

VYUŽITÍ POKROČILÝCH METOD NMR SPEKTROSKOPIE PRO STUDIUM STRUKTURY A VLASTNOSTÍ MALÝCH MOLEKUL

Autorka je laureátkou Prémie Otto Wichterleho za rok 2021. Článek vznikl na pozvání šéfredaktora při příležitosti udělení této ceny.

ELIŠKA PROCHÁZKOVÁ

*Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Flemingovo náměstí 2, 160 00 Praha 6
prochazkova@uochb.cas.cz*

Došlo 18.2.22, přijato 11.5.22.

Klíčová slova: ^{31}P NMR, fotopřepínače, konformační analýza, NMR spektroskopie, polymorfismus, stereochemie

• <https://doi.org/10.54779/chl20220395>

Obsah

1. Úvod
2. NMR spektroskopie *in situ* ozařováním
 - 2.1. Strukturní a kinetická informace
 - 2.2. Ozařování při nízkých teplotách
 - 2.3. Sledování velmi rychlých fotochemických reakcí
3. ^{31}P NMR spektroskopie
 - 3.1. Rozlišení hydrolyzy vs. self-imolace – detekce cyklického intermediátu pomocí ^{31}P NMR spekter
 - 3.2. ^{31}P NMR spektra jako sonda pro pozorování enzymové reakce v reálném čase
 - 3.3. Stereochemická analýza využívající ^{31}P NMR parametry
4. NMR spektroskopie v pevné fázi
 - 4.1. Polymorfni přeměna indukovaná enkapsulací do glykopolymerních váčků
 - 4.2. Fotopřepínání azopyrimidinových sloučenin v pevné fázi
5. Závěr

Úvod

Spektroskopie nukleární magnetické rezonance (NMR spektroskopie) je jednou z nejvýznamnějších analytických metod používaných pro studium chemické struktury látek. Princip metody je založen na využití vlastností magneticky aktivních jader, tedy těch, které mají nenulový jaderný spin a chovají se tak jako magnetické dipóly. Vektory magnetického momentu jádra se orientují paralelně či antiparalelně vůči externímu magnetickému poli a zároveň vykonávají precesní pohyb s kruhovou frekvencí, tzv. Larmorovou precesní frekvencí. Mírný přebytek spinů s paralelní orientací lze pozorovat jako makroskopickou magnetizaci, se kterou lze manipulovat pomocí radiofrek-

venčních pulzů uspořádaných do tzv. pulzních sekvencí¹. NMR spektra se měří pro daný typ jader, např. ^1H nebo ^{13}C , která jsou v organické chemii nejběžnější. V molekulách jsou atomová jádra stíněná elektrony, které determinují jejich okolí. Ovlivnění jader elektrony se zrcadlí v hodnotě chemického posunu – tedy poloze NMR signálu ve spektru. To společně s dalšími NMR parametry poskytuje klíčovou strukturní informaci, jak konektivitu atomů, tak i jejich prostorové uspořádání.

Pro systémy obsahující strukturně podobné fragmenty se obvykle měří dvoudimenzionální (2D) spektra², ve kterých jednotlivé krosníky představují interakci těch jader, které spolu mají nepřímou spin-spinovou interakci přes chemické vazby, jejíž velikost vyjadřuje interakční konstanta J (J -coupling). Jako příklad lze uvést homonukleární ^1H - ^1H korelace (COSY spektrum) nebo heteronukleární ^1H - ^{13}C korelace (HSQC, HMBC spektra). J -coupling je navíc úzce spjat s dihedrálním úhlem mezi interagujícími jádry, jak popisují Karplusovy křivky, čehož lze využít při studiu stereochemie (konformace/konfigurace)³. Dalším poměrně běžně používaným typem spektra je ^1H - ^1H NOESY/ROESY, které je založené na nukleárním Overhauserově efektu (NOE)⁴. Tato spektra poskytují krosníky v případech interakce jader přes prostor (cca do 500 pm).

Využití NMR spektroskopie v organické chemii se neomezuje jen na jádra ^1H a ^{13}C , ale často se měří i další jádra přítomná v molekule, jako např. ^{11}B , ^{15}N , ^{19}F , ^{31}P (cit.⁵). Tato jádra mají stejně jako ^1H a ^{13}C specifické chemické posuny pro dané funkční skupiny a interagují se sousedními magneticky aktivními jádry (např. izotopy ^1H a ^{13}C). Příslušné interakční konstanty tak poskytují klíčovou strukturní informaci. Tato jádra lze také využít pro



RNDr. Eliška Procházková, Ph.D. je absolventkou Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze. Již od střední školy spolupracovala s prof. Antonínem Holým. Jako postdoktorandka sbírala zkušenosti v Německu, Austrálii a Japonsku. V současné době působí jako vědecká pracovníce v oddělení NMR spektroskopie na Ústavu organické chemie a biochemie Akademie věd ČR. Od roku 2020 je školitelkou doktorského studijního programu Fyzikální chemie na PŘF UK. Publikovala 46 prací v odborných časopisech. Autorka získala v roce 2021 Prémii Otto Wichterleho v oblasti věd o živé přírodě a chemických věd.

studium reaktivity/kinetiky přeměn látek, protože jsou jejich spektra jednodušší na interpretaci oproti ^1H a zároveň citlivější než ^{13}C .

Cílem tohoto referátu je představit zajímavé aplikace pokročilých metod NMR spektroskopie, které byly nezbytné pro popis struktury a fyzikálně-chemických vlastností studovaných systémů, ať už v kapalně či pevné fázi. Experimentální NMR data lze často vhodně doplnit kvantově-chemickými výpočty.

V následujících kapitolách bude představeno několik vybraných příkladů využití NMR spektroskopie pro řešení strukturních a syntetických problémů nebo studium fyzikálně-chemických vlastností molekulárních systémů, kterými jsme se zabývali v průběhu posledních 7 let.

2. NMR spektroskopie s *in situ* ozařováním

NMR spektroskopie kombinovaná se zdrojem UV/Vis záření^{6,7} je unikátním zařízením vhodným pro studium fotochemických reakcí, ať už reverzibilních izomerací či ireverzibilních fotoaktivací⁸. Jako zdroje záření byly použity LED lampy, které pokrývají část UV a celé viditelné spektrum o vlnových délkách 365, 405, 470, 505 a 660 nm. Toto portfolio je možné rozšířit dle specifických požadavků studovaného systému. Světlo je vedeno optickým vláknem přímo do NMR kvety umístěné uvnitř NMR spektrometru (obr. 1A). Toto zapojení má hned několik výhod: 1) není nutné pořizovat speciální NMR sondy a zdroj záření, je možné použít v jakémkoli spektrometru (i elektronové paramagnetické rezonance⁹, obr. 1B); 2) LED lampa nevyžaduje žádná bezpečnostní opatření, jako je tomu např. u laserů; 3) kontinuálním ozařováním lze většinou akumulovat dostatečně vysokou koncentraci metastabilního produktu a měřit tak i časově náročnější NMR spektra, např. ^{13}C nebo dvoudimenzionální (2D); 4) jednotlivé LED lampy (vlnové délky) se dají jednoduše měnit, aniž by se muselo manipulovat se vzorkem uvnitř spektrometru, což významně minimalizuje experimentální chyby. Tato metoda byla implementována na mateřském pracovišti (ÚOCHB) v roce 2017 (po návratu z první postdoktorátské stáže autorky, TU Darmstadt, Německo).

V následujících kapitolách budou uvedeny tři příklady, ve kterých NMR s *in situ* ozařováním sehrála důležitou roli a poskytla tak klíčové strukturní a kinetické informace.

2.1. Strukturní a kinetická informace

Unikátní kombinace NMR spektroskopie a *in situ* ozařování vzorku je vhodná zejména pro studium fotochemických přeměn. Výhodou oproti optickým metodám je to, že lze průběžně kontrolovat strukturu intermediátů a produktů a odhalit tak včas případné bočné reakce (rozkladné reakce), které by komplikovaly stanovení kinetických parametrů. Dále umožňuje stanovení koncentrace jednotlivých forem i v případě, že se jejich absorpční pásy překrývají. Reakce mohou být monitorovány pomocí měření NMR parametrů různých NMR aktivních jader přítomných v molekule. Nejčastěji se využívá ^1H NMR spekter, která se měří zpravidla kvantitativně a signály pak lze integrovat. Je možné použít i další jádra, jako např. ^{13}C , ^{19}F či ^{31}P . Příkladem využití ^1H spekter snímaných během kontinuálního ozařování UV zářením může být fotopřepínání azopyrimidinů.

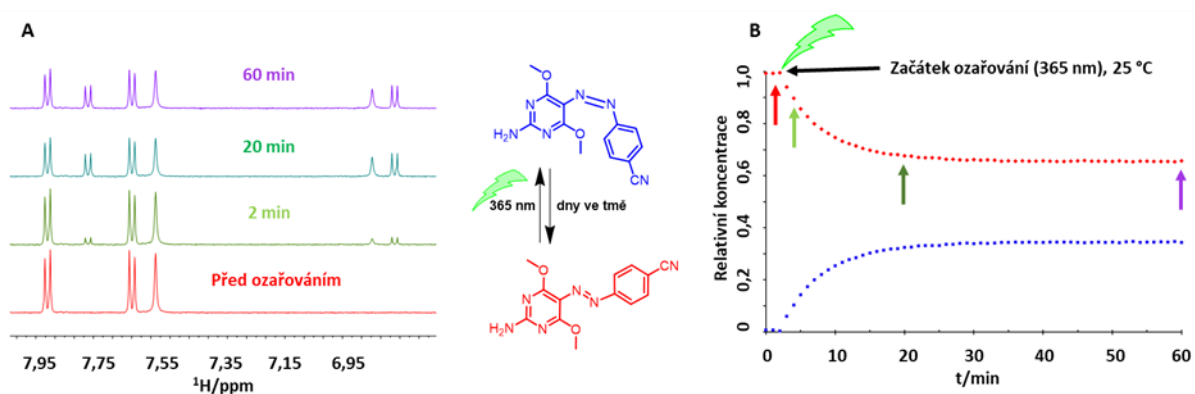
Azopyrimidiny podobně jako azobenzeny¹⁰ podléhají fotoizomeraci z termodynamicky stabilního planárního *trans* izomeru (obr. 2 červeně) na neplanární *cis* izomer (obr. 2 modře).¹¹ Tato výrazná změna geometrie molekuly je v ^1H NMR spektrech jasně patrná (obr. 2A). Po ozaření *trans* izomeru se objeví druhá sada signálů, která odpovídá vzniklému *cis* izomeru. Integrace ploch jednotlivých ^1H signálů poskytne informaci o zastoupení obou izomerů, což pak slouží k sestrojení kinetických křivek (obr. 2B).

2.2. Ozařování při nízkých teplotách

Aparaturu na *in situ* ozařování je možné použít v široké škále teplot, která je zpravidla limitována technickými parametry sondy NMR spektrometru a zvoleného rozpouštědla, při nízkých teplotách pak také rozpustností analytu. Snížení teploty lze výhodně využít např. ke zpomalení zpětné reakce během fotoizomerace. To je případ skupiny azopyrimidinů obsahujících dva donory intramolekulární vodíkové vazby.



Obr. 1. Aparatura pro *in situ* ozařování pro měření (A) NMR spekter v roztoku a (B) EPR spekter během kontinuálního ozařování UV/Vis světlem

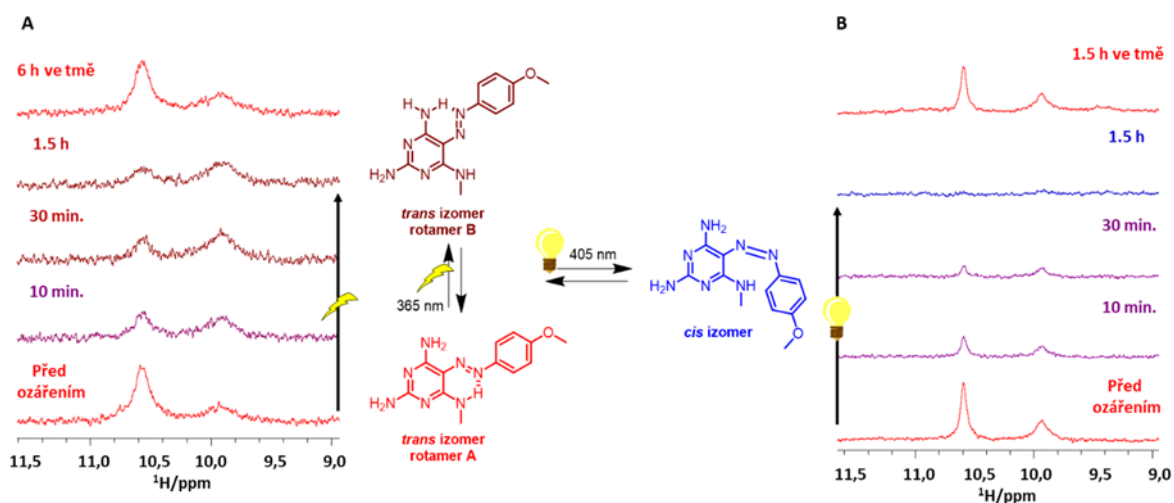


Obr. 2. (A) Aromatická oblast ^1H spekter nasnímaná v $\text{DMSO-}d_6$ při $25\text{ }^\circ\text{C}$ během kontinuálního ozařování UV světlem (365 nm) a (B) kinetické křivky získané integrací ^1H NMR signálů

Azopyrimidiny se dvěma donory intramolekulární vodíkové vazby umožňují vznik dvou rotamerů (A a B) od *trans* izomeru, které se liší orientací fenylozskupiny (obr. 3)¹². Směs dvou rotamerů je jasně patrná v ^1H NMR spektrech, kde jsou detekovatelné dvě sady signálů. Jako příklad lze uvést NH oblasti ^1H NMR spektra (obr. 3), kde je pozorován jeden signál odpovídající NH skupině rotameru A (majoritní) a jeden odpovídající rotameru B (minoritní). Tyto sloučeniny se za laboratorní teploty jeví jako fotoneaktivní, tzn. žádná strukturální změna nebyla během ozařování viditelná. To mohlo být způsobeno buď tím, že se vzniklý *cis* izomer tvoří, ale velmi rychle se přeměňuje zpět na *trans* izomer nebo tím, že intramolekulární vodíková vazba blokuje vznik *cis* izomeru. Kvantově-chemické výpočty ukazovaly, že vlivem intramolekulární vodíkové vazby dochází k významnému snížení energetické bariéry *cis*→*trans*, což vede k velmi rychlému návratu

do počátečního stavu¹³. Snížení teploty by tudíž mělo zpomalit izomeraci zpět na *trans* izomer a odhalit signály *cis* izomeru.

Překvapivě, ozařování UV světlem (365 nm) za velmi nízkých teplot ($< -100\text{ }^\circ\text{C}$) vedlo k reverzibilnímu zvýšení koncentrace rotameru B (obr. 3A) a *cis* izomer nebyl pozorován. Na druhou stranu, ozařování viditelným světlem (405 nm) vedlo k vymizení NMR signálů v oblasti NH protonů ($9\text{--}12\text{ ppm}$), což lze vysvětlit tak, že při vzniku neplanárního *cis* izomeru se intramolekulární vodíkové vazby přeruší, a signály odpovídající rotamerům A a B zaniknou (obr. 3B), resp. se objeví nové signály s nižšími chemickými posuny. Toto unikátní chování, kdy lze dvěma různými vlnovými délkami vyvolat odlišné strukturální změny, lze využít při vývoji nových ortogonálních foto-*prepínačů*.



Obr. 3. NH oblast ^1H spekter snímaných během ozařování (A) UV (365 nm) a (B) viditelným světlem (405 nm) ve směsi $\text{CD}_2\text{Cl}_2/\text{DMF-}d_7$ při $-105\text{ }^\circ\text{C}$

2.3. Sledování velmi rychlých fotochemických reakcí

NMR *in situ* ozařováním je také velmi užitečné pro sledování rychlých fotochemických přeměn, které by nebylo možné sledovat *ex situ*. To lze demonstrovat na případu nových derivátů diarylethenů nedávno připravených na ÚOCHB, kde bylo možné pozorovat fotochemické otevírání cyklu v řádu sekund¹⁴. Diaryletheny mohou přepínat mezi termodynamicky stabilní otevřenou formou a světlem indukovanou uzavřenou formou, která navíc fluoreskuje. Tyto látky se používají jako fluorofory pro mikroskopii s vysokým rozlišením k zobrazování buněčných systémů či organel. Na obr. 4 jsou vidět dvě série ¹H NMR spekter snímaných během ozařování viditelným světlem (405 nm) v řádech desítek sekund. Integrace ¹H signálů sloužila k sestrojení kinetických křivek. Stejná kinetická data lze pro tyto sloučeniny získat z analogicky měřených ¹⁹F NMR spekter, což by významně pomohlo v případě překryvů signálů obou forem v ¹H NMR spektru.

3. ³¹P NMR spektroskopie

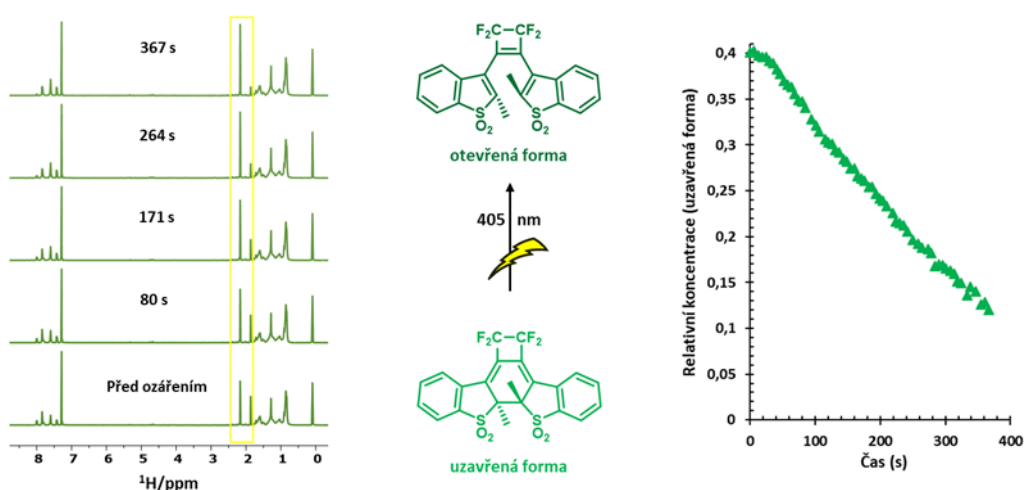
³¹P izotop je magneticky aktivní jádro vhodné pro využití v NMR spektroskopii: má jaderný spin ½, přirozené zastoupení 100 %, širokou škálu chemických posunů (1000 ppm), přijatelnou citlivost (15× menší než ¹H) a dostatečně vysokou Larmorovu frekvenci, což umožňuje měření ³¹P NMR spekter na běžných NMR sondách. Chemický posun jader ³¹P je velmi citlivý na sebemenší strukturní změny (např. solvatace, redox změny atd.)^{15,16}, což je ideální pro studium chemické struktury a sledování chemických i enzymových reakcí v reálném čase¹⁷. ³¹P jádro také interaguje s okolními magneticky aktivními jádry, např. ¹H, ¹³C, ¹⁹F.¹⁸ Např. ¹³C-³¹P *J*-couplingy významně

přispěly k určení struktury intermediátů *in situ* (bez nutnosti jejich izolace)^{15,19} a byly také úspěšně použity pro konformační analýzu, díky tzv. Karplusovským závislostem mezi *J*-couplingem a dihedrálním úhlem, který svírají interagující atomy^{18,20}.

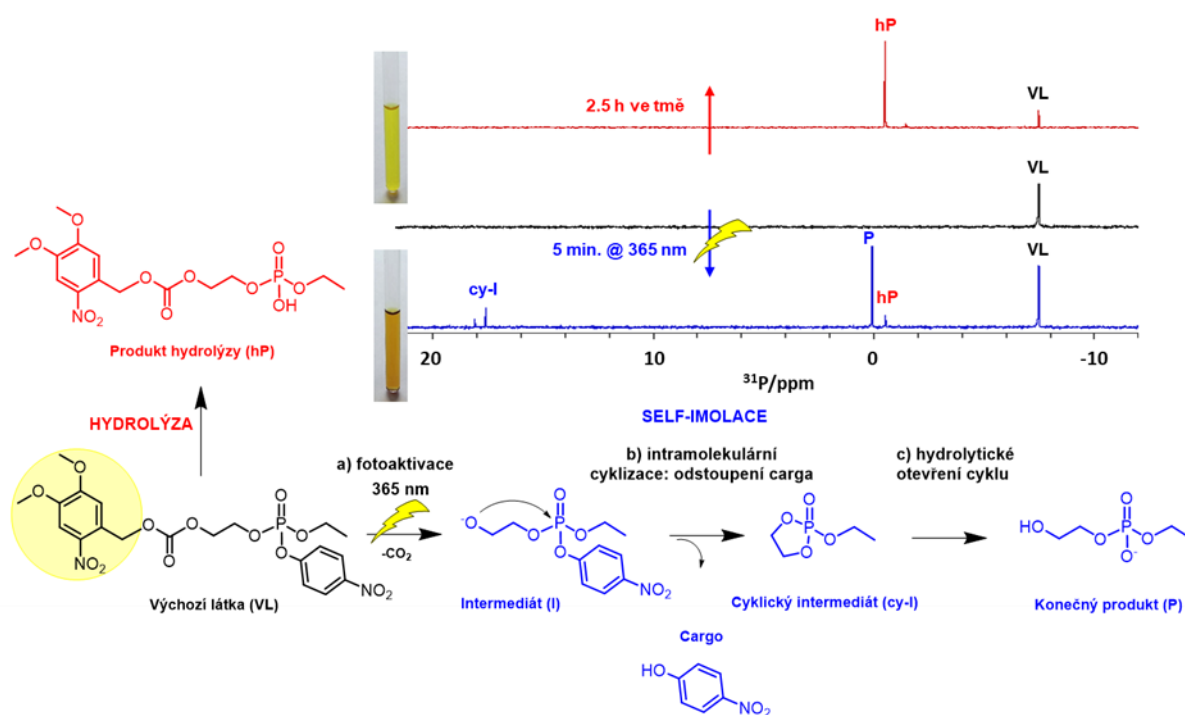
V následujících třech kapitolách budou uvedeny tři vybrané případy, kdy ³¹P spektroskopie významně přispěla k vyřešení strukturních či mechanistických otázek.

3.1. Rozlišení hydrolyzy vs. self-imolace – detekce cyklického intermediátu pomocí ³¹P NMR spekter

³¹P NMR spektroskopie byla využita pro studium struktury a vlastností nových fosfátových self-imolačních spojek^{15,19,21,22}, které byly navrženy jako nové systémy pro cílené doručení léčiv. Po externím impulzu (světlo, enzym, chemická reakce s externí sloučeninou) dojde k intramolekulární cyklizaci a následnému odštěpení cílové molekuly – carga, kterým může být buď biologicky aktivní látka či fluorescenční reportér, který slouží k vizualizaci místa doručení (např. daná buněčná organela). Kromě spojek na bázi aminokyselin byly připraveny i další analogy, které poskytovaly stabilnější cyklické intermediáty detekovatelné v ³¹P NMR spektru. Toho bylo využito pro studium mechanismu odštěpení *para*-nitrofenolu jako modelového carga. Z obr. 5 je patrné, že po externí aktivaci UV světlem (365 nm) došlo k intramolekulární cyklizaci a následnému odštěpení carga na výsledný produkt **P**. Naproti tomu, ve vzorku bez ozařování byl po 2,5 h detekován produkt hydrolyzy **hP**, který jednoznačně potvrdil samovolné odštěpení *para*-nitrofenolu. To by nebylo možné jednoznačně určit optickými metodami, protože obě reakční směsi absorbují světlo ve stejné oblasti spektra (oba roztoky jsou žluté), jak je patrné na obr. 5.



Obr. 4. ¹H spektra vybraných diarylethenů snímaná během *in situ* ozařování viditelným světlem (405 nm) v CDCl₃ při 25 °C



Obr. 5. Důkaz odštěpení *para*-nitrofenolu během intramolekulární cyklizace detekcí cyklického meziproduktu. ^{31}P NMR spektra výchozí sloučeniny (VL) ve směsi kakodylátového pufru a $\text{DMSO-}d_6$ (1:1 v/v) při laboratorní teplotě 2,5 h ve tmě (červeně) nebo 5 min ozařování UV světlem (365 nm), modře

3.2. ^{31}P NMR spektra jako sonda pro pozorování enzymové reakce v reálném čase

^{31}P NMR spektroskopie významně přispěla ke studiu enzymové aktivace nově připravených fosforamidátových proléčiv^{17,23}. Celá řada biologicky aktivních látek špatně prochází přes buněčnou membránu, proto je chemická struktura těchto molekul (léčiv) dále modifikována (na proléčiva). Jako příklad lze uvést fosforamidátová proléčiva připravená od biologicky aktivních nukleosidů (ProTides), u kterých je nutné nejen zvýšit lipofilitu molekuly, ale také je žádoucí obejít první fosforylační krok metabolismu této látky²⁴. Po aktivaci intramolekulárními esterami by mělo dojít k odštěpení esteru na intermediát a následnému ataku fosforu volnou karboxylovou funkcí za vzniku nestabilního cyklu a současného odštěpení fenolu. Enzymové reakce se klasicky sledují radiochemicky, což vyžaduje nejen syntézu substrátu značeného radioaktivním izotopem, ale také velmi striktní bezpečnostní opatření při manipulaci s radioaktivním materiálem. Naproti tomu ^{31}P NMR spektroskopie nevyžaduje žádné další strukturální modifikace a manipulace se vzorkem nepředstavuje žádná bezpečnostní rizika.

^{31}P NMR spektroskopie sehrála klíčovou roli při studiu aktivace dvou fosforamidátových proléčiv (obr. 6), které byly neaktivní v biologických testech, přestože příslušné volné nukleosidy aktivní byly. Byla nalezena alter-

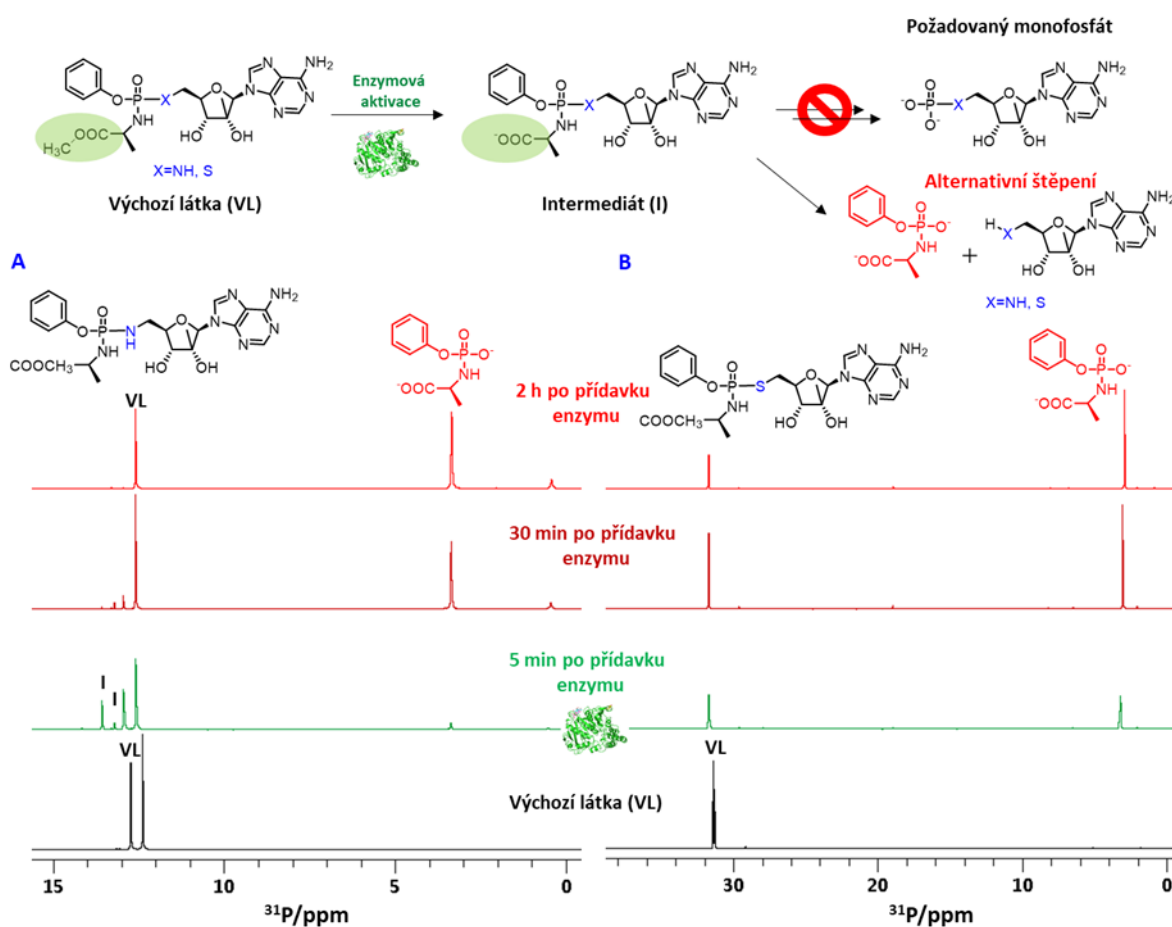
nativní cesta fragmentace molekul proléčiva, byl detekován produkt alternativního rozkladu s ^{31}P chemickým posunem 3,3 ppm (obr. 6).

Výchozí látka obsahovala dvě stereogenní centra, proto vznikly dva diastereomery, které se lišily konfigurací na fosforu, a vykazovaly tedy rozdílné spektroskopické vlastnosti. V NMR spektru jsou pak přítomny dva ^{31}P signály odpovídající právě těmto dvěma diastereomerům. Po enzymové aktivaci, odštěpení methanolu z esteru, vznikly dva diastereomery intermediátu (I). Po odštěpení nukleosidu stereogenní centrum na fosforu zaniklo, a proto byl ve spektru detekován právě jeden ^{31}P signál odpovídající produktu.

Další užitečnou strukturální informaci o struktuře intermediátu přináší ^{13}C NMR spektrum. Pokud je fenol stále připojen k fosforamidátové části, jsou příslušné ^{13}C signály štěpeny na dublety s interakčními konstantami $J_{\text{C-P}}$ do 10 Hz. To jednoznačně určuje strukturu intermediátu *in situ*, bez nutnosti jeho izolace z reakční směsi. Pomocí $J_{\text{C-P}}$ couplingů byla potvrzena struktura produktu alternativního rozkladu, a tím objasněna neaktivita v biologických studiích.

3.3. Stereochemická analýza využívající ^{31}P NMR parametry

Při NMR studii nově připravených nukleosidových proléčiv (kapitola 3.2.) se ukázalo, že je enzymem aktivo-



Obr. 6. Sledování průběhu enzymové reakce dvou připravených proléčiv (A a B) v NMR kyvetě pomocí ^{31}P NMR spekter

ván jen jeden z diastereomerů (obr. 6A). Bylo by velmi užitečné vědět, o který diastereomer se jedná. To byla motivace pro vznik další studie, zda by mohly parametry ^{31}P NMR spekter pomoci tuto otázku vyřešit.

Pro tento záměr byly připraveny modelové sloučeniny, směsi diastereomerů, které se liší relativní konfigurací. Interakční konstanty $J_{\text{C-P}}$ lze odečíst z ^{13}C spekter sloučenin měřených v roztoku. Jak je patrné z obr. 7, kombinací s kvantově-chemickými výpočty^{25,26} lze určit relativní konfiguraci na základě $J_{\text{C-P}}$ (cit.²⁷).

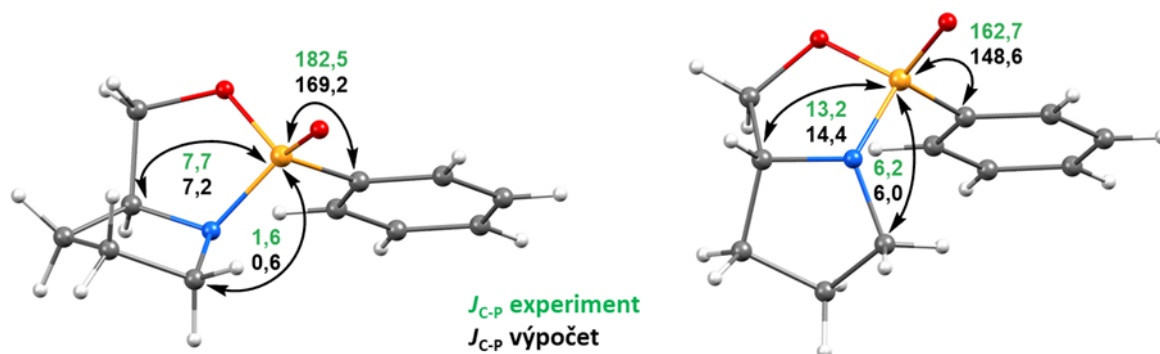
Dalším NMR parametrem, který by mohl být užitečný pro studium prostorového uspořádání látek, jsou dipolární couplingy, přímé spin-spinové interakce zprostředkované přes prostor. Velikost těchto interakcí popisují interakční konstanty D (D -couplingy). Ty se uplatňují hlavně v pevné fázi, kde jsou molekuly uspořádány. V kapalině se vlivem Brownova pohybu molekul D -couplingy průměrují k nule, a proto není možné pozorovat je v roztoku. Jejich reziduální hodnoty (reziduální dipolární couplingy, RDC) lze odečíst po částečném zorientování molekul působením kapalných krystalů či polymerů^{28–30}. RDC se řadí mezi anizot-

ropní parametry poskytující strukturní informaci komplementární k pozorovaným NOE, které ale poskytují pouze lokální informaci. Proto mohou RDC významně přispět při studiu stereochemie molekul³⁰.

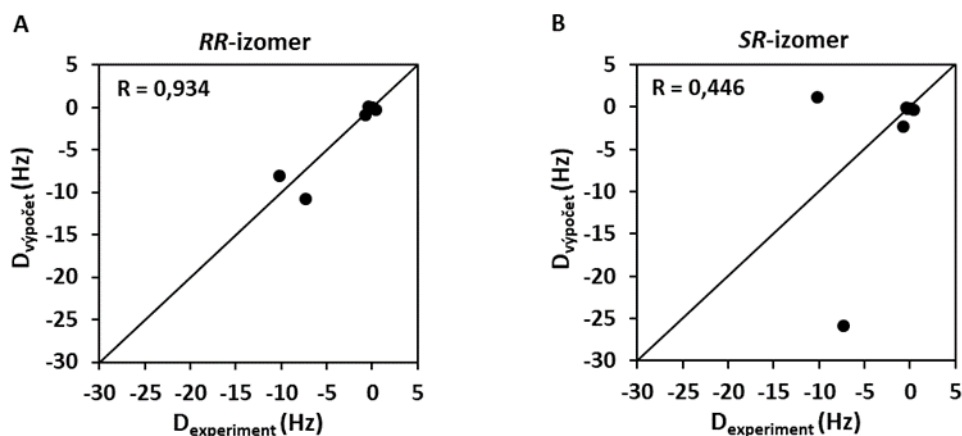
^{31}P izotop může také vykazovat RDC s okolními atomy v molekule, což umožní provést analýzu RDC i u molekul s nedostatečným počtem C-H interakcí. Experimentální data je nutné kombinovat s kvantově-chemickými výpočty. Obr. 8 ukazuje korelace mezi experimentálními a vypočtenými RDC, které určují relativní konfiguraci RR izomeru²⁷.

4. NMR spektroskopie v pevné fázi

NMR spektra lze získat nejen v kapalině, ale také v pevné fázi. Izotopy se dají měřit stejně jako v případě kapalných vzorků, je však nutná speciální měřicí NMR sonda. Ta umožňuje rotaci vzorku pod tzv. magickým úhlem ($54,7^\circ$), což do určité míry simuluje izotropní prostředí. V pevné fázi totiž nedochází k rychlé reorientaci



Obr. 7. Porovnání experimentálních (zeleně) a vypočtených (černě) J_{C-P} -couplingů umožnilo určit relativní konfiguraci jednotlivých diastereomerů



Obr. 8. Korelace mezi experimentálními reziduálními D -couplingy získanými pro RR izomer a vypočtenými pro (A) RR a (B) SR izomer. Vyšší Pearsonův koeficient pro RR -izomer $R = 0,934$ označuje korelaci s lepší shodou mezi experimentálními a vypočtenými hodnotami D -couplingů

molekul, a proto jsou signály ve spektrech měřených bez rotace pod magickým úhlem velmi široké a spektra obtížně interpreovatelná. Z toho důvodu se pro měření používá malých kyvet (rotorů) vyrobených ze ZrO_2 , které mohou rotovat vysokou rychlostí, v závislosti na průměru rotoru, např. rotor o průměru 1 mm může rotovat i rychlostí vyšší než 100 kHz (cit.³¹).

NMR spektroskopie v pevné fázi kombinovaná s kvantově-chemickými výpočty a krystalografickými daty se označuje jako NMR krystalografie³² a je vhodná pro studium polymorfismu sloučenin a mezimolekulárních interakcí³³. Molekuly mohou v závislosti na krystalizačních podmínkách krystalovat v různých krystalových formách (polymorfech). Polymorfy pak mohou vykazovat různé fyzikálně-chemické vlastnosti (např. rozpustnost či spektrální vlastnosti). Polymorfismus sloučenin se monito-

ruje ve farmakochemii, protože významně ovlivňuje biodostupnost a farmakokinetiku. V krajním případě se tak může stát, že pouze jeden polymorf bude biologicky aktivní³⁴.

V následujících dvou kapitolách jsou ukázány příklady využití NMR spektroskopie v pevné fázi pro popis jejich struktury a fyzikálně-chemických vlastností.

4.1. Polymorfni přeměna indukovaná enkapsulací do glykopolymerních váčků

NMR spektroskopie v pevné fázi v kombinaci s kvantově-chemickými výpočty byla použita pro studium struktury a vlastností bioaktivních molekul uvnitř glykopolymerních váčků (glycopolymeric vesicles), které byly navrženy a připraveny jako nosiče pro cílené doručování protirakovinných léčiv³⁵. Jako modelové molekuly byly

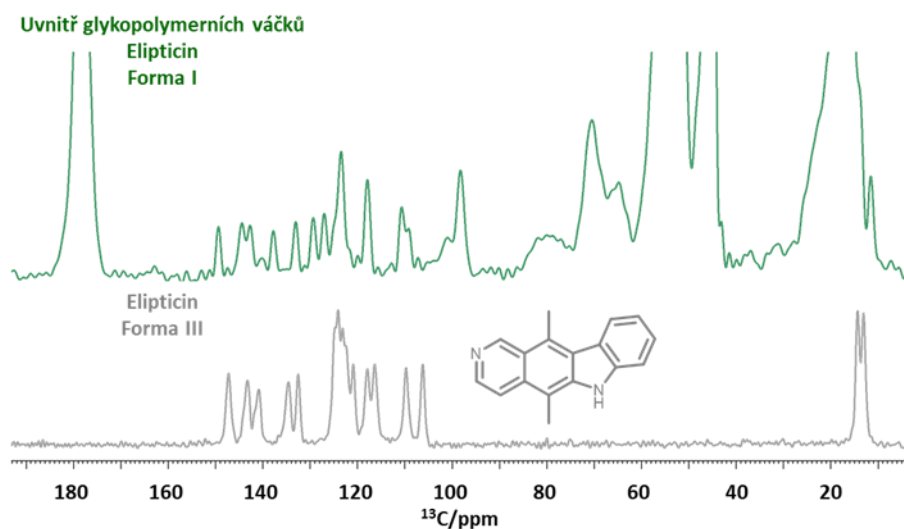
zvoleny elipticin a kurkumin. Elipticin je inhibitor topoi-zomerasy II, interkaluje se do DNA a má protirakovinné vlastnosti. Kurkumin má antioxidační vlastnosti. Struktura polymerních váčků i samotných modelových molekul byla detailně prozkoumána již v minulých pracích, ale struktura asociátů polymer-aktivní látka dosud nebyla popsána. Např. nebylo doposud zjištěno, ve které části váčku je látka lokalizovaná, či v jaké polymorfní formě se nachází.

NMR spektroskopie v pevné fázi jednoznačně prokázala, že modelové molekuly se opravdu enkapsulují do glykopolymerního váčku a vyskytují se v hydrofobní polymethylmethakrylátové (PMMA) vrstvě. Ve 2D ^1H - ^1H experimentech byly nalezeny klíčové krospektry potvrzující interakci mezi elipticinem a methoxyskupinami PMMA. ^{13}C NMR spektra v pevné fázi navíc odhalila, že obě modelové látky po enkapsulaci do glykopolymerních váčků mění svou polymorfní strukturu. Jako příklad jsou na obr. 9 uvedena ^{13}C spektra pro elipticin. Elipticin samotný

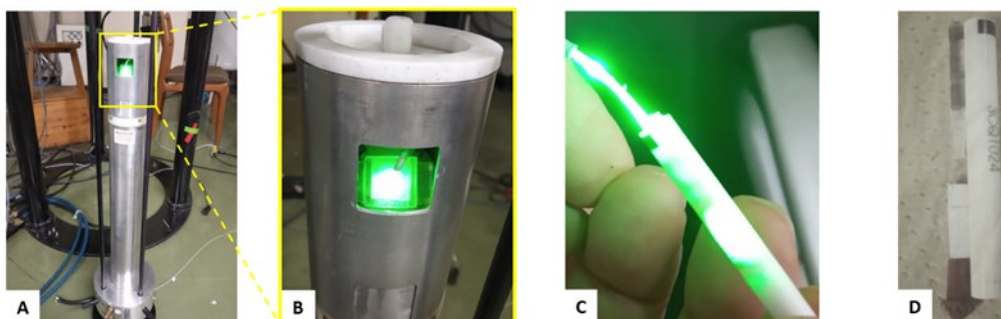
se vyskytuje v polymorfní formě III (obr. 9, šedé spektrum) a vykazuje tak jiné ^{13}C spektrum než po enkapsulaci do glykopolymerních váčků (obr. 9, zelené spektrum). Fakt, že mohou nosiče léčiv měnit polymorfní strukturu, by měl být brán v úvahu při vývoji nových systémů pro cílené doručování léčiv.

4.2. Fotopřepínání azopyrimidinových sloučenin v pevné fázi

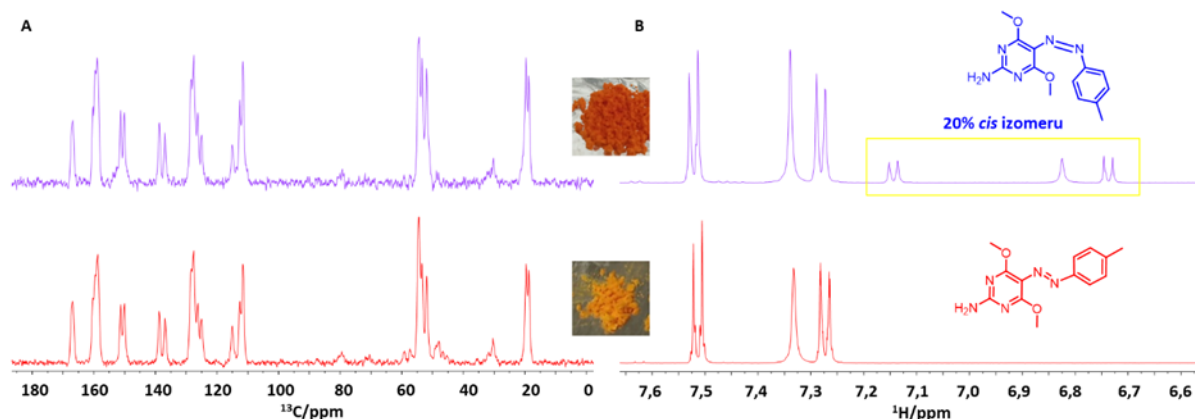
Kombinaci *in situ* ozařování a NMR spektroskopie je možné využít i pro měření v pevné fázi³⁶. Aparatura je však složitější vzhledem k tomu, že vzorek musí rotovat vysokou rychlostí (v řádech kHz) sklopený pod magickým úhlem, jak je popsáno v úvodu kapitoly 4. Optické vlákno se zavádí nad rotor a světlo prochází dovnitř rotoru přes skleněné víčko. Taková aparatura je k dispozici na Národní univerzitě v Jokohamě v Japonsku (obr. 10), kde autor-



Obr. 9. ^{13}C NMR spektra elipticinu (šedé spektrum) a elipticinu vázaného v glykopolymerním váčku (zelené spektrum) měřená v pevné fázi při rychlosti rotace 6,5 kHz pod magickým úhlem



Obr. 10. Zařízení pro měření vzorků v pevné fázi za kontinuálního ozařování, které sestrojil na Národní univerzitě v Jokohamě prof. Akira Naito. (A, B) Měřicí NMR sonda; (C) zavedení optického vlákna nad rotor, světlo prochází přes skleněné víčko dovnitř rotoru; (D) rotor z ZrO_2 o průměru 4 mm, ve kterém probíhá samotné měření



Obr. 11. (A) ^{13}C NMR spektra v pevné fázi před ozařováním (červeně) a po ozařování pevného vzorku (fialově) UV světlem (365 nm). (B) Aromatická oblast ^1H spekter měřených v $\text{DMSO}-d_6$ na počátku (červeně) a po rozpuštění ozářeného prášku (fialově)

ka studovala fotopřepínání azopyrimidinových derivátů v pevné fázi. V krystalech je ozařování méně účinné, protože působí strukturální změny pouze na povrchu krystalu. Celková koncentrace ozářené formy ve vzorku tak může být pod limitem detekce.

Kombinací poznatků z NMR spekter v pevné fázi a v roztoku se podařilo prokázat a popsat fotopřepínání azopyrimidinových derivátů v pevné fázi³⁷. Fotopřepínání v pevné fázi je důležité pro vývoj „chytrých“ materiálů, molekulárních motorů či optoelektroniky^{38,39}. Významná změna barvy po ozáření UV světlem byla nejprve prozkoumána optickou spektroskopií (difuzní reflektancí), která naznačovala vznik *cis* izomeru. V některých případech však přicházelo v úvahu i světlem indukovaný přenos protonu (azo/hydrazo formy),⁴⁰ který probíhá na azoskupině. Přirozené zastoupení izotopu ^{15}N je však nízké (0,37 %), a proto bylo nutné připravit deriváty značené izotopem ^{15}N na azoskupině.

Obr. 11 ukazuje, jak důležité je kombinovat informace získané z NMR spekter v pevné fázi a roztoku. Přestože je vidět jasná barevná změna po ozáření prášku, žádný zásadní rozdíl v ^{13}C spektrech v pevné fázi nebyl pozorován (obr. 11A). Až po rozpuštění ozářeného prášku bylo v ^1H spektrech v $\text{DMSO}-d_6$ detekováno 20 % *cis* izomeru (obr. 11B). Po fotoizomeraci na *cis* izomer dochází k porušení krystalové struktury a vzniklý *cis* izomer je amorfní (bez uspořádané struktury). NMR signály amorfní formy jsou výrazně rozšířené, proto nebyla pozorována druhá sada signálů *cis* formy ve ^{13}C spektru měřeném v pevné fázi, ale byla jasně prokázána ^1H NMR spektry v roztoku³⁷.

5. Závěr

Pokročilé metody NMR spektroskopie v kombinaci s kvantově chemickými výpočty poskytují klíčové informace o struktuře a fyzikálně-chemických vlastnostech molekul. Jedinečná kombinace NMR spektroskopie s *in*

situ ozařováním odhalila fotopřepínatelné vodíkové vazby či umožnila popsat rychlé fotochemické reakce, což by s *ex situ* ozařováním nebylo možné. ^{31}P NMR spektroskopie výrazně zjednodušila a urychlila sledování průběhu enzymových reakcí, ve kterých dochází k přeměnám látek obsahujících fosfor. Na rozdíl od klasického radiochemického přístupu je samotná manipulace se vzorkem bezpečná. ^{31}P spektra jsou výrazně jednodušší na interpretaci a NMR parametry ^{31}P izotopu mohou významně přispět k určení prostorového uspořádání látek, např. relativní konfigurace či konformace. NMR spektroskopie v pevné fázi odhalila polymorfni transformaci způsobenou glykopolymérem, který byl navržen jako nosič pro cílené doručování látek s protirakovinným účinkem.

*Na závěr autorka děkuje všem kolegům, kteří se aktivně podíleli na výše uvedených publikacích, jmenovitě pak vedoucímu Oddělení NMR spektroskopie na ÚOCHB doc. RNDr. Martinu Dračínskému, Ph.D.; Ing. Lucii Mužíkové Čechové za syntézu azopyrimidinů, Ing. Ondřeji Baszczyňskému, Ph.D. (Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy) za spolupráci v oblasti fosfátových spojek, prof. Dr. Christině Thiele (TU Darmstadt) za možnost NMR měření s *in situ* ozařováním během autorčiny stáže v její laboratoři, dále fotochemikům z Přírodovědecké fakulty Univerzity Komenského v Bratislavě, RNDr. Marku Cigáňovi, Ph.D. a RNDr. Juraji Filovi, Ph.D. za dlouhodobou spolupráci.*

LITERATURA

- Günther H.: *NMR Spectroscopy: Basic Principles, Concepts and Applications in Chemistry*, 3. vyd. Wiley-VCH, Weinheim 2013.
- Friebolin H.: *Basic One- and Two-Dimensional NMR Spectroscopy*, 5. vyd. Wiley-VCH, Weinheim 2010.
- Altona C., Geise H. J., Romers C.: *Tetrahedron* 24, 13 (1968).
- Noggle J. H., Schirmer R. E.: *The Nuclear Overhauser Effect*. Academic Press, New York 2012.

5. Silva M. S.: *Molecules* 22, 247 (2017).
 6. Feldmeier C., Bartling H., Magerl K., Gschwind R. M.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 54, 1347 (2015).
 7. Wolff C., Kind J., Schenderlein H., Bartling H., Feldmeier C., Gschwind R. M., Biesalski M., Thiele C. M.: *Magn. Reson. Chem.* 54, 485 (2016).
 8. Klán P., Wirz J.: *Photochemistry of Organic Compounds: From Concepts to Practice*. Wiley, Chichester 2009.
 9. Goldfarb D., Stoll S.: *EPR Spectroscopy: Fundamentals and Methods*. Wiley-VCH, Weinheim 2018.
 10. Bandara H. M., Burdette S. C.: *Chem. Soc. Rev.* 41, 1809 (2012).
 11. Čechová L., Kind J., Dračínský M., Filo J., Janeba Z., Thiele C. M., Cigáň M., Procházková E.: *J. Org. Chem.* 83, 5986 (2018).
 12. Procházková E., Čechová L., Kind J., Janeba Z., Thiele C. M., Dračínský M.: *Chem. Eur. J.* 24, 492 (2018).
 13. Čechová L., Filo J., Dračínský M., Slavov C., Sun D., Janeba Z., Slanina T., Wachtveitl J., Procházková E., Cigáň M.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 59, 15590 (2020).
 14. Sysoiev D., Procházková E., Semenenko A., Pohl R., Shishkina S., Klepetářová B., Shvadchak V., Yushchenko D. A.: *ChemPlusChem* 85, 2084 (2020).
 15. Procházková E., Navrátil R., Janeba Z., Roithová J., Baszczyński O.: *Org. Biomol. Chem.* 17, 315 (2019).
 16. Naito A., Nagao T., Norisada K., Mizuno T., Tuzi S., Saito H.: *Biophys. J.* 78, 2405 (2000).
 17. Procházková E., Hřebáček H., Dejmek M., Šála M., Šmídková M., Tloušťová E., Zborníková E., Eyer L., Růžek D., Nencka R.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 30, 1 (2020).
 18. Benda L., Sochorová Vokáčová Z., Straka M., Sychrovský V.: *J. Phys. Chem. B* 116, 3823 (2012).
 19. Procházková E., Filo J., Cigáň M., Baszczyński O.: *Eur. J. Org. Chem.* 2020, 897 (2020).
 20. Quin L. D., Gallagher M. J., Cunkle G. T., Chesnut D. B.: *J. Am. Chem. Soc.* 102, 3136 (1980).
 21. Šimon P., Tichotová M., Gallardo M. G., Procházková E., Baszczyński O.: *Chem. Eur. J.* 27, 12763 (2021).
 22. Dud M., Tichotová M., Procházková E., Baszczyński O.: *Molecules* 26, 5160 (2021).
 23. Hřebáček H., Procházková E., Šála M., Plačková P., Tloušťová E., Barauskas O., Lee Y. J., Tian Y., Mackman R., Nencka R.: *Org. Biomol. Chem.* 13, 9300 (2015).
 24. Slusarczyk M., Serpi M., Pertusati F.: *Antivir. Chem. Chemother.* 26, 29792071 (2018).
 25. Fukal J., Páv O., Buděšínský M., Rosenberg I., Šebera J., Sychrovský V.: *Phys. Chem. Chem. Phys.* 21, 9924 (2019).
 26. Fukal J., Páv O., Buděšínský M., Šebera J., Sychrovský V.: *Phys. Chem. Chem. Phys.* 19, 31830 (2017).
 27. Tichotová M., Ešnerová A., Tučková L., Bednárová L., Císařová I., Baszczyński O., Procházková E.: *J. Magn. Reson.* 336, 107149 (2022).
 28. Gil R. R., Gayathri C., Tsarevsky N. V., Matyjaszewski K.: *J. Org. Chem.* 73, 840 (2008).
 29. Thiele C. M.: *Concepts Magn. Res.* 30A, 65 (2007).
 30. Thiele C. M., Schmidts V., Bottcher B., Louzao I., Berger R., Maliniak A., Stevansson B.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 48, 6708 (2009).
 31. Müller K., Geppi M.: *Solid State NMR: Principles, Methods, and Applications*, 1. vyd. Wiley-VCH, Weinheim 2021.
 32. Harris R. K., Wasylishen R. E., Duer M. J.: *NMR Crystallography*. John Wiley & Sons, Chichester 2012.
 33. Harris R. K.: *J. Pharm. Pharmacol.* 59, 225 (2007).
 34. Halebian J., McCrone W.: *J. Pharm. Sci.* 58, 911 (1969).
 35. Procházková E., Cao C., Rawal A., Dračínský M., Bhattacharyya S., Císařová I., Hook J., Stenzel M.: *ACS Appl. Mater. Interfaces* 11, 28278 (2019).
 36. Yomoda H., Makino Y., Tomonaga Y., Hidaka T., Kawamura I., Okitsu T., Wada A., Sudo Y., Naito A.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 53, 6960 (2014).
 37. Procházková E. a 11 spoluautorů: *Dyes Pigm.* 199, 110066 (2022).
 38. Amimoto K., Kawato T.: *J. Photochem. Photobiol., C* 6, 207 (2005).
 39. Gonzalez A., Kengmana E. S., Fonseca M. V., Han G. G. D.: *Mater Today Adv.* 6, 100058 (2020).
 40. Filo J., Tisovský P., Csicsai K., Donovalová J., Gáplovský M., Gáplovský A., Cigáň M.: *RSC Adv.* 9, 15910 (2019).
- E. Procházková** (*Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Czech Academy of Sciences, Prague*): **Advanced NMR Spectroscopy Methods for Study of Structure and Properties of Small Molecules**
- NMR spectroscopy is the key analytical method for determination of chemical structure and investigation of physico-chemical properties, such as non-covalent interactions, tautomeric equilibria or polymorphism. In this work, selected examples of using advanced NMR methods in structural analysis are discussed. (1) NMR spectroscopy with *in situ* irradiation useful to monitor photochemical processes, (2) ^{31}P NMR spectroscopy for reaction monitoring and probing stereochemistry and (3) solid-state NMR spectroscopy to investigate polymorphism.
- Keywords: ^{31}P NMR, photoswitches, conformational analysis, NMR spectroscopy, polymorphism, stereochemistry
- Procházková E.: *Chem. Listy* 116, 395–404 (2022).
 - <https://doi.org/10.54779/chl20220395>