

MINULOST A SOUČASNOST NMR SPEKTROMETRIE – POHLED DO NITRA MOLEKUL A ČLOVĚKA

JIŘÍ BRUS a JAROSLAV KRÍŽ

Ústav makromolekulární chemie AV ČR, Heyrovského nám. 2, 162 06 Praha 6 – Petřiny
brus@imc.cas.cz, kriz@imc.cas.cz

Došlo 4.11.05, přepracováno 30.1.06, přijato 24.3.06.

Klíčová slova: NMR spektrometrie, strukturální analýza, NMR krystalografie, zobrazování magnetickou rezonancí (MRI)

Obsah

1. Úvod
2. Energie uložená v atomovém jádře
3. Spin částice a jeho původ
4. Kde hledat počátky NMR spektrometrie?
5. Proč je vodík tak výjimečný?
6. Kvantování orientací a energií
7. Excitace a koherence
8. První NMR signály
9. Matematika – královna věd
10. Spinová gymnastika a pulsní sekvence
11. Strukturální biologie
12. NMR spektrometrie tuhého stavu
13. NMR krystalografie
14. Zobrazování magnetickou rezonancí (MRI)
15. Funkční MRI
16. Závěr

1. Úvod

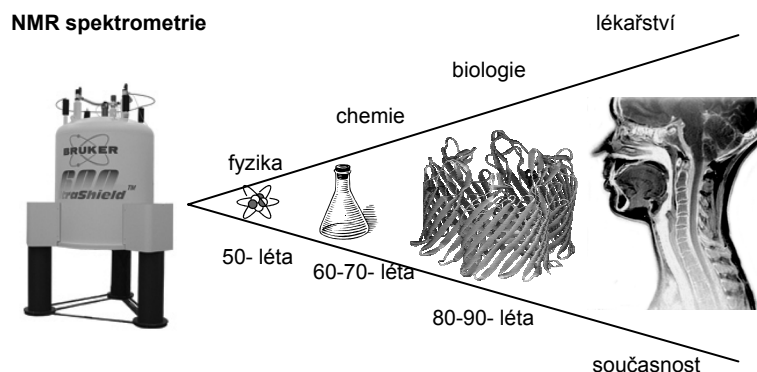
Krátce po svém objevení byla spektroskopická metoda – nukleární magnetická rezonance (NMR) – výhradně doménou fyziků a její využití bylo poměrně omezené. S objevem a pochopením vztahu mezi chemickou strukturou a polohou resp. tvarem NMR signálů se však její vliv rychle přenesl do chemie, kde se významně uplatnila a stále uplatňuje jako nepřekonatelná metoda strukturální analýzy při určování konstituce malých organických a organokovových sloučenin, přírodních látek a syntetických polymerů.

S rozvojem experimentálních postupů a přístrojového vybavení pak přednosti této metody elegantně využila strukturální biologie při popisu nukleových kyselin, polypeptidů a proteinů. Dnes již lze nalézt významné aplikace v průmyslu, především ve farmacii, ale i při identifikaci takových produktů jako jsou potraviny nebo produkty metabolismu. Dnešní „proteomický“ a „metabonomický“ výzkum se bez moderní NMR spektrometrie jen těžko

obejde. V současné době však NMR spektrometrie zasahuje do našeho života snad nejvíce v lékařství a to jako zcela neinvazivní diagnostická metoda (obr. 1).

2. Energie uložená v atomovém jádře

Ačkoli slovo „nukleární“ v nás může vyvolávat řadu smíšených pocitů spojovaných s řízeným i neřízeným uvolňováním obrovské energie při rozpadu atomového jádra, téměř podle známého vztahu $E = m \cdot c^2$, nukleární magnetická rezonance (NMR) překvapivě pracuje s energiemi, které jsou velmi nepatrné. Mnohdy je vůbec nedokážeme odlišit od elektronického šumu způsobeného tepelným pohybem atomů vodiče v elektronických součástech spektrometru. Proto musíme měření mnohokrát opakovat a signály postupně načítat. Přesto, anebo možná právě proto, je NMR spektrometrie tak rychle se vyvíjející oblast strukturální analýzy. Nedávný rozvoj experimentálních postupů a elektronických součástí vedl k tomu, že dosažené rozlišení a selektivita NMR experimentů umožňují velmi přesně popisovat strukturu a vnitřní pohyblivost širokého spektra látek (od velice tvrdých a rigidních skel, organických i anorganických krystalů, přes syntetické polymery až po velice měkké a pohyblivé gely a roztoky polypeptidů či proteinů). Díky tomu je možné popsat třírozměrné uspořádání i u takových látek, které jen velmi neochotně poskytují krystaly vhodné k rentgenové difrakci, které jsou nerozpustné anebo poskytují pouze velmi zředěné roztoky. To mimo jiné umožnila úžasná technologie kryosond. V nich jsou detekční cívka a předzesilovače signálu tak silně ochlazený kapalným heliem (4,2 K), že je potlačen tepelný pohyb atomů ve vodičích a s ním i elektronický šum. Tím se potřebný experimentální čas snižuje až 16krát. Mimo to je řada fyzikálních veličin sledovaných metodou NMR citlivých na rychlost a amplitudu vnitřních pohybů molekul, a tak právě NMR spektrometrie podává komplexní informace o vnitřní struktuře a uspořádání hmoty. Proto můžeme NMR spektroskopii směle považovat za metodu komplementární k rentgenové difrakci. Ačkoli NMR spektrometrie poskytuje významné informace, cílem není nahradit difrakční techniky, ale především doplnit chybějící údaje k úplnému popisu struktury a dynamiky vysoce organizovaných systémů. Zatímco standardní difrakční techniky jsou téměř slepé k atomům vodíku, protože ten se vyznačuje jen malou elektronovou hustotou, NMR experimenty jsou k přítomnosti vodíku ^1H velmi citlivé. Nejen díky tomu se NMR spektrometrie tuhého stavu stala významnou součástí charakterizace farmaceuticky aktivních substancí a od roku 1997 je doporučována i hlavním a přísným regulátorem trhu s léčivými v USA – FDA (Food and Drug Administration).



Obr. 1. Rozsah aplikací NMR spektrometrie v různých periodách minulého století

3. Spin částice a jeho původ

Začněme od začátku. Před více než 13 miliardami let vznikl známý vesmír. Během velmi krátkého období hadronů (10^{-6} – 1 s) se z kvarků vytvořily protony a neutrony. V těchto raných dobách však teplota vesmíru byla ještě příliš vysoká na to, aby elektrony a protony držely v atomech dohromady. Proto tyto částice osamocené bloudivy malým, horkým a velice hustým vesmírem. Ale již v té době měl proton, což je pořád nejjednodušší atomové jádro, svou klidovou hmotnost, náboj a **spin**. Když pak během období nadvlády zářivých polí a v období nukleosyntézy (cca 3 min – 400 000 let) vesmír zchladl na teplotu asi 3000 K, protony a neutrony se již mohly spojovat do atomových jader a spolu s elektrony tvořit nejjednodušší atomy a molekuly a posléze i těžší jádra. To byly a jsou především molekuly vodíku H_2 . I v těchto atomech a molekulách si jednotlivé elementární částice ponechaly výše uvedené vlastnosti tedy i **spin**. Proto **spin** není vlastností pouze protonů a elementárních částic, ale i velké většiny složených částic včetně těžších atomových jader.

4. Kde hledat počátky NMR spektrometrie?

Spin, tato vlastnost mnoha částic, nemá zcela úplnou makroskopickou analogii. Může trochu připomínat rotaci. Ano, rotace je velmi častým jevem a pohybem kolem nás. Je to právě rotační pohyb, díky němuž se pohodlně přesouváme z místa na místo, a který nás stále inspiruje. Všechny makroskopické objekty mohou rotovat kolem vlastní osy a vnějším zásahem plynule měnit svůj moment hybnosti. Mohlo by se tedy zdát, že to budou činit i elementární částice. Ale i když tomu tak není a my zcela určitě víme, že žádné atomové jádro (tedy ani samotný proton) kolem

vlastní osy nerotuje, nerozlučnou vlastností protonu je „vnitřní“ moment hybnosti, tedy spin. Tento vnitřní jaderný spin poprvé předpověděl Wolfgang Pauli (*1900–†1958, Nobelova cena 1945) v roce 1924 a to prostřednictvím čtvrtého kvantového čísla. O rok později to byli George Uhlenbeck (*1900–†1988) a Samuel Goudsmit (*1902–†1978), kteří interpretovali toto kvantové číslo jako spin. Spin je však vlastnost relativistická a její popis je dokonale propracován v rámci kvantové teorie. Proto se moment hybnosti stejně jako většina dalších vlastností ve světě částic nemění plynule, ale je kvantován.

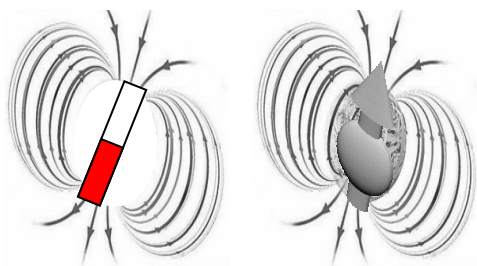
Zmíníme-li ale termín „relativistická“ musí se nám vybavít jméno jiného velikého badatele, na jehož počest byl rok 2005 právem nazván „světovým rokem fyziky“. Ano, je to Albert Einstein (*1879–†1955, Nobelova cena 1921), který před sto lety, tehdy jako ještě neznámý patentový úředník v Curychu, uveřejnil sérii článků, které zásadním způsobem změnily pohled fyziků na podstatu pozorovatelného světa. V obecném povědomí A. Einstein rovná se relativita; a relativistické efekty, jak každý ví, se projevují typicky při rychlostech, blízkých rychlosti světla, v kosmických rozměrech a v gravitačním poli velkých hmot. Ale struktura a dynamika atomů a molekul je prakticky výhradně založena na elektromagnetické interakci, popsané i pro mnohačasticové systémy kvantovou mechanikou, kterou Einstein nejenže nevytvořil, ale dokonce zavrhnul. Jenomže bez Einsteina, bez jeho jasnozřivé interpretace Planckova objevu kvantování světla, by sotva byla nějaká kvantová mechanika vůbec vznikla. Pomocí těchto úvah bychom tedy mohli posunout dobu položení základů NMR spektrometrie do doby před sto lety. Úvaha je to jistě hezká, ale ne zcela korektní, protože tak bychom se mohli dostat i dále až na konec 18. století do doby Francouzské revoluce. O tom se ale zmíníme později.

5. Proč je vodík tak výjimečný?

Možná to vyplývá z výše uvedeného snad až „aristokratického“ původu protonů (tedy i atomů vodíku), ale právě toto atomové jádro má pro NMR spektroskopii výjimečný význam. Je to právě vodík, vyjma neznámé temné látky (dark matter), který i v dnešních dnech tvoří drtivou většinu veškeré známé hmoty vesmíru, a v podobě molekul vody a jiných organických sloučenin, i živých organismů. Nejenom že je vodík (^1H) tak rozšířený, ale jsou to totiž jeho atomová jádra, která díky svému vysokému gyromagnetickému poměru ($2,68 \cdot 10^8 \text{ T}^{-1} \text{rads}^{-1}$) a téměř 100% přirozenému isotopovému zastoupení jsou vůbec nejcitlivější ve vztahu k NMR experimentům. Odezva vodíkových jaderných spinů na vnější podněty (excitaci) je největší a přítomnost jaderného spinu atomu ^1H lze vystopovat i na relativně velké vzdálenosti. Atomová jádra vodíku totiž produkují nejsilnější jaderný magnetický moment a projevují se i nejsilnější dipolární interakcí.

6. Kvantování orientací a energií

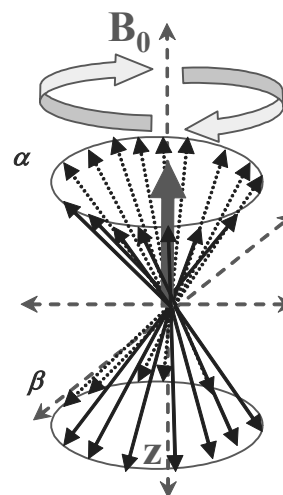
Jaderný magnetický moment je přímým důsledkem existence jaderného spinu. Atomové jádro můžeme velmi zjednodušeně považovat za malý magnetický dipól (obr. 2). Je-li vhodné atomové jádro (např. proton) umístěno do silného magnetického pole, přestávají být pro jeho magnetický moment (a současně spin) různé orientace rovnocenné. Za prvé platí kvantování orientace (ne každý směr je povolený) a pak (stejně jako v makroskopickém světě) závisí energie na orientaci magnetického momentu. Kvantování orientace současně tedy znamená kvantování energie. Tak vznikají energetické stavy, které lze pozorovat pouze v magnetickém poli. Obecně platí, že spin částice může být orientován pouze tak, aby jeho průmět (složka) do požadovaného směru (zde směr magnetické indukce) byla polovinovým násobkem Planckovy konstanty dělené π . To také znamená, že magnetický moment se nikdy nemůže energeticky uplatnit celou svou velikostí. A navíc díky principu neurčitosti, nemůžeme zbývající dvě složky vektoru spinu současně měřit přesně.



Obr. 2. Schématická ilustrace magnetických vlastností spinů

7. Excitace a koherence

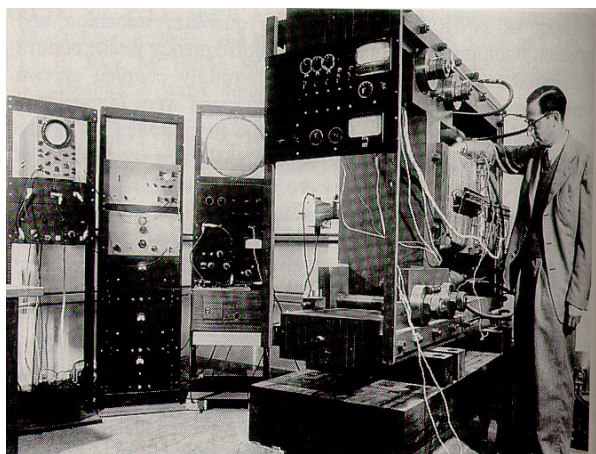
Pokud při popisu NMR experimentu zapomeneme na to, že spin není rotace, můžeme se na daný problém podívat i z jiné strany. Na počátku NMR experimentu je „nic“, totální chaos, kdy neexistuje žádná makroskopická a tedy i měřitelná magnetizace. Umístíme-li ale látku do magnetického pole, spiny se zorientují do dvou možných směrů a začnou vykonávat precesní pohyb (obr. 3). Jejich pohyb ale není zřazovaný, každý spin se nachází v jiné fázi precesního pohybu. Ale protože spinů se souhlasnou orientací se směrem vnějšího magnetického pole je nepatrně více než spinů s opačnou orientací, vektorový součet dává makroskopickou magnetizaci, které říkáme podélná. O ní pouze víme, že existuje, ale nemůžeme ji přímo měřit. Pak systém ozáříme krátkým radiofrekvenčním pulsem, jehož frekvence (10–950 MHz, frekvence radiových vln) odpovídá frekvenci spinové precese. Díky tomu dojde ke zřazování precesního pohybu a všechny spiny začnou „rotovat“ ze stejné výchozí orientace. Precesní pohyb je tedy fázově koherentní. Říkáme, že dosáhneme koherence. Zároveň se populace na obou energetických hladinách vyrovnají a vektorový součet dá příčnou magnetizaci. Ta v detekční cívice indukuje napětí, které snímáme ve formě volně doznívajících indukce (FID). No a právě tato volně doznívajících indukce je nositelkou všech strukturálních informací.



Obr. 3. Schématická ilustrace kvantování orientace vektoru jaderného magnetického momentu vzhledem k vnějšímu magnetickému poli

8. První NMR signály

Možnosti manipulace s jaderným spinem si jako jeden z prvních povšiml Isidor Isaac Rabi (*1898–†1988, Nobelova cena 1944), který se mimo jiné (např. konstrukce atomových hodin) věnoval rozvoji radarové technologie. Díky tomu se NMR spektrometrie začala více rozvíjet



Obr. 4. Felix Bloch ve své laboratoři v roce 1949, kdy byl naměřen první NMR signál

během druhé světové války. K dosažení úspěchu také významně přispěl rozvoj makromolekulární chemie, a to především díky objevu polymerů jako je teflon a nízkohusotní polyethylen. Nebýt těchto materiálů, které se velmi osvědčily také jako izolátory vysokofrekvenčních koaxiálních kabelů nebo elektronkových lamp, byl by rozvoj podstatných elektronických součástí značně komplikován. Jeden z prvních ^1H NMR signálů atomů vodíku byl naměřen v roce 1949 ve Stanfordu Felixem Blochem (*1905 až †1983). Ten později v roce 1952 spolu s Edwardem Millem Purcellem (*1912–†1997) získal Nobelovu cenu. Ovšem zařízení, které F. Bloch obsluhuje na obr. 4, ještě není klasický NMR spektrometr, ale spíše přístroj na měření magnetického momentu. Za více než 50 let se ale NMR spektrometrie dramaticky proměnila. Permanentní magnety a elektromagnety byly nahrazeny supravodivými, kde teplota kapalného helia dosahuje méně než 2 K. Velikost supravodivých magnetů, které dosahují závratných intenzit magnetických polí (více než 21 T, obr. 5), je přitom úctyhodná, zatímco elektronika se nyní vejde do několika malých boxů o rozměrech cca 70 × 70 × 120 cm. Původně byl poměr zcela opačný. Vzpomeňme na sálové počítače.



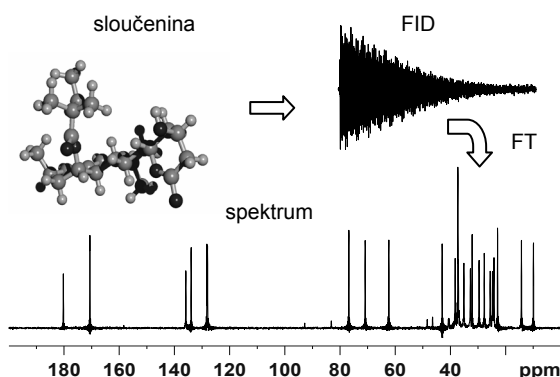
Obr. 5. Supravodivý magnet firmy Oxford Instruments o intenzitě magnetického pole větší než 21T

9. Matematika – královna věd

Vraťme se ale ještě na chvíli do historie. V historickém přehledu nesmíme zapomenout na jednoho muže, který se zcela nezastupitelně zapsal do knihy NMR spektrometrie, a to již v době, kdy ještě žádná NMR spektrometrie neexistovala. Je to důstojník armády císaře Napoleona Bonaparta a jeden z největších matematiků světa Jean Baptiste Joseph Fourier (*1763–†1830, obr. 6). Původně se měl stát knězem, ale bližší mu byla matematika a armáda a tak se již v 16 letech stal učitelem matematiky na vojenské škole v Auxerre. Byl to také člověk s jistým politickým nadáním a ačkoli byl ve spojení s Revolučním výborem, zbytečný teror francouzské revoluce mu prý byl cizí. Možná i proto byl v roce 1794 uvězněn a odsouzen na popravu. Ale dříve než on na popravišti skončil samotný Robespierre a díky tomu je svět o něco bohatší. J. B. J. Fourier ani poté na politiku nerezignoval a v roce 1798 vyrazil s Napoleonovou armádou na Východní expedici. Tehdy se stal guvernérem dolního Egypta a po návratu do Francie se stal i prefektem Grenoblu. Jeho přínos pro NMR spektroskopii však nespočívá v jeho politické a diplomatické obratnosti, ale ve vypracování vztahů, které převádějí, transformují funkce z časové oblasti do oblasti



Obr. 6. Jean Baptiste Joseph Fourier (*1763–†1830)



Obr. 7. FID a Fourierovou transformací generované ^{13}C NMR spektrum simvastatinu a jeho molekulární struktura

frekvenční. A právě touto procedurou získáváme tradiční frekvenční spektrum. Jeho transformace (Fourierova transformace – FT) vychází z předpokladu, že každý signál lze vyjádřit jako superpozici nekonečně mnoha sinusových signálů.

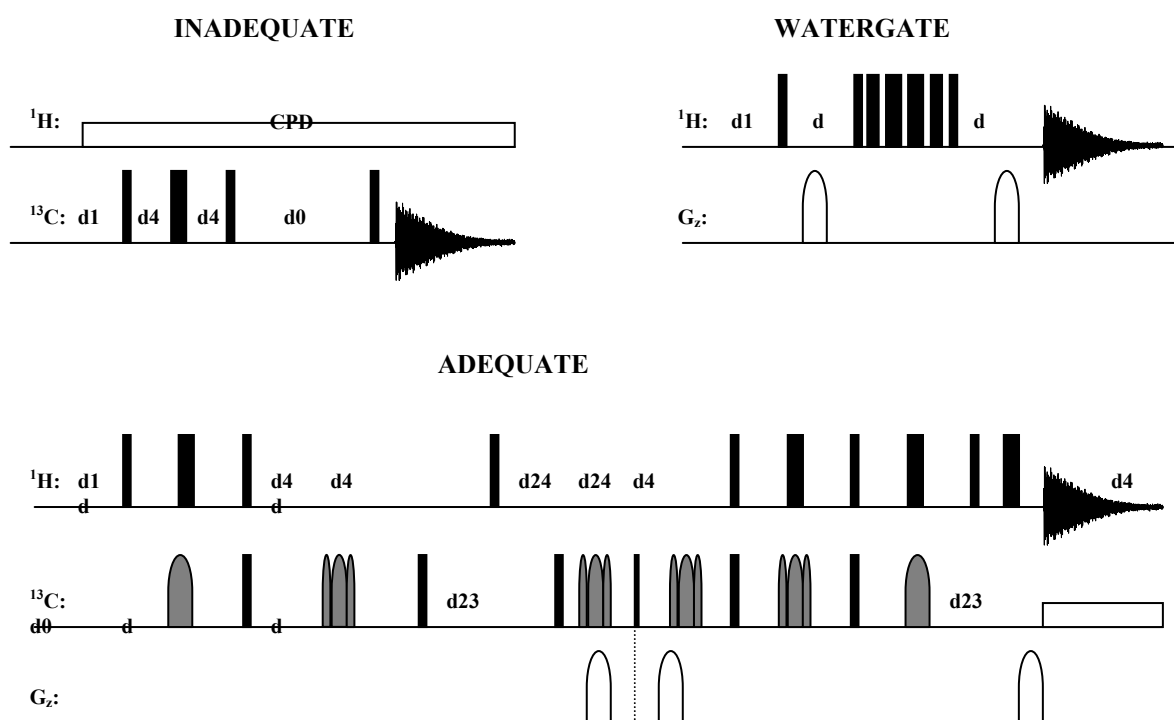
O více než 150 let později tuto Fourierovu transformaci využil Richard R. Ernst (*1933, Nobelova cena 1991) k převedení výše zmiňované v čase volně dozívající indukce do klasické podoby frekvenčního NMR spektra, ve kterém nacházíme signály, jež lze přiřadit jednotlivým atomům a strukturním jednotkám v molekule. Takovéto spektrum je vlastně úplným zobrazením molekuly a její struktury (obr. 7). Snahou NMR spektroskopiků je pak pochopit tato spektra a na jejich základě rekonstruovat konstituci a strukturu neznámé sloučeniny.

10. Spinová gymnastika a pulsní sekvence

Od poloviny 60. let minulého století se NMR spektrometrie již stala nedílnou součástí moderní chemie. A od roku 1971, kdy byl navržen první dvourozměrný experiment, pak NMR spektrometrie prošla dalším bouřlivým rozvojem. V tomto roce totiž Jean Jeener (*1931) na letní

škole v Basko Polje v Jugoslávii navrhl zásadní korelační experiment (COSY – COrelation SpectroscopyY). Tato jeho práce nikdy nebyla publikována v renomovaném časopise a přesto významně ovlivnila budoucí směřování NMR spektrometrie. Zajímavé také je, že trvalo celých pět let než se podařilo tento experiment realizovat R. R. Ernstovi. Badatelé věnující se NMR se posléze pomocí pulsních sekvencí (obr. 8) naučili tak šikovně a vhodně manipulovat se spinovým systémem molekul, že mohou získat velmi přesné informace o meziatomových vzdálenostech, lokální geometrii molekuly, vzájemných interakcích a vnitřní pohyblivosti téměř všech sloučenin ve všech stavech. Díky této manipulaci, která se někdy nazývá „spinová gymnastika“, tak pokročilé NMR techniky více než deset let umožňují určit úplnou třírozměrnou strukturu proteinů v roztoku. Jedním z nejvýznamnějších badatelů, kteří se zasloužili o rozpracování těchto technik, je Kurt Wüthrich (*1938, Nobelova cena 2002). Díky tomu NMR spektrometrie překročila hranice fyziky a chemie a začala významně ovlivňovat biochemii a strukturní biologii.

V současné době již existuje několik tisíc NMR experimentů – pulsních sekvencí, které poskytují specifické informace o studovaném objektu. Většinu těchto sekvencí přiřadili jejich objevitelé názvy, které jsou někdy poněkud

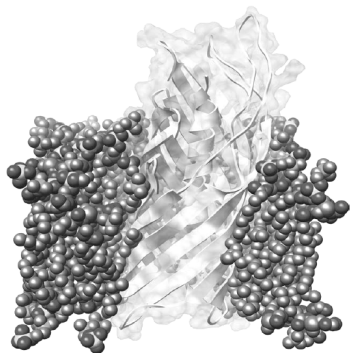


Obr. 8. Schématické znázornění některých pulsních sekvencí: INADEQUATE, WATERGATE a ADEQUATE. Svislé úsečky označují pulsy elektromagnetického pole, oblé útvary pulsy lineární změny magnetického pole nebo měkké pulsy elektromagnetického pole

bizarní a zasluhují proto krátkou zmínku. Jistě některý NMR experiment se nám může jevit jako zcela „nepostačující“, i když takový ve skutečnosti není (INADEQUATE – Incredible Natural Abundance Double-QUAntum Transfer Experiment). Jiná technika zase může být „moudrá“ (WISE – Wide-line SEparation). Někdy se domníváme, že vše je jen „sen“ (DREAM – Dipolar Recoupling Enhancement through Amplitude Modulation), který podle mě zkušenosti velmi rychle může přejít v pořádné „drama“ (DRAMA – Dipolar Recovery At Magic Angle) a nakonec v „horor“ (HORROR – HOmonucleaR ROTary Resonance). Smysl pro humor je NMR spektroskopikům skutečně blízký a tak jedna z velmi často používaných technik pro potlačení signálu vody nese příznačný název WATERGATE. Právě tato technika, při jejímž objevu stál významný český vědec Vladimír Sklenář (*1951), je dnes součástí téměř všech experimentů, které slouží k popisu biologicky zajímavých systémů.

11. Strukturní biologie

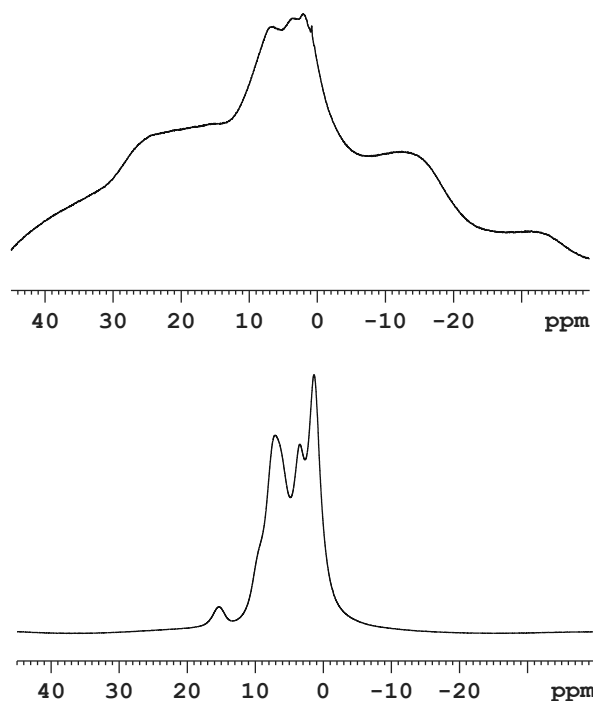
Zájem NMR spektroskopiků se velmi často soustřeďuje na biologicky zajímavé makromolekuly. Jde především o nukleové kyseliny, peptidy a proteiny, které řídí řadu biologických procesů v živých buňkách. Ať už jde o stabilizaci membránových potenciálů, přenos signálu, či regulace objemu buňky, všechny tyto procesy a především poruchy těchto procesů mohou vést k vážným poškozením celého organismu. Pro pochopení těchto procesů a nalezení zákonitostí mezi nimi je znalost úplné struktury těchto látek klíčová. Celá řada struktur rozpustných proteinů již byla úspěšně stanovena, a to jak rentgenovou difrakcí složitě připravených krystalů, tak užitím NMR v roztoku. Avšak 30 % všech proteinů se nalézá v přirozeném stavu v lipidových membránách (obr. 9) a tak je pochopitelné, že převést takovýto systém do roztoku, či připravit vhodný krystal a zároveň zachovat podstatné funkční vlastnosti, je velice obtížné. A právě pro řešení těchto problémů se nabízí NMR spektrometrie tuhé fáze.



Obr. 9. Uspořádání membránového proteinu v lipidové membráně

12. NMR spektrometrie tuhého stavu

Tato technika má na rozdíl od NMR v roztoku řadu specifíků. Například vzorek musí velice rychle rotovat, přičemž frekvence rotace dosahuje až 35 kHz. Dále musí osa rotace svírat se směrem vnějšího magnetického pole úhel $54,7^\circ$. Tomuto úhlu se říká „magický“, protože právě při rotaci pod tímto úhlem se spinový systém tuhé látky zdánlivě začíná chovat tak, jak se chová v roztoku. To lze zjednodušeně chápat tak, že vysoká rychlost rotace vnutí molekulárnímu systému a tak každému elektronovému oblaku kubickou symetrii. Úhel $54,7^\circ$ totiž svírá tělesová úhlopříčka se stranami v krychli. Techniku rotace vzorku pod magickým úhlem poprvé navrhli E. R. Andrew (*1921) a I. J. Lowe (*1929) v letech 1958 a 1959. Ovšem tehdejší práce byly prováděny na anorganických materiálech pro odstranění anizotropie chemického posunu. V tento okamžik do příběhu vstupuje Bohdan Schneider (*1927) z Ústavu makromolekulární chemie ČSAV. V roce 1962 byl na tomto ústavu instalován NMR spektrometr JEOL-JNM-3H-60, který měl napomoci řešit strukturní problémy neanorganických látek, ale často nerozpustných polymerů. Teoreticky vzdělaní fyzici však tehdy dokazovali, že v ^1H NMR spektrech tuhých polymerů 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



Obr. 10. ^1H MAS NMR spektra změřená při rotaci 8 kHz (nahore) a 32 kHz (dole)

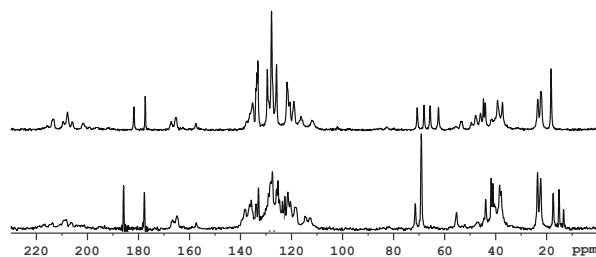
opět neprojeví. Navzdory těmto teoretickým předpokladům se B. Schneider nedal odradit a do roku 1967 zkonstruoval plexisklovou kyvetu, do které byly vyfrézovány lopatky. Jeho zařízení umožňovalo dosahovat frekvencí rotace 5 až 10 kHz. Samozřejmě, že bylo sledováno zužování signálů a dnes se ultravysoké rotace vzorku pod magickým úhlem (50–70 kHz) používají pro získání vysoce rozlišených ^1H MAS NMR spekter (obr. 10). Tehdy také B. Schneider vyslovil domněnku, že „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 správně“.

Od roku 1976, kdy byla poprvé uvedena a použita nyní již standardní uhlíková ^{13}C CP/MAS NMR spektrometrie tuhých látek, její význam neustále roste. Zvláště pro charakterizaci látek, jež lze jinými technikami popsat jen velmi obtížně. Především jde o již zmiňované membránové proteiny anebo zcela nerozpustné peptidy a proteiny, které způsobují velice vážná mozková poškození. Tím jsou především β -amyloidová vlákna prionových proteinů způsobující Alzheimerovu nebo Creutzfeldovu-Jakobovu chorobu. Nerozpustné priony jsou vlastně defektní proteiny, které buď pod vlivem genetických dispozic nebo z neznámých důvodů nejprve změni svou vlastní strukturu a konformaci a následně pak sousední proteiny z normální rozpustné formy na nebezpečnou nerozpustnou formu. Najít zákonitosti mezi strukturálními změnami a „infekčním“ chováním prionů je jednou z výzev právě pro moderní NMR spektroskopii tuhého stavu. Faktem také je, že první výsledky na sebe nenechaly dlouho čekat a 9. června 2005 vyšla v prestižním časopise *Nature* (*Nature* 435, 844 (2005).) práce, jež poodhaluje některá tajemství.

13. NMR krystalografie

NMR spektrometrie tuhého stavu však nezkoumá pouze biologické materiály, jak by se mohlo z výše uvedeného zdát. Významným způsobem zasahuje i do průmyslových oblastí, např. do oblastí farmaceutického průmyslu. Zde slouží především pro popis fázového složení polykrystalických aktivních substancí řady léků. To je podstatné nejenom k zajištění všech patentových náležitostí, ale i ke kontrole čistoty produktu.

Historicky to sice je prášková rentgenová difrakce, která stále zaujímá neotřesitelně první pozici při identifikaci různých krystalových forem lékových substancí, ale díky dosažitelnému spektrálnímu rozlišení rozsah využívání NMR tuhé fáze velmi rychle vzrůstá. Aplikovatelnost této metody ve farmaceutickém průmyslu je však podmíněna možností poskytovat požadované informace v relativně krátkém čase a možností analyzovat látky v přirozeném isotopickém zastoupení. Z toho plyne, že základním nositelem strukturálních informací je především chemický posun (obr. 11). To je rozdíl frekvence precesního pohybu zkoumaného atomu v molekule od frekvence standardu. Chemický posun totiž velice citlivě reaguje i na nepatrné změ-



Obr. 11. ^{13}C CP/MAS NMR spektra dvou krystalových forem atorvastatinu

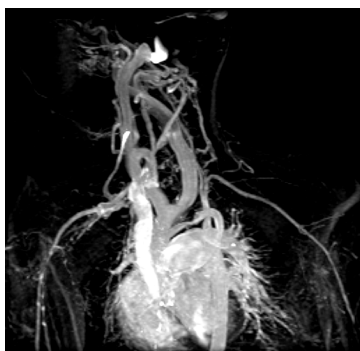
ny v rozložení hustoty elektronů v okolí detegovaných jader. V tom nejjednodušším přiblížení NMR chemický posun slouží k rozlišení a identifikaci jednotlivých polymorfů, solvatomorfů, či hydrátů. Zajímavou možností je také schopnost identifikace nestechiometrických hydrátů a lokalizace molekul vody v krystalových kanálech. V neposlední řadě pak analýza NMR spekter krystalických látek může vést k určení základních parametrů krystalografické jednotky. Tyto informace spolu s pochopením povahy vodíkových vazeb poutající molekuly do třírozměrné struktury a lokalizace odpovídajícího vodíkového atomu umožňují rekonstrukci úplně 3D struktury. Na rozdíl od standardních difrakčních technik totiž dokáže NMR spektrometrie velmi přesně lokalizovat pozici vodíkových atomů s přesností $\pm 2\text{--}5$ pm (1 pikometr = $1 \cdot 10^{-12}$ m).

14. Zobrazování magnetickou rezonancí (MRI)

Ale ponechme NMR krystalografii jejímu osudu. Od farmacie je jen krok k medicíně, kde se nukleární magnetická rezonance stala významnou diagnostickou metodou. Zobrazování magnetickou rezonancí (MRI – Magnetic Resonance Imaging) je založeno na stejných principech jako NMR. Správnější by bylo nazývat tuto diagnostickou metodu jako „zobrazování nukleární magnetickou rezonancí“, ale slovo „nukleární“ budilo v 70. letech minulého století, v dobách studené války, nepříjemné asociace, a proto se jednoduše vypustilo. Přesto již téměř 30 let tato metoda zobrazuje různé části organismu a poskytuje obrázky orgánů s velmi vysokým rozlišením a kontrastem



Obr. 12. MRI - axiální řez hlavy člověka v hloubce 22 cm



Obr. 13. MRI - cévní řečiště hrudníku a krku

(obr. 12). Všichni víme, že se lidský organismus skládá převážně z vody, ale až v roce 1971 si Raymond Damadian (*1936) uvědomil a pak i ukázal, že chování molekul vody ve zdravé a nemocné tkáni může být různé. Rozdíl je především v pohyblivosti molekul vody, která souvisí s teplotou případně obsahem různých solí a iontů, což ovlivňuje relaxační chování protonů vody. První obrázek pořídil v roce 1973 Paul Lauterbur (*1929). V roce 1975 Richard R. Ernst navrhl techniky fázového a frekvenčního kódování a v roce 1977 Peter Mansfield (*1933) vyvinul „echo-planární“ zobrazování (EPI). V té době pořízení jednoho obrázku trvalo několik minut, ale od roku 1986 se potřebný čas snížil na několik sekund. V témže roce byl vyvinut NMR mikroskop, který umožnil dosáhnout mikrometrového rozlišení na vzorcích velkých cca 1 cm. V roce 1987 echo-planární zobrazování umožnilo kontinuální sledování srdeční funkce a ve stejném roce Charles Dumoulin rozvinul angiografii (MRA – Magnetic Resonance Angiography), která dokáže při použití speciálních kontrastních látek na bázi komplexů gadolinia zobrazovat krevní řečiště (obr. 13). V tomto bodě se moderní NMR spektrometrie a tedy i MRI opět setkává s Ústavem makromolekulární chemie AV ČR, kde byl vyvinut speciální



Obr. 14. Celotělový MRI tomograf od firmy FONAR

kontrastní polymerní systém na bázi vodorozpustných komplexů kopolymerů *N*-(2-hydroxypropyl)methakrylamidu s gadoliniem. Dlouhodobá stabilita, biokompatibilita a především vysoká relaxivita těchto látek jsou optimální vlastnosti pro získání detailních a ostrých obrázků i velice subtilních struktur a útvarů.

Abychom učinili povinnosti zadost, musíme uvést že v roce 2003 Sir Paul C. Lauterbur z Univerzity v Illinois a Sir Peter Mansfield z Univerzity v Nottinghamu byli společně oceněni Nobelovou cenou v oblasti medicíny za jejich objevy a přínos v oblasti zobrazování magnetickou rezonancí. Otázkou zůstává, proč nebyl spolu s nimi oceněn skutečný objevitel této metody a autor patentu na NMR tomograf R. Damadian.

MRI je nepochybně mladou a dynamicky rostoucí vědní disciplínou. Například v r. 2003 bylo na světě přibližně 10 000 diagnostických zařízení (obr. 14), které pořídily odhadem 75 milionů obrázků.

15. Funkční MRI

Modifikace, která rozhodně stojí za zmínku, je tzv. funkční MRI (fMRI). Při ní se využívá faktu, že působením kyslíku se protony velice rychle vrací do výchozího magnetického stavu (relaxují), takže lze MRI záznamy snímat v milisekundových intervalech. Jelikož zejména neurony ve zvýšené činnosti spotřebují daleko více kyslíku, je možno řadou rychle za sebou následujících tomografických snímků zobrazit např. šíření nervových vzruchů po nějakém smyslovém nebo i slovním podnětu v různých oblastech lidského mozku. Na tomto principu byla např. sledována funkce mozku během mrkání oka. Ukázalo se, že při každém mrknutí oka, které trvá asi 150 ms, se u člověka deaktivují některé části mozku, především je to zraková kůra, která je obvykle v plné pohotovosti ve chvílích, kdy člověk vnímá objekty okolního světa. Pravděpodobně díky těmto „výpadkům“ si lidé neuvědomují, že mrkají. Je tedy zřejmé, že perspektivy tohoto oboru jsou doslova nedohledné.

16. Závěr

Ačkoli se to nezdá, NMR spektrometrie a techniky s ní související se od roku 1950 úspěšně rozšířily a zasáhly řadu oblastí nejenom vědy, ale také průmyslu a samozřejmě medicíny. Lze tvrdit, že NMR spektrometrie je stále velice rychle se rozvíjející oblast strukturální analýzy a lze předpokládat, že s budoucím 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 zkoumaného systému nám umožní pochopit řadu jevů a díky tomu i vhodně a cíleně připravovat nové materiály, případně lépe řešit a předcházet řadě zdravotních problémů.

J. Brus and J. Kříž (*Institute of Macromolecular Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague*): **Past and Present of NMR Spectrometry: View into the Interior of Molecules and Man**

Starting from the 1950's, NMR spectroscopy, a rapidly developing field of chemical structure analysis, and related techniques significantly affected a broad range of science and industry branches. The dawn of NMR spectroscopy, basic principles and modern applications are introduced and some historic aspects of the most important discoveries and events in the field are discussed.

VÝBĚROVÉ ŘÍZENÍ NA VÝZKUMNÉHO PRACOVNÍKA

IVAX Pharmaceuticals s.r.o. se sídlem v Opavě – Komárově vyhlašuje výběrové řízení na vědecko-výzkumného pracovníka. Náplní práce je řešení výzkumných a vývojových projektů v oblasti aktivních farmaceutických substancí, spolupráce na předávání vývojových projektů do výrobních divizí, vypracovávání expertních zpráv a posudků, spolupráce s marketingem a prodejem při řešení problémů zákazníků a poskytování informačního servisu. Požadujeme VŠ vzdělání – zaměření na organickou chemii, PhD výhodou, dobrá znalost angličtiny podmínkou. Nabízíme zajímavou práci v mezinárodní firmě, možnost dalšího profesního růstu a dobré platové ohodnocení.

Bližší informace: Mgr. Blanka Rinasová, e-mail: blanka.rinasova@ivax-cz.com