

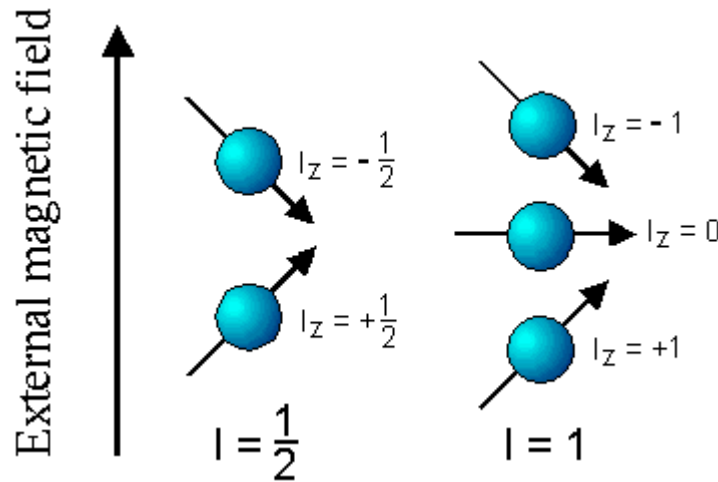
C6200–Biochemické metody

11A_NMR A EPR

Petr Zbořil

Nukleární magnetická rezonance

- Jádra vykazující nenulový jaderný spin (závisí na počtu protonů a neutronů) mají magnetický moment a orientují se v externím magnetickém poli.
- Spin může nabývat několika orientací v závislosti na své hodnotě – vyjádřeny magnetickým číslem m_l
- Počet možných hodnot m_l : $n = 2I + 1$, kde **I je spinové kvantové číslo (jaderný spin)** o hodnotách $0, \frac{1}{2}, 1, \dots$
- Hodnoty magnetického čísla $m_l \in I, I - 2I, \dots, -3/2, -1, -1/2, 0, 1/2, 1, 3/2 \dots$



Rozdělení jader

- Jádra o $I = \frac{1}{2}$
 - Nenulový jaderný magnetický moment, snadno měřitelná
 - ^1H a další viz tab.
 - Citlivost - vysoké přírodní zastoupení
- $I > \frac{1}{2}$
 - Nenulový jaderný magnetický moment, měřitelná
 - Kvadrupolový moment – obtíže při měření
 - Liché nukleonové číslo
 - I poločíselná ($3/2, 5/2$ atd.)
 - Sudé nukleonové a liché protonové číslo
 - I celočíselná ($1, 2$ atd.)
- $I = 0$
 - Sudý počet p i n – $^{12}\text{C}, ^{16}\text{O}$ apod.
 - Nulový magnetický moment, neaktivní

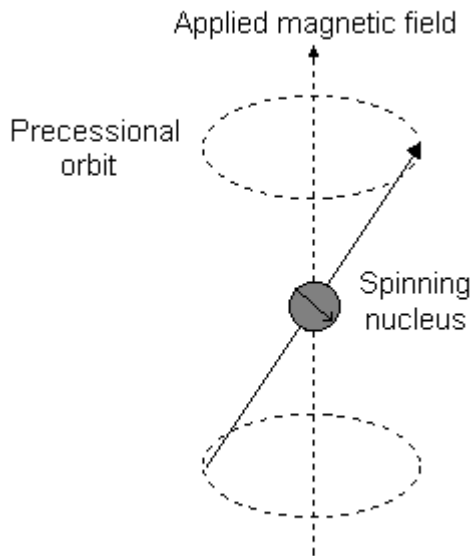
NMR

- Jaderný magnetický moment $M = \gamma \sqrt{I(I+1)} h / 2\pi$
 - h je Planckova konstanta
 - γ je tzv. gyromagnetický poměr, typický pro dané jádro
 - $\gamma = g_l \cdot e / 2m$ (rozlišovací faktor, náboj a hmotnost jádra)
- V magnetickém poli precese $\nu_0 = \gamma \mathbf{B}_0 / 2\pi$
 - Výsledek interakce magnetických momentů
 - ν_0 – Larmorova precesní frekvence
- Orientace $M_z = M \cdot \cos\theta = \gamma m_l h / 2\pi$

Nukleární magnetická rezonance

Magnetický moment rotujícího jádra M

$$M = \gamma I \hbar / 2\pi \quad \gamma \text{ gyromagnetický poměr}$$



Umístění rotujícího magnetu v elektrickém poli

Frekvence precesní rotace: $\nu_0 = \gamma B_0$

B_0 – indukce magnetického pole

ν_0 – Larmorova frekvence

Pro H – 200 MHz při 4,7 T atd.

Označení přístrojů – 200, 300, atd.

Nukleární magnetická rezonance

Velikost magnetického momentu M , gyromagnetický poměr γ , jaderný magneton μ , Planckova konstanta ($\hbar = h/2\pi$) a rozlišovací faktor g_l a hmotnost jádra m a jeho náboj e jsou ve vztahu

$$M = \gamma \cdot \hbar \cdot \sqrt{l(l+1)}$$

$$\gamma = \mu \cdot g_l / \hbar$$

$$\mu = e \cdot \hbar / 2m$$

A ten určuje energii jednotlivých orientací v magnetickém poli intenzity B_0

$$E_l = - M_z \cdot B_0 + E_0$$

$$M_z = \gamma \cdot \hbar \cdot m_l$$

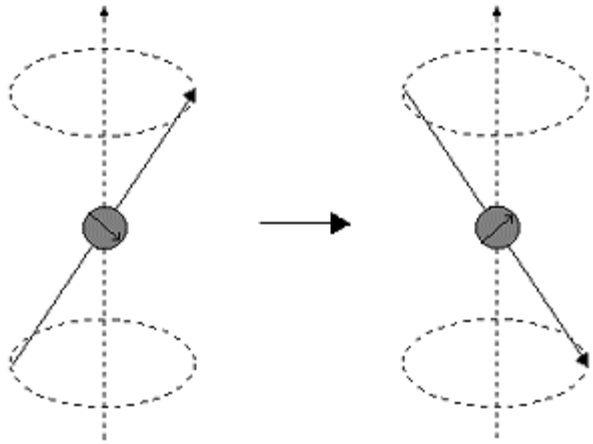
Kde magnetické kvantové číslo $m_l \equiv l, (l-1) \dots -(l-1), -l$, počet $2l+1$ E stavů

$$\text{Pro } l = 1/2, \quad m_l = \pm 1/2$$

a energetický rozdíl mezi jednotlivými stavy (orientacemi vektoru M_z) je

$$\Delta E = \gamma \cdot \hbar \cdot (1/2) \mathbf{B}_0 - \gamma \cdot \hbar \cdot (-1/2) \mathbf{B}_0 = \gamma \cdot \hbar \cdot \mathbf{B}_0 = h \cdot \nu$$

Nukleární magnetická rezonance

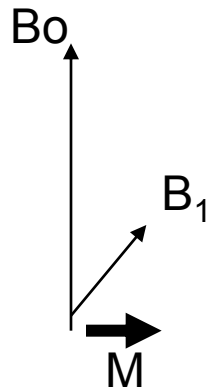


Rozdíl mezi dvěma energetickými hladinami

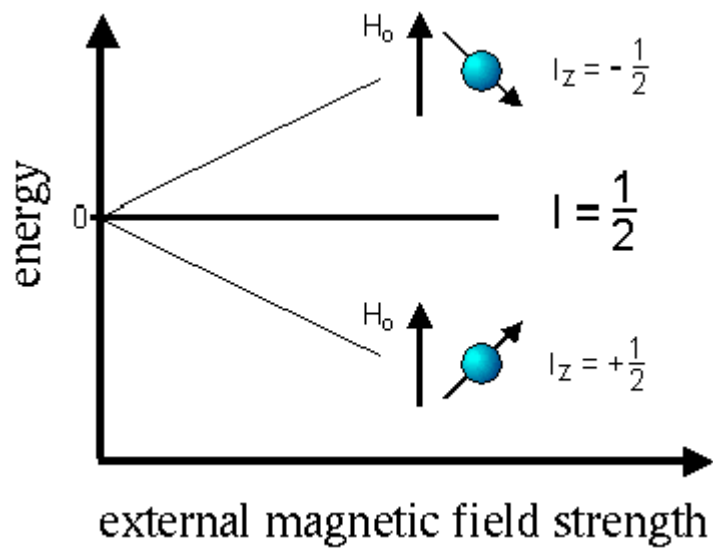
$$\Delta E = \gamma \cdot \hbar \cdot \mathbf{B}_0 = h \nu_0$$

pokud působíme elmg. polem o frekvenci $\nu_1 = \nu_0$

Dojde k rezonanci a přechodu na vyšší hladinu



Nukleární magnetická rezonance

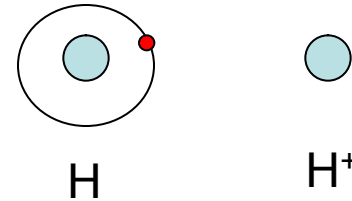
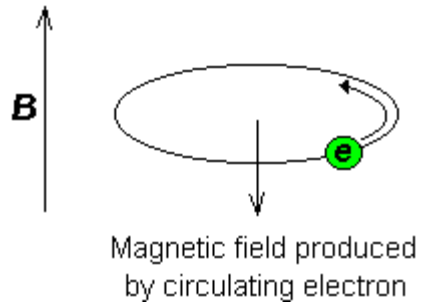


Nukleární magnetická rezonance (B = 2,3 T)

Jádro	I	ν_0 (MHz)	citlivost	% zastoupení
1H	$\frac{1}{2}$	100	1	99,9
13C	$\frac{1}{2}$	25	0,016	1
15N	1	10	0,001	0,36
19F	$\frac{1}{2}$	94	0,8	100
31P	$\frac{1}{2}$	40	0,067	100
17O	$\frac{5}{2}$	13	0,003	0,04

Nukleární magnetická rezonance

Stínění jádra – chemické posuny



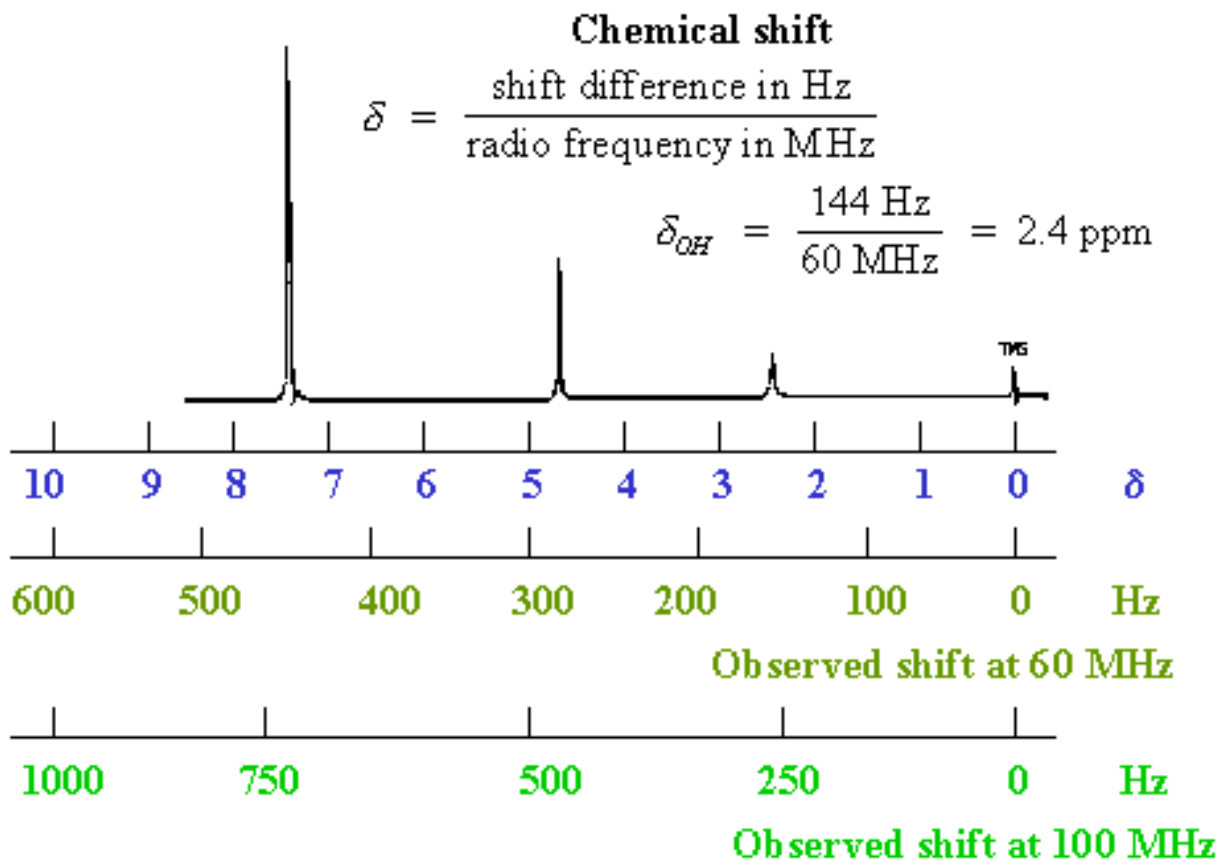
$$B = B_0 - \sigma B_0$$

$$\sigma = (B - B_0) / B_0 \text{ (x } 10^6 \text{)}$$

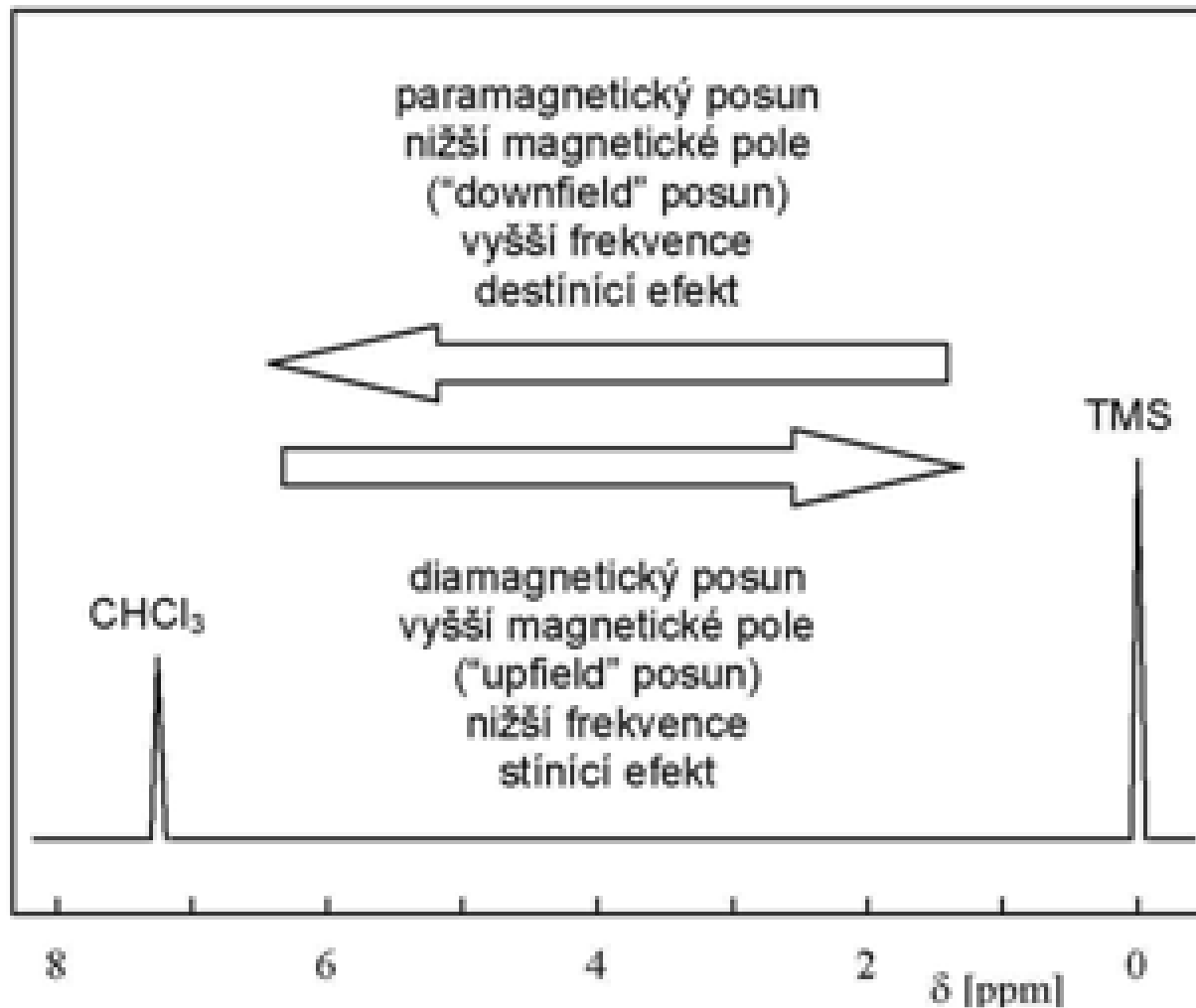
$$\delta = 10 - \sigma$$

δ chemický posun (ppm)

Chemický posun



Stínění a chemický posun



Standart pro ^1H -NMR

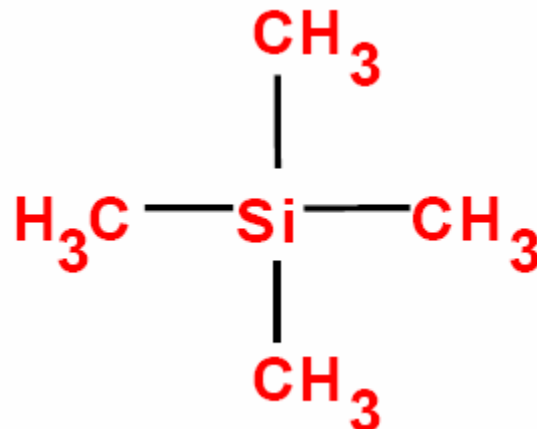
Tetrametylsilan

- jediná ^1H linie snadno
rozpoznatelná

- singletový signál nejvíce vpravo

- přidává se přímo k vzorku

- po skončení měření ho lze mírným
zahřátím ze vzorku odstranit



Nukleární magnetická rezonance

Chemické posuny

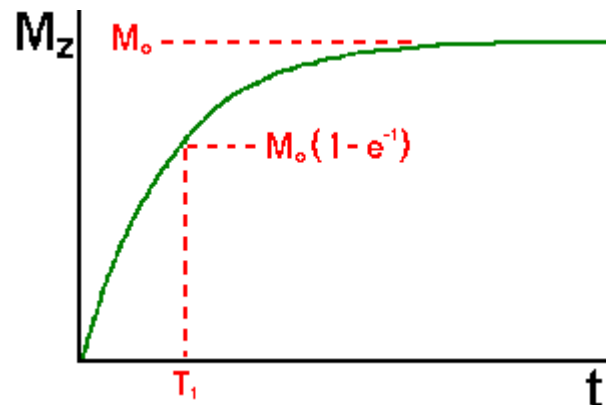
CH ₃	1
CH ₂	1,5
R ₂ NH	0,5-2
RNH ₂	1,5
ArCH ₃	2,5
-C≡CH	3
Ar-NH ₂	3,5 – 4,5
X-CH ₃	2,5 – 3,5
R-O-CH ₃	4
=C=CH ₂	5
ArH	7-8
RCOH	10
RCOOH	10-12

Nukleární magnetická rezonance

Spin-mřížková relaxace

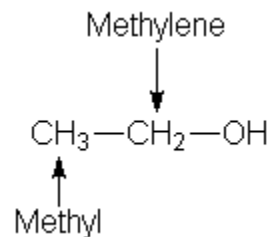
Jádro v excitovaném stavu se zbavuje energie relaxací

Relaxační čas (střední doba života jader v excitovaném stavu) – $\tau = 10^{-1} - 10^2$ s



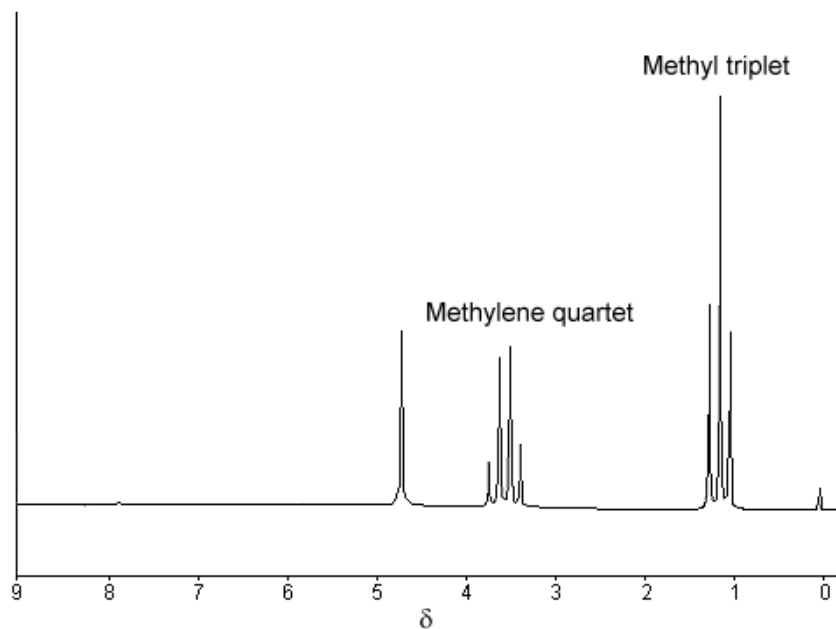
Nukleární magnetická rezonance

Multiplicita signálu – spin-spinová interakce

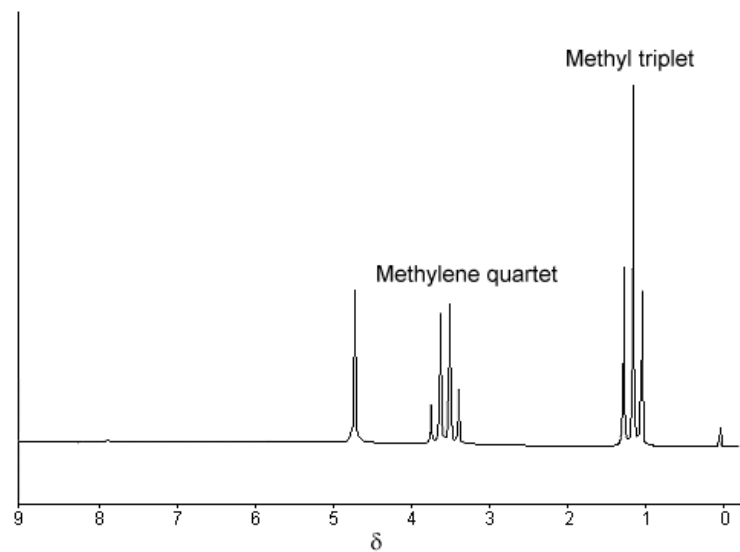


Multiplicita = $n+1$

$(x + 1)^n$



Nukleární magnetická rezonance



Využití NMR

Struktura a její změny

chemický posun δ – chemické okolí jádra, typ skupiny

Multiplicity a interakční konstanty J - počet sousedních magneticky aktivních jader a geometrických uspořádání

Integrální intenzity signálů - počet ekvivalentních atomů v molekule

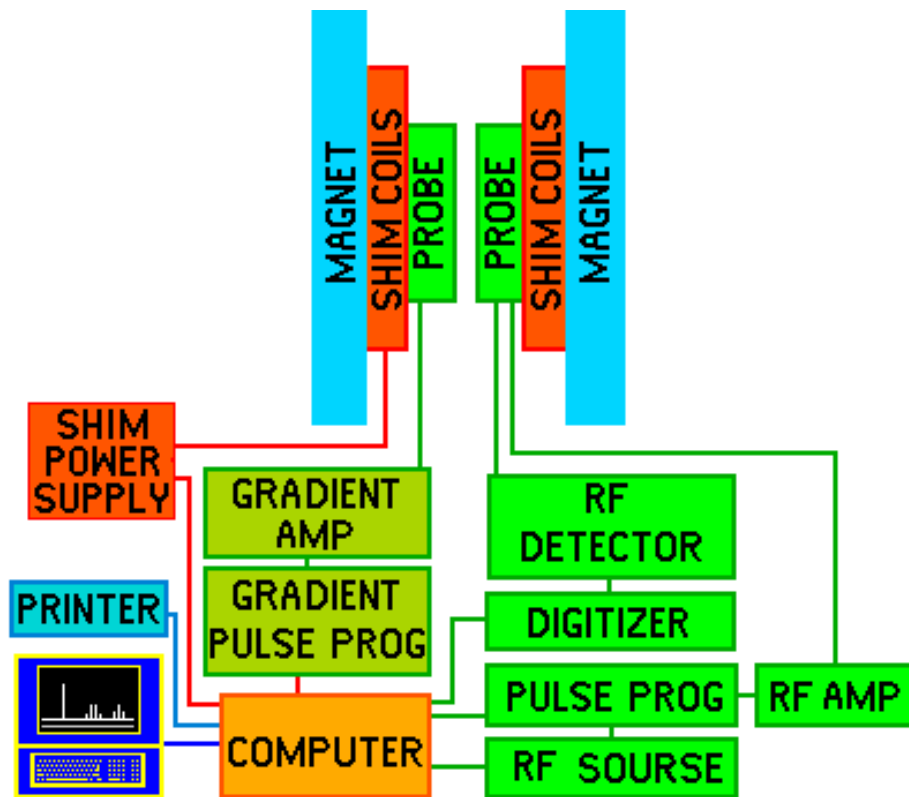
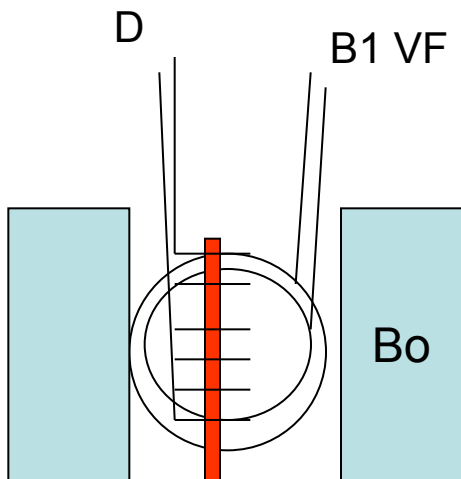
Korelační signály atp.

Nukleární magnetická rezonance

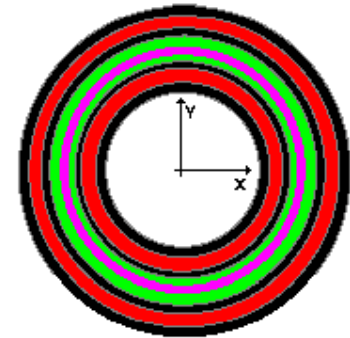
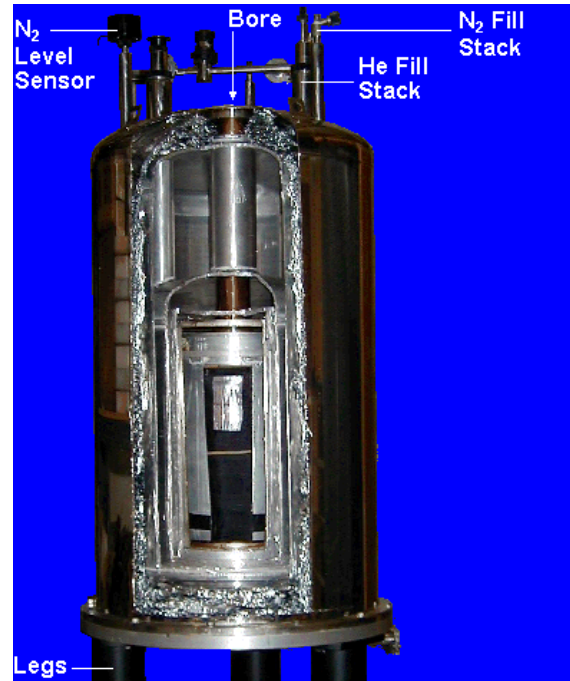
- Způsob měření
 - Absorpční
 - Relaxační
- Proměnné
 - ν při konstantním B_0
 - B_0 při konstantním ν

Nukleární magnetická rezonance

Přístrojové vybavení



Nukleární magnetická rezonance

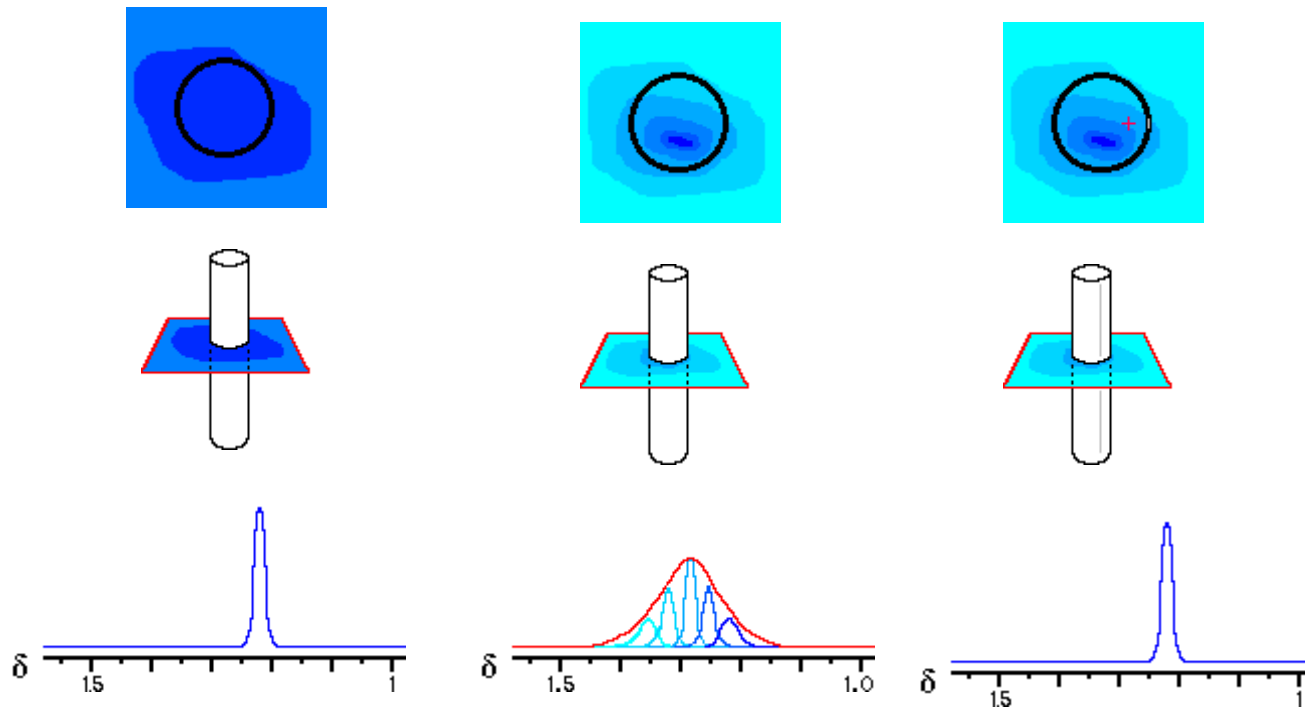


- Vacuum
- Liquid Helium
- Liquid Nitrogen
- Container & Support
- Superconducting Coil

Supravodivý magnet 7 T

Nukleární magnetická rezonance

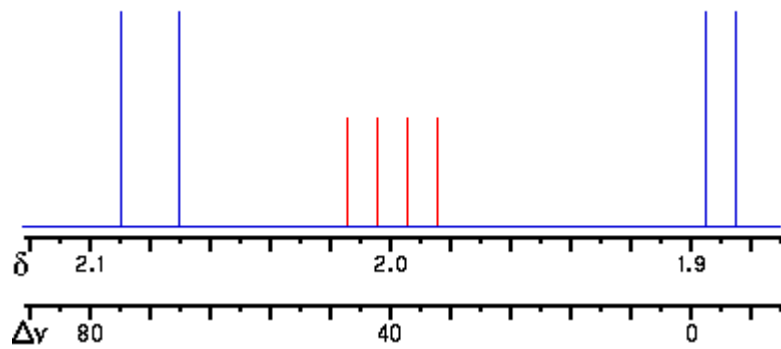
Vzorek – homogenizace pole



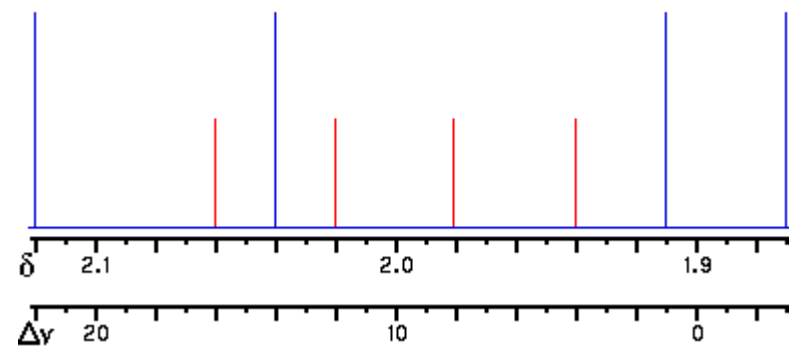
Nukleární magnetická rezonance

Volba přístroje

400 MHz

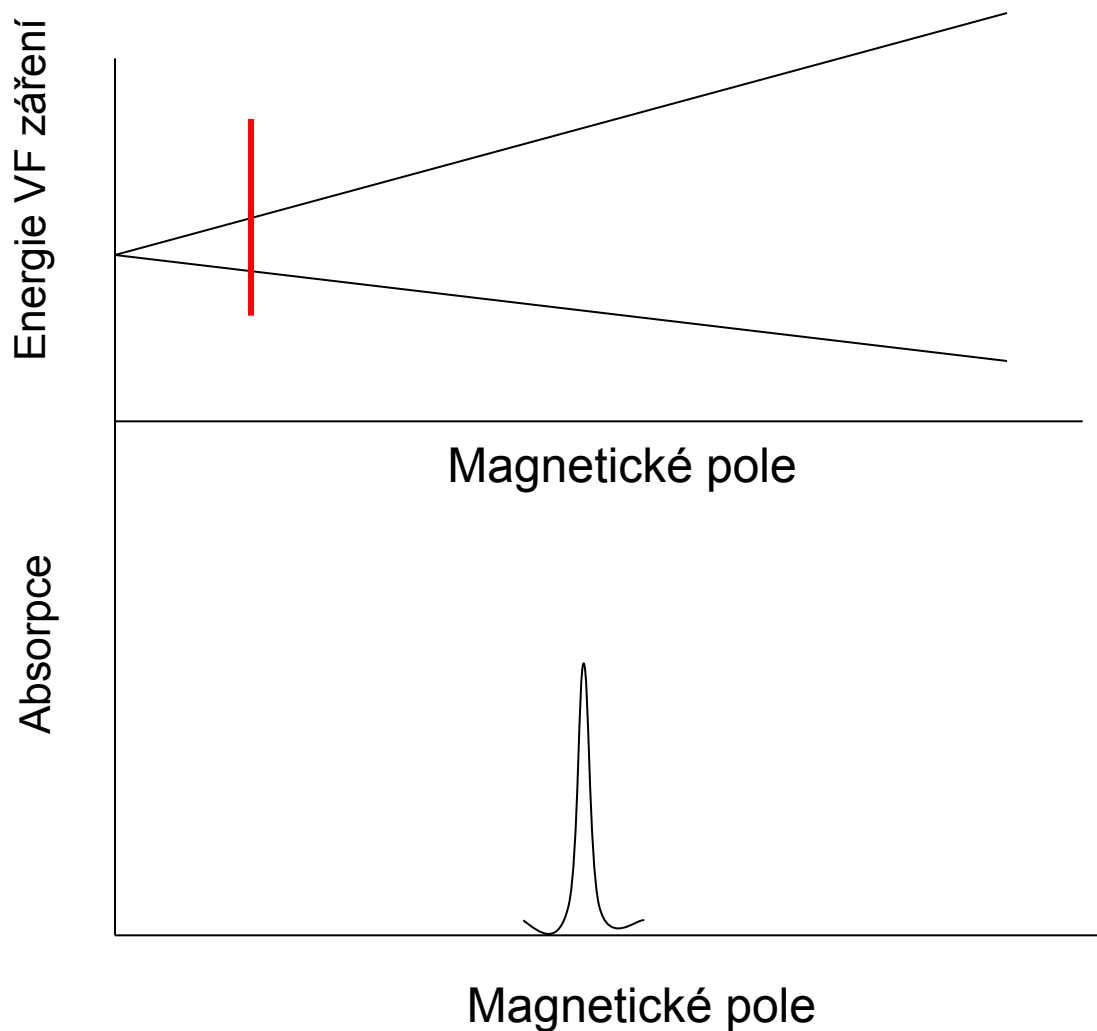


100 MHz



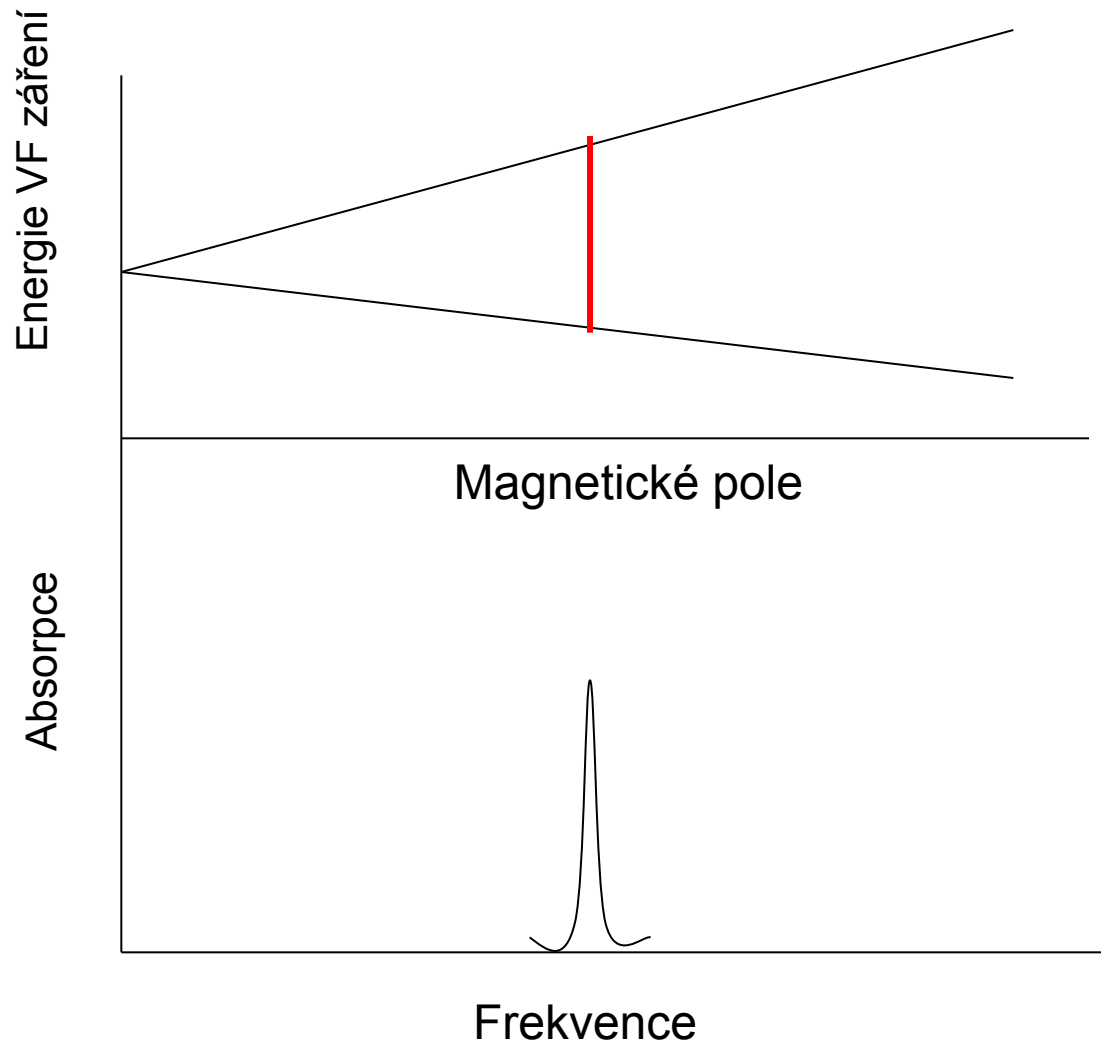
Nukleární magnetická rezonance

Metoda continuous wave (CW) – konstantní frekvence – mění se B_0



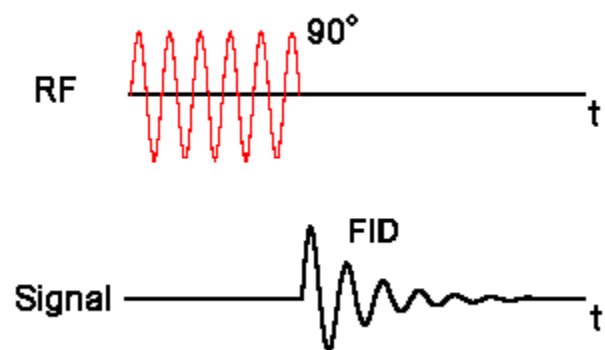
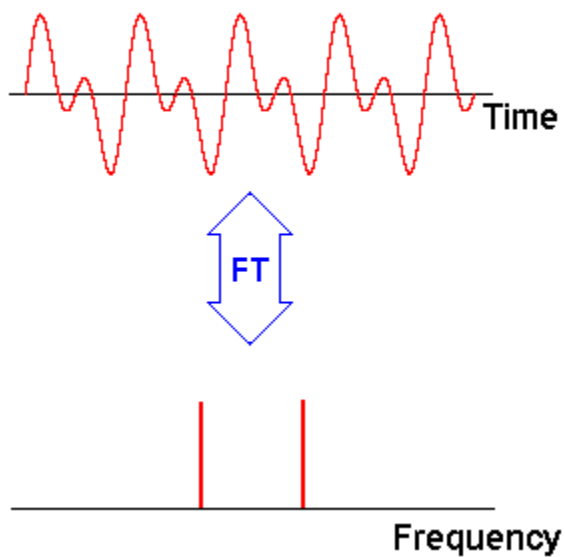
Nukleární magnetická rezonance

Metoda continuous wave (CW) – konstantní B_0 – mění se frekvence



Nukleární magnetická rezonance

Fourrierova transformace



Nukleární magnetická rezonance

Rozpouštědla – Deuterovaná

Acetone CD_3COCD_3

Chloroform CDCl_3

Methylnitrile CD_3CN

Water D_2O

Diethylether (DEE) $(\text{CD}_3\text{CD}_2)_2\text{O}$

Dimethyl Sulfoxide (DMSO) CD_3SOCD_3

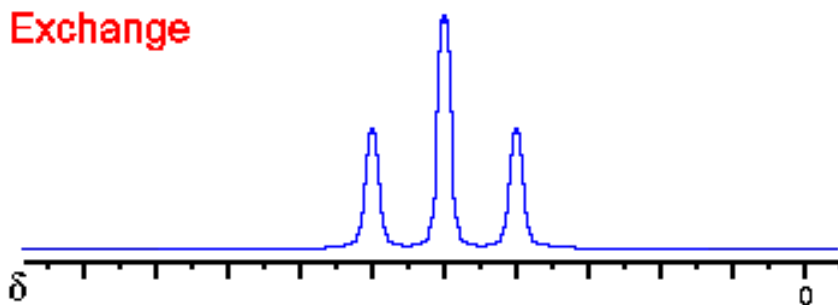
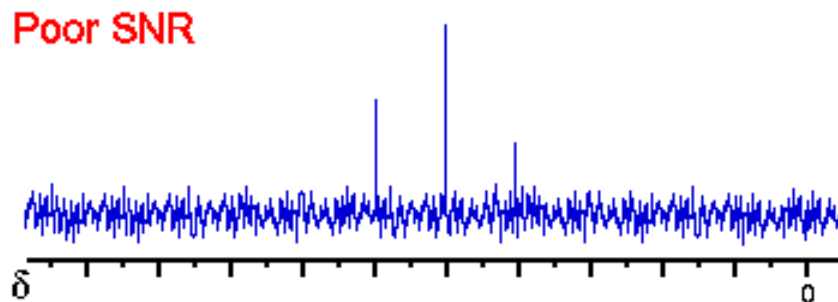
Ethanol $\text{CD}_3\text{CD}_2\text{OD}$

Atd.

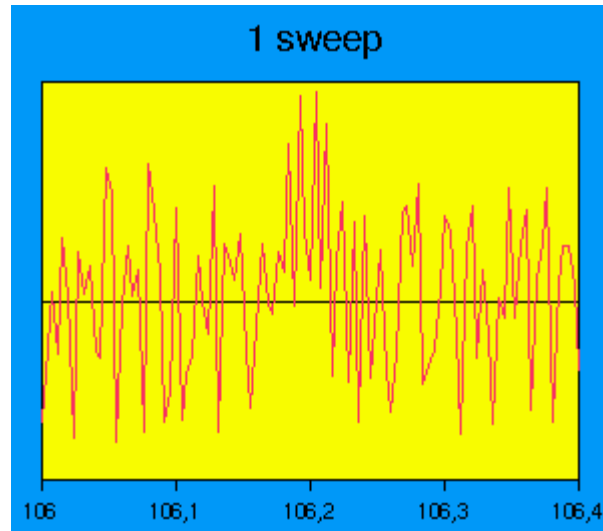
Nukleární magnetická rezonance

Signal-to noise ratio

Nízká a vysoká koncentrace

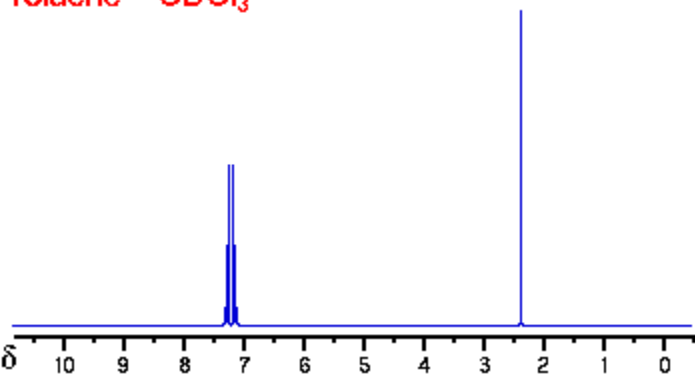


Nukleární magnetická rezonance

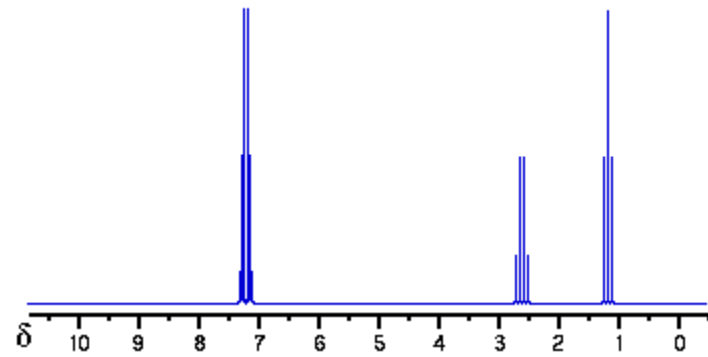


Nukleární magnetická rezonance

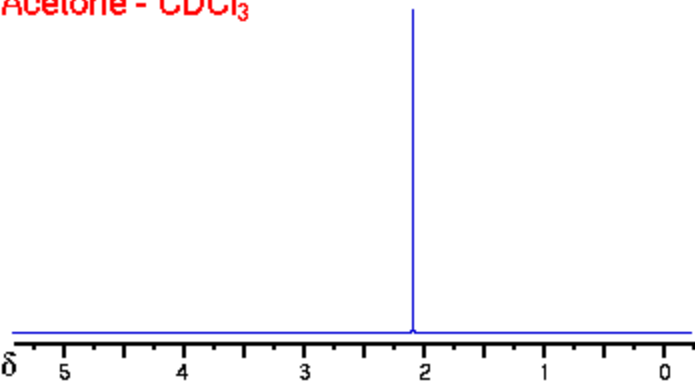
Toluene - CDCl_3



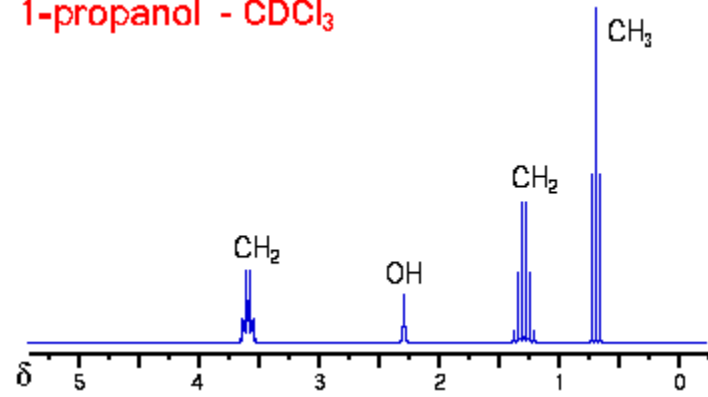
Ethyl benzene - CDCl_3



Acetone - CDCl_3

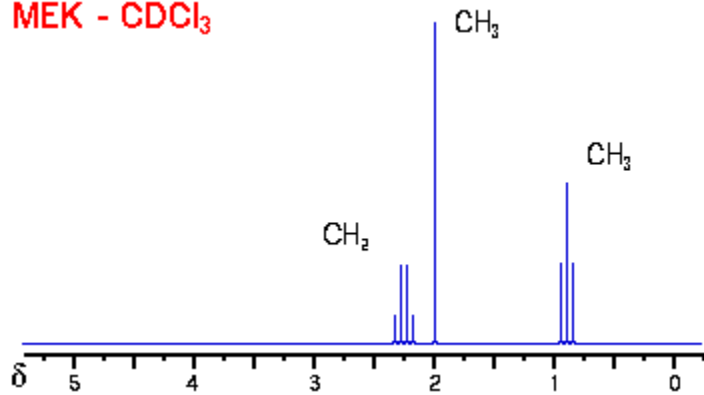


1-propanol - CDCl_3

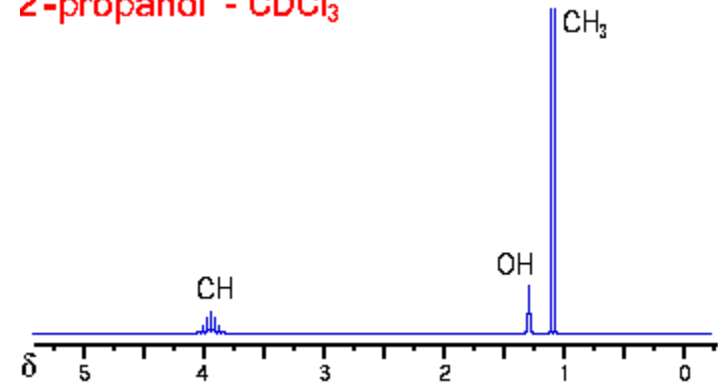


Nukleární magnetická rezonance

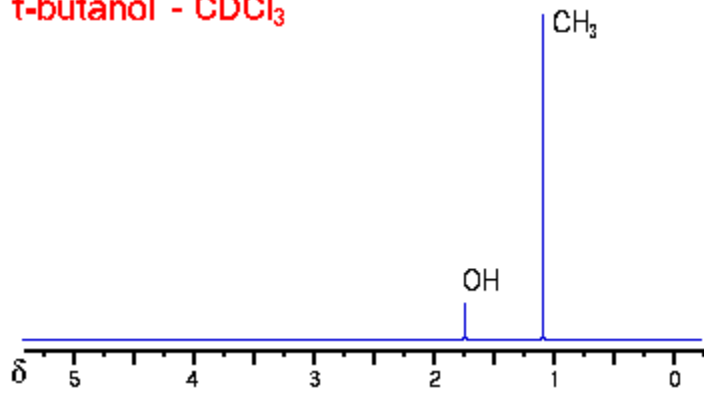
MEK - CDCl_3



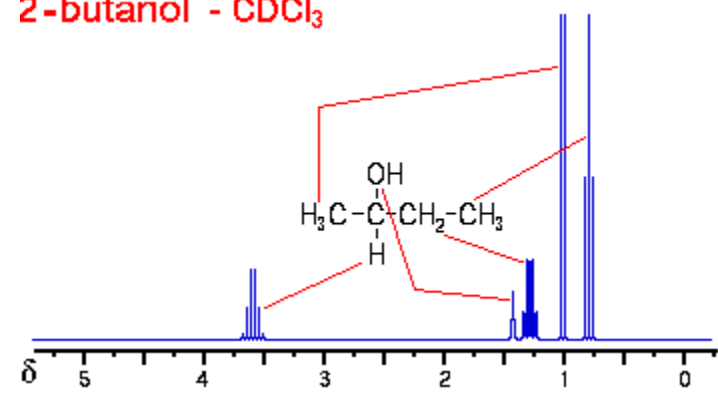
2-propanol - CDCl_3



t-butanol - CDCl_3



2-butanol - CDCl_3



Nukleární magnetická rezonance- ^{13}C

Carbon-13 Chemical Shifts

Carbon-13* Environment	Chemical Shift Range (ppm)
CH_3CH_2	0-50
$-\text{C}\equiv\text{C}-$	60-100
$\equiv\text{C}-\text{X}$	70-170
C_6H_6	65
CHCl CHCl (cis)	71
Ar	120-150
CCl_4	97
COOR	170
COH	210
RCOR	220

Nukleární magnetická rezonance-¹⁵N



Nitrogen-14 Chemical Shifts

Nitrogen-14* Environment	Chemical Shift Range (ppm)
NO ₂ Na	-355
NO ₃ ⁻ (aqueous)	-115
N ₂ (liquid)	-101
pyridine	-93
bare nucleus	0
CH ₃ CN	25
CH ₃ CONH ₂ (aqueous)	152
NH ₄ ⁺ (aqueous)	245
NH ₃ (liquid)	266

Nukleární magnetická rezonance- ^{31}P



Phosphorous-31 Chemical Shifts

Phosphorous-31 Environment	Chemical Shift Range (ppm)
PBr_3	-228
$(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_3\text{P}$	-137
PF_3	-97
85% phosphoric acid	0
PCl_5	80
PH_3	238
P_4	450

Nukleární magnetická rezonance- ^{31}P

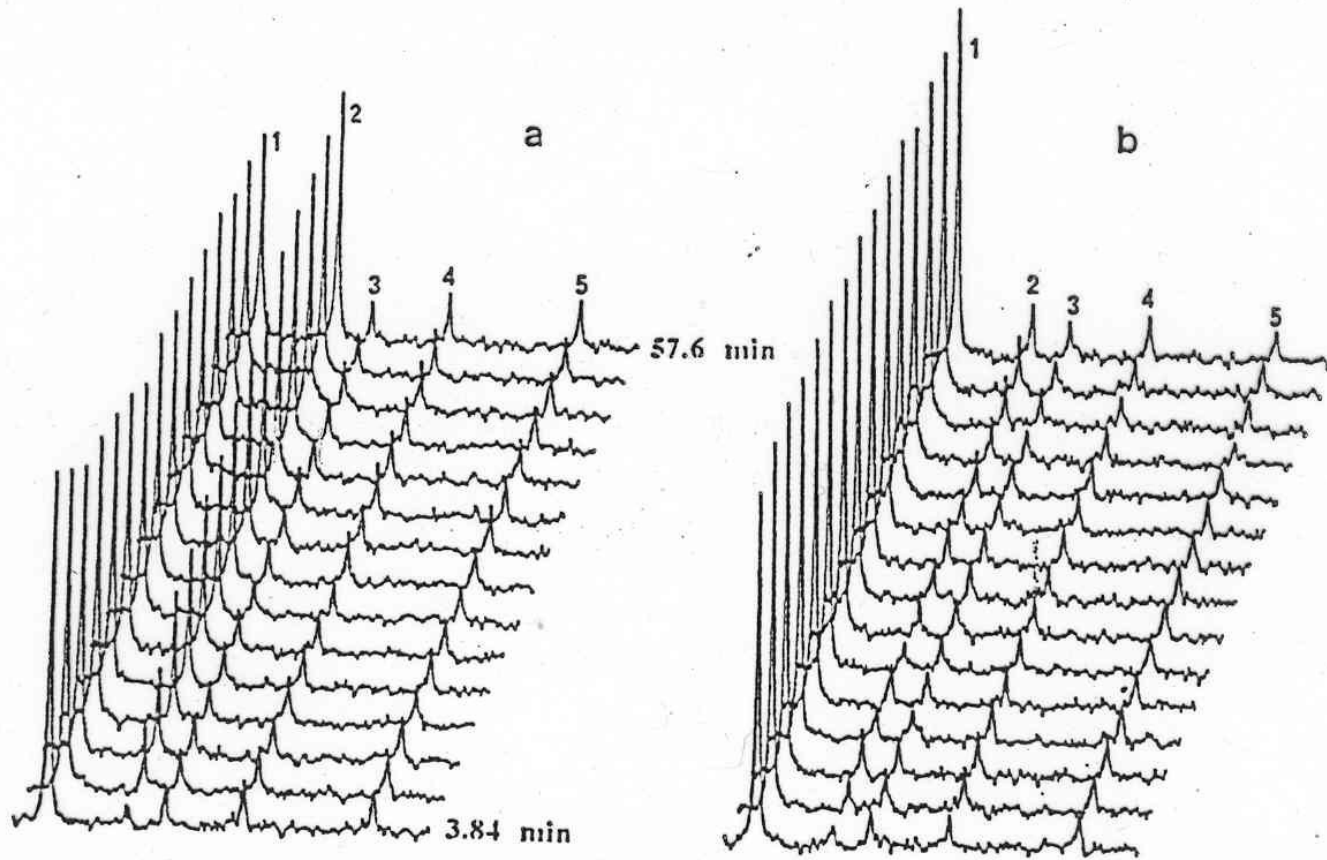


FIG. 1. Phosphocreatine synthesis by isolated rat skeletal muscle mitochondria followed by ^{31}P NMR spectroscopy: two series of typical spectra obtained during one hour with mitochondria (a) in the presence of 1 mM ATP or (b) in the presence of 1 mM ATP and 7 nmole/mg proteins of atractyloside. Peak assignments are (1) Pi, (2) PCr, (3), (4), and (5) γ -, α -, β - phosphorus of ATP respectively.

Nukleární magnetická rezonance- ^{31}P

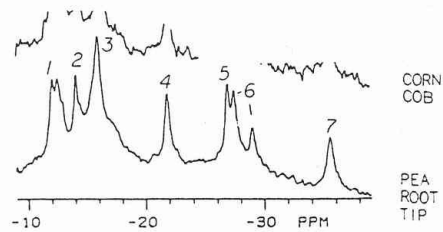


Fig. 12. ^{31}P -NMR spectra of living plant tissues, under oxygenated conditions. Peak assignments: 1, Glc-6-P; 2, cytoplasmic P_i ; 3, vacuolar P_i ; 4, γATP ; 5, αATP ; 6, UDPG and nicotinamide adenine nucleotides; 7, βATP . [From Roberts (1984), with permission.]

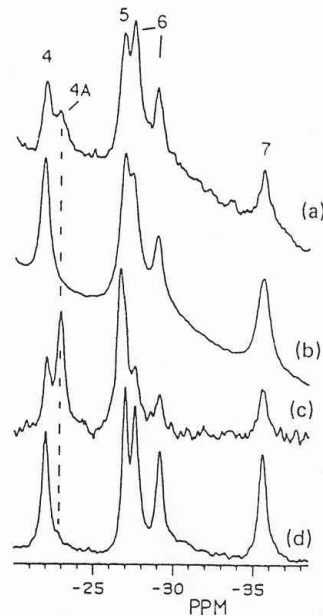
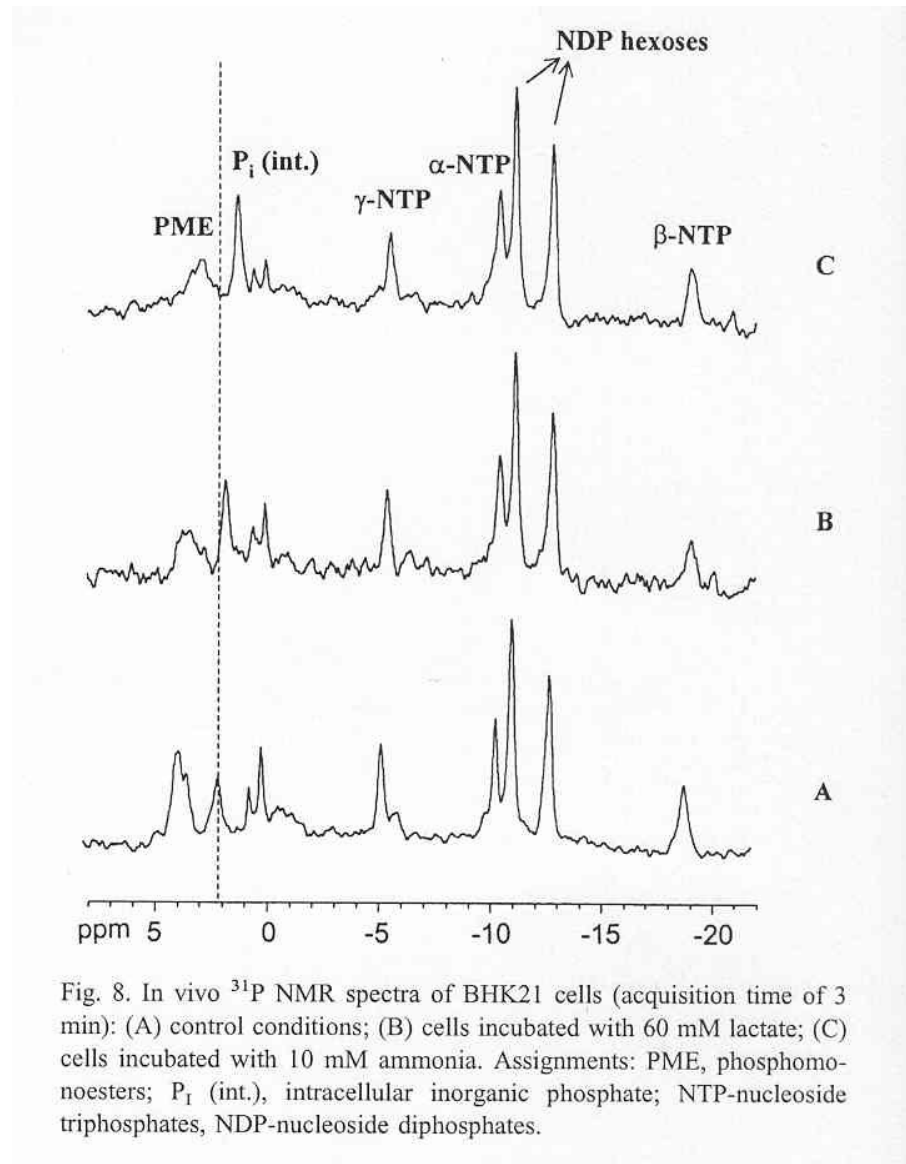


Fig. 19. ^{31}P -NMR partial spectra of the nucleotide region of (a) hypoxic maize root tips; (b) normoxic maize root tips; (c) extract of normoxic maize root tips, to which commercial ADP has been added; (d) extract of normoxic maize root tips, prior to addition of ADP. Peak assignments as in Fig. 12, except peak 4A, βADP (peak 5 will include a contribution from αADP , in addition to αATP). [From Roberts *et al.* (1985b), with permission.]

Nukleární magnetická rezonance- ^{31}P

Měření intracelulárního pH
Pomocí posunu signálu
 ^{31}P



Nukleární magnetická rezonance- ^{31}P

Měření koncentrace nukleotidů
Pomocí ^{31}P

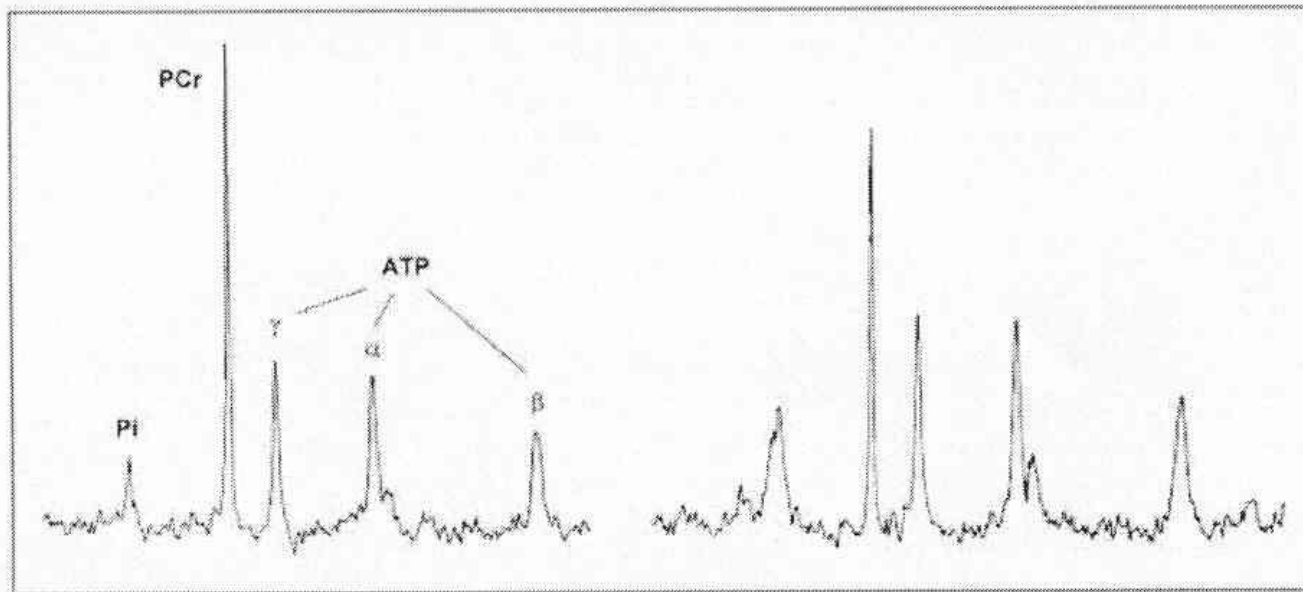


Figure 3 Typical ^{31}P NMR spectra from an isolated rat heart perfused with glucose only (right) or glucose and pyruvate (left). The major resonances, from left to right, report the relative heart contents of inorganic phosphate (Pi), PCr and the three phosphates of ATP (γ , α and β). Note the increase in PCr resonance area and fall in Pi resonance area when pyruvate is added to the glucose-containing buffer.

Nukleární magnetická rezonance- ^{13}C

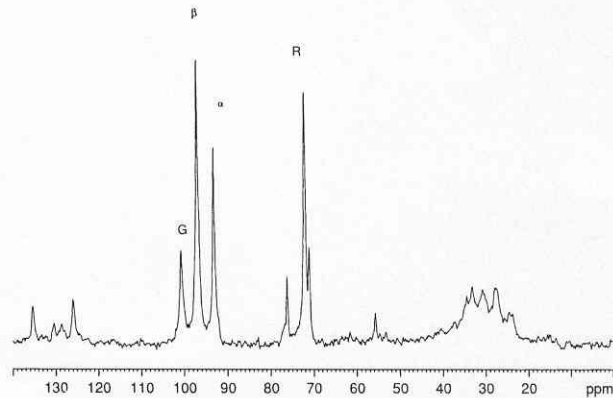


Fig. 7. Representative ^{13}C NMR spectrum acquired from a perfused rat heart under preischemic conditions after 30 min of labeled perfusion. The abbreviations denote $[1-^{13}\text{C}]$ glycogen (G), the α - and β -anomers of $[1-^{13}\text{C}]$ glucose (α and β), and $[2-^{13}\text{C}]$ ribose (R) used as standard.

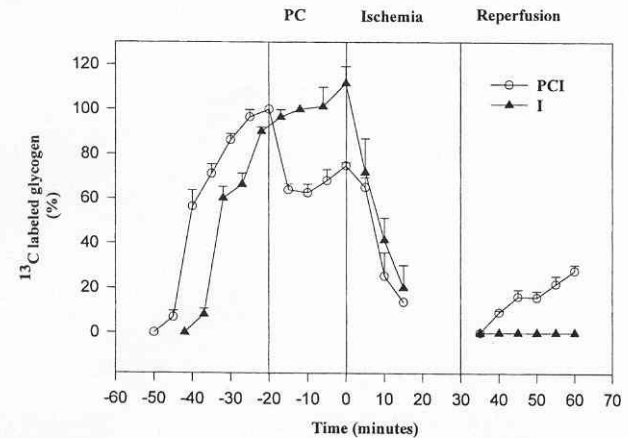


Fig. 8. ^{13}C -Labeling and mobilization of $[1-^{13}\text{C}]$ glycogen during protocol set I in preconditioned hearts (PCI, $n=6$, \circ) and ischemic controls (I, $n=6$, \blacktriangle). The labeled perfusion started at $t=-50$ min for the preconditioned hearts and $t=-42$ min for the controls. During the first 30 min of perfusion (stabilization), the behavior of the two groups was almost identical. $[1-^{13}\text{C}]$ -Glycogen was partially reduced by the first cycle of preconditioning ischemia and was not further reduced by subsequent cycles. In the PCI group, preischemic glycogen proved to be lower than that in Group I, with reduced $[1-^{13}\text{C}]$ glycogen mobilization during early ischemia ($t=0-15$ min). Only the PCI group resumed glycogen synthesis. Mean \pm S.E.M.

Nukleární magnetická rezonance – ^{15}N

Asimilace amoniaku sledovaná pomocí ^{15}N

Hlíva ústříčná

Extrakt mycelia narostlého na $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$
Mycelium 1 hod. po přidání $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$

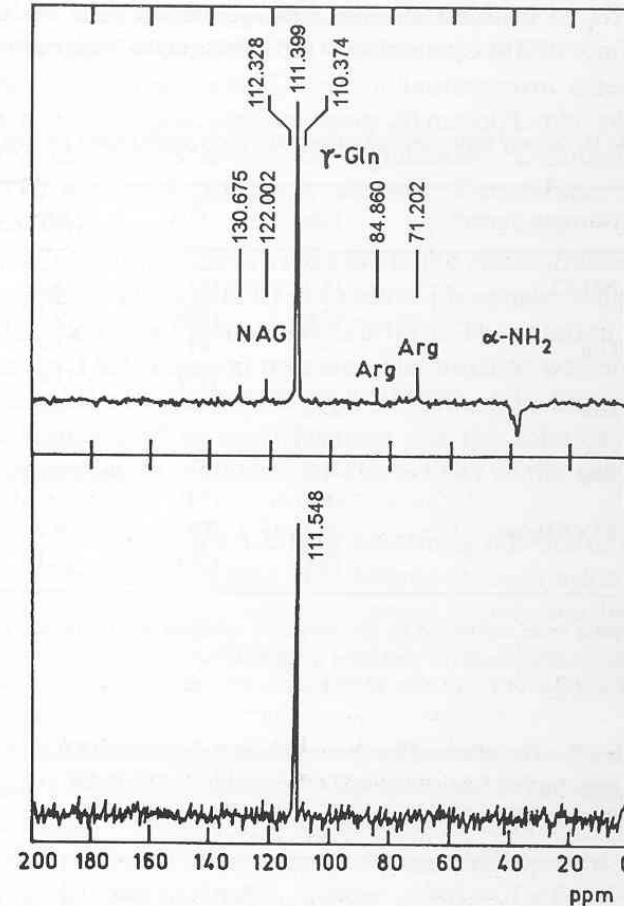


Fig. 1. ^{15}N -NMR spectrum (ppm) of cell-free extract from the mycelium of *P. ostreatus*. Top: mycelium grown in $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$, bottom: mycelium 1 h after the addition of $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$.

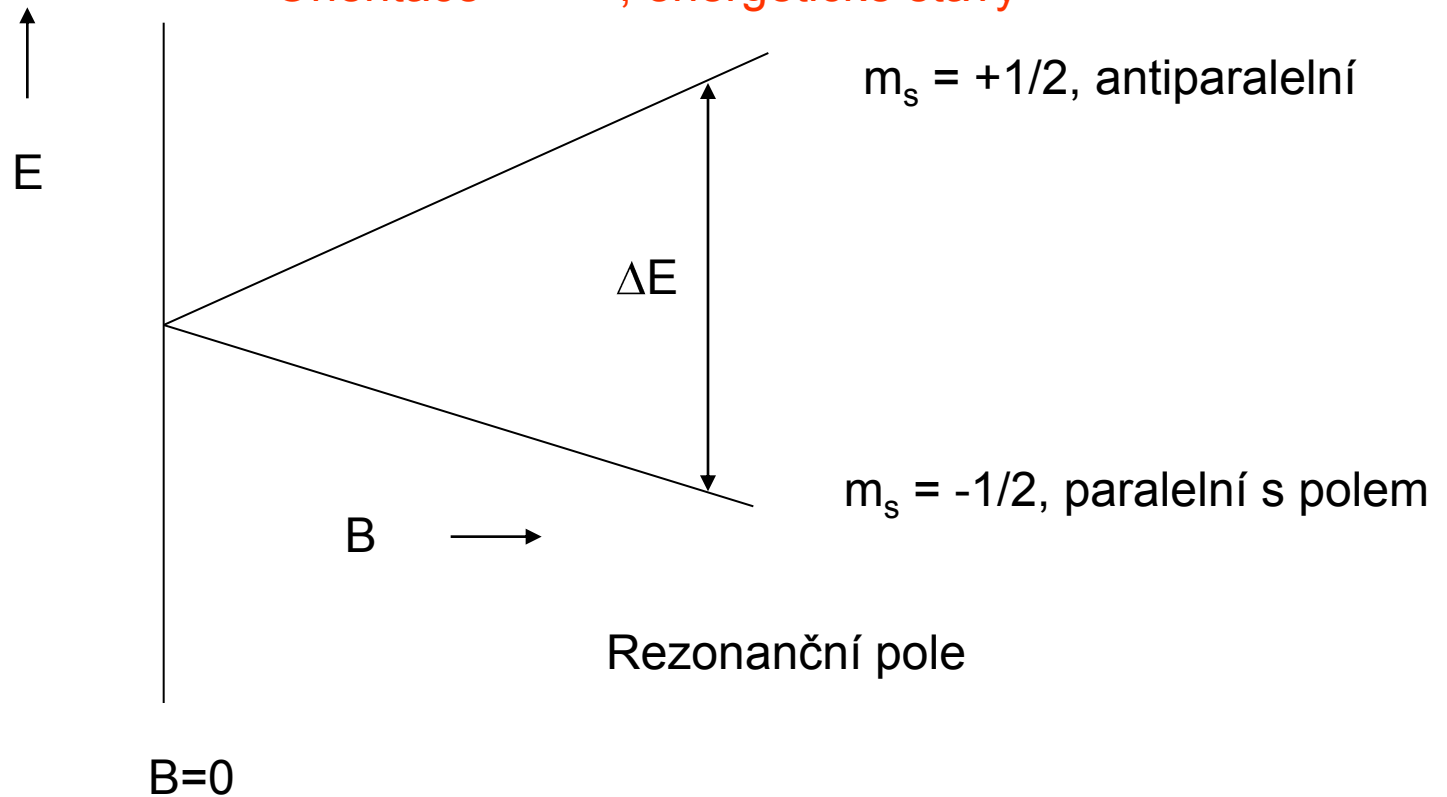
EPR - ESR

- Zde výtah pro základní pochopení
- Pro zájemce o bližší seznámení

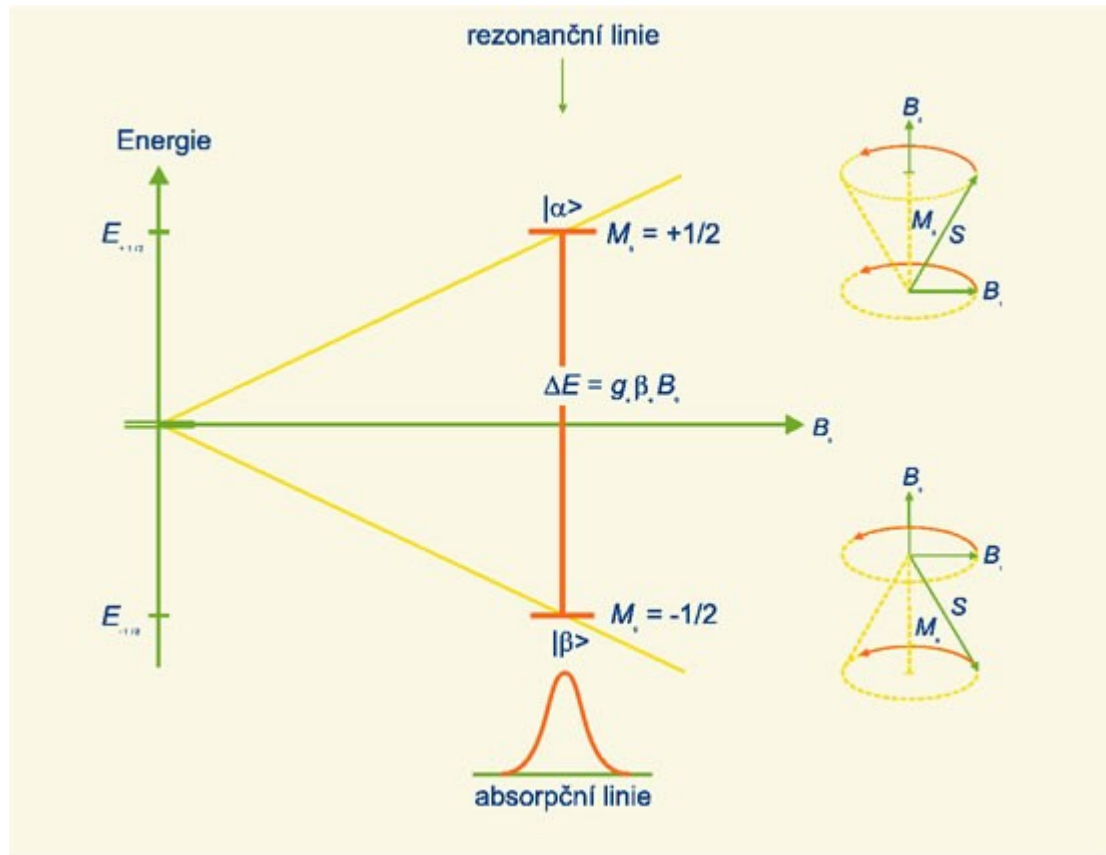
<http://cheminfo.chemi.muni.cz/ianua/epr/index.htm>

EPR – elektronová spinová rezonance

Nepárový elektron – nenulový spin – $|S| = 1/2$
Orientace – + - , energetické stavy



EPR – elektronová spinová rezonance



EPR – elektronová spinová rezonance

$$\Delta E = h\nu = g\mu B_0$$

Počet jader v jednotlivých orientacích
Intenzita signálu

$$N_1/N_2 = e^{-\Delta E/kT}$$

ΔE rozdíl energií

h – Planckova konstanta

ν – frekvence mikrovln

g – Landéův faktor
spin-orbitální interakce

μ – Bohrov magneton

B_0 – magnetická indukce

$$B_0 = 0,1 - 0,5 \text{ T}; \quad \nu = 10 - 100 \text{ GHz}$$

EPR – elektronová spinová rezonance

- Absorpce fotonů – MW oblast

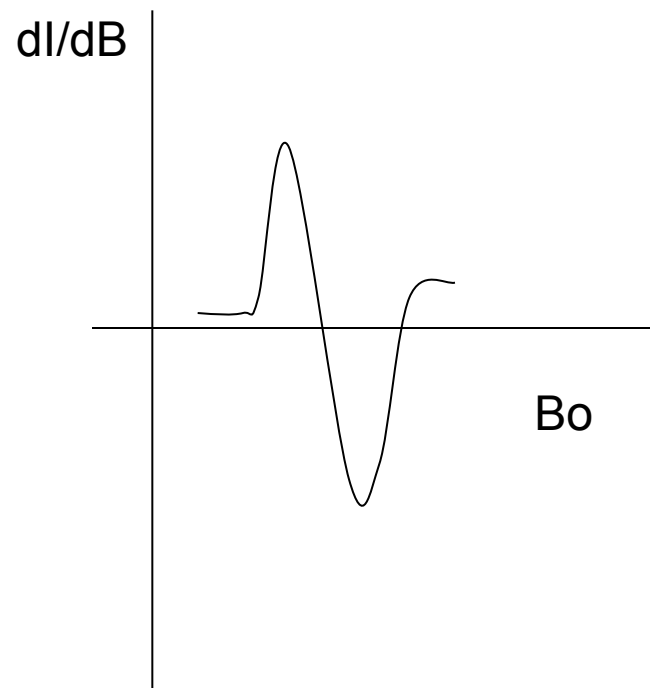
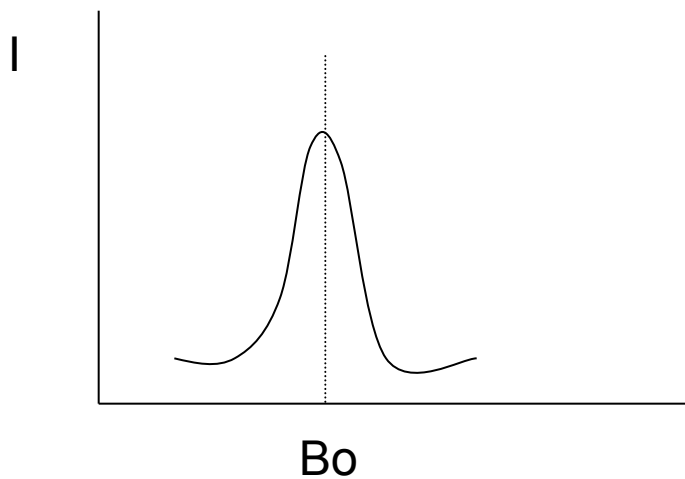
$$\nu = f(B_0)$$

změna ν nebo B_0 – častější

spektrum základní

derivace – standartně

EPR – elektronová spinová rezonance



EPR – elektronová spinová rezonance

Interakce s protony – štěpení píků

1 proton $I = \frac{1}{2}$

multiplicita = n (protonů ev. 2nI jádra) + 1, intenzita píků $(x + 1)^n$
platí pro ekvivalentní jádra (jinak složitější)

$n = 1$ – 1:1

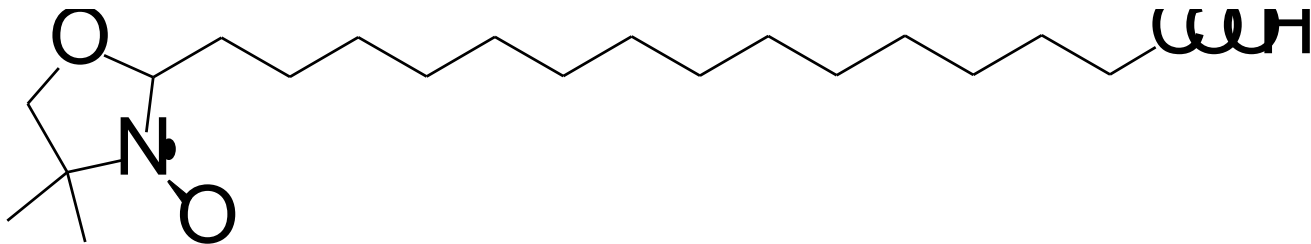
$n = 2$ – 1:2:1

$n = 3$ – 1:3:3:1

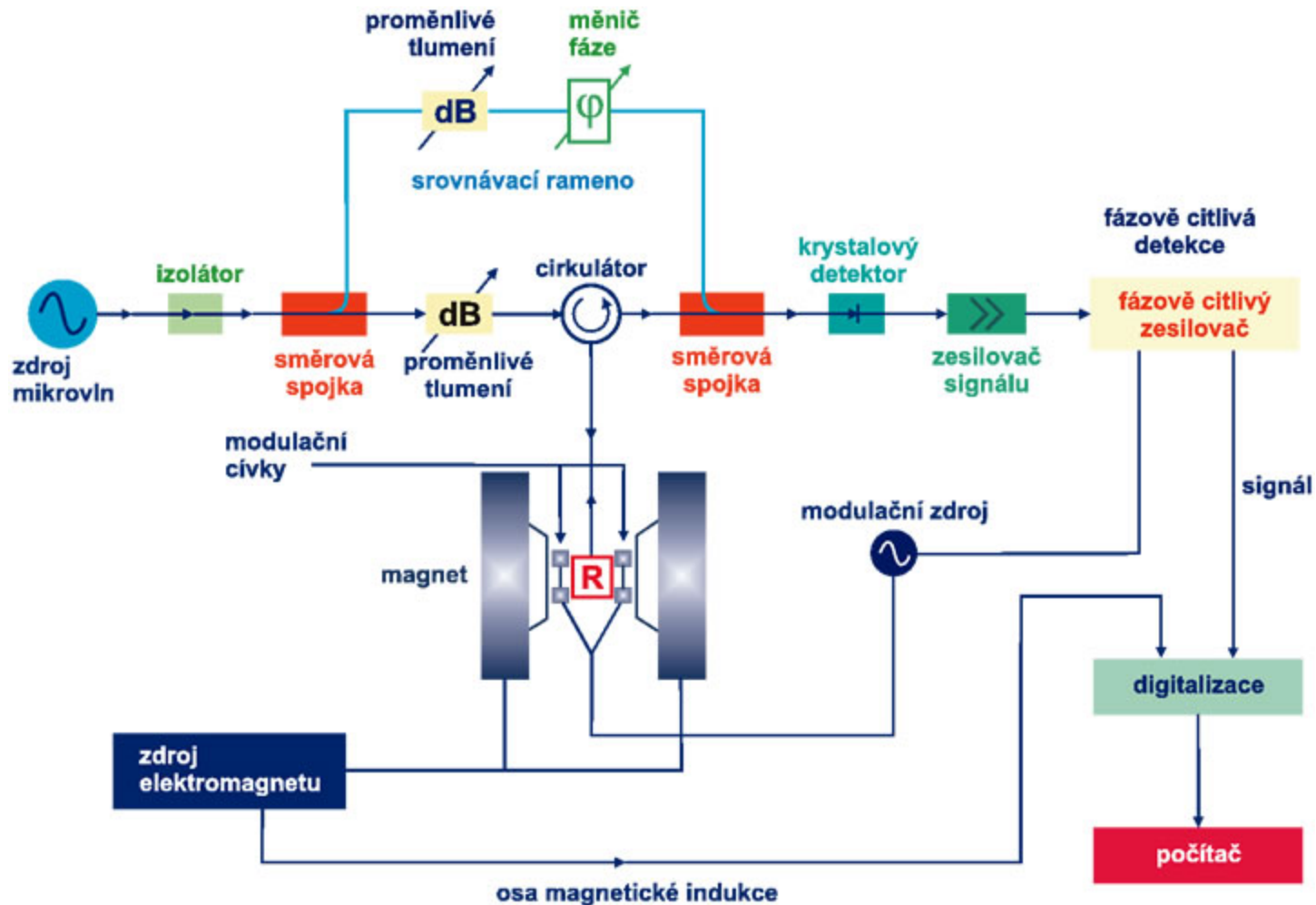
EPR – elektronová spinová rezonance

Využití v biochemii

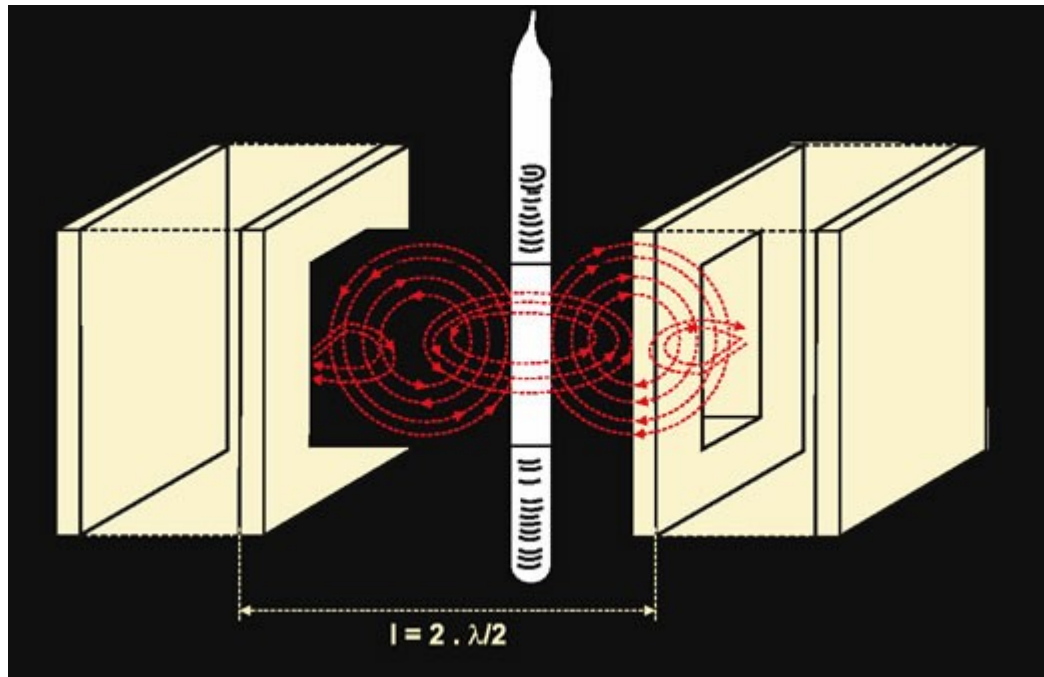
- Studium radikálů (peroxydy)
- Studium konformace – spinové značky – stabilní radikály
- Studium hemu



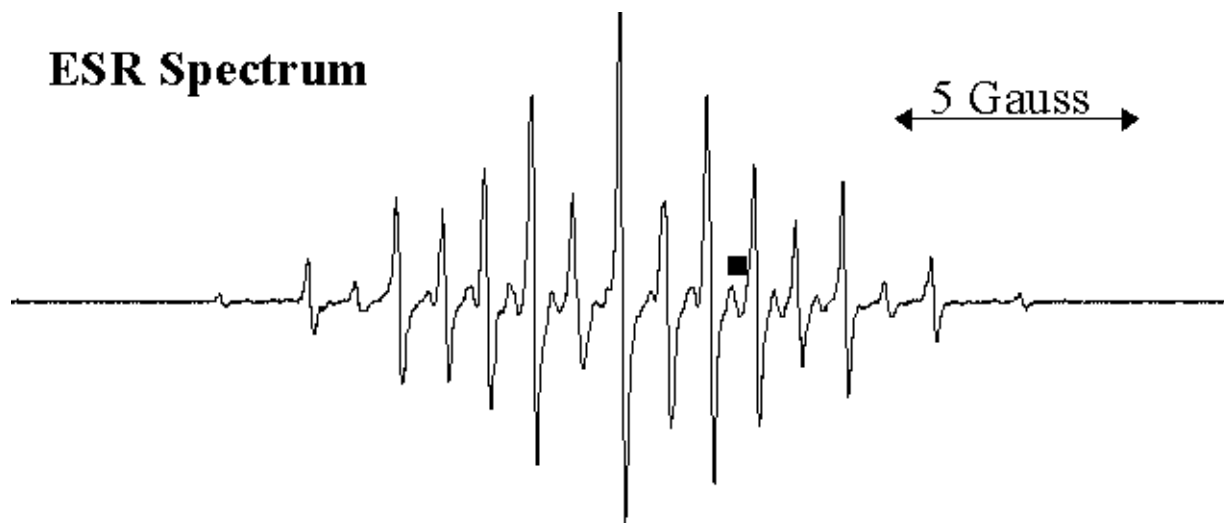
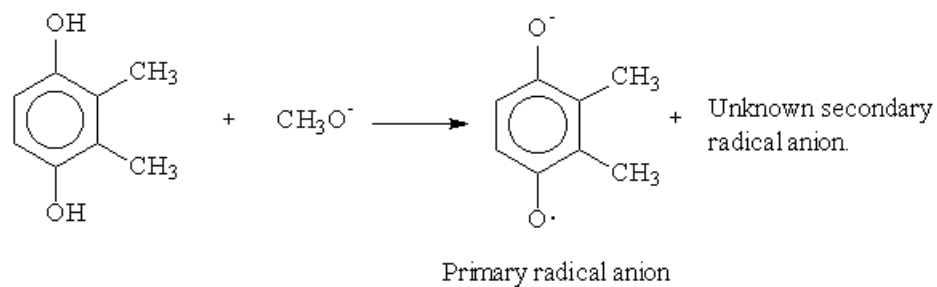
EPR - schema



EPR - měření



EPR – elektronová spinová rezonance



EPR – elektronová spinová rezonance

EPR spektrum NADH-UQ reduktasy
signál UQ
Signál 2Fe2S potlačen,
Signál FMN radikálu interferuje

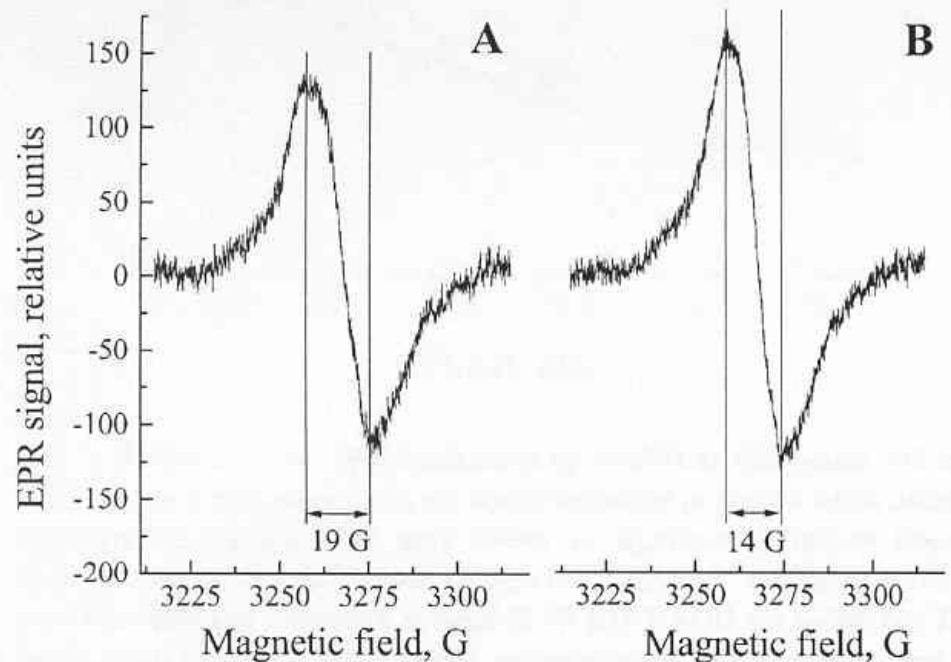


Fig. 1. EPR spectra of the radical signals in Na⁺-NQR from *V. harveyi*. (A) Air-oxidized, (B) dithionite-reduced. Sample conditions: 50 mM HEPES/Tris (pH 7.5), 200 mM NaCl and 0.05% DM, protein concentration 3 mg ml⁻¹, (B) dithionite, 5 mM. EPR conditions: microwave frequency, 9.15 GHz; microwave power, 100 μW; temperature, -40 °C; modulation amplitude, 0.2 mT.

EPR – elektronová spinová rezonance

EPR spektrum ferredoxinu
z mořské řasy
(3Fe-4S) $1+ / 0$
Typický signál

M.M. Pereira et al. / *Biochimica et Biophysica Acta* 1601 (2002) 1–8

5

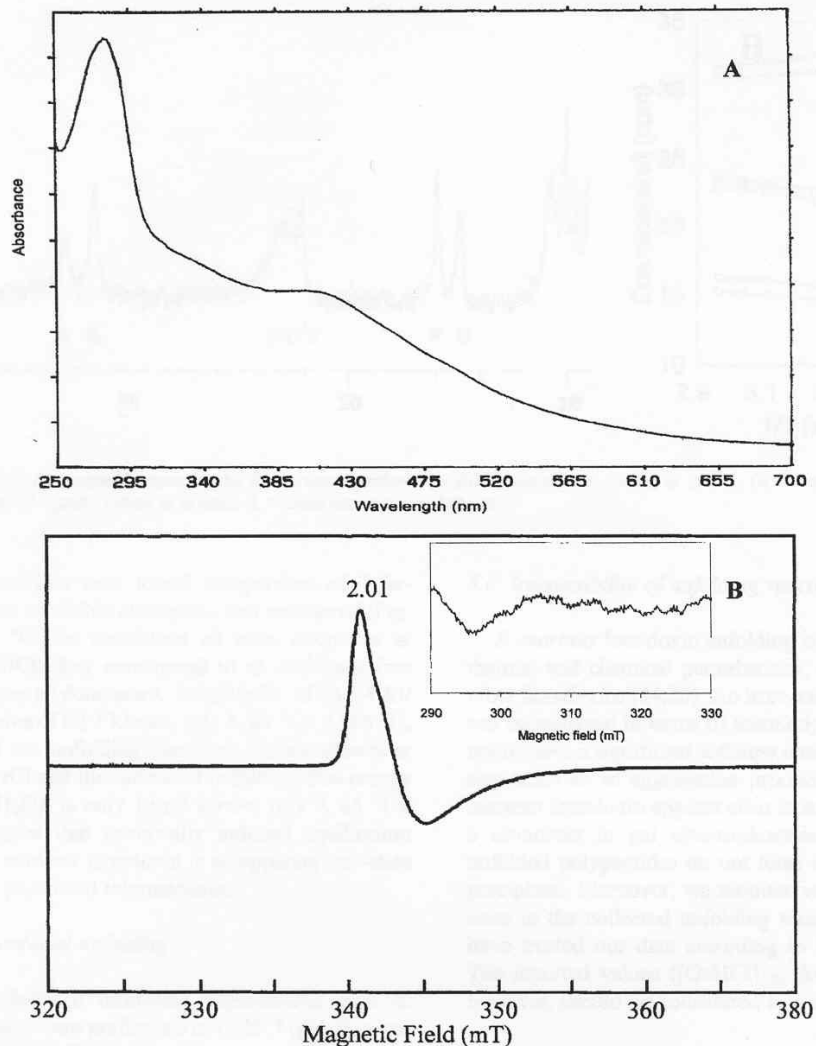


Fig. 2. (A) UV-visible spectrum of the oxidised ferredoxin from *R. marinus*. (B) EPR spectra of the ferredoxin from *R. marinus* in oxidised form and perpendicular mode (main spectrum) and reduced form and parallel mode (insertion). EPR conditions—temperature: 10 K; microwave frequency: 9.64 GHz (perpendicular mode) and 9.43 GHz (parallel mode); microwave power: 2.4 mW; modulation amplitude: 0.9 mT. Protein concentration 50 μ M (A) and 100 μ M (B).

EPR – elektronová spinová rezonance

EPR spektrum cyt bc₁ – mutant
M183K, M183H

Fe³⁺ hem (3,78 = cyt bL 3,44, cyt
bH,
2,94 bis-His cyt b nebo c₁)

J. Li et al. / Biochimica et Biophys Acta

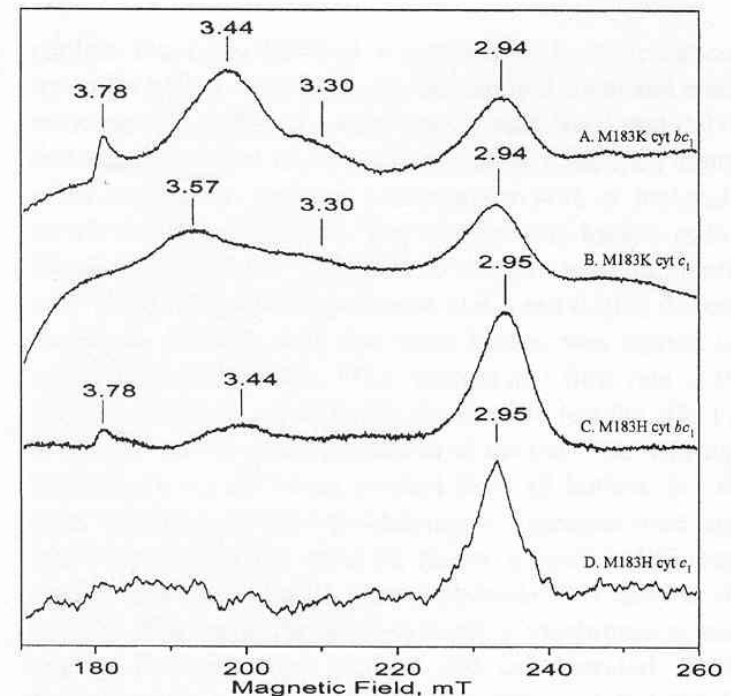


Fig. 2. X-band EPR spectra of *Rb. capsulatus* cytochromes. (A) Cytochrome *bc*₁ complex containing M183K cytochrome *c*₁ (39 μ M). (B) Purified M183K cytochrome *c*₁ (148 μ M). (C) Cytochrome *bc*₁ complex containing M183H cytochrome *c*₁ (29 μ M). (D) Purified M183H cytochrome *c*₁ (24 μ M). The buffer conditions are: 100 mM Tris–DCl (pD=8.0), 10 mM NaCl, 0.1% dodecyl maltoside and 55% *d*₃-glycerol for (A) and (C); 25 mM Tris–DCl (pD 8.0), 10 mM NaCl, 0.25% cholate and 55% *d*₂-ethylene glycol for (B); 25 mM Tris–DCl (pD 8.0), 10 mM NaCl, 1% cholate and 55% *d*₃-glycerol for (D). All spectra were recorded at 10 K and instrument settings were: number of scans, 5; microwave power, 10 mW; modulation amplitude, 1.0 mT; microwave frequency, 9.59 GHz.

EPR – elektronová spinová rezonance

EPR spektrum oxidace radikálů
LDL vyvolaných H₂O₂

Spektrum radikálu tokoferolu (A)

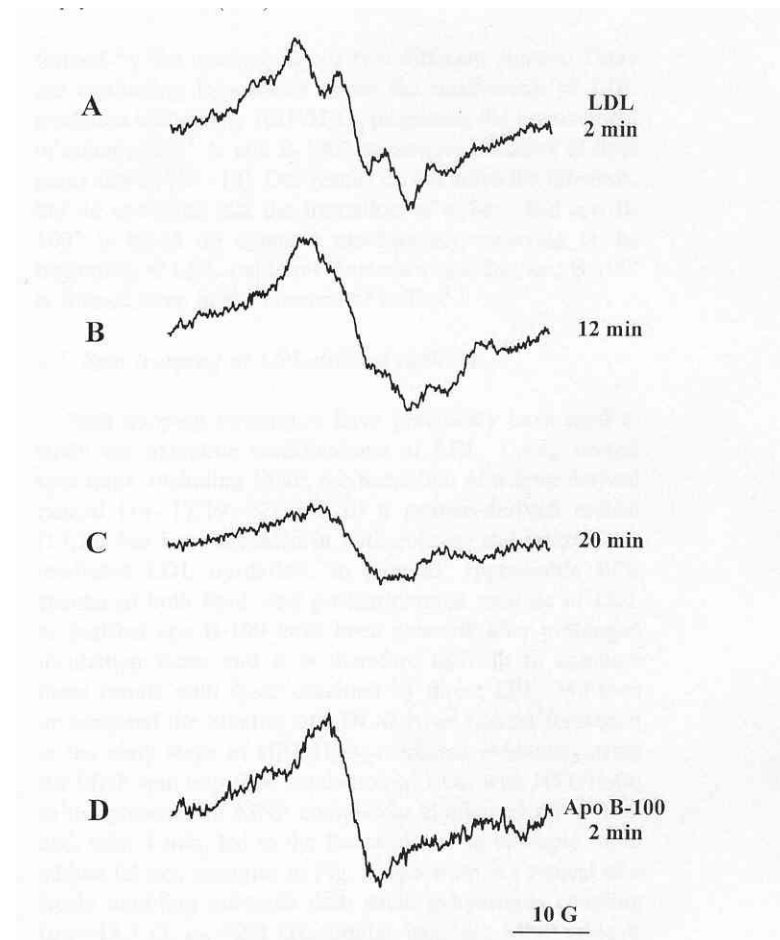


Fig. 1. EPR spectra at 37 °C of LDL and purified apo B-100 treated with HRP/H₂O₂. (A) Spectrum of LDL (1.5 mg/ml) recorded after 2 min of incubation with HRP (10 μM) and H₂O₂ (2.5 mM) in phosphate-buffered saline, DTPA (0.1 mM), pH 7.4; (B) sample (A) after 12 min of incubation, and (C) sample (A) after 20 min of incubation. (D) Spectrum of apo B-100 (4 mg/ml) recorded after 2 min of incubation with HRP (10 μM) and H₂O₂ (2.5 mM), in 10 mM Tris–HCl and 10 mM sodium deoxycholate, DTPA (0.1 mM), pH 9.0. Spectrometer conditions were as follows: modulation amplitude, 5 G; time constant, 82 ms; sweep time, 21 s; number of scans, 20.