

# Posloucháme rozhlasové vysílání atomových jader

„Vědci zjistili, že...“ Nějak podobně začíná značná část zpráv o pokrocích ve výzkumu. Jen výjimečně se dozvíme také něco o použitých metodách. Jako by nebyly důležité. Jedna z klíčových metod studia struktury látek na atomární úrovni je nukleární magnetická rezonance (NMR). Využívá chování atomových jader s nenulovým spinem ve vnějším magnetickém poli po excitaci radiofrekvenčním vlněním. Jejím rozvoji a aplikacím se věnuje Jiří Brus z Ústavu makromolekulární chemie AV ČR.

text **ONDŘEJ VRTIŠKA**

**Když se magnetická rezonance zaváděla do medicíny, lékaři se zbavili adjektiva „nukleární“, aby se pacienti nebáli, že je strčí do reaktoru. Setkáváte se při hovorech s laiky s podobným nepochopením? —** Dokonce si myslím, že se „nukleární hrozby“ nezbařili až lékaři, ale že ta technologie přišla do medicíny rovnou bez onoho problematického slova. Bylo to v době studené války a dalo se čekat, že by cokoli nukleárního pacienti děsilo. I my se setkáváme s dojmem, že tedy pracujeme s radioaktivitou. A zkušenost lidí s MRI v nemocnicích nám pomáhá tuto mylnou představu vyvracet.

**Říkáte laikům, že jste něco jako nemocnice bez pacientů? Že vyšetřujete vzorky materiálů? —** Tak nějak. Zkoušel jsem to podobně vysvětlit své babičce. Když jde s bolavým kolenem na magnetickou rezonanci do nemocnice, lékaři získají obrázek, na němž vidí, jak jsou v kolenu uspořádány

jednotlivé tkáně. My podobně zobrazujeme strukturu molekul. Je to jako v nemocnici, ale v menším měřítku. Do magnetického pole přístroje nedáváme pacienty, ale malé krystalky, pilulky léků... Radiofrekvenční signál, který zachytíme, překládáme do pozic jednotlivých atomů v molekule a do uspořádání molekul ve vzorku.

**Odhalíte třeba krystalovou strukturu zkoumané látky? —** Ano. A struktura může mít na vlastnosti látky zásadní vliv. Vezměte si dvě modifikace uhlíku – grafit a diamant. Liší se pouze uspořádáním atomů, přesto jsou rozdíly dramatické. Měkká tuha a krásný tvrdý drahokam.

**Grafit od diamantu poznáme na první pohled, na to nepotřebujeme NMR spektroskopii, ale ne vždy je rozdíl tak zjevný. Zmínil jste pilulku léku, to by mohl být dobrý začátek odpovědi na obligátní otázku:**

„**A k čemu je to dobré?**“ — K tomu, abychom zjistili, jak rozložení atomů ovlivňuje fungování léku v těle. Člověk by si mohl myslet, že pokud klinické zkoušky potvrdily, že léčivo funguje, nemá se už co pokazit. Ale i nenápadná změna vnitřní struktury může mít dramatické důsledky. Regulační úřady, které hlídají bezpečnost léčiv, vyžadují, aby léčivo bylo dokonale popsáno ve všech fázích svého životního cyklu od přípravy aktivní substance přes výrobu lékové formy až po distribuci a skladování. Struktura se nesmí měnit. Mnohokrát se už stalo, že došlo k fázovému přechodu a léčivo přestalo účinkovat. Například proto, že jiná krystalová modifikace je nerozpustná. A co se nerozpustí, to neléčí.

**Není toto riziko vyšší i kvůli tomu, že v léku není jen samotná účinná látka? —** Jistě. NMR krystalografie farmaceuticky aktivních materiálů se intenzivně rozvíjí právě proto, že léky obsahují řadu pomocných látek. Například nosiče zajišťující, že se účinná látka dostane do správného místa. Jsou to kompozitní materiály, které je velice obtížné charakterizovat jinými metodami.

**Co když se struktura změní až uvnitř pacientova těla působením specifického prostředí lidského organismu? —** I to studujeme. Nyní jsme například publikovali výsledky spolupráce s brněnskou Veterinární a farmaceutickou univerzitou. Zkoumali jsme přeměny alginátových polymerů ve fyziologickém prostředí. Algináty jsou biopolymery z mořských řas, které se hojně využívají jako nosiče bioaktivních látek nebo v tkáňovém inženýrství pro transplantaci buněk. Zajímalo nás, co se s nimi děje v pacientově těle. Zjistili jsme například, že se v kyselém prostředí žaludku tvoří hydrogely stabilizované vodíkovými vazbami, zatímco v tenkém střevě alginátové částice silně botnají a uvolňují polyvalentní ionty, které se ukládají jako anorganické mikrodomény. Tyto částice pak mohou značně ovlivnit rychlost dalšího uvolňování léčiva.

**Je výzkum týkající se farmaceutických aplikací něčím specifický? —** Už asi dvacet let spolupracujeme s farmaceutickou



Snímek Ústav makromolekulární chemie AV ČR

## Ing. JIŘÍ BRUS, Dr. (\*25. 9. 1970)

Vystudoval Vysokou školu chemicko-technologickou v Praze. Vede oddělení NMR spektroskopie Ústavu makromolekulární chemie AV ČR a společnou Laboratoř NMR spektroskopie pevné fáze Ústavu makromolekulární chemie a Ústavu fyzikální chemie J. Heyrovského AV ČR. Zabývá se vývojem NMR krystalografie.

společností Teva a je to úplně něco jiného než náš ostatní výzkum. Když řešíme nějaký grant, plánujeme si práci na tři roky. Kdežto firma se dnes ozve a zítra chce výsledky. Někdy na to máme týden, ale pokud jde například o něco, na čem stojí výroba, hraje se skutečně o hodiny. To znamená, že musíme pracovat velice rychle a efektivně. Není čas studovat literaturu, musíme to mít v hlavě – jak postupovat, které experimenty použít.

**Chápu to adrenalinové vzrušení, ale není vám na druhou stranu líto, že se problému nemůžete věnovat důkladněji?**

To ano. Kolikrát si říkám, že by se na tom dalo ještě krásně dál bádát. Jít do většího detailu, proniknout k podstatě strukturního problému. Třeba v roce 2014 jsme jeden takový výsledek museli dodat během měsíce. Stihli jsme to, a při tom jsme vyvinuli

a optimalizovali krásnou novou metodu. Strašně rád bych si s tím dál hrál, ale kvůli patentové ochraně to ani po pěti letech ještě nesmíme publikovat. To je zkrátka osud farmaceutického výzkumu.

**Opustíme farmacii. V jakých dalších oblastech se NMR spektroskopie uplatňuje?**

— Možnosti jsou široké. Například v materiálovém výzkumu při studiu nejrůznějších kompozitních materiálů. V poslední době jsou velice atraktivní materiály využitelné ke generování nebo ukládání energie. Vyvíjejí se perovskitové<sup>1</sup> solární články, v nichž dopování materiálu nejrůznějšími ionty ovlivňuje účinnost přeměny solární energie na elektrickou. NMR spektroskopie umožňuje popsat, jak jsou ty ionty rozmístěné a jaké tam probíhají interakce. Podobně důležitý je výzkum materiálů pro Li-ion baterie – studium procesů

probíhajících na rozhraní mezi elektrodou a elektrolytem. A v Ústavu fyzikální chemie J. Heyrovského, s nímž sdílíme laboratoř NMR pevné fáze, se kolegové zabývají strukturou zeolitů, což jsou katalyzátory – látky důležité pro chemický průmysl. Čím účinnější a selektivnější katalyzátor bude, tím bude výroba efektivnější, šetrnější k životnímu prostředí, energeticky méně náročná a levnější. Možnosti NMR spektroskopie jsou velmi široké. Nedávno jsme například spolupracovali na výzkumu olejových maleb. Studovali jsme vrstvičky barev a zjišťovali, k jakým chemickým procesům tam dochází. To bylo nesmírně zajímavé.

**K analýze obrazů máte vzhledem ke své osobní historii blízko, že? —** Přesně tak. Na VŠCHT jsem vystudoval technologii konzervování a restaurování památek.

**Jak jste se od památek dostal k NMR? —** Tehdy jsme se zabývali atraktivními projekty, bavilo mne nahlížet na památky z pohledu chemika a zároveň chodit na přednášky z architektury nebo z dějin umění. Věnovali jsme se například restaurování gotických maleb, deskám mistra Theodorika, které dnes visí v kapli svatého Kříže na Karlštejně. Časem jsem se dostal spíše ke konzervování a restaurování kamene, na to se používají nejrůznější siloxanové polymery a oligomery. Zjistit, co se s tím materiálem děje uvnitř kamene, umí právě NMR spektroskopie. Takže jako doktorand jsem se už věnoval výzkumu struktury siloxanových materiálů pomocí NMR spektroskopie pevného stavu.

**Restaurování vám nechybí? —** Nechybí, přestože je to krásná práce. Ale byli jsme pod značným tlakem tradičních restaurátorů a konzervátorů, bylo obtížné prosazovat nové technologie. A v tom tradičním pojetí byla z mého pohledu kreativita velice omezená.

**Kde je prostor pro kreativitu v NMR spektroskopii? Nestačí vložit vzorek do přístroje, zmáčknout tlačítko a přečíst si výsledek? —**

Dnes už existuje více než dva tisíce experimentů, říkáme jim pulsní sekvence, které lze ke zkoumání materiálů NMR spektroskopii použít. Máme tedy obrovské možnosti, z nichž si musíme vybrat nejvhodnější postup. Ně které experimenty jsou robustní, jednoduché, snadno interpretovatelné. Jsou to pro nás experimenty první volby. Když dostaneme vzorek, který máme charakterizovat, podíváme se nejprve na rozložení uhlíkových atomů, protože ty představují skelet organických molekul. Ale když pak jdeme do detailů, začíná se to komplikovat. Zajímá nás například, jak spolu jednotlivé molekuly interagují. V této fázi se uplatní naše dlouhodobé zkušenosti. Zpravidla je třeba volit nějaký kompromisní postup, protože některé experimenty jsou

<sup>1</sup> Se strukturou odvozenou od perovskitu (CaTiO<sub>3</sub>, oxid titaničito-vápenatý).

citlivé, ale trvají dlouho, jiné poskytnou méně přesné výsledky, zato rychle. Z desítek možných postupů volíme ten, který se v daném případě nejlépe hodí.

**Převládající izotop uhlíku  $^{12}\text{C}$  je pro NMR kvůli nulovému spinu neviditelný. Potřebujete  $^{13}\text{C}$ , ten ale přirozeně tvoří jen asi 1 % všech atomů uhlíku. Stačí vám to, nebo potřebujete obohacené vzorky?** — Ve většině případů si s tím musíme vystačit, i když se to projevuje na citlivosti měření. Práce s obohacenými vzorky je výsada biologů, kteří si mohou vypěstovat biologické materiály na substrátech bohatých na  $^{13}\text{C}$ . Bylo by fantastické, kdybychom měli třeba poloviční zastoupení tohoto izotopu, spoustu experimentů by nám to usnadnilo. Ale na druhou stranu je nám vzácný výskyt i k něčemu dobrý. Pokud například zjistíme, že dva  $^{13}\text{C}$  uhlíky spolu sousedí, je to pro nás zajímavá informace o charakteru zkoumaného systému.

**Po uhlíku sledujete jádra dalších atomů – vodíku, dusíku... Jak si ale z jednotlivých měření složíte představu o struktuře molekul a o jejich interakcích?** — Z těchto prvních jednodimenzionálních experimentů získáme základní informace. Pokud si vzorek představíme jako panelák, zjistíme takto, v kterých bytech bydlí ženy, v kterých muži, děti. V dalším kroku provedeme korelační experimenty. Dáváme do korelace vodíky s uhlíky, vodíky s dusíky, vodíky mezi sebou... Tím získáme jednotlivá propojení a vyvstane před námi tvar molekul. Podržíme-li se panelákové metafory, dozvíme se, který muž bydlí s kterou ženou a které děti k nim patří. Zjistíme také, jaké jsou mezi jednotlivými rodinami vztahy – jak jsou od sebe daleko, zda se přátelí... Takže děláme dvou- a vícedimenzionální experimenty, abychom ten „panelák“ co nejlépe popsali.

**Jak si představit výstup z dvoudimenzionálního experimentu? Jako krajinu nebo plastickou mapu?** — Přesně tak. Na jedné ose máme informaci třeba o rádiových frekvencích uhlíku, na druhé vodíku. A signál vystupuje a sestupuje, takže vznikají vrstevnice. Vrcholy ukazují blízkost uhlíku s vodíkem a lze z toho rekonstruovat obraz molekuly. U trojdimenzionálního experimentu už je to krychle, ale standardně se dnes měří čtyřdimenzionálně i pětidimenzionálně. Tam už fantazie přestává fungovat. Spektra se vykreslují v podobě série řezů tím vícerozměrným prostorem.

**Lze vůbec jednoznačně poznat, co ten který signál znamená? Není v nich příliš velký zmatek?** — K tomu právě slouží korelační vícedimenzionální experimenty, nebo experimenty různě filtrované. Každý atom

o sobě vysílá všechny informace najednou. V jaké je pozici, jak rychle se pohybuje, kdo jsou jeho sousedi. Je to obrovský chaos, který nedokážeme popsat. Jako bychom byli nad Prahou a poslouchali všechna zapnutá rádia s nejrůznějšími naladěnými stanicemi. Neporozuměli bychom ničemu. Radiofrekvenčním pulsem musíme vygenerovat nějakou koherenci. Rozhodneme se například poslouchat pouze vysílání vodíků na určité frekvenci. Jako by si všichni naladili Evropu 2. Pak pomocí nějaké sekvence pulsů přeladíme třeba na Český rozhlas Radiožurnál. NMR spektroskopie je ve své podstatě rádiové vysílání a ladění těch nejsprávnějších frekvencí, abych dostal co nečistší zvuk bez šumu a bez rušení jinými frekvencemi. K tomu používáme jak hardware, tedy nejrůznější filtry, tak různé sekvence pulsů, jimiž systém donutíme, aby nám posílal jen tu informaci, kterou chceme.

**Jak probíhá interpretace naměřených spekter?** — Z přístroje získáme signál v podobě radiofrekvenčního vlnění, který musíme nejprve zpracovat. K tomu slouží Fourierova transformace, díky které získáme spektrum. Lze si to představit na analogii se zvukem. Člověk s dobrým hudebním sluchem si hra na klavír dokáže v hlavě převést do notového zápisu. Ale většina lidí toho schopna není. My podobně musíme použít Fourierovu transformaci, která nám poskytne jednotlivé rádiové frekvence. Pak nastupují kvantově chemické výpočty, které nám umožňují interpretovat spektra co nejsprávněji. Předpovíme strukturu, kterou očekáváme, a teoreticky vypočítané spektrum porovnáme s výsledkem experimentu. Je-li mezi teorií a experimentem dostatečná podobnost, víme, že ta struktura odpovídá skutečnosti.

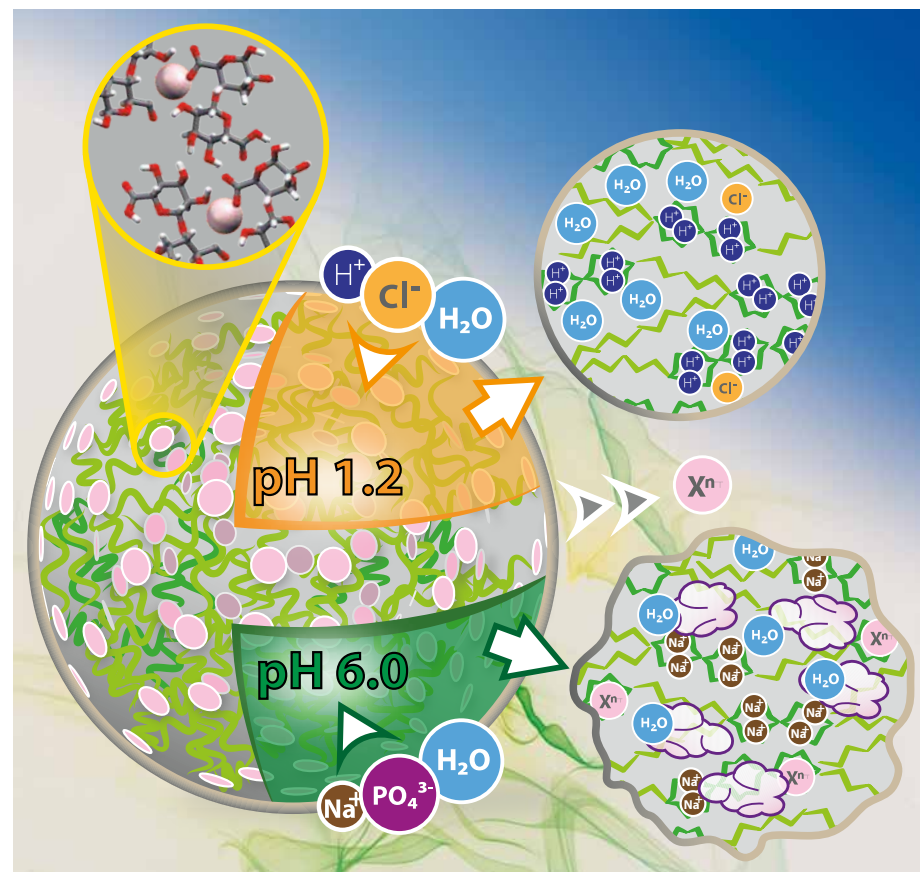
**Pro mne je to pořád trochu čarodějnictví. Když si představím složitost organických molekul, pestrost funkčních skupin, možnosti interakcí mezi atomy... Proměnných je tolik, že musí být obtížné interpretovat spektrum jednoznačně.** — Ale ono to je obtížné. Věnujeme se předpovídání krystalových struktur. A ukazuje se, že i za použití nejmodernějších výpočetních postupů je možností mnohonásobně více, než jsme schopni zpracovat. Přestože existuje řada zákonitostí, jimiž se atomy řídí, je pro ně v mikrovětě spousta místa. A všechny zákonitosti ještě nejsou zcela popsány. Ale právě to nás na tom baví. Experiment je důležitý, protože nám dává vodítka, abychom z množství teoreticky možných struktur dokázali vyselektovat ty nejnadějnější. Při upřesňování struktury nám potom velmi pomáhají výpočetní metody. V dnešní době do toho začíná vstupovat umělá inteligence, která nám může do budoucna hodně pomoci. Je to dobrý sluha, ale zlý pán.

**V jakém smyslu?** — Využívá strojové učení. Učí se na tom, co jsme jí poskytli. Nevím, jestli dokáže zcela správně odhadnout nějakou exotickou strukturu, s níž se dosud nesešla. Může nám jako nejlepší předložit variantu, která bude daleko od skutečnosti. Ale určitě naši práci výrazně urychlí, jen si musíme být vědomi jejich omezení.

**Jak si NMR spektroskopie vede ve srovnání s rentgenovou difrakcí?** — Rentgenová difrakce je metoda rychlejší, přesnější a správnější. Takže byste se mohl ptát, proč používáme NMR, když rentgenová difrakce drží všechny trumfy.

**Ptám se tedy: proč používáte NMR, když rentgenová difrakce drží všechny trumfy?** — Drží, ale ne vždy. Někdy není možné získat potřebný krystal nebo dobrý práškový materiál pro rentgenovou difrakci. To se týká například složitých kompozitních materiálů. A NMR spektroskopie má další velkou výhodu: umí zkoumat materiály, které vykazují silný vnitřní pohyb. Krystalová struktura je většinou dost rigidní. NMR spektroskopie oproti tomu dokáže popsat vnitřní dynamiku molekul. Jak se jednotlivé molekulární segmenty přibližují a oddalují, vychylují se ze svých pozic. A v těchto pohybech je často klíč k fungování daného materiálu. Asi největší využití to má u biologických materiálů, protože živá hmota je v neustálém pohybu. NMR spektroskopie umí tento pohyb zachytit, a to v prostředí hodně blízkém tomu přirozenému. Připravíme fyziologický roztok napodobující podmínky v organismu. Dnes už jsou dokonce k dispozici také metody, které dovedou zkoumat procesy přímo v buňkách.

**Jak lze zaznamenat pohyb jednotlivých částí molekul?** — Molekuly se skládají z jednotlivých segmentů, v organických molekulách je takovou základní jednotkou vodík – uhlík. Vodík je od svého uhlíku vzdálen jeden angström. Je tam známá dipól-dipólová interakce, která má svou specifickou hodnotu. Když je segment zcela rigidní, má ta interakce svou tabulkovou hodnotu. Ale jakmile se segment začne vychylovat, dochází k takzvanému pohybovému průměrování a dipól-dipólová interakce se začne zmenšovat. My toto zmenšení změříme a dokážeme je přeložit do amplitudy segmentového pohybu. Zjistíme, že se ten segment pootočil řekněme o  $60^\circ$  od původní polohy. A můžeme zjišťovat, s jakou frekvencí k těm pohybům dochází. Měříme takzvaný relaxační proces. Každý jaderný spin o sobě vysílá informaci, která se postupně ztrácí, jak se radiofrekvenční vysílání přeměňuje na teplo. Měříme rychlost tohoto vytráčení a z něho dokážeme určit frekvenci pohybu jednotlivých segmentů.



Ilustrace Ústav makromolekulární chemie AV ČR

**ALGINÁTY, biopolymery získávané z mořských řas, jsou používány jako nosiče bioaktivních látek, v tkáňovém inženýrství pro transplantaci buněk a v dalších oblastech medicíny. Ale jen velmi málo je známo o jejich interakcích ve fyziologickém prostředí. Jiří Brus s kolegy nedávno odhalili, jak se v kyselém prostředí žaludku vytvářejí hydrogely stabilizované silnými vodíkovými vazbami, zatímco v tenkém střevě alginátové částice silně botnají a uvolňují polyvalentní ionty, které ovlivňují rychlost dalšího uvolňování léčiva.**

**V čem se metodicky liší NMR pevné fáze od analýzy roztoku?** — V roztoku zaujme molekula během NMR experimentu miliardy nejrůznějších orientací, takže detekujeme takzvané izotropní hodnoty NMR parametrů. V pevné fázi molekuly svou orientaci vůči vnějšímu magnetickému poli nemění. Abychom dosáhli stejného vzhledu spekter, musíme chybějící molekulární pohyb nahradit. Činíme tak pohybem mechanickým. Práškový materiál, který zkoumáme, umístíme do květy o průměru několika milimetrů, která v přístroji rotuje. Abychom se alespoň trochu přiblížili tomu, co se děje v roztoku, vzorek musí rotovat velice rychle. Dnes používáme frekvenci v řádu desítek až stovek kilohertzů, takže květa se vzorkem se otočí až stotisíckrát za sekundu. Pro mne je to malý technický zázrak, rotační aparát je extrémně namáhaný.

**K NMR jste se dostal oklikou přes chemické metody restaurování památek, ale co ve vás na počátku vzbudilo obecný zájem o chemii?** — Původně jsem naprosto

bezpečně věděl, že budu astronom, protože na mne mocně zapůsobila *Okna vesmíru dokořán* Jiřího Grygara. V páté třídě jsem měl jasno, že budu studovat Matfyz. Ale na gymnáziu mi náš chemikář vysvětlil, že nikoli astronomie, ale chemie je to pravé. Neměli jsme ve škole žádné velké laboratoře, příliš jsme neexperimentovali, musel si vystačit s teorií, přesto mne uchvátil. Nevykládal nám jen vzorce a poučky, ale vysvětloval, jak chemici ke svým znalostem dospěli. A prokládal to výlety do historie. Čímž se dostávám zpět k NMR spektroskopii, protože její historie je zajímavá.

**Čím?** — První objevy sice spadají do období před 2. světovou válkou, ale obrovský rozvoj nastal až po ní. Navázal mimo jiné na válečné pokroky v technologii radarů. Navíc po válce byla spousta volných vědeckých kapacit. Mnoho lidí, kteří pracovali na projektu Manhattan, se začalo věnovat NMR spektroskopii. Atomové jádro se tehdy zkoumalo na různých energetických hladinách, takže k tomu měli blízko. A svou roli sehrál

i vývoj nových materiálů. Například teflonu, který umožnil účinně izolovat elektronické komponenty. Další rozvoj následoval po roce 1960 s aplikací Fourierovy transformace.

**Proměnila se technologie NMR nějak výrazně za dobu, kdy se jí sám zabýváte?**

— V posledních dvaceti letech je to spíše evoluce. Nastal čas plně využít potenciál metod vyvinutých v předchozích desetiletích. Přišly sondy pro rychlou rotaci při měření v pevné fázi. Já jsem začínal s frekvencí 5 kHz, dnes se standardně měří při 111 kHz. Revoluční změnu přinesla asi jen konstrukce spektrometru, který využívá tzv. dynamickou nukleární polarizaci. Princip byl znám dávno, ale na technické řešení jsme si museli počkat asi do roku 2010.

**O co jde?** — Vzorek se označí nepárovým elektronem, nějakým radikálem, jehož energie se přenesou do měřených jader, čímž dojde ke gigantickému zesílení signálu, a tím se dosáhne vyšší citlivosti měření. Poměr signálu k šumu se zvýší stonásobně. Během několika hodin či dnů lze získat výsledky, které by jinak trvaly rok. Takže je možné měřit velice komplikovaná korelační spektra v systémech s přirozeným izotopickým zastoupením. Ale je to metoda extrémně finančně náročná. Přístroj stojí kolem 200 milionů korun, a protože experimenty musí probíhat při nízkých teplotách, je velká spotřeba kapalného dusíku – třeba 500 litrů denně. Takový přístroj by uživilo leda nějaké národní centrum přístupné více uživatelům, jedná instituce si to dovolit nemůže.

**Pohybujete se na pomezí chemie a fyziky, v mikrovětě, který nedokážeme obsáhnout smysly. Máte nějaký rituál, kterým si čistíte hlavu od vědy?** — Rád čtu odpočinkovou literaturu, kolegové nad ní občas zdvihají obočí. Třeba knížky od Jiřího Kulhánka nebo sci-fi příběhy Tima Powerse. Skoky časem, mezi těly... Jsou to pro mne takové mentální lázně. A také se snažím hrát golf. Tam člověk musí vypnout a myslet jen a jen na správný úder.

**Nepracuje při tom na vědeckých problémech alespoň podvědomí? Mnohé lidi napadají zásadní věci ve spře nebo na procházce, ne u počítače.** — Někdy ano, ale projeví se to až po poslední jamce, když už sedím v klubovně. Pokud se mi hra dařila, jedu na adrenalinové vlně a dobře se přemýšlí. Problémy, které se mi dosud jevily jako těžko zvládnutelné, se najednou zdají prakticky vyřešené. Podvědomí si pracovalo na pozadí a v klubovně se přihlásilo s výsledky. Kdybych se ho ale pokusil ovládnout během hry, utopím všechny míčky vedle v rybníčku a stejně na nic nepříjdu. ●

