

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra analytické chemie

Bakalářská práce

Využití nukleární magnetické resonance v analýze léčiv

(rešeršní práce)

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci Využití nukleární magnetické resonance v analýze léčiv vypracovala samostatně a uvedla v seznamu literatury všechny použité literární a odborné zdroje. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím, aby tato práce byla dále propůjčena ke studijním účelům a byla citována dle platných norem.

Dne

v Hradci Králové

Podpis

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala PharmDr. Ludmile Matysové, Ph.D. za její cenné připomínky, odborné rady, vstřícnost, trpělivost a pomoc při vypracování této bakalářské práce.

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK	i
CÍL A ZADÁNÍ PRÁCE	1
ÚVOD	2
1. ZÁKLADNÍ POJMY A INSTRUMENTACE	3
1.1. NMR (Nukleární magnetická rezonance)	3
1.2. Spin	6
1.3. Magnetická spinová rezonance	7
2. ZÁKLADNÍ PRINCIPY A TECHNIKY NMR	8
2.1. Zásady při NMR spektroskopii	8
2.2. Kvantitativní NMR	8
2.3. qNMR v tuhém stavu	9
2.4. Microcoil NMR	10
2.5. Pohled na qNMR spektroskopii v analýze léčiv	10
3. UNIVERZÁLNÍ POUŽITÍ NMR	11
3.1. Vyšetřování vícekomponentní drogy NMR spektroskopii	11
3.2. Aplikace NMR pro charakterizaci polymerů	11
3.3. NMR spektroskopie přírodních látek	12
3.4. Solid-state při analýze drogy v lékové formě	13
3.5. Metabolické profilování	13
3.6. DOSY NMR analýza léčiv	14
4. SPECIÁLNÍ APLIKACE	15
4.1. NMR směsi na bázi analýzy na příkladu kvality ovocných šťáv	15
4.2. NMR pro testy sacharidů ve vakcínách	15
4.3. Fluor-19 nebo fosfor-31 NMR spektroskopie	16
4.4. Kvantitativní 2D NMR analýza glykosaminoglykanů	17
4.5. Využití protonové NMR jako alternativy při analýze aminokyselin	17
4.6. Hodnocení inhibiční účinnosti antibiotik MRI	18
4.7. Multiple online spektrální analýza pro charakterizaci drogových a přírodních produktů	19
4.8. Kvantitativní online NMR spektroskopie s vysokým rozlišením ve vyšetřování složitých směsí	19

5.	NMR POLYMERŮ.....	21
5.1.	Mikrostruktura polymerních řetězců	21
5.2.	Charakterizace polymerů	21
5.3.	Solid-state NMR polymerů	22
6.	NMR SPEKTROSKOPIE A JEJÍ APLIKACE PRO BIOMEDICÍNSKÝ VÝZKUM.....	23
6.1.	Dvojměrná NMR spektroskopie.....	23
6.2.	Multidimenzionální NMR spektroskopie makromolekul	23
6.3.	Izotopicky obohacené proteiny pro NMR spektroskopii.....	24
6.4.	Stanovení struktury proteinů z NMR dat	25
6.5.	Techniky NMR studující dynamiku proteinů.....	25
6.6.	Struktura a dynamika NK z NMR	26
6.7.	Struktura a dynamika sacharidů z NMR.....	26
6.8.	Solid-state NMR a její aplikace pro biomedicínský výzkum.....	27
	ZÁVĚR.....	30
	ZDROJE	I

SEZNAM ZKRATEK

2D ... Dvourozměrný

3D ... Trojrozměrný

4D ... Čtyřrozměrný

AAA ... Aminokyseliny

CE ... Kapilární elektroforéza (capillary electrophoresis)

DOSY ... Difúzní uspořádaní spektroskopie (Diffusion Ordered Spectroscopy)

FH ... Fourierova transformace

FIA ... Průtoková injekční analýza (flow injection analysis)

GAG ... Glykosaminoglykany

HPLC ... Vysoko účinná kapalinová chromatografie (High-performance liquid chromatography)

IR ... Infračervený

LC ... Kapalinová chromatografie (liquid chromatography)

MRI ... Magnetická rezonance (magnetic resonance imaging)

MS ... Hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry)

nD ... vícerozměrný

NK ... Nukleové kyseliny

NMR ... Nukleární magnetická rezonance (nuclear magnetic resonance)

qNMR ... Kvantitativní nukleární magnetická rezonance

RF ... Rádiová frekvence

SFC ... Superkritická fluidní chromatografie (supercritical fluid chromatography)

SNasa ... Stafylokoková nukleáza

CÍL A ZADÁNÍ PRÁCE

Cílem a zadáním této bakalářské práce bylo vyhledání a shromáždění informací o nukleární magnetické resonanci jako metodě pro stanovení nejrůznějších látek a zjištění jejího využití v současné době, konkrétně v oblasti analýzy léčiv.

ÚVOD

Nukleární magnetická rezonance (NMR) je fyzikálně chemická metoda. Využívá interakce mezi jádry určité stanovované látky, která se nachází ve vnějším magnetickém poli a elektromagnetickým zářením daných vlnových délek v radiofrekvenční oblasti. Atomová jádra přitom musí mít nenulový jaderný spin. Nukleární magnetická rezonance zkoumá jak rozdělení energií jaderného spinu, tak i jednotlivé přechody mezi spinovými stavy. Jednotlivé přechody jsou vyvolány působením radiofrekvenčního záření. Tato fyzikálně chemická metoda umožňuje určení struktury molekul, složení zkoumané látky i množství jednotlivých molekul obsažených v látce [1].

Je-li částice, mající magnetický dipólový moment, zároveň umístěna v přítomnosti statického magnetického pole a elektromagnetického pole, které osciluje s odpovídající frekvencí rezonanční absorpce/emise, nastává magnetická rezonance. Tento jev, pojmenovaný magnetická rezonance, je přítomen v mnoha úzce souvisejících technologiích, jako jsou elektronové spinové rezonance, nukleární magnetická rezonance, feromagnetické rezonance, a nukleární kvadrupólové rezonance. Nukleární magnetická rezonance je jedním z nejintenzivněji studovaných a používaných magnetických rezonančních technik. Během posledních pěti desetiletí našla NMR nárůst i v rutinním použití v medicíně [32].

V této práci se věnuji novým možnostem nukleární magnetické rezonance, zaměřuji se na pokroky této metody v současnosti a její využití v analýze léčiv a tělu vlastních i cizích sloučenin.

1. ZÁKLADNÍ POJMY A INSTRUMENTACE

1.1. NMR (NUKLEÁRNÍ MAGNETICKÁ REZONANCE)

NMR je magnetická spinová rezonance obsažená na spinech neutronů a protonů v atomových jádrech. Rezonanční frekvence je úměrná vnějšímu magnetickému poli, které má koeficient úměrnosti 0,76 kHz/T.

Je to fyzikální jev, kdy jádra umístěná v magnetickém poli absorbují a opětovně vyzařují elektromagnetické záření. Energie je v určité rezonanční frekvenci, která je závislá na síle magnetického pole a magnetických vlastnostech izotopů. NMR umožňuje pozorování specifických kvantově mechanických magnetických vlastností atomových jader [34].

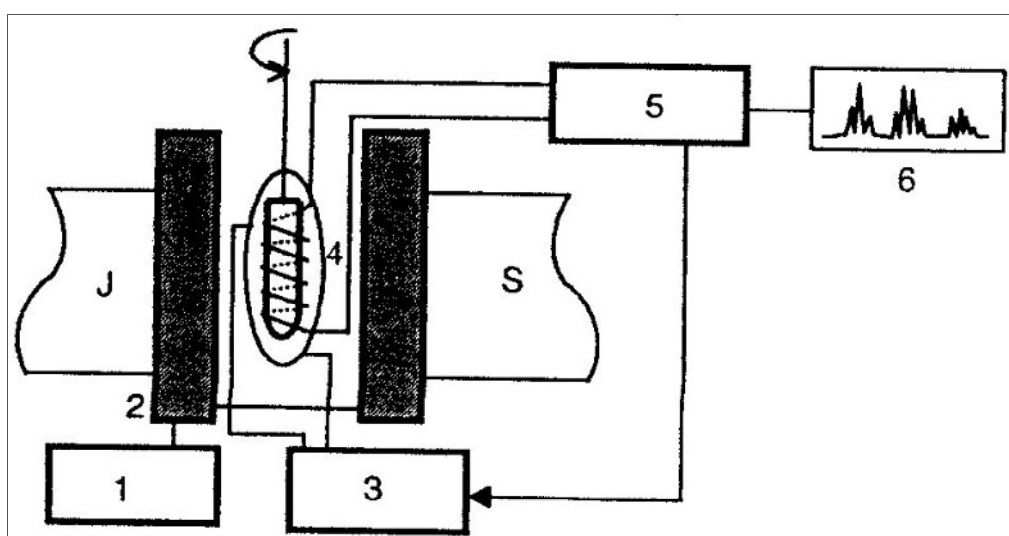
Princip NMR zahrnuje většinou dva po sobě následující kroky. Prvním z nich je seřazení (polarizace) jaderných magnetických spinů v konstantním magnetickém poli H_0 . Krokem následujícím je narušení tohoto vyrovnání jaderných spinů elektromagnetickým pulsem obvykle rádiové frekvence (RF). Dvě pole jsou obvykle vybrána tak, aby na sebe byla navzájem kolmá, což maximalizuje sílu NMR signálu. Celková magnetizace (M) jaderných spinů je jev, který je využíván v NMR spektroskopii a magnetické rezonanci [34].

Přístroje nutné pro NMR spektroskopii:

1. Magnet, který vytváří stabilní a homogenní magnetické pole. Mezi pólovými nástavci je umístěna kyveta se vzorkem, která je obklopena cívkou. Cívka je součástí radiofrekvenčního okruhu.
2. Stabilní zdroj radiofrekvenčního záření
3. Přijímač, zesilovač a detekční systém
4. PC jako registrační zařízení

U klasických NMR spektrometrů probíhá měření spojitě, modernější spektrometry pracují pulzně. Během krátké doby, při níž probíhá jeden pulz, se nabudí všechny signály, které jsou uloženy do paměti počítače v závislosti na čase. Jádra se po určité době začnou vracet do základního stavu, což je provázeno vyzařováním elektromagnetických vln. Frekvence elektromagnetických vln je odpovídá změně energie. Měřením jednotlivých vln lze určit počet jader a strukturu vzorku. Jednotlivé signály se sčítají a nakumulováním signálů dovoluje pracovat i s nízkými koncentracemi vzorku [35].

Obr. 1: Schéma NMR spektrometru

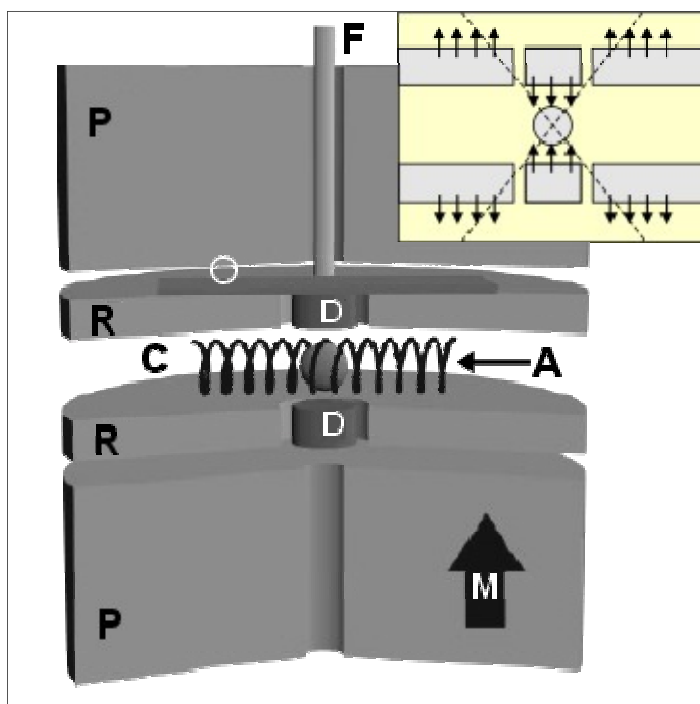


Zdroj: P. Klouda – Moderní analytické metody; ISBN-10: 80-86369-07-2. 21.8.2013

V rotující skleněné kyvetě tvaru trubičky (délky 15 cm a průměru 5 mm) je umístěn vzorek. Kyveta je umístěna v silném homogenním magnetickém poli (2), které vytváří elektromagnet na bázi supravodivosti. Elektromagnet je napájen ze zdroje (1), který vytváří proměnné vysokofrekvenční pole. Další součástí spektrometru je radiofrekvenční vysílač (4), který je napájen ze zdroje (3). Jako detektor se používá radiofrekvenční přijímač. Radiofrekvenční signál je vyhodnocen ve vyhodnocovacím zařízení (5) a výsledkem je spektrum NMR (6) [35].

Problém při zobrazování kapalin lze vyřešit zařízením BOOMERANG. Běžné techniky NMR využívají nehomogenní pole a měří radiové vlny. Zařízení BOOMERANG naproti tomu využívá homogenní magnetické pole a měří silové účinky magnetického pole. Při zobrazování kapalin může dojít vlivem gradientu pole k difúzi molekul s magnetickým momentem. Použije-li se zařízení BOOMERANG, lze tomuto problému předejít a difúze molekul v kapalině se v tomto případě téměř neprojeví.

Obr. 2: Schéma přístroje BOOMERANG



Zdroj: Proc. Nat. Acad. Sci. 101 12804

Dva permanentní magnety (P) vytvářejí homogenní magnetické pole a zmagnetizují prstencové (R) a detekční (D) magnety na obou stranách cívky (C). Vzorek (A) má kulovitý tvar a leží uvnitř cívky, která vytváří elektromagnetické pulsy. Magnetické pole způsobí posun detekčního magnetu vůči prstencovému a výchylka je přenesena na destičku z monokrystalu křemíku (O), která je spojena s detekčním magnetem. Monokrystal funguje jako mechanický rezonátor a jeho pohyb je zaznamenán interferometrem (F). V detailu jsou zaznamenány síly, které způsobují výchylku detekčního magnetu, a vektor M znázorňuje směr magnetizace. Přístroj se používá pro detekci částic.

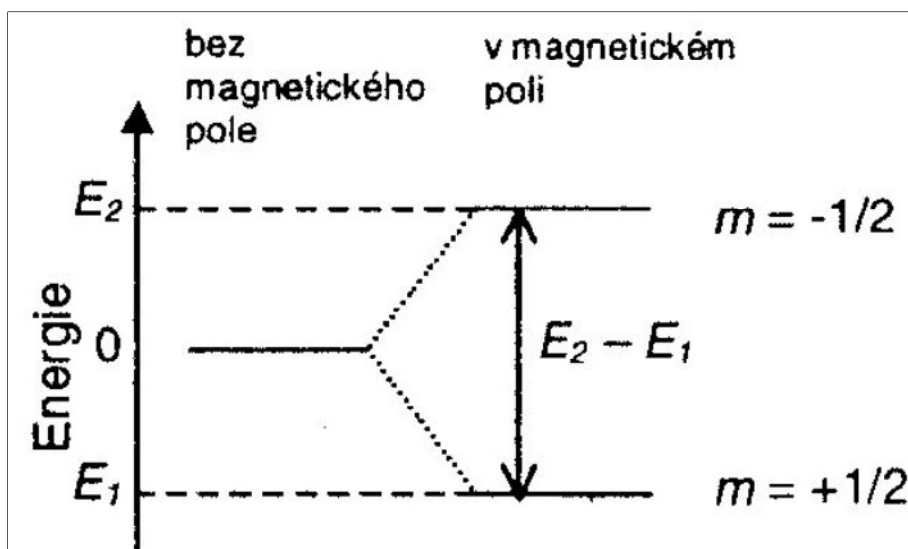
1.2. SPIN

Všechny izotopy, obsahující lichý počet protonů a/nebo neutronů mají vnitřní magnetický moment a moment hybnosti, tedy nenulový spin. Na druhé straně všechny nuklidy se sudým počtem protonů a/nebo neutronů mají celkový spin nula. Celkový spin jádra je dán rotačním kvantovým číslem S [34].

Spin je vlastní rotační moment částice a přirozeným způsobem souvisí s momentem hybnosti. Částice, které mají nenulový spin, se chovají jako malý magnetický dipól μ a reaguje na vnější magnetické pole.

Nenulový spin je vždy spojen s nenulovým magnetickým momentem (μ) přes vztah $\mu = \gamma S$, kde γ je gyromagnetický poměr. Je to magnetický moment, který umožňuje pozorování NMR spekter, způsobené přechody mezi úrovněmi spinu jádra. Většina nuklidů, které mají sudý počet protonů a neutronů, mají nulové jaderné magnetické momenty a z toho důvodu tyto nuklidy nevykazují žádnou absorpci v NMR spektru. Takovým nuklidem je například ^{18}O , naopak nuklidy ^{13}C , ^{31}P , ^{35}Cl nebo ^{37}Cl vykazují absorpci v NMR spektru. [34].

Obr. 3: Energetické hladiny jádra s $I = 1/2$



Zdroj: P. Klouda – Moderní analytické metody; ISBN-10: 80-86369-07-2. 21.8.2013

Velký význam má tzv. protonová magnetická rezonance, která vychází z faktu, že pokud se jádra, lišící se pouze spinem, nenacházejí ve vnějším magnetickém poli, mají stejnou energii. Po jejich umístění do magnetického pole se však rovnocennost jader poruší a ty se rozštěpí na dvě různé energetické hladiny. Každá tato hladina je popsána magnetickým kvantovým číslem m [35].

Tab. 1: Jaderný spin podle počtu nukleonů

POČET PROTONŮ	POČET NEUTRONŮ	JADERNÝ SPIN I	PŘÍKLADY
Sudý	Sudý	0	${}^6_{12}\text{C}$, ${}_8^{16}\text{O}$, ${}_{16}^{32}\text{S}$
Sudý	Lichý	$1/2, 3/2, 5/2, \dots$	${}^1_1\text{H}$, ${}^3_1\text{H}$, ${}^6_6\text{C}$, ${}^{13}_6\text{C}$, ${}^{19}_9\text{F}$ ($I=1/2$); ${}^{17}_8\text{O}$ ($I=5/2$)
Lichý	Sudý		
Lichý	Lichý	$1, 2, 3, \dots$	${}^2_1\text{H}$, ${}^{14}_7\text{N}$ ($I=1$); ${}^{10}_5\text{B}$ ($I=3$)

Zdroj: P. Klouda – Moderní analytické metody; ISBN-10: 80-86369-07-2. 21.8.2013

1.3. MAGNETICKÁ SPINOVÁ REZONANCE

Elementární magnetické dipóly vzorku interagují s vnějším magnetickým polem, což si můžeme představit jako pohyb elementárních dipólů kolem magnetických silokřivek. Soustavou prochází elektromagnetická vlna o určité rezonanční frekvenci. Vyzářené fotony potom umožňují získat informace o struktuře vzorku.

2. ZÁKLADNÍ PRINCIPY A TECHNIKY NMR

2.1. ZÁSADY PŘI NMR SPEKTROSKOPII

Nukleární magnetická rezonanční spektroskopie umožňuje vizualizaci jednotlivých atomů a molekul v různých médiích v roztoku, stejně jako v pevném stavu. Je to nedestruktivní metoda, jejímž výsledkem je molární reakce, která umožňuje objasnění struktury a kvantifikaci najednou. Informuje o chemické struktuře a dynamice organických molekul.

V rámci skupiny spektroskopických metod je při NMR spektroskopii používána nejnižší ozařovací energie pro excitaci. Vzhledem k nízké energetické úrovni buzení se relaxace a citlivost NMR spektroskopie specificky liší od jiných spektroskopických metod. Molekulární dynamika je pozorovatelná během buzení a relaxace. Rotující souřadný systém je užitečným nástrojem pro pochopení vyhodnocení dat v rámci experimentu NMR.

NMR data jsou zaznamenána v (y) a (x) směru během doby snímání. V experimentu NMR se makroskopická magnetizace vrátí zpět do rovnovážného stavu. Tento jev se nazývá spinová mříž relaxace. Rezonanční frekvence je přímo úměrná k magnetickému poli, a proto má každé aktivní jádro jeden charakteristický signál. Vzhledem k poměru mezi intenzitou magnetického pole a rezonanční frekvencí v experimentu NMR, musí být stupnice NMR spektra normalizovatelná [2].

2.2. KVANTITATIVNÍ NMR

NMR umožňuje jedinečné a kvantitativní stanovení relativního množství molekulárních skupin a nabízí tak nástroj pro kvantifikaci celé látky i ve směsích. Kvantitativní NMR spektroskopická aplikace získala velkou pozornost. Podporuje technický pokrok moderních NMR technik, který překonal problémy nízké citlivosti. To vedlo ke snížení, dříve značné, nedůvěry vůči qNMR výsledkům. Nejdůležitější základní vztah qNMR je, že odezva signálu ve spektru je přímo úměrná počtu jader,

která generují odpovídající rezonanční čáru. NMR spektra jsou pouze informace o poměru intenzit. Avšak přidáním standardu směsi můžeme získat absolutní výsledky analýzy, jako je obsah nebo koncentrace. qNMR našla rozsáhlé aplikace, a to zejména kvůli možnosti určit strukturu na molekulární úrovni. Umožňuje relativně krátkou dobu měření, významný je jeho nedestruktivní charakter a není nutná předchozí izolace analytu ve směsi. To znamená poměrně snadnou přípravu vzorků a manipulaci v jedinečné kombinaci směsí. Nicméně nízká citlivost ve srovnání s ostatními spektroskopickými a chromatografickými metodami je hlavní nevýhodou qNMR [3].

2.3. qNMR V TUHÉM STAVU

Tato kapitola navazuje na základy solid-state nukleární magnetické rezonance. V roztoku jsou všechny interakce, kromě chemického posunu a nepřímé spojky průměru, vztaženy na nulu tepelných pohybů molekul. Solid-state NMR spektra se zaměřuje na několika jader, jako jsou C nebo N. Registrace a získání spektra s několika tisíci skenováními trvá velmi dlouhou dobu. Ačkoli solid-state NMR se nyní rutinně používá pro identifikaci a strukturální studie organických látek, je méně často používána v kvantifikačních studiích. Proces ověření vyžaduje testování linearitu, robustnosti, specifity a selektivity, stejně jako ověření parametrů přesnosti: nejistota měření, reprodukovatelnost a srovnatelnost. Analytické metody založené na solid-state NMR jsou stále oblíbenější, je možné získat kvantitativní nebo téměř kvantitativní výsledky pro různé typy materiálů, jako jsou nejrůznější potraviny, půda, rostliny nebo vzorky jiného přírodního původu. NMR spektroskopie je jednoduchý a spolehlivý způsob kvantifikace látky, bez ohledu na to, zda existuje jako čistý lék, nebo v lékových formách [4].

2.4. MICROCOIL NMR

Existuje mnoho potenciálně zajímavých vědeckých studií, které však nelze provést pomocí NMR kvůli nízké citlivosti techniky, která také vylučuje mnoho studií dynamických procesů na krátkých lhůtách. Ve snaze zvýšit citlivost NMR různými technologickými postupy byly popsány metody, z nichž jedna používá velmi malé, vysoce citlivé detektory na rádiové frekvenci (RF). V tomto systému jsou hmotnostně omezené vzorky rozpuštěny ve velmi malých objemech (nejčastěji nanolitry až mikrolitry) s rozpouštědlem tak, aby odpovídaly objemu cívky RF. Existuje mnoho problémů, včetně optimalizace statické a radiofrekvenční homogenity magnetického pole nad vzorkem a efektivní vnesení malých objemů vzorků do detektoru. Výhodou malých cívek je, že signály z nečistot rozpouštědla jsou mnohem méně problematické při menších objemech vzorků a množství deuterovaných rozpouštědel může být výrazně sníženo oproti NMR spojenému se separací. Malé cívky umožňují konstrukci obsahující více než jednu cívku. Relativně nová oblast použití více cívek vypadá velmi slibně a umožňuje provedení zcela nových druhů experimentů [5].

2.5. POHLED NA qNMR SPEKTROSKOPII V ANALÝZE LÉČIV

Kvalitativní NMR spektroskopie může být uplatňována pro účely identifikace a kvantitativního hodnocení nečistot drog a složení polymerů. NMR spektroskopie je základní metodou měření a lze ji také použít pro vyhodnocení kvality léčiv a pomocných látek. Umožňuje identifikovat lék srovnáním H nebo C NMR spekter zkoušené látky a referenční látky. I když jsou hlášeny četné příklady použití kvantitativní NMR spektroskopie, mezinárodní lékopisy umožňují použití jen v omezené míře, a to pro účely identifikace a kvantitativní NMR spektroskopie pro hodnocení nečistot drog a složení polymerů. Látka musí být rozpuštěna ve správném deuterovaném rozpouštědle. Potřebné množství rozpouštědla je kolem 0,7 ml. qNMR analýza je často přesnější než standardní metody HPLC. Za normálních okolností, bez izolace nečistot, nejsou nutné drahé chemické referenční látky a strukturální informace nečistot, isomerů, atd. Další výhodou je skutečnost, že pro stanovení čistoty léku není třeba určit všechny nečistoty [6].

3. UNIVERZÁLNÍ POUŽITÍ NMR

3.1. VYŠETŘOVÁNÍ VÍCEKOMPONENTNÍ DROGY NMR SPEKTROSKOPÍÍ

Tato kapitola zkoumá vliv variace parametrů, které mohou být upraveny tak, aby bylo dosaženo optimálního oddělení signálu. Dostatečné oddělení signálu může ovlivnit druh rozpouštědla nebo hodnota pH roztoku. Lze použít různé koncentrace vzorku nebo pomocná činidla, jako jsou cyklodextriny, které mohou být do roztoku přidány. V NMR spektroskopii je chemický posun v přímém vztahu ke struktuře molekuly. Takže pro sloučeniny, které vykazují pouze nepatrné rozdíly v jejich chemických strukturách, může být obtížné oddělení jejich jednotlivých signálů. V některých případech ovlivňuje oddělení signálu také teplota. Na rozdíl od chromatografických metod, jako je např. HPLC, NMR spektroskopie nabízí jen několik parametrů, které mohou být optimalizovány tak, aby bylo dosaženo optimálního oddělení signálu. Hlavní výhodou NMR spektroskopie je její účinnost i v důsledku nedostatku jakýchkoli časových příprav [7].

3.2. APLIKACE NMR PRO CHARAKTERIZACI POLYMERŮ

Polymery jsou široce používány jako pomocné látky pro léky a formulace, nebo jako účinné látky. Konvenční chromatografické metody často selhávají vzhledem k jejich polymerním strukturám a to z různých důvodů jako například nedostatek vhodných standardů. Prostřednictvím aplikovaných příkladů rutinní analýzy je uvedena schopnost a rozsah NMR spektroskopie při analýze polymerů. Různé chemické typy polymerů se strukturálně liší, a proto se uplatňuje široká oblast aplikací pro získání lepšího přehledu o jejich strukturách. NMR spektroskopie v kapalinách v současné době hraje, zejména pro chemiky, hlavní roli při určování struktury sloučenin. Kvantitativní analýza umožňuje využití externích a interních standardů a dobře koreluje s dokumentovanou Fourierovou transformací (FT) / IR (infračervenou). Chceme-li získat lepší rozlišení signálu a spektrálně podrobnější informace, je doporučeno použití NMR spekter naměřených při vysoké teplotě. Kromě své klasické oblasti kvalitativní analýzy,

je qNMR vhodnou metodou pro kvantifikaci emulgátorů v lékových formách. Emulgátory se často skládají ze základních struktur, které představují směs podobných molekul [8].

3.3. NMR SPEKTROSKOPIE PŘÍRODNÍCH LÁTEK

K výrobě analytického standardu musí být účinné látky, izolované z rostlinného nebo živočišného zdroje, přečištěny. V návaznosti na tyto postupy je třeba pro analytické metody, které umožňují od samého začátku stanovení přečištěné účinné látky, vytvoření primárního standardu, a to prostřednictvím NMR spektroskopie. NMR spektroskopie je vhodná kvalitativní i kvantitativní metoda pro analýzu složité směsi na bázi přírodních extraktů a to bez standardu, který odpovídá přírodním látkám, pouze pomocí jednoho dobře definovaného umělého standardu. Molární odezva v NMR spektrech poskytuje podmínky pro tento postup. Ve spektru ^1H NMR rostlinného extraktu můžeme určit téměř všechny rozpustné molekuly, protože NMR detekce je založena na buněčné odpovědi. Další krok v analýze NMR přírodních látek je charakterizace a definice primárních a sekundárních referenčních standardů. Stanovení složení mastných kyselin v tucích a olejích lze provést běžně NMR [9].

3.4. SOLID-STATE PŘI ANALÝZE DROGY V LÉKOVÉ FORMĚ

Tato metoda je vhodná pro studium struktury a konformace, analýzu molekulárních pohybů (relaxační a výměnná spektroskopie) a měření vzdáleností jednotlivých jader. Přiřazení rezonancí je spolehlivější pomocí spektrální editace a dvourozměrné korelační spektroskopie. Používá se i ve spojení s jinými technikami. Práškové vzorky jsou ponechány v jejich původní podobě, vzorky v lékové formě stačí rozdrtit a látky izolované z rostlin mohou být použity i pro další testy. Obecně platí, že v případě, že jsou dvě nebo více molekul v asymetrickém postavení, budou pozorovatelné ve spektrech v důsledku schopností solid-state NMR a budou obsahovat podrobnější informace o molekulární geometrii. Při měření dipolární spojky je zapotřebí vzorky, které obsahují jednoduché spinové systémy, izolovat v krystalové struktuře. Cílem studií, týkajících se výpočtů chemických posunů, je umožnit predikci solid-state struktury. V mezinárodních lékopisech neexistuje příklad aplikace solid-state NMR, i když tento postup je vhodný zejména pro charakterizaci farmaceutických polymorfů a může být cenným nástrojem pro řešení problémů v oblasti regulace [10].

3.5. METABOLICKÉ PROFILOVÁNÍ

Metabolické profilování je určeno především pro experimentální design, sběr a zpracování dat. Metabolické profilování zahrnuje identifikaci a kvantifikaci specifických endogenních metabolitů. Zaměřuje se na jednotlivé třídy sloučenin (např. polárních lipidů, izoprenoidů, sacharidů, aminokyselin), nebo na meziprodukty určité metabolické dráhy. Vzhledem k jeho kvantitativní a selektivní povaze, může být metabolické profilování užitečné i v klinických diagnostických prostředích, v oblasti drog a charakterizace vlivu genetických modifikací na metabolismus. Mezi parametry, které mohou ovlivňovat metabolické profilování, patří genotyp, fenotyp, ekotyp, pohlaví, věk, strava a životní prostředí. Pečlivý výběr NMR parametrů při sběru dat je nutný k produkci nejlepších možných údajů pro posuzovaný systém, a je nezbytné, aby všechny datové sady byly pořízeny se stejným souborem parametrů. Jedinou překážkou při použití metabolického profilování dat pro vykreslení biologických závěrů je, že

často chybí důkladné zprávy o datech, jako jsou údaje o získávání a zpracování parametrů [11].

3.6. DOSY NMR ANALÝZA LÉČIV

Difúzně uspořádaná spektroskopie (DOSY) je metoda, která translační samodifúzí molekul v roztoku umožňuje přesnější analýzu složité směsi bez předchozí separace jednotlivých složek. DOSY experiment se liší od obvyklých moderních NMR experimentů, protože moderní NMR experimenty jsou založeny na analýze časové závislosti signálu. Tyto techniky umožňují zajištění kvality léčivých přípravků a jsou používány farmaceutickými analytiky. Kromě toho by tyto techniky mohly být užitečné při určování vztahů mezi jednotlivými vzorky, a tak by mohly pomoci při vyšetřování zdrojů těchto léků. DOSY NMR může být využita k řešení jinak neřešitelných spekter směsí, k určení velikosti molekul a agregátů nebo stanovení stupně polymerace [12], [33].

4. SPECIÁLNÍ APLIKACE

4.1. NMR SMĚSI NA BÁZI ANALÝZY NA PŘÍKLADU KVALITY OVOCNÝCH ŠŤÁV

Směsná analýza rychle získává význam pro nukleární magnetickou rezonanční spektroskopii (NMR), zejména z důvodu farmaceutických aplikací. Podrobné informace jsou nutné pro kontrolu kvality potravinového materiálu. NMR se používá k získání statistických informací a kvantifikuje předdefinovanou sadu sloučenin pro každý zkoumaný vzorek. Průtoková injekční NMR je používána při aplikacích, kdy je zajištěna vysoká propustnost a nízké náklady na provoz. Příprava se skládá z vyrovnávací paměti a následného míchání. Šťávy s pevnými částicemi, jako je například pomerančový džus, musí být navíc před vyrovnávací pamětí centrifugovány. Náklady na vzorky jako takové mohou být podstatně sníženy, je možnost testovat mnohem větší sady vzorků pro vyšší bezpečnost spotřebitelů. Popsaná metodika pro kvalitu ovocné šťávy je jen jedním z příkladů z nového oboru žádostí o statistické a kvantitativní analýzy směsí, které mohou být převedeny do lékařských a farmaceutických aplikací. Jako databáze referenčních sloučenin je k dispozici i pro $\text{pH} = 7$, kde se měří většina tělesných tekutin [13].

4.2. NMR PRO TESTY SACHARIDŮ VE VAKCÍNÁCH

Metody pro určení totožnosti a čistoty KPSS jsou kombinací kolorimetrické metody pro různé typy sacharidů nebo substituentů. NMR spektroskopie poskytuje spektrum charakteristické pro ty sacharidy, které jsou citlivé na malé strukturální rozdíly, jako jsou změny v jedné vnitřní vazbě v cukru. Obvykle není známo, zda je faktor odezvy v těchto testech pro 2,6-dideoxy-2-amino-cukru stejný jako u jednoduchých amino-cukrů nebo jednoduchých 6-deoxy cukrů. Pokrytí je neúplné, bez specifikace pro obsah O-acetylu u některých sérotypů. Limity specifikace k fosforu v pneumokokových KPSS, které neobsahují fosfátové skupiny, jsou nepřímě úměrné obsahu C-polysacharidů. Odlišný přístup, přechodný mezi tradiční mokrou chemickou

metodou a NMR metodou otisku prstu, je použití charakteristické rezonance ve spektru NMR a pro výpočet proporcí jiných typů sacharidových zbytků, které jsou v sacharidu obsaženy, v těchto případech N-acetylhexosamin skupin, O-acetyl skupin a 6-deoxycukrů. Některé z nových Glykokonjugovaných vakcín, jako jsou vakcíny proti tyfu a proti bakterii *Staphylococcus aureus*, využívají extrémně stabilní polysacharidy, které může NMR metoda prokázat pouze při životaschopnosti bakterie [14]

4.3. FLUOR-19 NEBO FOSFOR-31 NMR SPEKTROSKOPIE

NMR analýza fluorovaných nebo fosforylovaných léků nebo farmaceutických přípravků pomocí fluoru-19 NMR nebo fosforu-31 jsou jako analytické postupy také diskutovány. Fluor-19 a fosfor-31 nukleární magnetické rezonance poskytují velmi specifický nástroj pro detekci, identifikaci a kvantifikaci. Analyzuje všechny sloučeniny obsahující fluor nebo fosfor, včetně neočekávaných látek najednou. Fluor-19 a fosfor-31 NMR jádra mají charakteristiku jaderného spinu 1/2, relativně úzké linky, 100% přírodní bohatství, vysokou citlivost pro fluor-19 a fosfor-31 jádra. Mají také velký chemický rozsah, který minimalizuje překrývání signálu. Důležitou výhodou specifické ^{19}F NMR je, že eliminuje rušivé pozadí signálů i zanedbatelnou úroveň endogenních mobilních fluorovaných metabolitů s nízkou molekulovou hmotností. Kromě toho F a P NMR biologických matric nebrání dynamickému rozsahu, s čímž se setkávají protonové NMR vzhledem k intenzivnímu signálu protonů vody, které musí být potlačeny. Navzdory své omezené citlivosti, mohou být F a P NMR považovány za současně hojně používané chromatografické techniky pro analýzu tělních tekutin nebo farmaceutických přípravků [15].

4.4. KVANTITATIVNÍ 2D NMR ANALÝZA GLYKOSAMINOGLYKANŮ

Monodimensionální nukleární magnetická rezonanční spektroskopie se v současné době používá pro strukturální charakterizaci GAG, je rovněž spolehlivá pro kvantitativní měření, pokud jsou signály dostatečně odděleny. GAG jsou polysacharidy, tvořené z opakujících se disacharidových jednotek hexuronové kyseliny a hexosaminů. GAG můžeme najít v plazmatických membránách i extracelulární matici, včetně jejich podčeledí, galactosaminoglykany (nejreprezentativnější jsou chondroitiny a dermatan sulfát) a glukosaminoglykany heparinu a heparan sulfátu. Pro přiřazení struktury a kvantitativní profilování GAG živočišného původu, zejména heparinu a heparansulfátu a jejich fragmentů, vytvořené enzymatickou nebo chemickou depolymerací, byly vyvinuty některé metody. Mezi nejhlavnější patří vysoko účinná kapalinová chromatografie (HPLC) nebo kapilární elektroforéza (CE) a hmotnostně spektrometrické analýzy (MS). Nukleární magnetická rezonanční spektroskopie je jedna z mála metod, které poskytují strukturální informace o polymeru, bez známky změny, aby se zabránilo možné ztrátě strukturních informací v důsledku rozpadu polymeru. Předpokladem 2D NMR kvantitativního přístupu je správný výběr analytických signálů mezi těmi s podobnou magnetickou relaxací a jednoduchou vazbou na proton uhlíku. Tato metoda může být použita pro vysoko- i nízko-molekulární GAG, i když některá omezení, je třeba zvážit [16].

4.5. VYUŽITÍ PROTONOVÉ NMR JAKO ALTERNATIVY PŘI ANALÝZE AMINOKYSELIN

Pomocí NMR může být určeno složení aminokyselin (AAA), relativní množství (poměr) a absolutní obsah aminokyselin v peptidu. Použití protonové NMR bylo navrženo pro určení identity peptidů. Protonovou NMR lze snadno rozlišit a identifikovat všechny peptidy, které jsou v současné době popsány v Evropském lékopisu. Použití protonového NMR spektra bylo zjištěno při 400 MHz. Identifikace je přímočarý a jednoduchý proces ve srovnání s úrovní odpovídající peptidu a probíhá bez jakýchkoliv výpočtů. Dokonce i peptidy, které se odlišují jen velmi mírně, lze snadno rozlišit. Proton a Carbon-13 NMR spektra snadno rozliší všech 20 přirozeně se

vyskytujících aminokyselin a identifikují i neobvyklé aminokyseliny, které jsou obsaženy v syntetických peptidech. Protonové NMR spektrum peptidu závisí v první řadě na relativních množstvích a identita se odvíjí od pořadí aminokyselin v peptidu. Tyto informace týkající se identity peptidu jsou stejné jako informace získané z AAA. Z vědeckého hlediska je NMR vhodnou alternativou pro AAA. Pro zvýšení reprodukovatelnosti spektra se používá pufr, díky kterému se sníží pH, má vliv na chemické posuny a umožňuje zabránit shlukování molekul. Použití NMR jako zkoušky identity u větších peptidů může dělat problémy. Spektra jsou hůře rozlišitelná, což je dáno jednak rostoucím počtem rezonancí a širšími signály v důsledku slabších vazeb, což má na svědomí velikost molekul a, v některých případech, seskupování [17].

4.6. HODNOCENÍ INHIBIČNÍ ÚČINNOSTI ANTIBIOTIK MRI

Magnetická rezonance (MRI) umožňuje posoudit inhibiční účinnost antibiotik v bakteriálních kulturách. MRI umožňuje in vivo šetření ve zvířecích modelech a lidských subjektech. Běžně používá ke sledování progresu onemocnění u pacientů a její využití pro hodnocení léčiv je vzácné. Ve velkém měřítku hodnocení inhibiční účinnosti antibiotik může poskytnout nový přístup k identifikaci léčiv. MRI je neinvazivní a měření není v rozporu s různými kulturami. Rovněž nevyžaduje samostatné excitace nebo detekce jednotlivých vzorků. To umožní identifikovat zpomalení růstu bakteriálních kultur pomocí měření příčné relaxační doby. Fyzikální parametry, které jsou obvykle měřeny pomocí MRI, a týkají se fyziologických nebo patologických událostí na lidech nebo zvířatech, nemohou být přímo přeloženy do experimentů s bakteriálními kulturami. Za přiměřených podmínek růstu se bakterie zředí v médiu. Z tohoto důvodu je parametr hustoty spin, který se přímo převádí na obsah vody, není proto vhodný pro kultury. Při prodloužení doby měření může prošetřit kolem 10 000 vzorků současně [18].

4.7. MULTIPLE ONLINE SPEKTRÁLNÍ ANALÝZA PRO CHARAKTERIZACI DROGOVÝCH A PŘÍRODNÍCH PRODUKTŮ

Propojení UV, IR, MS a nukleární magnetické rezonanční spektrometrie do série (zřetězení) umožňuje sériová průtoková injekční analýza a zajišťuje tak provedení komplexní spektrální analýzy dat z jedné injekce čistého analytu. Dostupnost těchto průtokových komůrek umožňuje rutinní spojení těchto metod, buď průtokové injekční analýzy (FIA), separací pomocí kapalinové chromatografie (LC), kapilární elektrochromatografií, superkritickou fluidní chromatografií (SFC), nebo kapilární elektroforézou (CE). V situacích, kdy jsou požadována spektroskopická data z více než jedné techniky, mohou být použity různé přístupy v závislosti na tom, zda je vzorek předmětem šetření nebo zda je předkládán ve formě jediné čisté sloučeniny nebo komplexní směsi. Konvenční přístup k tomuto druhu problému by byla jedna analýza po druhé s využitím různých spektroskopických technik v pořadí, dokud všechny požadované informace nebudou získány. Nicméně, takový lineární přístup je časově náročný a pravděpodobně nedokáže využít stávající možnosti dostupných přístrojů. Alternativa k tradičním přístupům je využít pokroků v toku cell/interface technologie, která spojuje požadované spektroskopické techniky společně v jednom systému [19].

4.8. KVANTITATIVNÍ ONLINE NMR SPEKTROSKOPIE S VYSOKÝM ROZLIŠENÍM VE VYŠETŘOVÁNÍ SLOŽITÝCH SMĚSÍ

Kvantitativní online NMR spektroskopie je metodou volby pro vyšetřování složitých směsí tekutin z analyticky podobných sloučenin, kde další analytické metody nedosahují dostatečného rozdělení komponent. Jako online spojka spektrometrů NMR byla nejprve vyvinuta vysoko účinná kapalinová chromatografie (HPLC), superkritická fluidní chromatografie (SFC) a NMR jako analytický detektor s vysokou spektrální disperzí. Hlavní výhodou NMR spektroskopie je, že ve většině případů není potřeba žádná kalibrace pro kvantifikaci a metoda má vysokou linearitu mezi absolutní oblastí signálu a koncentrací vzorku. Kromě toho, on-line NMR spektroskopie umožňuje vyšetřování při zvýšeném tlaku, brání rozpuštění při varu a používá se pro studie v

provozních podmínkách. Použití toku NMR pro sledování koncentrace chemických součástí v průběhu reakce poskytuje vysoce kvalitní kvantitativní údaje. Budoucí aplikace mohou zahrnovat zavedení těchto zařízení, která používají NMR detekci, do chemických továren, k odběru vzorků a samotnou reakci v reálném čase [20].

5. NMR POLYMERŮ

5.1. MIKROSTRUKTURA POLYMERNÍCH ŘETĚZCŮ

Polymery jsou často syntetizovány z asymetrických monomerů, což vede k možnosti, že příchozí monomer se může přidat do řetězce ve třech různých orientacích: „head-to-head“, „head-to-tail“ nebo „tail-to-tail“. „Head-to-head“ připojení bez doprovodné „tail-to-tail“ jednotky budou vyplývat z rekombinace rostoucích řetězcových radikálů, ale v tomto případě může být pouze jedno takové připojení na řetězu. Obecným předmětem regioisomerismu a jeho matematické důsledky byly prozkoumány vědci Caisem a Sloanem. Navrhli termíny *isoregic* a *syndioregic*, popsali sekvence „head-to-tail“, „head-to-head“ a „tail-to-tail“, a tato nomenklatura je všeobecně přijímána. Ve vinylových polymerech jsou v hlavním řetězci substituované uhlovodíky, které se běžně označují jako A-uhlíky, nazývané "pseudoasymmetric", protože váží čtyři různé substituenty a mají možnost relativní otáčivosti. Nejjednodušší pravidelné uspořádání podél řetězce je izotaktická struktura, ve které jsou všechny substituenty, zde představované jako R, orientovány na stejnou stranu roviny řetězce, trans konformace, a syndiotaktické uspořádání, ve kterém se střídají skupiny ze strany na stranu. V ataktickém uspořádání jsou skupiny R umístěny náhodně na obou stranách klikaté roviny. Je třeba zdůraznit, že tyto isomerní formy nemohou být zařazeny do skupiny R rotujících kolem vazby uhlík-uhlík v hlavním řetězci [21].

5.2. CHARAKTERIZACE POLYMERŮ

Jedním z hlavních využití NMR v polymerní vědě, je charakterizace materiálů, které zajišťují vazbu mezi syntézou nových materiálů a strukturou dříve syntetizovaných materiálů. V mnoha polymerech závisí tepelné, mechanické, optické a elektronické vlastnosti na řetězové mikrostruktuře. Úroveň, na které může být mikrostruktura objasněna, závisí na rozlišení metod pro stanovení rezonance. Rozlišení závisí na řadě faktorů, včetně jader sledovaného řetězce, na dynamice, koncentraci, teplotě a rozpouštědle. Rozlišení je nejlepší, když pozorujeme jádra s širokou škálou

chemických posunů. Mnohé polymery jsou rozpustné, což nepředstavuje vážné experimentální omezení [22].

5.3. SOLID-STATE NMR POLYMERŮ

Většina používaných polymerů je v tuhém stavu a pochopení vlastností pevných polymerů je důležitým faktorem rozvoje pevných NMR metod. Solid-state NMR byla použita pro charakterizaci polymeru, protože může poskytnout informace o polymerech v širokém rozsahu délkových stupnic. Nejpodrobnější jsou informace o konformaci řetězce, které mohou být získány z chemických posunů. Na rozdíl od situací, kde je velké množství molekulárních pohybů, jsou řetězce v krystalických a amorfních polymerech pevnější, takže chemické změny odrážejí skutečné řetězcové konformace. NMR se rovněž ukázala jako užitečná pro studium vícefázových pevných polymerů, protože polymery v různých prostředích, mají různé molekulární dynamiky a různé časy NMR relaxace. Tyto rozdíly mohou být využity tak, že lze pozorovat NMR signály z určité fáze materiálu. Tímto způsobem je možné selektivně pozorovat krystalické, amorfní, mezifázové a pružné materiály [23].

6. NMR SPEKTROSKOPIE A JEJÍ APLIKACE PRO BIOMEDICÍNSKÝ VÝZKUM

6.1. DVOJROZMĚRNÁ NMR SPEKTROSKOPIE

Dvojměrnou NMR spektroskopii můžeme rozdělit na homonukleární a heteronukleární. Experimenty jsou popsány pomocí vizuálních popisů vývoje spinového systému a procesů koherence přenosu. Tento způsob popisu umožňuje diskusi o jakémkoli vícerozměrném, multinukleárním sledu impulzů ze strany přístupu shora dolů. Dvou-dimenzionální NMR spektroskopie se stala základem experimentů v mnoha disciplínách. Použití dvou- a více-dimenzionální NMR umožnilo značně pokročilé aplikace NMR biochemických systémů. Dvojměrné metody způsobily revoluci ve studiu makromolekul v NMR spektroskopii. Na začátku makromolekulární NMR byly jedinou možností k dispozici jednorozměrná spektra rezonancí. Každá analýza NMR experimentů stále vyžaduje dobře vyřešené rezonance, ale řešení nástrojů, z nichž se může čerpat, je nyní mnohem větší. Současný trend ve studiu větších molekul je získat 3D, 4D a dokonce i vyšší rozměrová spektra izotopicky značených molekul. Je vždy dobré získat data z nejjednodušších experimentů. V případě, že údaje lze jednoznačně získat z jednorozměrného NMR spektra, není skutečná potřeba použít dvourozměrné spektroskopie. Stejně tak může být mnoho problémů spojených s velkými molekulárními systémy vyřešeno použitím jednoduchých dvojměrných metod [24].

6.2. MULTIDIMENZIONÁLNÍ NMR SPEKTROSKOPIE MAKROMOLEKUL

Nedávné pokroky, zejména v heteronukleární a vícerozměrné nukleární magnetické rezonanci (NMR), umožnily osvětlit trojrozměrné struktury stále složitějších proteinů s pozoruhodnou přesností. Tento vývoj výrazně zvýšil význam NMR v biomedicíně, kde mnoho cílených proteinů, nukleových kyselin, nebo proteinových komplexů, nebylo přístupno konvenčním dvourozměrným metodám protonové NMR. Multidimenzionální NMR spektroskopie se vyvinula v mocný univerzální analytický nástroj pro charakterizaci struktur nejrůznějších biomolekul v

roztoku. Po pochopení základního principu 2D NMR spektroskopie byly položeny základy pro geometrický růst široké škály dvou a vícerozměrných NMR experimentů, které se aplikují na řešení stále rostoucí řady analytických a strukturálních problémů. Velké pokroky v oblasti výpočetní techniky usnadnily impozantní růst NMR jako výzkumného nástroje. Výpočetní technika poskytla nástroje pro zpracování mnohorozměrných dat a působivé pokroky v NMR spektroskopickém designu. Revoluční průlom v oblasti biotechnologie nastolila příprava vzorků, mutantních makromolekul a začlenění stabilních izotopových štítků do biomolekul [25].

6.3. IZOTOPICKY OBOHACENÉ PROTEINY PRO NMR SPEKTROSKOPII

Vývoj v oblasti biotechnologie umožňuje snadné a úsporné začlenění ^2H , ^{13}C a ^{15}N izotopových značek do bílkovin a to buď rovnoměrně nebo selektivně. Došlo k prudkému nárůstu v počtu pokusů nukleární magnetické rezonance (NMR), které mohou využitím izotopového značení získat rezonance a dostat strukturální, dynamické, a biologické informace. Isotopicky obohacené proteiny se používají u organismu, který potom vyjadřuje či nadměrně exprimuje zkoumaný protein. Izotopové obohacení pomocí fotosyntetické bakterie, řasy, kvasinky, nebo savčích expresních proteinů, je považováno za několik způsobů obohacení, které nepoužívají expresi proteinů [26].

6.4. STANOVENÍ STRUKTURY PROTEINŮ Z NMR DAT

Významný pokrok byl v posledních letech zaznamenán ve stanovení struktury bílkoviny z nD NMR dat. Ve srovnání s původní nukleární magnetickou rezonancí (NMR konstrukcí) před deseti lety, se dnes určují mnohem větší molekuly s vyšší přesností a stanovení probíhá i v mnohem kratších časech. NMR je nyní zcela komplementární k rentgenové difrakční analýze a NMR struktury jsou rovněž akceptovány širší vědeckou komunitou. Používají se k určení přesné struktury, což představuje asi 20% nových struktur stanovených v posledních několika letech. Důležitý je vývoj vícekanálových spektrometrů, hardwarové pokroky a vývoj nepřímých detekčních technik. Ostatní pokroky jsou umožněné díky neustálému zlepšování v oblasti počítačového hardwaru a softwaru a také značné pokroky v technikách pro výpočet proteinové struktury pomocí NMR dat. Kromě toho došlo ke značnému nárůstu počtu lidí, kteří používají NMR techniky pro stanovení struktury proteinu. To je vidět na velmi zvýšené návštěvnosti a počtu rozhovorů na poslední biologických NMR konferencích. I přes tento veliký nárůst je stále toto téma v jeho relativním dětství [27].

6.5. TECHNIKY NMR STUDUJÍCÍ DYNAMIKU PROTEINŮ

Nedávné pokroky v oblasti vysokých rozlišení nukleární magnetické rezonanční (NMR) spektroskopie poskytly prostředky, které mohou objasnit strukturu a dynamiku makromolekul v roztoku na atomární úrovni. Použitím dvourozměrných (2D) heteronukleárních NMR technik pro měření jaderného spinu dochází k uvolnění proteinů v roztoku a následnou interpretací těchto měření se získá podrobný popis globálních a vnitřních pohybů. Pro názornost výhod a omezení těchto studií, a k prokázání typu informací, které jsou získány, se používají některé techniky stafylokokové nukleázy (SNasy) v přítomnosti a nepřítomnosti ligandů. Protonové heteronukleární dvourozměrné NMR techniky měření poskytují mocný nástroj, kterým se charakterizují vnitřní pohyby proteinů v roztoku. Tyto techniky se potom aplikují na konkrétní základní řetězce a místa postranního řetězce v SNase [28].

6.6. STRUKTURA A DYNAMIKA NK Z NMR

Objevem vícerozměrných metod nukleární magnetické rezonance (NMR) se otevřely nové možnosti i pro analýzu struktury nukleových kyselin a proteinů v roztoku. Jsou přezkoumávány základní metody pro získání rezonance v duplexu nukleových kyselin. Řada změn, které jsou výhodné, je popsána zejména pro složitější systémy. Zdroje pro generování přímých strukturálních informací jsou spojeny s popisem toho, jak jsou uplatňovány v systémech nukleových kyselin. Metody, na základě kterých může být určena strukturální informace, používané pro vývoj modelů a pro řešení konstrukce, jsou prezentovány spolu s NMR metodami pro analýzu dynamiky nukleových kyselin [29].

6.7. STRUKTURA A DYNAMIKA SACHARIDŮ Z NMR

Vysoké rozlišení nukleární magnetické rezonanční (NMR) spektroskopie je vhodnou metodou pro analýzu sacharidů. Jedná se o metody pro stanovení složení, sekvence, konformace a dynamiky oligosacharidů a glyko-konjugátů. Objevily se i nedávné inovace, jako jsou selektivní excitace, trojrozměrné pulzní sekvence a přechody. Význam sacharidů v biologii získává stále větší uznání. Sacharidy jsou zapojeny do řady různorodých procesů na buněčné úrovni včetně adheze buněk, clearance cirkulujících glykoproteinů, vazby protilátek, patogenů, toxinů, lymfocytů, buněčného navádění a diferenciací. Nové struktury vyskytující se na povrchu glykoproteinů a proteoglykanů jsou publikovány průběžně. Přiřazení vede k identifikaci sekvence reziduí v oligosacharidech. NMR však nemusí být nejúčinnější metodou pro primární sekvenování, nicméně je to ale účinná metoda pro stanovení konformací oligosacharidů za fyziologických podmínek a pro studium jejich interakcí s jinými molekulami. NMR může být jedinou metodou pro studium těchto aspektů, v případě že systém nebude krystalizovat. Dochází k růstu důležitosti a různorodosti funkce sacharidů v kombinaci s technickým rozvojem a vede k ještě rychlejšímu pokroku v chápání této třídy biomolekul [30].

6.8. SOLID-STATE NMR A JEJÍ APLIKACE PRO BIOMEDICÍNSKÝ VÝZKUM

Multidimenzionální nukleární magnetické rezonance (NMR) se ukázala jako cenný nástroj pro stanovení struktury a dynamiky biologických molekul v roztoku. NMR se často využívá v kombinaci s rentgenovou difrakcí a molekulárními mechanickými výpočty k určení, do jaké míry jsou zachovány vlastnosti roztoků v pevném skupenství. Mnoho biologických molekul bylo připraveno jako jednotlivé krystaly. Kromě toho, že může mít zásadní vliv na strukturu a dynamiku jednotlivých molekul přítomnost rozpouštědla, může také změnit povahu mezimolekulárních interakcí. Metody používané při studiu pevných vzorků syntetických polymerů a anorganických skel mohou být použity i pro biologické zájmy. Počet aplikací, ve kterých je k dispozici solid-state NMR, zvýšil znalosti o biologických materiálech a o procesech, probíhajících v molekule [31].

Tab. č. 2: Přehled druhů NMR, jejich výhody, nevýhody a použití

Metoda	Výhody	Nevýhody	Použití	Zdroj
qNMR	<ul style="list-style-type: none"> ○ Přidáním standardu směsi získáme absolutní výsledky (obsah, koncentrace) ○ Krátká doba měření ○ Nedestruktivní charakter ○ Není nutná předchozí izolace analytu ze směsi – snadná příprava a manipulace 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Nízká citlivost ve srovnání s ostatními spektroskopickými a chromatografickými metodami 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Určení struktury látky na molekulární úrovni ○ Hodnocení nečistot drog, kvality léčiv a pomocných látek, hodnocení složení polymerů 	[3]
qNMR v tuhém stavu	<ul style="list-style-type: none"> ○ Součástí je ověření linearity, robustnosti, specifity a selektivity ○ Ověření parametrů přesnosti: nejistota měření, reprodukovatelnost, srovnatelnost 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Získání spektra trvá dlouhou dobu 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Rutinní použití pro identifikaci a strukturální studie org. látek ○ Téměř kvantitativní výsledky pro vzorky potravin, půdy, rostlin nebo i jiného přírodního původu ○ Kvantifikace látky jako čistého léku i v lékových formách 	[4]
Microcoil NMR	<ul style="list-style-type: none"> ○ Signály z nečistot rozpouštědla jsou mnohem méně problematické ○ Množství deuterovaných rozpouštědel může být výrazně sníženo ○ Zvýšení citlivosti 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Mnoho problémů (optimalizace statické a radiofrekvenční homogenity magnetického pole nad vzorkem a efektivní vnesení malých objemů vzorků do detektoru) 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Umožňují konstrukci obsahující více než jednu cívkou – nová řada NMR experimentů 	[5]
Metabolické profilování	<ul style="list-style-type: none"> ○ Zaměřuje se na jednotlivé třídy sloučenin nebo meziprodukty metabolické dráhy ○ Umožní charakterizaci vlivu genetických modifikací na metabolismus 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Často chybí zprávy o datech, jako jsou údaje o získávání a zpracování parametrů pro vykreslení biologických závěrů ○ Parametry které ovlivňují profilování – genotyp, fenotyp, ekotyp, pohlaví, věk, strava životní prostředí 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Experimentální design, sběr a zpracování dat ○ Identifikace a kvantifikace specifických endogenních metabolitů 	[11]
DOSY NMR	<ul style="list-style-type: none"> ○ Přesná analýza složité směsi bez předchozí separace 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Vyšetřování zdrojů léků ○ Určení velikosti molekul a agregátů ○ Stanovení stupně polymerace 	[12], [33]
F-19, P-31	<ul style="list-style-type: none"> ○ Specifický nástroj 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Omezená citlivost 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Analýza tělních 	[15]

NMR spektroskopie	pro detekci, identifikaci a kvantifikaci <ul style="list-style-type: none"> ○ Velký chemický rozsah – minimalizace překrývání signálu ○ Eliminuje rušivé pozadí signálu 		tekutin nebo farmaceutických přípravků <ul style="list-style-type: none"> ○ Analýza všech sloučenin, které obsahují fluor nebo fosfor, včetně neočekávaných látek najednou 	
Protonová NMR	<ul style="list-style-type: none"> ○ Přímochárý a jednoduchý proces ve srovnání s úrovní peptidu ○ Probíhá bez jakýchkoliv výpočtů ○ Rozliší i peptidy, které se liší jen mírně 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Jako zkouška identity všech peptidů nemusí být adekvátní ○ Hůře rozlišitelná spektra v případě seskupování nebo rostoucím počtem rezonancí 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Určení složení aminokyselin, relativní množství a absolutní obsah aminokyselin v peptidu ○ Identifikace peptidu, rozliší jak přirozeně se vyskytující aminokyseliny tak i aminokyseliny neobvyklé 	[17]

ZÁVĚR

Cílem této práce bylo shrnutí využití NMR, jednotlivých typů této metody a jejich výhody a nevýhody. Konkrétně jsem se snažila zaměřit na analýzu léčiv pomocí nukleární magnetické rezonance a stanovení biomolekul v těle, i sloučenin cizího původu.

Práce je členěna na několik částí. První a druhá kapitola se zabývá obecnými náležitostmi NMR. Konkrétněji první kapitola pojednává o základních pojmech, které se týkají nukleární magnetické rezonance, principech této metody a přístrojovém uspořádání. V další kapitole jsem se snažila rozebrat základní principy a techniky nukleární magnetické rezonance. Kapitola se zabývá i několika typy NMR, jejich použitím, výhodami i nevýhodami.

Třetí a čtvrtá kapitola zahrnuje použití samotné NMR. Shrnutí látek, sloučenin i biomolekul, které mohou být touto metodou stanoveny a další využití NMR.

Další kapitola se zabývá polymery a to jak jejich základní strukturou a charakterizací, tak i samotným stanovením ve vzorku.

Poslední kapitola obsahuje další možnosti využití metody ve stanovení látek tělu vlastních, jako jsou například proteiny, nukleové kyseliny nebo sacharidy.

ZDROJE

1. http://cs.wikipedia.org/wiki/NMR_spektroskopie. 17.7.2013
2. B. Diehl: Chapter 1 – Principles in NMR spectroscopy; NMR spectroscopy in Pharmaceutical Analysis; 2008, Pages 1, 3-41. ISBN: 978-0-444-53173-5. 18.7.2013
3. F. Malz: Chapter 2 – Quantitative NMR in the solution state NMR; NMR Spectroscopy in Pharmaceutical Analysis; 2008, Pages 43-62. ISBN: 978-0-444-53173-5. 18.7.2013
4. I. Wawer: Chapter 3 – qNMR in Solid State; NMR spectroscopy in Pharmaceutical Analysis; 2008, Pages 63-82. ISBN: 978-0-444-53173-5. 18.7.2013
5. A.G. Webb: Chapter 4 – Microcoil Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy; NMR Spectroscopy in Pharmaceutical Analysis; 2008, Pages 83-130. ISBN: 978-0-444-53173-5. 18.7.2013
6. U. Holzgrabe – Chapter 5 – qNMR Spectroscopy in Drug Analysis – A General View; NMR Spectroscopy in Pharmaceutical Analysis; 2008, Pages 131-137. ISBN: 978-0-444-53173-5. 18.7.2013
7. T. Beyer, U. Holzgrabe: Chapter 1 – Investigation of Multi-Component Drugs by NMR Spectroscopy; NMR Spectroscopy in Pharmaceutical Analysis; 2008, Pages 139, 141-155. ISBN: 978-0-444-53173-5. 18.7.2013
8. B. Diehl: Chapter 2 – NMR Applications for Polymer Characterisation; NMR Spectroscopy in Pharmaceutical Analysis; 2008, Pages 157-180. ISBN: 978-0-444-53173-5. 18.7.2013
9. B. Diehl: Chapter 3 – NMR Spectroscopy of Natural Substances; NMR Spectroscopy in Pharmaceutical Analysis; 2008, Pages 181-200. ISBN: 978-0-444-53173-5. 18.7.2013
10. I. Wawer: Chapter 4 – Solid-State Measurements of Drugs and Drug Formulations; NMR Spectroscopy in Pharmaceutical Analysis; 2008, Pages 201-231. ISBN: 978-0-444-53173-5. 18.7.2013
11. K.A. Kaiser, C.E. Merrywell, F. Fang, C.K. Larive: Chapter 5 – Metabolic Profiling; NMR Spectroscopy in Pharmaceutical Analysis; 2008, Pages 233-267. ISBN: 978-0-444-53173-5. 20.7.2013

12. V. Gilard, S. Trefi, S. Balayssac, M.A. Delsuc, T. Gostan, M. Malet-Martino, R. Martino, Y. Prigent, F. Taulelle: Chapter 6 – DOSY NMR for Drug Analysis; NMR Spectroscopy in Pharmaceutical Analysis; 2008, Pages 269-289. ISBN: 978-0-444-53173-5. 20.7.2013
13. M. Spraul, E. Humpfer, H. Schäfer, B. Schütz, M. Mörtter, P. Rinke: Chapter - NMR-Based Mixture Analysis on the Example of Fruit Juice Quality Control Using Statistics and Quantification; NMR Spectroscopy in Pharmaceutical Analysis; 2008, Pages 317, 319-339. ISBN: 978-0-444-53173-5. 20.7.2013
14. C. Jones, N. Ravenscroft: Chapter 2 – NMR Assays for Carbohydrate-Based Vaccines; NMR Spectroscopy in Pharmaceutical Analysis; 2008, Pages 341-368. ISBN: 978-0-444-53173-5. 20.7.2013
15. R. Martino, V. Gilard, M. Malet-Martino: Chapter 3 – Fluorine-19 or Phosphorus-31 NMR Spectroscopy: A Powerful Technique for Biofluid Metabolic Studies and Pharmaceutical Formulation Analysis of Fluorinated or Phosphorylated Drugs; NMR Spectroscopy in Pharmaceutical Analysis; 2008, Pages 369-406. ISBN: 978-0-444-53173-5. 20.7.2013
16. G. Torri, M. Guerrini: Chapter 4 – Quantitative 2D NMR Analysis of Glycosaminoglycans; NMR Spectroscopy in Pharmaceutical Analysis; 2008, Pages 407-428. ISBN: 978-0-444-53173-5. 20.7.2013
17. E. Kellenbach, K. Sanders, P.L.A. Overbeeke: Chapter 5 – The Use of Proton NMR as an Alternative for the Amino Acid Analysis as Identity Test for Peptides; NMR Spectroscopy in Pharmaceutical Analysis; 2008, Pages 429-436. ISBN: 978-0-444-53173-5. 20.7.2013
18. C. Faber: Chapter 6 – Assessment of the Inhibitory Potency of Antibiotics by MRI; NMR Spectroscopy in Pharmaceutical Analysis; 2008, Pages 437-448. ISBN: 978-0-444-53173-5. 20.7.2013
19. I.D. Wilson: Chapter 7 – Hypernation and Concatenation: Multiple On-Line Spectroscopic Analysis for Drug and Natural Product Characterisation; NMR Spectroscopy in Pharmaceutical Analysis; 2008, Pages 449-469. ISBN: 978-0-444-53173-5. 20.7.2013
20. M. Maiwald, O. Steinhof, C. Sleight, M. Bernstein, H. Hasse: Chapter 8 – Quantitative High-Resolution Online NMR Spectroscopy in Pharmaceutical Reaction and Process Monitoring; NMR Spectroscopy in Pharmaceutical Analysis; 2008, Pages 471-491. ISBN: 978-0-444-53173-5. 22.7.2013

21. F. A. Bovey, P. A. Mirau: 2- The Microstructure of Polymer Chains; NMR of Polymers; 1996, Pages 117-154. ISBN: 978-0-12-119765-0. 22.7.2013
22. F. A. Bovey, P. A. Mirau: 3- The Solution Characterization of Polymers; NMR of Polymers; 1996, Pages 155-241. ISBN: 978-0-12-119765-0. 22.7.2013
23. F. A. Bovey, P. A. Mirau: 4- The Solid-State NMR of Polymers; NMR of Polymers; 1996, Pages 243-352. ISBN: 978-0-12-119765-0. 22.7.2013
24. W. M. Westler: Chapter 1 – Two-Dimensional NMR Spectroscopy: A Graphical, “Top-Down” Description; NMR Spectroscopy and its Application to Biomedical Research; 1996, Pages 1-84. ISBN: 978-0-444-89410-6. 22.7.2013
25. L. Mueller, N. V. Kumar: Chapter 2 – Multidimensional NMR of macromolecules; NMR Spectroscopy and its Application to Biomedical Research; 1996, Pages 85-157. ISBN: 978-0-444-89410-6. 22.7.2013
26. B. J. Stockman: Chapter 3 – Preparation of ^2H , ^{13}C and ^{15}N Isotopically-enriched Proteins for NMR Spectroscopic Investigations; NMR Spectroscopy and its Application to Biomedical Research; 1996, Pages 159-185. ISBN: 978-0-444-89410-6. 22.7.2013
27. P. L. Weber: Chapter 4 – Protein Structure Determination from NMR Data; NMR Spectroscopy and its Application to Biomedical Research; 1996, Pages 187-239. ISBN: 978-0-444-89410-6. 22.7.2013
28. L. K. Nicholson, L. E. Kay, D. A. Torchia: Chapter 5 – Protein Dynamic as Studied by Solution NMR Techniques; NMR Spectroscopy and its Application to Biomedical Research; 1996, Pages 241-279. ISBN: 978-0-444-89410-6. 22.7.2013
29. D. E. Wemmer: Chapter 6 – Nucleic Acid Structure and Dynamics from NMR; NMR Spectroscopy and its Application to Biomedical Research; 1996, Pages 281-312. ISBN: 978-0-444-89410-6. 22.7.2013
30. L. E. Lerner: Chapter 7 – Carbohydrate Structure and Dynamics from NMR; NMR Spectroscopy and its Application to Biomedical Research; 1996, Pages 313-344. ISBN: 978-0-444-89410-6. 22.7.2013
31. A. Simmons, S. K. Sarkar, L. W. Jelinski: Chapter 8 – Solid State NMR and its Applications to Biomedical Research; NMR Spectroscopy and its Application to Biomedical Research; 1996, Pages 345-380. ISBN: 978-0-444-89410-6. 22.7.2013

32. I. S. Oliveira, T. J. Bonagamba, R. S. Sarthour, J. C.C. Freitas, E. R. deAzevedo:
2 – Basic concepts on nuclear magnetic resonance; NMR Quantum Information
Processing; 2007, Pages 33-91. ISBN: 978-0-444-52782-0. 23.7.2013
33. <http://chem.ch.huji.ac.il/nmr/techniques/other/diff/diff.html>. 22.8.2013
34. http://en.wikipedia.org/wiki/Nuclear_magnetic_resonance. 14.8.2013
35. P. Klouda – Moderní analytické metody; ISBN-10: 80-86369-07-2. 21.8.2013