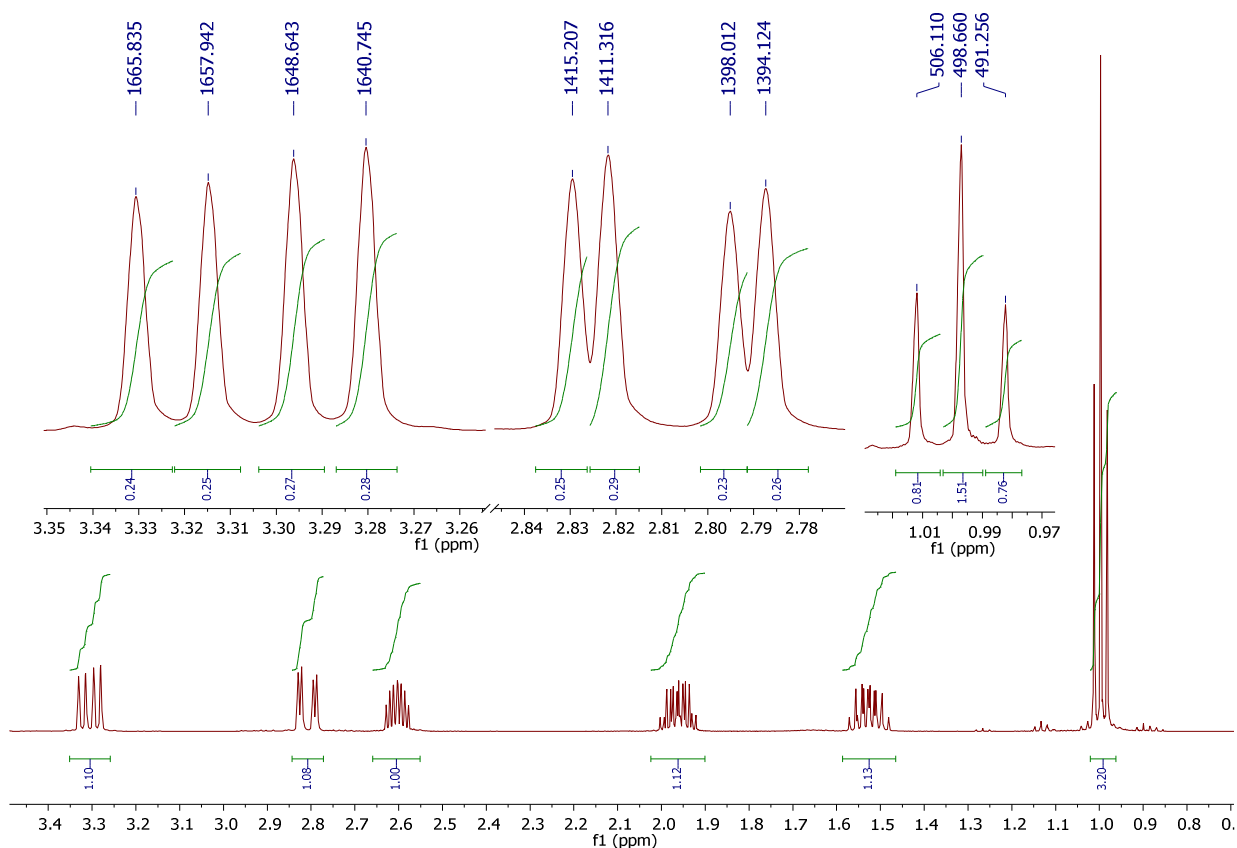
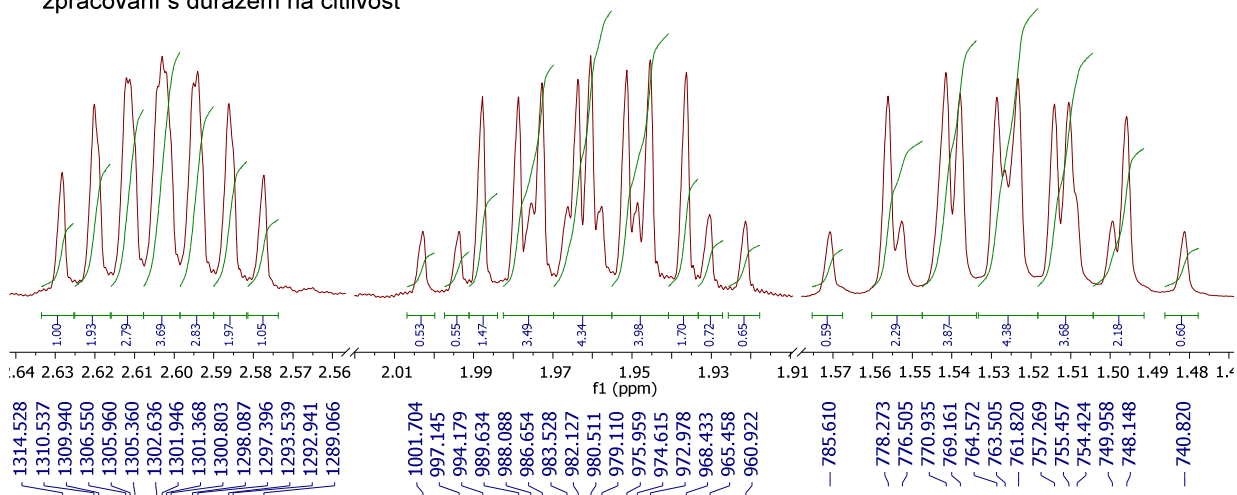


# 1. Multiplicita\_INDA

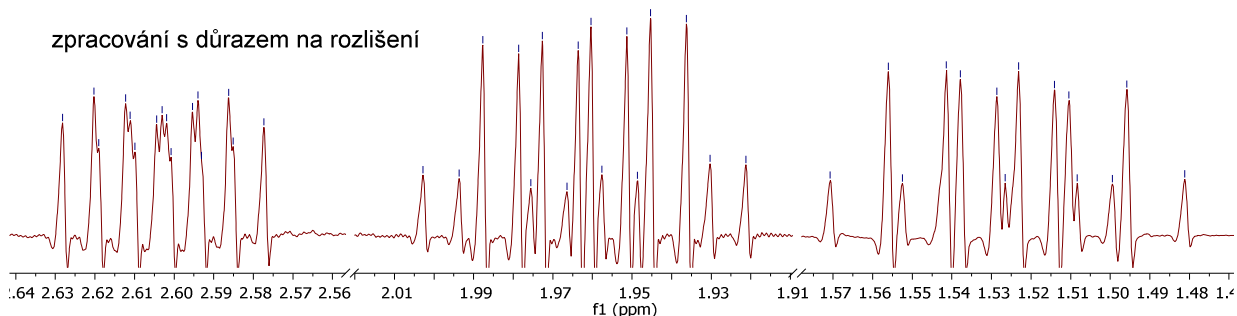
Interpretujte multiplety všech signálů spektra. Všechny multiplety jsou důsledkem interakce výhradně s jádry s magnetickým jaderným spinem 1/2, a nejsou významně komplikovány přítomností nečistot či vzájemným překryvem.



zpracování s důrazem na citlivost



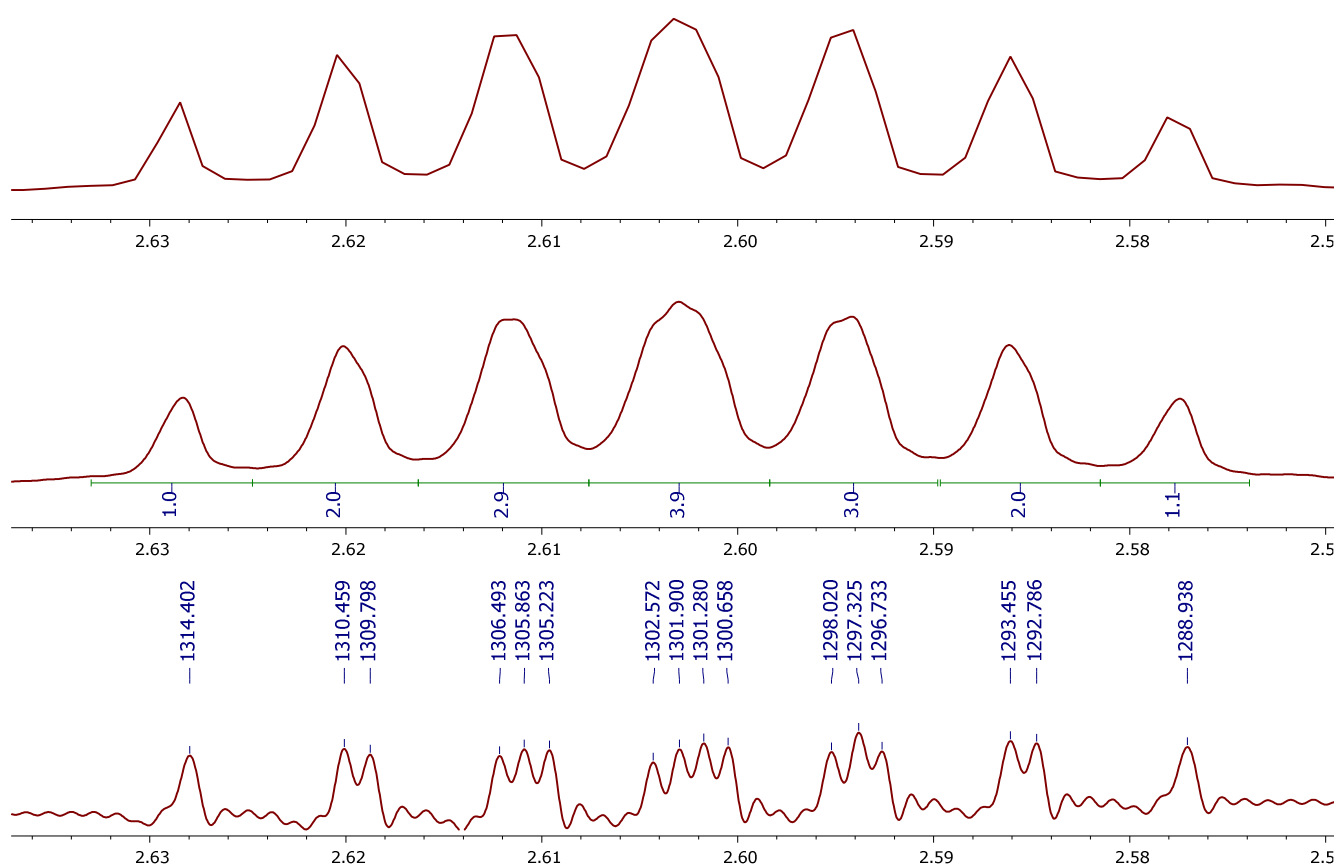
zpracování s důrazem na rozlišení



## 1.1. Příklad interpretace multipletu signálu 2,603 ppm

### 1.1.1. Zpracování spektra

Prvním krokem pro úspěšné řešení složitějšího multipletu je kromě výborného naměření též samotné zpracování naměřených dat. Jedná se zejména o optimalizaci parametrů pro transformaci FID záznamu na spektrum. Pokud není provedena žádná optimalizace pak je jemná struktura multipletu často zcela skryta (obr. 1a). Již při prostém rozšíření FID záznamu přidáním nulových hodnot (tzv. Zero Filling) obvykle dochází k náznačce jemné struktury (obr. 1b). Pokud je FID záznam navíc zpracován vhodnými apodizačními funkcemi (tzv. Apodization či Window functions) je rozlišení spektra a tím i jemná struktura multipletu významně zlepšena (obr. 1c), přičemž je zřejmé, že většího rozlišení je dosaženo za cenu zvýšení šumu.



**Obrázek 1.** Signál 2,603 ppm. a) Spektrum získané prostou transformací FID záznamu (16 kb hodnot). b) Spektrum získané standardním zpracováním, tj. doplnění nulami (na 512 kb hodnot) a aplikaci exponenciální funkce (LB = 0,2 Hz). c) Spektrum získané zpracováním s důrazem na rozlišení, tj. doplnění nulami a aplikaci exponenciální (LB = -1,0 Hz) a Gaussovské funkce (GB = 0,5 Hz).

### 1.1.2. Stanovení počtu komponent a grafické znázornění multipletu

Za předpokladu, že je multiplet signálu důsledkem interakcí jader výhradně spinu 1/2, musí být počet komponent multipletu roven mocnině dvou (2, 4, 8, 16, 32, 64, ...). Pokud tedy nastavíme celkový integrál roven mocnině dvou, pak integrály jednotlivých linií musí být celými čísly.

A obráceně. Pokud nastavíme integrál první linie roven jedné, pak celkový integrál signálu musí být roven mocnině dvou. Jelikož linie multipletu se skládá z jedné nebo více komponent, je zřejmé, že počet komponent bude vždy větší nebo roven počtu linií.

Poznamenejme, že skutečný signál prvního řádu je vždy symetrický i co do intenzity linií. První linie zprava i zleva tedy mají vždy jednotkovou intenzitu. U reálných signálů prvního řádu (signály pseudoprvního řádu) jsou intenzity linií často ovlivněny střechovým efektem = intenzity linií bližších signálu interagujícího jádra jsou intenzivnější, zatímco intenzity linií vzdálenějších signálu interagujícího jádra jsou adekvátně sníženy. Odstranění střechového efektu lze dosáhnout matematickou symetrizací multipletu (viz kap. 1.2.2).

U signálu 2,603 ppm lze rozpoznat 16 ( $= 2^4$ ) linií přibližně jednotkové integrální intenzity, a multiplet lze snadno vyjádřit graficky, kdy pozice úseček odpovídá pozici jednotlivých linií a délka úseček odpovídá jejich normalizované intenzitě viz Obr. 1. Signál je tedy multipletem o 16 komponentách rozdělených mezi 16 linií. Okem rozpoznatelná symetrie multipletu (počet, vzdálenost a intenzita linií je symetricky rozložena kolem středu multipletu) vypovídá o tom, že signál je střechovým efektem ovlivněn pramálo a symetrizace multipletu zde není nezbytná. Na druhou stranu, symetrizace multipletu potlačuje i jiné negativní vlivy jako je například šum či nerozpoznatelné nečistoty, a prakticky tak vždy vede ke správnějším hodnotám (Tab. 1).

**Tabulka 1.** Linie signálu 2,603 ppm. Normalizace intenzit a ploch byla provedena nejprve symetrizací hodnot (viz 1.1.2) a následně dělením hodnot 1/16 celkové intenzity (plochy). V závorkách jsou uvedeny hodnoty bez předchozí symetrizace hodnot.

Linie	pozice píku v Hz	Pološířka	Intenzita	Plocha	Intenzita norm. (bez sym.)	Plocha norm. (bez sym.)
1	1314,402	0,47	22098,2	919776,1	1,0 (0,9)	1,0 (0,9)
2	1310,459	0,47	24931,2	1026784,1	1,0 (1,0)	1,0 (1,0)
3	1309,798	0,45	22511,1	898409,0	1,0 (0,9)	1,0 (0,9)
4	1306,493	0,42	21930,6	799848,3	0,9 (0,9)	0,8 (0,8)
5	1305,863	0,53	24679,5	1141636,2	1,1 (1,0)	1,2 (1,1)
6	1305,223	0,44	24303,1	934017,0	1,0 (1,0)	0,9 (0,9)
7	1302,572	0,41	19264,1	687468,5	0,9 (0,8)	0,8 (0,7)
8	1301,900	0,46	24697,5	994803,8	1,0 (1,0)	1,1 (1,0)
9	1301,280	0,56	27193,2	1340194,6	1,0 (1,1)	1,1 (1,3)
10	1300,658	0,47	25511,5	1061921,5	0,9 (1,0)	0,8 (1,0)
11	1298,020	0,49	23538,0	1014721,9	1,0 (0,9)	0,9 (1,0)
12	1297,325	0,50	31649,8	1388406,2	1,1 (1,3)	1,2 (1,3)
13	1296,733	0,41	23791,8	860910,0	0,9 (1,0)	0,8 (0,8)
14	1293,455	0,50	28118,7	1225704,7	1,0 (1,1)	1,0 (1,2)
15	1292,786	0,41	27145,0	988493,2	1,0 (1,1)	1,0 (1,0)
16	1288,938	0,55	25630,0	1237097,3	1,0 (1,0)	1,0 (1,2)

### 1.1.3. Rekonstrukce diagramu štěpení

Jelikož má multiplet pro 16 komponent právě 16 linií jednotkové intenzity je zřejmé, že multiplet je důsledkem pouze dubletových interakcí a je tedy dubletem dubletu dubletu dubletu. U složitějších multipletů je však vhodné rekonstruovat diagram štěpení jak pro identifikaci multipletu tak zejména pro následné odečítání interakčních konstant.

Rekonstrukce diagramu štěpení nejsnadněji dosáhneme postupným zjednodušováním grafického vyjádření multipletu dle následujícího postupu a pravidel.

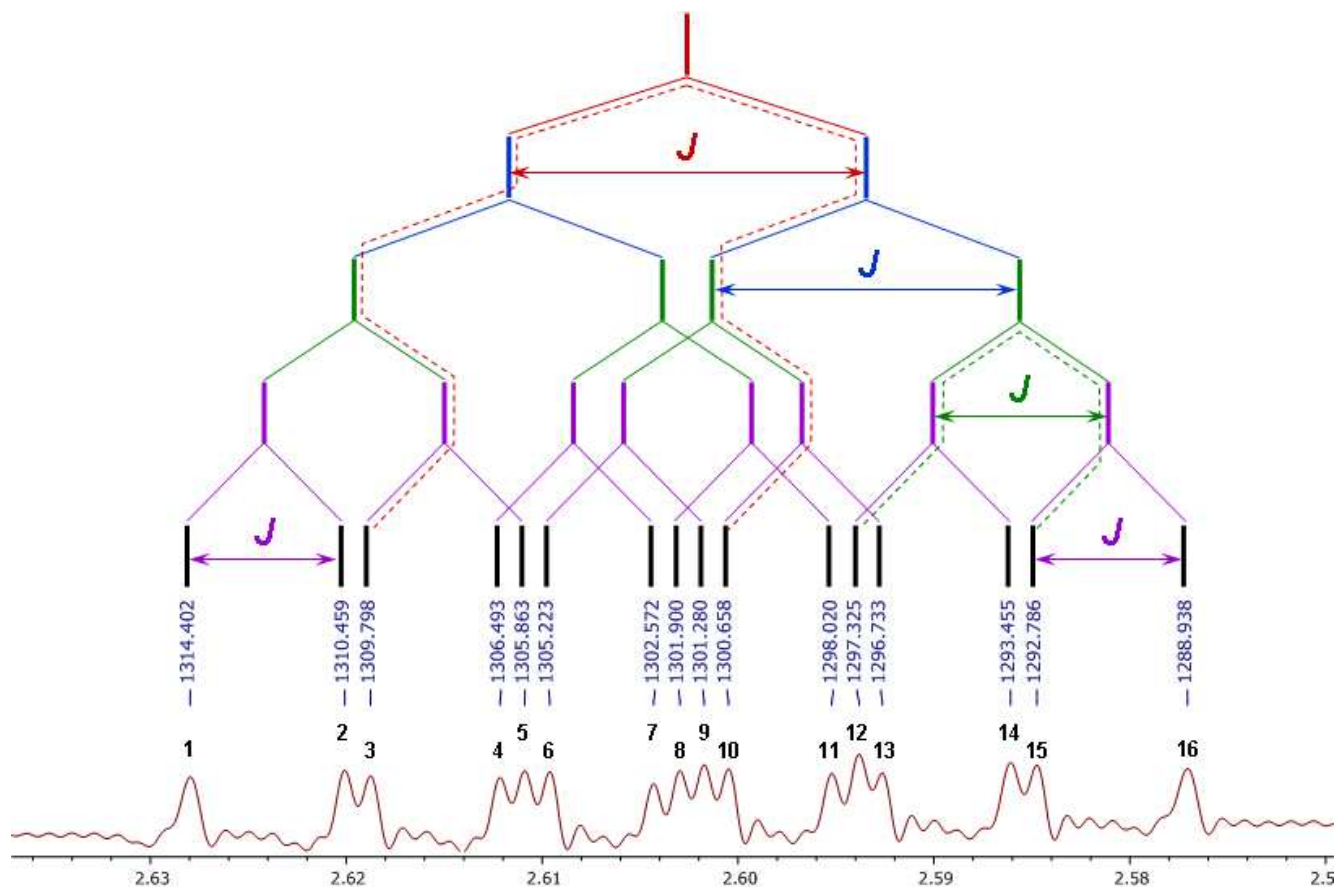
**Tabulka 2.** Pravidla pro analýzu multipletu (rekonstrukce diagramu štěpení) postupným zjednodušováním.

1. Vzdálenost první a druhé linie (píku) multipletu je vždy nejmenší interakční konstantou multipletu. V důsledku symetrie je zcela jedno, zda analyzujeme multiplet zprava či zleva. Obecně je výhodné postupovat z obou stran současně.
2. Poměr intenzit první a druhé linie odkazuje na multiplicitu tohoto nejslabšího štěpení (submultiplet). V případě interakcí s jádrem spinu  $1/2$  je poměr 1:1 důsledkem interakce dubletové, 1:2 tripletové, 1:3 kvartetová, ... atd.
3. Multiplet je tedy složen ze submultipletů, které je nutné identifikovat. Každá linie multipletu musí být součástí alespoň jednoho submultipletu. Přičemž je pokud dochází u některé linie multipletu k překryvu linií několika submultipletů, pak součet komponent překrývajících se linií submultipletů musí být roven počtu komponent linie multipletu. Žádná linie multipletu nesmí zůstat osamocena. Žádná linie multipletu tedy nesmí být součástí více submultipletů než kolik umožňuje počet komponent, které reprezentuje. Například linie multipletu intenzity jedna nemůže být součástí více než jednoho submultipletu, stejně tak jako nemůže reprezentovat druhou linii tripletového submultipletu.
4. Grafické znázornění multipletu zjednodušíme nahrazením úseček identifikovaných submultipletů úsečkou umístěnou ve jejich středu o délce rovnající se součtu komponent submultipletu, přičemž je obvyklé, že se tyto délky normalizují vydělením nejkratší. Experimentálně lze takového zjednodušení dosáhnout selektivním dekaplingem.
5. Na nově získaný multiplet znovu aplikujeme předchozí kroky až je dosaženo singletu.

U multipletu signálu 2,306 ppm je intenzita 1. a 2. linie 1:1. Jedná se tedy o interakci dubletovou. Každá linie multipletu tedy musí mít právě v této vzdálenosti právě jednu linii o stejné intenzitě (pokud nedochází k překryvu). Všechny tyto dublety (submultiplety) jsou v obrázku 2 vyznačeny fialově. Nahrazením dvojic černých linií (dubletů) jednou fialovou linií umístěnou přesně do středu

dubletu vzniká zjednodušený multiplet (fialový), který se skládá z 8 linií stejné intenzity, kde poměr intenzit 2:2:2:2:2:2:2:2 byl normalizován na 1:1:1:1:1:1:1:1.

Celý postup nyní opakujeme. Rozdíl mezi první a druhou fialovou linií je interakční konstanta. Jedná se opět o dubletovou interakci neboť jejich intenzita je 1:1. Opět tedy vyhledáme linie dubletů se stejnou vzdáleností a nahradíme je linií umístěnou do středu těchto dubletů. Tím se multiplet opět zjednoduší a získáme nový (zelený). Pokud celý postup opakujeme ještě dvakrát, převedeme multiplet až na singlet, který musí být uprostřed celého multipletu. Tímto jednak identifikujeme multiplet jako **dublet dubletu dubletu dubletu (dddd)** a zároveň získáme diagram štěpení multipletu (Obr. 2).



**Obrázek 2.** Diagram štěpení multipletu signálu 2,603 ppm s vyznačením několika cest (přerušované čáry) k odečtení interakčních konstant.

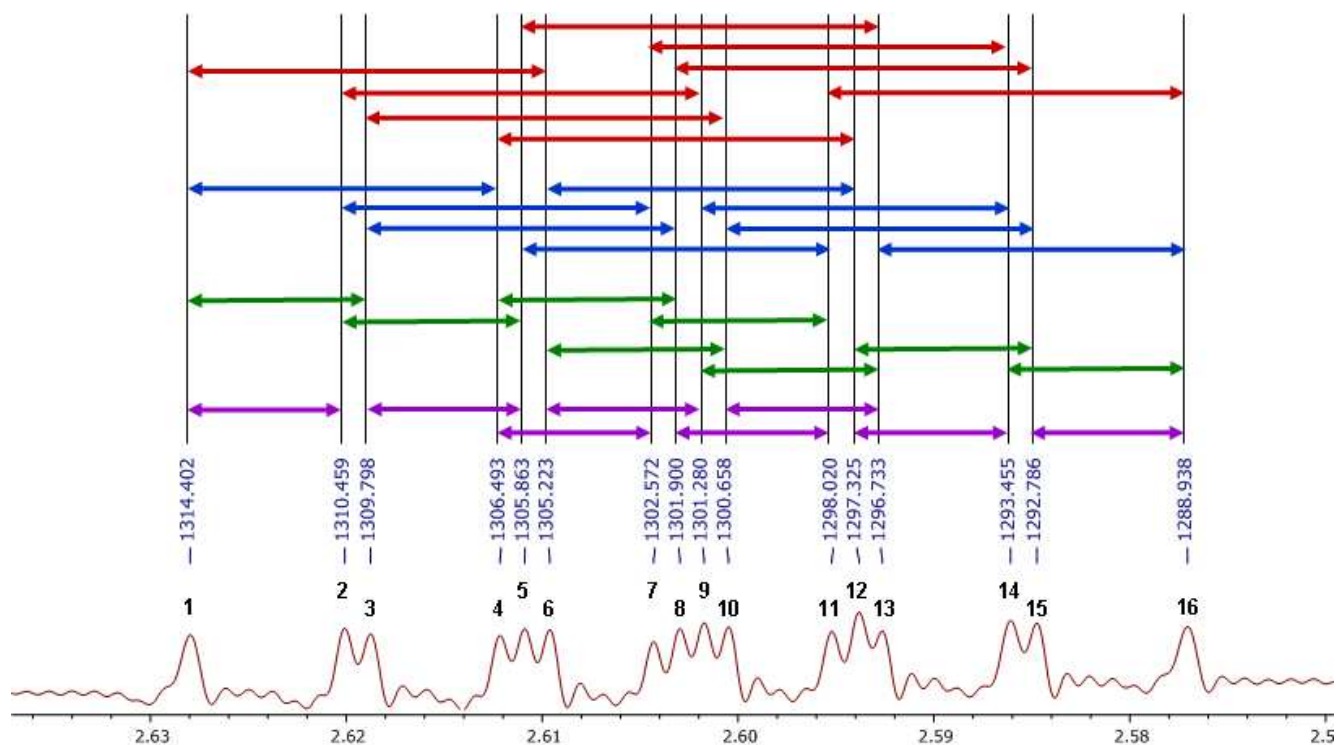
#### 1.1.4. Odečet interakčních konstant

Odečet jednotlivých interakčních konstant složitějších multipletů může být často nepřehledný, zvláště v případě, kdy chceme využít všechny linie multipletu, například s cílem získat průměrnou hodnotu interakční konstanty, která bude méně zatížena nedokonalostí spektra. V případě dddd tak lze každou interakční konstantu odečíst mezi osmi dvojicemi linií (píků). Z obrázku 3 je patrné, že každá linie multipletu je vždy součástí všech submultipletů (každého jednou), a že všechny interakční konstanty lze tedy odečíst od libovolné linie.

Linie pro odečtení interakčních konstant lze snadno identifikovat procházením diagramu od singletu k multipletu, přičemž je-li v cestě štěpení, pak musí cesta v obou štěpeních odbočit stejným směrem. Dvojice pro odečtení nejmenší interakční konstanty (fialová) jsou zřejmé (např. 1-2, 3-5, 8-11, 12-14). Naproti tomu největší červenou interakční konstantu lze odečíst sledováním štěpení červeného linie (viz Obr. 2), která je štěpena červenou interakční konstantou (rovnající se rozdílu modrých linií) vedoucí k modrým liniím, které jsou následně štěpeny modrou interakční konstantou na další dublet, kde pro příklad odbočíme na obou štěpeních doleva. Tyto linie jsou dále štěpeny zelenou interakční konstantou (odbočíme na obou např. doprava) a následně fialovou (odbočíme na obou např. doleva). Tímto jsme určili, že červenou interakční konstantu můžeme odečíst například mezi linií 3 a 10. Pokud systematicky projdeme všechny možnosti odbočení, získáme všech osm dvojic viz Obr. 3.

Odečtených hodnot pro jednotlivé interakční konstanty je následně vhodné udělat průměr. Pokud je pozice některé linie výrazně ovlivněna překryvem s jiným píkem, je vhodné provést dekonvoluci píků a tím upřesnit pozici linie, nebo takové hodnoty ze zpracování vyloučit. Po odečtení všech interakčních konstant mezi všemi možnými dvojicemi, a po jejich zprůměrování dostáváme tyto hodnoty 2,603 ppm (1H; dddd; 9,14; 7,87; 4,56; 3,91 Hz).

I přesto, že všechny diskutované vlastnosti multipletu prvního řádu jsou u signálu 2,603 ppm splněny, nelze zcela vyloučit, že se jedná o osm vzájemně neinteragujících dubletů či dvou *ddd* a podobně, jejichž chemické posuny jsou náhodně takové, že signály mimikují vyšší multiplet. K rozpoznání těchto výjimečných případů se využívá různých experimentálních technik jako je selektivní dekapling a korelační 2D NMR spekter.



**Obrázek 3.** Vyznačení všech dvojic linií k odečtu všech interakčních konstant signálu 2,603 ppm.

## 1.2. Příklad interpretace multipletu signálu 1,962 ppm

### 1.2.1. Zpracování spektra.

Pro analýzu multipletu byl FID záznam doplněn nulami na 512kb a aplikována exponenciální (-0,6 Hz) a Gaussovská funkce (0,8 Hz) viz Obr. 4.

### 1.2.2. Stanovení počtu komponent a grafické znázornění multipletu

Z obrázku signálu je zřejmá symetrie počtu a pozice linií, avšak významná nesymetrie jejich intenzit v důsledku střechového efektu. Jelikož nedostatečné rozlišení neumožňuje přímo integrovat intenzitu jednotlivých linií je integrace provedena po skupinách.

$$91 : 85 : 278 : 658 : 799 : 735 : 320 : 123 : 112$$

Pokud normalizujeme intenzity skupin linií dělením první hodnotou (91), dostáváme poměr, z kterého je jednak nesymetrie intenzit linií multipletu čitelnější, a jednak je zřejmé, že počet komponent (součet relativních intenzit všech linií) není roven mocnině dvou.

$$1,0 : 0,9 : 3,1 : 7,2 : 8,8 : 8,1 : 3,5 : 1,4 : 1,2 \quad \text{součet} = 35,2$$

V takových případech lze využít matematické symetrizace signálu či alespoň integrálních hodnot jednotlivých částí multipletu. K intenzitám jednotlivých skupin linií přičteme intenzitu symetrické skupiny. Tedy k hodnotám poměru

$$91 : 85 : 278 : 658 : 799 : 735 : 320 : 123 : 112$$

přičteme hodnoty „zrcadlového obrazu“

$$112 : 123 : 320 : 735 : 799 : 658 : 278 : 85 : 91$$

čímž získáme symetrický poměr

$$203 : 208 : 598 : 1393 : 1598 : 1393 : 598 : 208 : 203 \quad \text{součet} = 6402$$

který normalizujeme dělením první hodnotou poskytneme relativní poměr

$$1,0 : 1,0 : 2,9 : 6,9 : 7,9 : 6,9 : 2,9 : 1,0 : 1,0 \quad \text{součet} = 31,5$$

který po zaokrouhlení na celá čísla poskytneme jak symetrické rozložení intenzit tak správný počet komponent ( $32 = 2^5$ )

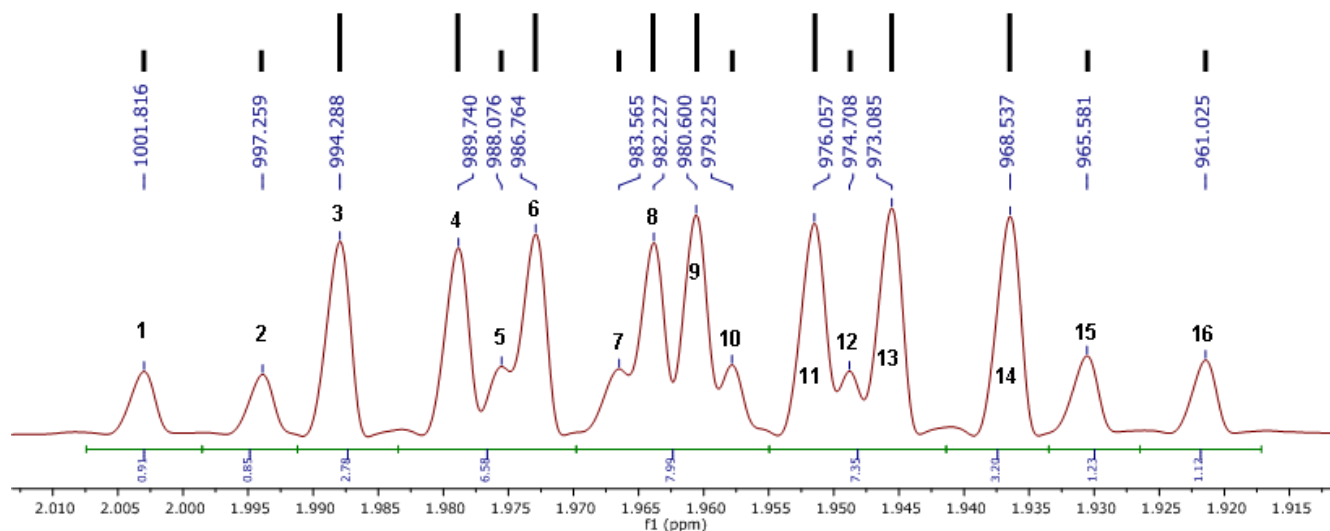
$$1 : 1 : 3 : 7 : 8 : 7 : 3 : 1 : 1 \quad \text{součet} = 32$$

Při znalosti, že signál má 32 komponent je vhodné normalizovat hodnoty nikoli nejmenší hodnotou (203), ale  $1/32$  celkové intenzity ( $6402/32 = 200,0625$ ). Tím je obvykle získán správnější poměr intenzit

$$1,0 : 1,0 : 3,0 : 7,0 : 8,0 : 7,0 : 3,0 : 1,0 : 1,0 \quad \text{součet} = 32$$

Ze získaných poměrů relativních intenzit skupin linií lze v tomto případě snadno rozpoznat, že skupina intenzity 7 obsahuje dvě linie intenzity 3 a jednu linii intenzity 1, skupina intenzity 8 obsahuje

dvě linie intenzity 3 a dvě linie intenzity 1. Již nyní lze tedy znázornit multiplet graficky (Obr. 4). Výhodou soudobých programů na zpracování NMR spekter je schopnost provést dekonvoluci a získat intenzity jednotlivých linií (Tab. 3).



**Obrázek 4.** Multiplet signálu 1,962 ppm a jeho grafické znázornění.

**Tabulka 3.** Linie multipletu signálu 1,962 ppm. Normalizace intenzit a ploch byla provedena nejprve symetrizací hodnot (viz 1.1.2) a následně dělením hodnot 1/32 celkové intenzity (plochy). V závorkách jsou uvedeny hodnoty bez předchozí symetrizace hodnot.

Linie	pozice píku v Hz	Pološířka	Intenzita	Plocha	Intenzita norm. (bez sym.)	Plocha norm. (bez sym.)
1	1001,816	1,20	5077,4	454472,01	1,0 (0,9)	1,0 (0,9)
2	997,259	1,00	4832,2	424876,79	1,0 (0,9)	1,0 (0,8)
3	994,288	1,00	15825,8	1386303,4	3,0 (2,8)	3,0 (2,8)
4	989,740	1,00	15285,2	1339860,1	3,0 (2,7)	3,0 (2,7)
5	988,076	1,13	5485,5	545005,56	0,9 (1,0)	1,0 (1,1)
6	986,764	1,20	16440,7	1470098,9	3,0 (2,9)	3,0 (2,9)
7	983,565	1,25	5287,7	578200,39	1,0 (0,9)	1,0 (1,2)
8	982,227	1,30	15719,6	1414048,7	3,0 (2,8)	3,0 (2,8)
9	980,600	1,10	18015,4	1597089,5	3,0 (3,2)	3,0 (3,2)
10	979,225	0,90	5617,7	442690,78	1,0 (1,0)	1,0 (0,9)
11	976,057	1,30	17329,0	1567888,9	3,0 (3,1)	3,0 (3,1)
12	974,708	1,40	5099,5	464595,98	0,9 (0,9)	1,0 (0,9)
13	973,085	1,10	18579,5	1640145,9	3,0 (3,3)	3,0 (3,3)
14	968,537	1,00	17898,6	1570522,8	3,0 (3,2)	3,0 (3,1)
15	965,581	1,50	6368,3	589236,22	1,0 (1,1)	1,0 (1,2)
16	961,025	1,10	6014,1	532250,17	1,0 (1,1)	1,0 (1,1)



### 1.1.3. Rekonstrukce diagramu štěpení

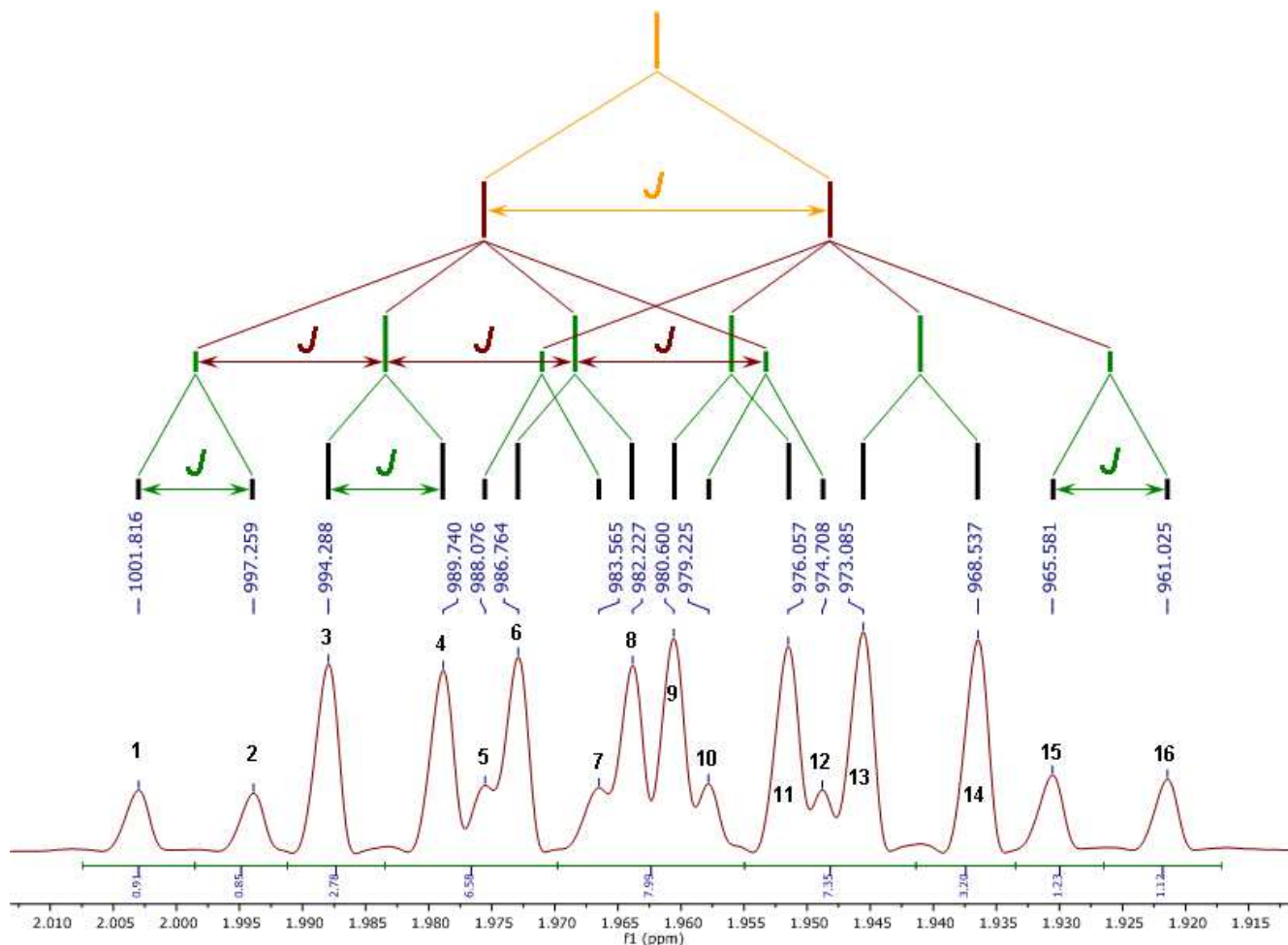
Narozdíl od předchozího signálu, má multiplet tohoto signálu na 16 liniích 32 komponent. Je tedy zřejmé, že některé interakční konstanty jsou stejné nebo za daných podmínek nerozlišitelné (důsledkem nedostatečného rozlišení přístroje, nevhodného nastavení experimentu či nevhodného zpracování naměřených dat).

Dle postupu v Tab. 2 rekonstruujeme diagram štěpení multipletu (Obr. 5). První a druhá linie multipletu prvního řádu vždy odpovídá interakční konstantě. Zde jsou linie 1 a 2 v poměru 1:1 a jedná se tedy o dubletovou interakci, kterou snadno převedeme na singlet podobně jako v předchozím příkladu. Intenzitu nové zelené úsečky normalizujeme dělením počtem komponent odstraňovaného multipletu, tedy dvěma. Další v pořadí je linie 3, která má ve vzdálenosti 1-2 linii 4. Obě linie dubletu (submultipletu) mají intenzitu 3, a tudíž odpovídající zelená linie musí mít intenzitu 6, která je opět normalizována dělením dvěma. Tímto postupně odstraníme dubletovou interakci u všech linií a původní multiplet zjednodušíme na zelený.

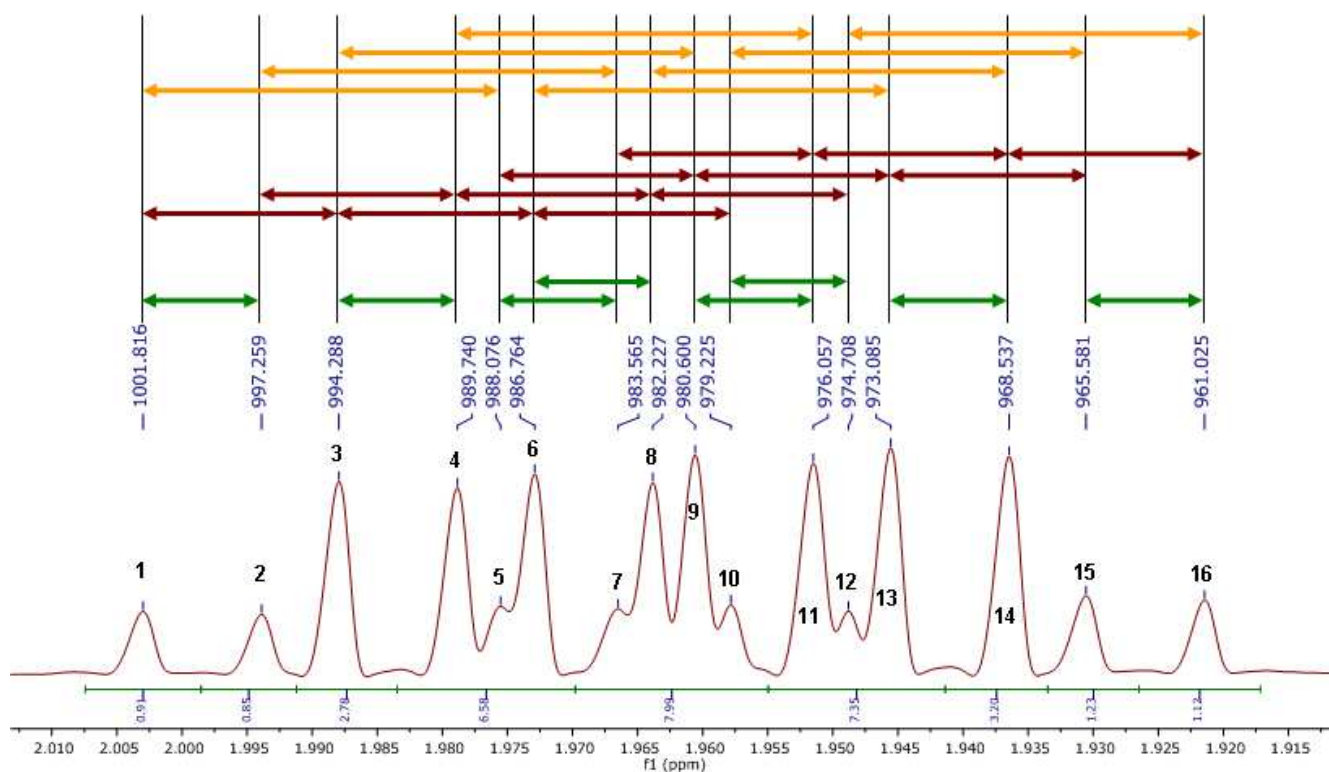
U zeleného multipletu je první a druhá linie v poměru 1:3 a jedná se tedy o interakci kvartetovou. V multipletu tedy musíme identifikovat všechny čtyři linie kvartetu v poměru intenzit 1:3:3:1, kde vzdálenosti 1-2, 2-3 a 3-4 jsou stejné (interakční konstanta kvartetu). Linie převedeme na novou úsečku, jejíž intenzitu normalizujeme vydělením osmi neboť odstraňovaný multiplet (kvartet) má osm komponent. Tímto postupně odstraníme kvartetovou interakci u všech linií a zelený multiplet zjednodušíme na hnědý dublet, který převedeme na oranžový singlet (Obr. 5).

### 1.1.4. Odečet interakčních konstant

Odečet jednotlivých interakčních konstant provedeme analogicky jako u signálu 2,603 ppm. Povšimněme, že u multipletu signálu 1,962 ppm lze dubletové interakční konstanty odečíst mezi osmi dvojicemi linií, zatímco kvartetovou interakci mezi dvanácti dvojicemi linií (Obr. 6). Po odečtení všech interakčních konstant mezi všemi možnými dvojicemi, a po jejich zprůměrování dostáváme tyto hodnoty 1,962 ppm (1H;  $d_{qd}$ ; 13,69; 7,51; 4,54 Hz).



Obrázek 5. Diagram štěpení multipletu signálu 1,962 ppm.



Obrázek 6. Vyznačení všech dvojic linií k odečtu všech interakčních konstant signálu 1,962 ppm.