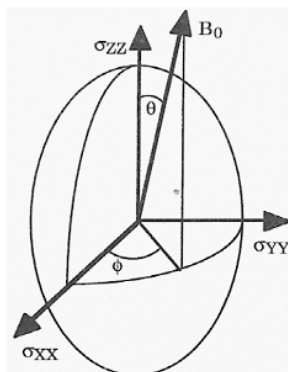


NMR spektroskopie pevného stavu: principy a aplikace

Joint Laboratory of Solid State NMR
IMCAS CR and JRP CAS CR

1. Historický úvod do NMR spektroskopie pevné fáze
2. Anizotropní interakce, Hamiltonián, průměrování a spektra
3. Techniky přenosu polarizace – “cross”-polarizace
4. Techniky editace 1D NMR spekter (NQS, CPPI, SoS APT)
5. 2D heteronukleární experimenty – separace lokálních polí
6. 2D heteronukleární korelační experimenty
7. 2D homonukleární korelační experimenty
8. 2D ^1H - ^1H dvou-kvantové techniky – π - π interakce a HB
9. X-X a X-Y korelace – dvojité CP, TDO-CP-INADEQUATE
10. Peptidy a proteiny, přiřazení signálů a struktura
11. Kvadrupolární jádra – SQ-TQ experimenty
12. Technická omezení NMR spektroskopie pevného stavu



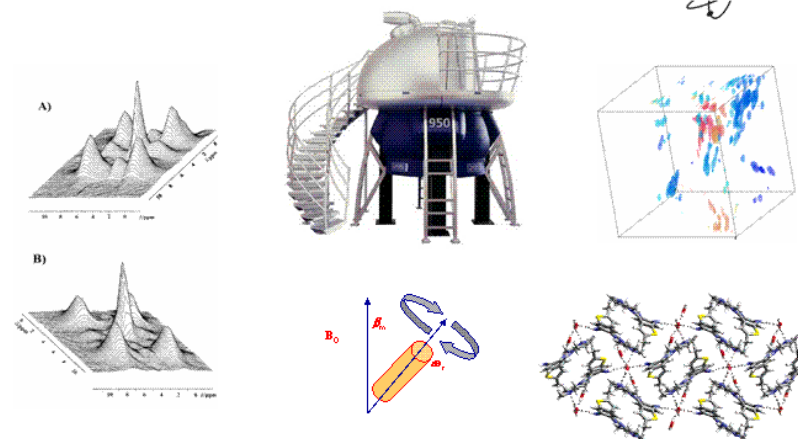
Jiří Brus

(Verze 1.0.1-2005)
(neupravená a neúplná)

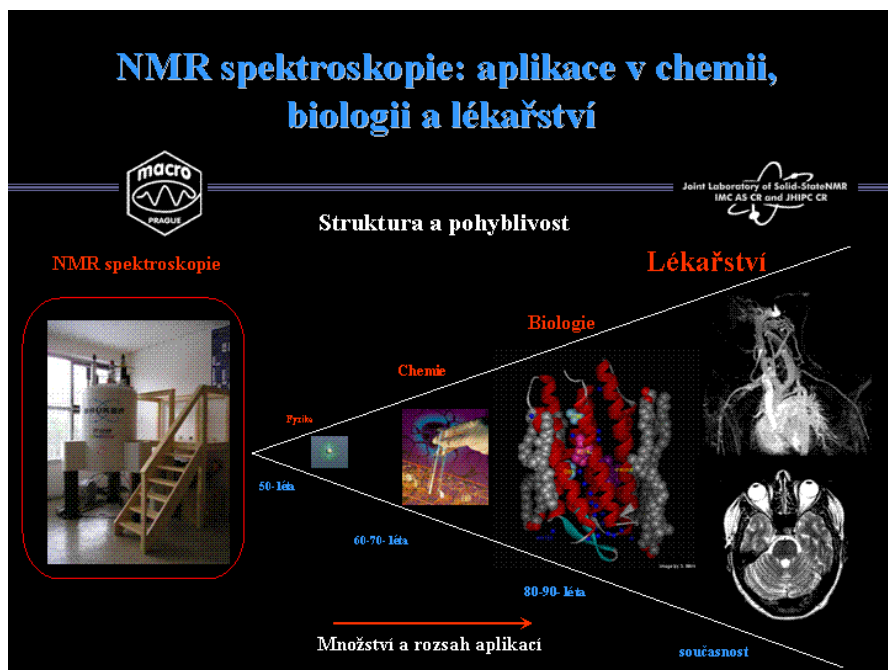
Ústav makromolekulární chemie AV ČR, Heyrovského nám. 2, Praha 6 -
Petržiny 162 06
e-mail: brus@imc.cas.cz

(1) Úvod do NMR spektroskopie pevného stavu – historický přehled

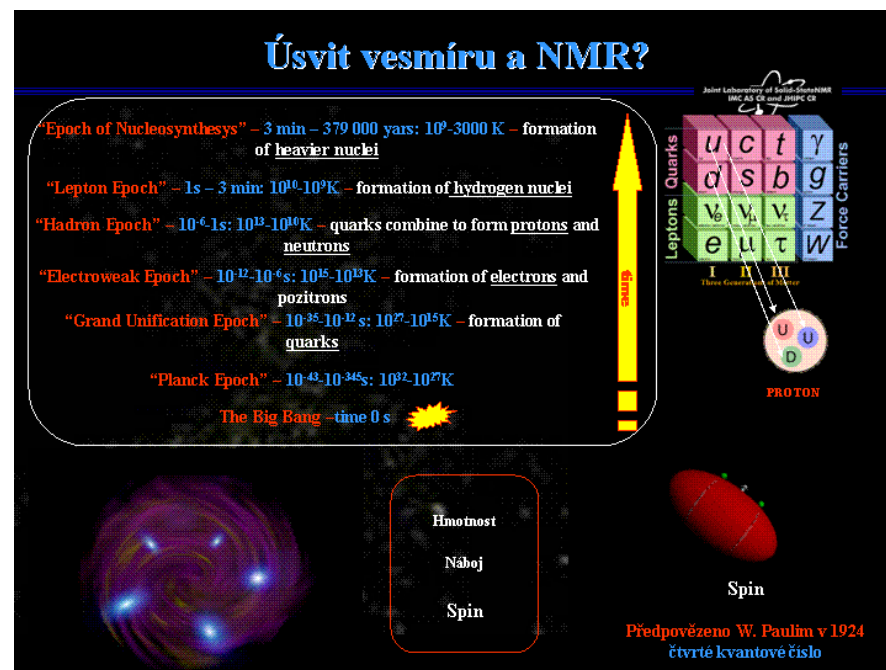
Joint Laboratory of Solid State NMR
IMCAS CR and JRP CAS CR



Nejprve se podíváme na NMR spektroskopii pevného stavu trochu s nadhledem a podíváme se na zásadní milníky a historické události, které podstatnou měrou a zásadně ovlivnily budoucí rozvoj této metody až k tomu současnému stavu, kdy můžeme odvážně tvrdit, že NMR spektroskopie pevné fáze je metoda komplementární k rtg. Difrakci a v určitých specifických případech poskytuje stejné strukturální informace, které poskytuje NMR roztoků a kapalin.



Krátce po svém objevu byla NMR spektroskopie výhradně doménou fyziků a její využití bylo poměrně omezené. S pochopením chemického posunu se však její vliv rychle přenesl do chemie, kde se významně uplatnila a stále uplatňuje jako analytická metoda. Nejprve při určování struktur malých organických látek, pak i polymerů a jiných makromolekul. S rozvojem experimentálních postupů a přístrojového vybavení pak přednosti této techniky významně využila strukturní biologie při popisu komplikovaných proteinových struktur a komplexů. Významné aplikace pak lze nalézt v průmyslu především ve farmacii, ale také i při identifikaci takových produktů jako jsou potraviny, případně produkty metabolismu. V současné době však NMR spektroskopie zasahuje do našeho života snad nejvíce v lékařství a to jako diagnostická metoda.



Základní podmínky a jaderné interakce

Joint Laboratory of Solid State NMR
IMCAS CR and JHPCAS CR

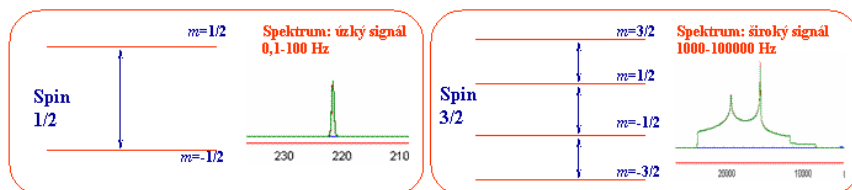
Atomy aktivní v NMR experimentu – isotopy s největším přirozeným zastoupením:

22 spinů $1/2$

77 spinů $3/2, 5/2, 9/2$

1 spin 1

H																	He
Li	Be											B	C	N	O	F	Ne
Na	Mg											Al	Si	P	S	Cl	Ar
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br	Kr
Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I	Xe
Cs	Ba	La	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At	Rn
Fr	Ra	Ac															
		Ce	Pr	Nd	Pm	Sm	Eu	Gd	Tb	Dy	Ho	Er	Tm	Yb	Lu		
		Th	Pa	U	Np	Pu	Am	Cm	Bk	Cf	Es	Fm	Md	No	Lw		



Atomové jádro ^1H má pro NMR spektroskopii výjimečný význam. Nejenom že je to právě vodík, který i v dnešních dnech tvoří drtivou většinu veškeré známé hmoty vesmíru, jsou to totiž jeho atomová jádra, která díky svému vysokému gyromagnetickému poměru a téměř 100% přirozenému izotopickému zastoupení jsou vůbec nejcitlivější ve vztahu k NMR experimentům. Odezva těchto jaderných spinů na vnější podněty (excitaci) je totiž největší a přítomnost jaderného spinu atomu ^1H lze vystopovat i na relativně velké vzdálenosti. Ostatní jádra již tak citlivá k NMR experimentu nemusí být. Ovšem právě kombinace vysokého izotopického zastoupení a vysokého gyromagnetického poměru je pro NMR spektroskopii téměř smrtící. Jestliže měření ^1H NMR spekter v roztoku je zcela rutinní pak pro NMR pevné fáze to představuje jistý problém.

Historie – možnost manipulace spinu 1930

Joint Laboratory of Solid State NMR
IMCAS CR and JHPCAS CR



Isidor Isaac Rabi
1898-1988
1944 – Nobel Prize



Pochází z Rakousko-Uherska

RADARová technologie



Rabi IJ, Zacharias JR, Millman S, Kusch P.
A new method of measuring nuclear magnetic moment. Phys Rev (1938); 53: 318.

Atomové hodiny



Jedním z prvních badatelů, kteří si povšimli možnosti manipulace s jaderným spinem byl ve třicátých letech minulého století Isidor Isaac Rabi. Již v roce 1938 publikoval metodu měření jaderného magnetického momentu. Tento muž je sice Američan nicméně je to rodák z Rakousko-Uherska. Ten se mimo jiné významně zasloužil o rozvoj RADAROVÉ technologie a také přispěl ke konstrukci atomových hodin.

Historie - první NMR signál 1949

Joint Laboratory of Solid State NMR
IMC AS CR and JHPC AS CR

Blochova laboratoř ve Stanfordu – přístroj na měření gyromagnetické konstanty



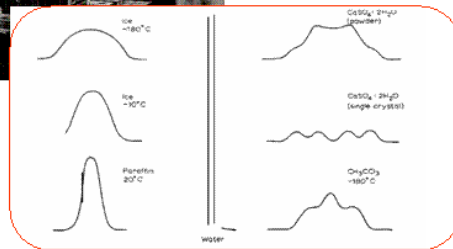
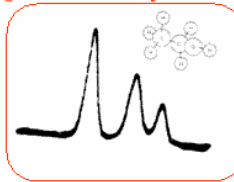
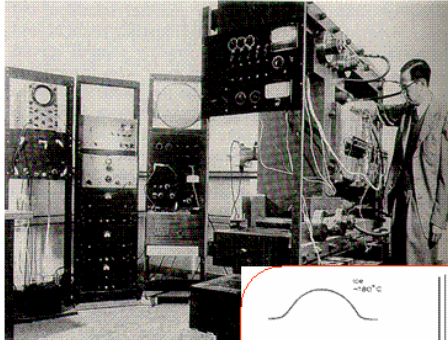
Felix Bloch
1905-1983



Edward M. Purcell
1912-1997



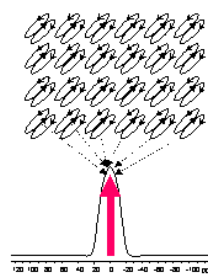
1952 – Nobel Prize



Rozšíření signálů – homogenní vs. nehomogenní

Joint Laboratory of Solid State NMR
IMC AS CR and JHPC AS CR

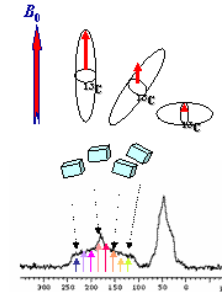
Dipol-dipolové interakce
(mnohaspinový systém)



HOMOGENNÍ

Všechny spiny spolu vzájemně interagují a vzniklý signál nelze separovat

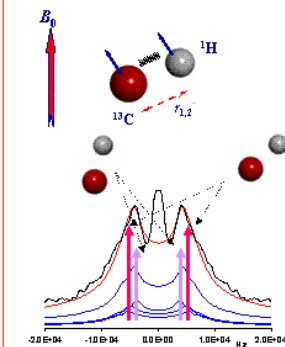
Anizotropie
chemického posunu



NEHOMOGENNÍ

Každý spin individuálně přispívá svou vlastní frekvencí k výslednému spektru, překryv mnoha signálů

Dipol-dipolové interakce
(omezený počet spinových párů)



HE TERO GENNÍ

Omezené množství dipolárně interagujících párů, několik překrývajících se dubletů

NMR spektroskopie se v začala rozvíjet někdy během druhé světové války, a tak první NMR signál vody v parafínu tak byl naměřen v roce 1949 ve Stanfordu, Felixem Blochem. Ten později spolu s Edvardem Millsem Purcellem v roce 1952 získal za svou práci v této oblasti Nobelovu cenu. První spektrum vysokého rozlišení bylo získáno v roce 1951. V změřena vůbec první NMR spektra pevných látek. Jedná se o led a krystalický síran vápenatý.

Od počátku bylo zřejmé, že spinovému systému v tuhé fázi dominují anizotropní interakce, které vedou k dramatickému rozšíření spektrálních linií. Rozšíření spektrálních čar může mít řadu příčin. Od roku 1953 obvykle rozlišujeme homogenní a nehomogenní rozšíření. Nehomogenně rozšířený signál je způsoben překryvem velké řady nezávislých signálů, se kterými můžeme individuálně manipulovat. V tomto případě každý naznačený signál odpovídá jednomu krystalitu v práškovém vzorku. To je např. důsledek anizotropie chemického posunu. Za druhé pak rozeznáváme homogenní spektrální rozšíření. To je důsledkem například homonukleárních dipolárních interakcí v mnohaspinovém systému. Tento signál nelze považovat za kontinuum překrývajících se čar, ale za jednu jedinou entitu. Každý spin a každý krystalit je charakterizovaný tímto signálem. No a za třetí rozeznáváme něco mezi tím.

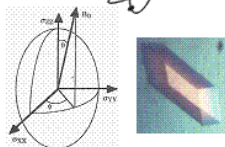
Rotace vzorku pod magickým úhlem – MAR (1958)

Joint Laboratory of Solid State NMR
IMC AS CR and JHPC AS CR

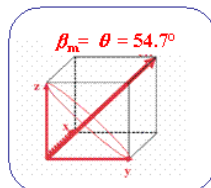
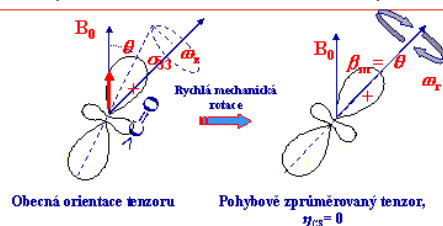
Andrew E.R., Bradbury A., Eades R.G.
NMR spectra from a Crystal Rotated at High Speed, *Nature* (1958); 182: 1659.



I.J. Lowe
Free Induction Decays in Rotating Solids, *Phys. Rev. Lett.* (1959); 2: 285.



$$\hat{H}_{CS} = \left\{ \sigma_{iso} + \frac{1}{2} \delta_{CS} [3 \cos^2 \theta - 1 - \eta_{CS} \sin^2 \theta \cos(2\phi)] \right\} \gamma B_0 \hat{I}_z \quad \text{Hamiltonian chemického posunu}$$



MAS průměruje všechny anizotropní interakce, které lze popsat tenzorem druhého řádu. Frekvence rotace musí převýšit vnitřní interakce.

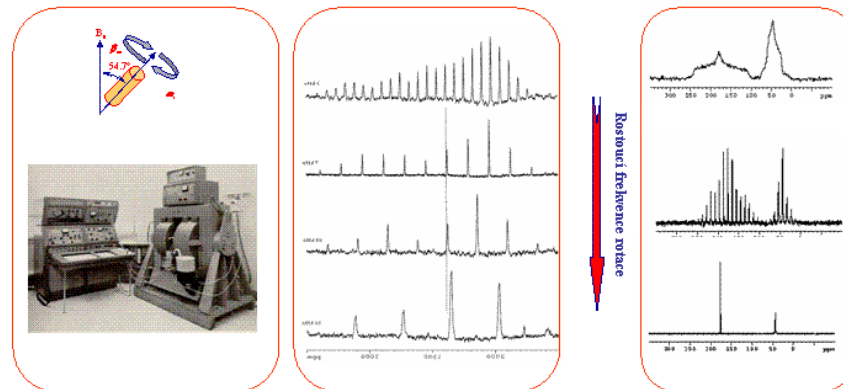
$$\hat{H}_{CS} = \left\{ \sigma_{iso} \gamma B_0 + \frac{1}{2} \delta_{CS} [0 - 0] \right\} \hat{I}_z = \sigma_{iso} \gamma B_0$$

Primární příčinou rozšíření spektrálních čar v tuhém stavu je tedy chybějící izotropní molekulární pohyb. Lze tedy tušit, že chybějící vnitřní izotropní molekulární pohyb lze alespoň částečně nahradit mechanickým pohybem celého vzorku. Samozřejmě, těžko docílíme pohybu izotropního ale dosáhnou rychlého „uniaxiálního“ pohybu není až tak komplikované. Toho v roce 1958 a 1959 využili Andrew a Law. Vyšli z toho, že anizotropní interakce lze ve speciálním případě charakterizovat sférickou harmonickou oscilací, přičemž za určitých podmínek se geometrický člen stává nulovým. Z toho plyne, že zcela vymizí anizotropní charakter nukleární interakce.

Rotace vzorku pod magickým úhlem – MAR (1958)

Joint Laboratory of Solid State NMR
IMC AS CR and JHPC AS CR

Odstranění CSA v anorganických materiálech –
pouze pro izotopicky řídká jádra



Nepředpokládalo se, že by bylo možno tuto techniku využít pro odstranění dipolárních interakcí mezi ^1H

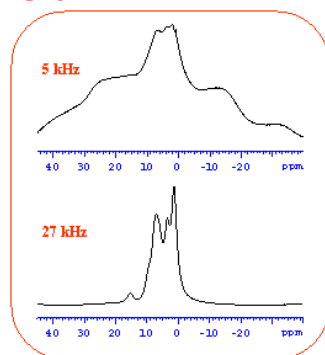
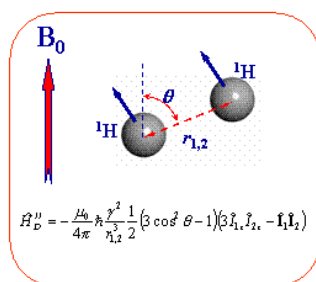
Na konci šedesátých let se tato technika využívala výhradně k odstranění anizotropie chemického posunu a to pouze u anorganických sloučenin, které neobsahovaly krystalovou vodu. Je zcela zřejmé, že využití této techniky bylo omezené, ale přesto pro tyto systémy se původně velmi široký a nesymetrický signál rozpadne na sérii rotačních signálů a centrální pás. S rostoucí frekvencí rotace klesá počet a intenzita rotačních pásů, zatímco intenzita centrálního signálu roste. V limitním případě pak ve spektru zůstane pouze signál odpovídající izotropnímu chemickému posunu.

Rotace vzorku pod magickým úhlem – MAR (1967)

Joint Laboratory of Solid State NMR
IMC AS CR and JHPC AS CR

Odstranění dipolárních interakcí mezi spiny ^1H v organických a polymerních látkách

$$\gamma = 26,8 \text{ radT}^{-1}\text{s}^{-1}$$



2.5 mm (<35kHz)
4mm (<20kHz)
7mm (<7kHz)



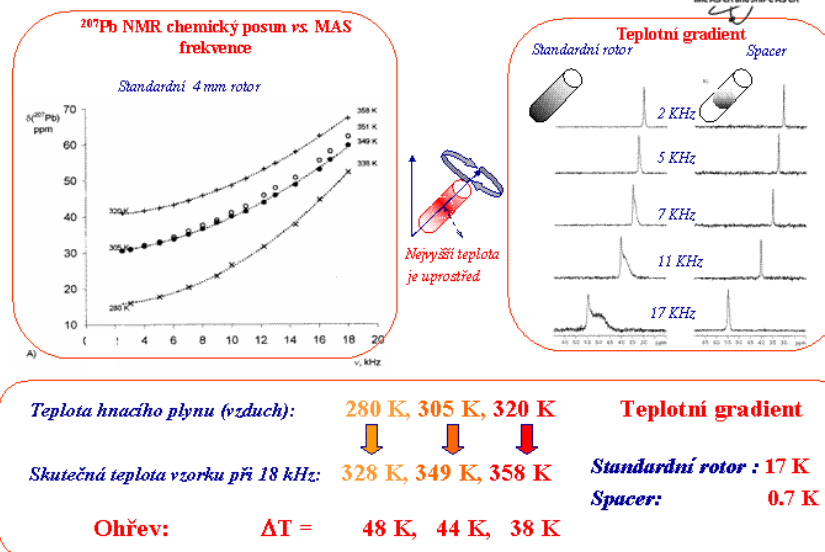
100%
 $\gamma = 26,8 \text{ rad}\cdot\text{T}^{-1}\text{s}^{-1}$

„Jediným úkolem teoretiků je vždy vyložit, proč experiment vyšel tak, jak vyšel, a že dobrý teoretik si najde vždy vysvětlení toho, že to co vyšlo, je zrovna správné.“
B. Schneider (1967)

Teoreticky vzdělaní fyzici však tehdy také dokazovali, že v ^1H NMR spektrech se žádný pozitivní efekt rotace vzorku pod magickým úhlem nemůže projevit, poněvadž šířka signálů protonů v rigidních systémech je příliš velká. Anebo naopak u systémů, jejichž signál byl již užší, se předpokládalo, že vnitřní pohyb je tak veliký, že se makroskopická rotace opět neprojeví. Navzdory těmto teoretickým předpokladům se B. Schneider nedal odradit roku 1967 zkonstruoval plexisklovou kyvetu, do které byly vyfrézovány lopatky. Samozřejmě, že bylo sledováno zužování signálů a dnes se ultravysoké rotace vzorku pod magickým úhlem (50-70 kHz) používají pro získání vysoce rozlišených ^1H MAS NMR spekter.

Zahřívání vzorku při MAS

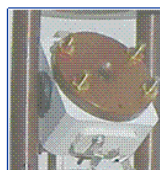
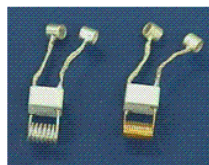
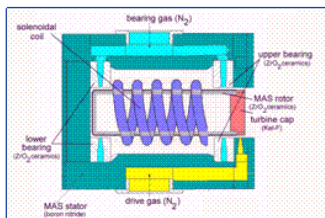
Joint Laboratory of Solid State NMR
IMC AS CR and JHPC AS CR



V dnešní době probíhá drtivá většina experimentů při vysoké rotaci vzorku, ovšem je potřeba si uvědomit jednu zásadní věc. Skutečně velmi rychlá rotace vede k významnému zahřívání vzorku, které je způsobeno třením povrchu kyvety o vzduch. Vzorek se může zahřát až o 50°C a navíc teplota není v celém vzorku stejná, ale směrem k hornímu a dolnímu konci kyvety klesá. Vzniklý teplotní gradient může dosahovat až 17°C . Proto je tedy nutné znát teplotní vlastnosti každého vzorku. Jakákoli fázová změna by mohla vést například k otevření kyvety a následnému poškození přístroje nebo přinejmenším k poškození zkoumané látky.

Konstrukce MAS sondy

Joint Laboratory of Solid State NMR
IMCAS CR and JHPCAS CR



Průměr kyvety = 4mm \Rightarrow obvod = $2\pi r = 12,6$ mm
Frekvence = 10 kHz, rychlost pláště = $126 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$

Za jeden rok nepřetržitého provozu urazí povrch pláště kyvety

3600 x 24 x 365 x 126

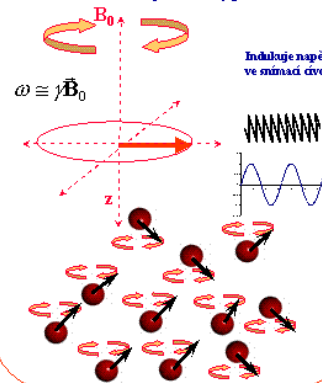
3.976.000 km

Z toho důvodu je potřeba považovat MAS sondy za konstrukčně velmi zajímavé zařízení. Dnes se kyveta pohybuje na vzduchových polštářích a je hnaná proudem vzduchu, který je směřovaný na lopatky turbinky. Při rotaci 10 kHz, dosahuje povrch pláště 4mm kyvety 125 m za sekundu a z toho plyne že rok neustálého chodu sondy, uběhne plášť kyvety téměř čtyři miliony kilometrů. To znamená, že stator, materiál ze kterého je vyroben povrch působení čtyř milionů kilometrů ZrO_2 pláště kyvety. Jakákoli nestabilita rotace a nehomogenita hmoty uvnitř může vést k trvalému a nevratnému poškození. Opatrnosti v tomto případě tedy není nikdy dost.

Pulsní NMR – 1964, 1966 (1822)

Joint Laboratory of Solid State NMR
IMCAS CR and JHPCAS CR

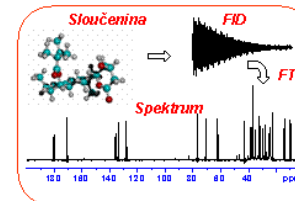
Spiny v magnetickém poli po *rf* PULSU
Precese spinů získá fázovou koherenci
Transverzální magnetizace vykonává precesi kolem vnějšího magnetického pole
Frekvence oscilace je chemický posun



Ernst R.R., Anderson W.A.
Application of FT Spectroscopy to Magnetic resonance, *Rev. Sci. Instr.* (1966); 37: 93.



Richard R. Ernst
*1933
1991 – Nobel Prize



Fourier J.B.J.
Theorie analytique de la chaleur, Firmin Didot, pere et fils, Paris. (1822).



Jean Baptista Joseph Fourier
1768-1830

$$F(\omega) = \int_{-\infty}^{\infty} dt. f(t) e^{-i\omega t}$$

Zásadní průlom v NMR spektroskopii nastal na počátku šedesátých let nástupem pulsni NMR. Už ve volně doznívající indukci (FID) jsou uloženy všechny hledané informace, ty ale neumíme přečíst. Řešení tohoto problému poskytl J.B.J. Fourier v roce 1822. Mimochodem Fourier je velmi zajímavá osoba. Již v 16 letech se stal učitelem matematiky. Byl to také člověk s jistým politickým nadáním. V roce 1794 byl ale uvězněn a čekal na popravu. Naštěstí byl osvobozen a v roce 1798 vyrazil s Napoleonovou armádou na Východní expedici. Jeho přínos pro NMR spektroskopii však nespočívá v jeho politické obratnosti, ale ve vypracování vztahů, které převádí „transformují“ funkce z časové oblasti do oblasti frekvenční. O 140 let později tuto Fourierovu transformaci potom využil R. Ernst k převedení FIDu do klasické podoby NMR spektra.

Hartmann-Hahnův experiment – 1962

Joint Laboratory of Solid State NMR
IMC AS CR and JHPC AS CR



E. L. Hahn

Hahn, E. L.,
Spin echoes, *Phys. Rev.*, 80, 580-594 (1950).

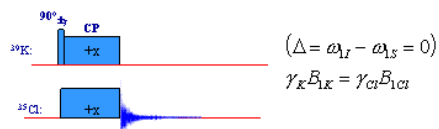
Hahn, E. L.,
Free nuclear induction, *Physics Today*, Nov. (1953), pp. 4-9.

Hartmann S.R., Hahn E.L.
Nuclear Double Resonance in Rotating Frame, *Phys. Rev.* (1962); 128: 2042.

Problém relaxace

- 1) Absorpce γ záření není doprovázena spontánní emisí.
- 2) Disipace je vynucena fluktuacemi lokálních magnetických polí.
- 3) Vnitřní molekulární pohyb je u krystalických systémů velmi omezený.
- 4) Relaxační časy izotopicky řídkých jader v řádech minut a hodin.

KClO₃ při 77K - vzorek je statický - nerotuje



$$(\Delta = \omega_I - \omega_S = 0)$$

$$\gamma_K B_{1K} = \gamma_{Cl} B_{1Cl}$$

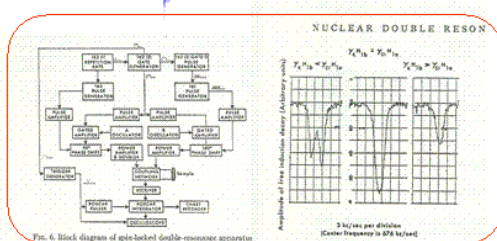


Fig. 6. Block diagram of spin-locked double-resonance apparatus.

Počátky pulsní NMR spektrometrie lze hledat již v roce 1950 kdy prof. Hahn provedl spin-echo experiment. Ale profesor Hahn v roce 1962 navrhl dvou-resonanční experiment, který zvýšil polarizovatelnost spinového systému a tedy i citlivost NMR experimentu. Při splnění tzv. Hartmann-Hahnovi podmínky se přeneše magnetizace z vysoce polarizovatelného systému do systému s nízkou polarizovatelností. Zvýšení citlivosti je dáno poměrem gyromagnetických konstant. Navíc se tímto způsobem zkrátí doba potřebná k návratu do termodynamické rovnováhy. Tedy doba potřebná k relaxaci. Protože disipace energie je vynucena fluktuacemi lokálních magnetických polí, pak relaxace izotopicky řídkých spinů s nízkým gyromagnetickým poměrem v tuhém stavu může dosahovat řady hodin. Relaxace je pochopitelně mnohem rychlejší mezi jádry s vysokým gyromagnetickým poměrem.

Cross-polarizace – 1972

Joint Laboratory of Solid State NMR
IMC AS CR and JHPC AS CR



Alex Pines
*1945

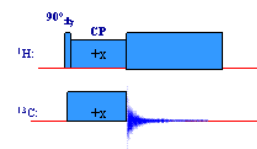
Podstatné zvýšení citlivosti NMR experimentu provedeném na izotopicky řídkých jádrech, odstraněno dipolární rozšíření, ale CSA stále dominuje spektru

Pines A., Gibby M.G., Waugh J.S.
Proton-Enhanced Nuclear Induction Spectroscopy. A Method for High Resolution NMR of Dilute Spins in Solids, *J. Chem. Phys.* (1972); 56: 1776.

Zvýšení citlivosti až 1000-krát

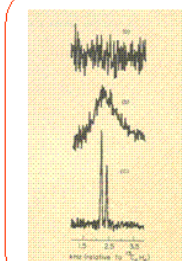
- 1) Polarizace izotopicky hojných jader I .
- 2) Snížení spinové teploty jader I v rotující soustavě souřadně.
- 3) Ustavení kontaktu mezi I a S – spin-lock a HH kontakt.
- 4) Detekce magnetizace S při současném dekaplinku I .

Adamantan při 303K - vzorek je statický - nerotuje



$$(\Delta = \omega_I - \omega_S = 0)$$

$$\gamma_H B_{1H} = \gamma_C B_{1C}$$



O dalších deset let později přišel Alex Pines s podstatným vylepšením tohoto experimentu. Tato technika už využívá FT volně doznívající indukce, využívá přenosu polarizace z protonového rezervoáru do uhlíkového skeletu a dipolárního decouplingu při snímání FIDu. Tato technika je tedy navržena pro získání spekter s relativně dobrým spektrálním rozlišením a tedy pro získání strukturních informací o organických systémech. Přesto se stále jedná o specifický systém s velkou vnitřní pohyblivostí. Vzorek je totiž stále statický, nerotuje a v případě rigidních systémů by anizotropie chemického posunu vedla k dramatickému rozšíření signálů.

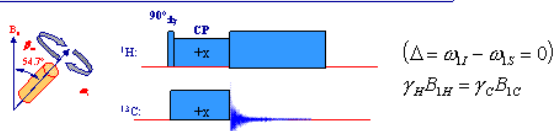
“Cross”-polarizace – 1976



J. Schaefer

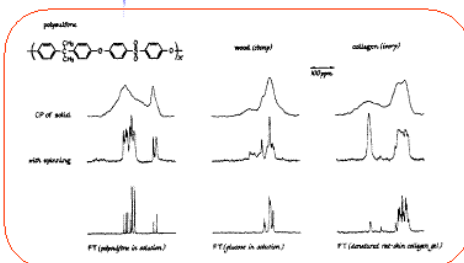
Navrzení dnes již rutinního NMR experimentu provedením na izotopicky řídkých jádrech, odstraněno dipolární rozšíření i CSA (vzorek rotuje pod magickým úhlem)

Schaefer J., Stejskal E.O.J.
¹³C NMR of Polymers Spinning at Magic Angle, *J. Am. Chem. Soc.* (1976); 98: 1031.



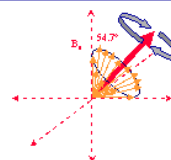
Zvýšení citlivosti až 1000-krát

- 1) Polarizace izotopicky hojných jader *I*.
- 2) Snížení spinové teploty jader *I* v rotující soustavě souřadné.
- 3) Ustavení kontaktu mezi *I* a *S* – spin-lock a HH kontakt.
- 4) Detekce magnetizace *S* při současném dekaplinku *I*.



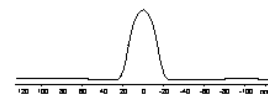
Konečné kombinace Hartmann-Hahnovy „cross“ polarizace, dipolárního dekaplinku a rotace vzorku pod magickým úhlem jsme se dočkali až v roce 1976, kdy tuto techniku navrhl Jacob Schaefer. Tato technika již skutečně vede k získání spekter s vysokým spektrálním rozlišením a díky zvýšení citlivosti až tisíc-krát je potřebná doba měření mnohdy kratší než čtvrt hodiny. Od roku 1976 kdy byla poprvé uvedena a použita nyní již standardní uhlíková ¹³C CP/MAS NMR spektroskopie pevných látek, její význam neustále roste. Zvláště pro charakterizaci látek a sloučenin, jež lze jinými technikami popsat jen velmi obtížně. Tím mám na mysli především membránové proteiny nebo anebo zcela nerozpustné peptidy a proteiny, které způsobují velice vážná mozková poškození.

Multipulsní homodekaplink – 1968



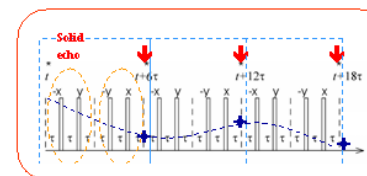
Navrzení první klasické sekvence pro odstranění ¹H-¹H dipolárních interakcí

Waugh J., Huber L., Haerberlen U.
 Approach to High-Resolution NMR in Solids, *Phys. Rev. Lett.* (1968); 20: 180.



Rotace spinů pod magickým úhlem

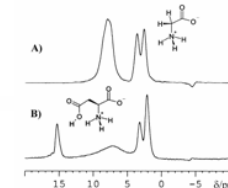
- 1) Sekvence se skládá z mnoha cyklů.
- 2) Čtyři 90° pulsy jsou separovány okny.
- 3) Po cyklu šesti tiden se snímá jeden až dva body FID.
- 4) Spiny se vyvíjejí pouze podle chemického posunu.



WHH-4

100%

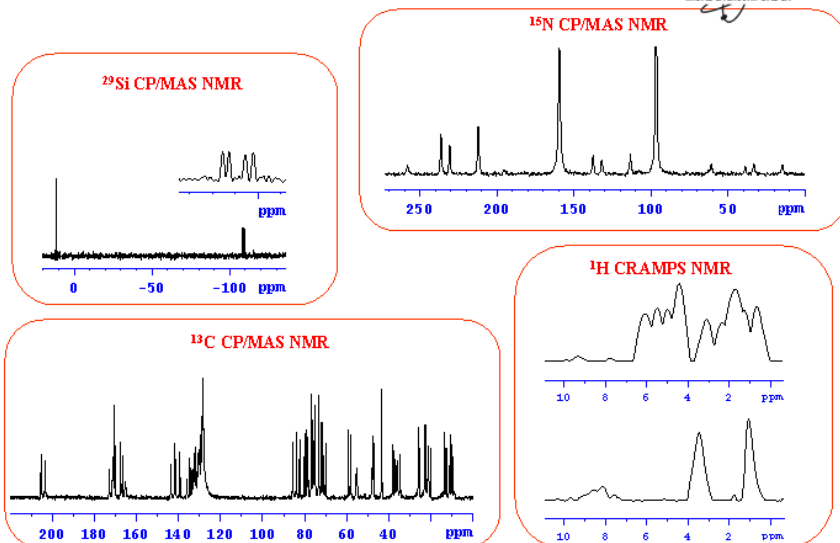
$\gamma = 26,8 \text{ rad} \cdot \text{T}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$



Stranou prozatím zůstalo měření vodíkových NMR spekter a detekce vodíkové magnetizace. To má v NMR spektroskopii roztoků a kapalin zcela jedinečnou pozici. Výjimečné postavení ¹H jader vyplývá z jejich téměř 100% přirozeného izotopického zastoupení a velmi vysokého gyromagnetického poměru. To je přesně ta kombinace, která měření ¹H NMR spekter v pevném stavu komplikuje. Prostá rotace vzorku pod magickým úhlem vede jen k omezenému zužování signálů. Existuje však alternativní přístup, který je založený na diskontinuálním ozařování vzorku *rf* polem. První klasická multipulsní sekvence tak byla navržena v roce 1968 a její podstatou je aplikace nekonečné řadě cyklů pulsů. Tím začnou spiny vykonávat precesi efektivně pod magickým úhlem. Výsledkem jsou potom relativně dobře rozlišená vodíková NMR spektra.

Spektra vysokého rozlišení – od 1976

Joint Laboratory of Solid State NMR
IMC AS CR and JHPC AS CR



V polovině sedmdesátých let se NMR spektroskopie pevného stavu konečně dostala do stavu, kdy dokázala v relativně krátkém čase získat NMR spektra vysokého rozlišení a tak poskytnout základní strukturální informace a to nejenom o anorganických systémech, ale také o složitých organických a přírodních sloučeninách. Paradoxně, když už se zdálo, že se výsledky NMR spektroskopie pevného stavu dostaly na dohled spektrům roztoků a kapalin tak v tomto roce, v roce 1976 se NMR spektroskopii roztoků podařilo revolučně rozvinout.

Vícerozměrná NMR spektroskopie – 1971

Joint Laboratory of Solid State NMR
IMC AS CR and JHPC AS CR

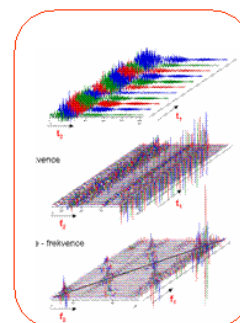


Jean Luis Charles Jeener
*1931

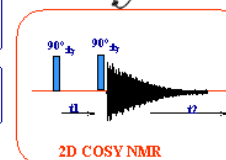
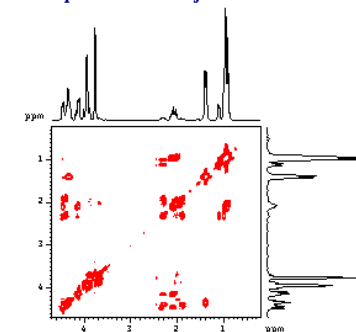
Přednáška na letní škole v Basko Polje, Jugoslávie, 1971

Dvoudimenzionální NMR, COSY

Avé W.P., Bartholdi E., Ernst R.R.
2D Spectroscopy. Application to NMR, *J. Chem. Phys.* (1976); 64: 229.



Magnetizace se přes vazebné elektrony přenáší na sousední jádra



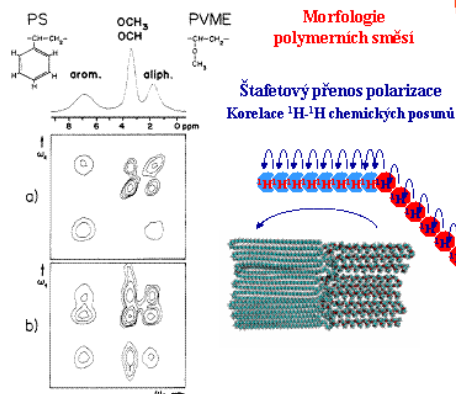
2D COSY NMR

I když dvou-dimenzionální experiment byl prvně navržen Jeanem Jeenerem na letní škole v Basko Polje už v roce 1971 trvalo to celých pět let, než se lidem kolem R. R. Ernsta podařilo realizovat dvoudimenzionální korelační experiment známý jako COSY a získat tak vodík-vodíkové korelační spektrum. Nejenom že tato spektra poskytují podstatně lepší spektrální rozlišení, ona navíc obsahují i principiálně nový typ informací. Jenom pro připomenutí tento typ korelačních experimentů je založený na existenci a působení spin-spinových J interakcí o velikosti jednotek až desítek Hz. Jde tedy o přenos polarizace prostřednictvím vazebných elektronů a slouží ke sledování proton-protonové konektivity a posouzení topologie v molekule.

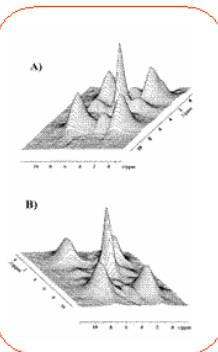
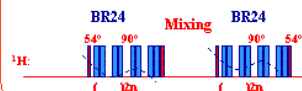
2D korelační NMR v pevné fázi – 1985

Joint Laboratory of Solid State NMR
IMC AS CR and JHPC AS CR

Caravatti P., Neuenschwander P., Ernst R.R.
Characterization of Heterogeneous Polymer Blends by 2D ^1H Spin
Diffusion Spectroscopy, *Macromolecules*. (1985); 18: 119.



2D ^1H - ^1H CRAMPS



V pevné fázi jsme museli na podobný, analogický experiment čekat ale dalších téměř deset let. Tento vodík-vodíkový korelační experiment byl opět realizován ve skupině R.R. Ernsta. Nesloužil ale k posouzení konektivity a topologie skeletu, ale spíše k posouzení mísitelnosti heterogenních polymerních systémů. Přenos polarizace je založen na přímých dipol-dipolových interakcích a tedy na spinové difuzi. Magnetizace se může šířit i přes velké vzdálenosti a vznik korelačních signálů indikuje prostorovou blízkost různých složek a strukturních jednotek.

2D separační NMR v pevné fázi – 1989-1992

Joint Laboratory of Solid State NMR
IMC AS CR and JHPC AS CR



Spieß HW

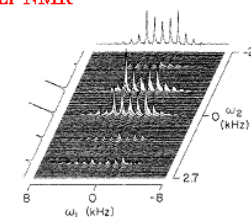
Schmidt-Rohr K., Clauss J., Spieß H.W.
Correlation of Structure and Mobility and Morphology by 2D
Wide-Line-Separation NMR, *Macromolecules*. (1992); 25: 3273.



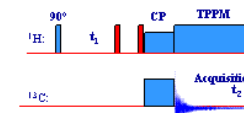
Griffin RG

Griffin R.G.
Measurement of Heteronuclear Bond Distances in
Polycrystalline Solids by Solid-State NMR, *J. Am. Chem. Soc.*
(1987); 109: 4163.

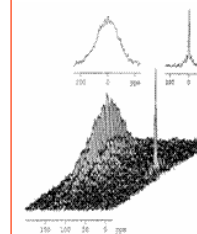
2D ^1H - ^{15}N SLF NMR



2D ^1H - ^{13}C WISE



2D ^1H - ^{13}C WISE NMR



Faktem ale je, že spíše než korelační experimenty se v pevné fázi navrhovali experimenty separační. Šikovou spinovou manipulací se totiž podařilo separovat řadu anizotropní interakcí podle izotropního chemického posunu. Anizotropní interakce totiž obsahují celou řadu významných strukturních informací. Anizotropie chemického posunu cosi vypovídá o distribuci nebo elektronové hustotě kolem daného jádra. Velikost heteronukleární vodík-dusíkové dipolární interakce potom např. odráží sílu vodíkových vazeb a tedy i pozici vodíkového atomu a nakonec homonukleární vodík-vodíkové dipolární interakce dobře odrážejí lokální pohyblivost. Úzký signál pak reflektuje vysoce dynamické segmenty, zatímco rigidním složkám odpovídá velmi široký signál.

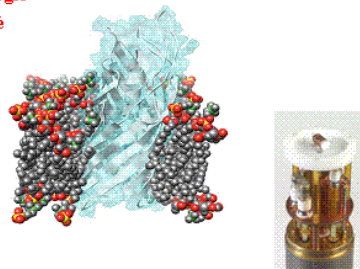
Prudká akcelerace – 90-tá léta

Stabilita NMR spektrometrů – digitální technologie



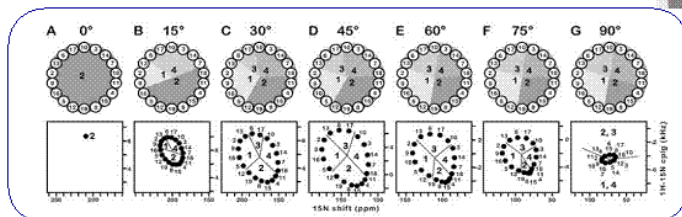
Opella S.J.

Strukturní biologie
Membránové
proteiny



Wu C.H., Ramamoorthy A., Opella S.J.,
High Resolution Dipolar Solid-State NMR, *J. Magn. Reson. A*
(1994); 109: 270.

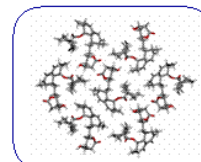
PISEMA:
Polarization Inversion Spin Exchange at Magic Angle



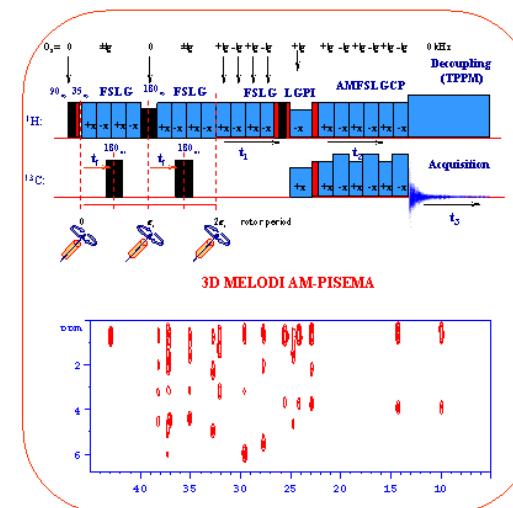
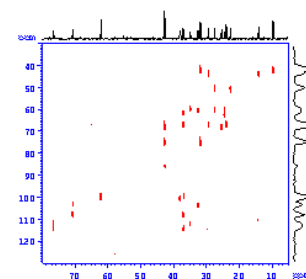
K prudkému rozvoji vícedimenzionálních experimentů došlo v devadesátých letech a to především díky digitální technologii a rostoucí stabilitě NMR spektrometrů. Již bylo jasné, že NMR spektroskopie pevného stavu je dostatečně silný nástroj k posouzení strukturních parametrů řady biologických systémů a to třeba membránových proteinů. Za zcela unikátní považují techniku separace lokálních polí, která je známá pod názvem PISEMA. Proměnlivá velikost dipolárních interakcí NH skupin peptidových řetězců procházejících orientovanou membránou totiž vede ke vzniku obrazců korelačních signálů ve spektru, které odrážejí například úhel sklonu průchodu tohoto proteinu lipidovou membránou.

Vysoce rozlišená 2D spektra – 2000

Stabilita NMR spektrometrů – digitální technologie



2D CP-INADEQUATE



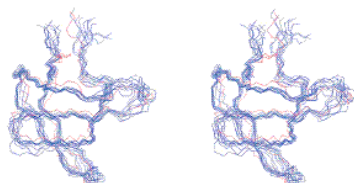
3D MELD/AM-PISEMA

V tomto desetiletí se pak rozvinuly techniky měření heteronukleárních korelačních spekter do té míry, že je možné poměrně přesně měřit meziatomové vzdálenosti mezi atomy vodíku a uhlíku, případně dusíku, což vede k rozvoji NMR krystalografie. Analýza NMR spekter krystalických látek může vést k získání takových parametrů jako je určení krystalografické asymetrické jednotky nebo prostorové grupy. Tyto informace spolu s pochopením povahy vodíkových vazeb poutající molekuly do třídimenzionální struktury a lokalizace odpovídajícího vodíkového atomu následně umožní rekonstrukci a optimalizaci úplné 3D struktury. Na rozdíl od difrakčních technik totiž dokáže NMR spektroskopie velmi přesně lokalizovat pozici vodíkových atomů. Přesnost měření je ± 2 pm pro vzdálenosti do 200 pm a ± 5 pm pro délky do 400 pm.

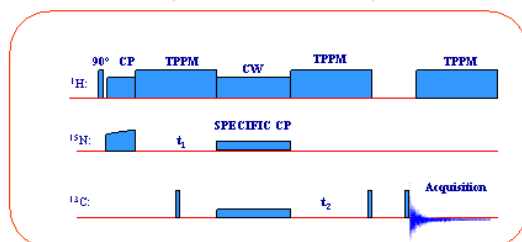
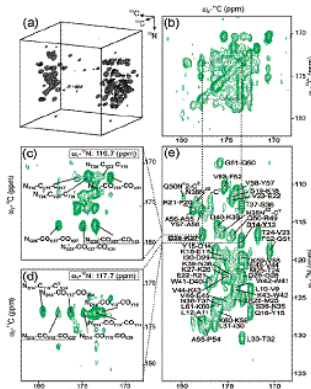
Malé mikrokrytalické proteiny – 2002

Joint Laboratory of Solid State NMR
IMC AS CR and JRPSC AS CR

Castellani, F., van Rossum, B.J., Diehl, A., Schubert, M., Rehbein, K., and Cschikina, H.
Structure of a protein determined by solid state magic-angle-spinning NMR spectroscopy, *Nature* 420, 98-102 (2002).



α -Spectrin SH3 Domain



A stejně jako je tomu v případě NMR roztoků a kapalin, hlavní úsilí NMR spektroskopiků se soustředilo na řešení 3D struktury proteinů, v tomto případě v mikrokrytalickém stavu. Pravda pokročilé NMR techniky již více jak deset let umožňují určit úplnou tří-dimenzionální strukturu proteinů v roztoku a Kurt Wüthrich za rozvoj těchto technik získal NC v roce 2002. Zatímco první solid-state NMR struktura SH3 domény α -spektrinu byla prezentována teprve až v tomto roce. Přesto NMR spektroskopie pevného stavu definitivně překročila hranice fyziky a chemie a začala významně ovlivňovat strukturní biologii.

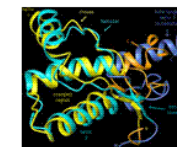
Amyloidová vlákna a prionové proteiny – 2005

Joint Laboratory of Solid State NMR
IMC AS CR and JRPSC AS CR

Meier B.H. et al.
Correlation of Structural Elements and Infectivity of the HET-s prion, *Nature* (2005); 435(9): 844.

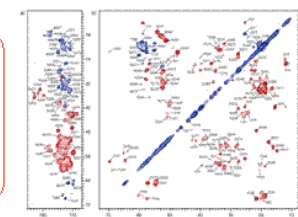
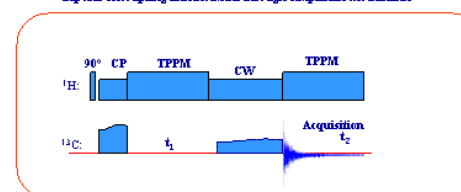


Meier B.H.
*1954



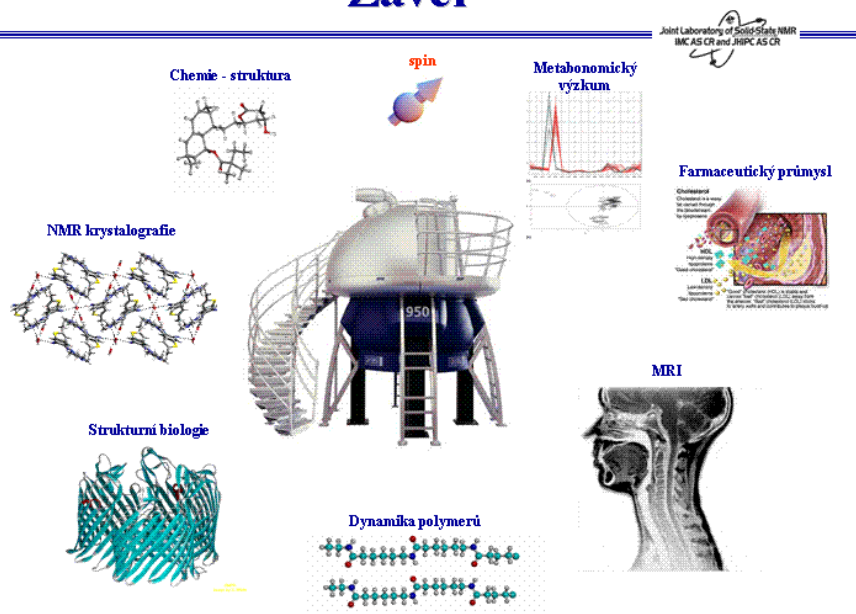
2D ^{13}C - ^{13}C DREAM NMR

Dipolar Recoupling Enhancement through Amplitude Modulation



Zde totiž najdeme systémy, které snad ani nejde jinak popsat než právě NMR spektroskopií pevné fáze. Tím jsou především *b*-amyloidová vlákna prionových proteinů způsobující Alzheimerovu nebo Creutzfeldt-Jakobu chorobu. Najít zákonitosti mezi strukturními změnami a infekčním chováním prionů je jednou z výzev právě pro moderní NMR spektroskopii pevného stavu. Faktem je, že první výsledky na sebe nenechaly dlouho čekat a 9. června tohoto roku (2005) vyšla v prestižním časopise *Nature* (435, 844, 2005) práce, jež poodhaluje některá tajemství.

Závěr



Ačkoli se to nezdá NMR spektroskopie a techniky s ní související se od roku 1950 poměrně úspěšně rozšířili a zasáhly řadu oblastí nejenom vědy, ale také i průmyslu a samozřejmě medicíny. Lze tvrdit, že NMR spektroskopie je stále velice rychle se rozvíjející oblast strukturální analýzy a lze předpokládat, že metodickým a technickým pokrokem se naše znalosti struktury hmoty ještě více prohloubí. Zvláště pak nalezení vztahu a zákonitostí mezi strukturou vnitřní pohyblivostí a funkčním chováním systému nám umožní pochopit řadu jevů a díky tomu i vhodně a cíleně připravovat nové materiály případně lépe řešit a předcházet řadě zdravotních problémů.