

## Laboratoř NMR – Strukturní analýza a 2D NMR spektra

**Místo:** Laboratoř NMR, místnost A28,  
**Kontakt:** doc. Ing. Bohumil DOLENSKÝ, Ph.D., Ústav analytické chemie, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6, budova A, laboratoř A28, Telefon: (+420) 220 44 4110, E-mail: [dolenskb@vscht.cz](mailto:dolenskb@vscht.cz),  
Web: <http://www.vscht.cz/anl/dolensky/nmr/index.html>

### Obsah

1. Zpracování 1D a 2D NMR spekter známé organické látky pomocí programu MNOVA a přiřazení signálů jednotlivým atomům molekuly.
2. Příprava vzorku neznámé organické látky pro měření NMR.
3. Naměření 1D a 2D NMR spekter nezbytných pro stanovení struktury látky využitím NMR spektroskopu JEOL ECZ 500R (11.73 Tesla, 500 MHz).
4. Stanovení struktury neznámé látky.

### Předpoklady

1. Znalost vztahů mezi molekulární strukturou a spektry  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  NMR, zejména počtem signálů, integrální intenzitou signálů a multiplicitou signálů prvního řádu. Znalost odečtu hodnot interakčních konstant u multiplů prvního řádu, a rozpoznání diastereotopních a enantiotopních jader a skupin.
2. Znalost návodů úlohy.

### Postup přiřazení signálů struktury známé organické látky

Postup přiřazení NMR signálů k jednotlivým atomům molekuly zahrnuje mnoho dílčích kroků, jejichž nejefektivnější pořadí vzhledem k rozmanitosti molekulových struktur nelze jednoznačně doporučit. Postup člověka se patrně bude vždy řídit osobními zkušenostmi i náladou. Níže jsou navrženy kroky, které v daném pořadí obvykle vedou u jednoduchých molekul a spekter k rychlému přiřazení signálů. Tyto kroky se obvykle vhodně spojují, vynechávají či se k nim opětovně vrací, dokud nejsou všechny signály přiřazeny. Nezbytná je též kontrola výstupu z každého kroku s očekávanými charakteristikami pro danou molekulovou strukturu, a především s

komplementárními charakteristikami v ostatních spektrech. Jednotlivé výstupy často nejsou zcela jednoznačné a je nezbytné je potvrdit souvisejícími spektry.

NMR experimenty se v rámci laboratorní úlohy budou týkat převážně jader  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$ . Proto jsou níže popsány NMR experimenty a jejich spektra pro přehlednost diskutovány pouze pro tyto jádra. Obecně však lze měřit tyto experimenty mezi mnoha jinými jádry, kdy interpretace spekter je analogická. Pro správné porozumění NMR spekter je zásadní mít na vědomí, že molekuly s přirozeným zastoupením izotopů jsou směsí všech možných isotopologů a jejich isotopomerů. Isotopology se liší zastoupením jednotlivých izotopů, např.  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{DHO}$ ,  $\text{D}_2\text{O}$ , zatímco isotopomery mají stejné isotopové složení, ale liší se pozicí izotopů v molekule. Neuvažujeme-li isotopy vodíku a kyslíku, pak například ethanol s přirozeným zastoupením izotopů obsahuje ca. 1.1 %  $^{13}\text{C}$  isotopologu, který má dva isotopomery  $^{13}\text{CH}_3^{12}\text{CH}_2\text{OH}$  a  $^{12}\text{CH}_3^{13}\text{CH}_2\text{OH}$ , a ca. 0.01 %  $^{13}\text{C}_2$  isotopologu  $^{13}\text{CH}_3^{13}\text{CH}_2\text{OH}$ .

1. Analyzujte strukturu molekuly zadané látky. Určete, kolik signálů bude mít látka v  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  NMR spektrech. Pokud jsou přítomny i jiné prvky mající snadno měřitelné isotopy (např.  $^{19}\text{F}$ ,  $^2\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{31}\text{P}$ ,  $^{29}\text{Si}$ ,  $^{11}\text{B}$ ), určete počet signálů v NMR spektrech těchto izotopů. Konfrontujte očekávané charakteristiky s experimentálními spektry.
2. Určete relativní integrální intenzitu signálů v NMR spektrech, zejména  $^1\text{H}$ , případně  $^{19}\text{F}$ . Konfrontujte očekávané s experimentálními spektry.
3. S ohledem na případný dekaplink určete očekávanou multiplicitu signálů v naměřených NMR spektrech. Konfrontujte očekávané s experimentálními spektry.
4. Na základě tabulek (méně vhodné) či predikce (velmi efektivní přístup současnosti) odhadněte očekávané hodnoty chemických posunů jednotlivých izotopů. Konfrontujte očekávané s experimentálními spektry. Uvažujte, že experimentální hodnoty se mohou od očekávaných i značně lišit, zejména v závislosti na rozpouštědle a jeho příměsích, a na exotičnosti molekulární struktury zadané látky. V případě běžných struktur lze u prediktorů využívajících velkých databází očekávat shodu chemických posunů ca.  $\pm 0.3$  ppm u  $^1\text{H}$  a  $\pm 2$  ppm u  $^{13}\text{C}$ .
5. V programu MNOVA zpracujte všechna experimentální spektra.
6. V experimentálních spektrech jednotlivých izotopů identifikujte jednotlivé signály či skupiny překrývajících se signálů. Počet signálů musí být shodný s počtem očekávaných signálů (kroky 1-4). Neopomeňte pravděpodobnou přítomnost signálů nečistot, zejména signálů použitých rozpouštědel a jejich obvyklých nečistot jako je voda či  $^1\text{H}$  isotopolog deuterovaných rozpouštědel (prakticky žádné rozpouštědlo není 100% deuterované). K řešení překrývajících se signálů využijte některé z 2D spekter, případně selektivních 1D spekter.

7. Nalezněte mezi očekávanými signály (kroky 1-4) takové, které jsou některou z charakteristik zcela unikátní, např.: intenzitou, multiplicitou, chemickým posunem či isotopem, tj. takové, které lze jednoznačně přiřadit k atomům molekuly studované látky. Pokud takové signály nejsou, je nezbytné najít takové, které lze přiřadit po uvážení dalších vztahů mezi strukturou a spektry.
8. U jednoznačně přiřaditelných signálů odečtěte maximum charakteristik, zejména chemický posun, relativní integrální intenzitu, multiplicitu a interakční konstanty, případně střechové efekty a pološířku píků multipletu. Pokud jsou všechny signály přiřazeny, pokračujte posledním krokem postupu.
9. Vyjděte z jednoznačně přiřazených signálů (krok 8) a pomocí 2D spekter či selektivních 1D spekter (kroky 10 a dále) jednoznačně přiřaďte další signály a vraťte se ke kroku 8.
10.  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY je NMR experiment detekující interakce  $^1\text{H}$  jader přes vazby. 2D spektrum je symetrické a souřadnice krosníku (mimodiagonálové píky) jsou chemické posuny signálů interagujících jader. V primárním posouzení spektra lze uvažovat, že intenzita krosníků přímo souvisí s velikostí interakční konstanty, kdy v COSY obvykle pozorujeme interakce s  $J > 3$  Hz, tedy obvykle takové, které se v 1D spekter projevují snadno pozorovatelnou multiplicitou. Krosníky v COSY spektrech jsou tak obvykle důsledkem interakcí studovaných jader přes 2 nebo 3 vazby, což umožňuje přiřazení interagujících signálů. Je však mít na paměti, že i interakce jader přes 2 či 3 vazby mohou mít velmi malou interakční konstantu a nebudou tak v COSY spektru identifikovány krosníkem. Struktura krosníku se obvykle neanalyzuje. V případě překryvu krosníků lze využít k interpretaci spektra COSY45, TOCSY či DQF-COSY. Menší interakční konstanty vedou ke krosníkům menší intenzity. V závislosti na nastavení COSY experimentu lze někdy pozorovat i krosníky slabých interakcí. Obecně jsou slabé interakce předmětem experimentu LR-COSY (*Long Range*), viz krok 14.
11.  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY45 je velmi podobné COSY spektru s tím rozdílem, že a) diagonálové píky jsou užší, a tudíž méně překrývají blízké krosníky; b) krosníky často nejsou symetrické, kdy směr jejich protažení vůči diagonále spektra souvisí se znaménkem interakční konstanty.
12.  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSY je velmi podobné COSY spektru s tím rozdílem, že jsou pozorovány krosníky mezi všemi signály interagujících jader daného spinového systému. Například interaguje-li jádro A pouze s jádrem B, které dále interaguje ještě s jádrem C, které dále interaguje ještě s jádrem D, které již neinteraguje s žádným jádrem, A-B-C-D, pak v COSY spektru pozorujeme pouze krosníky AB, BA, BC, CB, CD, a DC, avšak v TOCSY spektru pozorujeme krosníky AB, AC, AD, BA, BC, BD, CD, CA, CB, DA, DB a DC. TOCSY spektrum je přínosné

- zejména v případě přítomnosti více spinových systémů, jejichž signály se ve spektru překrývají. Oblíbené jsou též selektivní 1D TOCSY experimenty.
13.  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  DQF-COSY je velmi podobné COSY spektrum s tím rozdílem, že a) krosníky mají tzv. *anti-phase* strukturu, která umožňuje odečítání interakčních konstant mezi interagujícími jádry; b) singletové signály se ve spektru nijak neprojevují, ani jako diagonálové píky, čímž jsou odstraněny jejich případné překryvy s okolními krosníky.
  14.  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  LR-COSY je velmi podobné COSY spektru s tím rozdílem, že v závislosti na velikosti pauzy (*delay*) v sekvenci experimentu je ovlivněna intenzita krosníků. Přestože vztah není lineární, lze primárně uvažovat, že krosníky, které jsou důsledkem velké interakční konstanty, jsou potlačeny, zatímco krosníky, které jsou důsledkem malé interakční konstanty, jsou intenzivnější. Čím větší je *delay* (obvykle 150-600 ms), tím menší interakční konstanty se projeví přítomností krosníku. Velmi často, jsou tak pozorovány interakce jader přes 4 a více vazeb, kdy velikost interakční konstanty je v řádu desetin Hz. Interpretace může být velmi komplikovaná, zvláště pokud není zároveň pozorována i odpovídající multiplicita signálu v 1D spektrech. Malé interakce ( $J < 1.5$  Hz) nebo přítomnost několika malých interakcí jsou v 1D spektrech často pozorovány pouze jako rozšíření signálu (v závislosti na faktickém rozlišení spektra). Pro správnou interpretaci je vhodné naměřit sérii spekter s různým *delay* a sledovat vliv na intenzitu krosníků, jakož i konfrontovat interpretaci s ostatními spektry a charakteristikami.
  15.  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC je NMR experiment detekující interakce jader  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  přes jednu vazbu (tedy  $^1J_{\text{HC}}$ ). Interpretace těchto spekter je velmi jednoznačná. Souřadnice krosníku jsou chemické posuny signálů interagujících jader. Krosník tak dokazuje, že mezi danými jádry je právě jedna vazba. Nepřítomnost krosníku dokazuje, že jádra daných signálů mají mezi sebou více než jednu vazbu. Vzhledem k tomu, že  $\text{CH}_3$  skupina je za normálních podmínek vždy symetrická (tj., všechny vodíky dávají pouze jeden signál), lze u jednoho uhlíku očekávat maximálně dva krosníky, a to pouze v případě  $\text{CH}_2$  skupin s diastereotopními jádry. Vzhledem k vaznosti vodíku může mít jejich signál pouze jeden krosník. Toto může být porušeno pouze vizuálně, a to překryvem signálů, tj. přítomností signálů s velmi podobnými či náhodně shodnými chemickými posuny. Velmi užitečné je měření ME (*Multiplicity Edited*) varianty těchto spekter, kdy krosníky jsou v případě  $\text{CH}_3$  a  $\text{CH}$  skupin pozitivní, zatímco v případě  $\text{CH}_2$  skupin negativní (v případě diastereotopních vodíků jsou krosníky obou vodíků negativní). Spektra bývají velmi často obrácené a znaménka krosníků jsou pak ve spektrech zaměněna. Proto je vždy potřeba posuzovat jejich relativní vztah, jakož i najít ve spektru vhodný referenční signál, např. v aromatické oblasti lze očekávat převážně  $\text{CH}$  skupiny a tudíž

- pozitivní krosníky. Komplikace v interpretaci mohou nastat v případě, že jsou velikosti interakčních konstant studovaných jader velmi rozdílné. V takovém případě může být intenzita některých krosníků velmi snížena či mohou mít nesprávné znaménko. Experiment HMQC, který poskytuje prakticky stejné informace je v současnosti méně populární.
16.  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC je NMR experiment detekující interakce  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  přes více než jednu vazbu (nejčastěji  $^2J_{\text{HC}}$  a  $^3J_{\text{HC}}$ , vzácněji  $^4J_{\text{HC}}$ ). Souřadnice krosníku ve 2D spektru jsou chemické posuny signálů jader interagujících přes dvě či více vazeb, přičemž bohužel nelze určit přes kolik. Interpretace těchto spekter je proto obvykle nejednoznačná, a nezbytně vyžaduje konfrontaci s ostatními spektry. Primárně lze uvažovat, že intenzita krosníku je přímo úměrná velikosti interakční konstanty, přičemž například  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC experiment je obvykle nastaven pro zvýšenou citlivost k interakčním konstantám velikosti ca. 8 Hz. V takovém případě jsou obvykle pozorovány všechny interakce s  $J_{\text{HC}} > 4$  Hz. Interakce přes dvě vazby  $^2J_{\text{HC}}$  má velmi proměnlivou hodnotu (běžně 0 až 35 Hz), kterou nelze snadno predikovat, a tudíž nelze predikovat ani přítomnost či nepřítomnost krosníku ve spektru. Interakce přes tři vazby  $^3J_{\text{HC}}$  má celkem snadno odhadnutelnou hodnotu: a) při volné rotaci (alkylové řetězce) či v aromatických strukturách (dihedrál ní úhel je zafixován při  $180^\circ$  či  $0^\circ$ ) je  $^3J_{\text{HC}}$  obvykle velká a krosník je pozorován téměř vždy; b) je-li dihedrál ní úhel v molekulové struktuře fixován přibližně u  $90^\circ$  (často u cyklických a zejména polycyklických struktur), pak je  $^3J_{\text{HC}}$  blízka nule a krosník je obvykle žádný nebo málo intenzivní. Interakci přes čtyři vazby  $^4J_{\text{HC}}$  je obvykle malá až nulová a krosník je tedy pozorován vzácně a téměř vždy slabé intenzity. Interakce přes pět a více vazeb jsou obvykle blízke nule a krosník je tedy pozorován vzácně a vždy velmi slabé intenzity.
17.  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  INADEQUATE je NMR experiment detekující interakci  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$ . Vzhledem k velmi malému zastoupení isotopologů obsahujících dva  $^{13}\text{C}$  isotopy je citlivost tohoto experimentu velmi malá a spektrum lze získat jen u velmi koncentrovaných vzorků a použitím přístrojů s vysokou citlivostí. Spektrum je však velmi ceněno neboť z něj lze snadno odečíst uhlíkovou kostru molekuly. Krosníky jsou dublety, jejichž píky směřují k  $^{13}\text{C}$  satelitům  $^{13}\text{C}$  signálů, které jsou přibližně symetrické kolem  $^{13}\text{C}$  signálu, ale pouze ca. 0.55 % jeho intenzity. V druhé ose spektra je pak hodnota rovnající se součtu chemických posunů interagujících jader. Při experimentu se nastavuje velikost interakční konstanty, na kterou má být experiment nejcitlivější. Lze tak detekovat interakce přes jednu vazbu ( $^1J_{\text{CC}} = 30\text{-}70$  Hz) nebo přes více vazeb ( $J_{\text{CC}} < 15$  Hz).
18.  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  ADEQUATE je NMR experiment nejčastěji detekující interakce  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  s využitím interakce  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ . Oproti INADEQUATE je tato sekvence výrazně citlivější, avšak vyžaduje,

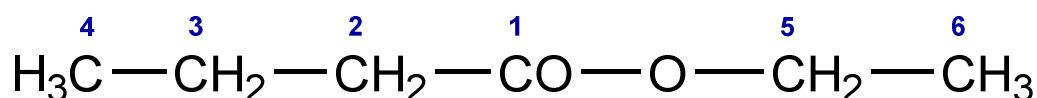
aby alespoň na jedno z interagujících  $^{13}\text{C}$  jader byl vázán vodík, jinak není interakce  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  detekována. Nejčastěji se využívá interakcí přes jednu vazbu, tedy  $^1J_{\text{CC}}$  a  $^1J_{\text{HC}}$ , tzv. 1,1-ADEQUATE. Experiment je prováděn jako SQ (*single quantum*) nebo DQ (*double quantum*). Při SQ provedení jsou souřadnice krosníku chemické posuny  $^1\text{H}$  na jedné ose a  $^{13}\text{C}$  na druhé ose, kdy krosník dokládá interakci jádra  $\delta_{\text{H}}$  s jádrem  $^{13}\text{C}$ , které je vázáno na jádro s posunem  $\delta_{\text{C}}$ , tedy interakci mezi  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$ . Při DQ provedení jsou souřadnice krosníku chemické posuny interagujícího  $^1\text{H}$  na jedné ose a součet chemických posunů interagujících  $^{13}\text{C}$  jader na druhé ose, kdy krosník dokládá interakci jádra  $\delta_{\text{H}}$  s některým z interagujících jader  $^{13}\text{C}$ .

19.  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  ROESY a NOESY jsou NMR experimenty, které detekují přímou interakci jader přes prostor, kdy souřadnice krosníku jsou chemické posuny interagujících jader. Intenzita krosníku je úměrná vzdálenosti interagujících jader  $1/r^6$ . Pozorovány jsou interakce jader vzdálených od sebe do ca. 0.5 nm (5 Å).

### UBTE ... Ethylbutyrát - příklad přiřazení NMR signálů

Pro naměření NMR spekter ve vysoké kvalitě v krátkém čase byl použit velmi koncentrovaný vzorek ethylbutyrátu (UBTE,  $C_6H_{12}O_2$ ,  $M = 116.16$  g/mol) připravený rozpuštěním 300  $\mu$ L (253.6 mg, 2.18 mmol) ve 250  $\mu$ L  $CDCl_3$ . Připravený roztok o koncentraci ca. 4 mol/L byl ve standardní atmosféře zataven do NMR kyvety vysoké kvality (600 MHz).

Zásadním krokem pro jednoznačné přiřazení NMR signálů známé molekulové struktury je inspekce molekulové struktury samotné. Díky tomu lze jednoznačně určit počet signálů a jejich integrální intenzitu, odhadnout jejich multiplicitu, chemický posun, velikost interakčních konstant a případně i další charakteristiky.



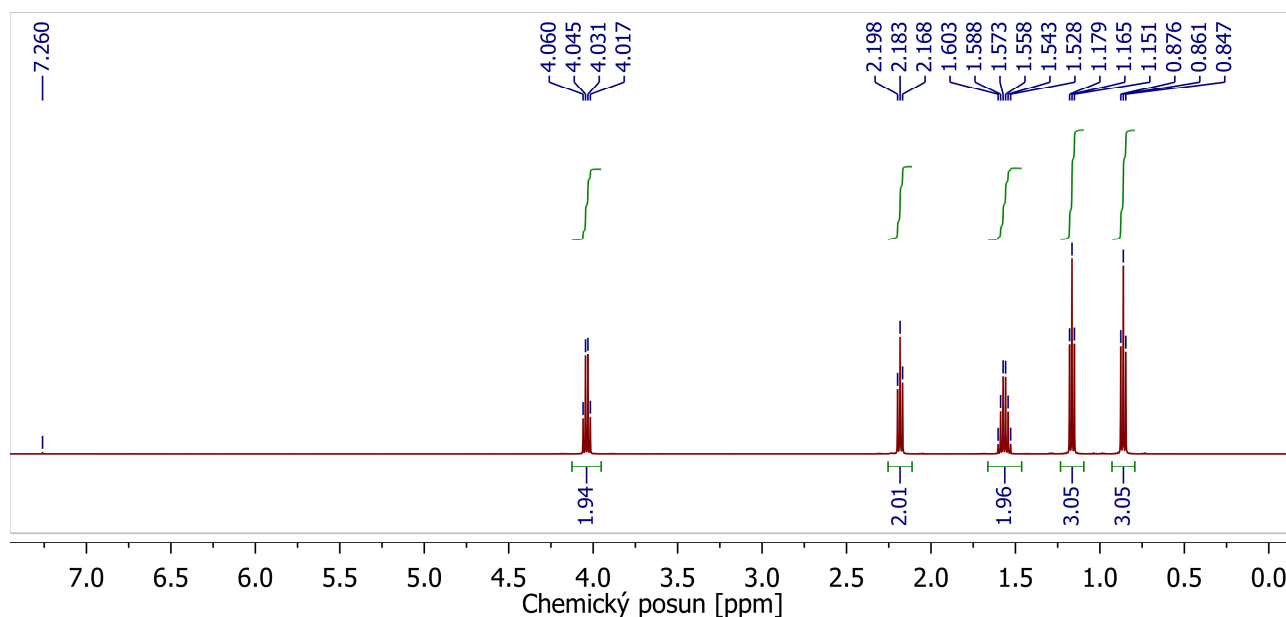
Molekula UBTE je nesymetrickou molekulou s volnou rotací kolem jednoduchých vazeb bez přítomnosti chirálního centra.

Molekula bude mít ve vodíkovém  $^1H$  NMR spektru pět signálů. Pro vodíky H4 triplet relativní integrální intenzity 3H, pro H3 kvartet tripletů (nebo triplet kvartetů) intenzity 2H, který však v případě podobnosti interakčních konstant bude pozorován jako sextet, pro vodíky H2 očekáváme triplet intenzity 2H, pro vodíky H5 kvartet intenzity 2H a pro vodíky H6 triplet intenzity 3H. Již teď je zřejmé, že dva  $^1H$  signály jsou jednoznačně přiřaditelné pro svou jedinečnost. I u čisté látky však může být přiřazení komplikováno překryvem signálů studované molekuly nebo v důsledku přílišné blízkosti interagujících signálů vznikem signálů druhého řádu.

V uhlíkovém  $^{13}C$  NMR spektru bude šest signálů, z nichž bude téměř jednoznačně přiřaditelný signál uhlíku esterové skupiny a signál uhlíku  $CH_2-O$  skupiny, pro jejich charakteristický chemický posun.

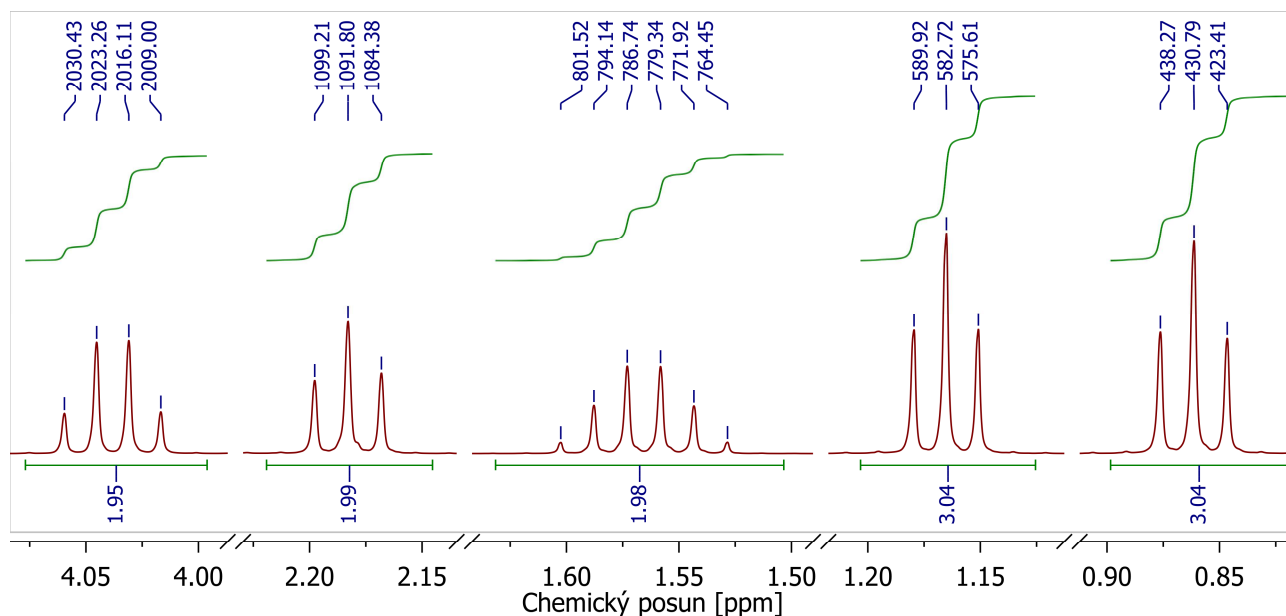
V kyslíkovém  $^{17}O$  NMR spektru budou pozorovány dva signály.

**UBTE-1a.** Přehledové  $^1\text{H}$  NMR spektrum (500.16 MHz)



Signál 7.260 ppm je signálem  $\text{CHCl}_3$  („zbytkové rozpouštědlo“), který je přirozenou nečistotou  $\text{CDCl}_3$  použitého jakožto rozpouštědla. Tento signál je často využíván jako vnitřní standard pro referencování spekter místo TMS. Signál vody (v  $\text{CDCl}_3$  obvykle 1.5 ppm) pro její nízký obsah pozorován není. Dle očekávání je pozorováno pět signálů odpovídající relativní integrální intenzity: 4.04 (2H), 2.18 (2H), 1.57 (2H), 1.17 (3H) a 0.86 (3H).

**UBTE-1b.** Detail na jednotlivé signály z **1a**.



Detailním náhledem na jednotlivé signály je zřejmá jejich multiplicita a lze odečíst interakční konstanty: 4.04 (2H, q, 7.14), 2.18 (2H, t, 7.42), 1.57 (2H, sex, 7.41), 1.17 (3H, t, 7.16) a 0.86 (3H, t, 7.43). Nyní lze jednoznačně přiřadit signál 4.04 ppm vodíkům H5 neboť je to jediný kvartet ve

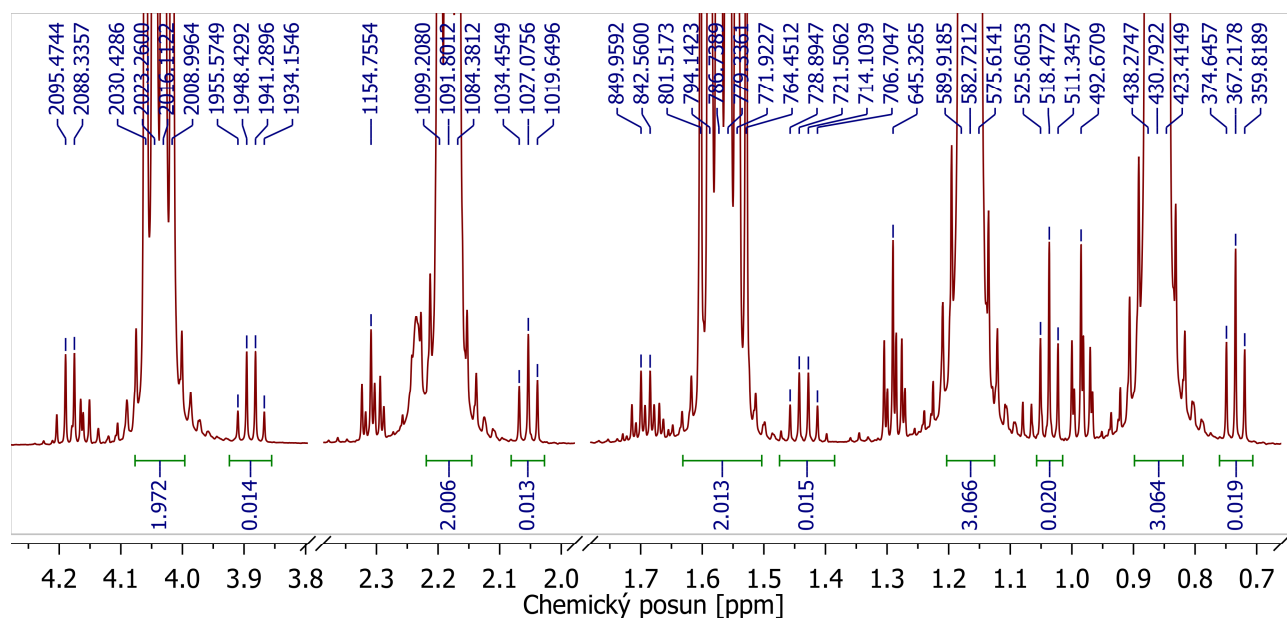


spektru a má dle očekávání největší chemický posun. Dále lze jednoznačně přiřadit signál 1.57 ppm vodíkům H3 neboť je jediným signálem mající očekávanou multiplicitu, kdy jako sextet je pozorován pro velmi podobnou interakční konstantu H2-H3 a H3-H4.

Porovnáním velikostí interakčních konstant lze udělat závěr, že signál 4.04 ppm interaguje se signálem 1.17 ppm, neboť mají stejnou interakční konstantu. Od ostatních se liší o 0.3 Hz, což je u současných přístrojů nad obvyklou přesností 0.1 Hz. Mutliplicita i intenzita těchto signálů odpovídá očekávanému. Střeňový efekt mezi těmito signály je téměř zanedbatelný neboť rozdíl chemických posunů těchto signálů  $4.04 - 1.17 \text{ ppm} * 500.16 \text{ MHz} = 1435 \text{ Hz}$  je 200-krát větší než jejich vzájemná interakční konstanta. Tyto signály lze tedy přiřadit ethylové skupině, avšak je vhodné využít COSY spekter k potvrzení.

Zbývající signály spektra pak lze přiřadit propylové skupině, kdy přiřazení tripletů je zřejmé z jejich integrální intenzity a v souladu s očekávanými hodnotami: 2.18 ppm pro vodíky H2 a 0.86 ppm pro vodíky H4. Vzhledem k blízkosti chemických posunů signálů H2-H3 a H3-H4, je již patrný střeňový efekt (viz též **1a**) jak u signálu vodíků H2 tak H4. U signálu H3 je střeňový efekt potlačen protichůdným efektem sousedních signálů. Toto přiřazení je vhodné potvrdit COSY spektrem.

#### UBTE-1c. Nečistoty, $^{13}\text{C}$ satelity a rotační signály v $^1\text{H}$ NMR spektru z **1a**



147.0 Zvýšením intenzity spektra **1a** lze pozorovat i signály  $^{13}\text{C}$  isotopologů (přirozené zastoupení ca. 1.1 %) a odečíst interakční konstanty  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  přes jednu vazbu. Signály s interakcí přes dvě a více vazeb jsou obvykle překryty signálem dominantního isotopologu. Pro nízkou intenzitu je identifikace těchto signálů často ztížena přítomností nečistot a rotačními píky.

Tyto signály mají obvykle multiplicitu hlavního signálu ( $^1\text{H}$  vázané na  $^{12}\text{C}$ ,  $I = 0$ ) zvýšenou o interakci s  $^{13}\text{C}$  isotopem ( $I = 1/2$ ) na dublet multipletu. Jelikož je interakce s  $^{13}\text{C}$  isotopem přes jednu vazbu  $^1J_{\text{HC}}$  obvykle větší než 120 Hz a chemický posun  $^1\text{H}$ - $^{12}\text{C}$  a  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  velmi podobný, jsou jednotlivé části dubletu pozorovány dva multiplety téměř symetricky kolem hlavního signálu o identické integrální intenzitě ca. 0.55 % intenzity hlavního signálu. Obvykle jsou nazývány  $^{13}\text{C}$  satelity. Jejich identifikace může být komplikována přítomností signálů nečistot, rotačních signálů (SSB, Spinning sideband), překryvem signálů a případně i dalšími artefakty nespécifikovaného původu.

Nečistoty obvykle nemají dvojici signálů stejné multiplicity, obvykle nejsou symetricky kolem hlavního signálu, obvykle nemají stejnou intenzitu, obvykle nemají intenzitu blízkou  $^{13}\text{C}$  satelitům a obvykle mezi nimi není frekvenční rozdíl odpovídající reálné  $^1J_{\text{HC}}$ .

Rotační signály jsou identifikovatelné při znalosti rychlosti rotace vzorku při měření, neboť se nacházejí po obou stranách hlavního signálu ve vzdálenosti rovnající se celistvým násobkům rychlosti rotace vzorku, tedy frekvenci otáčení vzorku v Hz. Jednotlivé rotační signály mají vždy stejnou multiplicitu jako hlavní signál a mohou se vzájemně značně lišit intenzitou i fází bez ohledu na symetrii kol hlavního signálu. Změnou rotace vzorku při měření mění rotační signály svou pozici. Měřením vzorku bez jeho rotace rotační signály ve spektru přítomny nejsou.

Analýzou satelitních signálů, lze zjistit rozdíly mezi  $^{12}\text{C}$  a  $^{13}\text{C}$  isotopology. Interakční konstanty  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  se liší pouze o setiny Hz a chemické posuny o tisíce ppm (tedy o jednotky ppb), což dokládá velmi malý isotopový efekt  $^{12/13}\text{C}$ . Pro přiřazení signálů jsou užitečné hodnoty interakčních konstant  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  přes jednu vazbu, kde pouze u signálu 4.04 ppm je  $^1J_{\text{HC}}$  blízká obvyklé hodnotě pro  $\text{CH}_2\text{O}$  skupiny ca. 150 Hz, což je další indicií podporující předchozí přiřazení.

4.04 ppm ( $^3J_{\text{HH}} = 7.15$  Hz),  $^{13}\text{C}$  isotopolog +2.61 ppb ( $^3J_{\text{HH}} = 7.14$  Hz,  $^1J_{\text{HC}} = 147.0$  Hz)

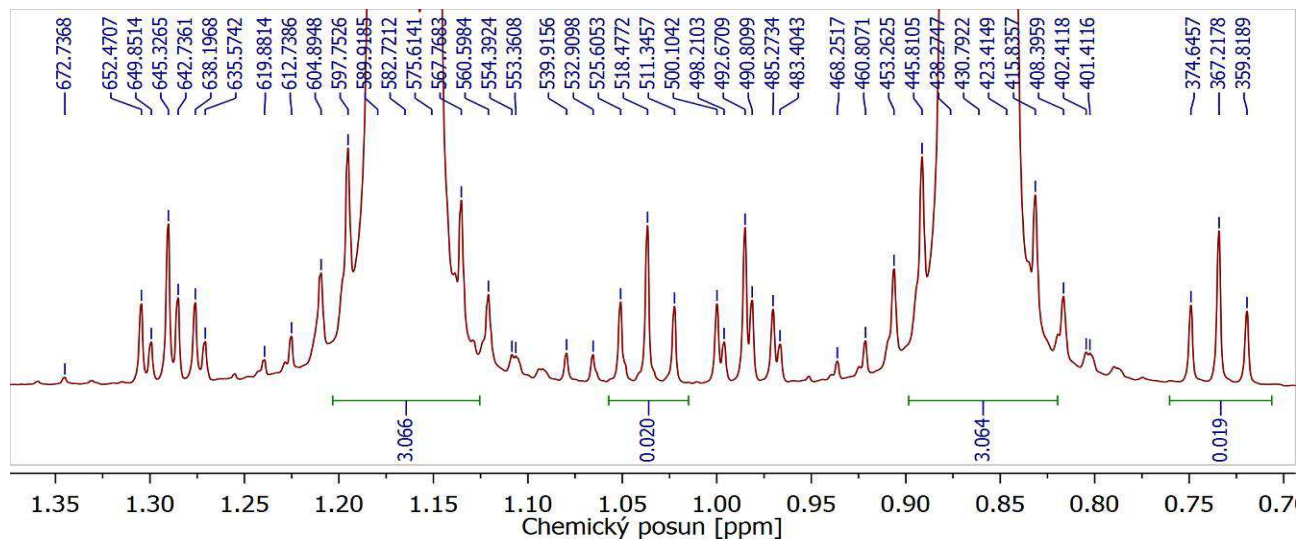
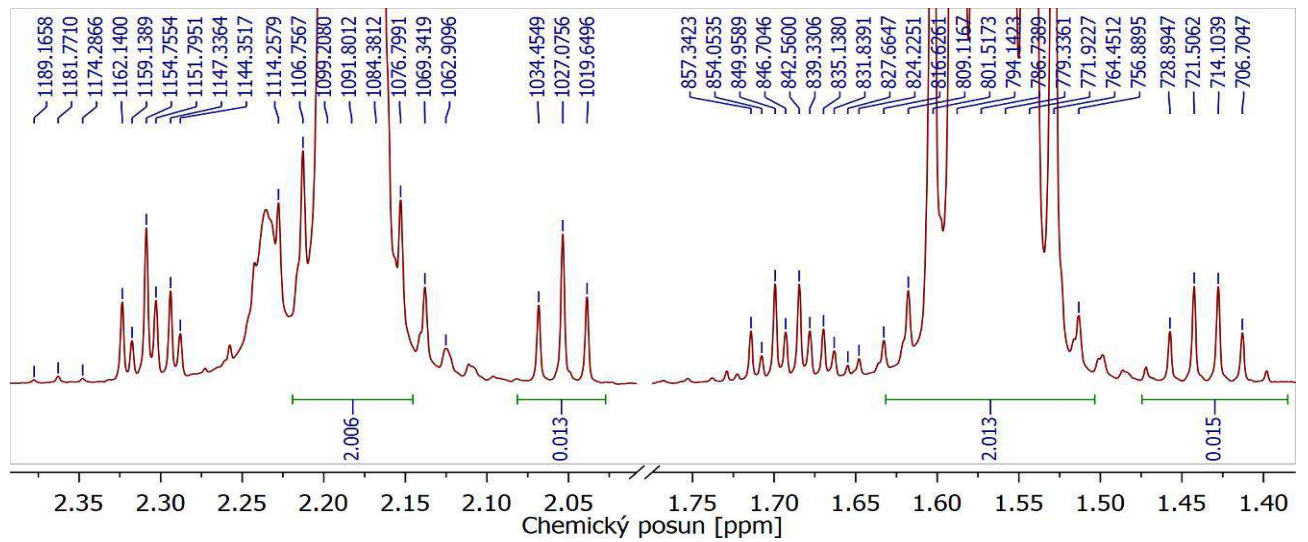
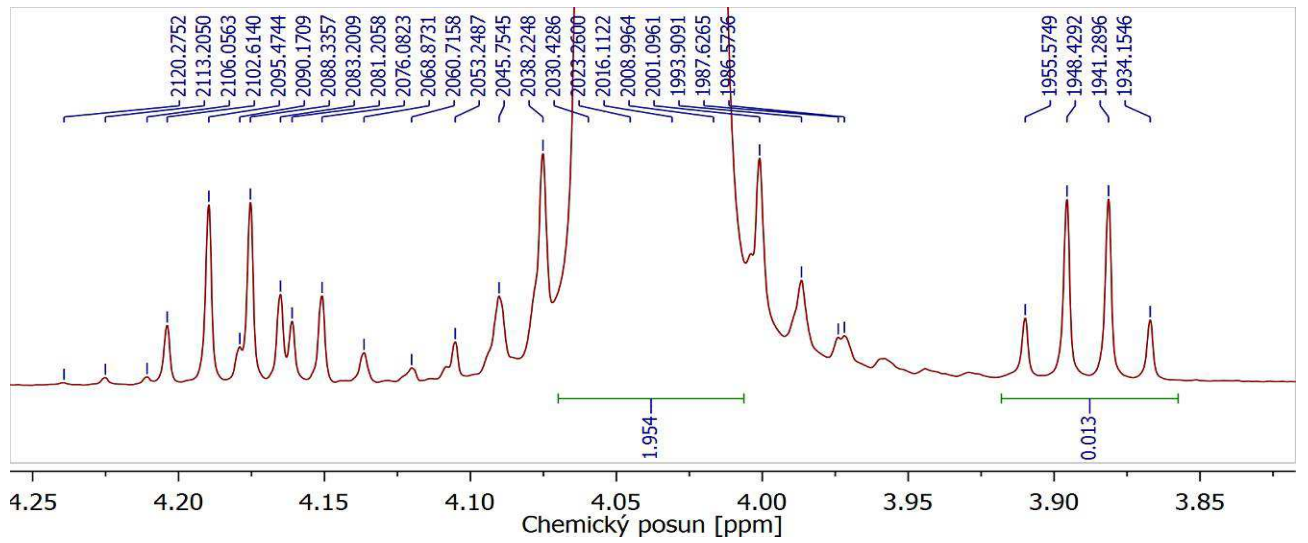
2.18 ppm ( $^3J_{\text{HH}} = 7.41$  Hz),  $^{13}\text{C}$  isotopolog +1.77 ppb ( $^3J_{\text{HH}} = 7.40$  Hz,  $^1J_{\text{HC}} = 127.7$  Hz)

1.57 ppm ( $^3J_{\text{HH}} = 7.40$  Hz),  $^{13}\text{C}$  isotopolog +2.01 ppb ( $^3J_{\text{HH}} = 7.40$  Hz,  $^1J_{\text{HC}} = 128.5$  Hz)

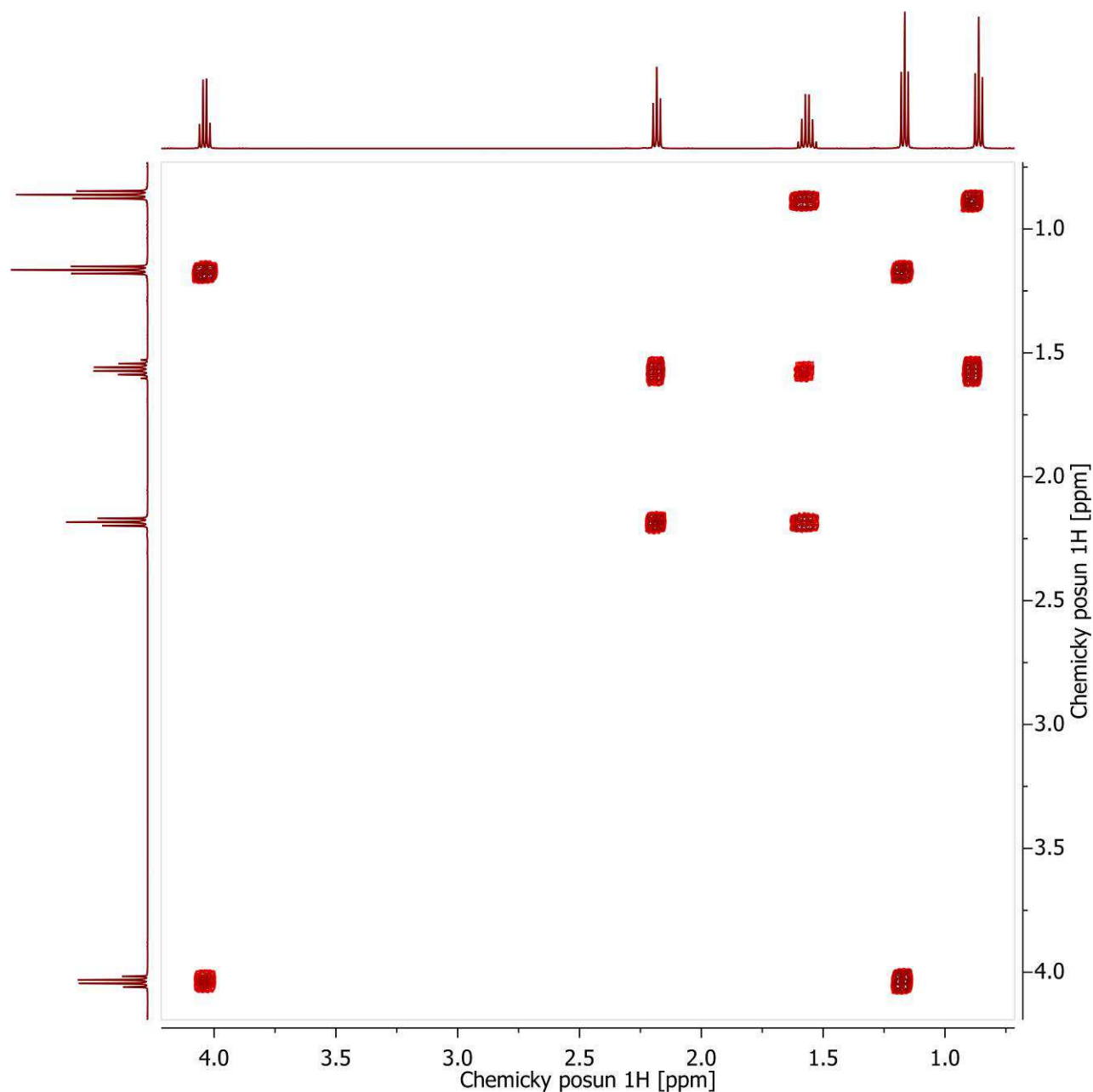
1.17 ppm ( $^3J_{\text{HH}} = 7.15$  Hz),  $^{13}\text{C}$  isotopolog +1.64 ppb ( $^3J_{\text{HH}} = 7.13$  Hz,  $^1J_{\text{HC}} = 126.8$  Hz)

0.86 ppm ( $^3J_{\text{HH}} = 7.43$  Hz),  $^{13}\text{C}$  isotopolog +1.70 ppb ( $^3J_{\text{HH}} = 7.41$  Hz,  $^1J_{\text{HC}} = 125.5$  Hz)

UBTE-1d. ... Detail signálů z 1a

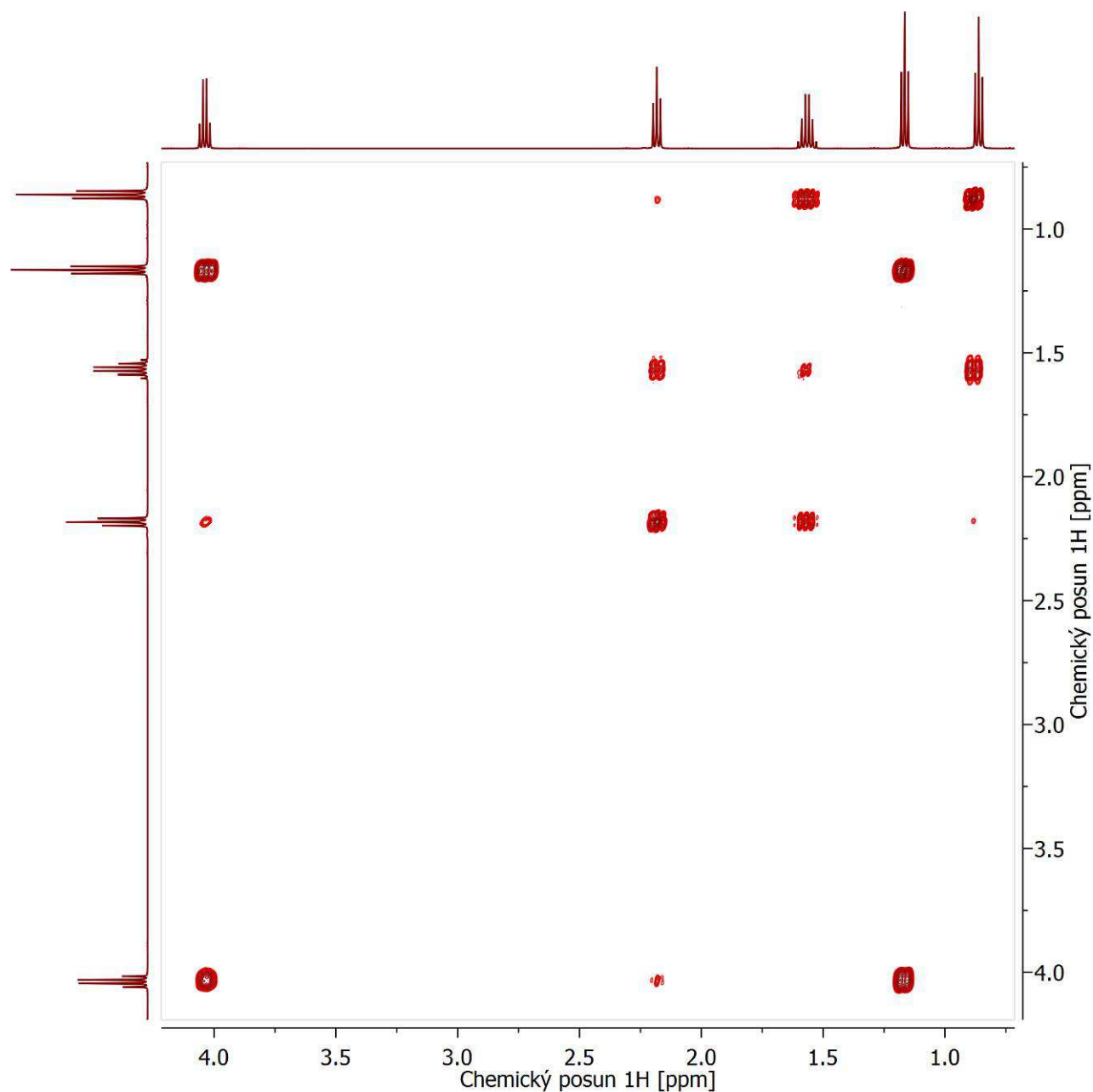


UBTE-2a ...  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  2D gCOSY-90 (500.16 MHz, 2048x1024, NUS 25%)



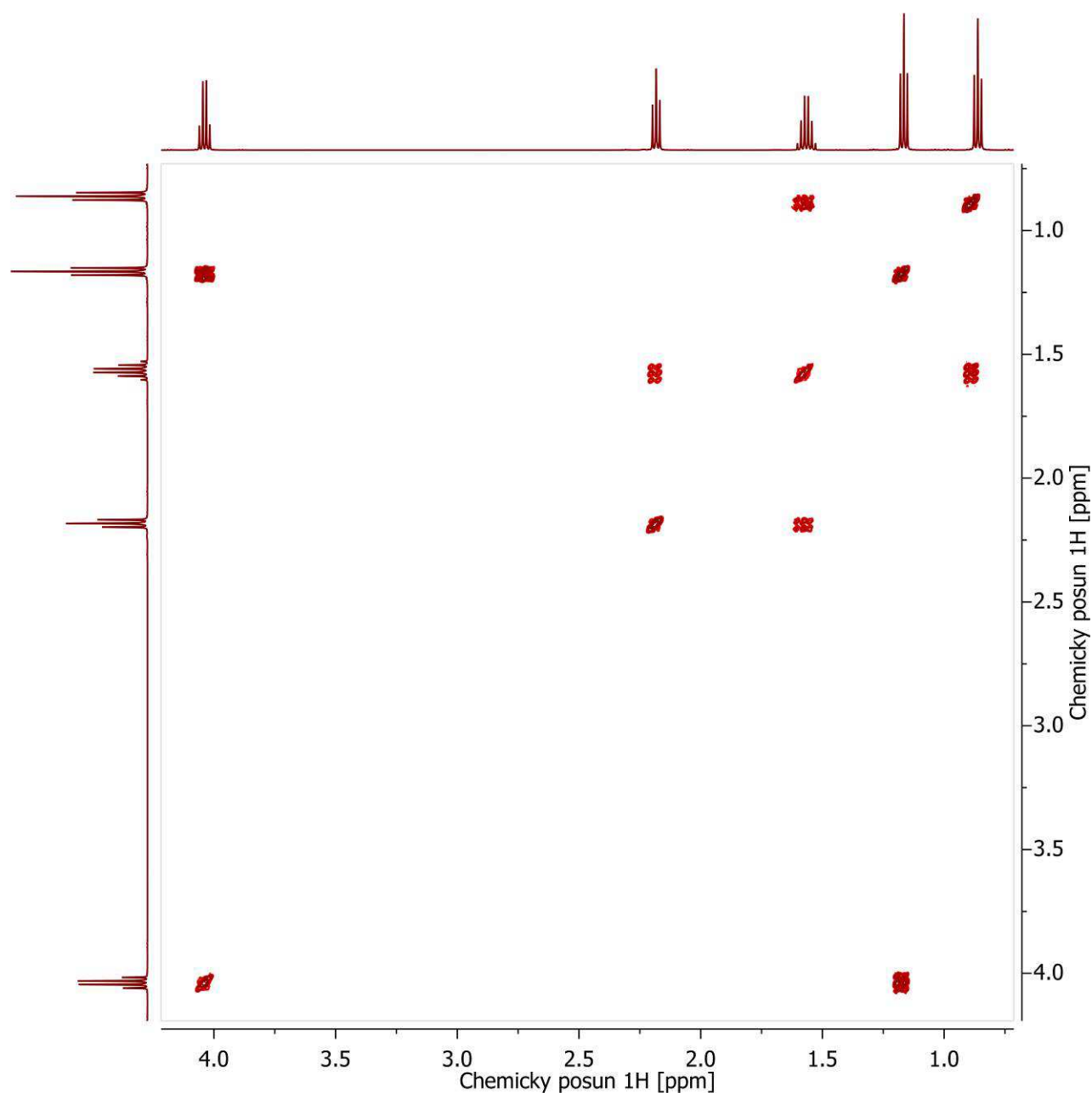
Standardní 2D COSY spektrum obsahuje diagonálové píky, které neposkytují prakticky žádnou novou informaci oproti běžným 1D spektrům. Zásadní informací z 2D COSY spekter jsou krosníky mimo diagonálu, jejichž souřadnice odpovídají chemickým posunům jader interagujících přes vazby. Zde pozorujeme dle očekávání krosníky mezi signálem 4.04 a 1.17 ppm, mezi 2.18 a 1.57 ppm, který má současně krosník i s 0.86 ppm. Ze spektra jsou tak zcela jednoznačně přiřaditelné signály pro ethylovou a pro propylovou skupinu.

UBTE-2b ...  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  2D LR gCOSY-90 (500.16 MHz, 400 ms, 2048x1024, NUS 25%)



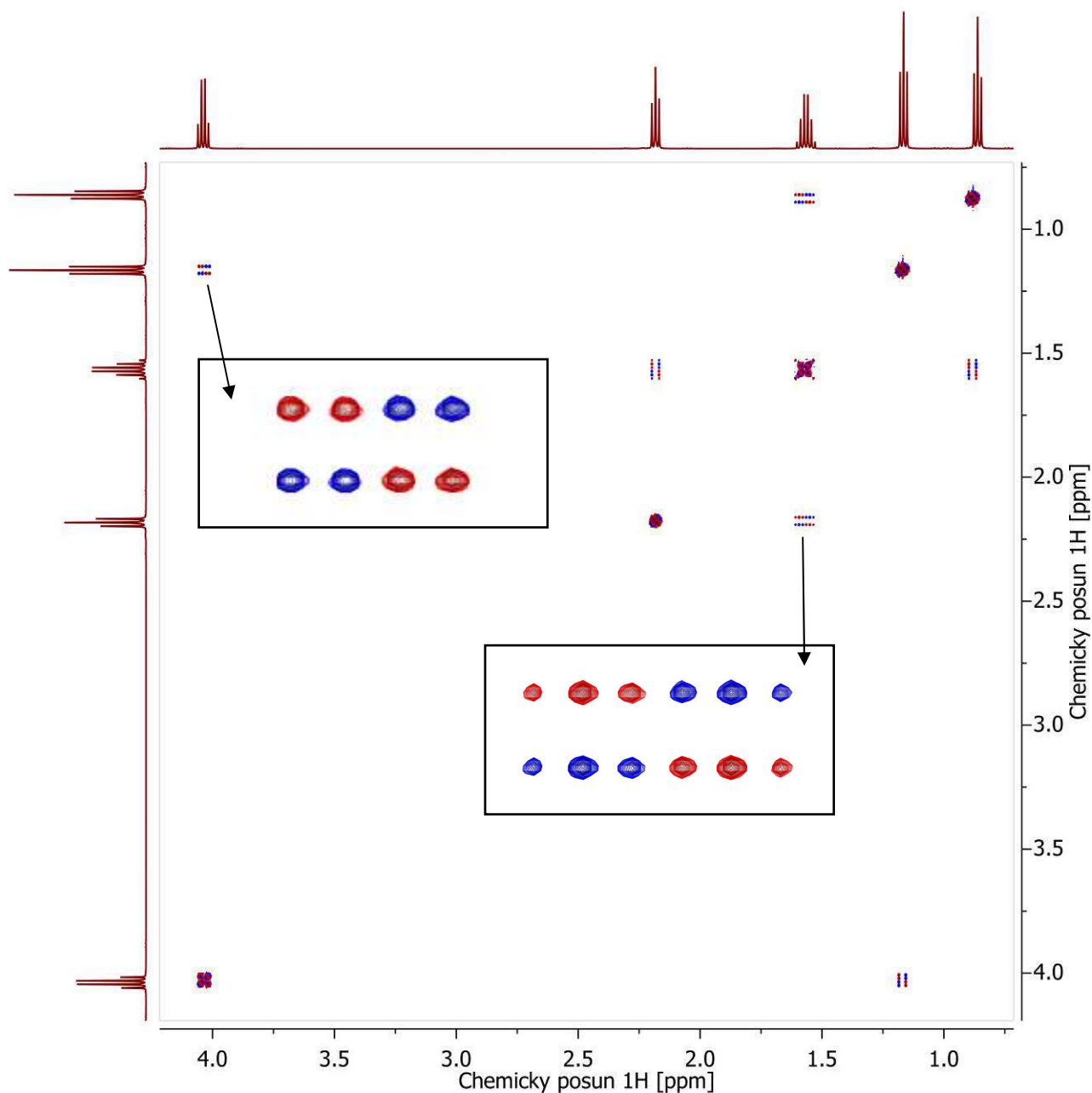
Krospíky v 2D COSY spektrech jsou důsledkem interakce jader přes vazby. Krospík tedy vzniká pouze mezi signály jader majících mezi sebou nenulovou interakční konstantu. Pokud je tato interakce malá (ca. pod 3 Hz), pak je krospík méně intenzivní. Krospíky těchto interakcí lze pozorovat intenzivněji v LR-COSY (*Long Range*). Zde jsou, oproti standardními COSY spektru **2a**, patrné i málo intenzivní krospíky mezi signály 4.04 a 2.18 ppm a mezi 2.18 a 0.86 ppm. Což dokládá jejich interakci přes vazby.

UBTE-2c ...  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  2D gCOSY-45 (500.16 MHz, 2048x1024, NUS 25%)

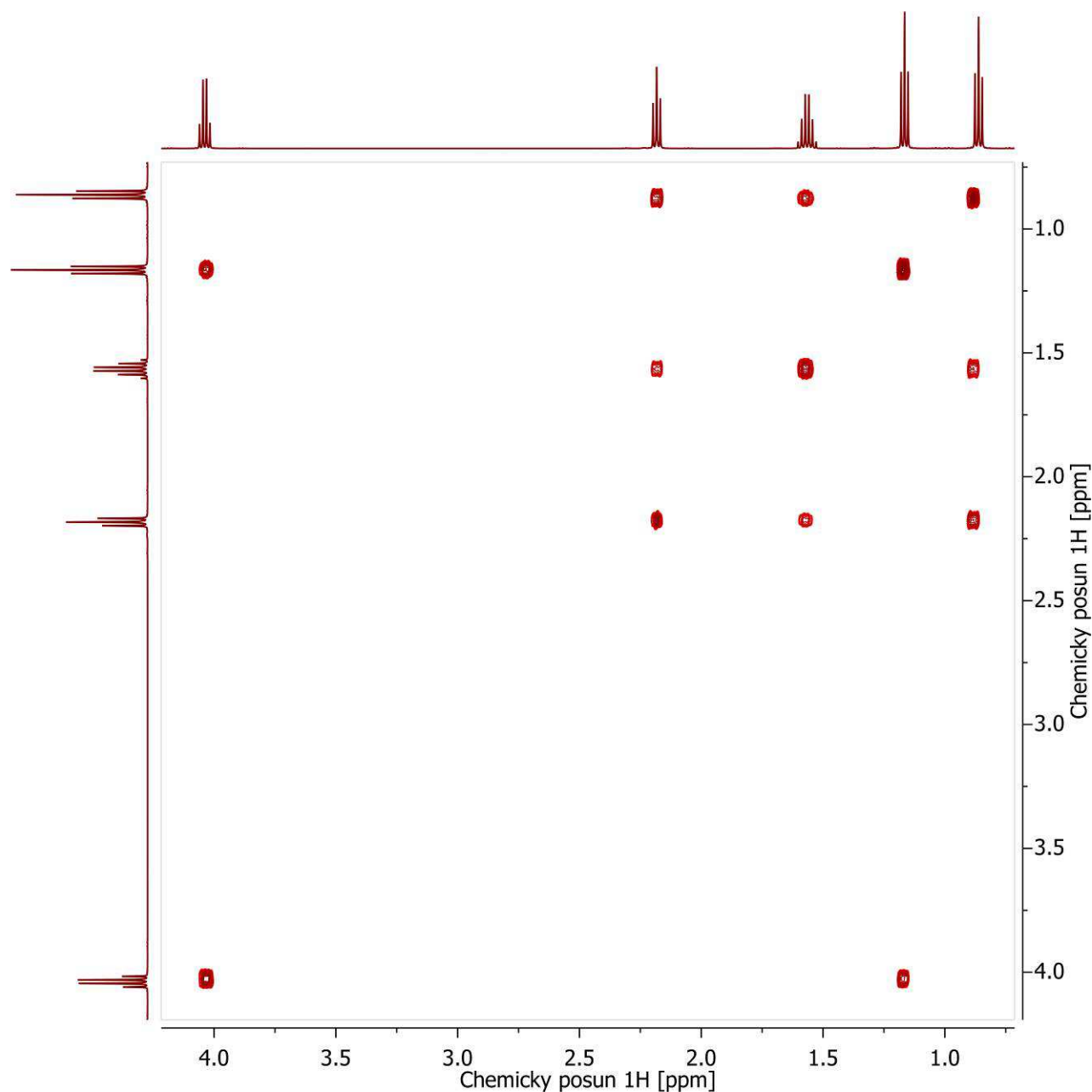


Krospíky ve 2D COSY-45 spektrech jsou oproti krospíkům ve standardním 2D COSY-90 spektru **2a** jsou obvykle jednodušší a často umožňují stanovit znaménko interakční konstanty. Dalším přínosem je též podstatně zredukovaná intenzita i složitost (velikost) diagonálních píků. Díky těmto vlastnostem jsou krospíky signálů s podobnými chemickými posuny, tj. s krospíky v blízkosti diagonály, v COSY-45 snadněji identifikovatelné, neboť v COSY-45 je méně překryvů než v COSY-90. Zde nepřináší COSY-45 žádnou novou informaci a pouze demonstruje zúžení diagonálních píků oproti COSY-90 (**2a**).

UBTE-2d ...  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  2D DQF-COSY (500.16 MHz, 4096x2048, NUS 25%)



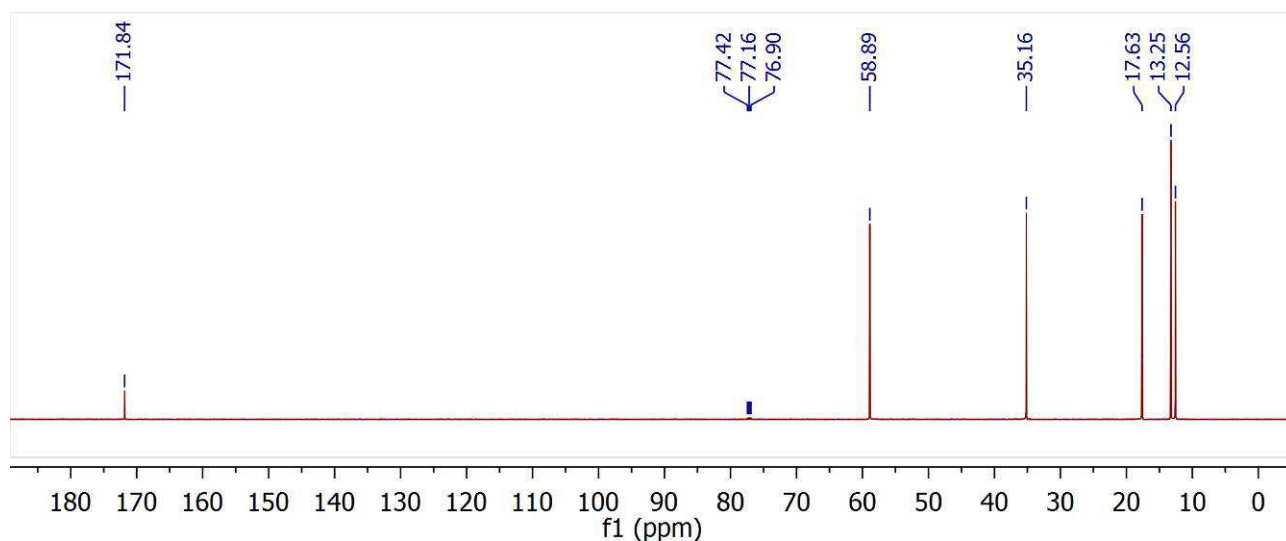
Krospíky ve 2D DQF-COSY (*Double Quantum Filtered*) mají *anti-phase* strukturu díky které lze stanovit jak multiplicitu signálů interagujících jader, tak jejich interakční konstanty (viz detaily v obrázku). Kompletní výklad jejich struktury je nad rámec tohoto předmětu. Podstatné je, že souřadnice krospíků odpovídají chemickým posunům interagujících jader. Užitečnou vlastností 2D DQF-COSY spekter je skutečnost, že singletové signály nemají diagonálové píky, čímž je pozorování krospíků v blízkosti diagonály často podstatně snazší než v jiných 2D COSY spektrech.

UBTE-3a ...  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  2D TOCSY (500.16 MHz, 2048x1024, NUS 25%, 60 ms)

2D TOCSY spektra (*Total Correlation Spectroscopy*) oproti 2D COSY spektrům obsahují navíc krospektrumy mezi signály interagujících jader celého spinového systému. Zde, je typický příklad, kdy oproti COSY spektru (**2a**, **2c**, **2d**) pozorujeme i intenzivní krospektrum mezi signálem 2.18 a 0.86 ppm, který není důsledkem velmi slabé interakce přes vazby (viz **2b**), ale důsledkem přítomnosti v totožném spinovém systému. Má-li signál 1.57 ppm interakci jak se signálem 2.18 ppm tak se signálem 0.86 ppm, pak ve 2D TOCSY spektru bude krospektrum i mezi signály 2.18 a 0.86 ppm i v případě, že mezi sebou nemají nenulovou interakční konstantu. TOCSY spektra jsou zásadním přínosem pro analýzu, zejména pokud jsou ve spektru překryvy signálů nebo je ve spektru přítomno více podobných spinových systémů (např. oligosacharidy).

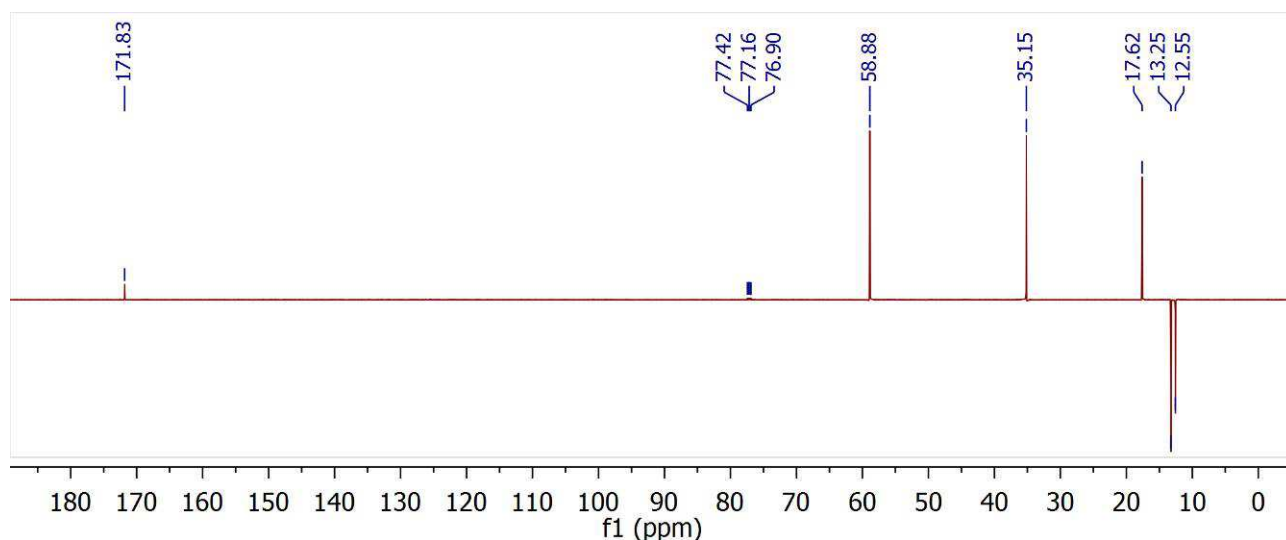


**UBTE-4a.**  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  NMR spektra (125.77 MHz)

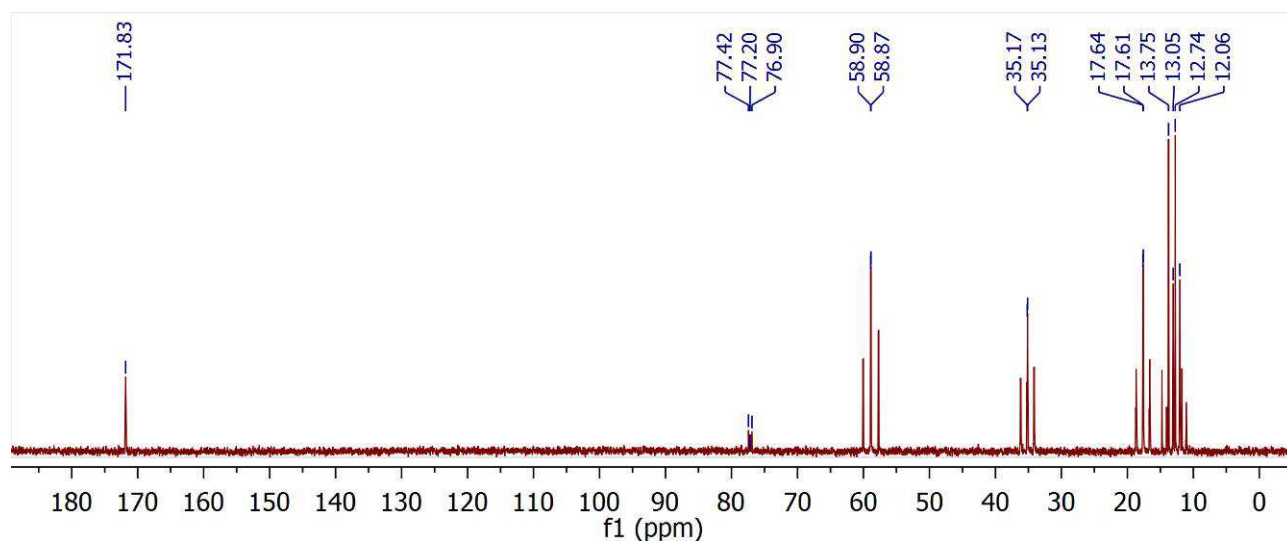


Standardní  $^{13}\text{C}$  NMR spektra jsou prakticky výhradně měřena s dekaplinkem  $^1\text{H}$  jader a obvykle tak nejsou označována  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ , ale pouze  $^{13}\text{C}$ . Všechny interakce s  $^1\text{H}$  jsou tedy ve spektru odstraněny. Naproti tomu interakce s jinými jádry jsou zachovány. Zde je například pozorován signál uhlíku  $\text{CDCl}_3$  použitého jako rozpouštědla 77.16 ppm jako triplet 1:1:1 v důsledku interakce  $^{13}\text{C}$  s  $^2\text{H}$  jádrem majícím spin  $I = 1$ . Pro UBTE je dle očekávání pozorováno šest signálů: 171.81, 58.87, 35.11, 17.60, 13.23 a 12.55 ppm. Na základě chemického posunu lze odhadnout, že signál 171.81 ppm náleží uhlíku karboxylové skupiny, a signál 58.89 ppm náleží uhlíku  $\text{CH}_2\text{O}$  skupiny.

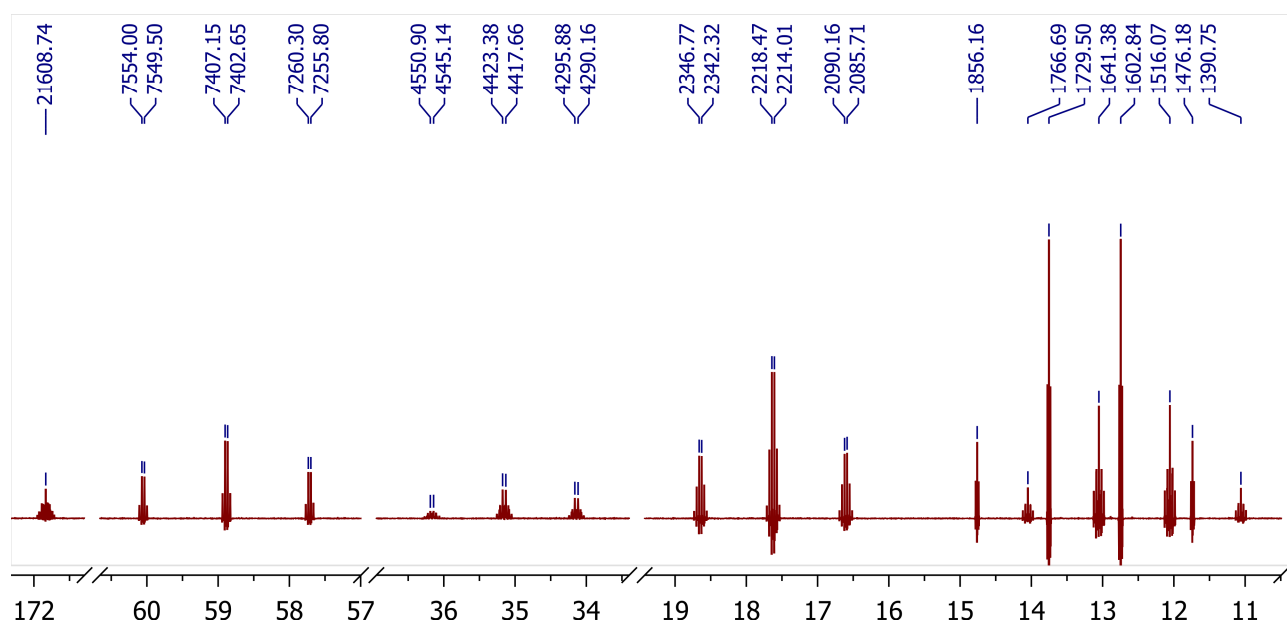
**UBTE-4b.**  $^{13}\text{C}$  APT NMR spektra (125.77 MHz)



Velmi přínosným  $^{13}\text{C}$  spektrem je APT spektrum (*Attached Proton Test*), který umožňuje rozlišit ve spektru signály uhlíků s lichým počtem vodíků ( $\text{CH}$  a  $\text{CH}_3$ ), jejichž signály jsou negativní, od signálů uhlíků se dvěma či žádným vodíkem ( $\text{CH}_2$  a  $\text{C}$ ), jejichž signály jsou pozitivní. Zde jsou tak snadno identifikovatelné signály  $\text{CH}_3$  skupin.

UBTE-4c.  $^{13}\text{C}$  NMR spektra (125.77 MHz)

Měření  $^{13}\text{C}$  NMR spekter bez dekaplinku protonů zůstanou interakce s protony zachovány, čímž se spektrum značně komplikuje a měření má výrazně nižší citlivost. Na druhou stranu multiplicita signálů a hodnoty interakčních konstant vypovídají o struktuře molekuly mnohé. Multiplicitu signálů lze snadno přiřadit interakci s jádry přes jednu vazbu ( $^1J_{\text{CH}}$  je obvykle větší než 110 Hz) a interakci s jádry přes více vazeb ( $^{\geq 1}J_{\text{CH}}$  je obvykle menší než 30 Hz). Skupiny  $\text{CH}_3$  jsou tedy pozorovány jako kvartet multipletů, skupiny  $\text{CH}_2$  jako triplety multipletů, methinové skupiny jako dublety multipletů a signály kvarterních uhlíků jako multiplety. Signál 171.81 ppm tak lze jednoznačně přiřadit uhlíku karboxylové funkce neboť je jediným kvartérním uhlíkem mající jen malé interakční konstanty.



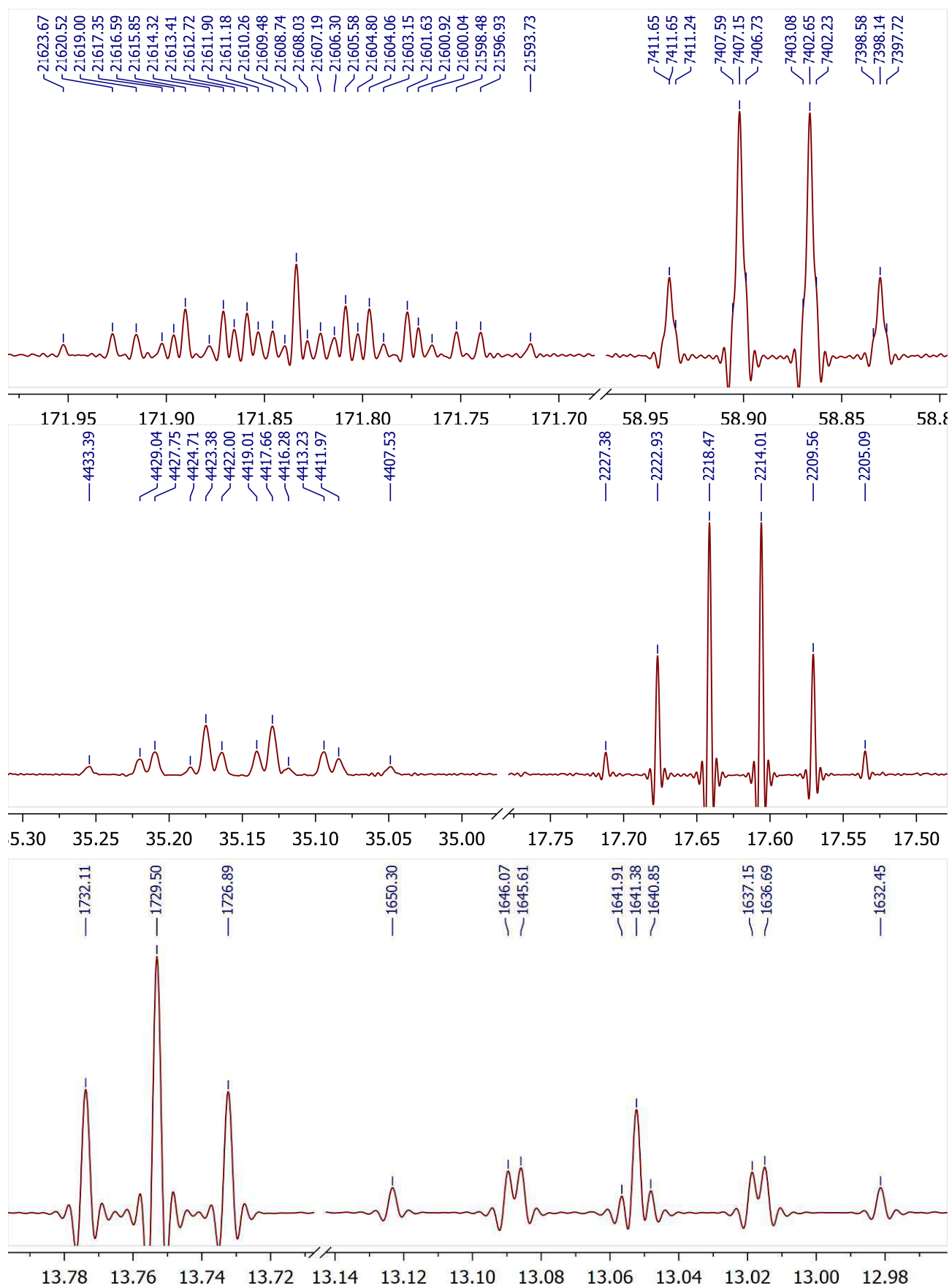
Odečtené interakční konstanty přes jednu vazbu jsou od stejného  $^{13}\text{C}$  isotopologu, který poskytuje v  $^1\text{H}$  NMR spektru satelitní signály, z kterých lze odečíst tutéž interakční konstantu. Porovnáním

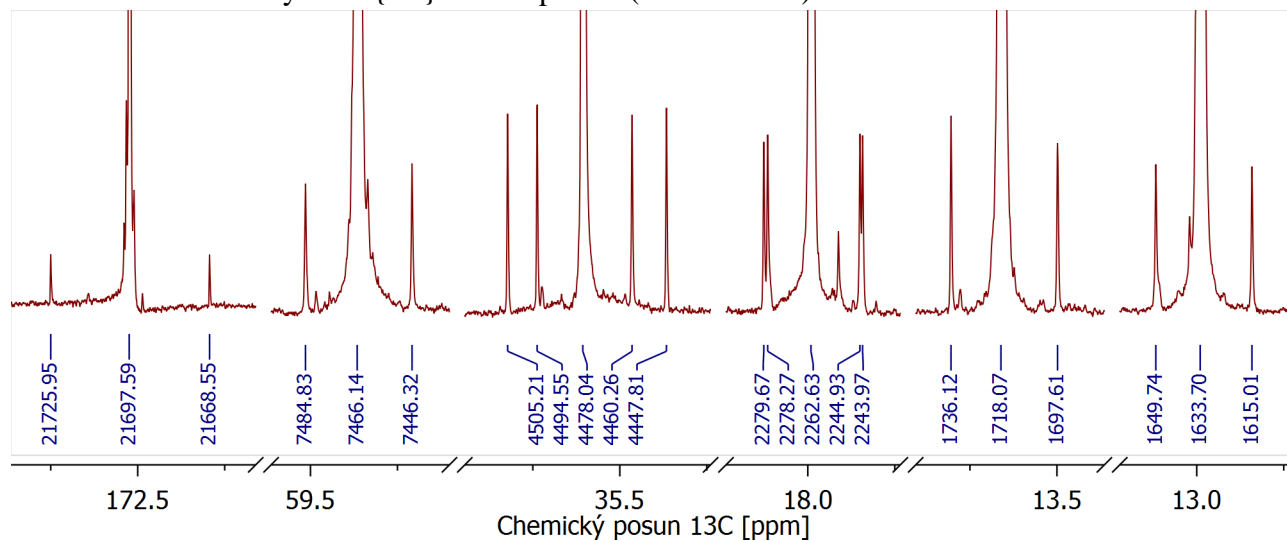
těchto interakčních konstant lze tedy spárovat signály  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  do skupin  $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2$  či  $\text{CH}$ . Jednomu z  $^{13}\text{C}$  isotopologů tak lze přiřadit  $^{13}\text{C}$  signál 58.87 ppm (t,  $^1J_{\text{HC}} = 146.9$  Hz) a  $^1\text{H}$  signál 4.04 ppm (d,  $^1J_{\text{HC}} = 147.0$  Hz), dalšímu 35.11 ppm (t,  $^1J_{\text{HC}} = 127.5$  Hz) a 2.18 ppm (d,  $^1J_{\text{HC}} = 127.7$  Hz), dalšímu 17.60 ppm (t,  $^1J_{\text{HC}} = 128.3$  Hz) a 1.57 ppm (d,  $^1J_{\text{HC}} = 128.5$  Hz), dalšímu 13.23 ppm (q,  $^1J_{\text{HC}} = 126.7$  Hz) a 1.17 ppm (d,  $^1J_{\text{HC}} = 126.8$  Hz), a dalšímu 12.55 ppm (q,  $^1J_{\text{HC}} = 125.3$  Hz) a 0.86 ppm (d,  $^1J_{\text{HC}} = 125.5$  Hz). Těchto interakčních konstant využívají HSQC a HMQC experimenty.

Detailní analýzou signálů (**4d**) lze odečíst interakční konstanty přes více než jednu vazbu: 171.81 (ttt, 7.1, 4.7, 3.1), 58.87 (tqt, 146.9, 4.5, 0.4), 35.11 (tqt, 127.5, 5.7, 4.4), 17.60 (tsex, 128.3, 4.5, signál je pozorován jako triplet sextetu místo očekávaného tripletu kvartetů, protože interakční konstanty s  $^1\text{H}$  okolních  $\text{CH}_2$  a  $\text{CH}_3$  skupin jsou náhodně téměř shodné), 13.23 (qt, 126.7, 2.6), 12.55 (qtt, 125.3, 4.7, 4.2). Interakční konstanty přes více vazeb jsou od  $^{13}\text{C}$  isotopologů jejichž signály jsou v  $^1\text{H}$  spektru obvykle zcela překryty signály  $^{12}\text{C}$  isotopologů, a hodnoty interakčních konstant tak není s čím porovnávat. Multiplicita, která je důsledkem interakce přes více vazeb jednoznačně odráží počet a typ  $^1\text{H}$  v okolí, avšak z hodnoty interakční konstanty obvykle nelze jednoznačně rozhodnout o počtu vazeb mezi interagujícími jádry. Těchto interakčních konstant se využívá v HMBC experimentech.

Zde je z multiplicity zřejmé, že signál 13.23 ppm náleží uhlíku methylové skupiny (je pouze qt) ethylové skupiny a signál 58.87 ppm náleží uhlíku její methylenové skupiny, kde interakční konstanta 0.4 Hz je  $^4J_{\text{CH}}$  s vodíky  $\text{CH}_2\text{CO}$  skupiny. Druhý kvartetový signál 12.55 ppm tak lze jednoznačně přiřadit methylu propylové skupiny. Signály 35.11 a 17.60 ppm nelze pro podobnost interakčních konstant jednoznačně přiřadit a zůstává tak pouze odhad na základě jejich chemického posunu.

**UBTE-4d.** Details ze signálů či jejich částí z  $^{13}\text{C}$  NMR spektra **2c** (125.77 MHz)



**UBTE-4e.**  $^{13}\text{C}$  satelity v  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  NMR spektru (125.77 MHz)

Díky vysoké koncentraci vzorku lze v  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  NMR spektru pozorovat  $^{13}\text{C}$  satelity, tedy signály  $^{13}\text{C}_2$  isotopologů. Vzhledem k velikosti interakční konstanty  $^1J_{\text{CC}}$  obvykle 30-80 Hz jsou velmi dobře pozorovány signály isotopomerů  $^{13}\text{C}_2$  isotopologů majících  $^{13}\text{C}$  jádra oddělená jednou vazbou. Oproti  $^{13}\text{C}$  satelitům ve vodíkovém spektru (heteronukleární interakce) mají  $^{13}\text{C}$  satelity v uhlíkovém spektru (homonukleární interakce) tu výhodu, že jsou pozorovány oba signály daného isotopomeru. Díky tomu lze odečíst hodnoty interakčních konstant a jejich porovnáním určit, které z uhlíků jsou na sebe vázány. Zde je již pohledem snadno stanovitelná vazba mezi uhlíky se signály 171.81 a 35.11 ppm, neboť jejich interakční konstanta přes jednu vazbu se výrazně liší od ostatních. Podobně jako u  $^{13}\text{C}$  satelitů v  $^1\text{H}$  spektru, i zde lze pozorovat isotopový efekt.

Signál 171.81 ppm má pouze dva  $^{13}\text{C}$  satelity, což znamená, že uhlík je v molekule vázán pouze na jeden jiný uhlík (pokud je vázán na více uhlíků, pak jsou chemicky ekvivalentní). Signál  $^{13}\text{C}_2$  isotopologu je dublet -2.70 ppb (uvedeno jako rozdíl chemického posunu  $^{13}\text{C}_2$  a  $^{13}\text{C}$  isotopologů, tj. isotopový efekt) a interakční konstantou  $^1J_{\text{CC}} = 57.40$  Hz.

Signál 58.87 ppm má také pouze dva  $^{13}\text{C}$  satelity. Signál  $^{13}\text{C}_2$  isotopologu je dublet -4.49 ppb ( $^1J_{\text{CC}} = 38.51$  Hz).

Signál 35.11 ppm má čtyři  $^{13}\text{C}$  satelity, což znamená, že uhlík je v molekule UTBE vázán na dva různé uhlíky a  $^{13}\text{C}$  satelity jsou od dvou isotopomerů  $^{13}\text{C}_2$  isotopologu. Interpretace satelitů může být trojí. Buď je dublet jednoho isotopomeru první a druhý satelit a dublet druhého isotopomeru třetí a čtvrtý satelit, nebo je dublet jednoho isotopomeru první a třetí satelit a dublet druhého isotopomeru druhý a čtvrtý satelit, anebo je dublet jednoho isotopomeru první a čtvrtý satelit a dublet druhého isotopomeru druhý a třetí satelit. První varianta vede k charakteristikám +173.65 ppb ( $^1J_{\text{CC}} = 10.66$  Hz) a -190.86 ppb ( $^1J_{\text{CC}} = 12.45$  Hz), druhá varianta k charakteristikám +37.33 ppb ( $^1J_{\text{CC}} = 44.95$  Hz) a -54.54 ppb ( $^1J_{\text{CC}} = 46.74$  Hz), a třetí varianta k charakteristikám

-12.17 ppb ( $^1J_{CC} = 57.40$  Hz) a -5.05 ppb ( $^1J_{CC} = 34.29$  Hz). První varianta má abnormálně malé interakční konstanty a abnormálně velký isotopový efekt, a lze ji tedy vyloučit. Druhá varianta má neobvykle velký isotopový efekt, ale interakční konstanty obvyklých hodnot, jejichž hodnoty však nejsou nalezeny u jiných signálů, a tudíž lze i tuto variantu vyloučit. Třetí varianta má typické hodnoty jak isotopového efektu tak interakčních konstant, k nimž jsou nalezeny i signály se stejnou interakční konstantou (viz signály 171.81 a 17.60 ppm), a proto lze tuto variantu interpretace považovat za správnou.

Signál 17.60 ppm má taktéž čtyři  $^{13}\text{C}$  satelity a rovněž tři možné interpretace (viz signál 35.11 ppm). První variantu interpretace lze opět jednoznačně vyloučit neb vede k abnormálním isotopovým efektům (+129.87 a -144.55 ppb) i interakčním konstantám ( $^1J_{CC} = 1.40$  a 0.96 Hz). Druhá i třetí varianta však dává zcela očekávatelné hodnoty. Druhá varianta vede k signálům -2.62 ppb ( $^1J_{CC} = 34.74$  Hz) a -12.01 ppb ( $^1J_{CC} = 34.30$  Hz), a třetí varianta k signálům -6.44 ppb ( $^1J_{CC} = 35.70$  Hz) a -8.19 ppb ( $^1J_{CC} = 33.34$  Hz), přičemž pouze k druhé variantě jsou ve spektru nalezeny signály se stejnou interakční konstantou.

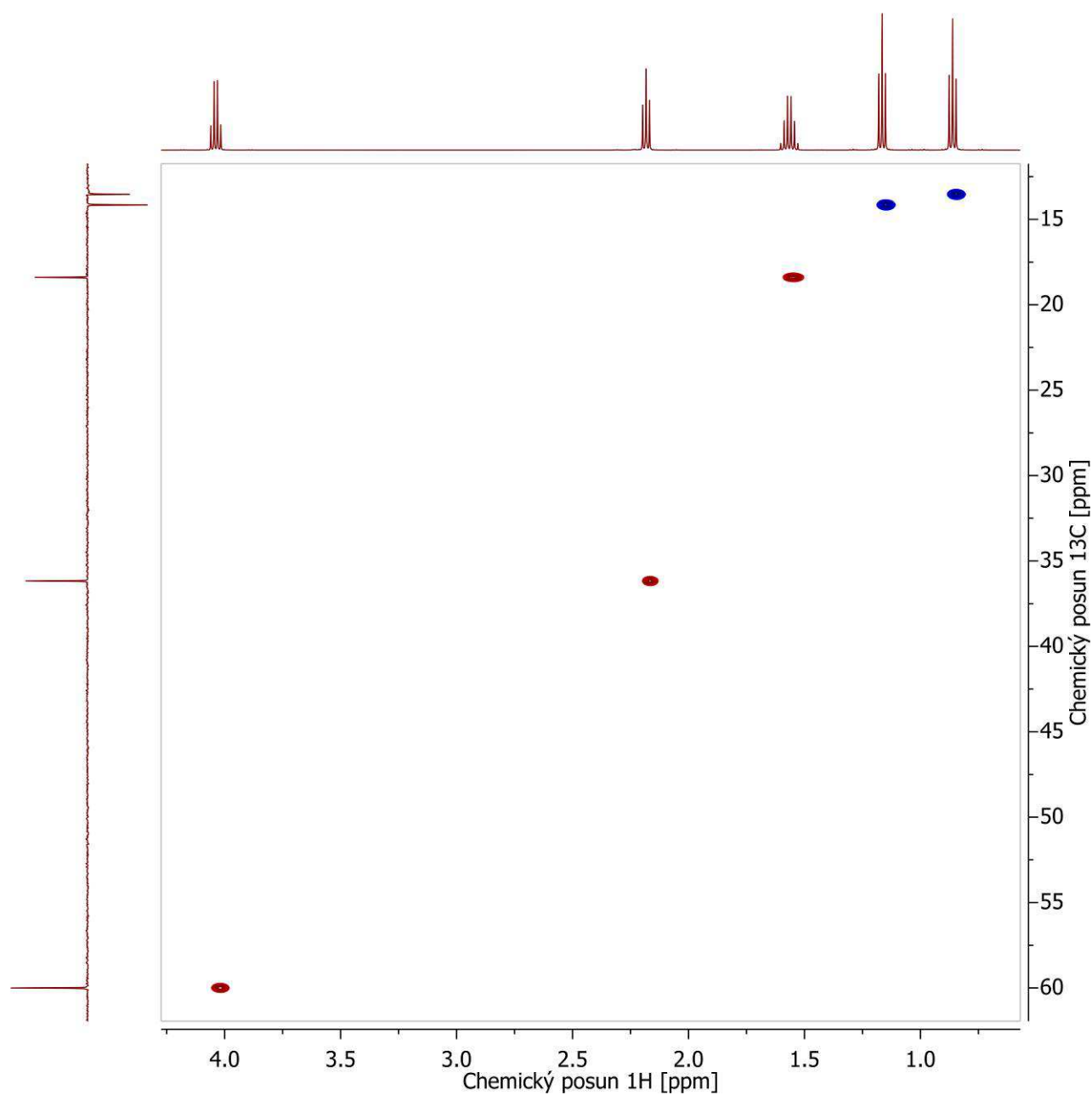
Signál 13.23 ppm má pouze dva  $^{13}\text{C}$  satelity. Signál  $^{13}\text{C}_2$  isotopologu je dublet -9.58 ppb ( $^1J_{CC} = 38.51$  Hz).

Signál 12.55 ppm má pouze dva  $^{13}\text{C}$  satelity. Signál  $^{13}\text{C}_2$  isotopologu je dublet -10.54 ppb ( $^1J_{CC} = 34.73$  Hz).

Signály isotopomerů  $^{13}\text{C}_2$  isotopologů, v nichž jsou  $^{13}\text{C}$  jádra oddělena více než jednou vazbou, jsou obvykle překryty signálem  $^{13}\text{C}$  isotopologu. Snadno pozorovatelné jsou v případech, kdy interakční konstanta mezi těmito jádry je větší než šířka píku  $^{13}\text{C}$  isotopologu v jedné setině jeho výšky alespoň o několik Hertzů. Zde jsou tyto isotopomery dobře pozorovatelné u signálu 171.81 ppm.

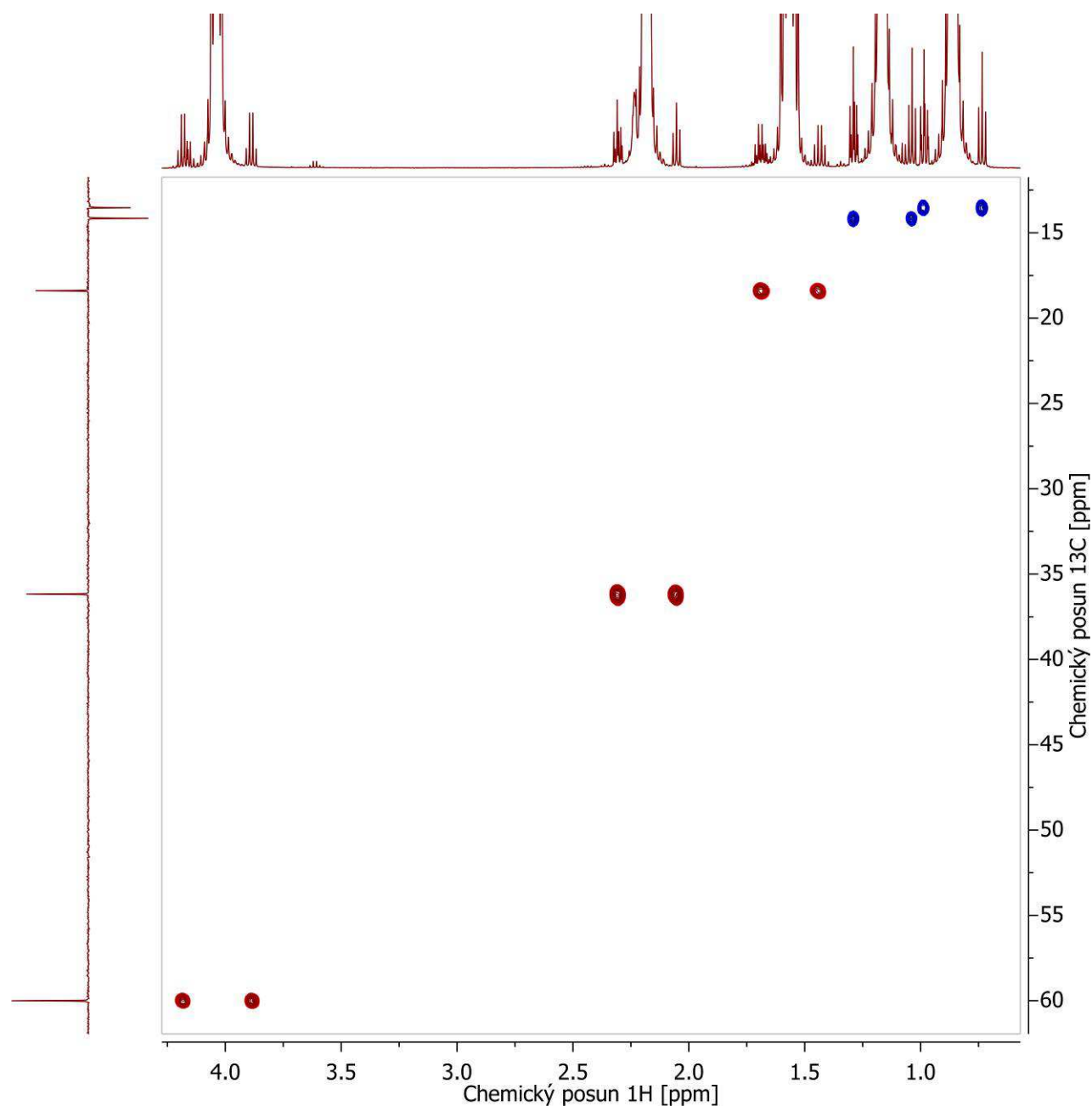
Jak je patrné z výše uvedeného rozboru  $^{13}\text{C}$  satelitů  $^{13}\text{C}$  signálů, není jejich interpretace vždy snadná. Uhlík vázaný na 4 různé uhlíky bude mít 8 satelitních signálů, které mají desítky možných interpretací. Mnohem snadnější a jednoznačnější je naměření  $^{13}\text{C}$  2D INADEQUATE NMR spekter.

### UBTE-5a. $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ 2D gHSQC spektrum



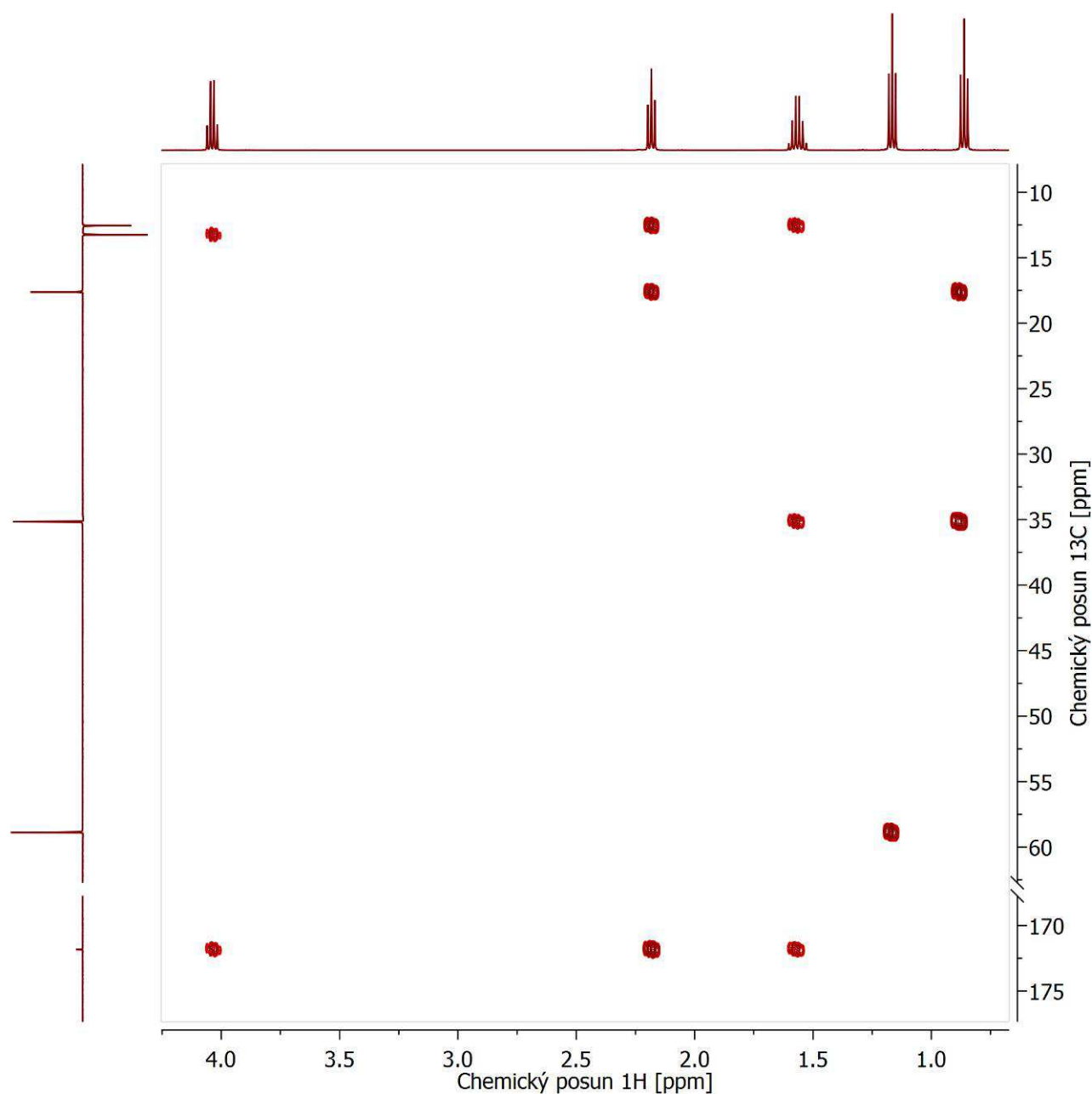
Souřadnice krosníků ve standardním HSQC spektru jsou chemické posuny jader  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  interagujících přes jednu vazbu (viz **5b**). Zde, lze snadno spárovat signály 4.04 ppm a 58.87 ppm, 2.18 ppm a 35.11 ppm, 1.57 ppm a 17.60 ppm, 1.17 ppm a 13.23 ppm, a 0.86 ppm a 12.55 ppm. Přiřazení je tedy identické jako z porovnání interakčních konstant (viz **4c**). Interpretace HSQC však nevyžaduje znalost hodnot interakčních konstant, jejichž získání z  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  spekter je u složitějších sloučenin pro množství překryvů obvykle nemožné. Přiřazení pomocí HSQC je navíc jednoznačné i v případě podobnosti či náhodné rovnosti interakčních konstant.

UBTE-5b ...  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  2D gHSQC spektrum bez dekaplingu  $^{13}\text{C}$



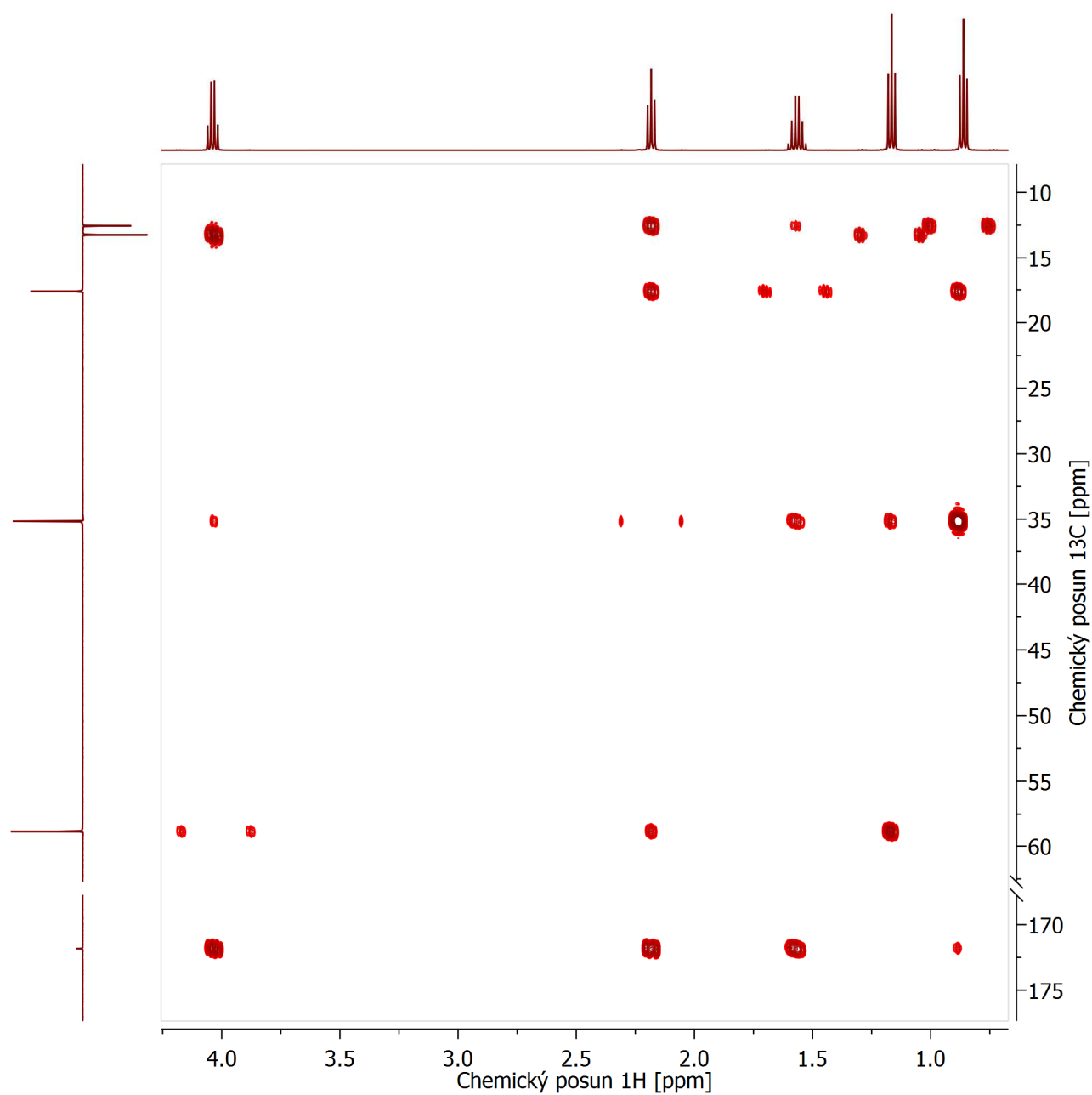
Ze spektra HSQC naměřeného bez dekaplinku  $^{13}\text{C}$  je zřejmé, že se skládá ze signálů jednotlivých isotopomerů  $^{13}\text{C}_1$  isotopologu studované látky, které jsou pozorovány v  $^1\text{H}$  spektru jako  $^{13}\text{C}$  satelity. Ze spektra lze tedy odečíst interakční konstanty  $^1J_{\text{HC}}$  stejně jako v  $^1\text{H}$  spektru z  $^{13}\text{C}$  satelitů. Pokud je tato interakce s  $^{13}\text{C}$  odstraněna dekaplinkem (viz **5a**), pak je dublet krospeků odstraněn a výsledný krospek má velmi podobný chemický posun jako signály v  $^1\text{H}$  spektru neboť  $^{12/13}\text{C}$  isotopový efekt na chemický posun je velmi malý. Visuálně se pak zdá, že signály  $^{13}\text{C}$  mají krospek s hlavními signály  $^1\text{H}$  spektra, s nimiž však interakci nemají, neboť jsou vázány na  $^{12}\text{C}$ , který má nulový magnetický jaderný spin.



UBTE-6a ...  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  2D gHMBC 8 Hz NMR spektrum

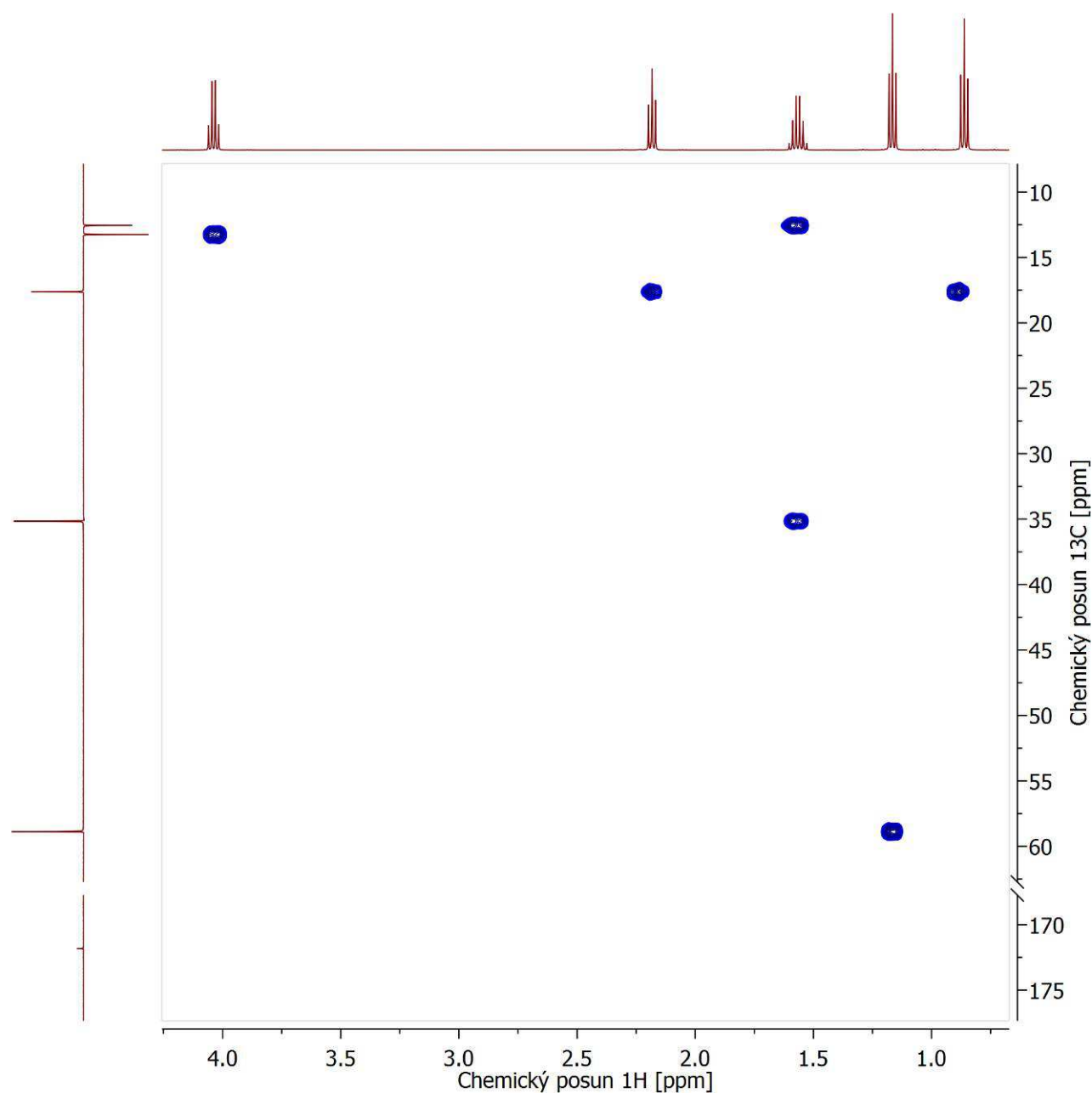
Krospíky v HMBC spektru jsou důsledkem interakce  $^1\text{H}$  s  $^{13}\text{C}$  přes více vazeb, a jejich souřadnice odpovídají chemickým posunům interagujících jader v isotopomerech  $^{13}\text{C}_1$  isotopologu, jejichž signály jsou v  $^1\text{H}$  spektrech překryty  $^1\text{H}$  signály  $^{12}\text{C}$  isotopologů. Zde například isotopomer s  $^{13}\text{C}$  isotopem v karboxylu (171.81 ppm) má krospíky s  $^1\text{H}$  jádry jejichž signály mají chemický posun 4.04, 2.18 a 1.57 ppm. To je zcela v souladu s multiplicitou ttt tohoto signálu v  $^{13}\text{C}$  spektru **4c** měřeného bez dekaplinku,  $J_{\text{CH}} = 7.1, 4.7$  a  $3.1$  Hz. Z intenzity krospíků nelze přímo odečíst velikost interakční konstanty, neboť souvisí i s nastavením experimentu. Obecně jsou krospíky od malých interakčních konstant malé či nepozorovatelné a k jejich detekci je nezbytné změnit nastavení experimentu (viz **6b**) nebo využít jiného NMR experimentu.

UBTE-6a.  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  2D gHMBC 2 Hz NMR spektrum



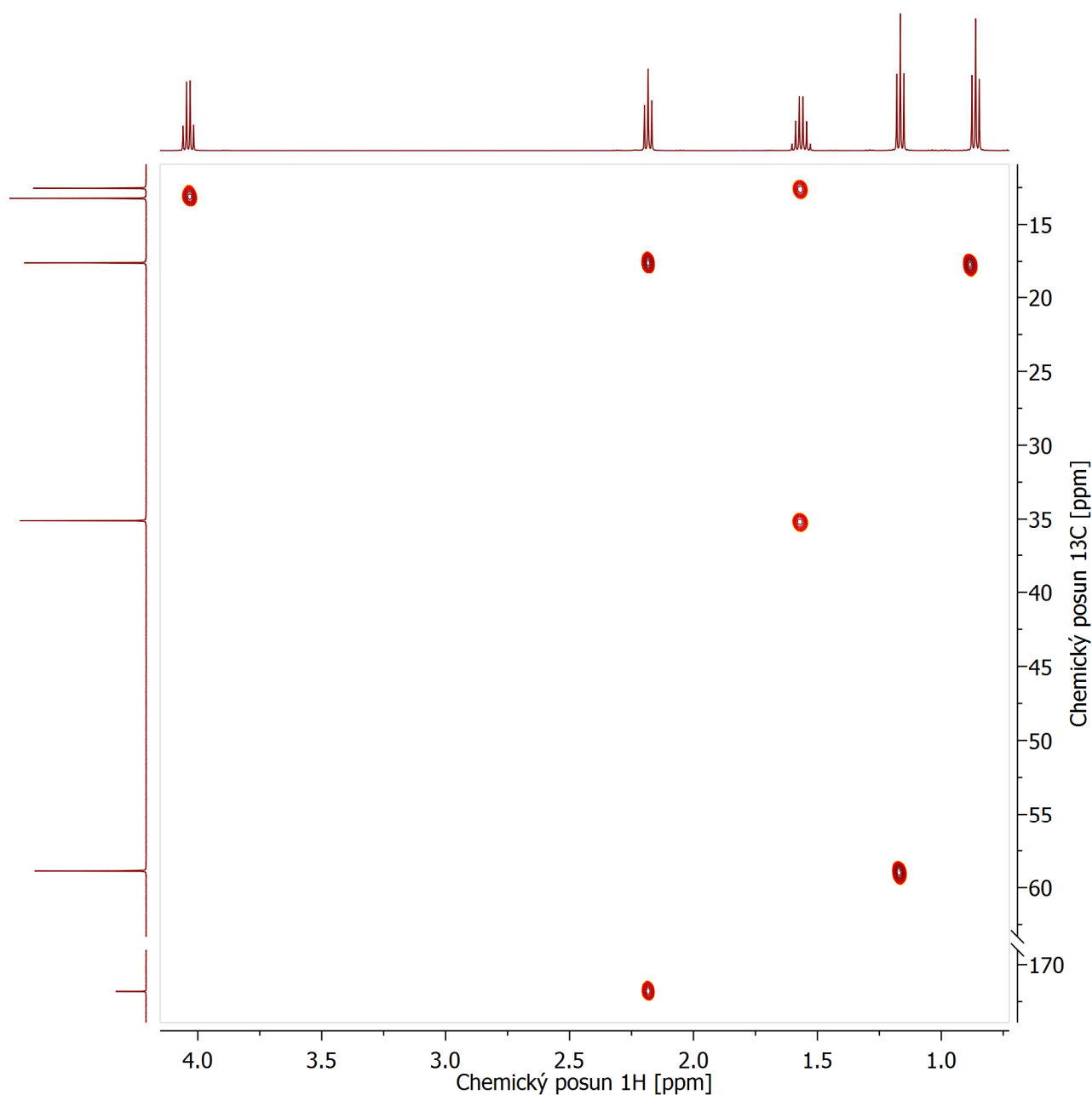
Nastavením citlivosti HMBC na malé interakční konstanty (zde 2 Hz) lze pozorovat i krosníky přes 4 a více vazeb (porovnej s **6a**), zatímco intenzita krosníků od velkých interakčních konstant může být i značně snížena. Jako rušivé signály jsou ve spektru často pozorovány v podobě dubletu krosníků s  $^1\text{H}$  přes jednu vazbu (viz **5b**), které nejsou zcela potlačeny.

UBTE-7a ...  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  2D H2BC NMR spektrum



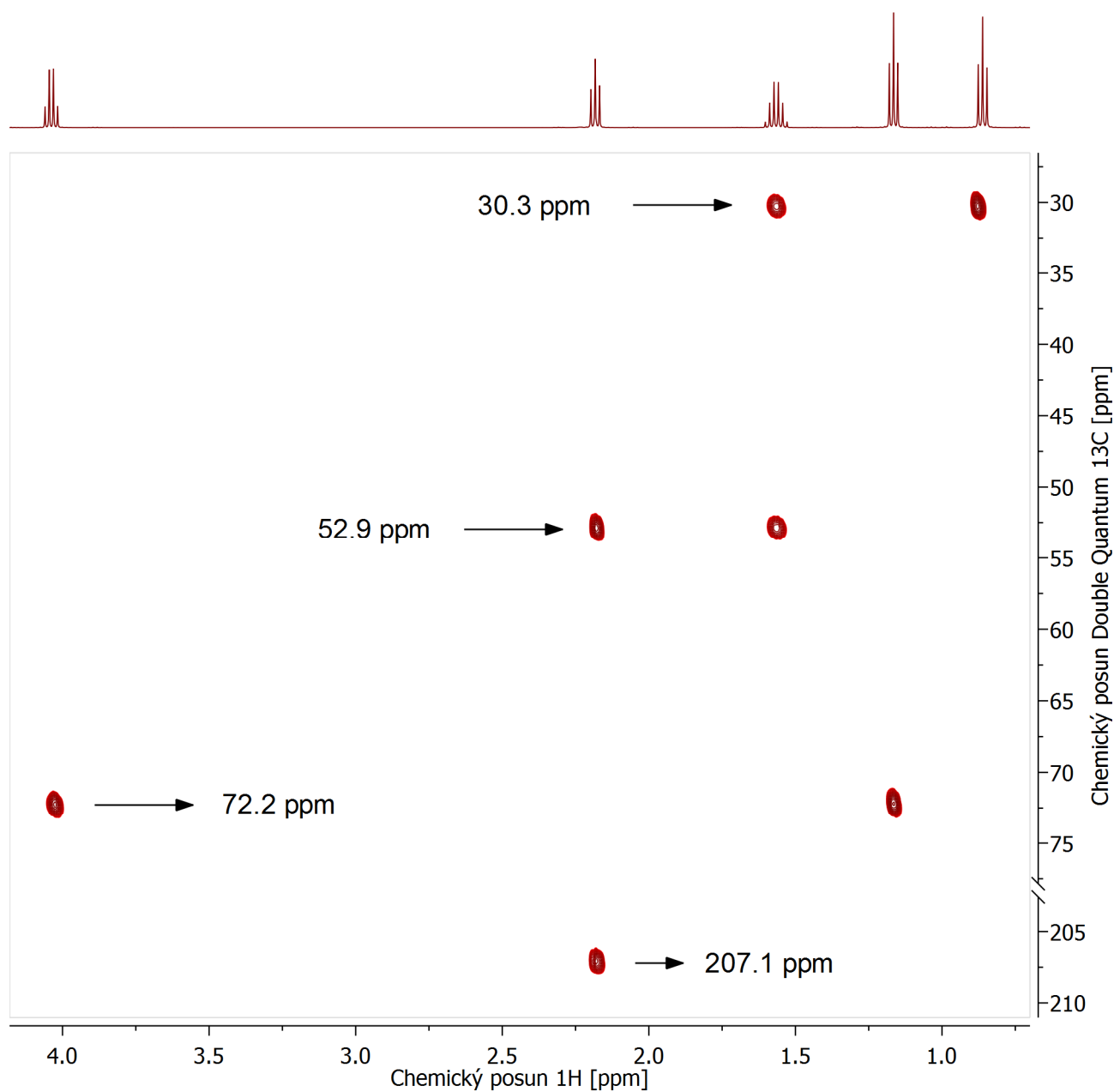
Souřadnice krosníků v H2BC spektru jsou chemické posuny  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  jader oddělenými dvěma vazbami. Měření nevyužívá interakcí  $^2J_{\text{HC}}$ , ale interakcí  $^3J_{\text{HH}}$  a  $^1J_{\text{HC}}$ , díky tomu jsou krosníky pozorovány pouze v případě, že na atom sousedící s uhlíkem je vázán  $^1\text{H}$ . Spektrum může obsahovat i řadu falešných informací neboť  $^3J_{\text{HH}}$  je vybírána pouze na základě její hodnoty. Je-li  $^3J_{\text{HH}}$  příliš malá pak krosník pozorován nebude, je-li naopak nějaká  $J_{\text{HH}}$  přes jiný počet vazeb srovnatelná s  $^3J_{\text{HH}}$  pak bude krosník pozorován. V tomto případě jsou přítomny pouze očekávané krosníky.

**UBTE-8a.**  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  2D 1,1-ADEQUATE SQ NMR spektrum (500.16 MHz, 50 Hz)



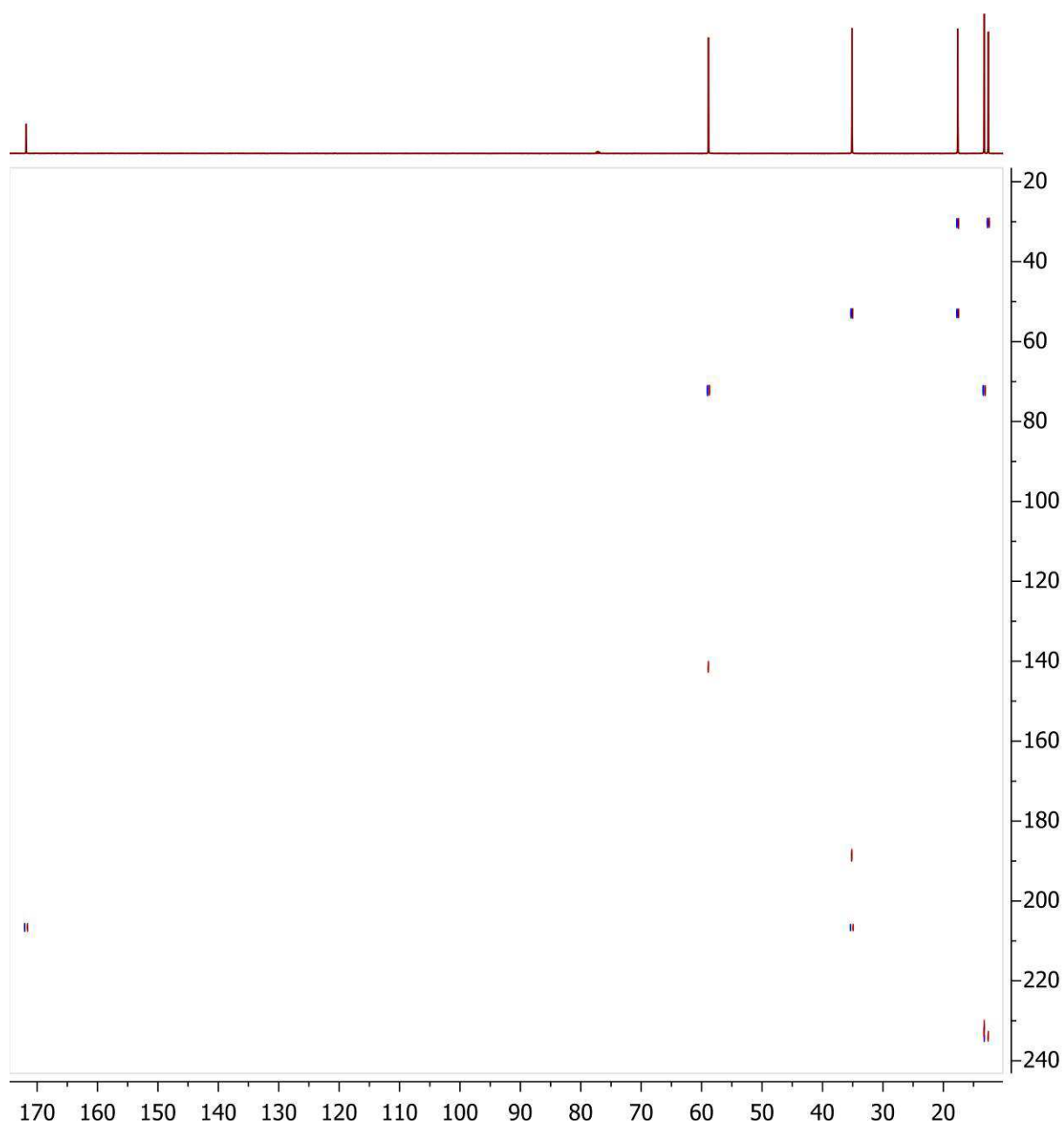
Experiment využívá interakčních konstant  $^1J_{\text{CC}}$  (obvyklé na stavení 50 Hz) a  $^1J_{\text{HC}}$  (obvyklé na stavení 146 Hz) v isotopomerech  $^{13}\text{C}_2$  isotopologu. Použití spekter  $^1\text{H}$  (signály  $^{12}\text{C}$  isotopologů) pro  $^1\text{H}$  osu a  $^{13}\text{C}$  spekter (signály  $^{13}\text{C}_1$  isotopologů) pro  $^{13}\text{C}$  osu je možné díky malým isotopovým efektům. Souřadnice krosníků ve variantě SQ (*Single Quantum*) odpovídají chemickým posunům  $^{13}\text{C}$  a  $^1\text{H}$  jader majících strukturní vztah  $\underline{^1\text{H}}\text{-}^{13}\text{C}\text{-}\underline{^{13}\text{C}}$ . Chemický posun  $^{13}\text{C}$  tak odpovídá uhlíku, který sousedí s uhlíkem, na který je vázán vodík, který má signál chemického posunu  $^1\text{H}$ . Ze spektra lze například zjistit, že  $^1\text{H}$  signál 2.18 ppm je vázán na uhlík, který sousedí s uhlíkem mající signál 171.81 ppm. Spektrum je lépe interpretovatelné společně s HSQC spektrem.

**UBTE-8b.**  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  2D 1,1-ADEQUATE DQ NMR spektrum (500.16 MHz, 50 Hz)



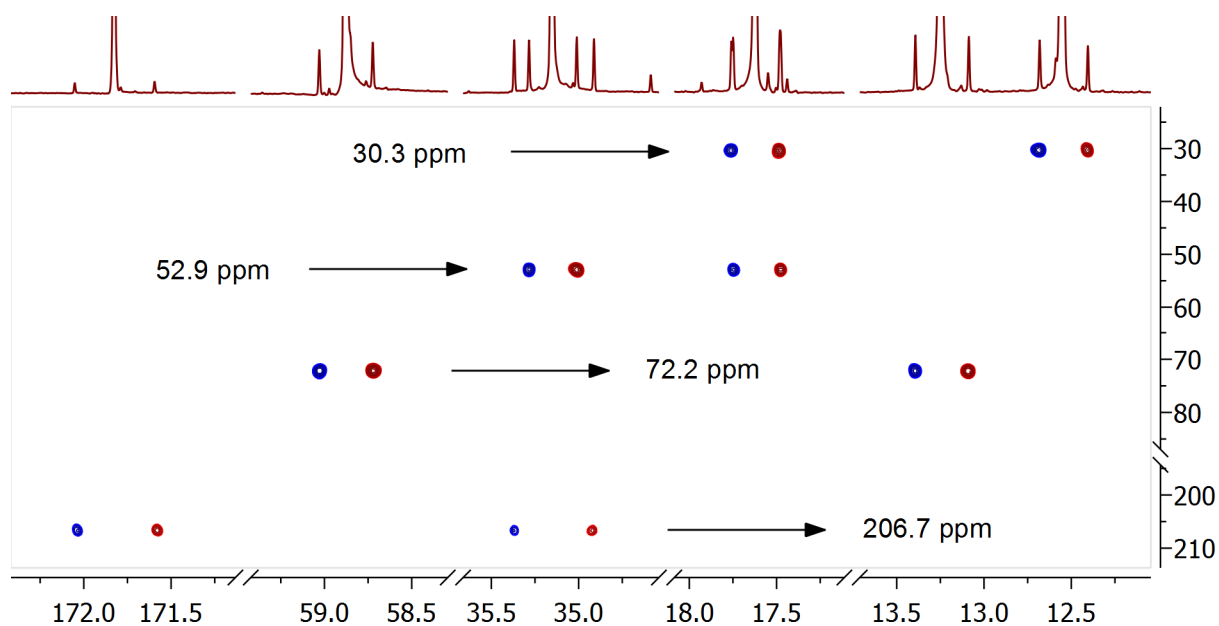
Na rozdíl od varianty SQ (viz **8a**), souřadnice krosníku ve variantě DQ (*Double Quantum*) odpovídá chemickému posunu signálu  $^1\text{H}$  jádra a součtu chemických posunů signálů uhlíků, které mají strukturní vztah  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$ .

UBTE-9a ...  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  INADEQUATE 2D spektrum (125.77 MHz, 46 Hz)



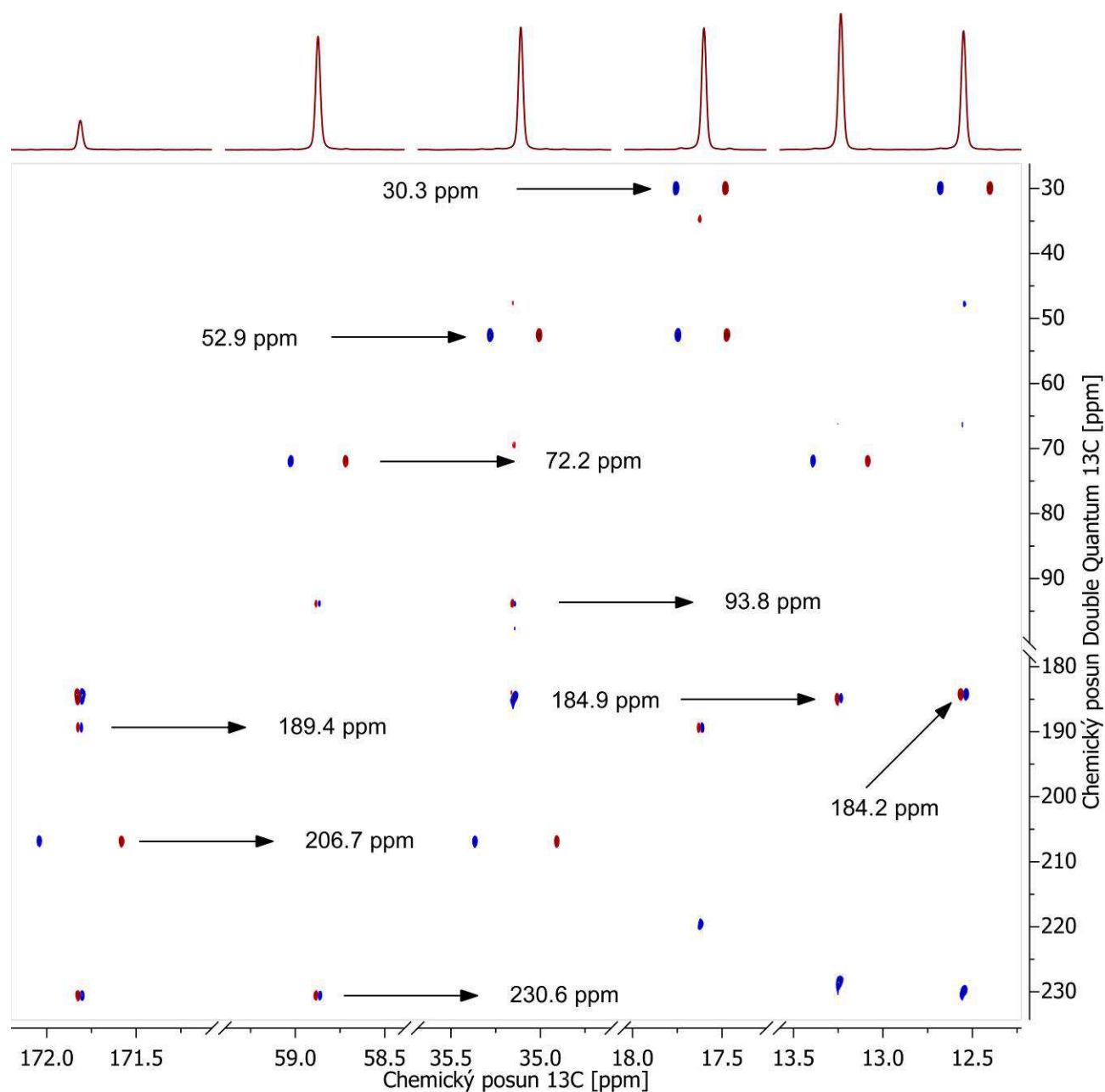
Tento experiment detekuje signály isotopomerů  $^{13}\text{C}_2$  isotopologu. Varianta *phase sensitive* detekuje *anti-phase* dublety interagujících uhlíků. V takovém spektru jsou interakce detekovány jako dva *anti-phase* dublety. Jejich společná souřadnice je součtem chemických posunů signálů interagujících jader, a souřadnice jednotlivých krosníků jsou chemickými posuny signálů interagujících jader. Krosníky jsou velmi úzké a při zobrazení celého spektra jsou často obtížně pozorovatelné či odlišitelné od artefaktů. Proto je vhodné skrýt části spektra, která jsou bez informací (viz **9b**) a pro snadnější interpretaci spektra využít  $^{13}\text{C}$  NMR spektra v kterém jsou pozorovány  $^{13}\text{C}$  satelity  $^{13}\text{C}$  signálů, které náležejí právě těm isotopomerům, které jsou tímto NMR experimentem měřeny.

**UBTE-9b.** Výřezy krosníků 2D  $^{13}\text{C}$  INADEQUATE NMR spektra



Spektrum jednoznačně potvrzuje jednu vazbu mezi uhlíky signálů 171.81 a 35.11 ppm (součet 206.92 ppm), mezi signály 35.11 a 17.60 ppm (součet 52.71 ppm), a mezi 17.60 a 12.55 ppm (součet 30.15 ppm), což jednoznačně dokazuje  $\text{C}_4$  lineární uhlíkovou kostru čtyř uhlíků. Rozdíly mezi experimentální hodnotou a očekávaným součtem chemických posunů „interagujících“ jader se liší jednak v důsledku experimentální chyby a jednak díky isotopovému efektu, neboť experimentální hodnota je od  $^{13}\text{C}_2$  isotopomeru, zatímco očekávaná je od dvou odpovídajících isotopomerů  $^{13}\text{C}_1$  isotopologu. Dále je ve spektru pozorována „vazba“ mezi uhlíky signálů 58.87 a 13.25 ppm (součet 72.12 ppm). Vzhledem k tomu, že interakční konstanty přes více než jednu vazbu jsou obvykle výrazně menší než 46 Hz (nastavení experimentu), nelze pozorovat propojení uhlíkatých fragmentů; nejsou pozorovány interakce přes více než jednu vazbu. Řešením je změření spektra s nastavením citlivosti NMR experimentu pro menší konstanty (viz **9b**).

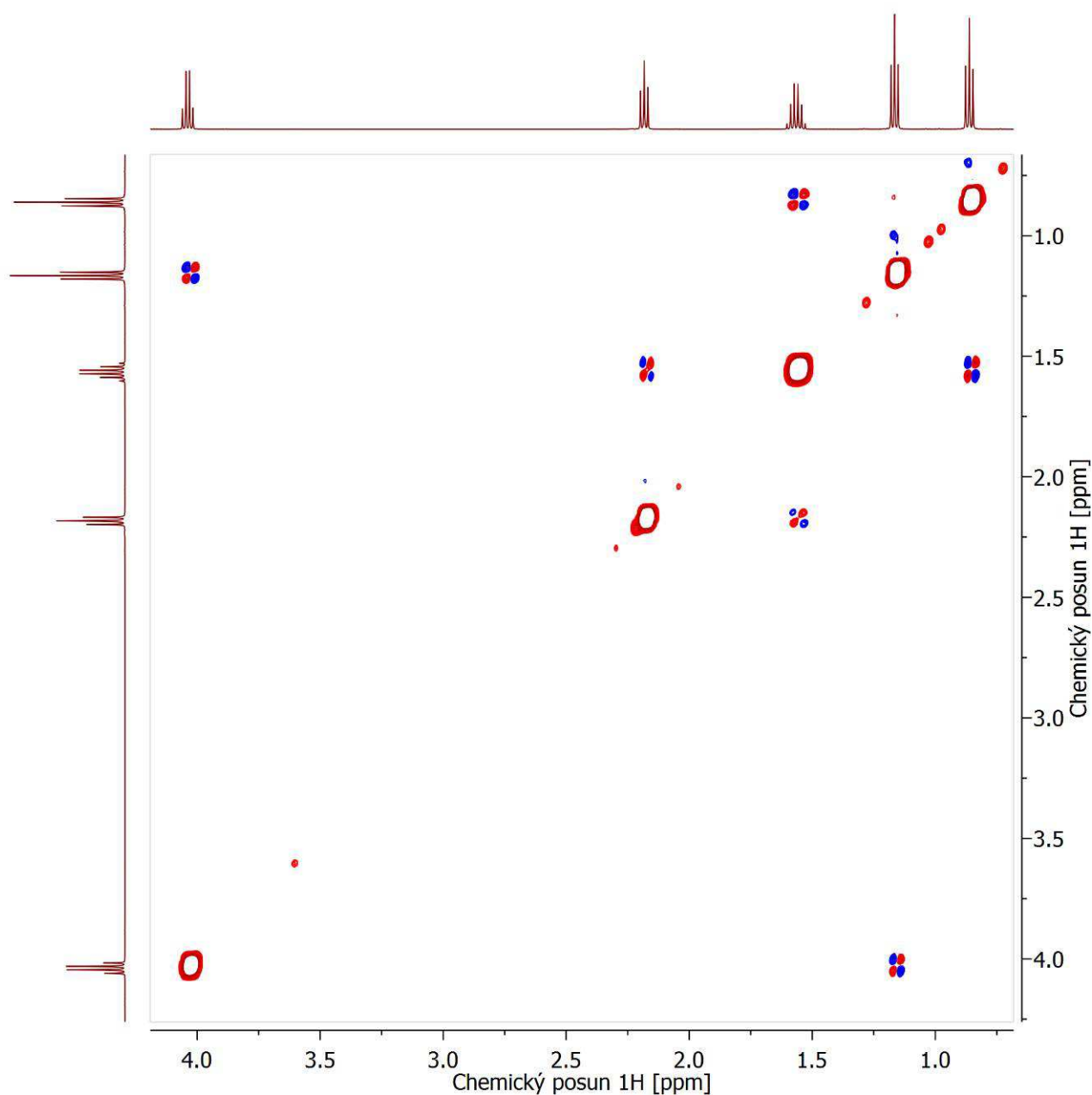
**UBTE-9b ...  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  INADEQUATE 2D spektrum (126 MHz, 5 Hz)**



Měřením spektra s nastavením citlivosti na menší interakční konstanty (zde 5 Hz) lze pozorovat interakce přes více než jednu vazbu. Zde jsou pozorovány interakce přes dvě vazby mezi C1 a C5 (230.6 ppm) a mezi C1 a C3 (189.4 ppm). Interakce mezi C2 a C4 (47.66 ppm) je na úrovni šumu. Dále jsou pozorovány krosníky interakcí přes tři vazby mezi C1 a C4 (184.2 ppm), mezi C1 a C6 (184.9 ppm) a mezi C2 a C5 (93.8 ppm). Interakce přes 4 vazby pozorovány nejsou. Signály  $^{13}\text{C}$  jader jsou 171.81 (C1), 58.87 (C5), 35.11 (C2), 17.60 (C3), 13.23 (C6) a 12.55 (C4) ppm.



UBTE-10a ...  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  2D ROESY NMR spektrum (500.16 MHz)



Souřadnice krospíků v tomto spektru jsou chemické posuny signálů  $^1\text{H}$  jader interagujících přes prostor. Intenzita krospíků je úměrná prostorové vzdálenosti interagujících jader s  $1/r^6$ . Struktura i intenzita krospíků je však značně narušena v případě, kdy jádra interagují nejen přímo přes prostor, ale také nepřímo přes vazby. To je případ všech krospíků v ROESY spektru této látky. Krospíky v tomto případě jen potvrzují informace s COSY spektra.