

PRINCIPY A APLIKACE VÍCEROZMĚRNÉ NMR SPEKTROSKOPIE TUHÉHO STAVU V PŘÍRODNÍM IZOTOPOVÉM SLOŽENÍ

JIŘÍ BRUS

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

Došlo 15.3.04, přijato 7.7.04.

Klíčová slova: NMR tuhé fáze, vícerozměrné experimentální techniky, korelace, přírodní izotopové složení, struktura, dynamika, mezijaderné vzdálenosti

Obsah

1. Úvod
2. Základní principy a techniky
 - 2.1. Anizotropie jaderných interakcí a vzhled NMR spekter
 - 2.2. Rotace vzorku pod magickým úhlem a techniky rušení spinových interakcí
 - 2.3. Zvýšení citlivosti měření – křížová polarizace (CP)
3. Vícerozměrná NMR
 - 3.1. Heteronukleární experimenty
 - 3.2. Homonukleární experimenty
4. Závěr

1. Úvod

V nedávné době a v současnosti se NMR spektroskopie tuhého stavu stále překotně rozvíjí, a to jak na poli technologickém, tak metodickém. V tomto přehledném článku chci čtenáři přiblížit některé experimentální postupy, které umožňují nové pohledy na uspořádání, strukturu a molekulární dynamiku tuhých systémů. Cílem samozřejmě není obsáhnout celou oblast NMR spektroskopie tuhého stavu, ale přinést základní informace poskytující možnost orientovat se v tomto odvětví strukturní analýzy, přičemž detailnější popis současného stavu poskytuje řada obsáhlých přehledných publikací, např.^{1–3}.

NMR spektroskopie kapalného stavu, jejíž obrovská výhoda vyplývá z její jedinečné selektivity umožňující rozlišit chemicky rozličné strukturní jednotky, se již stala metodou nepostradatelnou pro charakterizaci celé škály sloučenin (organických, organokovových, anorganických, aj.). V tuhém stavu však chybějící izotropní pohyb molekul působí díky řadě anizotropních interakcí dramatické rozšíření signálů a pokles rozlišení⁴. Přestože získané spektrum je téměř nečitelné, není bezobsažné. Anizotropní

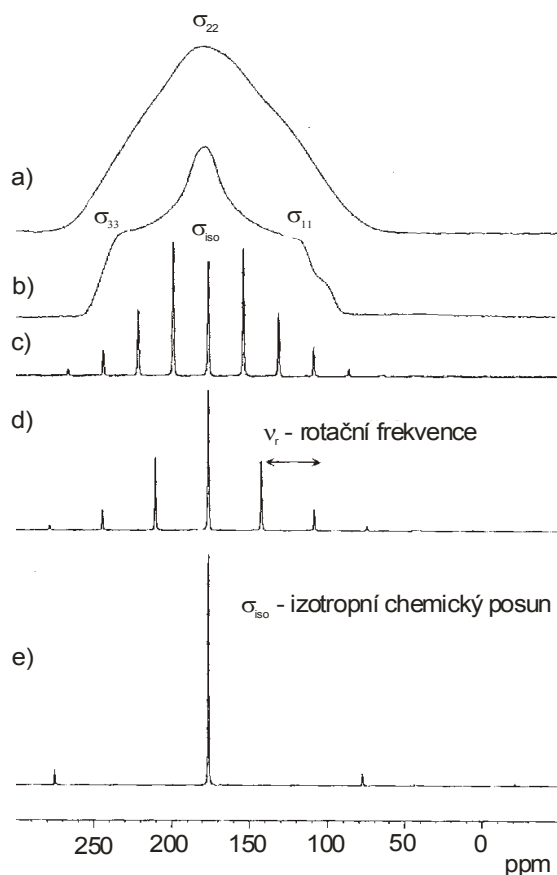
interakce nesou cenné strukturní informace, kterými je však získané spektrum přesyceno. Proto je nutné jejich vliv eliminovat a vhodně separovat. V minulých deseti letech byla vyvinuta řada technik, které v určité fázi NMR experimentu odstraní anizotropní interakce tak, aby je bylo možno vrátit zpět a užít např. k přesnému stanovení mezijaderných vzdáleností, torzních úhlů nebo pro posouzení molekulární dynamiky. Také technické zdokonalení sond umožňujících rotace vzorku pod magickým úhlem (MAS – Magic Angle Spinning) až do frekvencí 25–35 kHz významně usnadnilo získat ¹H NMR spektra s velmi vysokým rozlišením. To v kombinaci s nedávno rozvinutými technikami rušení spinových interakcí umožnilo navrhnout mnoho vícerozměrných korelačních a separačních experimentů⁵. Semikvantitativní a kvantitativní informace o ¹H–¹H vzdálenostech poskytují velmi slibné dvoukvantové experimenty, umožňující rozlišit vodíkové či π – π interakce. Stanovení morfologie a velikosti jednotlivých složek v heterogenních či nanoheterogenních systémech je téměř rutinním postupem. Abych se vyhnul pouze prostému výčtu jednotlivých technik, zaměřím se v tomto textu pouze na postupy, které nevyžadují izotopové obohacení a jen na okraj se zmíním o technikách NMR spektroskopie tuhého stavu určených k detekci kvadrupólových jader (jader se spinem větším než ½), ačkoli i v této oblasti byl učiněn značný pokrok⁶.

2. Základní techniky

Dříve než budou diskutovány jednotlivé experimentální techniky, bude užitečné uvést základní typy jaderných interakcí, které ovlivňují vzhled NMR spekter tuhých látek, tj. anizotropie chemického posunu a dipólní interakce.

2.1. Anizotropie jaderných interakcí a vzhled NMR spekter

¹³C NMR spektrum selektivně značeného glycinu (¹³C=O) poskytuje názorný příklad, na kterém lze demonstrovat vliv anizotropních interakcí (obr. 1a). Je zřejmé, že přímá jednopulsní excitace ¹³C jader vede pouze k detekci širokého a beztvareho signálu, který je důsledkem anizotropie jaderných interakcí (v roztocích je tato anizotropie odstraněna velmi rychlým izotropním Brownovým pohybem molekul). Mezi dominantní patří dipól–dipólové interakce, jejichž podstatou je vzájemné působení jaderných magnetických momentů. Protože každý spin představuje jaderný magnetický moment, který produkuje slabé magnetické pole, budou jaderné spiny pociťovat vliv magnetického pole sousedních jader a tím se bude měnit i jejich rezonanční frekvence. Stupeň tohoto ovlivňování je charakterizovaný velikostí dipólní interakční konstanty D ,



Obr. 1. ^{13}C NMR spektra selektivně značeného glycinu (^{13}CO); (a) – jednopulsní experiment, (b) – jednopulsní experiment s kontinuálním rušením ^1H - ^1H dipolárních interakcí; (c-e) – jednopulsní experiment s kontinuálním rušením ^1H - ^1H dipolárních interakcí a rotací vzorku pod magickým úhlem 2, 3 a 7 kHz

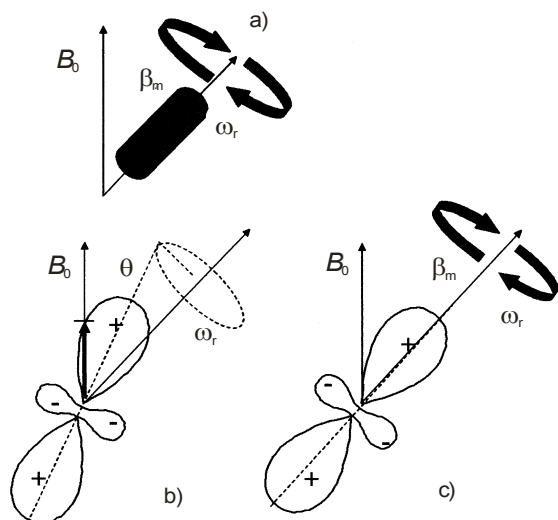
kteřá je přímo úměrná magnetogyrickému poměru γ (proto dominantní roli hrají jádra ^1H s téměř 100% izotopovým zastoupením a největší hodnotou γ), klesá s třetí mocninou mezijaderné vzdálenosti (proto je maximální dosah interakcí 0,5–0,6 nm) a závisí na orientaci mezijaderného vektoru vůči směru vnějšího magnetického pole ($D = 3 \cos^2 \theta - 1$). A právě tato orientační závislost vede k velmi omezenému působení dipolárních interakcí v roztocích. Doba setrvání molekuly v jedné orientaci je příliš krátká na to, aby se dipolární interakce vyvinula, tedy aby se dipól-dipólové působení efektivně projevilo. Avšak v práškovém vzorku tuhé látky, který je tvořen řadou náhodně orientovaných krystalitů, zůstává mezijaderný vektor časově neměnný (invariantní), a tak každý krystalit v závislosti na své orientaci přispívá svou specifickou frekvencí k NMR spektru. Obecně rozlišujeme homonukleární interakce mezi jádry stejného typu, obvykle ^1H - ^1H , a heteronukleární působící mezi různými jádry např. mezi ^1H a ^{13}C popř. ^{15}N , ^{29}Si .

Vedle dipolárních interakcí je tvar spektra také ovlivněn anizotropií chemického posunu. Původ chemického posunu lze najít v elektronovém obalu daného jádra, ve kterém vnější magnetické pole B_0 (magnetické pole supra-vodivého magnetu o indukci 4,7–21,1 T) produkuje cirkulující proudy, jež indukují velmi malá magnetická pole (milionkrát menší než B_0). Ta mění efektivní intenzitu magnetického pole v nejbližším okolí měřeného jádra a tedy i jeho rezonanční frekvenci. Tak lze rozlišit jednotlivé strukturní jednotky (atomy v různých funkčních skupinách či lokálních uskupeních). Anizotropní charakter chemického posunu vyplývá z faktu, že hustota pravděpodobnosti výskytu elektronů kolem jádra není obecně sféricky symetrická. Stupeň, kterým elektronová hustota ovlivní rezonanční frekvenci jádra tak závisí na orientaci elektronového oblaku (tedy i celé molekuly) vůči směru pole B_0 . Anizotropii chemického posunu lze vyjádřit tenzorem druhého řádu, který je v tomto případě reprezentován elipsoidem. V neorientovaných systémech, kde jsou možné všechny orientace, naměříme tzv. práškové spektrum (obr. 1b), které překrývá celý rozsah chemických posunů.

Klíč k odstranění anizotropních interakcí poskytuje NMR spektroskopie roztoků, ve kterých rychlý pohyb molekul způsobí, že i velmi asymetrické rozložení elektronů se jeví v časové škále NMR experimentu jako sféricky symetrické. Díky tomu je měřitelný pouze izotropní chemický posun, zatímco dipolární interakce jsou v roztoku neměřitelné.

2.2. Rotace vzorku pod magickým úhlem a techniky rušení spinových interakcí

Izotropní pohyb molekul v tuhé fázi lze mechanicky dosáhnout jen velmi těžko, a proto je potřeba použít alternativní přístup. Nyní se pokusíme podat ne zcela přesný, ale snad intuitivně pochopitelný výklad techniky vedoucí k odstranění anizotropní složky tenzoru chemického posunu, která je pro jednoduchost vyjádřena sférickou harmonickou oscilací: $P_2(\cos \theta) \approx (3 \cos^2 \theta - 1)$ (obr. 2b). Při obecné orientaci anizotropní složky tenzoru chemického posunu svírá jeho hlavní osa s vektorem vnějšího magnetického pole úhel θ a měřitelná hodnota anizotropní veličiny odpovídá průniku vektoru vnějšího magnetického pole tímto tenzorem (viz zvýrazněná šipka na obr. 2b). Při rotaci vzorku začne i tenzor chemického posunu rotovat kolem rotační osy a pro dostatečně vysokou frekvenci vznikne časově průměrný a axiálně symetrický tenzor druhého řádu, jehož hlavní osa je shodná s osou rotace (obr. 2c). Pokud osa rotace svírá magický úhel $\beta_m = 54,7^\circ$ s vektorem magnetického pole a je-li frekvence rotace dostatečně vysoká, pak je anizotropní část tenzoru chemického posunu neměřitelná. Při nízkých frekvencích rotace se původně široký signál rozpadne na sérii rotačních pásů a centrální signál (obr. 1b–e). Pozice rotačních signálů od centrálního odpovídá násobkům frekvence rotace, zatímco poloha centrálního signálu odpovídá izotropnímu chemickému posunu a je tedy neměnná. Tato, dnes zcela běžně používaná, technika rotace vzorku pod magickým úhlem (magic

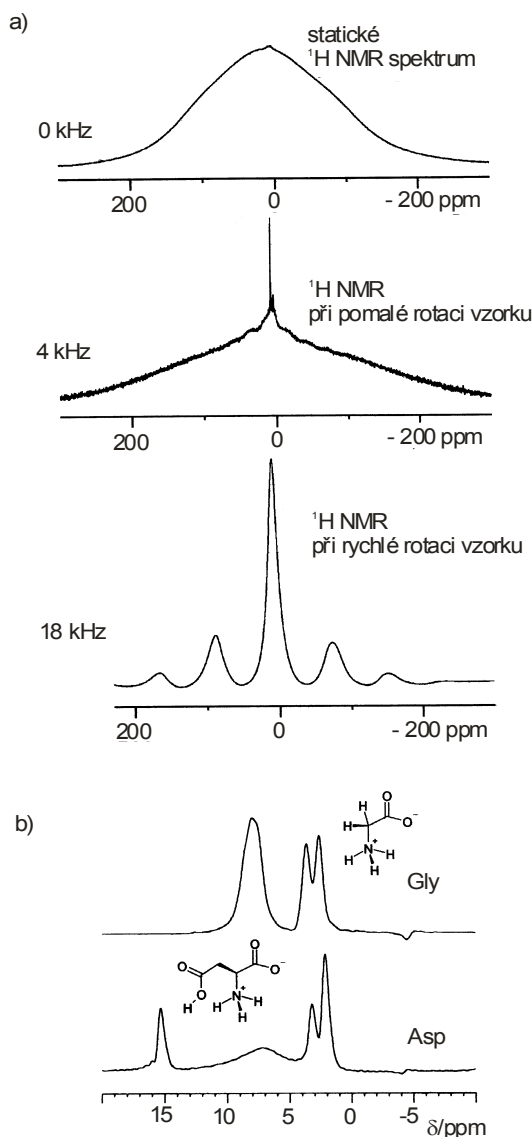


Obr. 2. (a) Schéma orientace rotoru vzhledem k magnetickému poli B_0 . β_m – úhel svírající osa rotace s vektorem intenzity magnetického pole; (b) Obecná orientace anizotropní složky tenzoru chemického posunu; (c) Časově průměrný tenzor anizotropní složky tenzoru chemického posunu při rychlé rotaci

angle spinning – MAS) byla v 60. letech minulého století úspěšně rozvíjena na Ústavu makromolekulární chemie ve skupině dr. Bohdana Schneidera.

Obdobně lze postupovat i při eliminaci dipolárních interakcí, avšak potřebná frekvence rotace vzorku by musela podstatně převýšit velikost těchto interakcí, jejíž typická hodnota (vyjádřená v Hz) je v chemicky vázaném ^1H - ^{13}C páru téměř 30 kHz. To je v současnosti ale také maximálně dosažitelná frekvence rotace vzorku. A tak aby se úplně odstranilo působení ^1H atomů na jádra s nízkým izotopovým zastoupením (např. ^{13}C , ^{15}N), je nutno použít ozařování ^1H spinového systému kontinuálním radiofrekvenčním (rf) polem během detekce signálu. Tato technika rušení dipolárních spinových interakcí (dipolar decoupling – DD) je založena na skutečnosti, že spin vodíku ^1H s paralelní orientací vzhledem k vnějšímu magnetickému poli působí na frekvenci např. ^{13}C jádra zcela opačně než spin s orientací antiparalelní. Aplikace radiofrekvenčního pole způsobí velmi rychlé přeskoky mezi těmito orientacemi, čím se časově průměrná orientace ^1H magnetického momentu blíží nule a tak je vliv dipolárních interakcí odstraněn. Ačkoli je tato technika kontinuálního rušení dipolárních interakcí (continuous wave dipolar decoupling – CW DD) velmi robustní, v poslední době se začíná uplatňovat přístup, zcela běžný v kapalinové NMR spektroskopii. Kontinuální ozařování radiofrekvenčním polem je nahrazeno sérií krátkých fázově posunutých rf pulsů, které obvykle nejsou synchronní s frekvencí rotace⁷, což vede k větší účinnosti rušení dipolárních interakcí zvláště při vysokých rotacích vzorku a v důsledku toho k detekci NMR spekter vysokého rozlišení (obr. 1b–e).

Tento postup ale nelze přímo užít při měření ^1H NMR spekter tuhých látek, která jsou zcela rutinní součástí základní charakterizace struktury řady sloučenin v roztoku. Výjimečné postavení ^1H jader vyplývá z jejich téměř 100% přirozeného izotopového zastoupení a velmi vysokého magnetogyrického poměru $\gamma = 26,8 \text{ rad} \cdot \text{T}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, což je přesně ta kombinace, která měření ^1H NMR spekter v tuhém stavu komplikuje. Prostá rotace vzorku pod magickým úhlem vede jen k omezenému zužování signálů (obr. 3a). Existuje však alternativní přístup, který je podobně jako již uvedený heteronukleární dipolární „dekuplink“ (CW DD) založený na ozařování vzorku radiofrekvenčním polem. Toto pole však nemůže být konti-

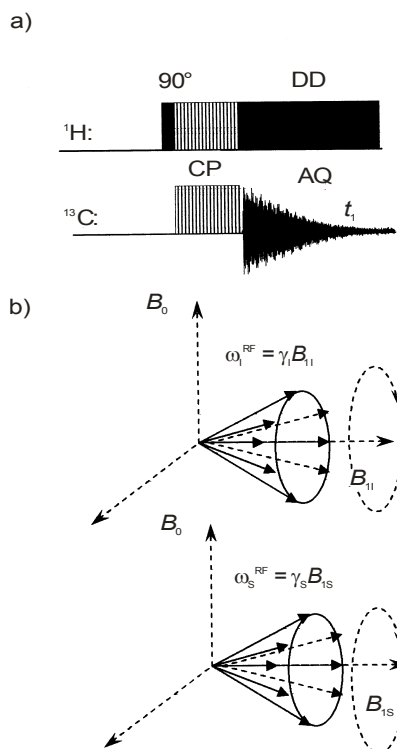


Obr. 3. (a) ^1H MAS NMR spektra glycinu měřená při různých frekvencích rotace; (b) ^1H CRAMPS spektrum glycinu a kyseliny asparťové

nuální, ale musí obsahovat prodlevy, v nichž lze NMR signál detekovat. Podstatou nejjednodušší techniky je multipulsní ozařování vzorku, které je rozděleno do mnoha opakujících se cyklů⁸. Každý cyklus se skládá ze čtyř velmi krátkých 90° pulsů, které jsou fázově posunuty a odděleny velmi krátkými prodlevami („okny“, τ nebo 2τ). Na konci každého tohoto cyklu je zaznamenán jeden bod NMR signálu, protože v tento okamžik se spinový systém vyvíjí pouze podle chemického posunu, zatímco ^1H - ^1H dipolární interakce je potlačena. Toto snímání NMR signálu se musí mnohokrát opakovat (snímá se až několik tisíc bodů), takže výsledkem je tzv. stroboskopická detekce. Působení multipulsní sekvence si lze představit tak, že během ozařování vzorku již neprobíhá precese spinů kolem vektoru vnějšího magnetického pole B_0 (v rovině x - y), ale spiny rotují pod magickým úhlem ve spinovém prostoru. V kombinaci s MAS lze následně získat ^1H NMR spektra s velmi vysokým rozlišením (obr. 3b). Na obdobném principu pracují nedávno rozpracované techniky mimorezonančního ozařování (FSLG – frequency switched *Lee-Goldburg*)⁹, jež v sobě nemají zabudovaná detekční okna, a tak protonová magnetizace musí být detekována nepřímo užitím dvourozměrných (2D) experimentů^{5,10}.

2.3. Křížová polarizace (Cross-Polarization CP)

Přímé (jednopulsní) měření spektrálně vysoce rozlišených NMR spekter jader s nízkým magnetogyrickým poměrem a nízkým izotopovým zastoupením (tzv. řídká jádra, jako jsou např. ^{13}C , ^{15}N , ^{29}Si , ^{119}Sn atd.) je však časově velmi náročné, neboť k dosažení příznivého poměru signál-šum je potřeba provést velký počet akumulací NMR signálu. Rychlost opakování, která je určena rychlostí návratu spinového systému po vybuzení do termodynamické rovnováhy, tedy rychlostí relaxace, je však velmi pomalá. A tak doba mezi jednotlivými excitacemi může být až stovky sekund, v některých případech i desítky minut. Pro překonání těchto obtíží lze však využít spinový systém jader s velkým magnetogyrickým poměrem a vysokým izotopovým zastoupením (tzv. hojná jádra např. ^1H nebo ^{19}F). Jejich vysoká polarizovatelnost podstatně zvyšuje citlivost NMR experimentu, přičemž i rychlost jejich relaxace je mnohem příznivější, obvykle se pohybuje v intervalu 1–10 s. Abychom mohli alespoň částečně využít těchto vlastností, je potřeba nějakým způsobem přenést polarizaci z izotopově hojných jader do spinového systému jader izotopově řídkých, k čemuž slouží technika zvaná křížová polarizace (cross-polarization – CP, cit.¹¹). Pokud jsou oba spinové systémy v tzv. „dipolárním kontaktu“, odtéká magnetizace během křížové polarizace z vysoce polarizovaných jader na jádra s nízkou polarizovatelností, obdobně jako teplo teče z horkého objektu do studeného, jsou-li oba objekty tepelně propojené. Tento přenos magnetizace probíhá při spinové výměně tzv. překlopnými přechody (flip-flop transitions), kdy celková energie systému je konzervována. Tento přechod lze chápat tak, že ve stejný okamžik dojde k současné změně orientace dvou vzájemně dipolárně interagujících spinů: ze stavu $\uparrow\downarrow$ do



Obr. 4. (a) Blokové znázornění CP pulsni sekvence; (b) Schématické znázornění orientace uložení a rotace jaderných spinů I (^1H) a S (^{13}C) během dipolárního kontaktu

stavu $\downarrow\uparrow$. Během tohoto experimentu jsou po počáteční polarizaci ^1H spinů na oba dva spinové systémy (^1H a např. ^{13}C) současně aplikována dvě radiofrekvenční pole. Intenzity obou polí musí být takové, aby rotace obou spinů (např. rychlost sklápění měřitelné magnetizace obou typů jader při pulsu ze směru osy z do roviny x - y) byly shodné

$$\omega_{1\text{H}}^{\text{rf}} = \gamma_{1\text{H}} B_{1\text{H}} = \gamma_{13\text{C}} B_{1\text{C}} = \omega_{13\text{C}}^{\text{rf}}$$

kde B je amplituda (intenzita) použitého radiofrekvenčního pole; obr. 4. Za tohoto stavu je splněna tzv. Hartmannova-Hahnova podmínka, čímž je ustaven dipolární kontakt mezi oběma systémy.

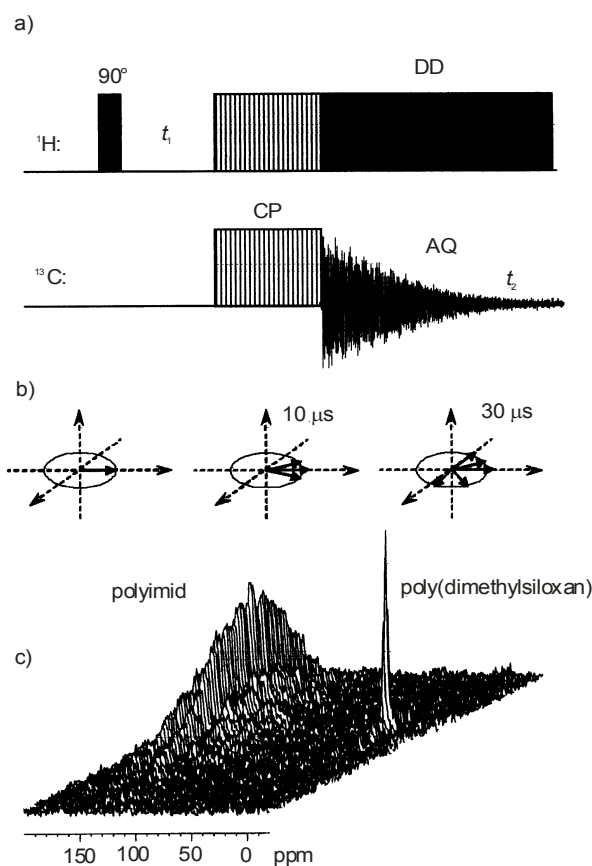
3. Vícerozměrná NMR

V předchozích kapitolách byly uvedeny základní techniky NMR spektroskopie tuhého stavu, které vedou k získání jednorozměrného (1D) NMR spektra, ve kterém převládá informace o izotropním chemickém posunu. Bylo však také řečeno, že odstranění anizotropních interakcí je doprovázeno ztrátou řady strukturních informací. A tak je zřejmé, že navržení experimentálních technik, které umožní separaci nebo korelaci izotropních a anizotropních informací, je velmi cenné. Základem těchto experimentál-

ních postupů je dvourozměrná (2D) NMR spektroskopie, která je nedílnou součástí moderních NMR technik roztoků. Zde se měření dvourozměrných a třírozměrných spekter stalo nezbytnou nutností, která podstatně zvyšuje spektrální rozlišení a přináší řadu nových informací. Stejně důvody platí i pro vícerozměrnou NMR spektroskopii tuhých látek.

3.1. Heteronukleární experimenty a jejich aplikace

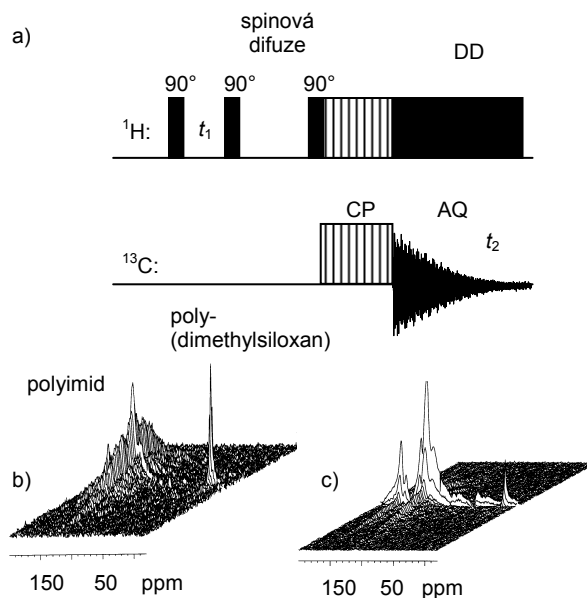
Typickým příkladem heteronukleárního 2D experimentu je technika separace širokých signálů⁴ (obr. 5a), kdy se během první detekční periody t_1 protonová transversální magnetizace vyvíjí pod vlivem dominantních homonukleárních ^1H - ^1H dipolárních interakcí. To vede k rychlému rozfázování precese ^1H spinů (ztrátě fázové koherence, viz obr. 5b), přičemž rychlost rozfázování je přímo úměrná velikosti dipolárních interakcí. V důsledku toho se zmenšuje výsledná složka protonové magnetizace, kterou lze přenést během křížové polarizace do ^{13}C spinového systému. Intenzita signálů v ^{13}C CP/MAS NMR spektru je tak závislá na velikosti ^1H - ^1H dipolárních interakcí.



Obr. 5. (a) 2D ^1H - ^{13}C WISE pulsní sekvence; (b) dipolární rozfázování ^1H magnetizace během periody t_1 ; (c) 2D spektrum blokového kopolymery polyimid-poly(dimethylsiloxan)

S postupně se prodlužující periodou t_1 získáme sérii ^{13}C NMR spekter s klesající intenzitou signálů. Tuto sérii lze považovat za jakýsi interferogram, a tak Fourierovou transformací poklesu intenzity NMR signálů získáme 2D NMR spektrum, kde v jedné dimenzi jsou uhlíkové atomy charakterizované ^{13}C NMR izotropním chemickým posunem a v druhé dimenzi více či méně širokým ^1H NMR signálem (obr. 5c). Protože velikost homonukleárních dipolárních interakcí klesá s rostoucím molekulárním pohybem, šířka ^1H signálů odráží segmentovou dynamiku. Rigidní strukturní jednotky jsou charakterizované širokými ^1H signály, zatímco pohyblivé segmenty se projeví úzkými pásy, jako je tomu v 2D NMR spektru blokové polymerní sítě polyimidu a poly(dimethylsiloxanu). Je zcela jasné patrné, že vysoká pohyblivost poly(dimethylsiloxanových) řetězců neovlivňuje dynamiku druhé složky¹². Tímto způsobem lze snadno posoudit segmentovou dynamiku řady polymerních systémů, především polymerních směsí (např. polykarbonát – poly(ethylenoxid), polystyren – poly(vinylmethakrylát) atp.), nebo u částečně krystalických materiálů (např. polyetylen, poly(ethyleoxid) atp.), kde amorfni (obecně pohyblivá) složka je jasné detekována v podobě úzkého ^1H signálu.

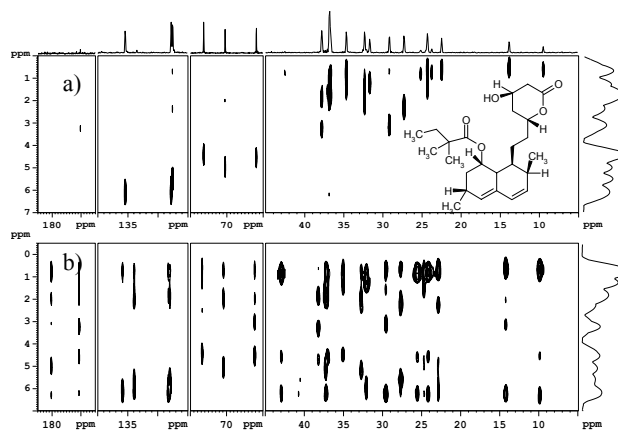
Rozdíly v lokální pohyblivosti rozdílných složek ve studovaném systému lze také využít ke stanovení velikosti domén obou komponent, neboť díky spinové difuzi, která může probíhat během směšovací periody (obr. 6a) se informace o pohybovém zúžení protonového signálu šíří přes prostor do rigidní fáze, a to rychlostí úměrnou $1/r_{ij}^3$. (Spinová difuze je koherentní přenos ^1H magnetizace výše



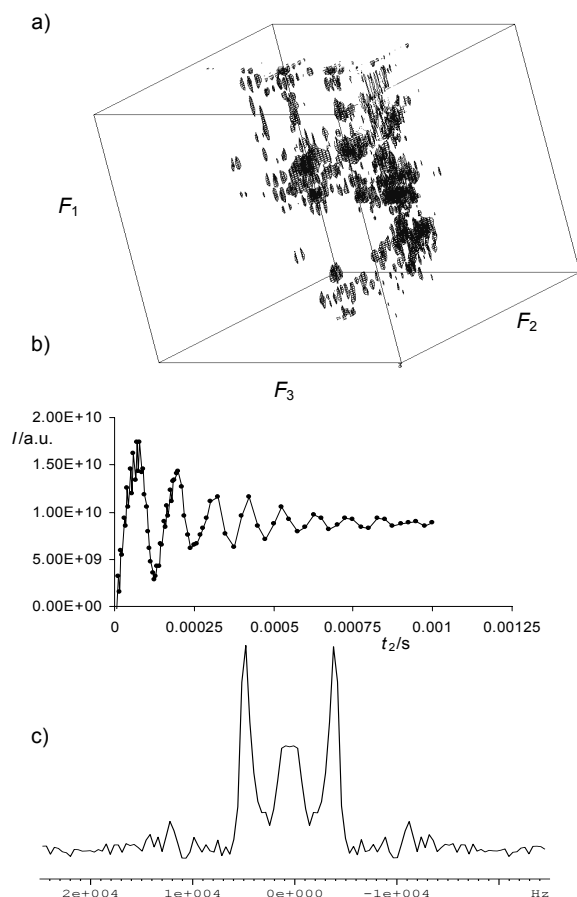
Obr. 6. (a) – Blokové znázornění 2D ^1H - ^{13}C WISE pulsní sekvence se spin-difúzní periodou; (b) – 2D spektrum blokového kopolymery polyimid-poly(dimethylsiloxan) změřené při směšovací periodě $t_m = 0,5$ ms; a (c) – při směšovací periodě $t_m = 10$ ms

zmiňovanými překlopnými přechody.) Při delší směšovací periodě nastane štafetový přenos polarizace do vzdálenějších oblastí a původně široký protonový signál rigidní komponenty bude tvořen superpozicí širokého a úzkého signálu¹² (obr. 6b a c). Postupný nárůst intenzity úzké složky pak obsahuje požadované informace o velikosti domén a morfologii systému, které lze získat analýzou této závislosti. Tato technika je zvláště výhodná pro určení velikosti domén v heterogenních systémech, kde velikost dispergovaných složek je v intervalu 1–20 nm. Nejčastěji je tato technika použita pro posouzení mísitelnosti polymerních směsí, kdy rychlý přenos magnetizace naznačuje velmi intimní molekulární promísení, zatímco pomalý proces odráží přítomnost rozměrných heterogenit. Detailní simulace procesu spinové difuze také umožní posoudit morfologii studovaného systému a rozlišit lamelární, cylindrické, sférické nebo i bikontinuální uspořádání, přičemž jemné odchylky od teoretického modelu mohou naznačit vznik komplikovaných útvarů na fázovém rozhraní^{3,12,15}. Procesu spinové difuze se také mohou účastnit vnější ^1H spiny, které nejsou přímo chemicky vázané ke studované látce např. molekuly vody¹³. A tak sledování propagace úzké složky signálu v 2D spektru slouží k získání informace o relativní poloze interagující vody a velikosti případných klastrů molekul H_2O . Tento přístup byl použit pro posouzení distribuce vody v silikagelech, popis velikosti jejich rezervoárů v novém i historickém papíru, či k určení její pozice v buněčné stěně.

Pro výše uvedené techniky bylo typické, že nositelem jedinečných informací o struktuře a dynamice tuhých látek je ^1H - ^1H dipolární interakce. Ačkoli byly použity 2D experimenty, spektrální rozlišení se podstatně nezvýšilo. K tomu a pro získání informace o ^1H chemickém posunu musí být ^1H - ^1H dipolární interakce aktivně rušeny během první detekční periody t_1 použitím některé z technik zmíněných v kapitole 2.2. Díky tomu se ^1H spinový systém začne vyvíjet pouze pod vlivem ^1H chemického posunu a výsledkem je standardní heteronukleární korelační spektrum⁵. Na rozdíl od analogických experimentů provedených v roztoku, které korelují jádra poutaná jednou nebo několika kovalentními vazbami, většina korelačních experimentů v tuhé fázi umožňuje korelaci všech prostorově blízkých jader, tedy i chemicky nevázaných. Signály v 2D spektru indikují všechny prostorově blízké spinové páry např. ^1H - ^{13}C , přičemž vzdálenost, odkud je ^1H polarizace přenesena, je řízena délkou křížové polarizace. Pro krátké trvání křížové polarizace dojde k přenosu jen z nejbližšího okolí a korelovat lze především přímo vázané ^1H - ^{13}C páry (obr. 7a), zatímco pro delší dobu křížové polarizace je sledován vznik dalších korelačních signálů, které odrážejí přenos magnetizace na mnohem delší vzdálenosti, až 4,8–5,0 Å (obr. 7b). Tím je možno nahlédnout do lokální struktury, konformace a rozložení atomů v molekule, přičemž nedávno byl tímto způsobem vypracován model uspořádání molekul v systému chlorofyl A/ H_2O . Pro získání exaktních informací však musíme 2D experiment rozšířit na trojrozměrný, a to diskretním prodlužováním doby přenosu polarizace (obr. 8a). Výsledek tohoto experimentu po dvou

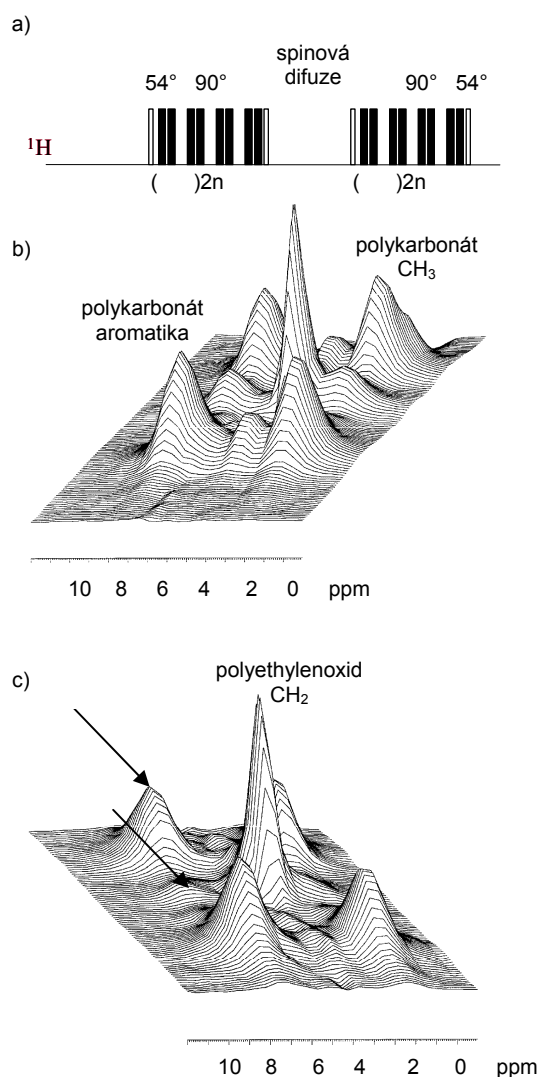


Obr. 7. Struktura látky a odpovídající 2D HETCOR spektra měřená (a) při CP = 100ms a (b) 2 ms



Obr. 8. (a) 3D ^1H - ^{13}C HETCOR spektrum; (b) závislost intenzity signálů 2D spektra na délce CP periody; (c) odpovídající dipolární spektrum

Fourierových transformací (v t_1 a t_3) je série 2D heteronukleárně korelačních spekter, přičemž intenzita signálů během periody t_2 osciluje pod vlivem ^1H - ^{13}C dipolární interakce (obr. 8b). Fourierovou transformací této oscilace získáme ^1H - ^{13}C dipolární spektrum (obr. 8c), ve kterém velikost štěpení odpovídá velikosti dipolární interakční konstanty, a tím i mezijaderné vzdálenosti $D \approx 1/r^3$. A zde je již naznačen obrovský potenciál NMR spektroskopie tuhého stavu, jež v blízké budoucnosti zřejmě umožní popsání úplné struktury mikrokrytalických a dobře uspořádaných systémů bez nutnosti izotopového obohacení.



Obr. 9. (a) Blokové schéma 2D ^1H - ^1H CRAMPS NMR pulsní sekvence; (b) odpovídající 2D NMR spektra změřená pro směs polykarbonát a poly(ethylenoxid) při délce směřovací periody $t_m = 10$ ms; a (c) $t_m = 0,25$ ms

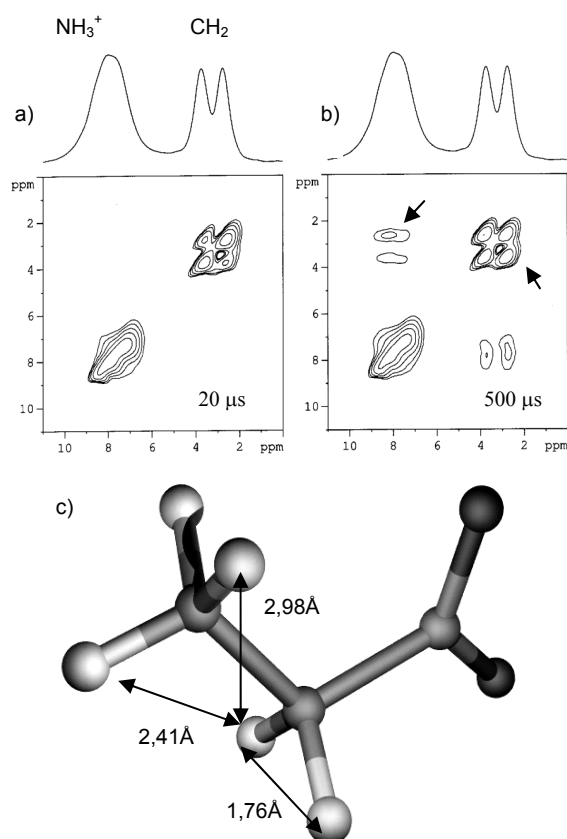
3.2. Homonukleární experimenty a jejich aplikace

Experimenty zmiňované v předchozí kapitole je tedy možno provádět u vzorků s přirozeným izotopovým zastoupením, přičemž s jádry ^1H lze korelovat nejenom ^{13}C , ale i ^{15}N , ^{29}Si , ^{31}P , ^{119}Sn atp. Ovšem bez nutného obohacení vzorku lze provádět homonukleární korelační experimenty pouze s několika málo izotopy, které mají dostatečně vysoké přirozené zastoupení (^1H , ^{19}F , ^{31}P). První homonukleární ^1H - ^1H korelační a vůbec 2D experiment v kapalně fázi byl navržen již v roce 1971 a od té doby se tento typ experimentů stal rutinní součástí strukturní analýzy. Ekvivalentní technika pro tuhou fázi byla poprvé uvedena v roce 1985 a původně byla díky relativně malému spektrálnímu rozlišení navržena pouze pro posouzení stupně mísitelnosti polymerních směsí¹⁴, protože jejich ^1H NMR spektrum je relativně jednoduché. Avšak vysoké nároky na stabilitu spektrometru neumožnily široké využití této techniky. Při tomto experimentu se NMR signál snímá během dvou detekčních period t_2 a t_1 , které odpovídají homonukleární pulsní sekvenci, která zároveň ruší silné ^1H - ^1H dipolární interakce (obr. 9). Během směšovací periody dochází ke spinové difuzi, kdy se magnetizace postupně šíří přes prostor a vyměňuje se mezi jednotlivými složkami systému. Tato výměna je indikována mimodiagonálními signály, přičemž jejich intenzita odráží rychlost spinové difuze.

Intenzita mimodiagonálních signálů nejprve vzrůstá s prodlužující se dobou směšovací periody a po určité době je dosaženo rovnováhy a intenzita signálů je dále konstantní. Z této rychlosti lze pak stanovit velikost domén jednotlivých složek v heterogenním systému obdobným způsobem, jak bylo uvedeno v předchozí kapitole. Výhodou tohoto typu experimentu je, že můžeme posoudit velikost domén všech složek v systému, které lze spektrálně rozlišit, přičemž rozdílná pohyblivost již není podmínkou. Typickým příkladem je směs polykarbonátu a poly(ethylenoxidu) (PC-PEO, obr. 9, cit.¹⁵). Rychlé dosažení rovnovážné intenzity signálu (po 250 μs), který koreluje aromatické a methylové protony v molekule polykarbonátu, odpovídá jejich vzájemné prostorové blízkosti a poskytuje vnitřní kalibrační standard. Rovnovážné intenzity signálů korelujících poly(ethylenoxid) a polykarbonát je však dosaženo mnohem později (desítky milisekund), což svědčí o přítomnosti útvarů o velikosti několika desítek nm.

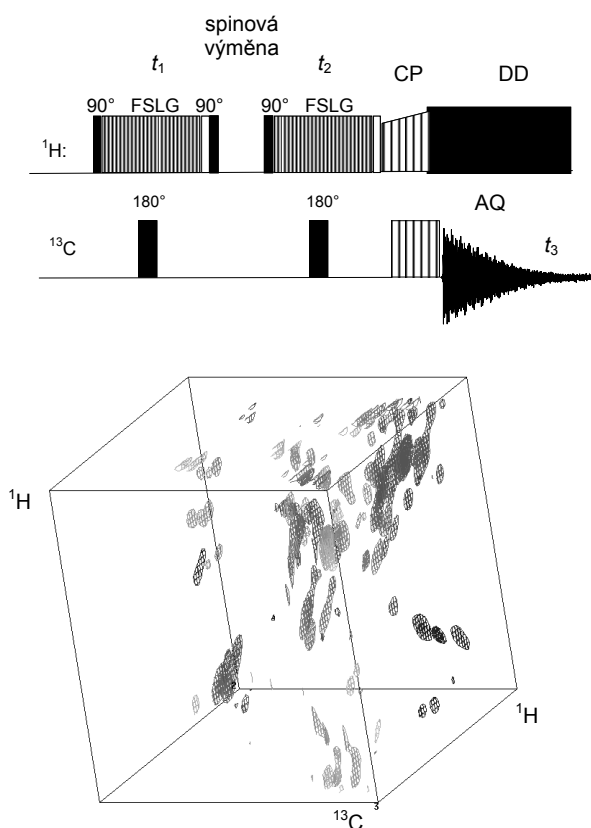
Touto technikou byla studována řada polymerních systémů, různých polymerních i nepolymerních komplexů, formování hydroxylových klastrů v siloxanových sítích¹⁶ a v neposlední řadě se ukázalo, že při dostatečném spektrálním rozlišení lze přesně měřit i ^1H - ^1H mezijadernou vzdálenost¹⁷. Na obr. 10 jsou jasně patrné rozdíly v intenzitách mimodiagonálních signálů, které reflektují vzdálenost mezi neekvivalentními atomy ^1H ve skupině CH_2 a vzdálenost mezi CH_2 a NH_3^+ protony v molekule glycinu¹⁷.

Přesto však nedostatečné spektrální rozlišení v ^1H dimenzi významně omezuje možnost využití těchto ^1H - ^1H



Obr. 10. (a) 2D ^1H - ^1H NMR spektra glycinu při délce směřovací periody $t_m = 20$ ms; (b) a $t_m = 50$ ms; (c) naznačené mezijaderné vzdálenosti

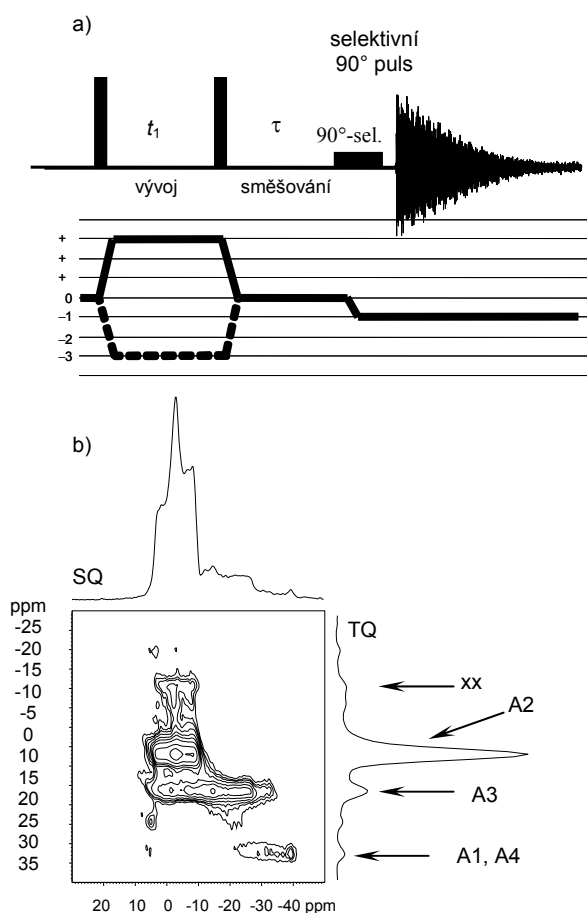
korelačních experimentů pro popis struktury složitých molekul a makromolekul. Proto je otázka zvýšení spektrálního rozlišení velmi aktuální, zvláště pokud chceme získat detailní a přesné informace o proton-protonových vzdálenostech ve složitějších systémech. Nabízí se však poměrně elegantní modifikace výše uvedeného 2D ^1H - ^1H korelačního experimentu, kdy za druhou detekční periodu umístíme křížovou polarizaci, kterou se přenesou magnetizace do uhlíkového spinového systému¹⁸. V tomto případě se ^1H signál snímá v obou vývojových periodách nepřímou, a tak lze s výhodou užít kontinuální techniky rušení ^1H - ^1H dipolárních interakcí např. FSLG (Frequency-switched Lee-Goldburg) sekvencí (viz. obr. 11). Výsledkem je pak 3D spektrum, které lze chápat jako sérii 2D ^1H - ^1H korelačních spekter, získaných selektivně pro každou ^{13}C strukturní jednotku, kterou lze rozlišit v ^{13}C NMR spektru. V principu tak můžeme získat informace o prostorovém rozložení atomů vodíku v okolí každého rozlišeného a definovaného atomu ^{13}C . Ovšem zvýšení selektivity experimentu a lepší rozlišení je zapláceno extrémním prodloužením celkové doby měření. Jedno 2D ^1H - ^1H korelační spektrum lze získat ve velmi dobré kvalitě během několika málo hodin (do 2 h). Získání 3D spektra v obdobné



Obr. 11. Blokové schéma 3D ^1H - ^1H - ^{13}C NMR pulsní sekvence a typické 3D spektrum

kvalitě však trvá více než 48 hodin, protože pro získání informací o mezijaderné vzdálenosti je potřeba měřit sérii alespoň deseti spekter při různé době spinové difuze. To znamená, že jednodenní experimentování se protáhne na téměř jeden měsíc. Využití tohoto typu experimentu pro látky s přírodním izotopovým zastoupením je tedy omezeno na poměrně malé molekuly (oligopeptidy)¹⁸ nebo vysoce uspořádané krystalické systémy. Nicméně pro látky, jež obtížně poskytují krystaly vhodné k RTG difrakci, je to jedna z mála možností, jak alespoň částečně popsat jejich strukturu.

Avšak nejenom jádra se spinem $\frac{1}{2}$ lze využít pro získání cenných strukturních informací. Je třeba si uvědomit, že kvadrupólových jader s větším spinem (^6Li , ^{18}O , ^{23}Na , ^{27}Al , ^{87}Rb atd.) lze v přírodě nalézt mnohem více, přičemž jejich význam je značný především pro strukturní studie anorganických materiálů – minerálů, zeolitů, skel atp. Na rozdíl od předchozích případů vzájemné působení jaderného spinu a gradientu elektrického pole, tzv. kvadrupolová interakce, vede k zneprůhlednění spekter. Existuje však jednoduchá 2D technika, která umožňuje částečně separovat kvadrupólovou interakci do jednoho rozměru, zatímco ve druhém převládá izotropní chemický posun.



Obr. 12. (a) Blokové schéma tříkvantového 2D experimentu; (b) výsledné 2D TQ/SQ ^{27}Al MAS NMR spektrum kyanitu měřeného při 13 kHz

Podstatou tohoto experimentu (obr. 12a) je excitace a nepřímá detekce tříkvantové koherence (TQ), která se následně převede na přímo sledovatelnou jednovantovou koherenci (SQ). To umožní separovat kvadrupólovou interakci od chemického posunu, neboť obě tyto jaderné interakce se při jednovantových a vícekvantových přechodech vyvíjejí rozdílnou rychlostí (obecně je velikost kvadrupólové interakce vzhledem k chemickému posunu relativně jiná při vícekvantových přechodech než při přechodech jednovantových). Výsledkem je 2D spektrum, ve kterém se koreluje tříkvantové a jednovantové signály. V případě minerálu kyanitu Al_2SiO_5 (obr. 12b) lze rozlišit 4 základní, krystalograficky různé, strukturní jednotky AlO_6 . Analýza 1D ^{27}Al MAS NMR spektra, kterému odpovídá jednovantová projekce (SQ, obr. 12b) je prakticky nemožná. Ovšem tříkvantová (TQ) projekce poskytuje podstatně lepší spektrální rozlišení a umožňuje detekci základních strukturních jednotek A1 a A4 – 34 ppm, A3 – 17 ppm a A2 – 8 ppm a také přítomnost dalších minerálů

v dané hornině (signál s chemickým posunem – 10 ppm). Tato technika se dnes stala téměř nepostradatelnou při popisu struktury aktivních center zeolitů nebo uspořádání hlinitokřemičitanových polymerů.

4. Závěr

V tomto článku jsem se pokusil uvést některé současné trendy NMR spektroskopie tuhého stavu, které poskytují odpovědi na otázky týkající se struktury a dynamiky molekul a makromolekul, jež jsou podstatné pro moderní chemii. Zvláště rozvoj ^1H MAS NMR technik vysokého rozlišení umožnil přímé studium vodíkových vazeb, π - π interakcí nebo stanovení ^1H - ^{13}C mezijaderné vzdálenosti, aniž potřebně množství studované látky převyšuje 25–30 mg, či vyžaduje selektivní izotopové značení nebo úplné obohacení. Navíc se aplikace neomezuji jen na uvedené příklady, ale mají obecné využití. Je však nutné zmínit, že obohacení látky daným izotopem nebo izotopy otevírá další možnosti strukturního studia. Existuje celá řada experimentálních postupů (REDOR, dvojité CP atd.) umožňujících korelační experimenty mezi různými typy jader (např. ^{13}C a ^{15}N , cit. ¹⁹), které však kvůli neúměrnému prodloužení tohoto příspěvku nemohly být uvedeny. Navíc jsem se jen okrajově dotkl technik, které se věnují jádrům se spinem větším než $1/2$, tedy kvadrupólovým jádrům jako jsou např. ^{27}Al , ^{23}Na nebo ^{43}Mn . 2D multikvantové (MQMAS) experimenty²⁰ umožňují separovat izotropní chemický posun a kvadrupólové štěpení druhého řádu a tak tedy zjistit velikost a asymetrii gradientu elektrického pole v okolí každé rozlišené pozice, což je významná strukturní informace pro řadu minerálů, katalyzátorů na bázi zeolitů nebo anorganických skel.

Moderní NMR spektroskopie tuhého stavu by však neměla být považována za metodu nahrazující RTG difrakční analýzu. Spíše jde o komplementární metody, které se vhodně doplňují především tam, kde je obtížné získat monokrystal, kde relevantní informaci poskytují pouze ^1H jádra nebo kde významnou roli hraje segmentová dynamika. V těchto případech je výhodné kombinovat i další metody jako je např. DSC (diferenční skanovací kalorimetrie) poskytující informace o teplotách případných fázových přechodů²¹. Znalost tepelné stability vzorku je velmi žádoucí, neboť při vysokých rotacích se vzorek významně zahřívá. Moderní NMR spektroskopie tuhého stavu však nevyužívá jen velmi pokročilých experimentálních postupů, ale její potenciál je také v kombinaci s teoretickým přístupem. Současné *ab initio* výpočty chemických posunů jsou již dostatečně přesné, aby poskytovaly přesné strukturní informace²². Dnes jsme svědky překotného technologického a metodického rozvoje NMR tuhého stavu. Každým dnem se objevují nové experimentální postupy vedoucí k přesnějším strukturním informacím a lze tedy předpokládat, že v budoucnosti bude tato technika schopna podávat obdobné informace o 3D struktuře jako NMR roztoků, což již bylo nedávno demon-

strováno na příkladu SH_3 domény α -spektrinu²³.

Tato práce vznikla za vydatné podpory Grantové agentury Akademie věd České republiky (číslo grantového projektu B4050203).

LITERATURA

1. Brown S. P., Spiess H. W.: *Chem. Rev.* **101**, 4125 (2001).
2. Laws D. D., Bitter H. M. L., Jerschow A.: *Angew. Chem. Int. Ed.* **41**, 3096 (2002).
3. Brus J., Petříčková H., Dybal J.: *Monatsh. Chem.* **133**, 1587 (2002).
4. Schmidt-Rohr K., Spiess H. W.: *Multidimensional Solid-State NMR and Polymers*, Academic Press 1994.
5. van Rossum B. J., Foerster H., De Groot H. J. M.: *J. Magn. Reson.* **124**, 516 (1997).
6. Frydman L., Harwood J. S.: *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 5367 (1995).
7. Ernst M.: *J. Magn. Reson.* **162**, 1 (2003).
8. Waugh J. S., Huber L. M., Haeberlen U.: *Phys. Rev. Lett.* **20**, 453 (1968).
9. Bielecki A., Kolbert A. C., Levitt M. H.: *Chem. Phys. Lett.* **155**, 341 (1989).
10. Lesage A., Duma L., Sakellariou D., Emsley L.: *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 5747 (2001).
11. Pines A., Gibby M. G., Waugh J. S.: *J. Chem. Phys.* **59**, 569 (1973).
12. Brus J., Dybal J., Sysel P., Hobzová R.: *Macromolecules* **35**, 1253 (2002).
13. Brus J.: *J. Sol-Gel Sci. Technol.* **25**, 17 (2002).
14. Caravatti P., Neuenschwander P., Ernst R. R.: *Macromolecules* **18**, 119 (1985).
15. Brus J., Dybal J., Schmidt P., Kratochvíl J., Baldrian J.: *Macromolecules* **33**, 6448 (2000).
16. Brus J., Dybal J.: *Macromolecules* **35**, 10038 (2002).
17. Brus J., Petříčková H., Dybal J.: *Solid State NMR* **23**, 183 (2003).
18. Sakellariou D., Lesage A., Emsley L.: *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 5604 (2001).
19. Gullion T., Schaefer J.: *J. Magn. Reson.* **81**, 196 (1989).
20. Medek A., Harwood J. S., Frydman L.: *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 12779 (1995).
21. Brown S. P., Schnell I., Brand J., Mullen K., Spiess H. W.: *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2**, 1735 (2000).
22. Heller J., Laws D. D., Tomaselli M., King D. S., Wemmer D. E., Pines A., Havlin R. H., Oldfield E.: *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 7827 (1997).
23. Castellani F., van Rossum B. J., Diehl A., Schubert M., Rehbein K., Oschkinat H.: *Nature* **420**, 98 (2002).

J. Brus (*Institute of Macromolecular Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague*): **Principles and Applications of Multidimensional NMR Spectroscopy of Solid State of Natural Isotope Abundance**

The review is devoted to current trends in modern solid-state NMR spectroscopy, which provide detailed information about structure and segmental dynamics of various systems of natural isotope abundance. Basic experimental techniques involving magic angle spinning (MAS) and several heteronuclear and homonuclear decoupling sequences leading to suppression of chemical shift anisotropy and dipolar interactions are briefly introduced. Recent results concerning the application of 2D heteronuclear and homonuclear correlation experiments to investigation of synthetic materials (predominantly polymers) are described. The abilities of two-dimensional ^1H - ^1H spin-exchange and ^1H - ^{13}C heteronuclear correlation techniques to characterize structure of organic solids and morphology of polymer blends as well as their limitations resulting from segmental mobility and undesired coherence transfer are discussed. Possibilities to precisely measure interatomic distances and determine domain sizes in heterogeneous systems are discussed. Although most of the presented techniques were originally designed for nuclei with spin $\frac{1}{2}$, application of two-dimensional single-quantum/double-quantum correlation experiment (^{27}Al SQ/DQ MAS NMR) to increase spectral resolution of NMR spectra of quadrupolar nuclei is introduced.

VŠCHT Praha vlastní novou telefonní ústřednu, její provoz je

220 44

Čtyřmístná čísla vnitřních linek zůstávají beze změny.