. (2) Почти мгновенно (за время $\sim 10^{-12} - 10^{-14}$ с) она испускает (переизлучает) новый фотон с другой частотой $\omega = \nu_0 \pm \nu_{\text{ИК}}$, где $\nu_{\text{ИК}}$ – частота колебательного, вращательного или другого перехода в молекуле. При этом энергия обменивается между светом и веществом (стоксово или анти-стоксово рассеяние).

В классической электродинамике этот процесс описывается как индуцированный осциллирующий дипольный момент молекулы, который излучает (переизлучает) волну с комбинационными частотами.

Для лучшей наглядности процесс упругого (рэлеевского) и неупругого (комбинационного) рассеяния схематично показаны на энергетической диаграмме в сравнении с поглощением ИК-излучения (см. Рисунок 11).

Для появления рамановской линии необходимо, чтобы колебание вызывало изменение поляризуемости молекулы. Интенсивность комбинационного рассеяния пропорциональна изменению поляризуемости. В этом проявляется основное отличие КР от ИК-спектроскопии, в которой детектируемый сигнал связан с изменением дипольного электрического момента и поляризацией атомов. Благодаря этой особенности, взаимодействия, имеющие большую интенсивность при комбинационном рассеянии, часто менее выражены в спектрах поглощения инфракрасного излучения, и наоборот.

Так, в случае вибрационных колебаний сильно поляризованной химической связи происходит лишь незначительное изменение ее длины, что при взаимодействии с фотоном дает весьма слабый результирующий эффект комбинационного рассеяния. При этом значительное изменение чистого дипольного момента во время вибрации способствует сильному поглощению инфракрасного излучения.

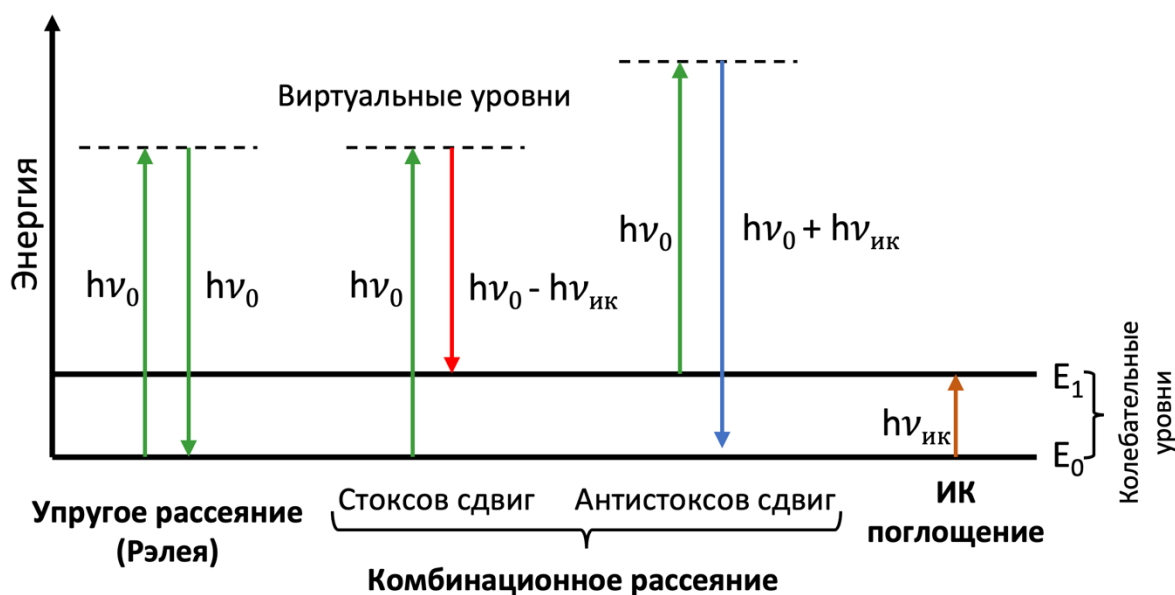


Рисунок 11 Энергетическая диаграмма упругого и комбинационного рассеяния света, а также ИК поглощения

В обратном случае, когда полярность химических связей относительно невысокая, взаимодействие с электромагнитным излучением может приводить к значимым изменениям в поляризации и, как следствие, выраженному комбинационному рассеянию; в то время как слабое изменение дипольного момента не способствует выраженному поглощению инфракрасного излучения.

Таким образом, методы ИК-спектроскопии и спектроскопии КР во многом комплементарны: то, что слабо выражено в одном методе, часто заметно проявляется в другом. Основные различия КР и ИК спектроскопии приведены в Таблице 5.

Таблица 5 Основные особенности ИК и КР спектроскопии.

Параметр	КР-спектроскопия	ИК-спектроскопия
Правило отбора	изменение поляризуемости	изменение дипольного момента
Вода как растворитель	практически не влияет	сильно поглощает
Симметричные колебания	активны	часто не детектируются
Асимметричные колебания	часто не детектируются	активны

Современные приборы спектроскопии КР включают в себя следующие компоненты:

- *Источник возбуждения.* Для возбуждающего излучения используется лазер видимого или ближнего ИК диапазона (видимый диапазон: 532, 633 нм; ближний ИК: 785, 1064 нм) мощностью 10–500 мВт.
- *Оптическая схема* для фокусировки рассеянного сигнала: объективы или линзы.
- *Фильтры для подавления рэлеевской линии.* Они выполняют важную роль в детекции сигнала, поскольку интенсивность упругого (рэлеевского) рассеяния обычно в 10^6 – 10^8 раз выше интенсивности комбинационного рассеяния.
- *Анализатор (спектрограф).* В современных приборах обычно используется дифракционный монохроматор или интерферометр Майкельсона.
- *Детектор.* Обеспечивает систему детекции и записи спектра.

Схема установки для проведения спектроскопии комбинационного рассеяния показана на Рисунке 12.

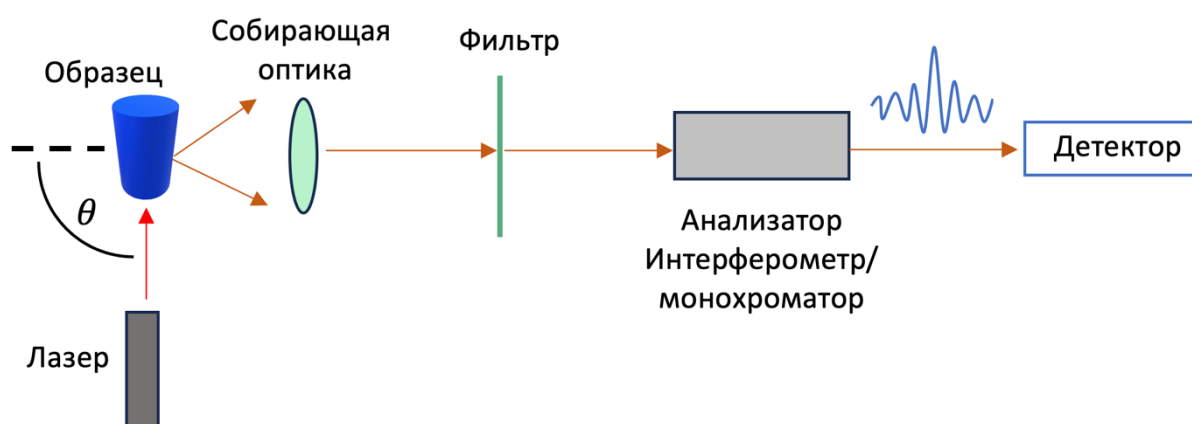


Рисунок 12 Схема установки спектроскопии комбинационного рассеяния

На схеме установки спектроскопии комбинационного рассеяния угол между направлением возбуждающего лазерного излучения и направлением сбора рассеянного света (угол θ) определяет геометрия рассеяния. Поскольку угол θ непосредственно определяет ту часть сферически рассеянного излучения,

которое попадёт в собирающую оптику, выбор геометрии эксперимента влияет на ряд его физических и практических параметров.

В ранних установках использовалась преимущественно 90° геометрия (прямой угол, боковое наблюдение). В этой геометрии сбор сигнала осуществляется перпендикулярно направлению возбуждающего излучения.

К *преимуществам* 90° геометрии относятся:

- Лучшее подавление упругого рассеяния (рэлеевской полосы).
- Удобство изучения поляризационных свойств рамановских линий.
- Удобство проведения экспериментов с жидкими и газообразными образцами.
- Меньший нагрев образца в некоторых случаях.

К *недостаткам* 90° геометрии относятся:

- Ограничение в компактности прибора.
- Относительно слабый сигнал (собирается относительно малая доля рассеянного света).

В настоящее время установки с 90° геометрией используются редко, преимущественно для высокоточных поляризационных измерений.

В большинстве современных коммерческих приборах рамановской спектроскопии, включая портативные приборы и спектрометры для микроскопических исследований, используют 180° геометрию (обратного рассеяния). Сбор рассеянного света в таких приборах производится в том же направлении, откуда изначально производилось возбуждающее излучение.

К *преимуществам* 180° геометрии относятся:

- Максимальная эффективность сбора сигнала (особенно с высокоапертурными объективами).
- Возможность проведения т.н. «микро-рамановской» спектроскопии – микроскопии, совмещённой со спектроскопией КР и конфокальной микроскопией.
- Удобство использования для непрозрачных, порошковых, тонкоплёночных и объёмных образцов.

К *недостаткам* 180° геометрии относятся:

- Относительно сильный фон от упругого (рэлеевского) рассеяния.
- Повышенный нагрев образца при использовании лазера высокой мощности.

На практике спектры обычно изображают не по абсолютной длине волны, а по *рамановскому сдвигу* $\Delta\tilde{\nu}$, измеряемому в обратных сантиметрах (см^{-1}):

$$\Delta\tilde{\nu} = \tilde{\nu}_0 - \tilde{\nu}_s,$$

где $\tilde{\nu}_0$ – волновое число возбуждающего лазера, а $\tilde{\nu}_s$ – волновое число рассеянного света. Рамановский сдвиг не зависит от длины волны лазера и напрямую соответствует энергии колебания. Типичные значения лежат в диапазоне 100–4000 см^{-1} . Пример спектра КР для циклогексана, имеющего относительно неполярные химические связи, показан на Рисунке 13.

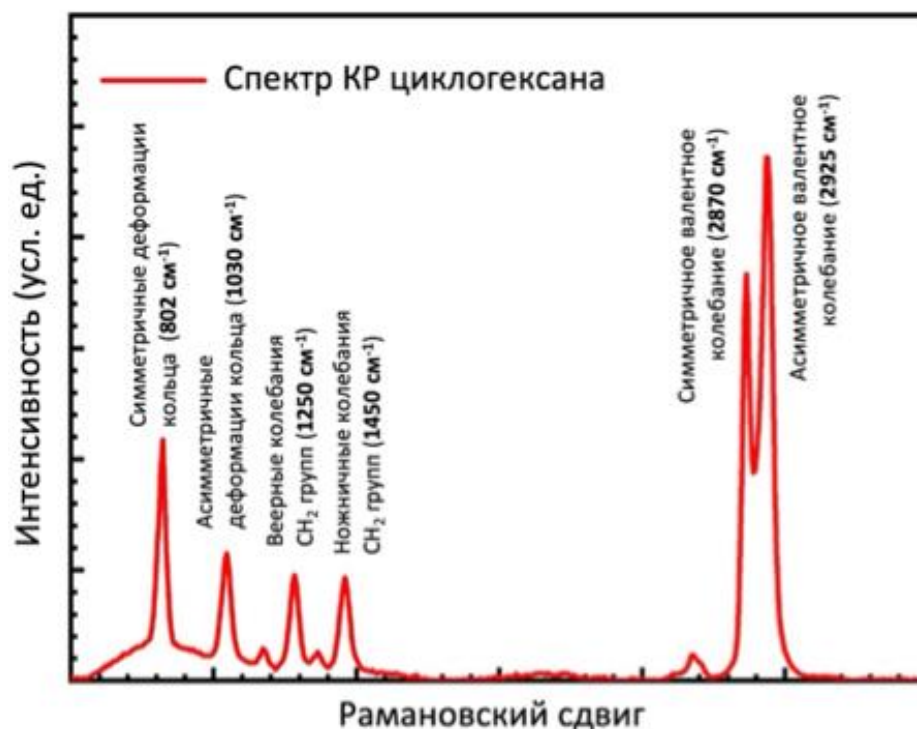


Рисунок 13 Пример спектра КР для циклогексана (по данным H. Ren, J. Zhang, L. Peng, H. Li, Z. Su. *Multirole 3D-Printed Modular Spectrometer for Various Teaching Spectral Experiments in the Classroom and at Home // J. Chem. Educ.*, 2023, Vol. 100, № 11, P. 4307–4317)

Референтные характеристики комбинационного рассеяния для некоторых функциональных групп, характерных для продуктов органического синтеза, приведены в Таблице 6.

Таблица 6 Референтные значения рамановского сдвига некоторых функциональных групп

Диапазон, см ⁻¹	Тип колебания / функциональная группа	Интенсивность в спектре КР	Примечание
100–200	Колебания решётки (кристаллы)	Сильная	Низкочастотная область
250–400	Деформации С–С (алифатические цепи)	Сильная	—
430–550	Валентные колебания S–S (дисульфидные мостики)	Сильная	Важно для анализа белков
460–550	Симметричные валентные колебания Si–O–Si	Сильная	Сигнал заметен в растворах полисиликатов, кремнийорганики, а также в кристаллическом кварце; в аморфном стекле сигнал значительно уширяется и не мешает анализу

Продолжение Таблицы 6

480–660	Валентные C–I	Сильная	—
500–700	Валентные C–Br	Сильная	—
550–800	Валентные C–Cl	Сильная	—
630–790	Валентные C–S (алифатический)	Сильная	—
800–970	Симметричные валентные C–O–C (эфиры)	Средняя / слабая	—
990–1100	Симметричные деформации ароматического кольца (ring breathing)	Очень сильная	Классический пик ~1000 см ⁻¹
650–1250	C=S	Сильная	Тиокарбонильные группы
700–1000	Симметричные деформации циклогексана и других насыщенных колец	Очень сильная	Пример: 802 см ⁻¹ в циклогексане
900–1100	Симметричная Деформация ароматического кольца	Средняя	—
1320–1350	Симметричное валентное колебание NO ₂	Очень сильная	Нитрогруппы
1400–1470	Веерные и ножничные Деформации CH ₂ / CH ₃ (scissoring, wag)	Средняя	—
1450–1600	Валентные колебания в ароматических кольцах	Сильная / средняя	Часто два пика ~1580 и 1600 см ⁻¹
1550–1700	Валентные C=O (Амиды, соединённые с N–H)	Сильная	Белки
1620–1680	Валентные C=C (алкены)	Очень сильная	Особенно в симметричных молекулах
1680–1750	Валентные C=O (кетоны, альдегиды, сложные эфиры, карбоновые кислоты)	Средняя / слабая	Слабее, чем в ИК
2100–2260	Валентные C≡C (алкины)	Сильная	Особенно терминальные алкины
2220–2260	Валентные C≡N (нитрилы)	Средняя / сильная	—
2550–2600	Валентные S–H (тиолы)	Сильная	—
2800–3000	Валентные колебания C–H (алканы, CH ₂ , CH ₃)	Сильная	—
3000–3100	Валентные колебания =C–H (алкены, ароматические)	Сильная	—
3200–3500	Валентные N–H (амины, амиды)	Средняя	—
3100–3650	Валентные O–H (спирты, фенолы, карбоновые кислоты)	Слабая / средняя	Часто широкая, слабее чем в ИК

2.4 Спектроскопия видимого и ультрафиолетового диапазона

Ультрафиолето-видимая (УФ-Вид) спектроскопия – это аналитический метод, позволяющий количественно оценить поглощение ультрафиолетового и видимого света образцом в зависимости от длины волны, в результате чего получается характерный спектр поглощения. Этот метод широко используется для идентификации неизвестных соединений, количественного определения концентрации светопоглощающих веществ, а также для исследования физических и электронных свойств как органических, так и неорганических веществ. Принцип, лежащий в основе этого метода, заключается во взаимодействии фотонов с валентными электронами атомов или молекул вещества. Когда фотон поглощается, его энергия передается электрону в атоме или молекуле, переводя его в состояние с более высокой энергией. Спектроскопическое измерение фиксирует поглощение энергии, соответствующее этому переходу.

На практике спектроскопия в видимом и УФ-диапазоне предполагает подготовку образца путем его растворения в растворителе, который не создает помех для поглощения в соответствующем спектральном диапазоне. Обычно это вода, этанол или метанол. Растворитель должен быть прозрачным в интересующем диапазоне; обязательно проводится «пустое» измерение чистого растворителя, чтобы вычесть вклад его поглощения. Экспериментальная установка предполагает размещение образца, находящегося в прозрачной кювете известной длины, между источником света и детектором (Рисунок 14). Следует отметить, что в то время, как для видимого диапазона можно использовать стеклянные или пластиковые кюветы, в УФ-измерениях используются только кюветы из кварца и плавленого кремнезема, поскольку эти материалы не обладают сильным поглощением в ультрафиолетовом диапазоне.

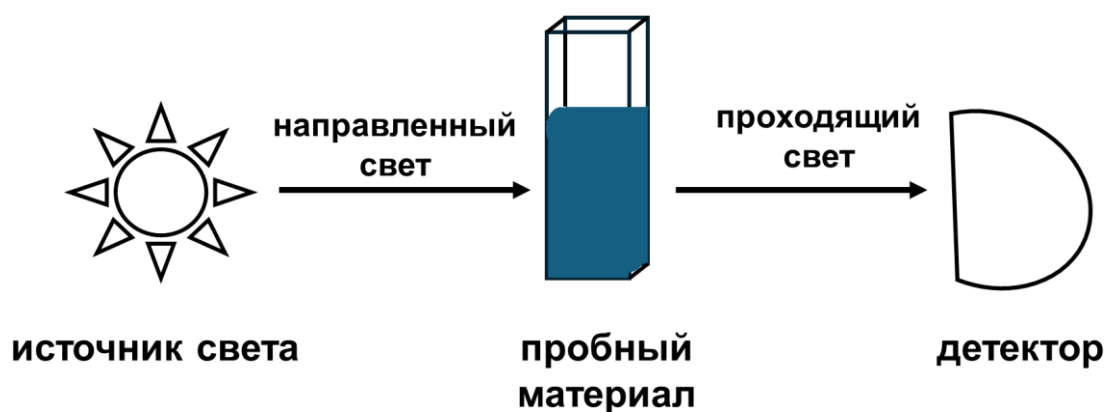


Рисунок 14 Схема спектрометра в видимом и УФ-диапазоне

Для идентификации неизвестного соединения образец облучают светом, охватывающим весь ультрафиолетовой-видимый диапазон электромагнитного спектра (от 200 до 800 нм), с целью определения длин волн, при которых наблюдается максимальное поглощение. Электронные спектры поглощения в ультрафиолетовой и видимой областях возникают при взаимодействии электромагнитного излучения с молекулами и сопровождаются энергетическими

переходами электронов с занятых молекулярных орбиталей на вакантные. Энергия кванта света в этом диапазоне достаточно для возбуждения валентных электронов. При этом длины волн максимумов поглощения λ_{max} служит в качестве «отпечатка пальца». Эти максимумы поглощения выступают в качестве диагностических маркеров, позволяющих установить идентичность соединения и его структурные характеристики.

Спектроскопия в видимом и УФ-диапазоне также дает ценную информацию об электронной структуре и энергетических уровнях соединений. Полосы поглощения, наблюдаемые в спектре, как правило, обусловлены электронными переходами $\pi \rightarrow \pi^*$ и $n \rightarrow \pi^*$. На Рисунке 15 показана схема возможных электронных переходов между связывающими, несвязывающими и разрыхляющими орбиталями.

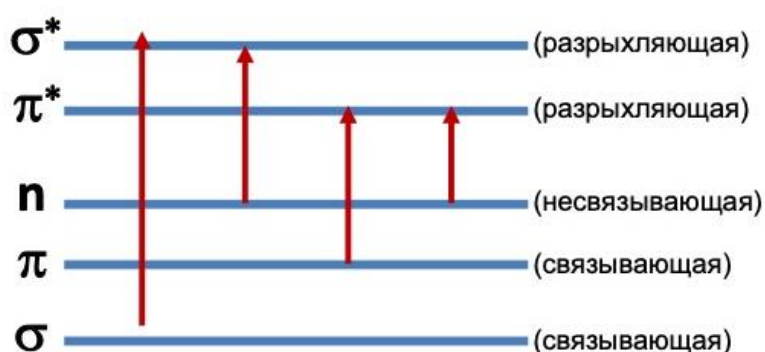


Рисунок 15 Схема молекулярных орбиталей и возможных электронных переходов при поглощении света в УФ и видимом диапазоне.

Колебательные и вращательные переходы имеют существенно меньшую энергию. В соответствии с приближением Борна-Оппенгеймера изменение энергии молекулы ΔE включает изменения энергий её электронной ($\Delta E_{эл}$), колебательной ($\Delta E_{кол}$) и вращательной ($\Delta E_{вр}$) составляющих:

$$\Delta E \approx \Delta E_{эл} + \Delta E_{кол} + \Delta E_{вр}.$$

Поскольку $\Delta E_{эл} \gg \Delta E_{кол} \gg \Delta E_{вр}$, каждый электронный переход сопровождается изменением колебательного и вращательного состояний молекулы в соответствии с величиной энергии поглощаемого фотона. Таким образом, совокупность возможных изменений колебательных и вращательных состояний молекулы, сопровождающих электронный переход, приводит к уширению полос поглощения, наблюдаемому в электронных спектрах.

Характерные особенности основных типов электронных переходов в молекулах приведены в Таблице 7.

Определяя длину волны начала поглощения, можно оценить ширину запрещенной зоны соединения. Кроме того, сдвиги максимумов поглощения как в красную, так и в синюю сторону могут свидетельствовать об изменениях

полярности среды. Спектральные профили можно использовать для подтверждения чистоты веществ и выявления присутствия примесей.

Таблица 7 Основные типы электронных переходов в молекулах

Переход	Характерная особенность
$\sigma \rightarrow \sigma^*$	Наблюдаются в области длин волн ниже 200 нм. Характерны для насыщенных углеводородов. Пример: CH_4 (125 нм)
$n \rightarrow \sigma^*$	Наблюдаются в области 200–250 нм. Характерны для соединений с гетероатомами (галогены, кислород, азот). Примеры: $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$ (190 нм), CH_3NH_2 (213 нм)
$\pi \rightarrow \pi^*$	Наблюдаются в области 200–700 нм. Характерны для всех ненасыщенных органических соединений. Характерны для кратных связей ($\text{C}=\text{C}$, $\text{C}=\text{O}$, $\text{N}=\text{O}$) и сопряженных систем. Проявляются сильными полосами поглощения часто в УФ-области, сдвигаясь к видимой области при сопряжении. Имеют относительно высокую интенсивность ($\epsilon = 10^3\text{--}10^5 \text{ л}\cdot\text{моль}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$). Примеры: C_2H_4 (180 нм), CH_2O (175 нм)
$n \rightarrow \pi^*$	Наблюдаются в области 200–700 нм. Характерны для карбонильных соединений, нитрогрупп и других групп с неподелёнными электронами. Имеют относительно высокую интенсивность ($\epsilon = 10\text{--}100 \text{ л}\cdot\text{моль}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$). Пример: $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$ (277 нм)

Еще одним полезным применением спектроскопии в видимом и УФ-диапазоне является определение концентрации аналита путем измерения поглощения на определенной длине волны, обычно λ_{max} , для повышения чувствительности. Это можно сделать двумя способами. Один из них – интерполяция. При этом подходе готовят серию стандартов с известными концентрациями и измеряют их поглощение для построения калибровочной кривой (Рисунок 16), представляющей собой график зависимости поглощения от концентрации.

Следует отметить, что поглощение не должно превышать единицы, поскольку чем выше поглощение, тем выше концентрация и тем менее надежны данные. Поглощение образцом измеряется на той же длине волны. Затем концентрация образца интерполируется по калибровочной кривой.

В другом методе поглощение образца при λ_{max} используется для определения концентрации вещества по закону Бера-Ламберта:

$$c = \frac{A}{\epsilon \cdot l},$$

где c – концентрация, A – оптическая плотность; l – длина кюветы; а ϵ – молярная поглощающая способность, представляющая собой уникальную физическую константу для различных химических веществ при данной длине волны и

температуре, служит мерой степени поглощения света данным веществом, выступая в качестве константы пропорциональности в законе Бера-Ламберта.

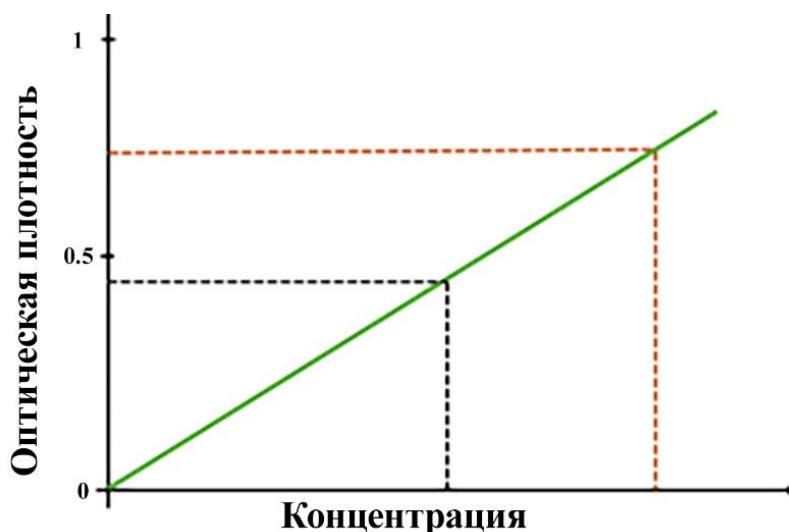


Рисунок 16 Калибровочная кривая и пример определения концентрации

Спектроскопия в видимом и УФ-диапазоне является основным инструментом для количественного анализа во многих отраслях, таких как фармацевтическая, биомедицинская, а также пищевая промышленность и производство напитков, где она широко применяется для определения концентрации анализируемых веществ и загрязнителей, таких как ионы металлов, органические соединения и биологические макромолекулы. Ее также можно использовать для мониторинга реакций в режиме реального времени путем измерения изменений поглощения на определенных длинах волн по мере изменения концентраций реагентов или продуктов с течением времени. Она позволяет определять кинетику (константы скорости, порядок реакции) путем отслеживания изменений цвета или сдвигов спектра, что широко применяется в каталитических, фотохимических и ферментативных исследованиях.

2.5 Спектрофлуориметрия

Спектрофлуориметрия (также известная как флуоресцентная спектроскопия) – это высокочувствительный аналитический метод, используемый для идентификации и количественного определения веществ путем измерения характеристик (длины волны и интенсивности) света, излучаемого ими после поглощения излучения. Спектры излучения несут в себе важную информацию о химическом составе системы, кинетике процессов, формах нахождения флуорофора в гомогенных и гетерогенных средах. В основе люминесценции лежит явление испускания света частицей, находящейся в возбужденном электронном состоянии. По методу возбуждения люминесценция делится на фото-, электро- и хемилюминесценцию; по времени жизни и мультиплетности возбужденного и основного состояний – на флуоресценцию и фосфоресценцию. Флуоресценция – быстро затухающее излучение, связанное с

переходом между состояниями без изменения мультиплетности системы, например, из возбужденного синглетного в основное синглетное состояние. Фосфоресценция – медленно затухающее излучение, отвечающее переходу между состояниями с разной мультиплетностью, например, из триплетного в синглетное. Длина волны испускания и время жизни возбужденного состояния являются индивидуальными характеристиками флуорофора. При наличии в системе нескольких компонентов-флуорофоров их индивидуальное определение возможно на основе спектральных и/или временных характеристик. Для схематического изображения процессов, происходящих при поглощении, преобразовании и испускании энергии в процессе люминесценции часто используют диаграммы Яблонского (Рисунок 17).

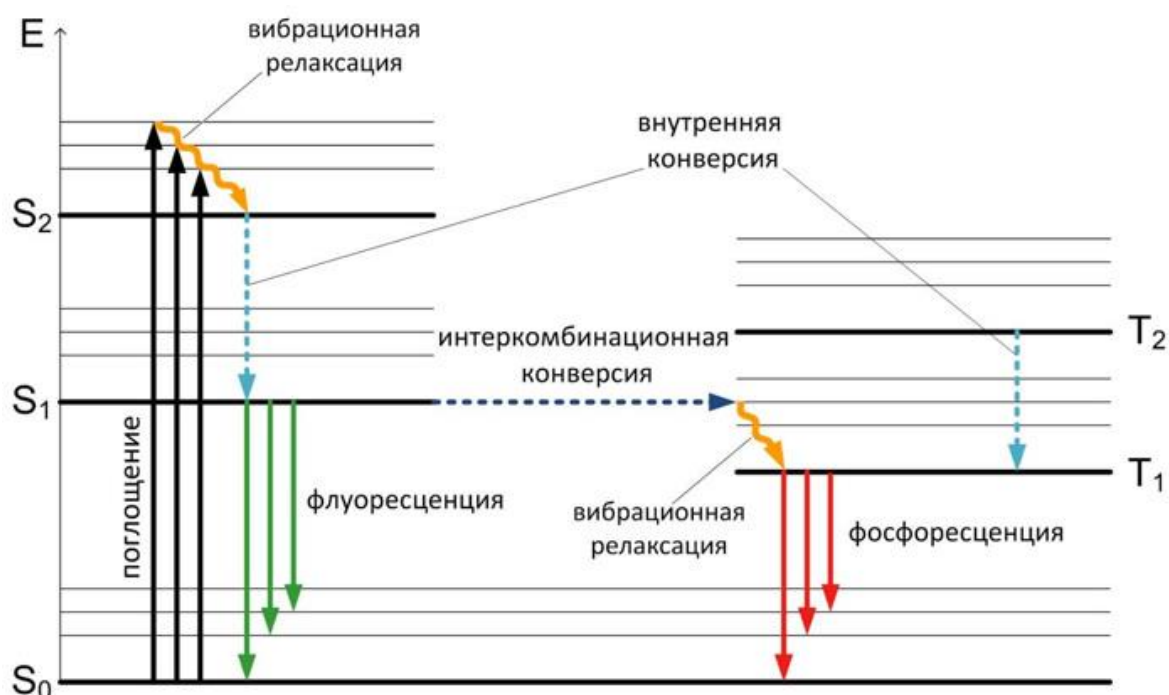


Рисунок 17 Поглощение и испускание света на диаграмме Яблонского

Спектры, отвечающие излучению энергии, называют спектрами испускания, или спектрами флуоресценции (фосфоресценции) – зависимость интенсивности испускаемого излучения от его длины волны. При этом возбуждение системы (в случае фотолюминесценции) обеспечивается облучением с фиксированной длиной волны. Различают также и спектры возбуждения флуоресценции, которые представляет собой зависимость интенсивности испускания при фиксированной длине волны от длины волны возбуждения. Если испускание возбуждённой молекулы происходит из единственного состояния, то спектр поглощения совпадает по форме со спектром возбуждения флуоресценции.

Наиболее часто для получения спектров флуоресценции, а также спектров возбуждения флуоресценции аппаратно реализуется оптическая схема, показанная на Рисунке 18:

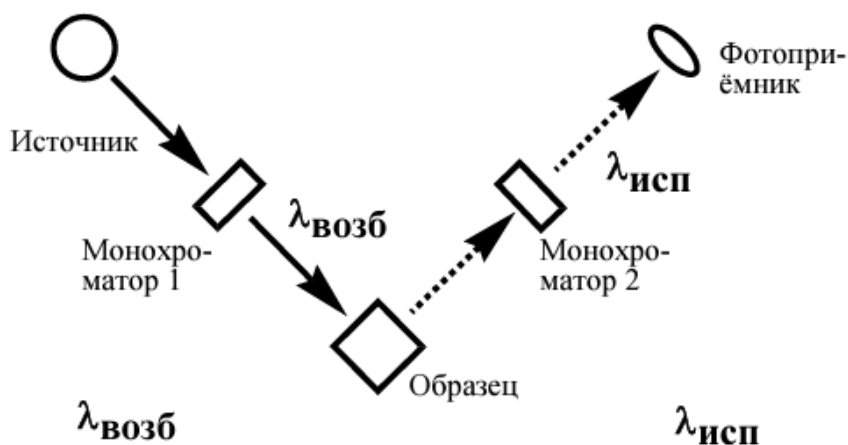


Рисунок 18 Оптическая схема регистрации люминисценции, записываемых при различных режимах работы монохроматоров

В данной схеме источник излучения и фотоприемник, если смотреть от образца, находятся под прямым углом друг к другу для уменьшения попадания возбуждающего излучения в детектор. Кроме того, часто в приборах существует возможность разложения в спектр как возбуждающего, так и испускаемого образцом излучения. Для этого в него вводят два монохроматора. Если с помощью *монохроматора 1* фиксируют длину волны излучения ($\lambda_{\text{возб}}$), а для записи испускаемого используют *монохроматор 2*, то в результате получают спектр испускаемого (флуоресценции) образца. Если же при помощи *монохроматора 2* фиксируют длину волны испускаемого ($\lambda_{\text{исп}}$), то изменяя длину волны *монохроматора 1*, получают спектр возбуждения флуоресценции образца. В случае единственного испускаемого возбуждённого состояния спектр испускаемого (флуоресценции) не зависит от длины волны возбуждения. Избыток энергии возбуждения (см. Рисунок 17) над нижним электронно-колебательным возбуждённым уровнем (S_1) расходуется на внутреннюю конверсию флуорофора. Этот факт является основополагающим при доказательстве присутствия в системе флуорофора. Для флуорофоров выполняется правило зеркальной симметрии Лёвшина, согласно которому спектры поглощения и люминесценции, построенные в одних координатах, являются зеркальными отражениями друг друга. Пример показан на Рисунке 19. Если в спектре поглощения присутствует несколько полос, то зеркальной по отношению к спектру люминесценции является полоса, отвечающая возбуждённому состоянию, из которого происходит испускание. С помощью правила Лёвшина можно идентифицировать такие полосы поглощения.

Правило Лёвшина выполняется, если близки геометрии молекул в основном и возбуждённом состояниях, а также энергии их колебательных уровней в этих состояниях, отсчитанные от энергии нулевых колебаний. Возбуждение, как правило, происходит с нижнего колебательного уровня основного состояния на случайный (соответствующий конкретной энергии поглощаемого кванта) уровень (см. Рисунок 18). Поэтому форма пика в спектре поглощения отвечает распределению колебательных уровней возбуждённого

состояния. Испускание же, как правило, протекает после внутренней конверсии (или релаксации) с более высоких колебательных уровней электронного возбуждённого состояния на низший. Распределение квантов испускания по энергиям в таком случае соответствует колебательным уровням основного состояния.

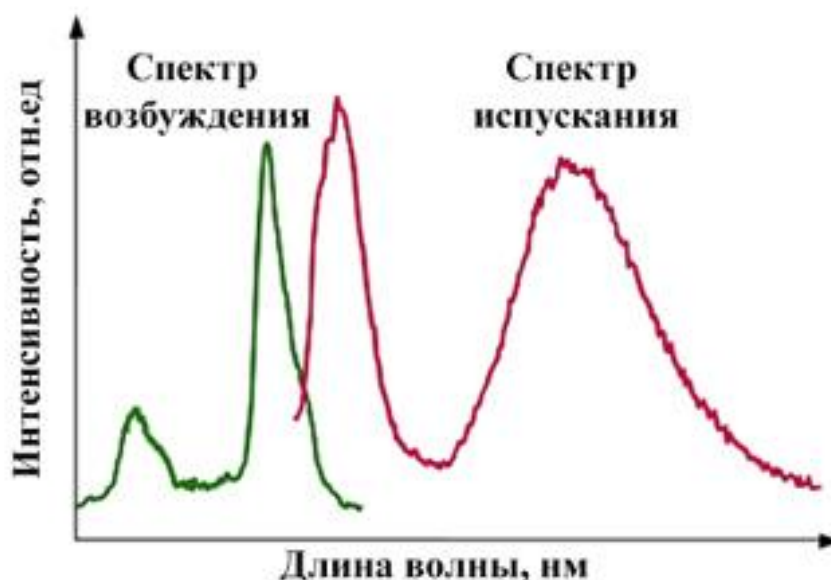


Рисунок 19 Спектры возбуждения и флуоресценции, представленные в одних координатах

Когда система (молекула или атом) поглощает энергию, она переходит в возбужденное состояние. Существует несколько возможностей для её возврата в основное состояние. Одним из них является испускание. Вследствие разных причин часть поглощенной энергии теряется в безызлучательных процессах. В результате этого испущенный фотон имеет меньшую энергию, и, следовательно, большую длину волны, чем поглощенный. Стоксов сдвиг является обобщением и уточнением правила Стокса-Ломмеля, согласно которому длина волны фотолюминесценции больше, чем длина волны возбуждающего света, то есть энергия фотонов люминесценции меньше энергии фотонов возбуждающего света. Пример приведен на Рисунке 20.

Важной характеристикой флуоресценции является квантовый выход, представляющий собой отношение испущенных и поглощенных фотонов. В пределе он равен единице – в случае, если все возбуждённые молекулы переходят в основное состояние (релаксируют) через излучательный путь. Отношение молекул, релаксирующих по излучательному и безызлучательному путям, можно также выражать через скорости испускания фотона и скорости безызлучательной конверсии. Тогда квантовый выход, близкий к единице, соответствует тому, что константа скорости внутренней безызлучательной конверсии много меньше константы скорости испускания фотона.

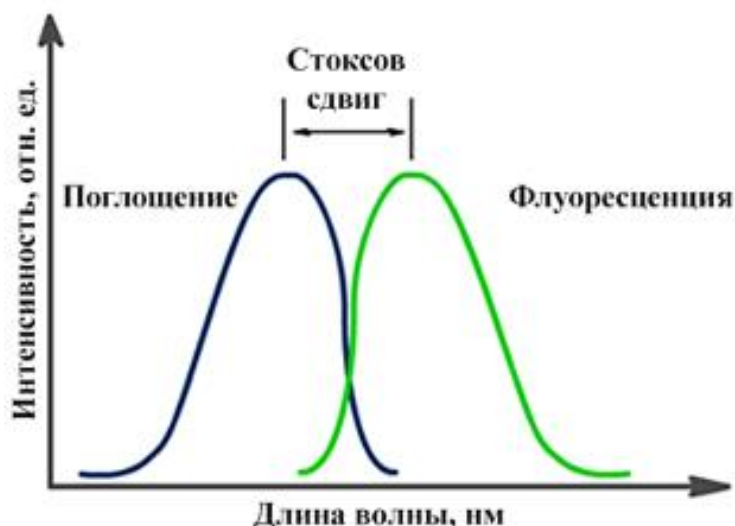


Рисунок 20 Стоксов сдвиг

Различают также и энергетический выход флуоресценции, а именно – отношение испускаемой и поглощённой энергии. Рассчитать его можно, домножив квантовый выход на отношение энергий излучённых и поглощённых квантов. Поскольку испускание происходит на более длинных волнах (Рисунок 20), энергии квантов испускания меньше. Это же показано и на диаграмме Яблонского (Рисунок 17), где видно, что внутренняя конверсия приводит к уменьшению энергии испускаемых квантов по отношению к поглощённым. Такое уменьшение называется стоксовыми потерями. Из-за таких потерь энергетический выход флуоресценции всегда меньше единицы.

На выход флуоресценции влияет и среда, окружающая молекулы флуорофора. Поскольку процессы поглощения и испускания световых квантов являются статистическими, то состав среды может сказываться на эффективности процесса. Так, растворенный кислород обладает эффектом тушения флуоресценции, связанным с безызлучательным переносом энергии возбужденного состояния флуорофора на молекулы кислорода. Следовательно, при исследовании флуоресцентных свойств вещества необходимо принимать во внимание не только процессы, происходящие непосредственно с участием молекул флуорофора, но и процессы с участием окружающей его среды.

Спектрофлуориметрия может использоваться как для качественной идентификации, так и для количественного определения флуоресцентных соединений в неизвестных образцах. Для идентификации неизвестного соединения образец подвергается сканированию, в ходе которого определяются максимальные (то есть оптимальные) длины волн возбуждения и излучения. Эти спектры создают «отпечаток», который можно сравнить с базой данных известных соединений. Количественный спектрофлуориметрический анализ очень похож на спектроскопию в видимом и УФ-диапазоне, где концентрация аналита определяется с помощью закона Бера-Ламберта. В данном случае – флуоресценция прямо пропорциональна концентрации и выражается следующим уравнением:

$$c = \frac{F}{\Phi I_0 \epsilon b},$$

где c – концентрация; F – интенсивность флуоресценции; ϵ – коэффициент поглощения; I_0 – интенсивность возбуждения; b – длина кюветы; Φ – квантовый выход образца, представляющий собой отношение числа испускаемых фотонов к числу фотонов, поглощаемых системой.

Квантовый выход обычно определяют путем сравнения флуоресценции исследуемого образца с флуоресценцией известного эталона (например, родамина В) и вычисления значения по формуле:

$$\Phi_S = \Phi_R \cdot \frac{I_S}{I_R} \cdot \frac{A_R}{A_S} \cdot \frac{n_S^2}{n_R^2},$$

где Φ_S – квантовый выход образца; Φ_R – квантовый выход контрольного образца; I_S – площадь под кривой спектра образца; I_R – площадь под эталонным спектром; A_R – поглощение эталона; A_S – поглощение образца; n_S – показатель преломления растворителя образца; n_R – показатель преломления эталонного растворителя.

Квантовый выход также можно определить непосредственно с помощью интегрирующей сферы – материала с высокой степенью отражения, который используется в спектрофлуориметре. Перед измерением прибор проходит процедуру нулевой поправки. Образец помещают в сферу, после чего измеряют рассеянный свет возбуждения и излучаемый флуоресцентный свет. Затем квантовый выход определяют по следующему уравнению:

$$\Phi = \frac{S_2}{S_0 - S_1},$$

где S_0 – интенсивность возбуждающего света, определенная при обнулении; S_1 – рассеянный возбуждающий свет; S_2 – излучаемый флуоресцентный свет.

Следует отметить, что количественный спектрофлуориметрический анализ является достоверным только при низкой концентрации образца. Это связано с тем, что при более высоких концентрациях возникает явление, известное как эффект внутреннего фильтра, в результате которого анализируемое вещество повторно поглощает излучаемый свет, что приводит к снижению наблюдаемой интенсивности.

Спектрофлуориметрия является важным инструментом для идентификации и количественного определения флуоресцентных молекул в различных областях, включая биохимию, фармацевтику и экологию. Она применяется в фармацевтическом анализе для определения содержания важных соединений, в первую очередь витаминов, гормонов и лекарственных средств; в биомедицине и биохимии – для анализа нуклеиновых кислот, белков и ферментов; а также в экологическом анализе – для обнаружения различных

загрязнителей воды и почвы, включая ионы тяжелых металлов и флуоресцентные красители.

Контрольные вопросы

1. Как используется метод «отпечатка пальца» в ИК-спектроскопии?
2. Если в ИК-спектре неизвестного соединения наблюдаются очень интенсивные полосы поглощения при 3300 см^{-1} и 1710 см^{-1} , какая функциональная группа, скорее всего, присутствует в этом соединении?
3. Что происходит с дипольным моментом молекулы, поглощающей инфракрасное излучение?
4. Как отличить альдегидную функциональную группу от амидной на ИК-спектре?
5. Какие методы ИК-спектроскопии можно использовать для анализа жидких проб?
6. Какой метод ИК-спектроскопии вы бы предложили для анализа водной пробы?
7. Какие факторы необходимо учитывать при ИК-спектроскопии проб газа с очень низкой концентрацией?
8. Почему для жидких проб предпочтительнее использовать метод ИК-НПВО, в то время как для газообразных проб по-прежнему популярен метод с использованием пропускательной кюветы?
9. Что такое комбинационное рассеяние? В чем заключается механистическое различие процессов получения ИК и КР спектров?
10. Какой основной параметр определяют в ходе записи КР спектров?
11. Ваша задача – качественно определить наличие белков третичной структуры в пробе, растворитель – вода. Какой метод (ИК или КР) вы бы предложили для решения задачи? Какой сигнал вы бы предложили для качественного определения? В какой области вы бы стали искать данный сигнал?
12. В чем будет основное отличие сигналов карбонильной группы в ИК и КР спектрах?
13. В чем заключается основной принцип спектроскопии в видимом и УФ-диапазоне?
14. Что измеряют после облучения для построения спектра поглощения соединения?
15. Зачем при спектроскопии в видимом и УФ-диапазоне требуется проводить измерение с пустым пробником?
16. Почему для спектроскопии в видимом и УФ-диапазоне не рекомендуется использовать пластиковые и стеклянные кюветы?
17. Какими двумя способами можно определить концентрацию аналита?
18. Какую информацию можно определить по спектру поглощения?
19. Концентрация аналита составляет $1,5 \cdot 10^{-5}\text{ М}$. Если длина пути прохождения составляет 1 см, а оптическая плотность при 300 нм равна 0,75, то какова молярный коэффициент поглощения?

20. Почему закон Бера-Ламберта можно использовать для определения концентрации флуоресцентных соединений, несмотря на то, что измеряется не поглощенный, а излучаемый свет?
21. Что такое квантовый выход флуорофора и почему он важен?
22. На ваш взгляд, какой метод определения квантового выхода является более эффективным и почему?
23. Определите квантовый выход аналита, растворенного в этаноле, используя в качестве эталонного стандарта сульфат хинина, растворенный в 0,1 М H_2SO_4 . Квантовый выход сульфата хинина составляет 0,55; показатель преломления этанола равен 1,36, а 0,1 М H_2SO_4 – 1,33; поглощение образца и эталона при 350 нм составляет 0,035 и 0,040 соответственно; площадь под кривой эмиссии составляет 85 000 а.е. для образца и 120 000 а.е. для эталона.
24. Как спектрофлуориметрия может быть использована в качественном анализе?

Рекомендуемая литература

1. Stuart B. H. *Infrared spectroscopy: fundamentals and applications* / B. H. Stuart. – Chichester : John Wiley & Sons Ltd., 2004. – 224 p.
2. Szymanski H. A., Erickson R. E. *Infrared band handbook* / H. A. Szymanski, R. E. Erickson. – New York : Springer, 2013. – 324 p. – ISBN 978-1-4684-6071-1.
3. Ferraro J. R., Nakamoto K., Brown C. W. *Introductory Raman spectroscopy*. – 2nd ed. – Amsterdam ; Boston : Academic Press, 2003. – 434 p.
4. Smith E., Dent G. *Modern Raman spectroscopy : a practical approach*. – 2nd ed. – Hoboken : Wiley, 2019. – 256 p.
5. McCreery R. L. *Raman spectroscopy for chemical analysis*. – New York : Wiley, 2000. – 448 p.
6. Колесов Б. А. *Прикладная КР-спектроскопия : монография* / отв. ред. Н. В. Суровцев ; Рос. акад. наук, Сиб. отд-ние, Ин-т неорганической химии им. А. В. Николаева. – Новосибирск : Изд-во СО РАН, 2018. – 400 с.
7. Edwards H. G. M. *Spectra–structure correlations in Raman spectroscopy // Handbook of vibrational spectroscopy* / ed. by J. M. Chalmers, P. R. Griffiths. – Chichester : John Wiley & Sons, 2002. – P. 1838-1872 – ISBN 978-0-471-98847-2.
8. White R. G. *Handbook of ultraviolet methods* / R. G. White. – New York : Springer, 2012. – 350 p. – ISBN 978-1-4684-7175-5.
9. Gauglitz G. *Ultraviolet and visible spectroscopy // Handbook of analytical techniques* / ed. by H. Günzler, A. Williams. – Weinheim : Wiley-VCH, 2001. – P. 659–688. – ISBN 978-3-527-30165-2.
10. Harris D. A., Bashford C. L. *Spectrophotometry and spectrofluorimetry : a practical approach*. – Oxford : IRL Press, 1987. – 312 p.
11. Vogt C., Wondergem C. S., Weckhuysen B. M. *Ultraviolet-visible (UV-Vis) spectroscopy // Springer handbook of advanced catalyst characterization* / ed. by

I. E. Wachs, M. A. Bañares. – Cham : Springer, 2023. – P. 1–28. – ISBN 978-3-031-07124-9.

12. Povrozin Y., Barbieri B. Fluorescence spectroscopy // Handbook of measurement in science and engineering. Vol. 3 / ed. by M. Kurtz. – Hoboken : John Wiley & Sons, 2016. – P. 1–25. – ISBN 978-1-118-64724-0.

РАЗДЕЛ 3 СПЕКТРОСКОПИЯ ЯДЕРНОГО МАГНИТНОГО РЕЗОНАНСА (ЯМР)

Спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР) – метод исследования веществ, основанный на явлении резонансного поглощения электромагнитных волн ядрами атомов с ненулевым спином во внешнем постоянном магнитном поле. Спин атомного ядра – это квантовомеханическая характеристика, представляющая собой полный собственный момент количества движения ядра, складывающийся из спинов и орбитальных моментов составляющих его нуклонов (протонов и нейтронов). Ненулевым спином обладают ядра атомов элементов либо их изотопов с нечетным массовым числом, то есть не содержащих одновременно чётное число нейтронов и чётное число протонов.

3.1 Физические основы метода

Принцип спектроскопии ЯМР основан на энергетической неэквивалентности состояний ядра с различным спином во внешнем магнитном поле. Изменение спина атомного ядра с переходом его на более высокий энергетический уровень становится возможным при поглощении электромагнитного излучения. Во внешнем постоянном магнитном поле более низкому энергетическому состоянию атомного ядра соответствует направление его спина в сторону, совпадающую с направлением внешнего магнитного поля, а более высокому – противоположное. Таким образом, для ядер с ненулевым вращательным моментом (спином) во внешнем магнитном поле будет происходить расщепление энергетических уровней в зависимости от состояния спина, причем энергия расщепления будет пропорциональна величине модуля вектора индукции внешнего магнитного поля B_0 . Принцип резонансного поглощения электромагнитного излучения во внешнем магнитном поле схематично показан на Рисунке 21 для простейшего ядра атома водорода.

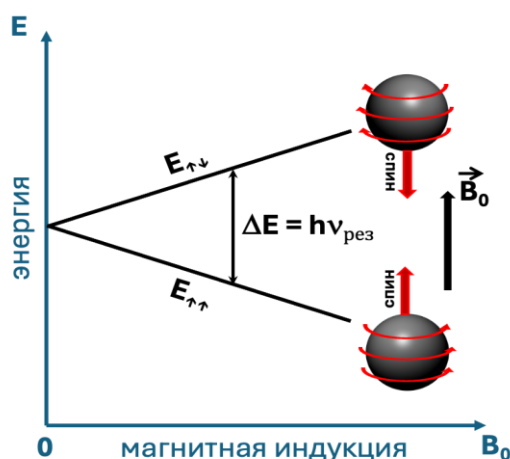


Рисунок 21 Расщепление энергетических уровней протона во внешнем постоянном магнитном поле

В силу квантовой природы углового момента ядра – суммарного орбитального и спинового момента количества движения всех входящих в ядро нуклонов (протонов и нейтронов), спиновое квантовое число I может принимать значения, кратные $1/2$, а само ядро может находиться в $2I+1$ состояниях. В отсутствии внешнего магнитного поля все эти состояния вырождены, то есть имеют одинаковую энергию. В присутствии внешнего постоянного магнитного поля B_0 вырождение снимается, и для ядра со спиновым квантовым числом I можно различить следующий набор дискретных энергетических состояний:

$$-\mu_z B_0, -\mu_z \frac{I-1}{I} B_0, \mu_z \frac{I-1}{I} B_0, \mu_z B_0,$$

где μ_z – проекция ядерного магнитного момента на направление поля [Дж/Тл].

В простейшем случае, как например, для протона со спиновым квантовым числом $I = 1/2$ (Рисунок 21), квантовое расщепление энергетического уровня составит:

$$\Delta E_{\text{протона}} = E_{\uparrow\downarrow} - E_{\uparrow\uparrow} = \mu_z B_0 - (-\mu_z B_0) = 2\mu_z B_0.$$

Соответственно, из правила частот Бора можно определить частоту электромагнитного поля, необходимую для перехода между расщепленными под воздействием внешнего магнитного поля энергетическими подуровнями ядер при поглощении ими кванта света:

$$\nu = \frac{\mu_z B_0}{h} = \frac{\gamma B_0}{2\pi},$$

где h - постоянная Планка, γ - гиромагнитное отношение.

Как видно из приведенного соотношения, резонансная частота поглощения электромагнитного излучения пропорциональна индукции постоянного магнитного поля. На практике используются электромагнитные волны преимущественно радиочастотного диапазона в пределах от единиц до нескольких сотен мегагерц при постоянном магнитном поле с индукцией в диапазоне от единиц до десятков Тесла.

В спектрометрах ЯМР первого поколения использовались высокочастотные генераторы высокой добротности с фиксированной частотой электромагнитного излучения: 200, 300, 400, 500 или 800 МГц, а резонансное поглощение фиксировалось при постепенном изменении величины индукции магнитного поля. При таком режиме спектрометрии качество получаемых спектров сильно зависит от наличия внешних помех и требует достаточно продолжительного времени сканирования. Хорошие результаты могли быть получены в исследованиях, основанных на эффекте ЯМР в ядрах атомов водорода ^1H (так называемый *протонный магнитный резонанс*), фтора ^{19}F и фосфора ^{31}P . Для этих элементов характерны высокое содержание ЯМР-чувствительного изотопа, большой магнитный момент (гиромагнитное

отношение) и значение спинового квантового числа $I = 1/2$, что обеспечивает высокую чувствительность их детектирования и относительно простую интерпретацию полученных спектральных сигналов. Также известны исследования, проводимые на изотопах с меньшим естественным содержанием в природе, такими как ^{11}B , ^{13}C , ^{17}O .

Большинство современных ЯМР-спектрометров являются приборами импульсного типа и обладают более высокой чувствительностью и разрешением, что расширяет диапазон детектируемых ядер. Принцип работы таких приборов основан на быстром импульсном возбуждении всех резонирующих ядер с последующим спектральным анализом сигнала их релаксации. Во внешнем магнитном поле заселенности расщепленных подуровней зависят от температуры и описываются статистическим распределением Больцмана. Разница между заселенностями верхнего и нижнего уровней определяет результирующий магнитный момент (намагниченность). При импульсном радиочастотном возбуждении возникает кратковременное неравновесное перераспределение заселенностей верхних и нижних энергетических подуровней с последующей релаксацией. Как следствие, это сопровождается изменением макроскопической намагниченности. В свою очередь, изменение магнитного потока регистрируется приёмной катушкой ЯМР-спектрометра (намотанной вокруг ампулы с веществом). Индуцируемый в приемной катушке электрический ток представляет собой затухающий сигнал спада свободной индукции (FID - Free Induction Decay). Итоговые спектральные характеристики поглощения получаются посредством преобразования Фурье сигнала FID, в котором присутствуют спектральные компоненты поглощения от всех резонирующих атомов.

3.2 Количественный и качественный анализ. Химический сдвиг

Количественный анализ содержания ЯМР-чувствительных ядер в исследуемых образцах возможен при обработке спектров высокого разрешения с хорошо различимыми узкими спектральными линиями, интенсивности либо ограничиваемые площади которых пропорциональны количеству резонирующих ядер в соответствующем химическом окружении. Однако из-за явлений релаксации (см. далее), количественный анализ возможен преимущественно для протонных систем. Например, для ядер атома углерода интегральная интенсивность спектрального сигнала сильно зависит от обменного взаимодействия с окружающими ядрами с ненулевым спином.

Химический сдвиг – разность между регистрируемой резонансной частотой поглощения ядра атома, находящегося в состоянии обменного взаимодействия с химическим окружением, и эталонной резонансной частотой поглощения для соответствующего ядра атома. Возникновение химического сдвига обусловлено эффектом экранирования, проявляющимся в изменении локального магнитного поля в месте нахождения резонирующего ядра атома за счет влияния вторичных магнитных полей электронов, которое, в свою очередь, зависит от распределения

электронной плотности в молекуле. Вследствие такого экранирования возникает поправка, определяемая безразмерной константой экранирования σ :

$$B_{эфф} = B_0 (1 - \sigma)$$

Величина константы экранирования зависит от распределения электронной плотности вблизи ядра и влияет на положение спектральных линий. Так, например, в молекуле этанола наибольшая электронная плотность приходится на протоны метильной группы, а наименьшая – на протоны гидроксильной группы; соответственно, резонансное поглощение фотонов одинаковой энергии протонами метильной группы будет происходить в более сильном магнитном поле, а гидроксильной – в более слабом. Этот эффект был впервые показан Джеймсом Арнольдом в его диссертационном исследовании (Рисунок 22) и является классическим примером демонстрации химического сдвига и базовых возможностей количественного анализа ЯМР-спектроскопии. Триплет, видимый в низком разрешении, отлично иллюстрирует проявление химического сдвига для ядер атомов водорода, находящихся в разном химическом окружении в молекулах этанола CH_3-CH_2-OH . При этом уширение спектральных линий пропорционально количеству резонирующих ядер в неэквивалентных позициях и находится в соотношении 3:2:1 для протонов, находящихся в метильной, метиленовой и гидроксильной группах, соответственно.

В современных экспериментальных установках высокого разрешения более точно можно определить резонансную частоту электромагнитного поля при неизменной величине индукции постоянного магнитного поля. В таком случае смещение спектральных линий с учетом химического сдвига определяется выражением:

$$\nu_{эфф} = \gamma B_0 (1 - \sigma) / 2\pi,$$

Поскольку на практике величину химического сдвига невозможно измерить в абсолютной шкале, то есть выразить смещение спектра относительно гипотетических линий изолированных неэкранированных электронами ядер атомов, то для его характеристики проводят измерения с использованием эталонных веществ и выражают в безразмерных единицах миллионных долей:

$$|\delta| = (|\nu - \nu_{эт}| / \nu_0) \cdot 10^6 \text{ (м.д.)},$$

где $|\nu - \nu_{эт}|$ – модуль разности резонансных частот для сигналов ядер, измеренных в исследуемом веществе и в эталонном соединении, а ν_0 – рабочая частота прибора.

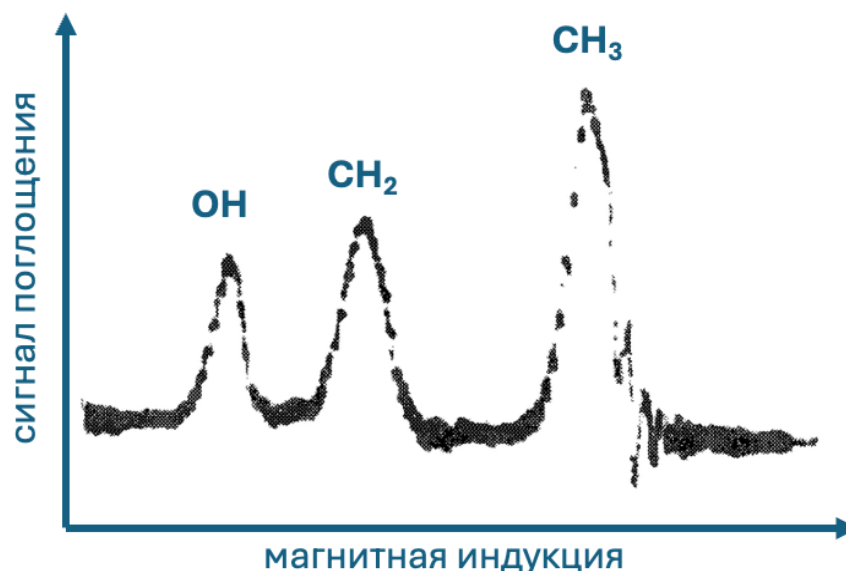


Рисунок 22 Спектр низкого разрешения ^1H -ЯМР этанола. (Arnold, J. T., Dharmatti, S. S., Packard, M. E. *Chemical Effects on Nuclear Induction Signals from Organic Compounds // J. Chem. Phys.*, 1951, Vol. 19, P. 507-507)

Так, для измерений спектров органических веществ, содержащих ^1H и ^{13}C , в качестве эталона наиболее часто используют тетраметилсилан $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$ (ТМС). Небольшое количество этого вещества добавляется в исследуемый образец непосредственно перед съемкой. Это устойчивое, химически инертное соединение обладает низкой температурой кипения ($27\text{ }^\circ\text{C}$), что способствует его быстрому удалению в результате естественного испарения. На ЯМР спектрах ТМС проявляется узкими выраженными спектральными линиями, соответствующими двенадцати эквивалентным ядрам водорода и четырем эквивалентным ядрам углерода. При известном положении спектральных линий эталона обработка результата ЯМР-спектроскопии проводится следующим образом: определяются модули разности резонансных частот сигналов исследуемого вещества и эталона, затем эти разности делятся на рабочую частоту прибора и домножаются на 10^6 . Полученный результат, выраженный в миллионных долях, является относительным и не зависит от величины индукции магнитного поля и рабочей частоты прибора. Это дает возможность сравнивать результаты, полученные на разных приборах с различными рабочими характеристиками. При использовании эталона его собственный химический сдвиг принимается за начало отсчета (ноль). Соответственно, химические сдвиги сигналов, расположенные в спектрах в *более слабом поле*, принято считать *положительными*. Если сигнал изучаемого соединения находится в *более сильном поле*, то его химический сдвиг считают *отрицательным*.

Константа экранирования в ЯМР связана с перераспределением электронной плотности в молекулах изучаемого вещества. Таким образом, химический сдвиг возможно предсказать, полагаясь на электронные эффекты заместителей. В спектре этанола в наиболее слабом поле наблюдается сигнал

протона, связанного с кислородом, проявляющим прямой отрицательный индуктивный эффект ($O \leftarrow H$). В более сильном поле – сигнал метиленовой группы ($HO \leftarrow \underline{CH}_2 - \underline{CH}_3$). Наименьший химический сдвиг имеет метильная группа ($HO \leftarrow \underline{CH}_2 \leftarrow \underline{CH}_3$). На данном примере заметно падение силы отрицательного индуктивного эффекта кислорода с увеличением расстояния группы в молекуле.

Значения химических сдвигов для наиболее распространенных функциональных групп органических соединений приведены в Таблице 8. Значения, приведенные в таблице, являются ориентировочными. На практике значения химических сдвигов могут варьироваться в зависимости от используемого растворителя, пробоподготовки и особенностей используемого оборудования.

Таблица 8 Значения химических сдвигов для наиболее распространённых функциональных групп органических соединений

Тип протона	Функциональная группа (фрагмент)	Химический сдвиг δ (м.д.)	Примечания
Алкильные (sp^3)	$-CH_3$ (первичный)	0.7–1.0	R- CH_3 (удаленный)
Алкильные (sp^3)	$-CH_2-$ (вторичный)	1.2–1.4	$(CH_2)_n$
Алкильные (sp^3)	$>CH-$ (третичный)	1.4–1.7	
Алкильные (sp^3)	$CH_3-C=O$	1.8–2.1	синглет
Алкильные (sp^3)	\underline{CH}_3-Ar	2.2–2.5	синглет
Алкильные (sp^3)	CH_3-O / CH_3-N	3.2–3.4	
Аллильные	$=C-CH_3$	1.6–1.7	
Аллильные	$=C-CH_2-$	1.9–2.2	
Пропаргильные	$-CH_2-C \equiv CH$	2.0–2.2	
Активированные sp^3	$-CH_2-O-$ (эфиры)	3.3–3.8	
Активированные sp^3	$-CH_2-O-C=O$	3.6–4.1	
Активированные sp^3	$-CH_2-Cl$	3.6–4.1	
Активированные sp^3	$-CH_2-Br$	3.4–3.9	
Активированные sp^3	$-CH_2-OH$	3.4–3.9	
Активированные sp^3	$N-CH_3$	2.1–3.1	
Винильные	$=CH_2$	4.5–5.0	
Винильные	$=CH-$ (внутренний)	5.0–5.5	
Винильные	$=CH-$ (сопряжённый)	5.5–6.5	
Ароматические	$Ar-H$ (весь спектр)	6.5–8.5	

Ароматические	Ar-H орто к донору	6.5–7.0	
Ароматические	Ar-H орто к акцептору	7.5–8.5	
Альдегидный	-CHO	9.5–10.0	синглет
Карбоксильный	-COOH	10.5–12.0	широкий
Спирты	-OH (спирты)	1.0–5.0	широкий
Спирты	-OH (фенолы)	4.0–7.0	
Амины первичные	-NH ₂	1.0–3.0	уширенный
Амины вторичные	-NH-	5.0–8.0	
Алкины	≡C-H	2.0–3.0	

3.3 Факторы, влияющие на качественные и количественные характеристики ЯМР-спектров.

Спин-спиновое взаимодействие. С появлением возможности получать спектры высокого разрешения обнаружилось, что для многих веществ некоторые пики поглощения появляются как в форме синглетов (одиночные пики), так и в форме мультиплетов: дублетов, триплетов, квадруплетов и т.д. Примером может служить тот же, ставший классическим, ¹H-ЯМР спектр этанола, показанный в высоком разрешении на Рисунке 23. Для мультиплетов характерно строгое соотношение относительных интенсивностей центральных пиков к периферийным: для дублета – 1:1, для триплетта – 1:2:1, для квадруплетта – 1:3:3:1 и так далее – согласно таблице биномиальных коэффициентов, также известной как «треугольник Паскаля».

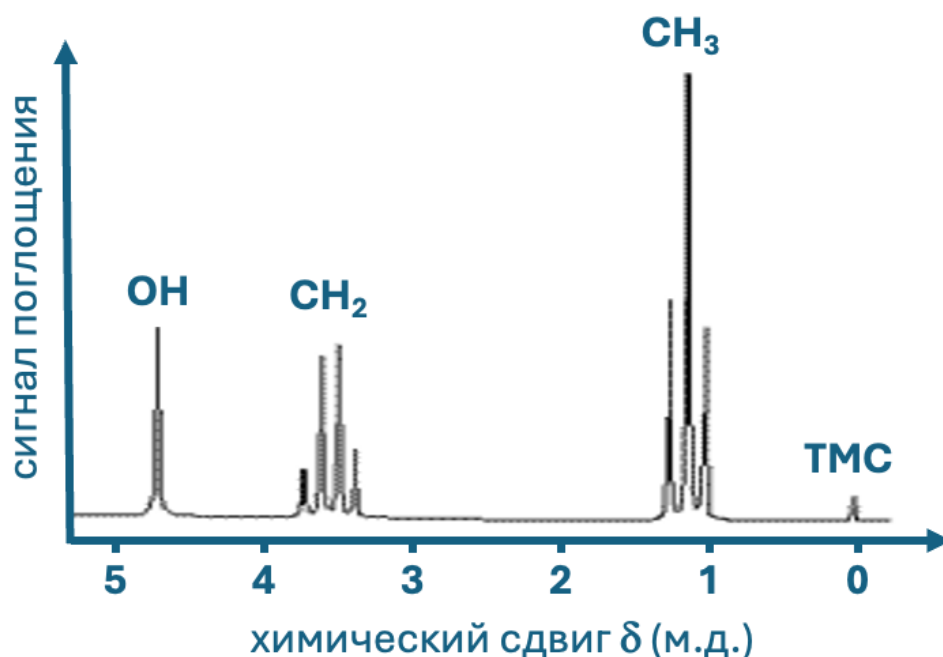


Рисунок 23 Спектр высокого разрешения ¹H-ЯМР этанола

Другой характерной особенностью мультиплетного расщепления пиков является то, что радиочастотный интервал между составляющими их линиями не зависит от величины напряженности внешнего магнитного поля B_0 . Иными словами, мультиплетность не является следствием или проявлением особенностей экранирования резонирующих ядер.

Этим закономерностям достаточно быстро было найдено физическое объяснение. Оно состоит в проявлении так называемого «косвенного спин-спинового взаимодействия», передаваемого электронами, обеспечивающими химическую связь. В соответствии с принципом запрета Паули, связывающие ядра электроны имеют противоположные спины. В магнитном поле каждое из взаимодействующих ядер стремится спаривать свой спин со спином одного из связывающих электронов (разнонаправленно). Таким опосредованным образом соседние ядра проявляют магнитное взаимодействие, передаваемое посредством «поляризующего» воздействия на электроны, обеспечивающие химическую связь.

Мультиплетность каждой группы химически эквивалентных ядер зависит от количества взаимодействующих ядер соседней группы. Общее правило мультиплетности: $2nI+1$, где n – количество ядер соседней группы, участвующей во взаимодействии. Так, для протонов со спиновым квантовым числом $I = 1/2$ метильной группы CH_3 этанола количество линий мультиплета будет определяться косвенным спин-спиновым взаимодействием с двумя протонами метиленовой группы ($2 \cdot 2 \cdot 1/2 + 1 = 3$, *триплет*), а количество линий мультиплета для протонов метиленовой группы – с тремя протонами метиленовой группы ($2 \cdot 3 \cdot 1/2 + 1 = 4$, *квадруплет*). Эта мультиплетность обнаруживается в ^1H -ЯМР-спектре этанола с высоким разрешением (Рисунок 23). Ядра водорода в гидроксильных группах имеют наименьшую электронную плотность и на практике, как правило, не проявляют мультиплетности и не оказывают влияния на мультиплетность соседних ядер. Этому также препятствует быстрый протонный обмен между гидроксильными группами и растворителем. Однако, как было неоднократно показано в ряде ранних работ, мультиплетность, связанная с гидроксильной группой, может наблюдаться при определенных условиях, к которым относятся химическая чистота, концентрация и температура.

Константа спин-спинового взаимодействия – расстояние между соседними линиями в пределах одного мультиплета, выраженное в герцах. При домножении на постоянную Планка она так же может быть выражена в единицах энергии (*Джоулях*). Эта константа является показателем косвенного спин-спинового взаимодействия между ядрами и не зависит от напряженности магнитного поля B_0 . Благодаря этому свойству достаточно просто установить отличие между дублетом и двумя отдельными синглетами, проведя измерения при разных рабочих частотах. Для отдельных синглетов расстояние между линиями (в *герцах*) изменится, для дублета (как и для любых мультиплетов) останется неизменным.

Таким образом, наряду с химическим сдвигом, константа спин-спинового взаимодействия является важной характеристикой ЯМР-спектроскопии, характеризующей особенности взаимного расположения магнитоактивных ядер.

В литературе общепринято обозначать константу буквенным символом *J*. Величина *J* зависит от геометрической конфигурации резонирующих ядер в молекулярной структуре, наличия кратных связей и общего количества связей, разделяющих атомы с резонирующими ядрами. В частности, определение величины константы спин-спинового взаимодействия является наиболее информативным методом различения между алкенами с *цис*- и *транс*-изомерией. *Транс*-изомеры характеризуются большим значением константы сравнительно соответствующих *цис*-изомеров.

Значения констант для спин-спинового взаимодействия наиболее распространённых магнитно-активных ядер приведены в Таблице 9.

Таблица 9 Значения констант (*J*) для спин-спинового взаимодействия наиболее распространённых магнитно-активных ядер. Взаимодействия *n*-го порядка (через *n* связей) обозначены в скобках как *nJ*

Тип взаимодействия	Фрагмент	<i>J</i> (Гц)	Примечания
Геминальное (2 <i>J</i>)	-CH ₂ - (насыщенный)	-12...-15	
Геминальное (2 <i>J</i>)	-CH ₂ - (у O,N,Hal)	-10...-12	
Геминальное (2 <i>J</i>)	=CH ₂ (винильное)	-1...-3	
Вицинальное (3 <i>J</i>)	алканы (своб. вращ.)	6–8	
Вицинальное (3 <i>J</i>)	анти (180°)	8–12	
Вицинальное (3 <i>J</i>)	гауше (60°)	2–4	
Вицинальное (3 <i>J</i>)	этилен (<i>цис</i>)	6–12	обычно 10–12
Вицинальное (3 <i>J</i>)	этилен (<i>транс</i>)	12–18	обычно 15–18
Вицинальное (3 <i>J</i>)	арены (<i>орто</i>)	6–9	
Вицинальное (3 <i>J</i>)	арены (<i>мета</i>)	1–3	
Вицинальное (3 <i>J</i>)	арены (<i>пара</i>)	0–1	
Аллильное (4 <i>J</i>)	H-C-C=C-H	1–2	~1.5
Дальнее (4 <i>J</i> ,5 <i>J</i>)	W-образное	0–2	
Спиртовая OH	H-O-C-H	4–6	часто не видна
Амидная NH	H-N-C-H	5–8	уширена
¹ H- ¹³ C (1 <i>J</i>)	sp ³ C-H	120–135	CH ₃ ~125
¹ H- ¹³ C (1 <i>J</i>)	sp ² C-H	150–170	~160
¹ H- ¹³ C (1 <i>J</i>)	sp C-H	240–250	
¹ H- ¹⁹ F (2 <i>J</i>)	H-C-F	45–50	
¹ H- ¹⁹ F (3 <i>J</i>)	H-C-C-F	15–25	
¹ H- ¹⁹ F	H-C=C-F (<i>цис</i>)	15–30	
¹ H- ¹⁹ F	H-C=C-F (<i>транс</i>)	40–70	
¹ H- ³¹ P	H-C-P	6–10	
¹ H- ¹⁵ N	H-N	60–90	

Процессы релаксации. Возвращение ядер анализируемого вещества в исходное невозбуждённое состояние достигается посредством процессов релаксации. Релаксация происходит главным образом за счет обменных процессов, происходящих при взаимодействии ядер в возбуждённом спиновом состоянии со структурно-молекулярным окружением (*спин-решёточная релаксация*), либо друг с другом внутри молекулы, посредством электронов (*спин-спиновая релаксация*).

Проще всего наглядно наблюдать процессы релаксации по изменению макроскопической намагниченности системы. Поэтому, перед тем как приступить к рассмотрению процессов релаксации необходимо более подробно рассмотреть поведение макроскопической намагниченности в присутствии внешнего магнитного поля до и после подачи радиочастотного импульса.

После появления внешнего магнитного поля снимается вырождение спиновых квантовых состояний. Благодаря избыточной заселённости нижнего энергетического состояния возникает макроскопическая намагниченность. В пробе всегда наблюдаются спонтанные переходы магнитоактивных ядер из одного спинового состояния в другое, это вызывает прецессию (вращение) вектора макроскопической намагниченности вокруг \mathbf{B}_0 с характеристической для данного типа ядер в данном веществе и для данного магнитного поля частотой, называемой ларморовой частотой.

Воздействие внешнего магнитного поля на различные ядра в молекуле или кристалле неоднородно из-за эффектов экранирования и спин-спинового взаимодействия. При этом у отдельных групп однотипных ядер в пробе существует своя ларморова частота, определяемая формулой:

$$\omega_0 = \gamma \cdot B_{эфф}.$$

Гиромагнитное отношение (γ) в данной формуле является характеристикой, присущей каждому типу ядер, $B_{эфф}$ – магнитная индукция поля, в котором находится спин; она зависит от обменных процессов, в которые вступает данная группа ядер. Суммарная прецессия макроскопической намагниченности является сложной функцией, отражающей совокупность всех прецессий макроскопических намагниченностей отдельных групп однотипных ядер, испытывающих однотипные спиновые переходы.

Суммарный магнитный момент (намагниченность) прецессирует вокруг поля \mathbf{B}_0 с ларморовой частотой, присущей всей совокупности, а радиочастотный импульс отклоняет его от равновесия. Последующее возвращение к равновесию (релаксация) индуцирует измеряемое напряжение в приемной катушке. При этом вектор макроскопической намагниченности прецессирует вокруг направления внешнего постоянного магнитного поля \mathbf{B}_0 так же с общей ларморовой частотой.

Спин-решёточная релаксация (также называемая продольной релаксацией) проявляется благодаря возможности взаимодействия магнитоактивных ядер с молекулярным окружением. После радиочастотного импульса спины «переворачиваются», и проекция макроскопической намагниченности на

направление B_0 (продольная намагниченность M_z) становится близкой к нулю или даже отрицательной. Система при этом находится в неравновесном состоянии – на верхнем энергетическом уровне оказывается больше количество ядер. Спин-решёточная релаксация – это процесс, при котором ядра меняют своё спиновое состояние, отдавая избыточную энергию в повышение динамического состояния структурного окружения – изменение колебаний атомов кристаллической решётки (фононы) или повышение кинетической (колебательно-вращательной) энергии молекул. При этом постепенно восстанавливается равновесное распределение ядер между уровнями. Впервые эффект был описан теоретически для экспериментов ЯМР с кристаллическими веществами, отсюда название явления – спин-решёточная релаксация. Действительно, данный тип релаксации более выражен в твердых телах. Благодаря близкому и упорядоченному расположению соседних молекул возможен более эффективный и быстрый перенос энергии в колебания решётки с восстановлением исходного спинового состояния системы и величины продольной намагниченности M_z . Быстрое затухание сигналов FID эквивалентно уширению спектральных линий при преобразовании Фурье. Поэтому в ЯМР-спектрах кристаллических веществ спектральные линии, как правило, значительно уширены.

Спин-решёточная релаксация определяется характеристическим временем T_1 . Эффективность спин-решёточной релаксации определяет скорость восстановления величины вектора макроскопической намагниченности в продольном направлении (M_z), то есть в направлении внешнего поля как следствие. Отсюда второе название данного явления – продольная релаксация. В свою очередь, величина продольной намагниченности определяет амплитуду наблюдаемой свободной индукции и, как следствие, интегральную интенсивность сигналов в спектре после преобразования Фурье. Поскольку в современных системах накопление спектров производится путём суммирования отклика от нескольких импульсов, то время, которое необходимо затратить на запись спектра, зависит от T_1 .

Малые значения T_1 обеспечивают возможность более частой подачи импульсов и, как следствие, более высокую чувствительность за одинаковый промежуток времени. Подача последующего импульса до полного восстановления величины вектора макроскопической намагниченности в направлении внешнего поля приводит к уменьшению интегральной интенсивности отдельных сигналов. Интегральная интенсивность сигналов в полученном спектре будет зависеть не только от количества ядер, соответствующих сигналу, но и от времени их релаксации T_1 . Таким образом, при относительно длительной продольной релаксации T_1 появляется риск потери возможности количественного анализа по интегральной интенсивности сигналов в спектре. В случае ядер ^1H время релаксации T_1 относительно мало и находится в узком диапазоне. На практике, для получения интегрируемых спектров используют избыточную по отношению к времени релаксации задержку между импульсами – например, пятикратную ($T_1 \cdot 5$). Так, в случае ЯМР протонов

задержка между импульсами в 10 секунд является достаточной для большинства анализируемых проб. Однако в некоторых ситуациях для получения интегрируемых спектров необходимо экспериментальное определение времени T_1 . Для этого получают спектры с различной задержкой между радиочастотными импульсами. При достижении времени задержки, равного T_1 , соотношение сигналов в спектре перестаёт меняться, поскольку начинает определяться исключительно количеством соответствующих ядер в пробе. В случае спектроскопии ^{13}C T_1 для разных ядер может значительно различаться, при этом T_1 для углеродных ядер значительно превышает T_1 протонов (в 10–100 раз). Помимо этого, время съёмки спектров ^{13}C также увеличивается из-за низкого природного содержания данного изотопа в пробах (примерно 1%). На практике, для получения рутинных спектров не дожидаются полной релаксации пробы и продолжительность эксперимента составляет 20–60 минут. Интегральная интенсивность сигналов в таких спектрах сильно зависит не только от количества данных ядер в пробе, но и от времени их продольной релаксации T_1 . Ядра с медленной продольной релаксацией, например четвертичные углеродные атомы, проявляются в спектре сигналами с низкой интегральной интенсивностью. Количественный анализ по таким спектрам выполнить невозможно.

Получение спектров ^{13}C с возможностью количественного анализа зависит от точности измерения времени продольной релаксации T_1 . Однако увеличение задержки между радиочастотными импульсами значительно увеличивает время эксперимента (до нескольких дней). Другой подход к возможности проведения количественного анализа состоит в добавлении в пробу добавки-релаксанта, например ацетилацетоната хрома III (до концентрации 0,025–0,05 М). Такая добавка обладает парамагнитными свойствами благодаря наличию неспаренного электрона на внешнем электронном уровне. Спин-спиновое взаимодействие неспаренного электрона с ядрами пробы уменьшает время их продольной релаксации T_1 . В случае ядер ^{13}C это приводит к возможности быстро получать спектры с возможностью количественного анализа.

Спин-спиновая релаксация в ЯМР происходит с участием электронного окружения ядер. Электроны тоже являются магнитными диполями и участвуют в *спин-спиновом взаимодействии* с магнитно-активными ядрами, соединёнными системой ковалентных связей. Тепловое движение ядер и молекул как целого вызывает локальные флуктуации силы спин-спинового взаимодействия, что приводит к расфазировке составляющих макроскопической намагниченности и уменьшению её величины. Данное явление называется *спин-спиновой релаксацией*, которая характеризуется временем T_2 .

Процессы спин-спиновой релаксации, главным образом, приводят к уменьшению величины намагниченности, регистрируемой катушкой. Увеличение скорости затухания прецессии макроскопической намагниченности приводит к уширению спектральных линий и уменьшению интенсивности сигналов. Наиболее заметны явления спин-спиновой релаксации в твердых телах. В отсутствие вращения молекул их положение относительно внешнего

магнитного поля зафиксировано, и эффект расфазировки, возникающий ввиду различного времени релаксации ядер, становится заметен. Наблюдаются малые T_2 , все сигналы сливаются в одну широкую линию. В жидких растворах и газах быстрое вращение молекул происходит, как правило, с частотой, превышающей ларморову, что практически нейтрализует эффект спин-спиновой релаксации. В таком случае T_2 в значительной степени возрастает, позволяя регистрировать отдельные узкие сигналы, соответствующие различным ядрам в составе молекул.

На сегодняшний день спектроскопия ЯМР является одним из наиболее информативных методов качественного и количественного анализа продуктов органического синтеза, их элементного состава и строения. Информационная значимость основных аналитических критериев, рассмотренных в этом разделе, в обобщенном виде приведена в Таблице 10.

Таблица 10 Основные аналитические критерии спектроскопии ЯМР

Аналитический критерий	Информационная значимость
Общее количество основных сигналов	Количество неэквивалентных типов магнитоактивных ядер
Химический сдвиг	Химическое окружение магнитоактивного ядра в молекуле
Интенсивности сигналов	Относительное количество магнитоактивных ядер каждого неэквивалентного типа
Структура сигналов, мультиплетность	Количество и тип соседних магнитоактивных ядер
Константы спин-спинового взаимодействия	Особенности (удаленность и тип) взаимного расположения магнитоактивных ядер

3.4 Пробоподготовка

На практике при проведении экспериментов ЯМР важно обеспечить правильный подбор растворителя и учитывать специфику ампул для образцов.

Растворитель для анализа ЯМР

Эксперименты ЯМР удобнее всего проводить с жидкими образцами. Получить спектр высокого разрешения с твердофазного образца значительно труднее. К основным факторам, определяющим влияние агрегатного состояния образца на качество получаемых спектров, относятся следующие:

1. В жидких образцах (по сравнению с твёрдыми) *относительно долгая продольная релаксация*, что способствует получению узких спектральных линий с возможностью различения их тонкой структуры, возникающей в связи со спин-спиновым взаимодействием.

2. В жидких образцах *значительно более долгая спин-спиновая релаксация*, что также снижает ширину спектральных линий и способствует лучшему разрешению.

3. В твёрдых образцах с кристаллической структурой проявление магнитной анизотропии в сочетании с многообразием возможных ориентаций кристаллитов по отношению к направлению внешнего магнитного поля B_0 приводит к флуктуациям *спин-спинового взаимодействия* и *химического сдвига*, что также приводит к уширению спектральных линий. В аморфных веществах уширение ещё сильнее из-за отсутствия дальнего упорядочения.

С учетом этих факторов для характеристики твердых веществ методом ЯМР целесообразно их предварительное растворение. Основным критерием при выборе растворителя для ЯМР является отсутствие в их молекулярной структуре ядер, дающих заметный сигнал в ЯМР спектре. На практике используют растворители, не содержащие ядра со спином $1/2$. Такие ядра либо инертны для ЯМР (спин 0) либо имеют особенности релаксации, не позволяющие им проявляться в спектре при заданной импульсной последовательности. К таким ядрам относятся дейтерий (спин 1), хлор (спин $3/2$), углерод (основной изотоп имеет спин 0). Исторически первым растворителем для приготовления проб стал четырёххлористый углерод (CCl_4). В настоящее время также применяются дейтерированные растворители, для получения которых в классических растворителях водород (1H , спин $1/2$) химически замещен на дейтерий (2H или D , спин 1). При этом стандартным подходом является проведение обменной реакции между растворителем и тяжелой водой (D_2O). Данная реакция является обратимой. Поэтому в коммерческих дейтерированных растворителях всегда содержится небольшая часть молекул с 1H , и они всегда дают небольшой остаточный сигнал в спектрах.

Ампулы для проведения анализа ЯМР. Поле B_0 в современных ЯМР-спектрометрах создаётся сверхпроводящим соленоидом – это большая катушка из специального проводника, через которую пропускают очень сильный электрический ток и «замораживают» его в замкнутом контуре. Соленоид охлаждают жидким гелием до 4 К (-269 °С). При такой температуре проводник становится *сверхпроводящим*. В результате получается *очень стабильное постоянное магнитное поле* огромной силы и очень высокой однородности. В структуре прибора также присутствует вторая катушка, предназначенная одновременно для подачи электромагнитного импульса и регистрации FID. Для создания радиочастотного импульса в данную катушку подают переменный ток. Витки в катушке имеют особую направленность, чтобы магнитная составляющая радиочастотного импульса B_1 была направлена перпендикулярно постоянному магнитному полю B_0 .

При проведении эксперимента ЯМР образец помещают в специальную ампулу. Ампулу помещают таким образом, чтобы она была параллельна внешнему магнитному полю B_0 , как показано на Рисунке 24. При выполнении эксперимента ампула вращается вокруг своей оси. Вращение необходимо для усреднения мельчайших неоднородностей постоянного магнитного поля, которых практически невозможно избежать при создании прибора. Усреднение, в том числе, идёт за счет перемешивания жидкого образца при вращении ампулы.

Важным с точки зрения пробоподготовки является влияние геометрических характеристик ампулы на разрешение получаемого спектра. Для эффективного усреднения неоднородностей магнитного поля необходимо создавать симметричные ампулы. Материал ампулы (стекло) может привносить неоднородности магнитного поля, что приводит к уширению спектральных сигналов. Если стенки ампулы имеют разную толщину или дефекты, то эти искажения становятся неоднородными.

Таким образом, ампулы с разной кривизной поверхности предназначены для получения спектров с различным разрешением. Данные об этом обычно указываются производителем на упаковке.

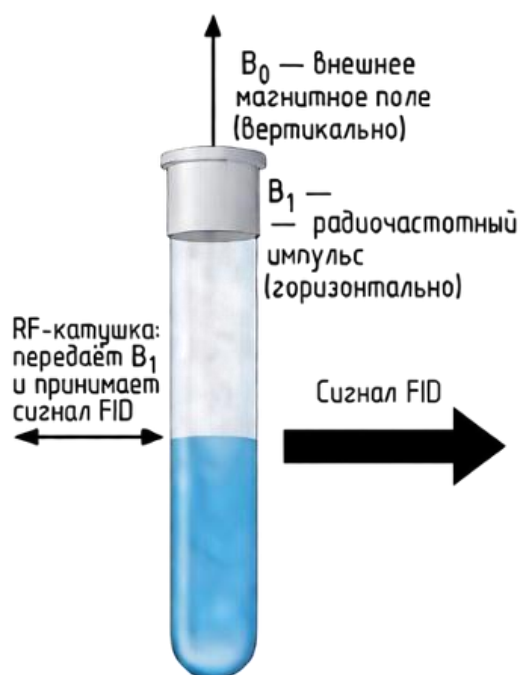


Рисунок 24 Схема эксперимента ЯМР

Контрольные вопросы

1. Физические основы метода ЯМР. В чем отличие спиновых квантовых состояний протона во внешнем постоянном магнитном поле и вне его?
2. Опишите процесс записи спектра на приборах первого поколения.
3. Опишите процесс записи ЯМР спектра на импульсных приборах.
4. Каким образом анализируется ответ пробы на возбуждающий импульс в приборах нового поколения?
5. Что такое химический сдвиг в ЯМР? Какая из групп в веществе с формулой $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-NH}_2$ будет иметь наибольший химический сдвиг?
6. В чем различие ЯМР экспериментов в случае твёрдых и жидких анализов?
7. Какой растворитель из списка вы бы выбрали для получения спектра ЯМР ^1H ацетофенона? CH_3OH , $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, CHCl_3 , CH_2Cl_2 , CDCl_3 , CD_3OH , CD_3OD , без растворителя, CCl_4 .
8. Как шероховатость ампулы влияет на разрешение в спектрах ЯМР?

9. На Рисунке 25 показан график, иллюстрирующий сигнал FID. Как были получены данные, представленные на этом графике? Возможно ли получить спектр ЯМР из этих данных и каким образом?

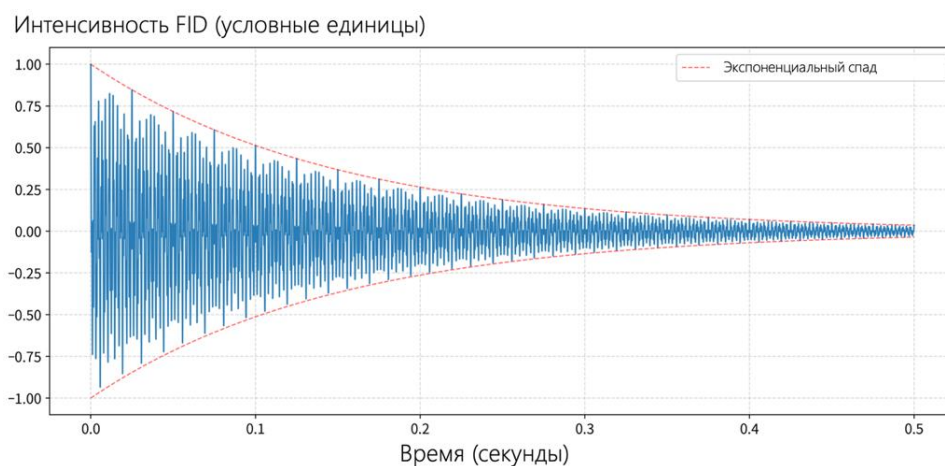


Рисунок 25 Пример сигнала FID

10. На Рисунке 26 представлены первичные данные, полученные при анализе одного вещества в трёх различных экспериментах ЯМР. Что отличалось в этих трёх экспериментах? Как отличается отклонение макроскопической намагниченности пробы в этих трёх экспериментах? В каком эксперименте будет наименьшее время T_1 ?

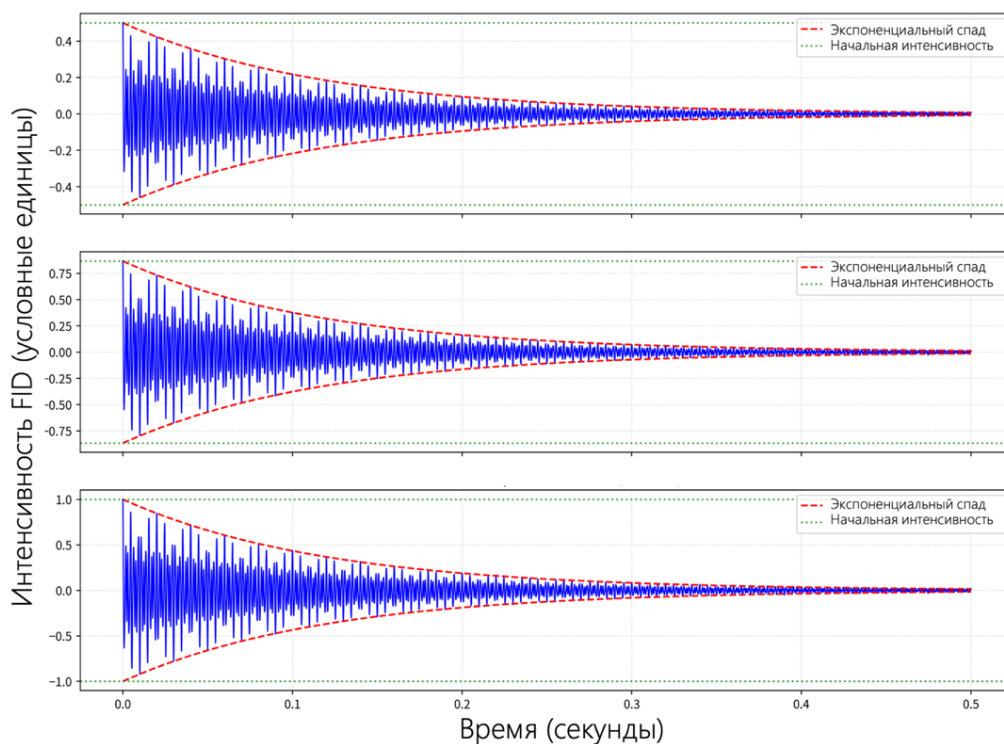


Рисунок 26 Примеры сигналов FID, полученных при анализе одного вещества в трёх различных экспериментах ЯМР

11. На спектре ЯМР ^1H вблизи каждого из сигналов углеводородных групп видны так называемые сателлиты. Данные сигналы симметрично расположены по обе стороны от главного сигнала и дублируют его, их суммарная интегральная интенсивность всегда относится к интенсивности главного сигнала как 1/100 (см. Рисунок 27). Объясните происхождение данных сигналов.

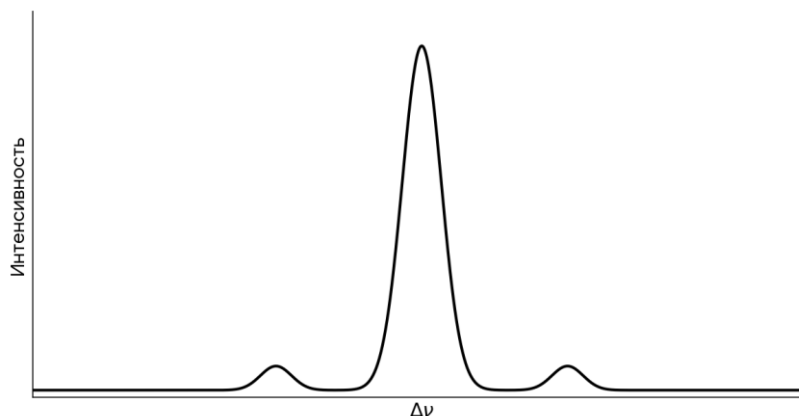


Рисунок 27 Пример сигнала с сателлитами на ^1H спектре ЯМР

Рекомендуемая литература

1. Ионин Б. И., Ершов Б. А., Кольцов А. И. ЯМР-спектроскопия в органической химии / под ред. Б. А. Ершова. – 2-е изд., перераб. – Л. : Химия : Ленингр. отд-ние, 1983. – 269 с.
2. Сильверстейн Р. М., Вебстер Ф. Х., Кимл Д. Дж. Спектрометрическая идентификация органических соединений / пер. с англ. – М. : Мир, 1977. – 592 с.
3. Гюнтер Х. Введение в курс спектроскопии ЯМР / пер. с англ. Ю. А. Устынюка, Н. М. Сергеева. – М. : Мир, 1984. – 478 с.
4. Brown W. H., Foote C. S. Organic Chemistry. – 8th ed. – Belmont, CA : Brooks/Cole, Cengage Learning, 2012.

Морозов Никита Андреевич
Карцев Дмитрий Дмитриевич
Талена Трейси Шантал
Кривошапкина Елена Федоровна
Морозов Максим Игоревич

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРОДУКТОВ ОРГАНИЧЕСКОГО СИНТЕЗА

Учебно-методическое пособие

В авторской редакции
Редакционно-издательский отдел Университета ИТМО
Зав. РИО Н.Ф. Гусарова
Подписано к печати
Заказ №
Тираж
Отпечатано на ризографе