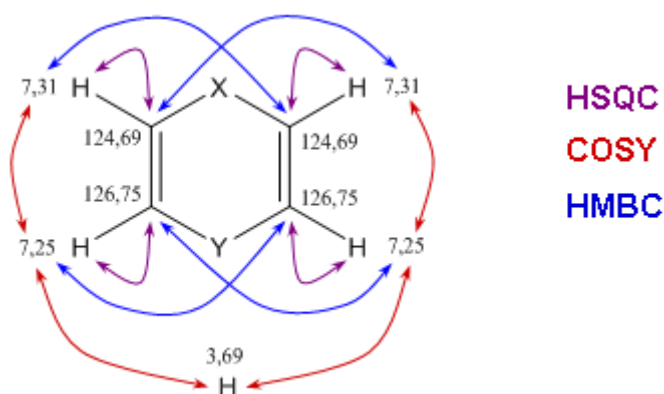


Postup při interpretaci NMR spekter neznámého vzorku

VŠCHT 2017, Bohumil Dolenský, dolenskb@vscht.cz

Tento text byl vypracován pro projekt „Inovace předmětu Semestrální práce oboru analytická chemie I“. Slouží jako zdroj informací pro studenty zmíněného předmětu navazujícího magisterského oboru „Analytická chemie a jakostní inženýrství“ na fakultě chemicko-inženýrské VŠCHT Praha.

1. Vodíkové spektrum obsahuje signály v aromatické oblasti (ca. 7,3 ppm), které při přiblížení připomínají dva dublety, kdy střechový efekt potvrzuje jejich interakci ca. 8,4 Hz. Je však patrné, že dublety mají i další interakce. Při zpracování s důrazem na rozlišení (LB = -0,5 a GF = 0,1) je zřejmá složitost signálů. Takovéto signály jsou typické například pro benzen s různými substituenty v poloze 1 a 4. Protony v pozici 2 a 6 jsou sice chemicky ekvivalentní a mají pouze jeden signál, ale nejsou ekvivalentní magneticky. To samé platí pro protony v pozici 3 a 5. Důsledkem je vznik spinového systému označovaného AA'BB' skládající se z multipluťů druhého řádu, k jejichž řešení je nezbytná simulace. Lze tedy uvažovat, že v aromatické oblasti jsou dva signály s chemickým posunem ca. 7,31 a 7,25 ppm, každý s intenzitou 2H. A můžeme uvažovat, že molekula obsahuje benzen s dvěma různými substituenty v polohách 1 a 4, nebo pyridin se substitucí v poloze 4, jakož i jiné struktury vyznačující se AA'BB' spinovými systémy.



Další indicie a noticky:

- a) ^1H - ^1H COSY spektrum potvrzuje interakci signálů 7,31 a 7,25 ppm, přičemž signál 7,25 ppm má navíc krospektrum i se signálem 3,69 ppm, což vysvětluje vyšší multiplicitu signálu 7,25 ppm. Nízká intenzita tohoto krospektru dokládá, že interakční konstanta mezi 7,25 a 3,69 ppm je malá, a tedy patrně tedy přes čtyři či více vazeb.

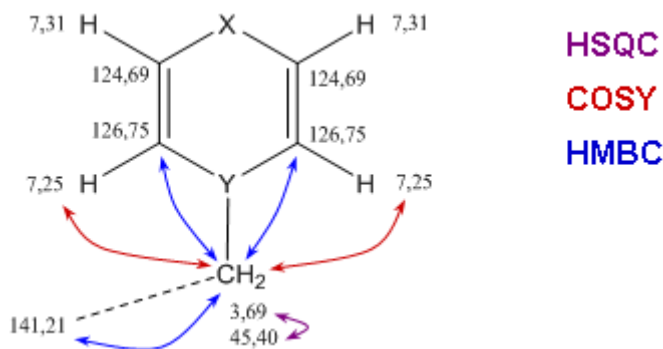
- b) Náhled do ^{13}C NMR spektra potvrzuje přítomnost šesti signálů v aromatické oblasti 100-155 ppm, což připouští přítomnost např. benzenového derivátu.
 - c) Krosníky v ^1H - ^{13}C HSQC spektru potvrzují $^1J_{\text{CH}}$ interakci signálu 7,31 ppm se signálem 124,69 ppm a signálu 7,25 ppm se signálem 126,75 ppm.
 - d) Krosník signálu 7,31 ppm se signálem 124,69 ppm i v ^1H - ^{13}C HMBC spektru ukazuje na interakci „těchto“ signálů nejen přes jednu vazbu, ale i přes více vazeb (u silného signálu nejčastěji přes 3 vazby), což je důsledkem symetrie. V molekule tedy existují minimálně dva chemicky ekvivalentní vodíky s posunem 7,31 ppm a uhlíky 124,69 ppm, které jsou odděleny ca. třemi vazbami. Analogické platí pro signál vodíku 7,25 ppm a signál uhlíku 126,75 ppm. (Viz též vysvětlení v bodu 7.c).
 - e) Ve spektru ^1H - ^{13}C HMBC není krosník mezi vodíkem 7,31 ppm a uhlíkem 126,75 ppm ani mezi vodíkem 7,25 ppm a uhlíkem 124,69 ppm. Takové krosníky by odpovídaly interakci přes dvě vazby, která je však často blízká nule a tudíž neposkytuje krosníky v běžném HMBC spektru. Nepřítomnost těchto krosníků tedy navržené strukturní fragmenty ani nepotvrzuje ani nevyvrací.
 - f) MS spektrum přítomnost benzenového či benzylového derivátu podporuje.
 - g) IČ spektrum přítomnost *para*-disubstituovaného benzenu podporuje.
2. Předpokládáme, že skutečná intenzita signálu 7,31 ppm je tedy 2H a všechny integrální hodnoty pracovně vynásobme čtyřmi.
3. Signál s chemickým posunem 3,69 ppm je singlet s intenzitou 2H. Chemický posun spadá mimo jiné do oblasti CH_2O , CH_2Cl či CH_2N skupin. U signálu jsou též patrné ^{13}C satelitní signály, z kterých lze získat hodnotu $^1J_{\text{HC}} = 133,1$ Hz, která podporuje spíše skupinu CH_2N . Přítomnost satelitů navíc dokládá, že vodíky tohoto signálu jsou vázány na uhlík. Za zmínku též stojí fakt, že pokud se jedná o CH_2 skupinu, pak jsou vodíky spíše chemicky ekvivalentní nikoli diastereotopní. Tudíž se lze domnívat, že látka není chirální a nebo je chirální centrum od CH_2 skupiny velmi vzdálené.

Další indicie a noticky:

- a) Krosník v ^1H - ^1H COSY spektru viz bod 1.a.
- b) ^1H - ^{13}C HSQC spektra potvrzuje $^1J_{\text{CH}}$ interakci signálu 3,69 ppm se signálem 45,40 ppm, což je chemický posun spíše pro CH_2N než-li pro CH_2O . Negativní krosník dokazuje, že se jedná o CH_2 skupinu.
- c) Ve spektru ^1H - ^{13}C HMBC jsou intenzivní krosníky mezi vodíky 3,69 ppm a

uhlíky 141,21 a 126,75 ppm, které jsou důsledkem interakce přes dvě nebo tři vazby. Krosník s uhlíkem 126,75 ppm je pravděpodobně přes tři vazby, protože přes čtyři vazby je obvykle málo intenzivní a přes dvě vazby by skupina CH₂ musela být skupinou Y, kde by však byla očekávána zároveň interakce s uhlíkem 124,69 ppm (žádný takový krosník v HMBC není) a intenzivní krosníky v COSY (interakce přes tři vazby s vodíky 7,25 ppm), které jsou však pouze velmi málo intenzivní.

- d) Signál uhlíku 45,40 ppm v ¹³C NMR spektru bez dekaplingu protonů je triplet tripletů s interakcemi 133,1 Hz a 4,1 Hz.
- e) MS spektrum nenaznačuje přítomnost ani Cl ani Br atomů, což vylučuje CH₂Br či CH₂Cl skupinu.



4. Málo intenzivní signál 2,50 ppm má multiplicitu 5 s poměrem píků 1:2:3:2:1 což je typický multiplet pro interakci s dvěma ekvivalentními jádry se spinem $I = 1$. Jedná se „jednoznačně“ o signál „zbytkového rozpouštědla“, tedy přirozené nečistoty perdeuterovaného DMSO, tedy o CHD₂SOCD₃. Velikost interakční konstanty $^2J_{HD} = 1,8$ Hz je v souladu s tabelovanými údaji.

Další indicie a noticky:

- a) ¹³C spektrum obsahuje septet 1:3:6:7:6:3:1, což odpovídá interakci s jádrem s magnetickým jaderným spinem 1. Chemickým posunem 39,52 ppm a interakční konstantou $^2J_{CD} = 21,0$ Hz odpovídá CD₃SOCD₃.
5. Za povšimnutí stojí fakt, že signál vody, která je nečistotou prakticky všech vzorků připravených běžným způsobem, není na své obvyklé pozici, kdy signál vody v CD₃SOCD₃ je typicky 3,3 ppm. Toto je typické pro látky podléhající rychlé chemické výměně vlastních protonů s protony vody. Je tedy pravděpodobné, že neznámá látka obsahuje „kyselé vodíky“, nejběžnějšími jsou OH, NH a SH.
6. Velmi široký signál u 2,13 ppm s intenzitou 2H nemající krosník ¹H-¹³C HSQC spektru naznačuje přítomnost dvou OH skupin nebo dvou NH skupin nebo dvou SH nebo jedné

NH₂ skupiny či kombinace OH a NH s rychlou výměnou a podobně. Signál NH či NH₂ by byl od ostatních možností odlišitelný pozorováním ¹⁵N satelitů (¹J_{NH} = ca. 80-100 Hz), které však pro značnou šířku signálu pozorovány nejsou. Signál NH či NH₂ by mohl být dokázán krosním v ¹H-¹⁵N HSQC, které bohužel měřeno nebylo.

Další indicie a noticky:

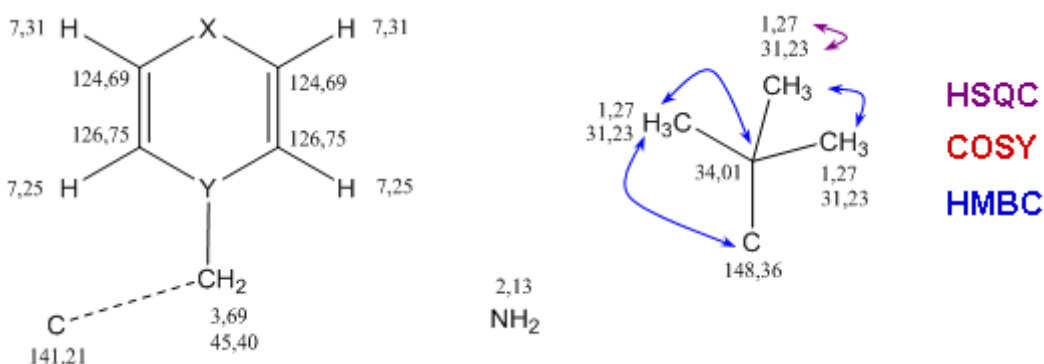
- a) Krosníky velmi širokých píků nemusí být v korelačních spektrech vůbec pozorovány neb budou také velmi široké a tudíž velmi nízké intenzity. Vazbu těchto protonů na uhlík tedy nelze zcela vyloučit. Protony na uhlících však dávají široké signály pouze u výjimečných struktur.
 - b) Skutečnost, že ve spektru chybí signál vody (viz bod 5.) dále podporuje přítomnost snadno vyměnitelných protonů (NH, OH, SH, COOH, SO₃H, aj.).
 - c) MS spektrum podporuje přítomnost CH₂NH₂ skupiny.
 - d) IČ spektrum podporuje přítomnost alifatického aminu.
7. Posledním signálem vodíkového spektra je singlet 1,27 ppm s intenzitou ca. 9,72H. Intenzitu signálu, která se výrazně liší od intenzity ostatních signálů (zde ca. 10H vs. 2H), je nezbytné posuzovat s opatrností. Odchyłka integrální intenzity od skutečné hodnoty je při běžné měření ¹H NMR spekter i více než 10%. Pokud jsou všechny signály srovnatelné intenzity, není rozdíl významný. Zde to však může znamenat rozdíl jednoho vodíku. Též s ohledem k tomu, že signál 1,27 ppm je doprovázen nečistotou (viz spektrum), lze usuzovat, že skutečná intenzita bude nižší. Vzhledem k tomu, že signál je v oblasti methylových skupin, lze uvažovat intenzitu spíše na intenzitu násobků tří, tedy 9H. U signálu jsou též patrné ¹³C satelitní signály, z kterých lze získat hodnotu ¹J_{HC} = 125,5 Hz, která napovídá o navázání této skupiny na uhlíkový atom. Nejspíše se tedy jedná o signál tří ekvivalentních methylových skupin. Nejobvyklejší takovou skupinou je *t*-butyl.

Další indicie a noticky:

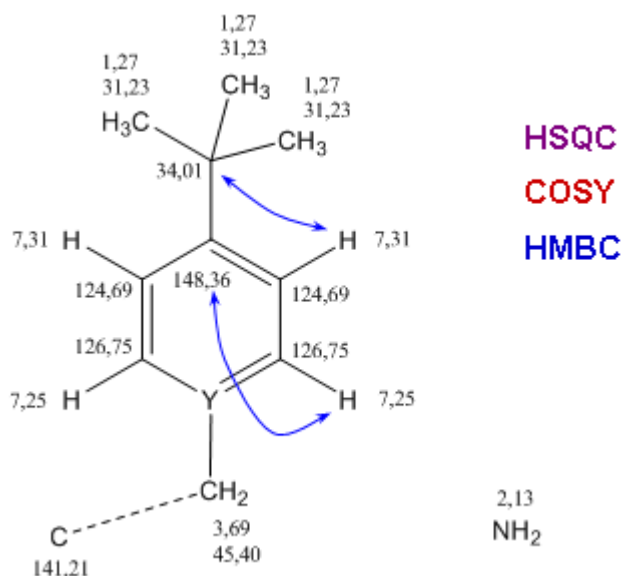
- a) ¹H-¹³C HSQC spektra potvrzuje ¹J_{CH} interakci se signálem 31,23 ppm, což je typický chemický posun pro alifatické uhlíky. Positivní pík potvrzuje přítomnost lichého počtu vodíkových atomů na tomto uhlíku. Z chemického posunu se bohužel nelze přiklonit k jedné z možností neb typické hodnoty pro CH₃ jsou 0-40 ppm a pro CH jsou 15-50 ppm.
- b) ¹³C NMR spektrum kvartet septetu ($J_{CH} = 125,5$ a $4,8$ Hz), což opět vede k domněnce *t*-butyl, kde ¹³C uhlík bude štěpen vlastními vodíky na kvartet a šesti

sousedními vodíky na septet.

- c) V ^1H - ^{13}C HMBC spektru je silný krosník mezi ^1H signálem 1,27 ppm a ^{13}C signálem 31,23 ppm, což je důkaz interakce mezi “chemicky ekvivalentními” skupinami přes více vazeb (typicky přes 2-4 vazby) například ve skupině $^{13}\text{CH}_3\text{-C-CH}_3$ či $^{13}\text{CH}_3\text{-N-CH}_3$ nebo $^{13}\text{CH}_3\text{-C-(CH}_3)_2$ či $^{13}\text{CH}_3\text{-N}^+\text{-(CH}_3)_2$.
- d) Krosník vodíku 1,27 ppm s uhlíkem 34,01 ppm v ^1H - ^{13}C HMBC může být jak interakcí přes dvě vazby v případě *t*-butylové skupiny nebo přes tři vazby pro případ dimethylaminové skupiny. Chemický posun uhlíku odpovídá kvartérnímu uhlíku *t*-butylové skupiny vázané na uhlík.
- e) Krosník v ^1H - ^{13}C HMBC spektru se signálem 148,36 ppm pak je posunem v aromatické oblasti a je vzdálen od vodíku 1,27 ppm přes tři vazby.
- f) MS spektrum podporuje přítomnost *t*-butylové skupiny.
- g) IČ spektrum podporuje přítomnost *t*-butylové skupiny.

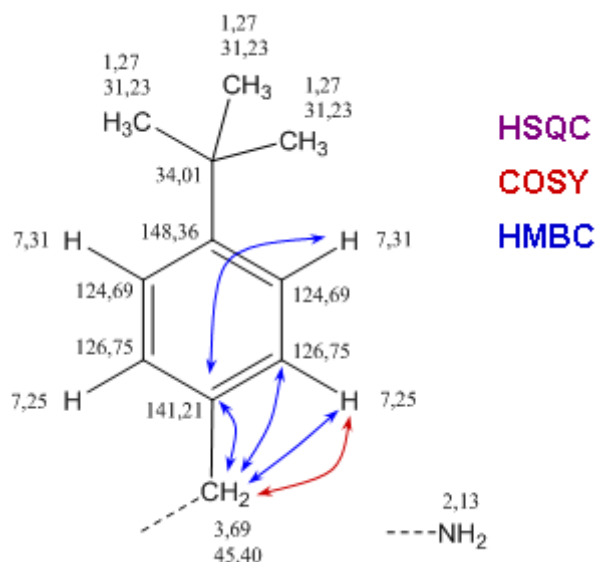


8. Signál 148,36 ppm je obtížně interpretovatelným multipletem. Chemickým posunem spadá do oblasti aromatických uhlíků. V ^1H - ^{13}C HMBC spektru jsou krosníky se signálem 7,25 ppm (2H) a signálem 1,27 ppm (9H), dle čehož by měl být signál tripletem dekapletu, což pozorování širokého multipletu vysvětluje. Za předpokladu, že zásadní jsou interakce přes tři vazby, lze navrhnout následující strukturu.

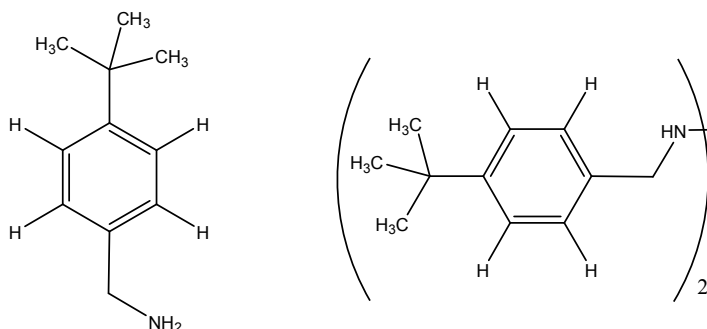


Další indicie a noticky:

- Nepřítomnost krosníku mezi uhlíkem 148,36 ppm a vodíkem 7,31 ppm není neobvyklá neb hodnota $^2J_{CH}$ je často blízká nule.
 - Naproti tomu interakce mezi uhlíkem 148,36 ppm a vodíkem 7,25 ppm je očekávána neb uspořádání trans (dihedrání úhel 180°) vede obvykle k velké interakční konstantě, $^3J_{CH}$ ca. 8 Hz.
 - Strukturu dále dokazuje přítomnost interakce mezi vodíkem 7,13 ppm a uhlíkem 34,01 ppm.
9. Signál 141,21 ppm je triplet tripletů s $J_{CH} = 6,8$ a 4,5 Hz, což potvrzují krosníky v 1H - ^{13}C HMBC se dvěma signály 7,31 a 3,69 ppm intenzity 2H a 2H. Krosník v 1H - ^{13}C HMBC spektru se vodíkem 7,31 ppm vedou k umístění tohoto uhlíku do benzenového kruhu (místo Y), kdy tato interakce přes tři vazby je očekávána, zatímco nepřítomnost interakce přes dvě vazby s vodíky 7,25 ppm nepřekvapí. Krosník v 1H - ^{13}C HMBC spektru s vodíkem 3,69 ppm pak nenabízí jednoznačnou informaci, neboť nevíme, zda je důsledkem interakce přes dvě nebo tři vazby. Avšak intenzivní krosník mezi 3,69 ppm a 126,75 ppm nabízí prakticky jedinou možnost.



10. V této fázi jsou další možnosti stanovení struktury z daných NMR spekter vyčerpány. K dalšímu zpřesnění struktury pomocí NMR by bylo nejnadhnější změřit vzorek při vyšší teplotě, čímž dojde ke zrychlení chemické výměny a široké signály se stávají užšími, a bylo by tedy snad možné získat krospektry vodíků NH_2 skupiny s uhlíky v ^1H - ^{13}C HMBC spektru. Zúžení signálu by též mohlo umožnit pozorování ^{15}N satelitů, a potvrdit tak přítomnost dusíku. Dále by bylo vhodné změřit ^1H - ^{15}N HMBC spektrum (rovněž při vyšší teplotě) a získat korelace mezi dusíkem a vodíky. Vhodné by též bylo změřit ^1H NMR spektrum neznámé látky v takovém rozpouštědle a koncentraci a teplotě, aby byla pozorována multiplicita CH_2 způsobená interakcí s aminoskupinou, kdy tripletový signál by potvrdzoval CH_2NH_2 skupinu zatímco dublet by potvrdzoval CH_2NH skupinu. Rozhodnout mezi těmito skupinami by bylo snadné z nedekaplovaného ^{15}N NMR spektra, kdy signál NH_2 skupiny bude triplet, zatímco signál NH skupiny dublet. Bohužel pro velmi nízkou citlivost vyžaduje naměření těchto spekter vysokou koncentraci vzorku, jakož i užití citlivých NMR experimentů, např. INEPT.
11. Pokud již není možné získat další NMR experimenty, zbývá ještě pokus o uhádnutí struktury kvalifikovaným odhadem, který je založen na porovnání experimentálních hodnot neznámé látky s predikovanými hodnotami pro konkrétní strukturu, kdy rozdíl jednotlivých chemických posunů ^1H do 0,3 ppm a ^{13}C do 2 ppm je považován za běžnou odchylku. Ještě přesnější by bylo porovnání s hodnotami, které jsou pro danou látku publikovány, kdy je nutno brát zřetel zejména na použití stejného rozpouštědla. V bodu 6. byla s pomocí IR a MS navržena spíše přítomnost NH_2 než dvou chemicky ekvivalentních NH skupin, avšak vyloučit tuto možnost prozatím nelze. Pokud vyloučíme látky neběžné molekulární struktury, nabízí se buď amin nebo hydrazin.



Chemické posuny ¹H

Neznámá látka	Predikce pro amin		Predikce pro hydrazin	
1,27	1,34	+ 0,07	1,34	+ 0,07
7,31	7,37	+ 0,06	7,38	+ 0,07
7,25	7,17	- 0,08	7,34	+ 0,09
3,69	3,96	+ 0,27	4,05	+ 0,36
2,13	1,95	- 0,18	2,38	+ 0,25

Chemické posuny ¹³C

Neznámá látka	Predikce pro amin		Predikce pro hydrazin	
31,23	31,16	- 0,07	31,16	- 0,07
34,01	34,52	+ 0,51	34,53	+ 0,52
148,36	150,05	+ 1,69	150,25	+ 1,89
124,69	125,15	+ 0,46	125,43	+ 0,74
126,75	127,52	+ 0,77	126,87	+ 0,12
141,21	142,83	+ 1,62	137,07	- 4,14
45,40	45,71	+ 0,31	55,17	+ 9,77

Z porovnání experimentálních a predikovaných chemických posunů ¹H a ¹³C lze vcelku snadno rozhodnout ve prospěch aminu, u kterého se všechny predikované chemické posuny významně neliší od experimentálních hodnot neznámé látky, zatímco predikované chemické posuny hydrazinu se významně liší, zejména chemickým posunem ¹³C pro CH₂ skupinu. Je však nezbytné vzít v potaz, že chemické posuny NH či NH₂ skupin, jakož i jader v nejbližším okolí, vždy velmi závisí na pH (stopy kyselin či bází), teplotě a koncentraci.

- Zásadní roli v této fázi strukturní analýzy přebírá hmotnostní spektroskopie, kterou lze stanovit molekulovou hmotnost a tím i rozhodnout mezi strukturou aminu a hydrazinu, jakož i vést k návrhu méně běžné struktury.