

# Úvod do strukturní analýzy farmaceutických látek

Garant předmětu: doc. Ing. Bohumil Dolenský, Ph.D.

A28, linka 4110, dolenskb@vscht.cz

## Nukleární Magnetická Rezonance I.

*Příprava předmětu byla podpořena  
projektem OPPA č. CZ.2.17/3.1.00/33253*



**Evropský sociální fond  
Praha & EU: Investujeme do vaší budoucnosti**

# Nukleární Magnetická Rezonance

## The Electromagnetic Spectrum

Radiation	Wavelength (nm) $\lambda$	Frequency (Hz) $\nu$	Energy (kJ mol <sup>-1</sup> )
Cosmic rays	$<10^{-3}$	$>3 \times 10^{20}$	$>1.2 \times 10^8$
Gamma rays	$10^{-1}$ to $10^{-3}$	$3 \times 10^{18}$ to $3 \times 10^{20}$	$1.2 \times 10^6$ to $1.2 \times 10^8$
X rays	10 to $10^{-1}$	$3 \times 10^{16}$ to $3 \times 10^{18}$	$1.2 \times 10^4$ to $1.2 \times 10^6$
Far ultraviolet rays	200 to 10	$1.5 \times 10^{15}$ to $3 \times 10^{16}$	$6 \times 10^2$ to $1.2 \times 10^4$
Ultraviolet rays	380 to 200	$8 \times 10^{14}$ to $1.5 \times 10^{15}$	$3.2 \times 10^2$ to $6 \times 10^2$
Visible light	780 to 380	$4 \times 10^{14}$ to $8 \times 10^{14}$	$1.6 \times 10^2$ to $3.2 \times 10^2$
Infrared rays	$3 \times 10^4$ to 780	$10^{13}$ to $4 \times 10^{14}$	4 to $1.6 \times 10^2$
Far infrared rays	$3 \times 10^5$ to $3 \times 10^4$	$10^{12}$ to $10^{13}$	0.4 to 4
Microwaves	$3 \times 10^7$ to $3 \times 10^5$	$10^{10}$ to $10^{12}$	$4 \times 10^{-3}$ to 0.4
Radiofrequency (Rf) waves	$10^{11}$ to $3 \times 10^7$	$10^6$ to $10^{10}$	$4 \times 10^{-7}$ to $4 \times 10^{-3}$

# Nukleární Magnetická Rezonance

---

Nedestruktivní metoda vyžadující obvykle několik mg látky. Pro vysoce citlivé přístroje zlomky  $\mu\text{g}$  látky.

Umožňuje měření v plynné, kapalně i pevné fázi.

NMR je téměř nejsilnějším analytickým nástrojem

k řešení struktury organických a bioorganických látek.

Umožňuje stanovit kovalentní, sekundární, terciární i kvartérní strukturu. Umožňuje studovat interakce molekul i biomolekul.

V následujícím textu je zahrnuta řada zjednodušení a aproximací.

# Nukleární Magnetická Rezonance

## Nukleární ( jaderná )

Využívá vlastností jader majících nenulový jaderný spin,  $I \neq 0$ .

Isotopy mající nulový jaderný spin nelze měřit (tzv. NMR inaktivní jádra).

## Magnetická

Vyžaduje silné magnetické pole

( v současnosti 1-24 Tesla; magnetické pole Země je ca.  $45 \mu\text{T}$  )

## Resonance

resonanční podmínka ( Larmorova frekvence )

Absorbce elektromagnetického záření o frekvenci  $10^6$  až  $10^{10}$  Hz

Hodnota je přímo úměrná síle použitého magnetickém pole.

(  $10^{11}$  až  $3 \cdot 10^7$  nm,  $4 \cdot 10^{-7}$  až  $4 \cdot 10^{-3}$  kJ/mol )

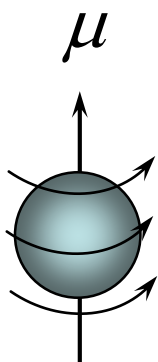
# Nukleární (jaderná)

**Je-li spinové kvantové číslo jádra nenulové,  $I > 0$ , pak lze tyto jádra studovat pomocí NMR.**

Spinové kvantové číslo jádra ( $I$ ) = jaderný spin = spin

Spin je kvantově mechanická vlastnost mnoha fundamentálních částic. Spinem se nazývá neboť se jedná o typ momentu hybnosti a platí pro něj vztahy týkající se momentu hybnosti.

Jádra s nenulovým jaderným spinem mají nenulový magnetický moment

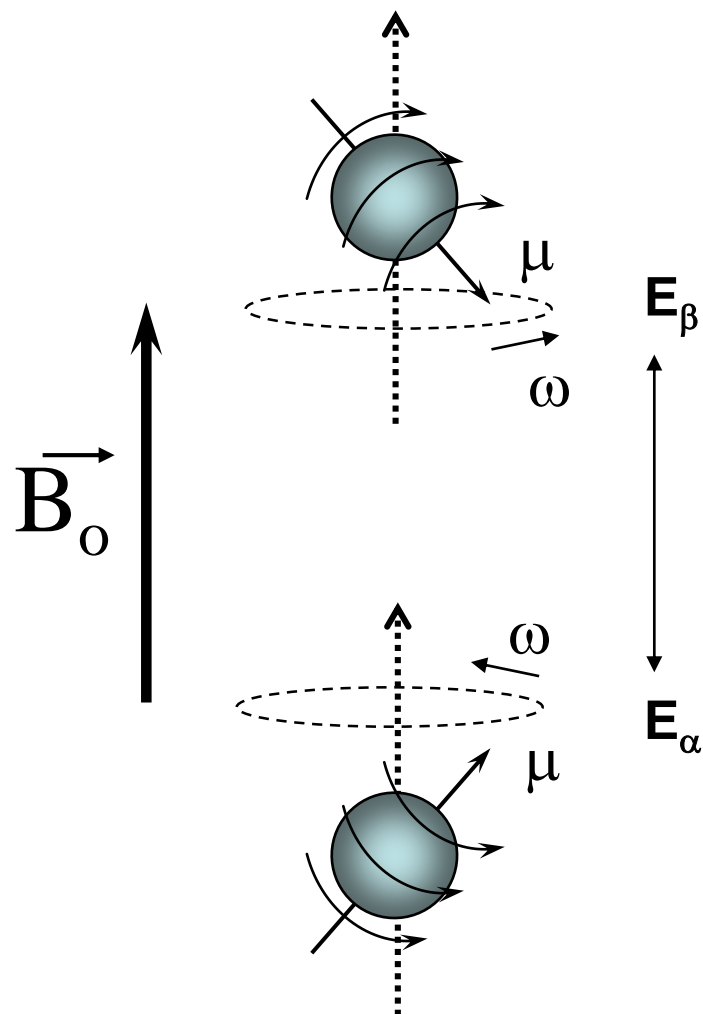


$$\mu = \gamma \sqrt{I(I+1)} h / 2\pi$$

$h = 6,626\ 068\ 96\ (33) \cdot 10^{-34}$  J.s Planckova konstanta

$\gamma$  = gyromagnetický poměr (vlastnost jádra)

# Rezonance



Při stejné orientaci vektorů magnetického pole a magnetického momentu je energie nižší.

Přímá úměra síle magnetického pole i gyromagnetickému poměru.

$$\Delta E = E_{\beta} - E_{\alpha} = \gamma \hbar B_0 \quad [\text{J}]$$

$$\begin{aligned} \Delta E &= h\nu \\ \hbar &= h / 2\pi \end{aligned}$$

$$\omega = \gamma B_0 / 2\pi = \nu$$

$\omega$  - rezonanční frekvence  
[ rad . s<sup>-1</sup> ]

**LARMOROVA FREKVENCE**

$\nu$  - rezonanční frekvence  
[ s<sup>-1</sup> = Hz ]

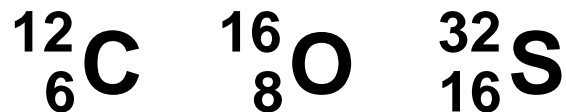
# Měřitelná jádra ( isotopy )

1	1 <u>H</u>																	2 <u>He</u>
2	3 <u>Li</u>	4 <u>Be</u>	<b>Nuclear Spins</b>										5 <u>B</u>	6 <u>C</u>	7 <u>N</u>	8 <u>O</u>	9 <u>F</u>	10 <u>Ne</u>
3	11 <u>Na</u>	12 <u>Mg</u>											13 <u>Al</u>	14 <u>Si</u>	15 <u>P</u>	16 <u>S</u>	17 <u>Cl</u>	18 Ar
4	19 <u>K</u>	20 <u>Ca</u>	21 <u>Sc</u>	22 <u>Ti</u>	23 <u>V</u>	24 <u>Cr</u>	25 <u>Mn</u>	26 <u>Fe</u>	27 <u>Co</u>	28 <u>Ni</u>	29 <u>Cu</u>	30 <u>Zn</u>	31 <u>Ga</u>	32 <u>Ge</u>	33 <u>As</u>	34 <u>Se</u>	35 <u>Br</u>	36 <u>Kr</u>
5	37 <u>Rb</u>	38 <u>Sr</u>	39 <u>Y</u>	40 <u>Zr</u>	41 <u>Nb</u>	42 <u>Mo</u>	43 Tc	44 <u>Ru</u>	45 <u>Rh</u>	46 Pd	47 <u>Ag</u>	48 <u>Cd</u>	49 <u>In</u>	50 <u>Sn</u>	51 <u>Sb</u>	52 <u>Te</u>	53 <u>I</u>	54 <u>Xe</u>
6	55 <u>Cs</u>	56 <u>Ba</u>	* 71 <u>Lu</u>	72 <u>Hf</u>	73 <u>Ta</u>	74 <u>W</u>	75 <u>Re</u>	76 <u>Os</u>	77 <u>Ir</u>	78 <u>Pt</u>	79 <u>Au</u>	80 <u>Hg</u>	81 <u>Tl</u>	82 <u>Pb</u>	83 <u>Bi</u>	84 Po	85 At	86 Rn
7	87 Fr	88 Ra	** 103 Lr	104 Unq	105 Unp	106 Unh	107 Uns	108 Uno	109 Mt	110 Uun	111 Uuu	112 Uub	113 Uut	114 Uuq	115 Uup	116 Uuh	117 Uus	118 Uuo
<b>*Lanthanides</b>			* 57 <u>La</u>	58 Ce	59 <u>Pr</u>	60 <u>Nd</u>	61 Pm	62 <u>Sm</u>	63 <u>Eu</u>	64 <u>Gd</u>	65 <u>Tb</u>	66 <u>Dy</u>	67 <u>Ho</u>	68 <u>Er</u>	69 <u>Tm</u>	70 <u>Yb</u>		
<b>**Actinides</b>			** 89 Ac	90 Th	91 Pa	92 <u>U</u>	93 Np	94 Pu	95 Am	96 Cm	97 Bk	98 Cf	99 Es	100 Fm	101 Md	102 No		

omezíme se na základy  $^1\text{H}$  NMR a  $^{13}\text{C}$  NMR spekter

# Měřitelná jádra ( isotopy )

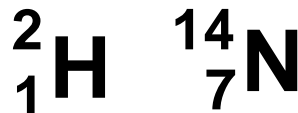
Je-li hmotnostní i protonové číslo jádra  
sudé je jaderný spin nulový.



Je-li hmotnostní číslo liché je  
Jaderný spin poločíselný.



Je-li hmotnostní číslo sudé a protonové  
číslo liché je spin celočíselný.





# Varian Mercury Plus 300 MHz 7,05 Tesla

R2D2 type ;-)



# NMR přístroj s nejvyšším polem v ČR



**CEITEC Brno**

**Národní NMR centrum Josefa Dadoka**



## Národní NMR centrum Josefa Dadoka

**950 MHz** NMR spektrometr Bruker Avance III HD pro spektroskopii vysokého rozlišení v kapalinách, **4 RF kanály**, 5 mm **trojrezonanční** (1H-13C-15N) **inverzní kryosonda** s chlazenými předzesilovači (1H, 13C), rozsah teplot vzorku -40 oC až 80 oC.

**850 MHz** NMR spektrometr Bruker Avance III HD pro spektroskopii vysokého rozlišení v kapalinách, **4 RF kanály**, 5 mm **trojrezonanční** (1H/19F-13C-15N) **inverzní kryosonda** s chlazenými předzesilovači (1H, 13C), rozsah teplot vzorku 0 oC až 135 oC.

**700 MHz** NMR spektrometr Bruker Avance III HD pro měření spekter biomolekul, 4 RF kanály, 5 mm **trojrezonanční** (1H-13C-15N) **inverzní kryosonda** optimalizovaná pro 13C detekci s chlazenými předzesilovači (1H, 13C, 15N), rozsah teplot vzorku -40 oC až 80 oC.

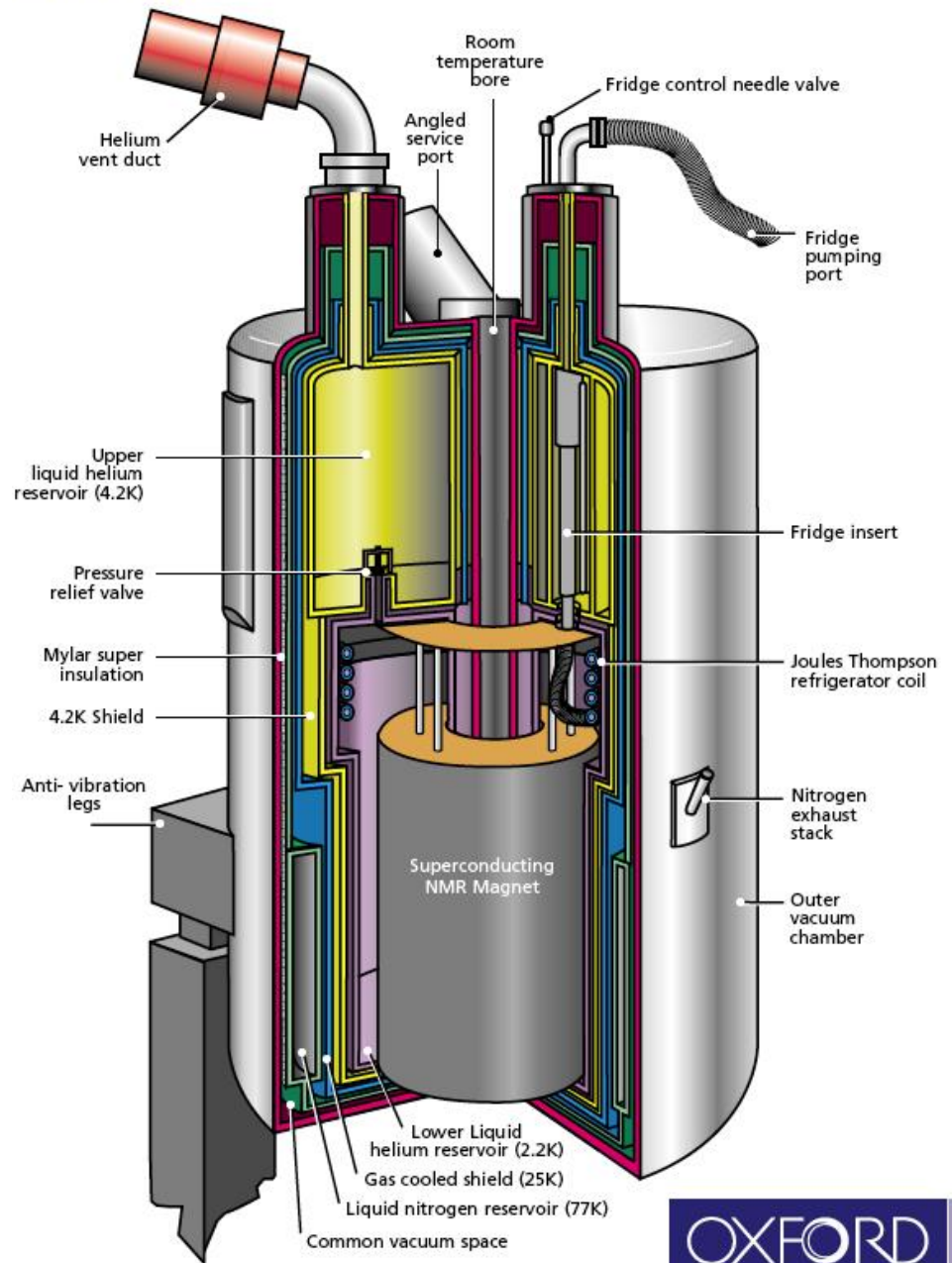
**700 MHz** NMR spektrometr Bruker Avance III HD pro měření vzorků v kapalinách a pevné fázi, **4 RF kanály**, vybavený 5 mm **duální** širokopásmovou sondou, 5 mm **duální** inverzní širokopásmovou sondou, 1,7 mm **trojrezonanční** (1H-13C-15N) sondou, 3,2 mm **trojrezonanční** (1H-13C-15N) **MAS sondou** pro měření vzorků v pevné fázi a 4 mm duální CP/MAS sondou pro měření vzorků v pevné fázi.

**600 MHz** NMR spektrometr Bruker Avance III HD pro spektroskopii vysokého rozlišení v kapalinách, **5 RF kanálů**, 5 mm **čtyřrezonanční** (1H-13C-15N-31P) inverzní **kryosonda** s chlazenými předzesilovači (1H, 13C), rozsah teplot vzorku -40 oC až 80 oC.

**500 MHz** NMR spektrometr Bruker Avance pro měření vzorků v kapalinách a pevné fázi, **3 RF kanály**, vybavený 5 mm **duální** (BB-1H) **kryosondou** chlazenou dusíkem (Prodigy), 5 mm **trojrezonanční** (1H-13C-15N) sondou, 10 mm duální (1H-13C) sondou a 4 mm duální (BB-1H) **CP/MAS sondou** na měření vzorků v pevné fázi.

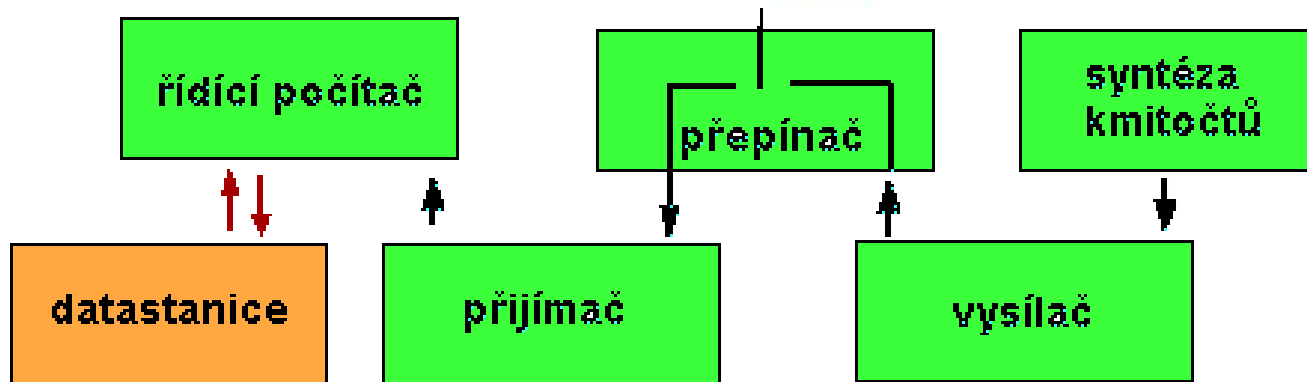
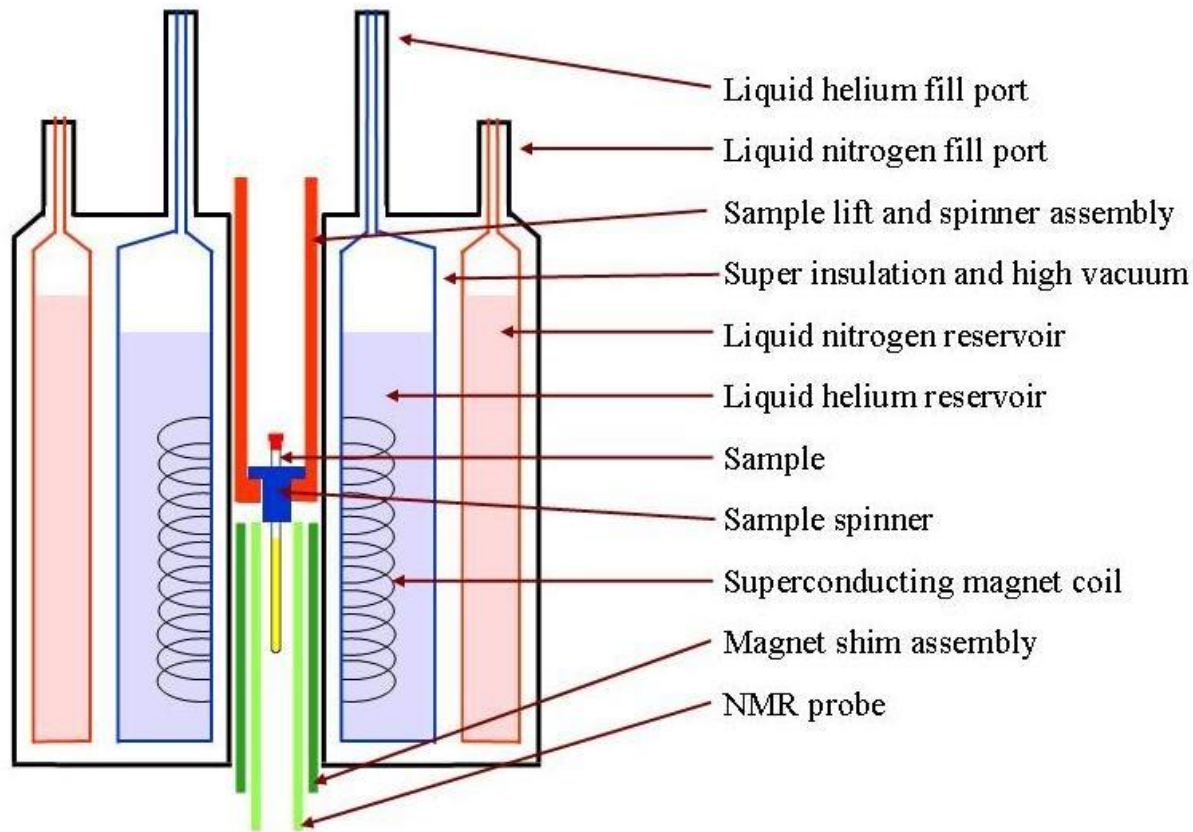
# Varian Mercury Plus 300 MHz 7,05 Tesla

# 800MHz 2.2K NMR Cryostat Schematic



**pomocná zařízení**

- ovládání rotace vzorku
- manipulace se vzorkem
- stabilizace teploty
- ovládání homogenity pole



Bod varu dusíku -195,795 °C (77,355 K)

Bod varu helia -268,928 °C ( 4,222 K)

**23,5 Tesla**

**BRUKER**  
**1000**  
*UltraStabilized™*

**523000-krát silnější pole  
než magnetické pole Země**

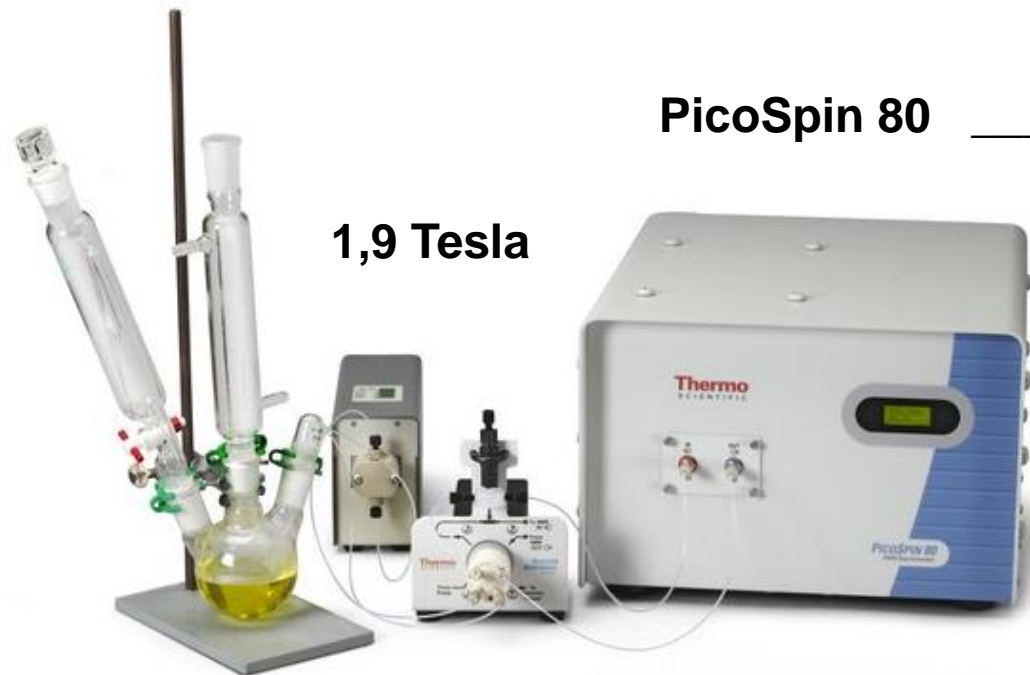
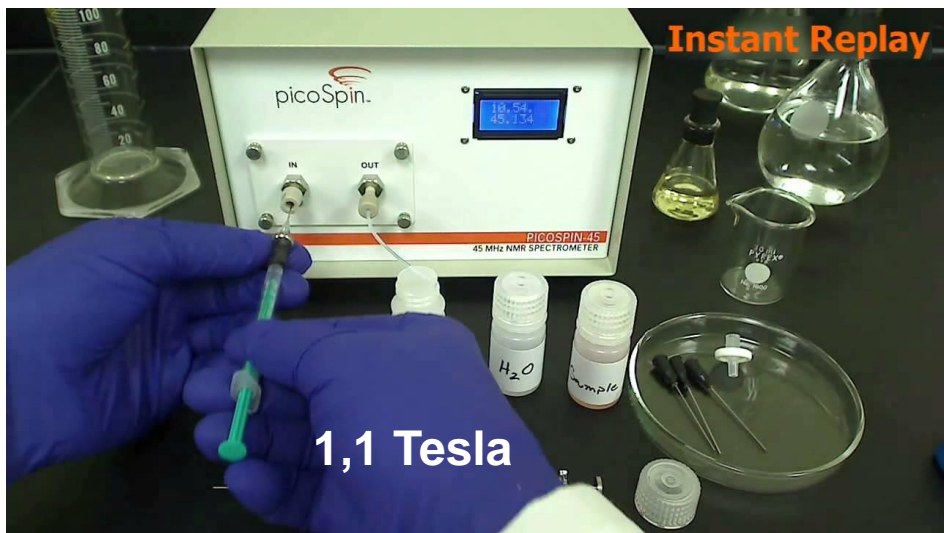
**11,76  
Tesla**

**JEOL  
ECZ  
500R**

**ÚACH  
VŠCHT  
Praha**

**261000-krát silnější pole  
než magnetické pole Země**

# Stolní NMR přístroje s permanentními magnety (Benchtop NMR)



---

Larmor frequency	<b>82 MHz (1,9 T)</b>
Nucleus	$^1\text{H}$
Resolution	20 ppb
<b>Magnet type</b>	<b>PERMANENT</b>
Capillary	40 $\mu\text{L}$
Weight	19,5 kg
Dimensions	43 x 35 x 25 cm

## Varian A-60 vs. NMReady-60





# Achievement of 1020 MHz NMR (24.0 T)

*Journal of Magnetic Resonance*, 2015; 256: 30.

DOI: [10.1016/j.jmr.2015.04.009](https://doi.org/10.1016/j.jmr.2015.04.009)



Výška 5 m  
Váha 15 tun  
Cena 350 mil. Kč

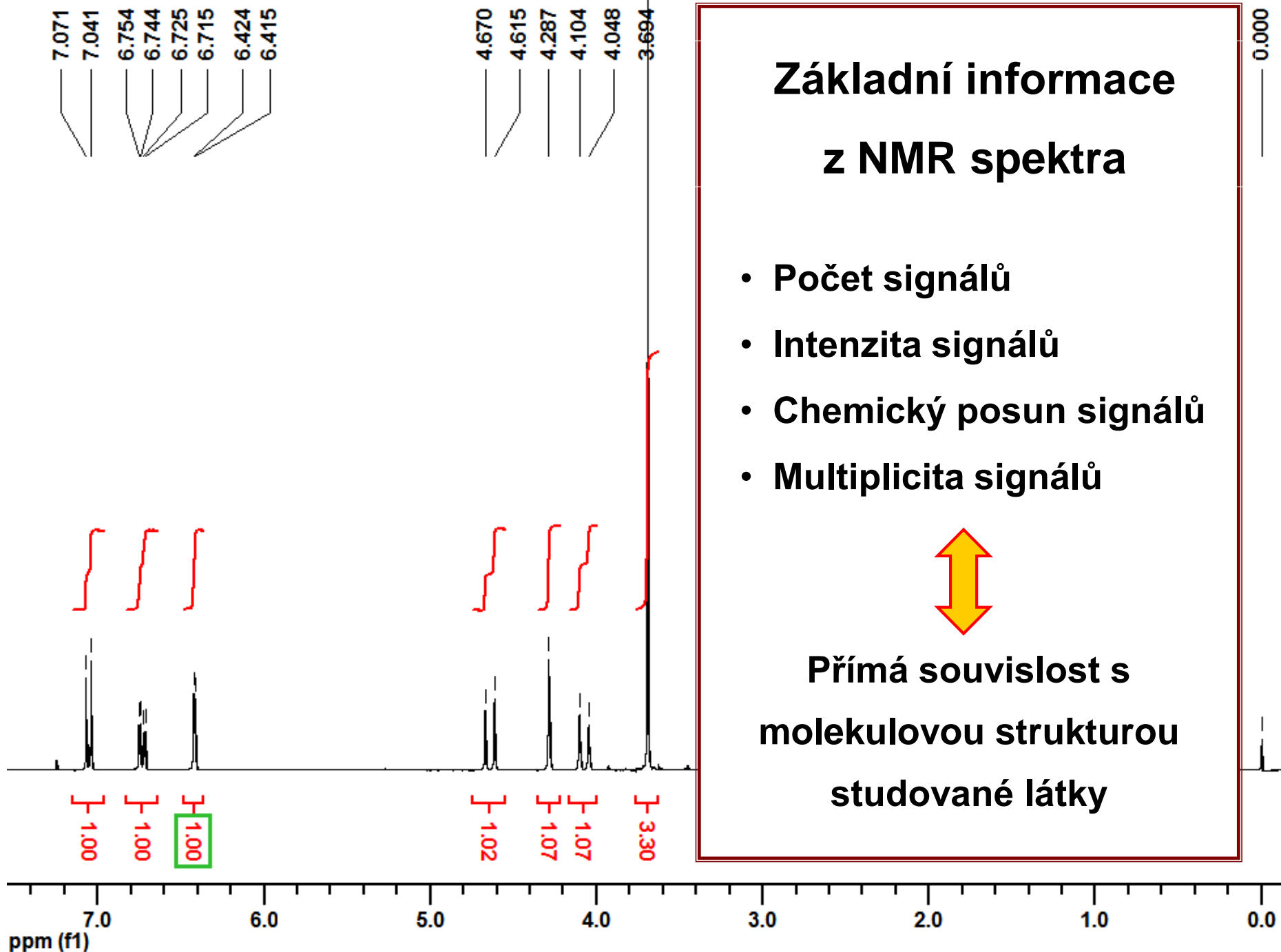
Výška 0,4 m  
Váha 0,0725 tun  
Cena 0,35 mil. Kč



## Specifications

- Nuclei:  $^1\text{H}$ ,  $^{19}\text{F}$ ,  $^{13}\text{C}$  (Other Nuclei Available)
- Operating frequency: 80 MHz ( $^1\text{H}$ )
- $^1\text{H}$  50% Linewidth: < 0.5 Hz
- $^1\text{H}$  0.55% Linewidth: < 20 Hz
- $^1\text{H}$  Sensitivity (dual channel): >200:1 for 1% Ethyl Benzene
- Operating Temperature Range: 20° C to 25° C (68° F to 77° F)
- Dimensions: 58 x 43 x 40 cm (23" x 17" x 16")
- Weight: 72.5 kg (160 lb)
- Stray Field: < 2 G all around system
- Voltage Requirement: 100-240 VAC, 50/60 Hz

Proton	Fluorine	Carbon
1D	1D	1D
Paramagnetic	Paramagnetic	DEPT
2D COSY	2D F - COSY	HETCOR
2D TOCSY	2D F - JRES	HMBC
2D JRES	2D FH - COSY	HMQC
$T_1$ , $T_2$	Reaction Monitoring	HSQC
Reaction Monitoring		HSQC-ME



## Základní informace z NMR spektra

- Počet signálů
- Intenzita signálů
- Chemický posun signálů
- Multiplicita signálů



Přímá souvislost s  
molekulovou strukturou  
studované látky

# Základní informace z NMR spektra čisté látky

- **Počet signálů**

odpovídá počtu chemicky neekvivalentních jader v molekule  
( omezíme na spektra látek při „vyšší teplotě“ )

- **Intenzita signálů**

vypovídá o množství daných jader v molekule  
( omezíme na spektra měřená za obvyklých „servisních“ podmínek )

- **Chemický posun signálů**

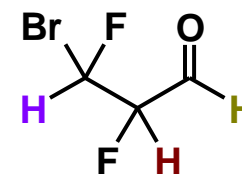
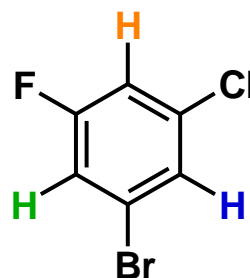
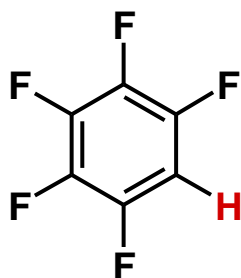
vypovídá o chemickém okolí jader daného signálu  
( omezíme na běžná jádra a běžné organické látky )

- **Multiplicita signálů**

vypovídá o přítomnosti jader s nenulovým magnetickým spinem (v molekule)  
( omezíme na jádra s  $I = \frac{1}{2}$ , a na spektra prvního řádu )

# Počet signálů v NMR spektru

Počet signálů v NMR spektru čisté látky odpovídá počtu *chemicky neekvivalentních* jader, tedy jader s různým *chemickým okolím*.



---

$^1\text{H}$ NMR	1	3	3
$^{13}\text{C}$ NMR	4	6	3
$^{19}\text{F}$ NMR	3	1	2

*Chemicky ekvivalentní* (neboli *Homotopní*) jádra jsou taková, která jsou v důsledku symetrie nerozlišitelná, mají stejné *chemické okolí*.

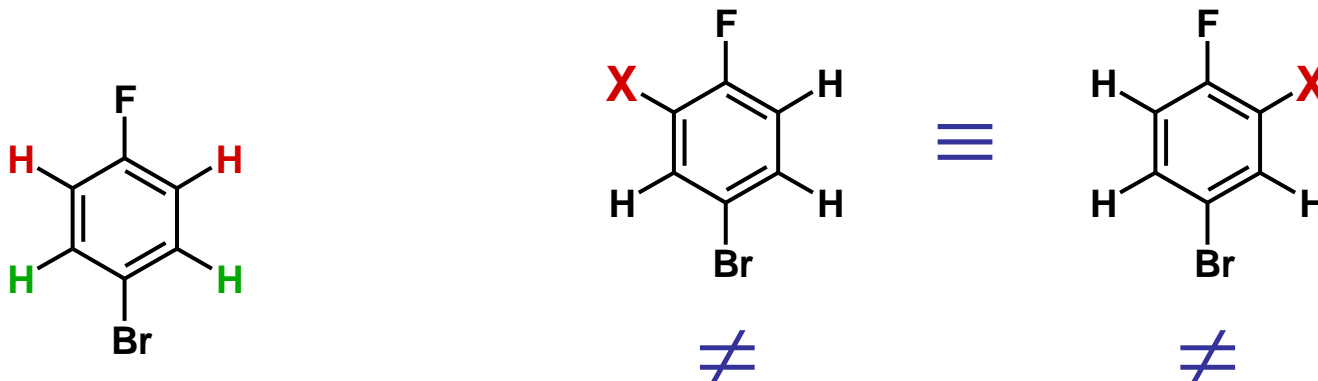
➔ **Počet signálů vypovídá o symetrii molekuly studované látky**

# Počet signálů v NMR spektru

**Chemicky ekvivalentní** ( neboli **Homotopní** ) jádra jsou taková, která jsou v důsledku symetrie nerozlišitelná, mají stejné **chemické okolí**.

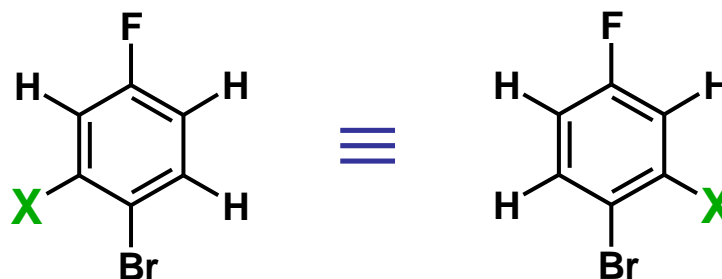
Pro **chemicky ekvivalentní** jádra platí „**substituční test**“ :

→ Záměnou jednoho za X vzniká stejná látka jako záměnou druhého za X.



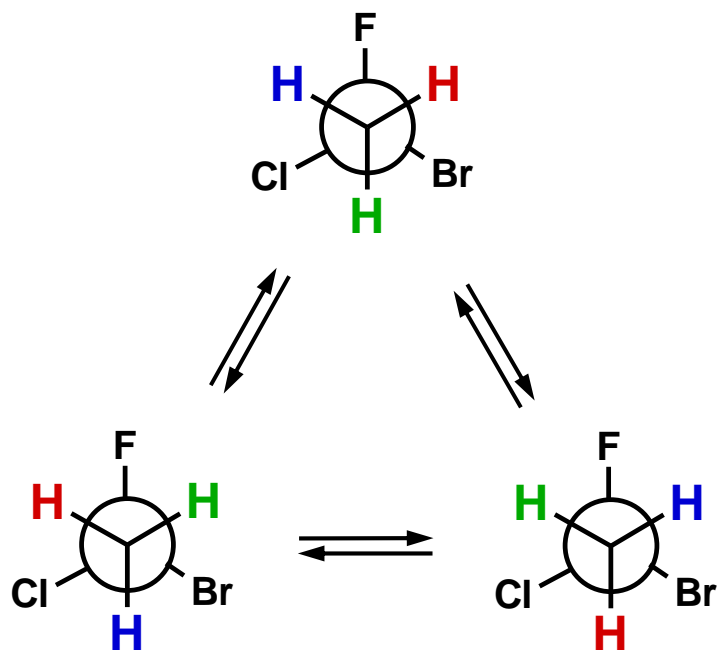
2 signály v  $^1\text{H}$  NMR

4 signály v  $^{13}\text{C}$  NMR



# Počet signálů v NMR spektru

Za **chemicky ekvivalentní** lze považovat i jádra, která jsou ekvivalentní v důsledku **rychlé** rotace skupiny nebo jiné rychlé **chemické výměny**.



Byla-li by rotace velmi **pomalá**,  
vodíky by byly neekvivalentní.

Měření NMR spektra trvá ca.  $10^{-1}$  až  $10^1$  s

➔ Pro rychlé procesy je pozorována  
jejich průměrná hodnota.

Methyl se otočí mnohotisíckrát za sekundu.

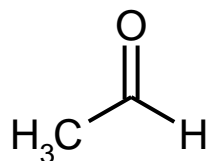
➔ Vodíky methyly jsou ekvivalentní.

Obecně jsou rotace kolem jednoduché  
vazby rychlé a vedou k ekvivalenci  
jader rotujících skupin.

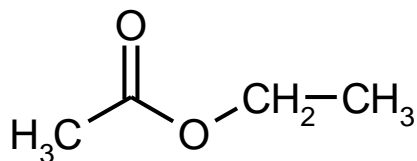
Pokud nejsou neekvivalentní z jiného  
důvodu !!!

# Počet signálů v NMR spektru

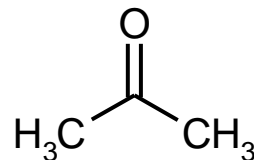
Uvažujte volnou rychlou rotaci kolem jednoduchých vazeb.



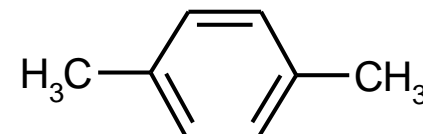
$^1\text{H}$ : 2  
 $^{13}\text{C}$ : 2



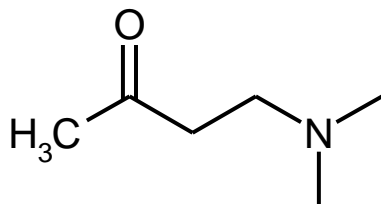
3  
4



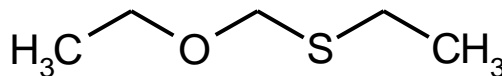
1  
2



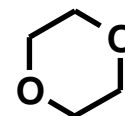
2  
3



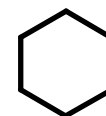
$^1\text{H}$ : 4  
 $^{13}\text{C}$ : 5



5  
5



1  
1



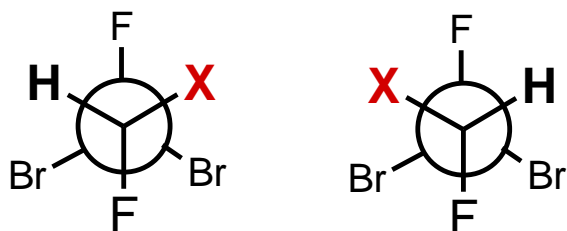
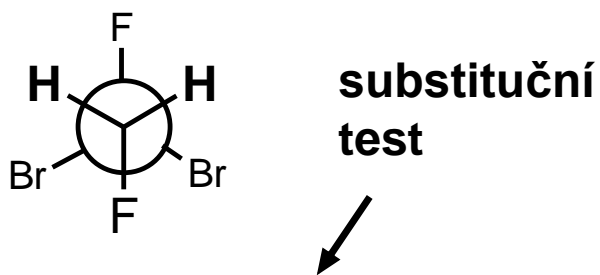
1  
1

# Počet signálů v NMR spektru

NMR není chiroptickou metodou

→ **Standardním měřením nelze rozlišit enantiomery.**

!!!! **Chiralita má však zásadní dopad na NMR spektra.**



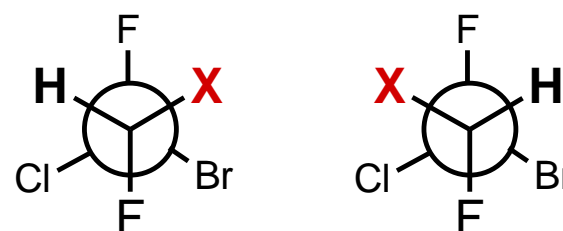
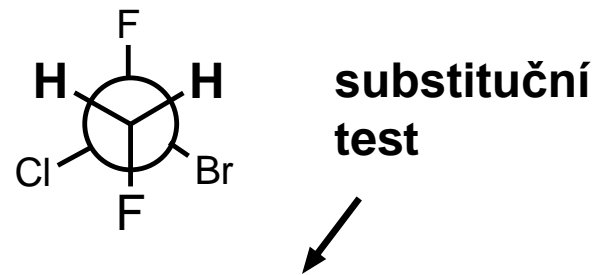
**Enantiomery**

jsou nerozlišitelné

vodíky jsou ekvivalentní

jeden signál v  $^1\text{H}$  NMR

***Enantiotopní jádra***



**Diastereomery**

jsou rozlišitelné

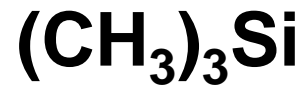
vodíky jsou neekvivalentní

dva signály v  $^1\text{H}$  NMR

***Diastereotopní jádra***



# Rezonanční frekvence signálů v NMR spektru



Rezonanční frekvence tetramethylsilanu ( TMS , standard pro  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  i  $^{29}\text{Si}$  NMR )

$B_0$ [ T ] Tesla	$^1\text{H}$ jádra [ MHz ]	$^{13}\text{C}$ jádra [ MHz ]	$^{29}\text{Si}$ jádra [ MHz ]
1,41	60,0	15,1	11,9
7,05	300,1	75,5	59,6
9,4	400,1	100,6	79,5
11,75	500,1	125,8	99,4
14,1	600,1	150,9	119,2
18,8	800,1	201,2	159,0
23,5	1000,1	251,5	198,7

- ➔ Silnější magnetické pole = vyšší rezonanční frekvence
- ➔ Na každém přístroji absorbují stejná jádra při jiné frekvenci
- ➔ Pro přenositelnost nutno využít referenční látky (standardu)

# Chemický posun signálů v NMR spektru

Chemický posun signálu  $\delta$  je **bezrozměrné číslo**, tj. **nezávislé na síle použitého magnetického pole**. Vzhledem k jeho obvyklé velikosti  $10^{-6}$  až  $10^{-4}$  udáváme jeho hodnotu v **ppm**.

$$\delta_x = 10^6 * (\nu_x - \nu_{ref}) / \nu_{ref}$$

chemický posun signálu  $x$

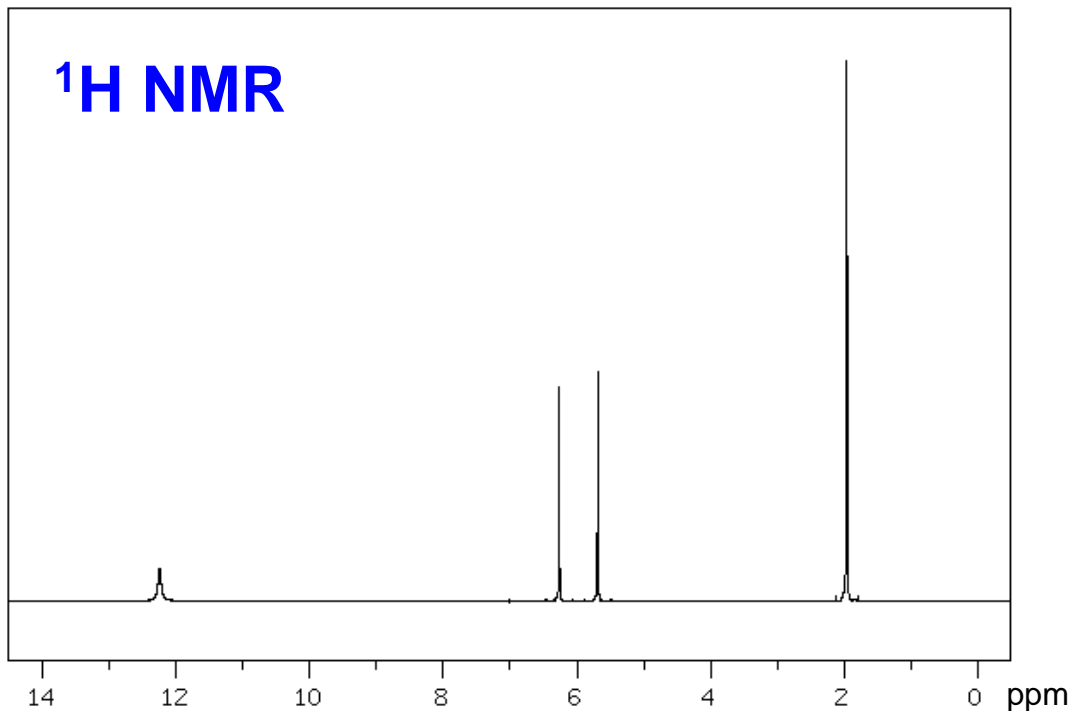
faktor pro přepočet na **ppm**

resonanční frekvence signálu  $x$

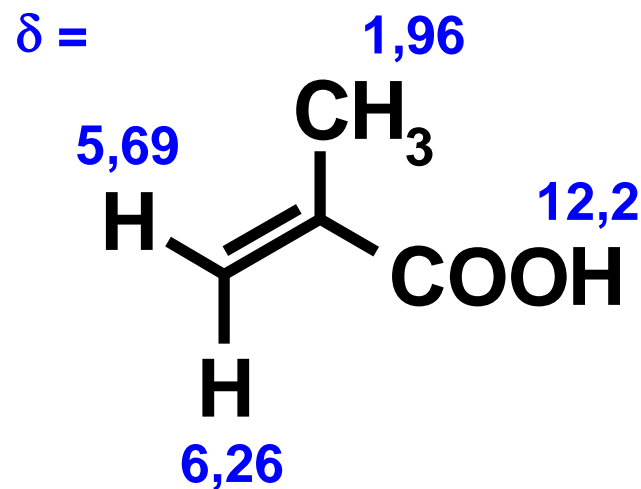
resonanční frekvence referenční látky (standardu)

blízká s tzv. pracovní frekvencí přístroje

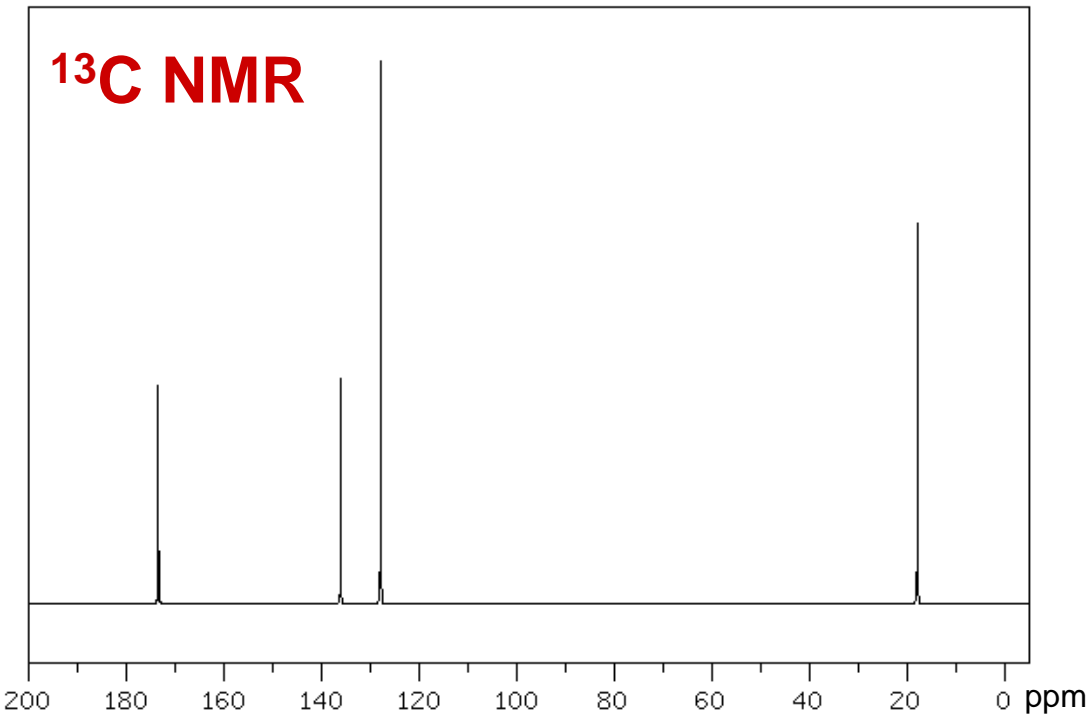
# <sup>1</sup>H NMR



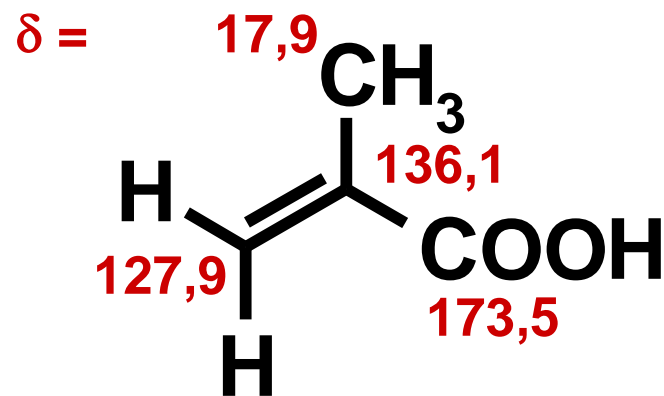
# Chemické posuny <sup>1</sup>H v ppm



# <sup>13</sup>C NMR



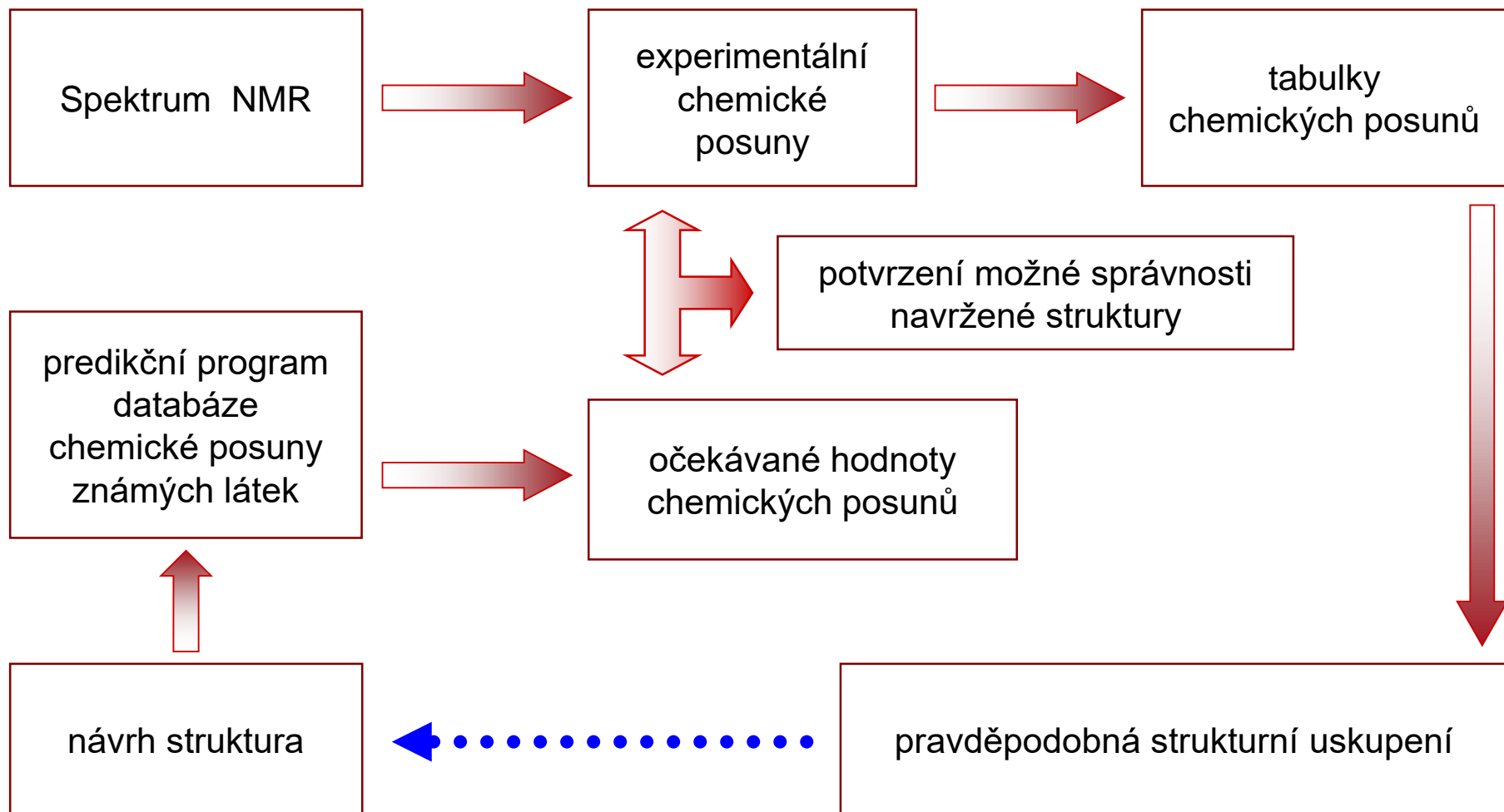
# Chemické posuny <sup>13</sup>C v ppm



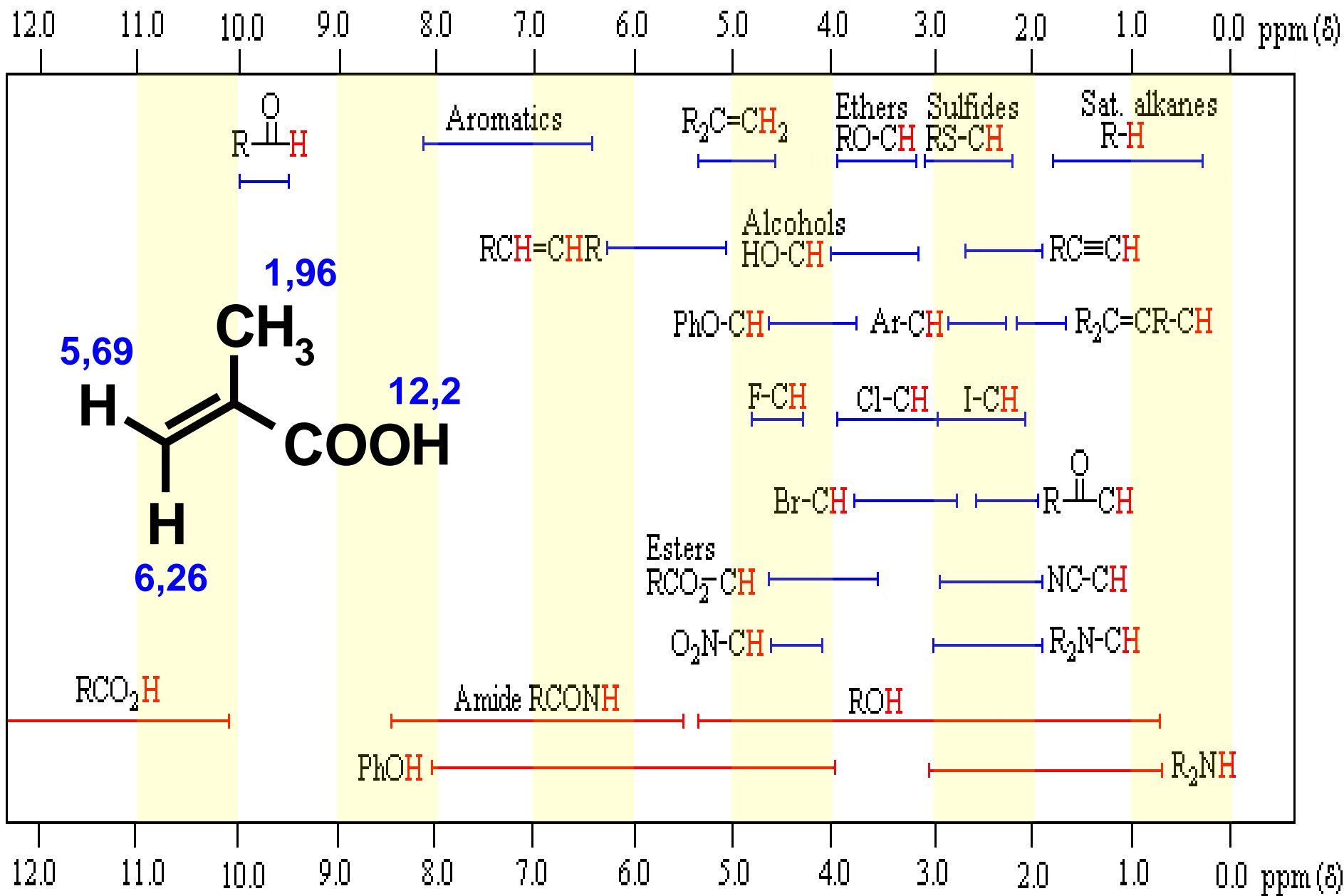
# Chemický posun signálů v NMR spektru

Hodnota chemického posunu odráží chemické okolí atomů (stínění).

Z rozsáhlých tabulek těchto hodnot lze usuzovat na možné strukturální fragmenty neznámé látky, nebo odhadnout (predikce) chemické posuny pro známou strukturu.



# Chemické posuny v $^1\text{H}$ NMR spektrech





# Intenzita signálu

---

Integrální intenzita signálu je úměrná počtu chemicky ekvivalentních jader daného izotopu.

Při standardním měření lze integrálních intenzit využít při analýze  $^1\text{H}$  i  $^{19}\text{F}$  NMR spekter, nikoli u  $^{13}\text{C}$  NMR spekter.

Poměr integrálních intenzit signálů odpovídá poměru počtu ekvivalentních jader v molekule.

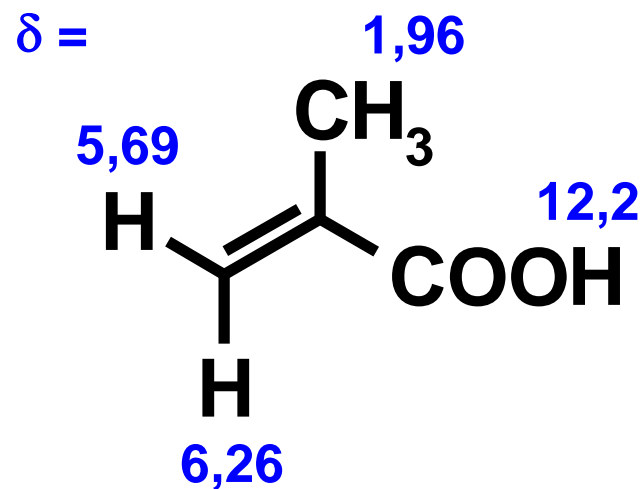
# $^1\text{H}$ NMR

integrální vlna (výška)

integrální normalizovaná hodnota (plocha)

14 12 10 8 6 4 2 0 ppm

# Chemické posuny $^1\text{H}$ v ppm



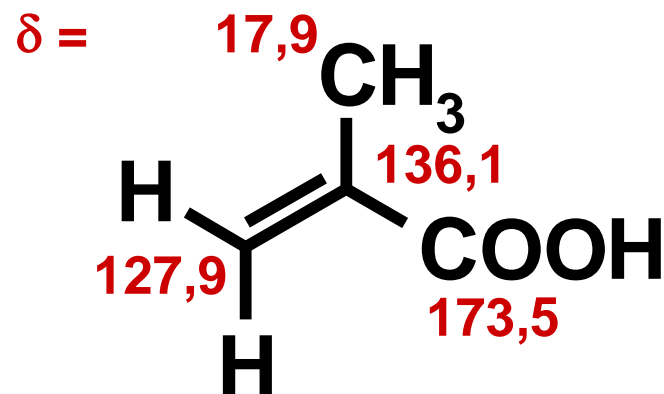
# $^{13}\text{C}$ NMR

numerická integrace

402 414 1000 701

200 180 160 140 120 100 80 60 40 20 0 ppm

# Chemické posuny $^{13}\text{C}$ v ppm





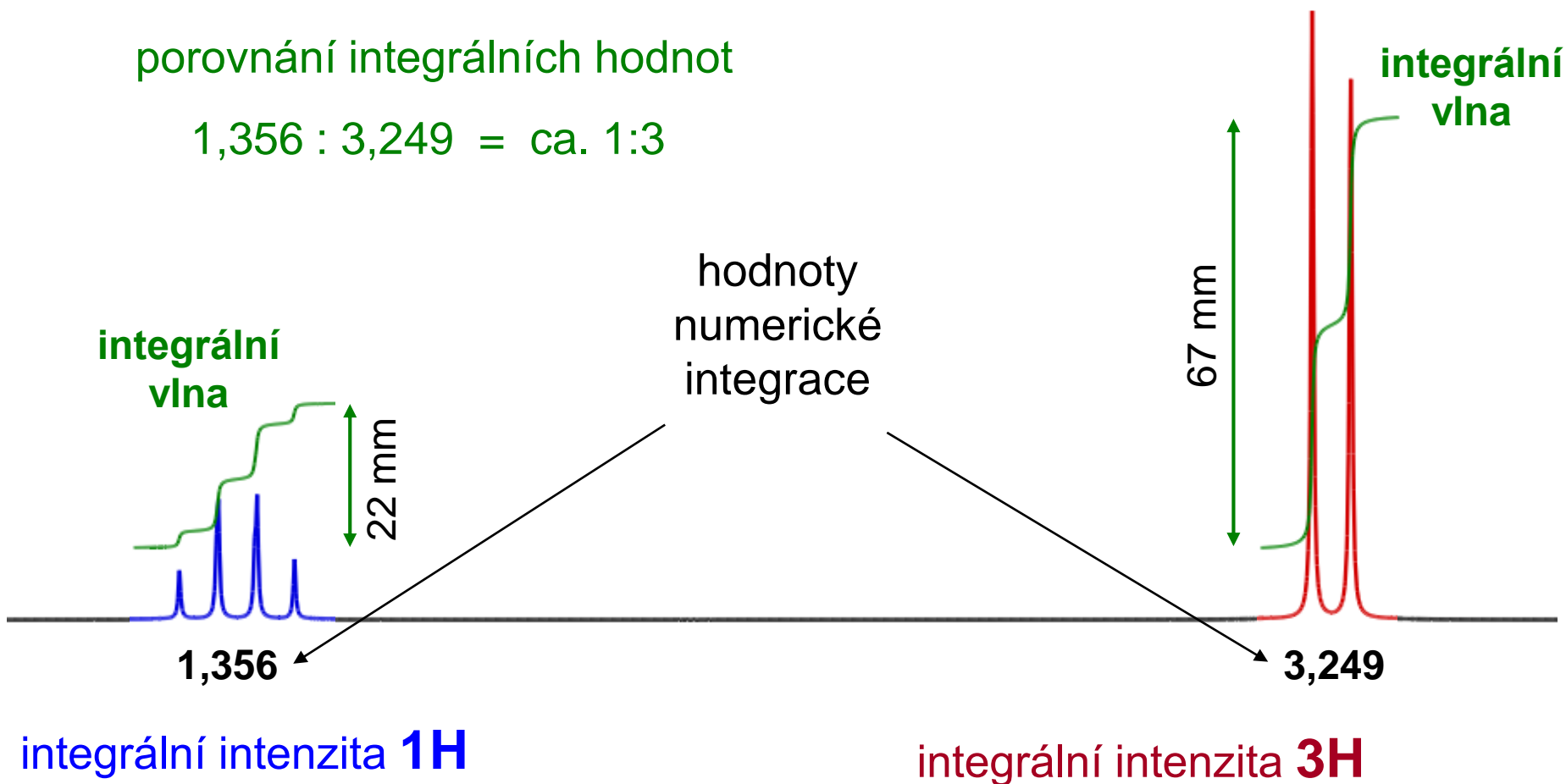
# Intenzita signálu v NMR spektru

porovnání výšky integrální vlny

$$22 : 67 = \text{ca. } 1:3$$

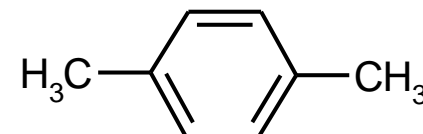
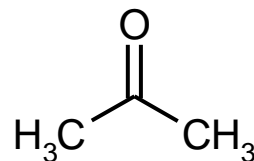
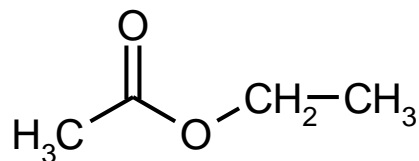
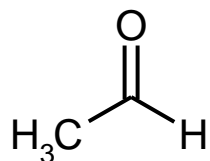
porovnání integrálních hodnot

$$1,356 : 3,249 = \text{ca. } 1:3$$



# Počet a integrální intenzita signálů v NMR spektru

Uvažujte volnou rychlou rotaci kolem jednoduchých vazeb.

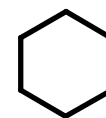
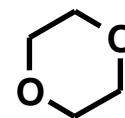
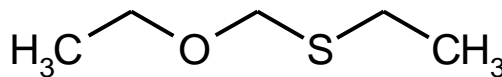
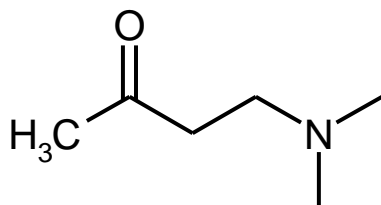


$^{13}\text{C}$ : 2  
 $^1\text{H}$ : 2 3:1

4  
3 3:2:3

2  
1

3  
2 3:2



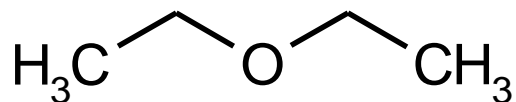
$^1\text{H}$ : 4 3:2:2:6  
 $^{13}\text{C}$ : 5

5 3:2:2:2:3  
5

1  
1

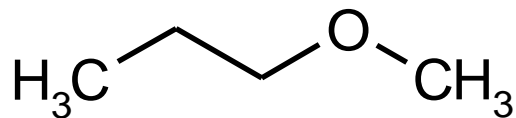
1  
1

# Počet signálů



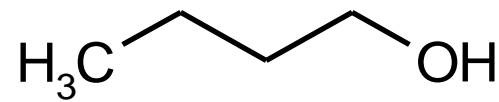
$^1\text{H}$ : 2 (3:2)

$^{13}\text{C}$ : 2



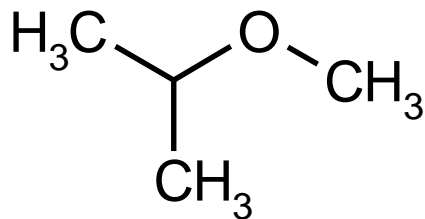
$^1\text{H}$ : 4 (3:2:2:3)

$^{13}\text{C}$ : 4



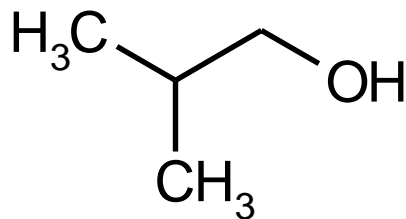
$^1\text{H}$ : 5 (3:2:2:2:1)

$^{13}\text{C}$ : 4



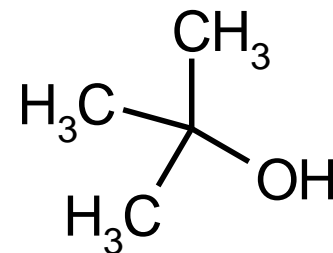
$^1\text{H}$ : 3 (6:1:3)

$^{13}\text{C}$ : 3



$^1\text{H}$ : 4 (6:1:2:1)

$^{13}\text{C}$ : 3



$^1\text{H}$ : 2 (9:1)

$^{13}\text{C}$ : 2

Tyto konstituční isomery lze snadno rozlišit pomocí NMR nikoli ze spekter IČ, Raman či MS.