

# Měření a interpretace NMR spekter

B. Dolenský

E-mail : [dolenskb@vscht.cz](mailto:dolenskb@vscht.cz)

Telefon : (+420) 220 44 4110

Místnost : budova A, A28

<b>H1</b>	<p><b>7,01 (2H; d; 8,1)</b></p> <p>a) COSY krosník s H2, stejná velikost interakční konstanty (<math>{}^3J_{\text{HH}} = 8.1 \text{ Hz}</math> je typická velikost pro aromatické systémy) a střechový efekt vypovídá o interakci s H2.</p> <p>b) COSY krosník s H7 je překvapivý, odpovídá interakci přes 5 vazeb, což není běžné, nicméně možné.</p> <p>c) Při zvýšení intenzity spektra lze nalézt <math>{}^{13}\text{C}</math> satelity <math>{}^1J_{\text{HC}} = 157 \text{ Hz}</math>, což je typická velikost pro aromatické systémy.</p> <p>d) NOESY1D odhaluje silné NOE s H2 (velmi nečitelné vlivem SPT) a velmi silné NOE k vodíku H6, konfrontace s modelem ukazuje že H6 vodík je tedy endo. Slabé NOE pozorované s H3, H5 a H7 mohou být i důsledkem nedokonalého měření.</p>
<b>H2</b>	<p><b>6,94 (2H; dm; 8,2 d; 2,1 d; (+ 0,5 q ?); <math>\Sigma J = \text{ca. } 13 = 8,2 + 2,1 + 3 \cdot 0,5 = 11,8</math>)</b></p> <p>a) COSY krosník s H1, odhadnutá velikost interakční konstanty dubletu a střechový efekt vypovídá o interakci s H1</p> <p>b) COSY krosník s H3 a odhadnutá velikost interakční konstanty (ca. 1,7 až 2,0) odpovídá interakci přes 4 vazby na derivátech benzenu.</p> <p>c) Satelity s <math>{}^{13}\text{C}</math> jsou překryty.</p> <p>d) COSY krosník s H7 odpovídá interakci přes 4 vazeb, což není neobvyklé; velikost obvykle pod 1 Hz.</p> <p>e) NOESY1D ukazuje NOE k H7.</p>
<b>H3</b>	<p><b>6,68 (2H; m; <math>\Sigma J = \text{ca. } 5 \text{ Hz}</math>)</b></p> <p>a) COSY krosník s H2, a šířka píku dokládá interakci s H2.</p> <p>b) Satelity s <math>{}^{13}\text{C}</math> jsou částečně překryty, lze odhadnout <math>{}^1J_{\text{HC}} = 155 \text{ Hz}</math>, což je typická velikost pro aromatické systémy.</p> <p>c) COSY krosník s H7 odpovídá interakci přes 4 vazeb, což není neobvyklé.</p> <p>d) NOESY1D ukazuje silné NOE k H7. Dále pak silné NOE k H6 a slabší k H4, viz dále.</p>

H4	<p><b>4,63 (2H; d; 16,6)</b></p> <p>a) Chemický posun napovídá o blízkosti elektronegativního atomu či skupiny, v tomto případě dusík a benzenové jádro.</p> <p>b) COSY krosník vypovídá o interakci s H6, což potvrzuje i stejná velikost interakční konstanty, jejíž velikost je typická pro geminální interakci <math>{}^2J_{\text{HH}}</math> diastereotopních protonů.</p> <p>c) COSY krosník s H7 by odpovídal interakci přes 6 vazeb což je velmi neobvyklé, a je vhodné uvážit, zda se nejedná o artefakt.</p> <p>d) Satelity s <math>{}^{13}\text{C}</math> jsou částečně překryty, lze odhadnout <math>{}^1J_{\text{HC}} = 138 \text{ Hz}</math>, což odpovídá interakční konstantě uhlíků vázaných na dusík.</p> <p>e) NOESY1D ukazuje silné NOE k H6, slabé k H5 (dokládá exo pozici) a velmi slabé k H3.</p>
H5	<p><b>4,28 (2H; t; 1,3)</b></p> <p>a) Chemický posun napovídá o blízkosti elektronegativního atomu či skupiny, v tomto případě dvou dusíků.</p> <p>b) COSY krosník vypovídá o interakci s H6, což potvrzuje multiplicita (triplet je způsoben 2 chemicky ekvivalentními atomy). Šířka signálů je podobná což napovídá o vzájemném štěpení. Velikost 1.3 Hz je pro interakce přes 4 vazby typická.</p> <p>c) Navíc je pozorována pouze s H6 a nikoli s H4, což po konfrontaci s molekulovým modelem ukazuje na interakci s endo vodíkem neboť pouze v tomto případě jsou jednotlivé vazby mezi atomy v rovině a pouze v trans uspořádání – typická interakce označovaná W.</p> <p>d) Při zvýšení intenzity spektra lze naléznout <math>{}^{13}\text{C}</math> satelity <math>{}^1J_{\text{HC}} = 151 \text{ Hz}</math>, což odpovídá interakční konstantě uhlíků vázaných na dva dusíky.</p> <p>e) NOESY1D ukazuje silné NOE k H4 a téměř nulové k H6, z čehož plyne, že H4 je exo. Dále je slabé NOE k H3 a H1, a velmi slabé k H2.</p>
H6	<p><b>4,09 (2H, dm, 16,7)</b></p> <p>a) viz H4 a H5</p> <p>b) Satelity s <math>{}^{13}\text{C}</math> jsou částečně překryty, lze odhadnout <math>{}^1J_{\text{HC}} = 138 \text{ Hz}</math>, což odpovídá interakční konstantě uhlíků vázaných na dusík.</p> <p>e) NOESY1D ukazuje silné NOE k H4, slabší NOE k H3 a H1. Žádné NOE k H5 dokládá, že jde o vodík endo.</p>

**H7**

**2,19 (6H; s)**

a) Integrální intenzita a multiplicita jednoznačně určuje o který atom se jedná.

b) Při zvýšení intenzity spektra lze nalézt  $^{13}\text{C}$  satelity  $^1J_{\text{HC}} = 126 \text{ Hz}$ , což odpovídá interakční konstantě u methylů vázaných na uhlík.

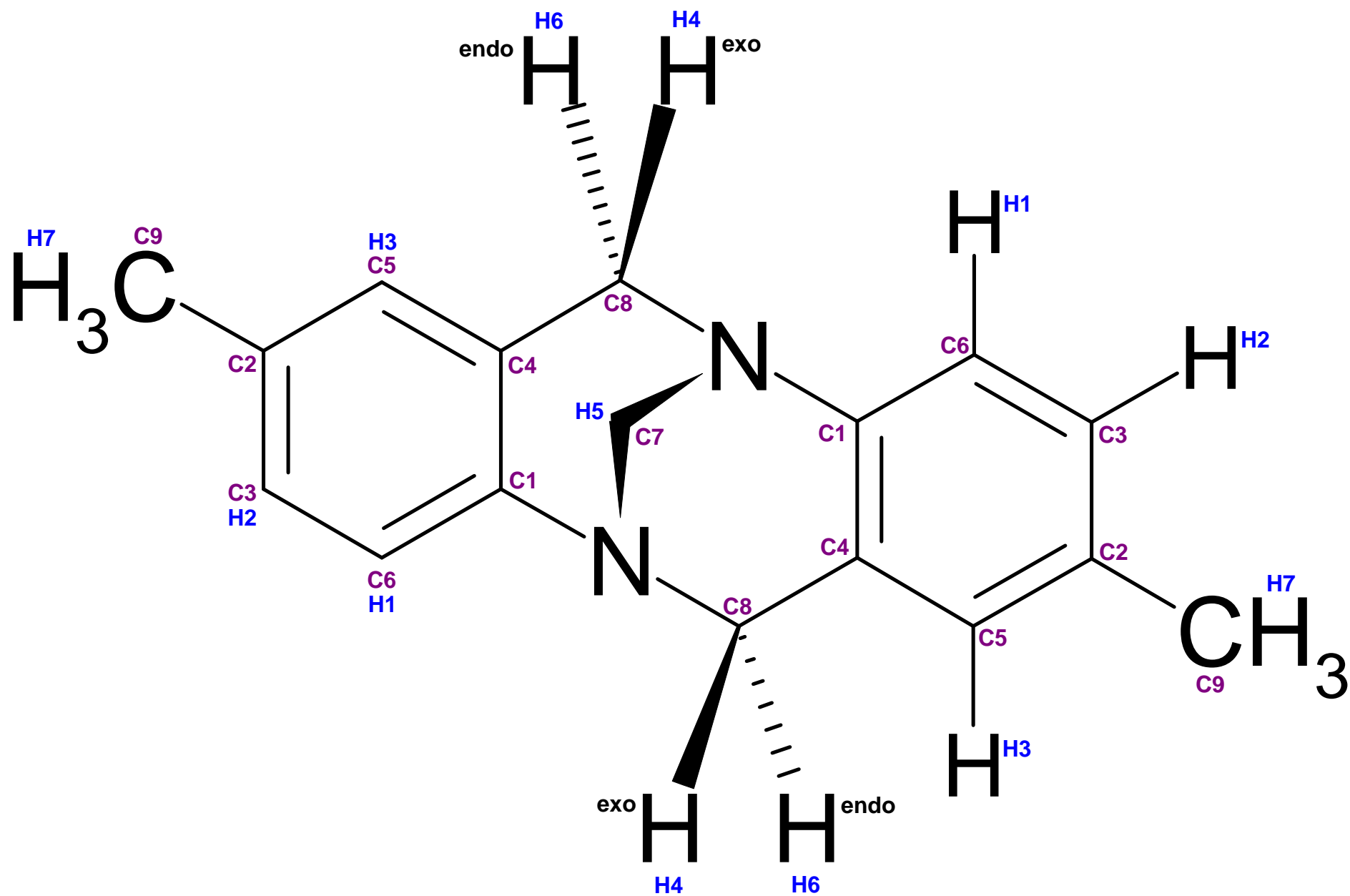
C1	<p><b>145,14 ppm; m; <math>\Sigma J = 38</math>; <math>^1J_{CH}</math> není; g-HSQC není; C</b></p> <p>a) Chemický posun odpovídá benzenovému uhlíku s aminovou skupinou.  b) Takový uhlík v zadané struktuře má celkem 8 možných interakcí <math>^3J_{CH}</math>, což odpovídá vysoké multiplicitě signálu, která je při daném rozlišení pozorována pouze jako velmi rozšířený signál.  c) HMBC křížky s H2, H3, H4, H5 a H6 toto potvrzují.</p>
C2	<p><b>132,68 ppm; m, dq? <math>\Sigma J = 26</math>; <math>^1J_{CH}</math> není; g-HSQC není; C</b></p> <p>a) HMBC křížky s H1 a H7 potvrzují odhadnutou multiplicitu signálu dq s interakčními konstantami <math>^3J_{HC}</math> 6,8 (d) a <math>^2J_{HC}</math> 6,2 (q).</p>
C3	<p><b>127,61 ppm; ddq; <math>^1J_{CH} = 157,4</math>; g-HSQC k H2; CH</b></p> <p>a) HMBC křížky s H3 jednoznačně potvrzují přiřazení z kombinace přiřazení H2 a HSQC.  b) Z multiplicity signálu a ze struktury lze očekávat též křížky s H7. Ten je však pozorován jako křížky spojený-slité s křížkem C5.  d 7,6 q 4,9</p>
C4	<p><b>127,11 ppm; q ? asi dt; <math>^1J_{CH}</math> není; g-HSQC není; C</b></p> <p>a) HMBC křížky s H1 potvrzují pozici. Křížky s H4 a H6 reprezentují interakci přes dvě vazby, která je v důsledku přítomnosti dusíku větší a pozorována. signál je tedy ddd či spíše dt.  b) HMBC křížky s H7 je patrně artefakt plynoucí ze spojení křížků C3-H7 a C5-H7.  q 4,5</p>
C5	<p><b>126,80 ppm; dm; <math>^1J_{CH} = 153,6</math>; g-HSQC k H3; CH</b></p> <p>a) HMBC křížky potvrzují interakci s H2 a H7 ...  b) Překvapivě žádné křížky s H4 a H6. Inspekce modelu ukazuje, že mohou být velmi blízko 90° a tudíž bude konstanta velmi malá a křížky nepozorovány. Na druhou stranu je multiplicita značná.</p>
C6	<p><b>124,33 ppm; d; <math>^1J_{CH} = 157,1</math>; g-HSQC k H1; CH</b></p> <p>a) Jediný uhlík, který nemá přes tři vazby žádný vodík a není tudíž překvapení, že nemá žádné křížky v HMBC. Dokládá to i multiplicita signálu, dublet bez rozšíření jednotlivých linií.</p>

<b>C7</b>	<p><b>66,53 ppm; tt; <math>^1J_{CH} = 150,9</math>; g-HSQC k H5; CH<sub>2</sub></b></p> <p>a) Chemický posun, interakční konstanta a HSQC krosník jednoznačně ukazují na uhlíkový atom molekuly.</p> <p>b) Multiplicita odpovídá jednak o přítomnosti dvou stejných vodíků přímo vázaných na tento uhlík a jednak další interakci se dvěma stejnými uhlíky, tedy nikoli se čtyřmi.</p> <p>c) HMBC pík je pozorován pouze s H6. Inspekce modelu odhalí, že dihedralní úhel C7-N-C8-H<sup>exo</sup> je blízký 0°, zatímco úhel C7-N-C8-H<sup>endo</sup> je blízký 180° a tudíž pozorován krosník pouze s H6 a nikoli s H4.</p> <p>t 7,4</p>
<b>C8</b>	<p><b>58,26 ppm; tq či tdt ?; <math>^1J_{CH} = 139,4</math>; g-HSQC k H4 a H6; CH<sub>2</sub></b></p> <p>d 4,5</p> <p>b) HMBC krosník s H5 a s H3 jednoznačně ukazuje na atom molekuly.</p>
<b>C9</b>	<p><b>20,38 ppm; qt; <math>^1J_{CH} = 126,2</math> Hz; g-HSQC k H7; CH<sub>3</sub></b></p> <p>t 4,4</p> <p>a) Krosníky s H2 a H3 (viz. spektrum se zvýšenou intenzitou) jednoznačně podtrhují přiřazení.</p> <p>b) Jsou též pozorovány HMQC krosníky v HMBC, které jen dokládají přiřazení s HSQC.</p>

## Možný postup přiřazení

Prvním krokem přiřazení signálů bývá nalezení signálu, který lze prakticky jednoznačně přiřadit například pouze z dovodu jeho multiplicity nebo integrální hodnoty nebo chemického posunu. Následně je nutné tento odhad potvrdit dostupnými informacemi. V tomto případě je jednoznačných signálů hnedle několik, viz vodíky H3, H4, H5, H6 a H7, a uhlíky C1, C7, C8 a C9.

1.  $^1\text{H}$  NMR. Je jednoznačné, který vodík je H7 neb pouze methylová skupina je očekávána jako singlet o intenzitě 3 (resp. 6). Je též jednoznačné, který vodík je H5 neb pouze methylenová skupina mezi dvěma dusíky je očekávána jako singlet o intenzitě 2 (resp. 4). Je též jednoznačné, který s aromatických vodíků bude H3 neb pouze u jednoho nejsou očekávány interakční konstanty nad 6 Hz; následně z COSY lze přiřadit H2 a H1. Je též jednoznačné, že H4 a H6 budou na stejném uhlíku methylenové skupiny mezi benzenem a dusíkem, ale nelze určit, který je endo a který exo.
2. Pomocí HSQC lze přiřadit následující konektivitu H1-C6, H2-C3, H3-C5, H4-C8-H6, H5-C7 a H7-C9.
3. NOESY1D na H7 potvrzuje blízkost H2 a H3.
4. HMBC na H7 bohužel nedává zcela jednoznačné krosníky neboť dochází k překryvu. Při větším rozlišení by byla patrná interakce pouze s C2, C3 a C5, přičemž pouze na C2 není vázán proton a bylo by tedy možno ho přiřadit. Krosník s C2 je skutečně pozorován, ale překryv ostatních krosníků nedává jistotu.
5. U uhlíku na který je vázán dusík očekáváme HMBC interakci s H3 a H2, což pozorujeme pouze u signálu C1. Přiřazení je potvrzeno i velkým chemickým posunem tohoto signálu, který je důsledkem vazby k dusíku. Navíc má signál C1 uhlíku má očekávané HMBC krosníky i s H4, H5 a H6.
6. Na benzenu zbývá přiřadit C2 a C4. HMBC krosník s H7 lze spíše očekávat u C2 než-li u C4,  $^2J$  versus  $^4J$ . Zrovna tak lze očekávat HMBC krosníky s H4 a H6 spíše u C4 nežli u C2. Tomu vyhovuje, že C2 je uhlík nesoucí methyl.
7. Tímto jsou signály přiřazeny a zbývá vyřešit, který ze signálů H6 a H4 odpovídá endo vodíkům, a který exo vodíkům.





## Řešení stereostruktury pomocí měření NOE

Klasickou technikou určování konfigurace je měření NOE. Čím jsou si atomy prostorově blíže, tím je NOE větší, přičemž měřitelné je do vzdálenosti 0,5 nm (5 Å). Pokud známe strukturu molekuly a potřebujeme pouze stanovit konfiguraci konkrétních atomů, pak nejvhodnější technikou pro měření NOE jsou sekvence NOEDIF a NOESY1D. Inspekci modelu molekuly lze snadno nalézt dvě možná řešení.

8. Z inspekce modelu molekuly vyplývá, že vodíky signálu H5 by měly vykazovat NOE pouze s exo protony. Bohužel měření NOE signálu H5 (S14a) vykazuje nejen pozitivní NOE se signálem H4, ale též slabě „negativní“ se signálem H6. Toto může být buď artefakt a nebo důsledek neselektivní excitace, tj. není zřejmé zda je NOE na H4 důsledkem excitace H5 a nebo H6. Z tohoto měření tedy nelze dělat jednoznačný závěr. Neselektivní excitaci podporuje měření NOE signálu H6 (S14f), kde je patrné „negativní“ NOE na H5. Naproti tomu měření NOE signálu H4 (S14e) není zatíženo neselektivní excitací (signál je dobře separován od ostatních) a jednoznačně ukazuje silné NOE nejen k vodíku H6, ale i k vodíku H5. Je tedy zřejmé, že H4 je prostorově blízko k H5, tj. signál H4 reprezentuje exo vodíky.
9. Z inspekce modelu molekuly dále vyplývá vodíky H1 jsou výrazně blíže vodíkům endo nežli exo. Měření NOE excitací signálu H1 (S14b) vede k pozorování NOE pouze na signálu H6 a nikoli na H4. Tímto je potvrzeno přiřazení signálu H6 endo vodíkům, což potvrzuje předchozí závěr.
10. Je vhodné zmínit, že měření NOE vodíků H3 (S14d), vykazuje poněkud silnější NOE na signálu H6 nežli na signálu H4. Inspekci modelu pak lze zjistit, že vodíky H3 jsou blíže vodíkům endo nežli exo. Struktura optimalizovaná semiempirickou metodou RM1 má vzdálenosti H3-H<sup>endo</sup> = 0,257 nm a H3-H<sup>exo</sup> = 0,282 nm, z čehož plyne očekávaný poměr NOE endo/exo = 1,7 což je v dobré shodě s experimentem (2,4). Opět tedy dostáváme přiřazení signálu H6 endo vodíkům a signálu H4 exo vodíkům.

$$\frac{\text{NOE H3-H}^{\text{endo}}}{\text{NOE H3-H}^{\text{exo}}} = \frac{(r \text{ H3-H}^{\text{endo}})^{-6}}{(r \text{ H3-H}^{\text{exo}})^{-6}} = 1,745$$

## Řešení stereostruktury pomocí analýzy interakčních konstant

U nasycených částí molekuly se k určení konfigurace nejčastěji využívají hodnoty interakčních konstant  ${}^3J_{\text{HH}}$  a  ${}^3J_{\text{CH}}$  pro které platí, že při dihedrálním úhlu interagujících atomů kolem  $90^\circ$  se hodnota interakční konstanty blíží nule a při  $180^\circ$  větší než při  $0^\circ$ . Je však vždy potřeba brát zřetel na flexibilitu systému. Pokud mohou vazby mezi interagujícími atomy rotovat, pak dochází ke zprůměrování hodnoty interakční v závislosti na zastoupení jednotlivých konformerů a interpretace její velikosti je pak velmi obtížná. U rigidních systémů je interpretace mnohem snadnější. U rigidních systémů jakým je i tento případ lze pozorovat  ${}^4J_{\text{HH}}$  jako nenulovou, jsou-li všechny dihedrální úhly mezi atomy velmi blízké  $180^\circ$ . Interagující vodíky a všechny atomy mezi nimi jsou tedy téměř v jedné rovině a připomínají písmeno W, což je i obvyklé označení této interakce.

11. Signál vodíků H5 je jednoznačně tripletem (S2), přičemž není zřejmé, kterými vodíky je tato multiplicita způsobena. Jednoznačně lze tuto interakci přiřadit z COSY spektra (S4) jako interakci přes 4 vazby mezi vodíky H5 a H6, čemuž odpovídá i velikost interakční konstanty  ${}^4J_{\text{H5-H6}} = 1,3 \text{ Hz}$ . V důsledku této interakce by však měl být dublet signálu H6 ještě tripletem. Píky jsou však pouze rozšířené. Po zesílení COSY spektra (S5) je patrné, že rozšíření signálu H6 je důsledkem dalších interakcí, allylové  ${}^4J_{\text{H6-H3}}$  a  ${}^6J_{\text{H6-H7}}$ . Inspekcí modelu molekuly snadno odhalíme, že podmínky pro W interakci jsou pouze v případě vodíků endo, čímž opět potvrzujeme přiřazení signálu H6 endo vodíkům. Dobré je povšimnouti si, že jeden vodík H5 interaguje s vodíkem H6 na jedné straně a druhý vodík H5 na opačné, jakoby každý s jiným, v důsledku symetrie jsou však oba H5 vodíky i oba H<sup>endo</sup> vodíky identické a vystupují tedy jako běžná CH<sub>2</sub> skupina štěpená na triplet dvěma stejnými vodíky.
12. Porovnáme-li krosníky vodíků H4 a H6 v HMBC spektru (S11) zjistíme, že s uhlíkem C7 má krosník pouze signál H6 a nikoli H4 (odpovídající  ${}^3J_{\text{HC}} \sim 0 \text{ Hz}$ ). Inspekcí modelu molekuly zjistíme, že zatímco dihedrální úhel mezi H<sup>endo</sup> a C7 se blíží  $180^\circ$  (očekáváme tedy maximální hodnotu interakční konstanty), dihedrální úhel mezi H<sup>exo</sup> a C7 se blíží  $90^\circ$  (očekáváme hodnotu interakční konstanty blízkou nule, tj. žádný nebo velmi slabý krosník v HMBC). Toto opět potvrzuje přiřazení signálu H4 exo vodíkům a signálu H6 endo vodíkům. Významně rozdílnou intenzitu krosníků signálů H4 a H6 v HMBC spektru lze ještě pozorovat k uhlíku C1. Vhodnější úhel mají tentokrát exo vodíky (viz model molekuly), takže větší krosník k vodíkům H4 potvrzuje předchozí přiřazení.