



---

# **Přirazení struktur reaktivátorů organofosfáty-inhibované acetylcholinesterázy na základě spekter nukleární magnetické rezonance**

**Jiří PALEČEK**

**52. ústřední vojenský zdravotní ústav, Výzkumné a vývojové středisko Hostivice**

**Vladimír CÍRKVA, Stanislav RELICH, Lenka SLAVĚTÍNSKÁ**

**Ústav chemických procesů AV ČR Praha 6 – Suchdol**

**Kamil KUČA, Daniel JUN**

**Katedra toxikologie**

**Fakulta vojenského zdravotnictví Univerzity obrany, Hradec Králové**

---

## **Úvod**

Spektroskopie NMR<sup>1-8</sup> (zkratka NMR je odvozena z názvu Nukleární magnetická rezonance) využívá magnetických vlastností atomových jader. Tato metoda poskytuje detailní informace o struktuře a dynamických vlastnostech organických i anorganických látek a biomolekul v kapalném, plynném i pevném stavu. Speciální aplikace představuje *in vivo* NMR spektroskopie a metody založené na NMR zobrazení živých i neživých objektů (NMR „imagine“ a NMR tomografie). Tento článek je zaměřen na použití <sup>1</sup>H a <sup>13</sup>C NMR spektroskopie v kapalně fázi při interpretaci struktur organických látek, konkrétně reaktivátorů organofosfáty-inhibované acetylcholinesterázy (AChE; EC 3.1.1.7.).

## **Historie metody**

V roce 1945 se dvěma skupinám amerických vědců, vedených Blochem a Purcellem (Nobelova cena 1952), podařilo pozorovat NMR signál v makroskopickém materiálu (voda a parafin). První komerční NMR spektrometry znamenaly počátek aplikací metody ve strukturní analýze. Nízká citlivost metody omezovala zpočátku NMR spektroskopii na studium nejcitlivějších jader – <sup>1</sup>H, <sup>19</sup>F a <sup>31</sup>P. Prostorová NMR poskytovala v 50. letech základní informace o počtu neekvivalentních jader, jejich relativních stíněních a spinově interagujících sousedních jádrech. Pulsní techniky ve spojení s Fourierovou transformací odezvy, zavedené na konci 60. let, dramaticky zvýšily citlivost a umožnily rutinní měření méně citlivých jader (zejména <sup>13</sup>C) a časově závislých jevů. Vedly také k představě využití druhé dimenze (2D NMR), jejíž potenciál byl poznán na konci 70. let. Zavedení těchto metod v 80. letech přineslo nové účinné postupy pro získání strukturních informací stanovením korelací mezi různými typy jader a nové 1D NMR metody. Pokroky v technologii magnetů, vedoucí k stále vyšším magnetickým polím, zvýšily citlivost experimentů a umožnily detailně studovat velké a složité molekuly.

---

## Teoretické základy NMR

Základní stavební částice jádra atomů (protony a neutrony) rotují kolem vlastní osy a mají tedy moment hybnosti  $p$ , zvaný spin. Protony a neutrony mají spinové kvantové číslo  $l = 1/2$ . V jádrech izotopů se sudým počtem protonů a neutronů jsou spiny částic spárovány, takže výsledný spin jádra  $l = 0$ . Taková jádra (např.  $^{12}\text{C}$ ,  $^{16}\text{O}$ ) mají nulový spin a neposkytují signály NMR. Jádra s lichým počtem protonů, neutronů či obou typů částic nemají spiny spárovány a jejich  $l > 0$ . Protože pohyb elektricky nabitých částic po uzavřené dráze je spojen se vznikem magnetického pole, mají jádra s  $l > 0$  (např.  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{17}\text{O}$ ) vlastní magnetický moment  $\mu$  ( $\mu = \gamma p$ ; kde konstanta  $\gamma$  je gyromagnetický poměr, charakterizující každý izotop).

Je-li vzorek obsahující izotop s nenulovým magnetickým momentem umístěn do silného magnetického pole o indukcii magnetického pole  $B_0$ , dojde k rozštěpení energetických hladin jeho jaderných spinů (obr. 1).

Potenciální energie jádra  $E$  je dána vztahem:  $E = -\mu B_0$  a pro složku magnetického momentu ve směru pole  $B_0$  platí  $\mu_z = m\hbar\gamma/2\pi$  (kde  $h$  je Planckova konstanta,  $m$  je magnetické kvantové číslo). Magnetické kvantové číslo nabývá hodnot  $m = l, l-1, \dots, -l+1, -l$ . Počet vzniklých energetických hladin je určen hodnotou spinového kvantového čísla  $l$  (počet stavů  $= 2l+1$ ), proto u spinů s  $l = 1/2$ , jako jsou  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$ , zaujmou jaderné spiny dva energetické stavy s magnetickým číslem  $m = +1/2$  a  $m = -1/2$ . Jejich energii lze pak vypočítat ze vztahu:  $E_{+1/2} = -1/2(\hbar B_0 \gamma / 2\pi)$ ;  $E_{-1/2} = +1/2(\hbar B_0 \gamma / 2\pi)$ .

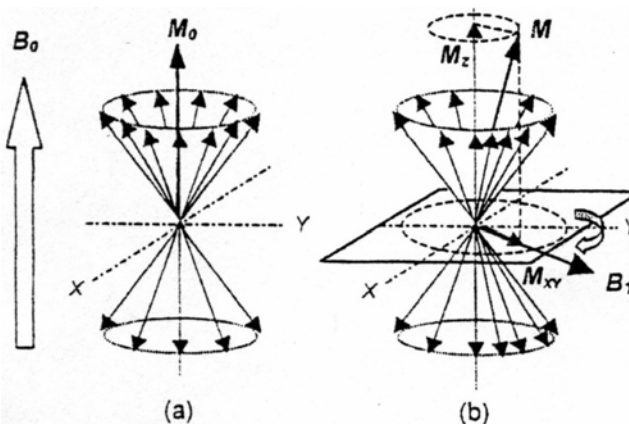
Podle zákonů kvantové mechaniky může být však každý spin trvale pouze na jedné energetické hladině, tj. může mít pouze jednu ze dvou možných orientací. Přechody mezi těmito hladinami může způsobit záření, jehož frekvence splňuje podmínku:  $\Delta E = E_{-1/2} - E_{+1/2} = \hbar\nu$  (kde  $\Delta E$  je rozdíl mezi hladinami). S využitím těchto vztahů pak lze napsat:  $\nu_0 = \Delta E/\hbar = \gamma B_0/2\pi$ . Tento vztah je známý jako rezonanční podmínka, frekvence  $\nu_0$  je tzv. Larmorova frekvence. Protože rozdíl hladin je malý, postačí k excitaci těchto jader pouze energie radiofrekvenčního záření (řádově MHz).

Na energeticky nižší hladině jsou jádra, jejichž průmět jaderného magnetického momentu  $\mu$  je orientován souhlasně s vnějším magnetickým polem  $B_0$ . Tato orientace odpovídá magnetickému kvantovému číslu  $m = +1/2$ . Jádra na vyšší energetické hladině mají magnetický moment orientovaný proti směru magnetického pole  $m = -1/2$  (obr. 1).

Populace jader na energeticky nižší hladině je jen nepatrně větší než na hladině energeticky vyšší. Výsledkem tohoto přebytku je vektorový součet všech jaderných spinových magnetických momentů – jaderná magnetizace  $M_0$ . Její velikost je úměrná přebytku jader na nižší energetické hladině.

Při měření NMR spekter pulsními metodami se vhodným radíofrekvenčním pulsem ( $B_1$ ) vyvolává populace obou energetických hladin a magnetizace  $M_0$  se vychýlí ze své rovnovážné polohy (ze směru osy vnějšího magnetického pole  $B_0$ ). Protože je magnetizace spojena s momenty hybnosti jader, nevrací se ihned po ukončení pulsu do směru magnetického pole, ale chová se podobně jako setrvačnick upevněný mimo těžiště, jehož osa rotace je skloněná vůči gravitačnímu poli. Výsledkem je precese, při které magnetizace zachovává svou velikost i sklon vůči magnetickému poli a otáčí se okolo směru magnetického pole  $B_0$  s Larmorovou frekvencí (obr. 1).

Kromě toho se ale relaxačními procesy postupně obnovuje narušený rovnovážný stav. Po určité době, charakterizované dobou tzv. spin-mřížkové relaxace  $T_1$ , se opět ustálí rovnovážné rozdělení spinů na obou energetických hladinách. Tím se obnoví složka magnetizace ve směru pole. Složka magnetizace kolmá na směr magnetického pole se naopak snižuje až na nulovou hodnotu s dobou tzv. spin-spinové relaxace  $T_2$ .



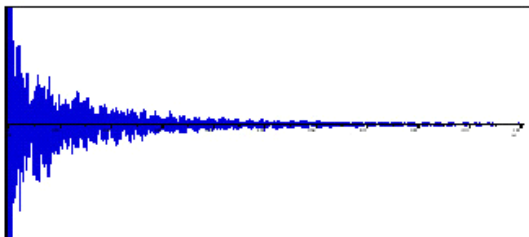
Obr. 1: Makroskopická magnetizace jader s  $l=1/2$

- a) za rovnováhy (v poli  $B_0$ )
- b) v rezonanci (s polem  $B_1$ )

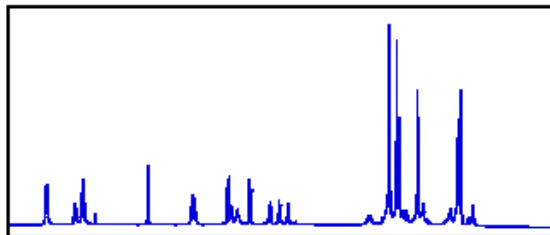


Podobně jako budí otáčející se magnet střídavé napětí v cívkách statoru alternátoru, budí i otáčející se vektor magnetizace střídavé napětí v cívce přijímače, která je navinuta okolo vzorku v NMR spektrometru. Časový průběh ( $s(t)$ ) napětí (signálu) indukovaného jadernou magnetizací v cívce se běžně označuje jako FID (free induction decay) a lze si jej představit jako doznívající tón po stisknutí klávesy klavíru.

Pokud vzorek obsahuje pouze jeden typ atomů jednoho izotopu (např.  $\text{CHCl}_3$ ), je pokles amplitudy tlumených kmitů exponenciální a je charakterizován dobou spin-spinové relaxace  $T_2$ . Frekvencí kmitů je Larmorova frekvence. U složitějších vzorků je výsledný FID interferogramem nebo superpozicí FIDů pocházejících od různých jader stejného izotopu. Aby byla získána rezonanční frekvence jednotlivých typů jader a intenzita jejich signální odezvy, je nutno nejprve převést FID, tj. časovou závislost signálu  $s(t)$  na frekvenci  $f$ , nebo-li na spektrum NMR. Tento převod se provádí na počítači tzv. Fourierovou transformací (obr. 2).



Obr. 2a): FID – závislost signálu  $s$  na čase  $t$



Obr. 2b): NMR spektrum – závislost signálu  $s$  na frekvenci  $f$

**NMR spektrum obsahuje informace o struktuře látky, které jsou uloženy ve třech parametrech:**

1. v poloze signálů (chemickém posunu)
2. v integrální intenzitě signálů
3. v multiplicitě (jemné struktuře) signálů

### NMR spektrometr

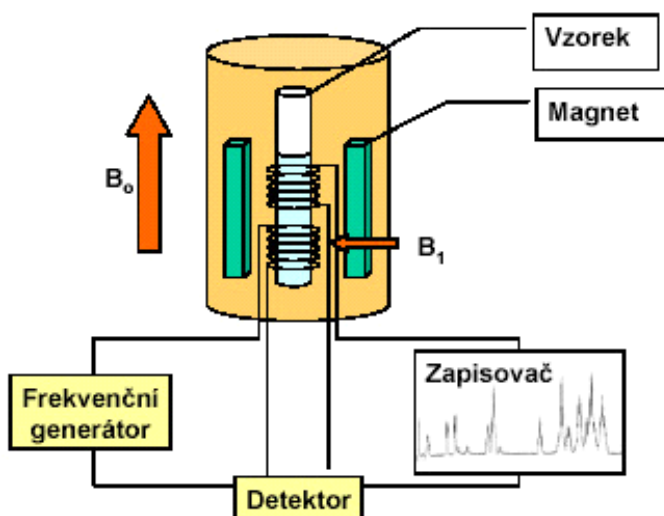
Moderní FT NMR spektrometr je velmi složité zařízení, které lze rozdělit do tří základních částí: magnet, elektronika spektrometru a výpočetní systém s periferiemi. Základem každého NMR spektrometru (obr. 3) je magnet se sondou. Supravodivý magnet je tvořen selenoidní cívkou ze supravodivého materiálu (slitina Nb-Ti nebo Nb-Sn), která je umístěna v kryostatu s kapalným heliem, které zajišťuje chlazení selenoidu na teplotu 4 K.

Vzorek měřené látky, který je ve skleněné kyvetě, se umísťuje do tzv. sondy. V sondě kyveta se vzorkem rotuje pro zvýšení homogenity. Hlavní části sondy tvoří cívky a elektrické obvody, které slouží k dodání energie do vzorku radiofrekvenčním pulsem z vysílače a k detekci absorpce této energie v obvodech přijímače (snímání FIDu). Navíc jsou v sondě obvody pro ozařování vzorku dalším radiofrekvenčním zářením pro tzv. dekapling (viz dále).

Elektronika spektrometru zajišťuje excitaci spinového systému a následující snímání signálu ve vzorku. NMR spektrometr obsahuje obvykle tři nezávislé vysokofrekvenční signály:

- Měřicí, v němž se provádí excitace jader měřeného vzorku a snímání jeho odezvy.
- Lockovací (stabilizační), který zajišťuje stabilitu rezonanční podmínky. K tomu využívá obvykle rezonančního signálu deuteria z deuterovaných rozpouštědel.
- Dekaplovací, sloužící k ozařování vzorku dalším vysokofrekvenčním zářením (metoda tzv. dekaplingu).

Výpočetní systém spektrometru zabezpečuje řízení všech jeho funkcí a zpracování naměřených dat. Vlastní řízení experimentu provádí pulsní programátor nebo samostatný akviziční procesor. Nadřazený počítač je odpovědný za veškeré funkce spektrometru. Řídí činnost pulsního programátoru nebo akvizičního procesoru, provádí matematické zpracování naměřených dat (FIDů) a jejich Fourierovu transformaci a zajišťuje výstup takto získaných spekter (spolu s nezbytnými parametry) na obrazovku, zapisovač a tiskárnu.



a) schéma

b) Varian Mercury-Vx 300 (300 MHz),  
Ústav chemických procesů AV ČR Praha

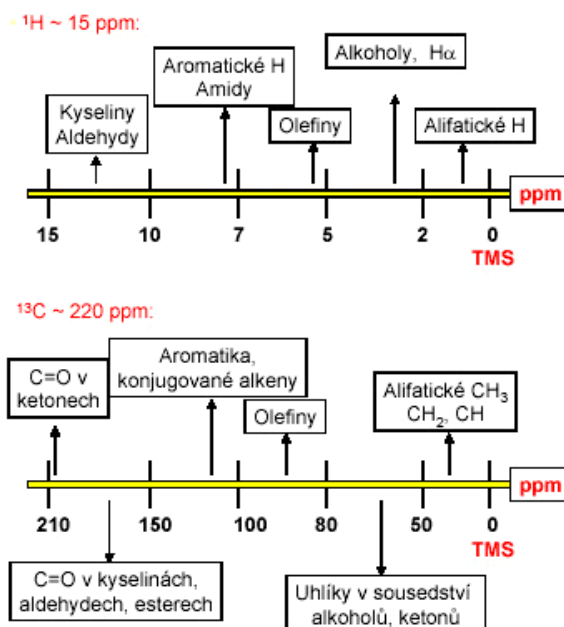
Obr. 3: NMR spektrometr

### $^1\text{H}$ a $^{13}\text{C}$ NMR spektroskopie

Vztah mezi frekvencí absorbovaného záření a magnetickou indukcí  $B_0$  je vyjádřen v rezonanční podmínce (viz výše). Podle uvedené podmínky by měla být rezonanční frekvence konstantní pro všechna jádra téhož izotopu. V molekule jsou však jádra vázána do skupin a jsou tak ovlivňována rozdílným elektronovým okolím. Elektronové okolí mění (stíní) magnetické pole v místě jádra, takže v místě jádra platí pro magnetickou indukcí vztah:  $B_{\text{lok}} = B_0 (1 - \sigma)$ , kde  $\sigma$  je konstanta stínění. Jádra  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  jsou v molekule vždy stíněna, tedy hodnoty konstanty stínění jsou vždy kladné a tak rezonanční podmínka je při konstantní  $B_0$  splněna vždy při vyšší frekvenci.

Zjištění konstanty stínění je experimentálně náročné, proto se v praxi uvádějí relativní hodnoty vztažené vůči standardu. Jako standard se používá např. tetramethylsilan – TMS, který se přidává přímo do měřeného vzorku jako tzv. vnitřní standard. Vzdálenost rezonančních signálů od signálu TMS se měří v Hz. Naměřená hodnota by však byla závislá na  $B_0$ , proto byla zavedena veličina chemického posunu  $\delta$ , která je nezávislá na indukci magnetického pole:  $\delta = (v - v_{\text{St}}) / v_0 * 10^6$  [ppm], kde  $v$  a  $v_{\text{St}}$  jsou frekvence měřeného jádra a frekvence standardu,  $v_0$  je pak pracovní frekvence spektrometru pro daný izotop (vyjádřená v MHz). Chemický posun je vyjádřen v ppm (parts per million). Hodnota chemického posunu TMS je rovna 0 ppm. Obvyklý rozsah  $\delta$  v  $^1\text{H}$  NMR je 0-15 ppm, pro  $^{13}\text{C}$  NMR se pak hodnoty  $\delta$  pohybují v intervalu 0-220 ppm (obr. 4).

Chemický posun je ovlivňován řadou faktorů (elektronegativita substituentů, magnetická anizotropie, sférické efekty, teplota, koncentrace, rozpouštědlo aj.).

Obr. 4: Příklad rozsahů chemických posunů  
v  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  NMR spektrech



Nejvýraznější z nich je elektronegativita substituentů. Platí, že s rostoucí elektronegativitou sousedního atomu nebo skupiny klesá stínění a roste hodnota chemického posunu  $\delta$ . Teplota, koncentrace a rozpouštědlo výrazně ovlivňují hodnotu chemického posunu protonů vázaných na heteroatomy (OH, NH, SH).

V  $^1\text{H}$  NMR spektrech jsou plochy rezonančních signálů úměrné počtu protonů v molekule. Za tímto účelem se pořizuje integrální záznam, který má tvar vlny nad jednotlivými signály. V protonových spektrech se jednotlivé signály dále liší, kromě rozdílného chemického posunu a integrální intenzity, také jemnou strukturou (multiplicitou) signálů. Příčinou tohoto štěpení je vzájemná interakce spinů jednotlivých protonů – spin-spinová interakce. Jedná se o interakci, která je přenášena vazebnými elektrony (nikoliv prostorem). Je proto nejvýraznější pro nejbližší sousedící skupiny. Spin-spinová interakce je vzájemná, tzn. je-li signál protonů A štěpen protony odpovídajícími signálu B, musí být i signál protonů B štěpen protony odpovídajícími signálu A. Spin-spinová interakce je charakterizována hodnotou spin-spinové interakční konstanty  $J$ , její hodnota se vyjadřuje v Hz a nezávisí na indukci vnějšího magnetického pole.

Ve srovnání s  $^1\text{H}$  NMR mají  $^{13}\text{C}$  NMR spektra řadu odlišností. V důsledku nízkého přirozeného výskytu jader  $^{13}\text{C}$ , který je jen 1,11 % a čtyřikrát menšího gyromagnetického poměru ve srovnání s jádrem  $^1\text{H}$ , je relativní citlivost uhlíků přibližně 5700krát nižší než u vodíků. Z tohoto důvodu se  $^{13}\text{C}$  NMR spektroskopie stala běžnou metodou až po zavedení pulsních FT NMR spektrometrů, které umožňují rychlou akumulaci spekter. Poměr signálu k šumu roste s odmocninou z počtu akumulací (skenů), proto je třeba pro získání kvalitních uhlíkových spekter provést řádově stovky až několik desítek tisíc akumulací v závislosti na struktuře molekuly a koncentraci vzorku.

Ve srovnání s protonovými spektry nejsou intenzity v uhlíkových spektrech vždy úměrné odpovídajícímu počtu jader uhlíku. To znesnadňuje využití  $^{13}\text{C}$  NMR spektroskopie ke kvantitativním účelům a někdy též interpretaci spekter. Důvodem jsou nestejné relaxační časy různých jader uhlíku, které závisí na okolí dotyčných atomů. Signály kvarterních uhlíků dávají slabší signály než uhlíky, na kterých jsou vázány atomy vodíku.

V uhlíkových spektrech se interakce  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  prakticky neobjeví vzhledem k malé pravděpodobnosti výskytu dvou jader izotopu  $^{13}\text{C}$  v těsné blízkosti jedné molekuly. Naopak se v uhlíkových spektrech výrazně projevuje spin-spinová interakce  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ . Nejvýraznější jsou přímé  $^1J$  interakční konstanty, které závisí na hybridizaci uhlíkového atomu a jejichž hodnota se mění v tomto pořadí:  $sp^3$  (120-150 Hz),  $sp^2$  (150-250 Hz) a  $sp$  (250-320 Hz). Tato skutečnost sice usnadňuje přiřazení signálů uhlíků molekuly, ale na druhé straně zhoršuje přehlednost spekter v případě, že je malý rozdíl v chemických posunech jednotlivých uhlíků. Z tohoto důvodu se používá metoda označovaná jako dekapling.  $^{13}\text{C}$  NMR se měří za současného ozařování všech protonů v molekule. Tím dojde k eliminaci všech štěpení vyvolaných spin-spinovou interakcí uhlík-proton.

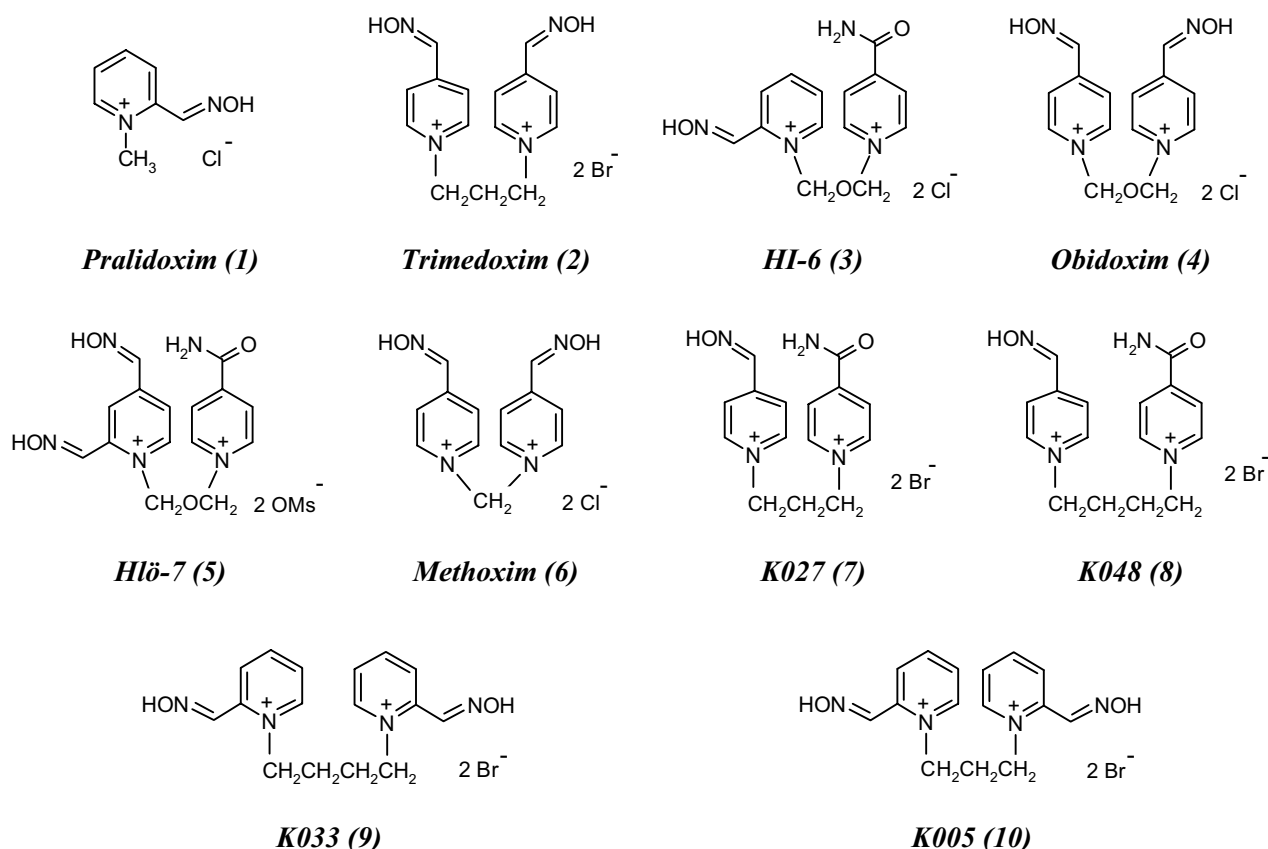
Jiná technika měření uhlíkových spekter je označována jako APT (Attached Proton Test) nebo  $J$ -Modulated Spin-Echo, není založena na multiplicitě  $^{13}\text{C}$  signálu, ale na jeho intenzitě. Ta může mít podle počtu připojených protonů pozitivní (pro C a  $\text{CH}_2$ ) nebo negativní amplitudu (pro CH a  $\text{CH}_3$ ).

### Objasnění struktur reaktivátorů AChE

Vodík  $^1\text{H}$  má výjimečné postavení v NMR spektroskopii organických sloučenin. Naměřená  $^1\text{H}$  NMR spektra zpravidla poskytují základní informace o struktuře studovaných látek. V praxi jsou při zjišťování struktury neznámé látky dále měřena uhlíková  $^{13}\text{C}$  NMR spektra. Ta spolu s vodíkovými spektry pak poskytují dostatečné množství informací o měřené organické sloučenině<sup>1)</sup>.

Objasnění (přiřazení) struktur třech **3**, **4**, **6** v AČR zavedených a sedmi **1-2**, **5**, **7-10** potenciálních reaktivátorů AChE<sup>9-12</sup> (obr. 5) bylo provedeno na základě  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  NMR spektroskopie. Bylo zjištěno, že naměřená vodíková a uhlíková spektra odpovídají všem deseti analyzovaným oximům **1-10**.

<sup>1)</sup> Závěry vyplývající z NMR spekter je možné dále porovnat s výsledky ostatních spektrálních metod, zejména hmotnostní, infračervené a ultrafialové spektroskopie, případně s výsledky rentgenové strukturní analýzy.

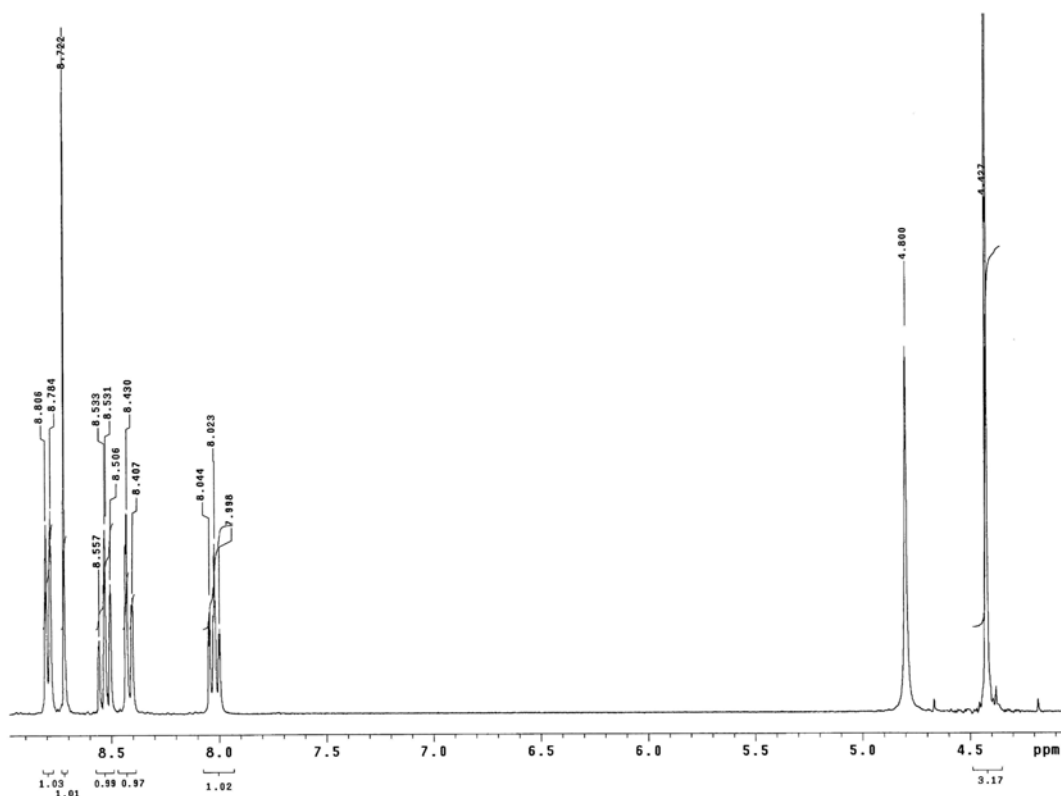


**Obr. 5: Reaktivátory organofosfáty-inhibované acetylcholinesterázy 1-10**

Na příkladu třech vybraných strukturně odlišných látek Pralidoximu (1), Trimedoximu (2) a HI-6 (3) je ukázán postup při interpretaci naměřených NMR spekter.

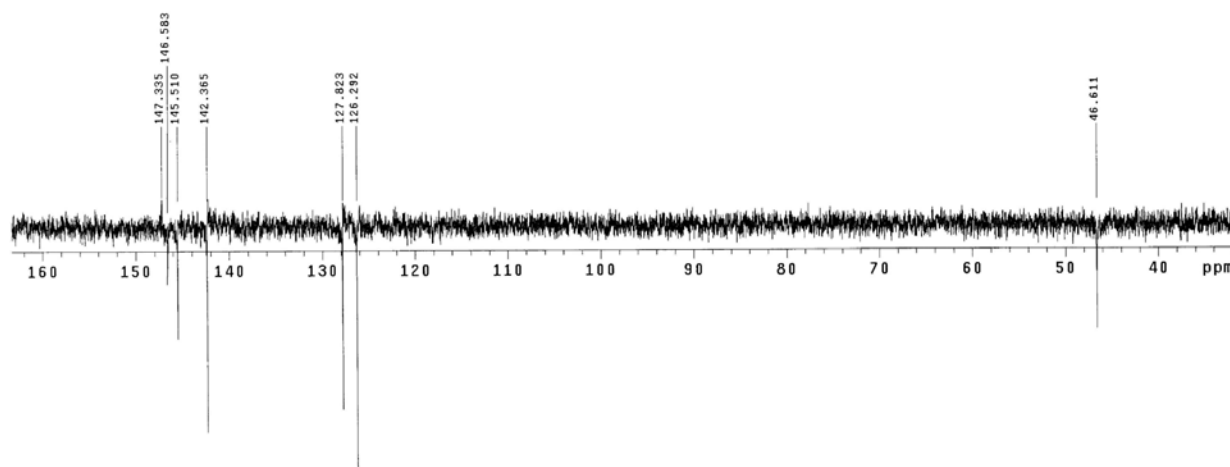
Pralidoxim (1) je strukturně nejjednodušším oximem z látek 1-10. Přiřazení jeho signálů v  $^1\text{H}$  NMR spektru vyhodnocením všech parametrů, tj. chemického posunu, integrální intenzity a spin-spinové interakční konstanty, je proto poměrně jednoduché (obr. 6). Látka 1 obsahuje celkem sedm neekvivalentních vodíkových atomů: methyl skupinu, čtyři pyridiniové CH vodíky, aldoximový CH a oximový NOH vodík. Naměřené  $^1\text{H}$  NMR spektrum obsahuje celkem sedm různých signálů. Signál s chemickým posunem ( $\delta$ ) 4,80 ppm však nenáleží látce 1, stejně jako v případě ostatních naměřených vodíkových spekter látek 2-10, ale zbytkovému signálu vody z deuterovaného rozpouštědla  $\text{D}_2\text{O}$ . Ve spektru tedy není zobrazen jeden vodíkový signál látky 1. Tímto signálem je oximový NOH vodík, který není v důsledku kvadrupolového momentu izotopu  $^{14}\text{N}$  a použitému deuterovanému rozpouštědлу v protonovém spektru látky 1 zobrazen<sup>2)</sup>. Ze šesti zobrazených neekvivalentních signálů látky 1 má nejnižší chemický posun ( $\delta$  4,43 ppm) singletová methylová skupina s integrální intenzitou rovnou třem. Druhý ve spektru zobrazený singlet ( $\delta$  8,72 ppm) s integrální intenzitou rovnou jedné odpovídá signálu aldoximové CH skupiny. V  $^1\text{H}$  NMR spektru látky 1 tak zbývá přiřadit již jen zbylé čtyři CH signály pyridiniového jádra. Ty jsou ve spektru zobrazeny jako dva dublety ( $\delta$  8,42 a 8,79 ppm) a dva dublety-dubletu ( $\delta$  8,02 a 8,53 ppm) s integrálními intenzitami rovné jedné a s vicinálními interakčními konstantami přes tři vazby ( $^3J_{\text{HH}}$ ).

<sup>2)</sup> Stejně tak nejsou v  $^1\text{H}$  NMR spektrech ostatních reaktivátorů 2-10 zobrazeny signály protonů ve skupinách -NOH a -CONH<sub>2</sub>.



Obr. 6: <sup>1</sup>H NMR spektrum Pralidoximu (1)

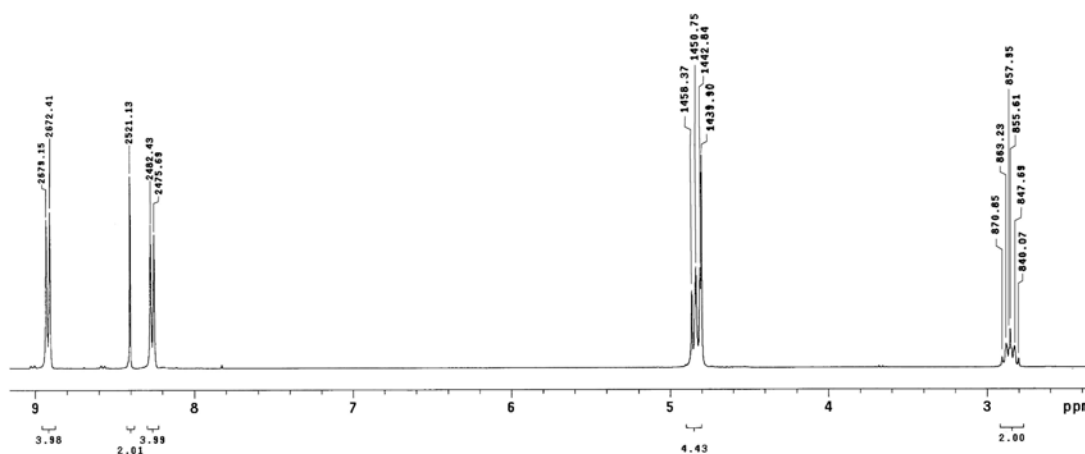
Struktura Pralidoximu (1) byla dále potvrzena změřením a vyhodnocením <sup>13</sup>C NMR (APT) spektra (obr. 7). Ze sedmi neekvivalentních uhlíkových atomů látky 1 vykazuje signál s pozitivní amplitudou pouze kvarterní aromatický uhlík ( $\delta$  147,34 ppm). Ze šesti uhlíkových signálů s negativní amplitudou má nejnižší chemický posun primární CH<sub>3</sub> uhlíkový atom ( $\delta$  46,61 ppm). Zbylých pět signálů uhlíkového APT spektra pak náleží terciálním CH uhlíkům, tj. čtyřem neekvivalentním pyridiniovým a jednomu aldoximovému uhlíku ( $\delta$  126,29-146,58 ppm).



Obr. 7: <sup>13</sup>C NMR spektrum Pralidoximu (1)

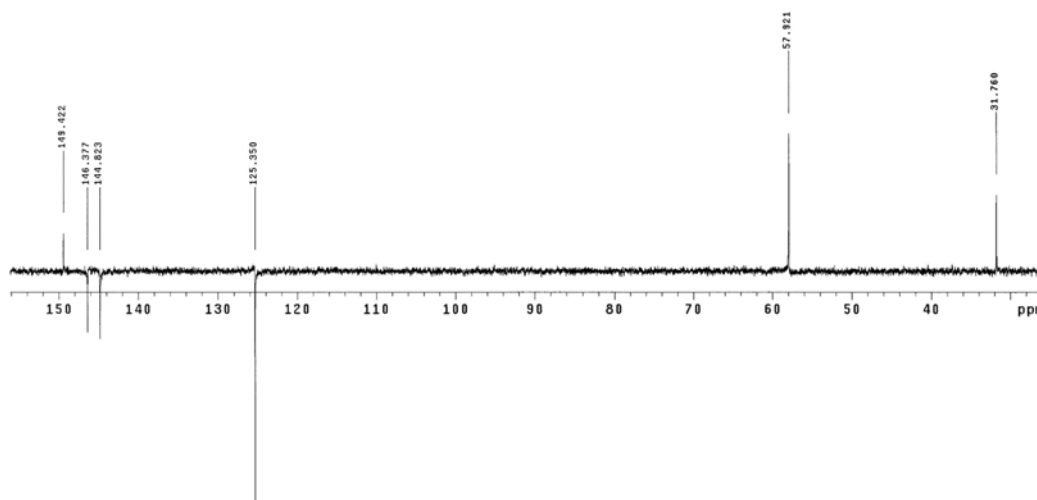


Molekula Trimedoximu (**2**) obsahuje navíc oproti oximu **1** jedno pyridiniové jádro, aldoximovou skupinu, ale také alifatický uhlíkový spacer. Látka **2** je však symetrická, z čehož vyplývá, že se dvojice ekvivalentních pyridiniových jader a aldoximových skupin projeví v zobrazení  $^1\text{H}$  NMR spektru (obr. 8) pouze nárůstem integrálních intenzit a ne vznikem duplicitních signálů. Dále pak *para*-poloha aldoximové skupiny vzhledem ke kvarternímu dusíku způsobí také ekvivalentnost dvojic aromatických *ortho*- a *meta*-vodíkových atomů na obou pyridiniových jádrech. Z toho vyplývá, že se deset atomů vodíků, tj. dva CH aldoximové, čtyři *ortho*-aromatické CH a čtyři *meta*-aromatické CH vodíky zobrazí v  $^1\text{H}$  NMR spektru pouze jako tři signály o integrální intenzitě v poměru 2 : 4 : 4, přičemž aldoximová CH skupina je zobrazena jako singlet ( $\delta$  8,40 ppm). Čtyři *ortho*-aromatické CH vodíky a čtyři *meta*-aromatické CH vodíky jsou pak zobrazeny jako dvojice dubletů ( $\delta$  8,25 a 8,92 ppm) s vicinálními interakčními konstantami přes tři vazby ( $^3J_{\text{HH}}$ ). Alifatický spacer tří methylenových skupin je ve vodíkovém spektru zobrazen, díky symetrii látky **2**, jako kvintet ( $\delta$  2,85 ppm) a triplet ( $\delta$  4,83 ppm) v integrálním poměru 2 : 4 a vicinálními interakčními konstantami opět přes tři vazby ( $^3J_{\text{HH}}$ ).



Obr. 8:  $^1\text{H}$  NMR spektrum Trimedoximu (**2**)

Symetrie molekuly Trimedoximu (**2**) se projeví také v APT uhlíkovém spektru (obr. 9). Celkem je v uhlíkovém spektru zobrazeno pouze šest různých signálů. Tři signály s pozitivní amplitudou, tj. signál jedné methylenové skupiny ( $\delta$  31,76 ppm), signál dvou ekvivalentních methylenů ( $\delta$  57,92 ppm) a signál dvou ekvivalentních kvarterních aromatických uhlíků ( $\delta$  149,42 ppm). Negativní amplituda obsahuje také tři signály: signál čtyř ekvivalentních aromatických *ortho*-uhlíků, signál čtyř ekvivalentních aromatických a signál dvou ekvivalentních aldoximových terciálních CH uhlíků ( $\delta$  125,35-146,38 ppm).

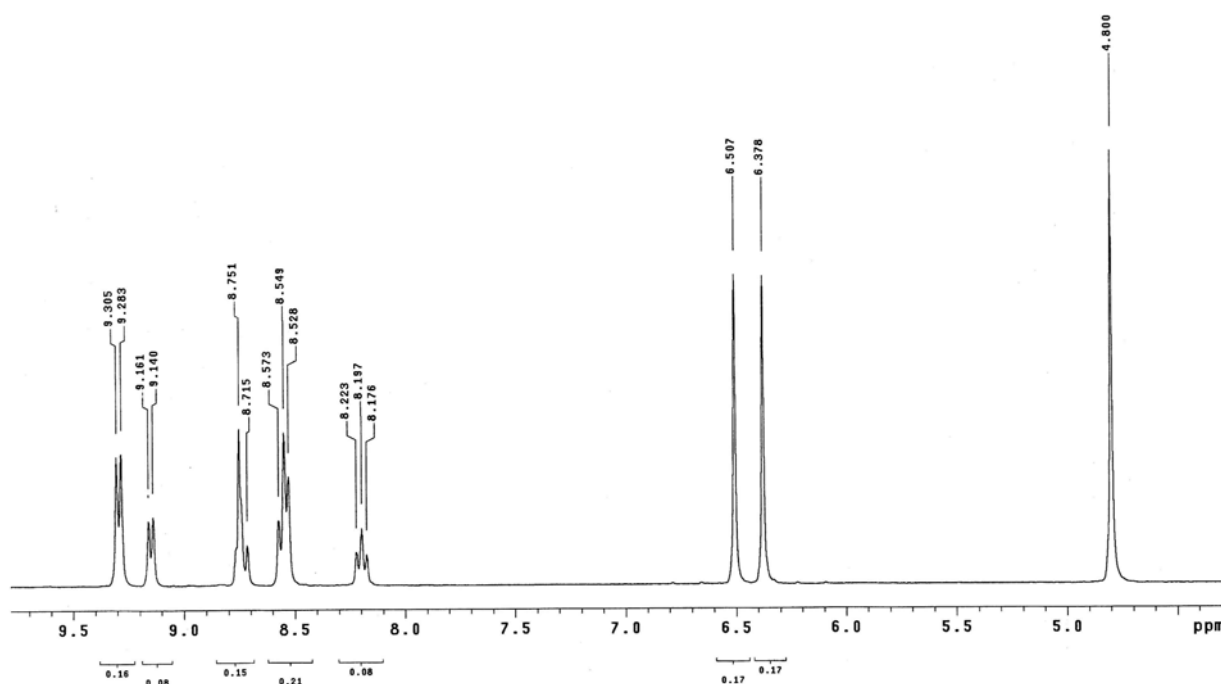


Obr. 9:  $^{13}\text{C}$  NMR spektrum Trimedoximu (**2**)



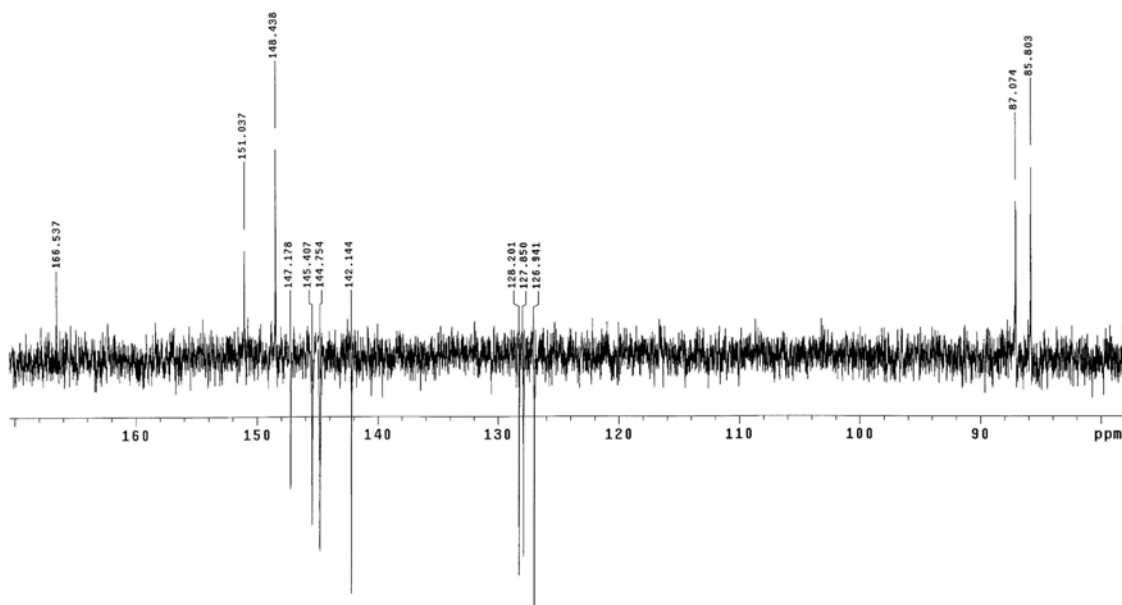


Naopak látka HI-6 (**3**) je příkladem nesymetrického oximu. Tento oxim **3** obsahuje stejně jako látka **2** dvě pyridiniová jádra, přičemž však pouze jedno z nich je substituováno aldoximovou skupinou, a to v poloze *ortho*. Z tohoto důvodu má toto aromatické jádro v  $^1\text{H}$  NMR spektru (obr. 10) všechny čtyři vodíkové atomy neekvivalentní a ve spektru je zobrazeno jako tři různé signály (dublet-dubletu s  $\delta$  8,19 ppm, multiplet s  $\delta$  8,73 ppm a dublet s  $\delta$  9,13 ppm) o integrální intenzitě 1 : 2 : 1 a vicinálními interakčními konstantami přes tři vazby ( $^3J_{\text{HH}}$ ). Druhé pyridiniové jádro je substituováno amidovou skupinou v *para*-poloze a je tedy symetrické, z čehož vyplývá ekvivalentnost obou *ortho*-aromatických, ale i obou *meta*-aromatických vodíků. V  $^1\text{H}$  NMR spektru jsou proto zobrazeny dva dublety ( $\delta$  8,54 a 9,29 ppm) o integrální intenzitě 2 : 2 a vicinálními interakčními konstantami opět přes tři vazby ( $^3J_{\text{HH}}$ ). Ve spektru je dále zobrazen, stejně jako v případě předchozích oximů **1**, **2**, aldoximový CH vodík (singlet,  $\delta$  8,56 ppm). Oximový NOH a amidový  $\text{NH}_2$  vodík není z výše uvedeného důvodu ve spektru zobrazen. Dvě methylenové skupiny alifatického spaceru látky **3** spojené kyslíkovým heteroatomem jsou ve vodíkovém spektru zobrazeny jako dva singletové signály. Přítomnost atomu kyslíku v sousedství obou methylenů způsobuje posun k nižšímu poli, a tedy vyšší hodnoty chemických posunů ( $\delta$  6,37 a 6,51 ppm), než v případě methylenových skupin oximu **2**.



Obr. 10:  $^1\text{H}$  NMR spektrum HI-6 (**3**)

V uhlíkovém APT spektru oximu **3** (obr. 11) se oproti předchozím spektrům látek **1**, **2** nově zobrazí kvarterní amidový uhlík mající pozitivní amplitudu ( $\delta$  166,54 ppm). Dalšími signály s pozitivní amplitudou zobrazenými ve spektru jsou dva kvarterní uhlíkové pyridiniové ( $\delta$  148,44 a 151,04 ppm) a dva sekundární uhlíkové methylenové signály ( $\delta$  85,80 a 87,07 ppm). Signálů s negativní amplitudou je v APT spektru zobrazeno celkem sedm: signál dvou ekvivalentních terciálních aromatických *ortho*-uhlíků, signál dvou ekvivalentních terciálních aromatických *meta*-uhlíků, čtyři signály neekvivalentních terciálních pyridiniových uhlíků a jeden terciální CH aldoximový signál ( $\delta$  126,94-147,18 ppm).

Obr. 11:  $^{13}\text{C}$  NMR spektrum HI-6 (3)

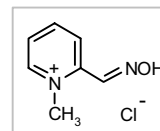
Struktury ostatních studovaných reaktivátorů 4-10 byly na základě naměřených  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  NMR spekter určeny analogickým způsobem. Souhrn vyhodnocených analýz je uveden v následující části.

### Přehled vyhodnocených $^1\text{H}$ a $^{13}\text{C}$ NMR spekter reaktivátorů 1-10

Spektra nukleární magnetické rezonance byla měřena na přístroji Varian Mercury-Vx 300 (300 MHz) (FT,  $^1\text{H}$  NMR při 299.98 MHz,  $^{13}\text{C}$  NMR při 75.44 MHz) v roztoku  $\text{D}_2\text{O}$ . V jednotlivých spektrech je uvedena frekvence přístroje a použité rozpouštědlo. Označení signálů: *s* – singlet, *d* – dublet, *t* – triplet, *q* – kvartet, *kv* – kvintet, *m* – multiplet. U multipletů je uvedena celková šířka v ppm.

#### Pralidoxim (1):

$^1\text{H}$  NMR (299.98 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  4.43 (*s*, 3H,  $\text{CH}_3$ ); 8.02 (*dd*, 1H, Ph-H,  $^3J_{\text{HH}} = 6.3$  Hz,  $^3J_{\text{HH}} = 7.5$  Hz); 8.42 (*d*, 1H, Ph-H,  $^3J_{\text{HH}} = 6.9$  Hz); 8.53 (*dd*, 1H, Ph-H,  $^3J_{\text{HH}} = 7.2$  Hz,  $^3J_{\text{HH}} = 7.5$  Hz); 8.72 (*s*, 1H,  $\text{CH}=\text{N}$ ); 8.79 (*d*, 1H, Ph-H,  $^3J_{\text{HH}} = 6.6$  Hz) ppm. Signál NOH skupiny není ve spektru zobrazen.

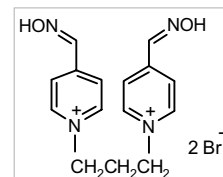


$^{13}\text{C}$  NMR (75.44 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  46.61 ( $\text{CH}_3$ ); 126.29 (CH); 127.82 (CH); 142.36 (CH); 145.51 (CH); 146.58 (CH); 147.34 (C) ppm.

#### Trimedoxim (2):

$^1\text{H}$  NMR (299.98 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  2.85 (*kv*, 2H,  $\text{CH}_2$ ,  $^3J_{\text{HH}} = 7.6$  Hz); 4.83 (*t*, 4H,  $2\times\text{CH}_2$ ,  $^3J_{\text{HH}} = 7.6$  Hz); 8.25 (*d*, 4H,  $4\times\text{Ph-H}$ ,  $^3J_{\text{HH}} = 6.7$  Hz); 8.40 (*s*, 2H,  $2\times\text{CH}=\text{N}$ ); 8.92 (*d*, 4H,  $4\times\text{Ph-H}$ ,  $^3J_{\text{HH}} = 6.7$  Hz) ppm. Signál NOH skupin není ve spektru zobrazen.

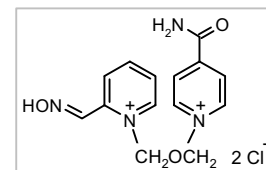
$^{13}\text{C}$  NMR (75.44 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  31.76 ( $\text{CH}_2$ ); 57.92 ( $\text{CH}_2$ ); 125.35 (CH); 144.82 (CH); 146.38 (CH); 149.42 (C) ppm.



#### HI-6 (3):

$^1\text{H}$  NMR (299.98 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  6.37 (*s*, 2H,  $\text{CH}_2$ ); 6.51 (*s*, 2H,  $\text{CH}_2$ ); 8.19 (*dd*, 1H, Ph-H,  $^3J_{\text{HH}} = 6.3$  Hz,  $^3J_{\text{HH}} = 7.8$  Hz); 8.54 (*d*, 2H, Ph-H,  $^3J_{\text{HH}} = 6.3$  Hz); 8.56 (*s*, 1H,  $\text{CH}=\text{N}$ ); 8.73 (*m*, 2H, Ph-H); 9.13 (*d*, 1H, Ph-H,  $^3J_{\text{HH}} = 6.3$  Hz); 9.29 (*d*, 2H, Ph-H,  $^3J_{\text{HH}} = 6.6$  Hz) ppm. Signály NOH a  $\text{CONH}_2$  skupin nejsou ve spektru zobrazeny.

$^{13}\text{C}$  NMR (75.44 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  85.80 ( $\text{CH}_2$ ); 87.07 ( $\text{CH}_2$ ); 126.94 (CH); 127.85 (CH);



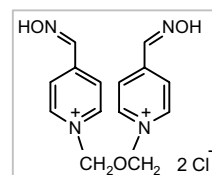


128.20 (CH); 142.14 (CH); 144.75 (CH); 145.41 (CH); 147.18 (CH); 148.44 (C); 151.04 (C); 166.54 (CONH<sub>2</sub>) ppm.

#### Obidoxim (4):

<sup>1</sup>H NMR (299.98 MHz, D<sub>2</sub>O): δ 6.25 (s, 4H, 2xCH<sub>2</sub>); 8.33 (d, 4H, Ph-H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.9 Hz); 8.43 (s, 2H, 2xCH=N); 9.05 (d, 4H, Ph-H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.9 Hz) ppm. Signál NOH skupin není ve spektru zobrazen.

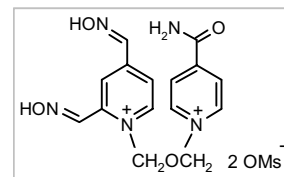
<sup>13</sup>C NMR (75.44 MHz, D<sub>2</sub>O): δ 86.95 (CH<sub>2</sub>); 125.19 (CH); 143.82 (CH); 146.27 (CH); 151.49 (C) ppm.



#### Hlō-7 (5):

<sup>1</sup>H NMR (299.98 MHz, D<sub>2</sub>O): δ 2.82 (s, 6H, 2xCH<sub>3</sub>SO<sub>2</sub>O (MsO)); 6.32 (s, 2H, CH<sub>2</sub>); 6.42 (s, 2H, CH<sub>2</sub>); 8.27 (d, 1H, Ph-H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.3 Hz); 8.42 (s, 1H, CH=N); 8.51 (d, 2H, Ph-H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.9 Hz); 8.63 (s, 1H, Ph-H); 8.69 (s, 1H, CH=N); 9.01 (d, 1H, Ph-H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.6 Hz); 9.24 (d, 2H, Ph-H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.9 Hz) ppm. Signály NOH a CONH<sub>2</sub> skupin nejsou ve spektru zobrazeny.

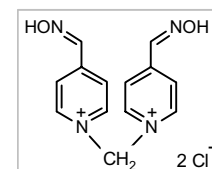
<sup>13</sup>C NMR (75.44 MHz, D<sub>2</sub>O): δ 38.59 (CH<sub>3</sub>SO<sub>2</sub>O); 85.38 (CH<sub>2</sub>); 87.07 (CH<sub>2</sub>); 124.01 (CH); 124.46 (CH); 126.89 (CH); 141.96 (CH); 144.71 (CH); 145.48 (CH); 146.10 (CH); 147.46 (C); 151.07 (C); 151.27 (C); 166.47 (CONH<sub>2</sub>) ppm.



#### Methoxim (6):

<sup>1</sup>H NMR (299.98 MHz, D<sub>2</sub>O): δ 7.38 (s, 2H, CH<sub>2</sub>); 8.43 (d, 4H, Ph-H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.5 Hz); 8.44 (s, 2H, 2xCH=N); 9.29 (d, 4H, Ph-H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.7 Hz) ppm. Signál NOH skupin není ve spektru zobrazen.

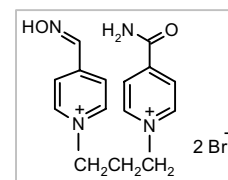
<sup>13</sup>C NMR (75.44 MHz, D<sub>2</sub>O): δ 77.33 (CH<sub>2</sub>); 125.92 (CH); 145.32 (CH); 146.09 (CH); 152.79 (C) ppm.



#### K027 (7):

<sup>1</sup>H NMR (299.98 MHz, D<sub>2</sub>O): δ 2.88 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 4.86 (t, 2H, CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.5 Hz); 4.94 (t, 2H, CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.5 Hz); 8.27 (d, 2H, Ph-H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.6 Hz); 8.41 (s, 1H, CH=N); 8.45 (d, 2H, Ph-H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.3 Hz); 8.93 (d, 2H, Ph-H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.9 Hz); 9.15 (d, 2H, Ph-H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.9 Hz) ppm. Signály NOH a CONH<sub>2</sub> skupin nejsou ve spektru zobrazeny.

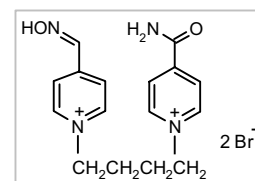
<sup>13</sup>C NMR (75.44 MHz, D<sub>2</sub>O): δ 31.89 (CH<sub>2</sub>); 57.86 (CH<sub>2</sub>); 58.60 (CH<sub>2</sub>); 125.40 (CH); 127.00 (CH); 144.89 (CH); 145.96 (CH); 146.42 (CH); 149.19 (C); 149.44 (C); 166.76 (CONH<sub>2</sub>) ppm.



#### K048 (8):

<sup>1</sup>H NMR (299.98 MHz, D<sub>2</sub>O): δ 2.21 (m, 4H, 2xCH<sub>2</sub>); 4.72 (t, 2H, CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.2 Hz); 4.80 (t, 2H, CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.2 Hz); 8.24 (d, 2H, Ph-H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.8 Hz); 8.41 (s, 1H, CH=N); 8.42 (d, 2H, Ph-H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.6 Hz); 8.88 (d, 2H, Ph-H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.1 Hz); 9.09 (d, 2H, Ph-H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.8 Hz) ppm. Signály NOH a CONH<sub>2</sub> skupin nejsou ve spektru zobrazeny.

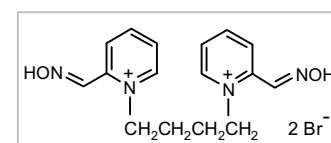
<sup>13</sup>C NMR (75.44 MHz, D<sub>2</sub>O): δ 27.39 (CH<sub>2</sub>); 27.50 (CH<sub>2</sub>); 60.59 (CH<sub>2</sub>); 61.33 (CH<sub>2</sub>); 125.20 (CH); 126.78 (CH); 144.70 (CH); 145.72 (CH); 146.46 (CH); 148.87 (C); 149.04 (C); 166.88 (CONH<sub>2</sub>) ppm.



#### K033 (9):

<sup>1</sup>H NMR (299.98 MHz, D<sub>2</sub>O): δ 2.12 (m, 4H, 2xCH<sub>2</sub>); 4.82 (m, 4H, 2xCH<sub>2</sub>); 8.06 (dd, 2H, Ph-H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.2 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.6 Hz); 8.42 (d, 2H, Ph-H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.9 Hz); 8.56 (dd, 2H, Ph-H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.8 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.9 Hz); 8.72 (s, 2H, 2xCH=N); 8.86 (d, 2H, Ph-H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.2 Hz) ppm. Signál NOH skupin není ve spektru zobrazen.

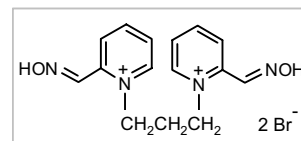
<sup>13</sup>C NMR (75.44 MHz, D<sub>2</sub>O): δ 26.81 (CH<sub>2</sub>); 58.12 (CH<sub>2</sub>); 127.58 (CH); 128.12 (CH); 142.19 (CH); 145.88 (CH); 145.98 (CH); 146.76 (C) ppm.



**K005 (10):**

<sup>1</sup>H NMR (299.98 MHz, D<sub>2</sub>O): δ 2.69 (*m*, 2H, CH<sub>2</sub>); 4.99 (*t*, 4H, 2xCH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.9 Hz); 8.08 (*dd*, 2H, Ph-H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.2 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.5 Hz); 8.41 (*d*, 2H, Ph-H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.8 Hz); 8.58 (*dd*, 2H, Ph-H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.7 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.8 Hz); 8.73 (*s*, 2H, 2xCH=N); 8.94 (*d*, 2H, Ph-H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.5 Hz) ppm. Signál NOH skupin není ve spektru zobrazen.

<sup>13</sup>C NMR (75.44 MHz, D<sub>2</sub>O): δ 30.85 (CH<sub>2</sub>); 55.17 (CH<sub>2</sub>); 128.33 (CH); 128.38 (CH); 142.42 (CH); 146.17 (CH); 146.36 (CH); 146.74 (C) ppm.

**Závěr**

Nukleární magnetická rezonance (NMR) je obecně používanou metodou při popisu struktur chemických individuí. NMR je užívána rovněž v AČR, např. při popisu struktur nově syntetizovaných reaktivátorů AChE<sup>13-15</sup>. Další z možných využití této metody by mohlo být zjištění stability již zavedených antidot a jejich degradačních produktů.

Výzkumné a vývojové středisko Hostivice spolu s Fakultou vojenského zdravotnictví Univerzity obrany, Katedrou toxikologie, Hradec Králové využívají tuto metodu ve spolupráci s Ústavem chemických procesů AV ČR.

**Literatura**

1. Böhms, S. – Smrčková-Voltrová, S.: Strukturální analýza organických sloučenin, VŠCHT Praha, 1995.
2. Krofta, J. a kol.: Návody pro laboratorní cvičení z analytické chemie II, VŠCHT Praha, 1994.
3. Buděšínský, M. – Koudelka, J. – Podlaha, J. – Stibor, I. – Štrauch, B. – Ubik, K.: Spektroskopické metody, ÚOCHB ČSAV, 1991.
4. Friebolin, H.: Basic One- and Two-Dimensional Spectroscopy, Wiley-Vch 1998.
5. Sanders, J. K. M. – Hunter, B. K.: Modern NMR Spectroscopy – a guide for chemists, Oxford University Press 1994.
6. Gunther, H.: NMR Spectroscopy, John Wiley 1995.
7. Ernst, R. R. – Bodenhausen, G. – Wokaun, A.: Principles of Nuclear Magnetic Resonance in One and Two Dimensions, Oxford University Press 1987.
8. Hrabal, R. – Lang, J. – Dvořáková, J.: NMR spektroskopie pro studium přírodních látek, [www.vscht.cz/NMR/predmet/predmet.html](http://www.vscht.cz/NMR/predmet/predmet.html)
9. Kassa, J. – Cabal, J.: Pharmacol. Toxicol. 84 (1999) 41-45.
10. Kuča, K. – Kassa, J.: J. Enzym. Inhib. Med. Chem. 18 (2003) 529-535.
11. Kuča, K. – Patočka, J. – Cabal, J.: J. Appl. Biomed. 1 (2003) 207-211.
12. Patočka, J. – Bielavský, J.: Collect. Czech. Chem. Commun. 48 (1975) 1794-1800.
13. Kuča, K. – Bielavský, J. – Cabal, J. – Bielavská, M.: Tetrahedron Lett. 44 (2003) 3123-3125.
14. Kuča, K. – Bielavský, J. – Cabal, J. – Kassa, J.: Bioorg. Med. Chem. Lett. 13 (2003) 3545-3547.
15. Kuča, K. – Cabal, J. – Patočka, J. – Kassa, J.: Lett. Org. Chem. 1 (2004) 84-86.