

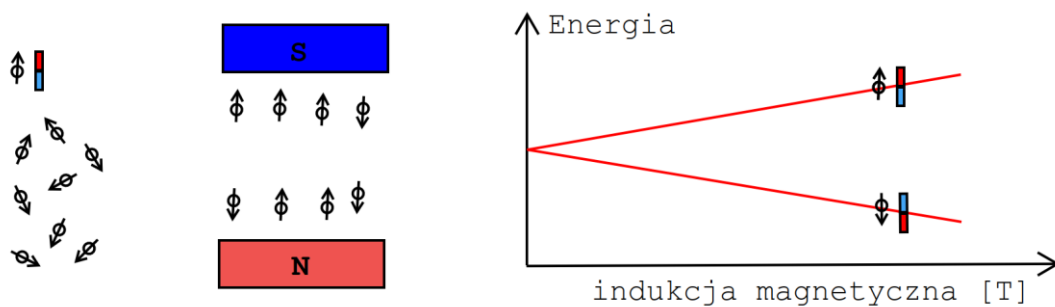
# Wprowadzenie do metod spektroskopowych pod kątem nowej matury 2023

Metody spektroskopowe odgrywają kluczową rolę we współczesnej nauce oraz analizie chemicznej. Można powiedzieć że bez tych metod byłoby nam ciężko tak szybko i jednoznacznie określić jakie substancje znajdują się w naszych próbkach. Pozwalają one przeprowadzać analizy skomplikowanych procesów zachodzących w naszym organizmie np. metabolizm leków, określić strukturę nowo otrzymanych lub wyizolowanych związków, oraz pozwala na identyfikację znanych związków m.in. w analizie kryminalnej czy też antydopingowej.

Celem tego artykułu jest pomoc w prostych analizach jakie mogą pojawić się czy to na maturze, czy też olimpiadzie. Długo zastanawiałem się czy oprzeć się na teorii, która opisuje nam zachowanie jądra atomowego w polu magnetycznym oraz jakie to ma przełożenie na widmo (podstawy nuklearnego rezonansu magnetycznego z ang. *Nuclear Magnetic Resonance* – skrót NMR) oraz jak otrzymujemy widmo mas (Spektrometria mas – ang. Mass spectroscopy skrót MS), czy też opisać to z pominięciem teorii upraszczając do kilka prostych zasad pozwalających na rozwiązanie prostych struktur. Wiedząc, że drugie podejście (nawet bez znajomości teorii) pozwala na rozwiązywanie nawet trudnych struktur „teorii” będzie jeden akapit gdzie przybliżę teorię bardzo ją upraszczając co byłoby nie do przyjęcia na poziomie akademickim. Ale nie jesteśmy na studiach, a osoby zainteresowane odsyłam do literatury [1,2]

**NMR** - nuklearny rezonans magnetyczny oraz **MRI** (ang. *magnetic resonance imaging*)

W NMR badamy zachowanie jąder atomowych w polu magnetycznym w zależności od otoczenia chemicznego czyli od tego z jakimi innymi atomami dane i jądro jest połączone. Nasze jądro atomowe możemy rozpatrywać jako krążący wokół własnej osi ładunek (zgodnie lub niezgodnie ze wskazówkami zegara). Z lekcji fizyki wiemy że wytwarza się wtedy pole magnetyczne. Jądra atomowe, tak jak elektrony, mają Spin. Jeżeli nasze „magnesiki” umieścimy w zewnętrznym polu magnetycznym ustawiają się one albo zgodnie z liniami sił pola albo przeciwnie, wektor spinu może być skierowany do góry lub do dołu. W zależności od natężenia pola magnetycznego przejście z jednego stanu do drugiego wymaga większej energii i ta energia będzie różna dla różnych atomów (Rysunek 1).



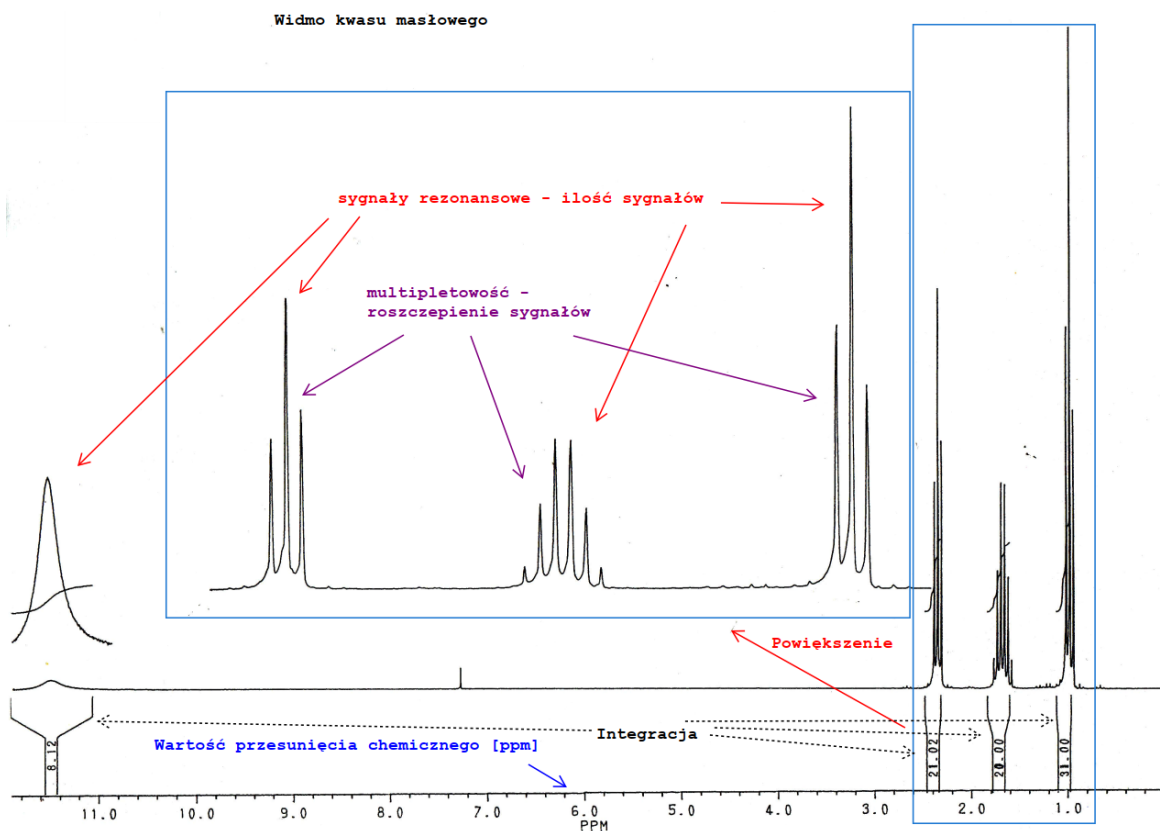
Rysunek 1

Większość z nas pewnie słyszała o spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego ale w odniesieniu do obrazowania metodą rezonansu magnetycznego w skrócie rezonans magnetyczny, który jest wykorzystywany w medycynie.

Najczęściej wykorzystywanym widmem jest widmo protonowe, które charakteryzuje się czterema cechami są to podstawowe elementy widma NMR: ilość sygnałów położenie sygnałów intensywność sygnałów rozszczepienie sygnału (Rysunek 2). Każdy element zostanie pokrótce wyjaśniony.

#### Podstawowe elementy widma NMR:

- Ilość sygnałów
- Położenie sygnałów
- Intensywność sygnałów
- Rozszczepienie sygnałów

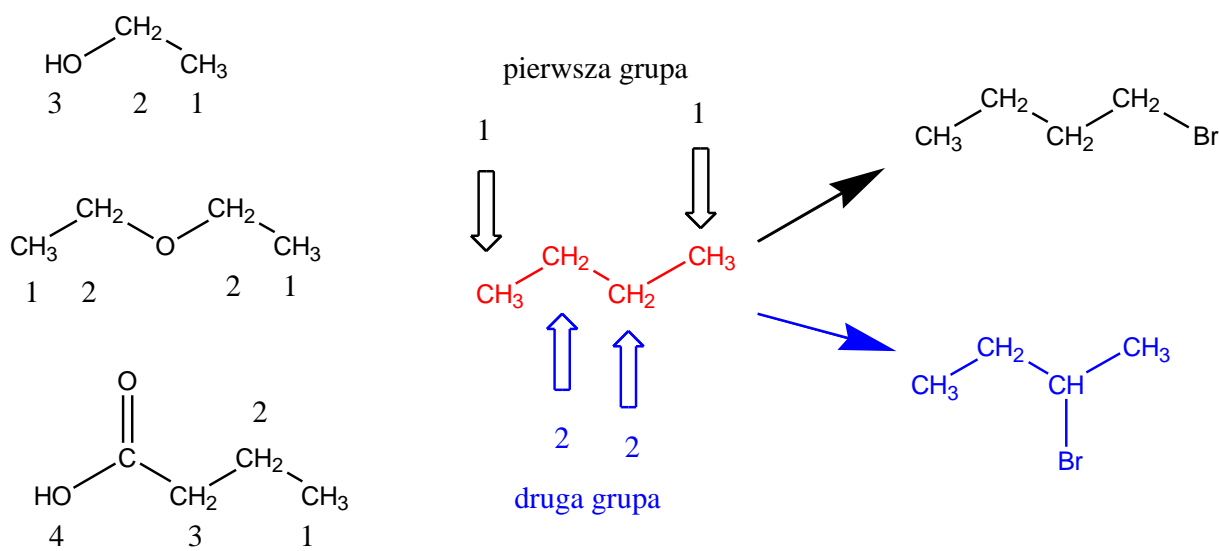


Rysunek 2

Pierwszym i najważniejszym zagadnieniem które trzeba opanować to umiejętność rozróżnienia równocennych atomów węgla i wodoru, które występują w danej cząsteczce. Ilość sygnałów oraz ich położenie na widmie protonowym zależy od otoczenia chemicznego jąder wodoru w zewnętrznym polu magnetycznym.

**Ilość sygnałów** jest powiązana z ilością grup nierównocennych protonów, ponieważ protony równocenne dadzą jeden sygnał.

**Metoda podstawienia** jest najprostszym sposobem na ocenę czy mamy do czynienia z identycznymi grupami protonów – jeżeli podstawimy jeden atom wodoru np. bromem i uzyskamy ten sam związek jak w przypadku innej rozpatrywanej grupy (nazwy związków będą takie same) to znaczy że mamy grupy równocenne ale jeżeli otrzymamy inny związek czyli inną nazwę to znaczy że te dwa protony są nierównocenne względem siebie (Rysunek 3).



Rysunek 3

Protony:

- równocenne (**jeden sygnał**, po podstawieniu protonu np: Br uzyskujemy ten sam związek)
- nierównocenne (**różne sygnały**, po podstawieniu protonu np: Br uzyskujemy inny związek)

Jeżeli mamy płaszczyznę symetrii widmo nam się upraszcza przykład eteru na rysunku 3, bo będziemy mieli te same sygnały po jednej i po drugiej stronie płaszczyzny symetrii poprowadzonej przez atom tlenu.

**Położenie sygnałów** możemy sobie wytłumaczyć następująco: wyobraźmy sobie jądro atomowe wodoru, które jest otoczone przez elektrony – my chcemy „zobaczyć” proton czyli dodatnio naładowaną cząstkę ale trudno nam zobaczyć dodatnio naładowane jądro jeżeli elektrony krążące wokół niego mi je zasłaniają. W sytuacji, gdy atom węgla przy którym jest obserwowany wodór będzie podstawiony pierwiastkiem, który jest silnie elektroujemny, nasz

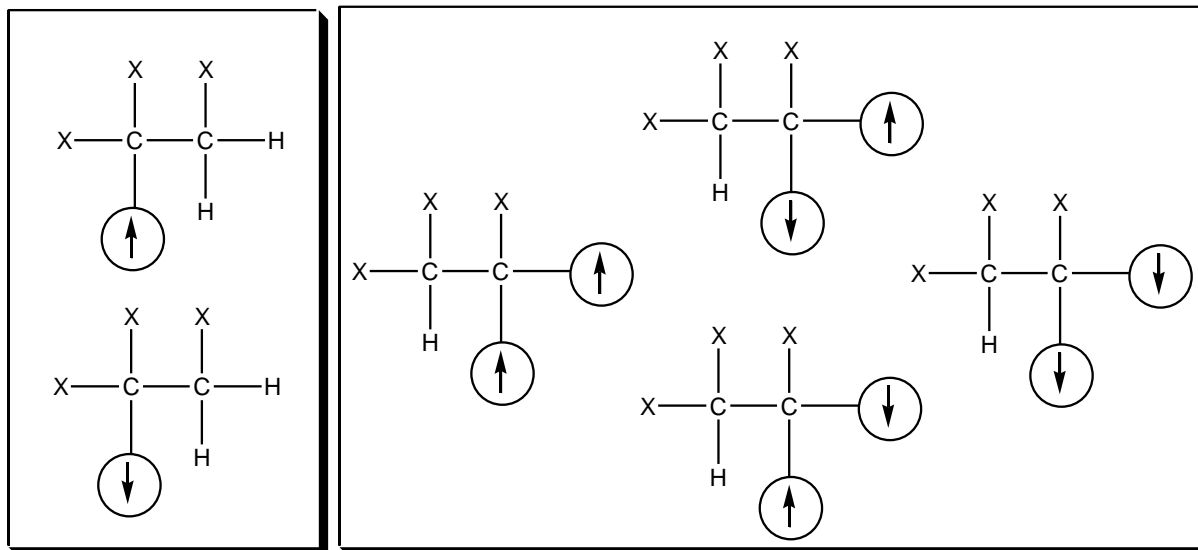
proton będzie łatwiej nam „zobaczyć”. Bardziej elektroujemny atom przyciągnie elektrony, które krążą wokół jądra wodoru, do siebie i w pewnym sensie będzie łatwiej mi zobaczyć ten Proton czyli mniej energii będzie mnie to „kosztowało”, żeby zobaczyć czyli będzie dalej na widmie nie wnikając w fizyczne aspekty powstawania widma.

Powstawania widma, czyli przesunięcie chemiczne to nic innego jak położenie sygnału absorpcji energii w widmie NMR spowodowane przesłanianiem lub odsłanianiem protonów przez elektrony. Wszystko zostało stabelaryzowane i mając tablice przesunięć możemy łatwo ustalić gdzie będzie nasza grupa lub mając sygnał przyporządkować do odpowiedniej grupy.

**Wartość przesunięcia chemicznego** (oś X na widmie NMR) jest skalą bezwymiarową podawaną w **ppm**. Została ona wprowadzona po to żebyśmy mogli porównać widma tego samego związku zarejestrowanego w różnych rozpuszczalnikach, na aparatach o różnej częstotliwości podstawowej czyli mające różne magnesy czyli różne natężenie pola magnetycznego.

Trzecią zależnością jest **intensywność sygnałów**. Zależy ona tak naprawdę od stosunku poszczególnych nierównocennych protonów względem siebie. Musimy tylko pamiętać że jest to stosunek odpowiadający empirycznemu stosunkowi czyli jeżeli mamy na widmie dwa sygnały w stosunku 2:3 to może znaczyć, że rzeczywiście mamy związek w którym mamy np. jedną grupę etylową, ale też dwie równocenne grupy etylowe czyli w związku mamy 10 protonów a nie pięć itd. Itd. Dlatego pamiętajmy **pole powierzchni pod pikiem informuje nas o stosunku nierównocennych protonów** względem siebie.

Ostatnim elementem widma NMR jest tzw. **rozszczenie sygnału** (multipletowość). Jest to spowodowane obecnością innych protonów (o różnych spinach) w bliskiej odległości od rozpatrywanego protonu. Największe oddziaływanie na rozpatrywany proton mają inne protony, które są oddalone o trzy wiązania. Mogą one mieć spiny skierowane równoległe lub antyrównoległe do linii sił pola i w niewielkim stopniu zmieniają przesunięcie naszego protonu (Rysunek 4). W pierwszym przypadku nasze dwa protony zostaną rozszczepione na dwa sygnały, w drugim przypadku nasz jeden proton zostanie rozszczepiony na trzy sygnały (sygnał środkowy będzie miał podwojoną intensywność. Wystarczy znać prostą zależność. Jeżeli nasze protony „widzą” w odległości trzech wiązań **n** protonów to nasz sygnał zostanie rozszczepiony na **n+1 sygnałów**. Jeżeli rozpatrywana grupa protonów może sprzęgać się przez trzy wiązania z 4 protonami z innych grup nierównocennych to na widmie otrzymamy sygnał rozszczepiony na 5 sygnałów.



Rysunek 4

Rozpatrzmy teraz nasze widmo z rysunku 2, widmo kwasu butanowego. Jak wynika z rysunku 3 mamy **4 grupy nierównocennych protonów**, czyli na widmie powinniśmy mieć **4 sygnały**. Następnie patrzymy na **położenie sygnałów**. Najbardziej odsłanianym będzie sygnał od grupy karboksylowej i znajduje się on przy około **11,5 ppm**. Kolejnym sygnałem będzie grupa metylenowa nr 2, która jest bezpośrednio związana z grupą karboksylową co częściowo odsłania nam protony, dlatego mamy tutaj przesunięcie ok **2,4 ppm**. Następnie pojawia się sygnał od grupy 3 przy ok **1,7 ppm** i na końcu od grupy 4 (najmniej odsłanianej) przy ok **1 ppm**, jeżeli patrzymy na widmo od strony lewej do prawej. **Intensywność sygnałów**, czyli pole powierzchni pod pikem, dla pików nr 4 wynosi w przybliżeniu 10 (co odpowiada w naszym przypadku jednemu protonowi), dla pików nr 3 i 2 w przybliżeniu 20 (co odpowiada w naszym przypadku dwóm protonom) oraz dla pików nr 1 w przybliżeniu 30 (co odpowiada w naszym przypadku trzem protonom). Obserwując **multipletność** widzimy pojedynczy sygnał (**singlet**) dla protonu grupy karboksylowej (nie jest sprzężony, „nie widzi”, przez trzy wiązania z innymi protonami), rozszczepiony na trzy sygnały (**triplet**) sygnał dla grupy nr 3 (sprzężenie przez trzy wiązania z dwoma protonami grupy nr 2 –  $2+1=3$ ), rozszczepiony na sześć sygnałów (**sekszet**) sygnał dla grupy nr 2 (sprzężenie przez trzy wiązania z pięcioma protonami grupy nr 3 i 1 –  $5+1=6$ ), rozszczepiony na trzy sygnały (**triplet**) sygnał dla grupy nr 1 (sprzężenie przez trzy wiązania z dwoma protonami grupy nr 2 –  $2+1=3$ ).

## Spektrometria mas – MS (ang. *Mass Spectrometry*)

Spektrometria mas jest jedną z metod spektroskopowych, ale w przeciwieństwie do innych metod nie wykorzystujemy tutaj pomiarów absorpcji czy też emisji promieniowania elektromagnetycznego. W obecnych czasach odgrywa kluczową rolę w analizie jakościowej oraz ilościowej w wielu dziedzinach nauki m.in. w medycynie i biochemii. Bazuje na pomiaru stosunku masy jonu do jego ładunku elektrycznego ( $m/z$ ).

*Co robią spektrometry mas?*

1. Dokonują pomiaru masy cząsteczkowej dokładniej niż inne techniki.
2. Udzielają informacji o strukturze związku.

Jakie dostarcza informacje? Wzór sumaryczny, klasa związku (alifatyczny, aromatyczny), obecność różnych elementów struktury cząsteczki, czasami obecność konkretnego pierwiastka, sekwencja oligomerów, stereochemia.

*W jakim celu wykonuje się pomiarów masy?*

Do identyfikacji, weryfikacji i oceny ilościowej: metabolitów, białek rekombinowanych, białek wyizolowanych ze źródeł naturalnych, oligonukleotydów, kandydatów na leki, peptydów, syntetycznych organicznych związków chemicznych, polimerów

Wykorzystanie w chemii organicznej - wyznaczenie lub potwierdzenie masy cząsteczkowej substancji i jej wzoru sumarycznego; uzyskanie informacji na temat budowy cząsteczki, a w sprzyjających okolicznościach ustalenie tej budowy; identyfikacja substancji przez porównanie jej widma mas z widmami z baz danych

Osoby chcące dowiedzieć się więcej o budowie spektrometrów mas, zasady ich działania, metod jonizacji odsyłam do szczegółowej literatury [1-4]. Tak samo jak przy NMR teorię ograniczę do minimum.

Schemat blokowy spektroskopu mass składa się z:

- układu wprowadzania próbki
- źródła jonów
- analizatora jonów
- detektora jonów
- analiza danych

W pierwszym etapie należy wprowadzoną próbkę zjonizować np. bombardując ją elektronami. Analizator jonów pozwala na rozdział jonów w zależności od stosunku ich masy do ładunku, które następnie są rejestrowane w detektorze proporcjonalnie do ich ilości. W ten sposób otrzymujemy widmo mas w formie wykresu.

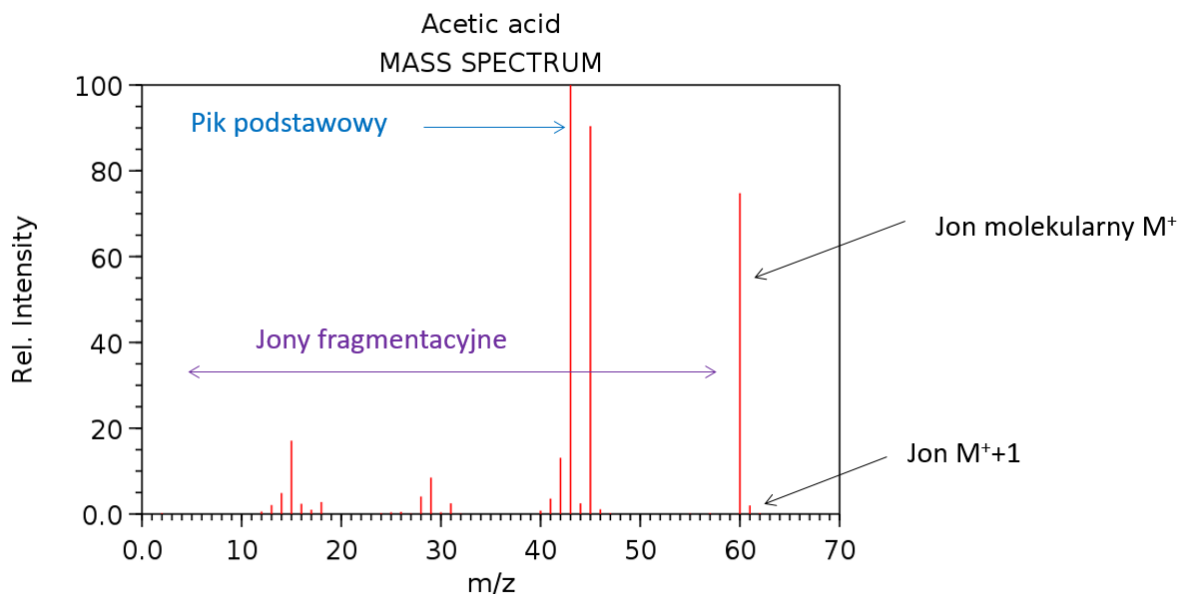
Trzeba pamiętać, że w układzie okresowym pierwiastków znajdują się średnie masy wazone, a związki są zbudowane z konkretnego izotopu. Większość pierwiastków ma co najmniej dwa izotopy. Jeżeli brom ma dwa izotopy  $^{79}\text{Br}$  oraz  $^{81}\text{Br}$  występujące w przyrodzie prawie w stosunku 1:1 to na widmie mas będziemy obserwować dwa sygnały przy masie 79 oraz 81 a liczba zliczeń będzie prawie podobna – odpowiadająca procentowemu występowaniu jednego i drugiego izotopu w przyrodzie.

Jeżeli będziemy analizować widmo bromometanu to głównymi sygnałami będą masy pochodzące od związku składającego się z  $^{12}\text{C}^1\text{H}_3^{79}\text{Br}$  i  $^{12}\text{C}^1\text{H}_3^{81}\text{Br}$  ale też otrzymamy masy w których będziemy mieli izotop węgla-13:  $^{13}\text{C}^1\text{H}_3^{79}\text{Br}$  i  $^{13}\text{C}^1\text{H}_3^{81}\text{Br}$  ale też w bardzo małym procencie gdzie będą inne izotopy np. deuter.

Metody jonizacji możemy podzielić na dwa rodzaje:

- „miękka” jonizacja, podczas której tworzy się jedynie jon molekularny (cząsteczkowy) bez fragmentacji cząsteczki,
- „twarda” jonizacja, podczas której cząsteczka rozpada się na fragmenty.

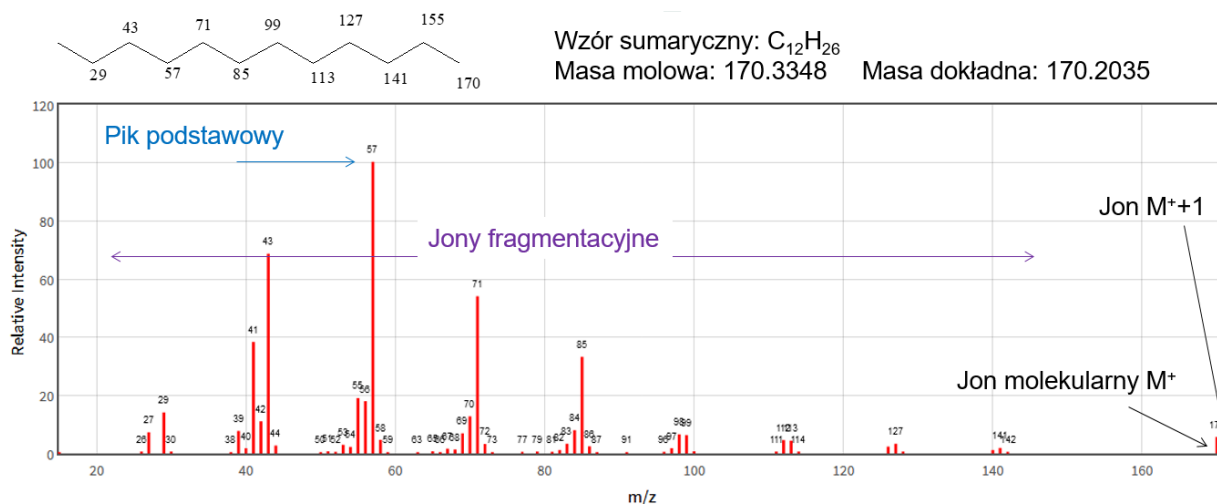
Zjonizowana cząsteczka związku organicznego utworzona poprzez utratę jednego elektronu oznaczamy jako  $\text{M}^+$  oraz nazywamy **jonem molekularnym**. Jon molekularny może ulegać dalszym rozpadom w wyniku czego otrzymamy inne jony o mniejszej masie. **Jony fragmentacyjne** tworzą się w wyniku rozpadu wiązań oraz różnego rodzaju przegrupowań (Rysunek 5).



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

Rysunek 5

W prostych analizach powinniśmy się skupić na jonie molekularnym i ew. liczyć masę jonów fragmentacyjnych powstałych poprzez rozerwanie wiązania (Rysunek 6).



Rysunek 6

W tabeli 1 podano dokładne masy atomowe oraz składy izotopowe wybranych pierwiastków.

Tabela 1

Pierwiastek	$M^+$	$M^+ + 1$		$M^+ + 2$		Masa atomowa [u]
Wodór	$^1H$	100%				1,008
Węgiel	$^{12}C$	98,9%	$^{13}C$	1,1%		12,011
Azot	$^{14}N$	99,6%	$^{15}N$	0,4%		14,007
Tlen	$^{16}O$	99,8%			$^{18}O$	0,2% 16,000
Siarka	$^{32}S$	95,0%	$^{33}S$	0,8%	$^{34}S$	4,2% 32,066
Chlor	$^{35}Cl$	75,5%			$^{37}Cl$	24,5% 35,453
Brom	$^{79}Br$	50,5%			$^{81}Br$	49,5% 79,904

Co może powiedzieć nam jon molekularny? Praktyczne rady przy analizie widma mas.

- Izotopy: obecne w związkach zgodnie z ich rozpowszechnieniem.
- Węglowodory zawierają 1,1% izotopu  $^{13}C$ , więc będzie mały pik  $M+1$  (11%  $M^+$ )
- Jeśli Br jest obecny,  $M+2$  jest równy  $M^+$ .
- Jeśli Cl jest obecny,  $M+2$  stanowi jedną trzecią  $M^+$ .
- Jeśli jod jest obecny, pik przy 127, duża przerwa.
- Jeśli N jest obecny,  $M^+$  będzie liczbą nieparzystą.
- Jeśli S jest obecna,  $M+2$  będzie 4%  $M^+$ .



W celu nabrania wprawy w analizie widm masowych oraz NMR można skorzystać z wielu stron internetowych oraz baz widm np.:

<http://webbook.nist.gov/chemistry/>

[http://sdbs.db.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/cre\\_index.cgi](http://sdbs.db.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/cre_index.cgi)

Rozwój metod spektroskopowych pozwolił na szybsze poznanie otaczającego nas świata. Spektrometria mas oraz rezonans magnetyczny jest powszechnie wykorzystywany nie tylko w chemii ale też w fizyce oraz w przemyśle. Techniki te znalazły szerokie zastosowanie nie tylko w nauce, ale też w medycynie, analizie sądowej oraz antydopingowej. Każdy współczesny badacz wcześniej czy później spotka na swojej drodze jedną z tych metod i tylko od nas zależy czy analiza prostych widm będzie dla nas wyzwaniem, czy też prostą łamigłówką.

Michał Sienkiewicz

### **Literatura**

[1] R.M. Silverstein, F.X. Webster, D.J. Kiemle „Spektroskopowe metody identyfikacji związków organicznych” PWN 2007.

[2] W. Zieliński, A. Rajca (red.) „Metody spektroskopowe i ich zastosowanie do identyfikacji związków organicznych” WNT 1995.

[3] R. A. W. Johnstone „Spektrometria masowa w chemii organicznej” PWN 1975

[4] B. Drożdż „Spektroskopia Masowa” skrypt UJ 2016 – dostępny online