

# C9320 Metody biochemického výzkumu

## Nukleární Magnetická Rezonance

### Organizace cvičení

Sraz 8:00 v koridoru před budovou A4.

Teoretická příprava v NMR seminární místnosti

Praktické cvičení u spektrometru (pracovní plášť není potřeba).

### vyučující:

Pavel Srb

Biomolekulární NMR spektroskopie  
budova A4, dveře 2.26

tel. +420 54949 2674  
email: [srb@ncbr.muni.cz](mailto:srb@ncbr.muni.cz)

### Pracovní úkol

1. Stanovení hmotnostní koncentrace alkoholů ve vzorku
2. Semikvantativní analýza 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  spektra proteinu
3. Určení oligomerního stavu proteinu z relaxace jader  $^{15}\text{N}$

## 1 Teoretický úvod

Pomocí jaderné magnetické rezonance – NMR<sup>1</sup> – pozorujeme *magnetické momenty jader atomů*, které souvisí s jejich celkovým momentem hybnosti nazývaným *jaderný spin*. Zatímco spinová kvantová čísla jednotlivých protonů a neutronů jsou právě rovna jedné polovině, jádra mohou být složena z několika takových částic: skládání spinů všech nukleonů a jejich orbitálních momentů se projeví jako celkový spin jádra s kvantovým číslem  $l$ , které nabývá nezáporných celočíselných násobků jedné poloviny. V organických látkách se nejčastěji měří takové izotopy, jež mají jednopoložinový spin: sem patří zejména vodík  $^1\text{H}$ , uhlík  $^{13}\text{C}$ , dusík  $^{15}\text{N}$  či fosfor  $^{31}\text{P}$ .

Průmět vektoru spinu  $\mathbf{I}$  do zvolené osy nemůže nabývat libovolných hodnot: pro částici s celkovým spinovým kvantovým číslem  $l$  – čili  $I^2 = \hbar^2 l(l+1)$  – je povoleno pouze  $2l+1$  různých projekcí, potažmo magnetických kvantových čísel

$$m = -l, -l+1, \dots, l-1, l. \quad (1)$$

$$\text{Pro } l = \frac{1}{2} \text{ máme tedy: } m = -\frac{1}{2}, \frac{1}{2}$$

Všechny tyto směry vektoru spinu jsou za nepřítomnosti elektromagnetického pole rovnocenné a odpovídají stejné energetické hladině. Vložíme-li však takovou částici do magnetického pole, odstraníme degeneraci stavů příslušících různým číslům  $m$  a jejich energie se rozštěpí na  $2l+1$  úrovní. NMR se zabývá přechody mezi těmito stavy atomových jader, které doprovází absorpce či vyzáření fotonu v radiofrekvenčním pásmu.

### 1.1 Pozorování různých jader: rezonanční frekvence

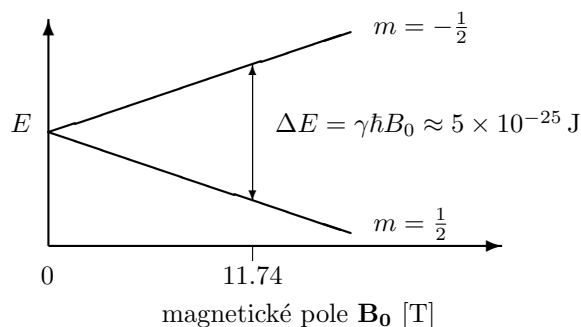
Rozdíl mezi těmito energiemi pro dvě sousední čísla  $m$  (která se liší o 1) činí (viz. 1)

$$\Delta E = \hbar\gamma B. \quad (2)$$

Frekvence fotonu, který může vyvolat přechod mezi sousedními energetickými hladinami jádra, neboli *rezonanční frekvence* je proto

$$\nu = \frac{\gamma B}{2\pi}. \quad (3)$$

<sup>1</sup>zkratka anglického spojení *nuclear magnetic resonance*



Obrázek 1: Zeemanovo štěpení hladin pro spinové číslo  $m = \frac{1}{2}$

Jádro	Spin $I$	$\gamma/2\pi$ [ $10^7 \text{ T}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	$\nu$ [MHz]	Přirozený výskyt izotopu [%]
$^1\text{H}$	1/2	26,75	500,0	99,985
$^2\text{H}$	1	4,11	76,8	0,015
$^{13}\text{C}$	1/2	6,73	125,8	1,108
$^{14}\text{N}$	1	1,93	36,1	99,63
$^{15}\text{N}$	1/2	-2,71	50,6	0,37
$^{31}\text{P}$	1/2	10,84	202,6	100,0

Tabulka 1: Spiny a gyromagnetické poměry vybraných izotopů a příslušné rezonanční frekvence v magnetickém poli 11,7 T

Součinitel této úměrnosti  $\gamma$  se nazývá *gyromagnetický poměr* a liší se pro různá jádra; jeho velikosti pro NMR aktivní jádra významná v biochemickém výzkumu jsou uvedena v tabulce 1.

Z uvedeného je zřejmé, že pomocí NMR je možné pozorovat různá jádra ve zkoumané molekule. Technicky je třeba pouze zajistit aby excitace i detekce NMR signálu byla prováděna na příslušné frekvenci (viz. čtvrtý sloupec Tabulky 1)

## 1.2 Popis jednoduchého experimentu NMR. Signál volné precese

Při popisu NMR experimentu je klíčové zavést makroskopickou magnetizaci  $\mathbf{M}$  jako vektorovou sumu všech jaderných magnetických momentů obsažených ve vzorku (typicky 500  $\mu\text{l}$  kapaliny). Magnetizace je v *nulovém* vnějším magnetickém poli *nulová*. Po vložení vzorku do magnetického pole dojde k ustanovení rovnovážného stavu, který je tvořen mírnou převahou magnetických momentů s magnetickým spinovým číslem  $m = \frac{1}{2}$  (nižší energetická hladina) nad spiny s  $m = -\frac{1}{2}$  (vyšší energetická hladina). Rozdíl v populacích těchto dvou hladin odpovídá Boltzmannovu rozdělení  $N_{-\frac{1}{2}}/N_{\frac{1}{2}} = \exp\left(-\frac{\Delta E}{k_B T}\right) \approx 0.999914$  tj. na jeden milion spinů jich jen asi 86 přebývá navíc na nižší energetické hladině.

Máme tedy vzorek vložený do homogenního magnetického pole  $\mathbf{B}_0$  ve směru osy  $z$ . Aplikací dalšího radiofrekvenčního magnetického pole s indukcí  $\mathbf{B}_1$  rotující v rovině kolmé na osu  $z$  s kruhovou rychlostí  $\omega_1$  je možné měnit orientaci vektoru jaderné magnetizace vzorku. Magnetizace  $\mathbf{M}$  bude konat jednak precesi kolem směru  $\mathbf{B}_1$ , dvak precesi kolem osy  $z$  způsobenou odklonem magnetizace od rovnovážného směru.

Úhel sklopení magnetizace  $\mathbf{M}$  od osy  $z$  je přímo úměrný délce trvání pulsu  $\tau$  a na jeho amplitudě  $B_1$ :

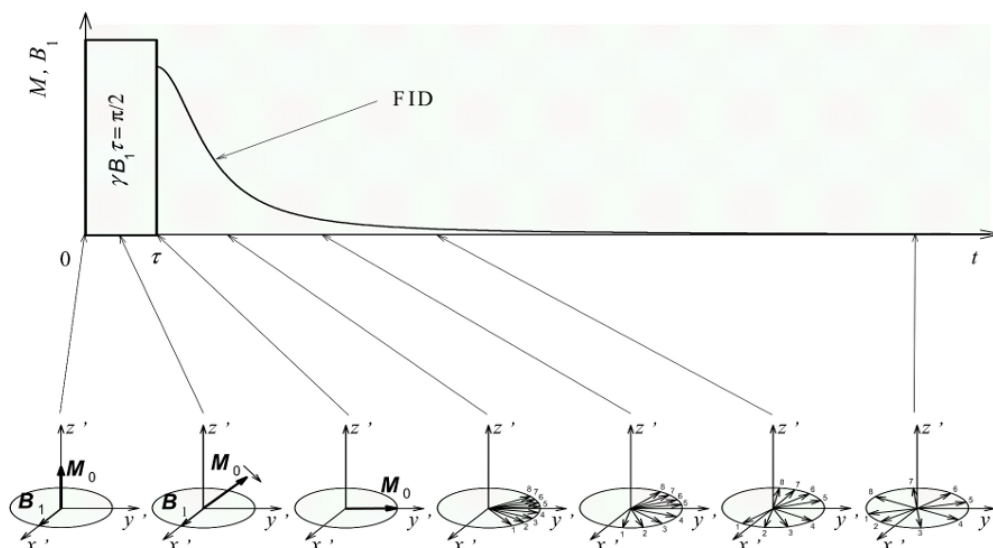
$$\alpha = \gamma B_1 \tau. \quad (4)$$

Volbou času  $\tau$  získáme pulsy, které stočí magnetizaci do roviny kolmé na osu  $z$  ( $\pi/2$ - nebo  $90^\circ$ -pulzy) či změni její orientaci "hlavou dolů" ( $\pi$ - nebo  $180^\circ$ -pulzy).

Základní měřicí technikou pulsní spektroskopie NMR je sledování *signálu volné precese*<sup>2</sup>. Jedním  $90^\circ$ -pulsím je magnetizace sklopena do roviny  $xy$  kde následně preceduje kolem směru pole  $\mathbf{B}_0$  (ležícího v ose  $z$ ). Precesním pohybem magnetických momentů se na detekční cívice indukuje napětí, které představuje již zmiňovaný *signál volné precese* (viz. Obr. 2).

Ze zaznamenaného průběhu napětí, tedy časové nahrávky souboru frekvencí, na kterých pozorovaná jádra precedují, lze poté pomocí *Fourierovy transformace* získat spektrum těchto frekvencí. Spektrum nese kvantitativní informaci o tom kolik spinů (které ve vektorové sumě tvoří magnetizaci  $\mathbf{M}$ ) na dané frekvenci preceduje. Analýzou informací obsažených ve spektru se zabývá oddíl 1.4.

<sup>2</sup>free induction decay, bývá označován zkratkou FID



Obrázek 2: Schéma jednoimpulsového experimentu NMR

### 1.3 Návrat k tepelné rovnováze: Relaxace

Pro další pochopení mechanismů vedoucích k obnovení tepelné rovnováhy je užitečné zavést podélnou  $M_{\parallel}$  a příčnou  $M_{\perp}$  magnetizaci. Složky magnetizace mají následující vlastnosti:

- $M_{\parallel}$  odpovídá magnetizaci ve směru magnetického pole  $\mathbf{B}_0$ , tedy v ose  $z$
- $M_{\perp}$  odpovídá magnetizaci v rovině kolmé na směr magnetického pole  $\mathbf{B}_0$  (rovina  $xy$ )
- v tepelné rovnováze je  $M_{\parallel}$  maximální,  $M_{\perp}$  je nulová
- experimentálně pozorujeme pouze  $M_{\perp}$

Vraťme se k obrázku 2. Pozorovaný pokles intenzity signálu souvisí s tím, že příčná magnetizace  $M_{\perp}$ , která byla maximální po skončení pulsu, nabude své rovnovážné (tj. nulové) hodnoty. Tento relaxační proces je možné charakterizovat časovou konstantou  $T_2$ , tzv. příčnou relaxační dobou.

Důležité je, že zatímco  $M_{\perp}$  už nabyla své rovnovážné hodnoty,  $M_{\parallel}$  zatím nikoliv. Proces relaxace  $M_{\parallel}$  do tepelné rovnováhy je obecně pomalejší a je charakterizován časovou konstantou  $T_1$ , tzv. podélnou relaxační dobou. V praxi často užíváme převrácené hodnoty relaxačních dob – relaxační rychlosti ( $R_i = T_i^{-1}$ , kde  $i \in \{1, 2\}$ ).

Informace o procesech vedoucích k obnovení tepelné rovnováhy ve spinovém systému mají pro NMR přinejmenším dvojnásobný význam. Kvalitativní znalost rychlostí těchto procesů pro danou studovanou molekulu (popř. směs molekul) je nutná pro správné technické provedení příslušných experimentů. Pečlivé *kvantitativní* studium relaxace daného jádra (souboru jader daného typu – např. uhlíku  $^{13}\text{C}$  ve skupině  $\text{CH}_3$ , nebo dusíku  $^{15}\text{N}$  ve skupině  $-\text{NH}-$ ) pak poskytuje informaci o *rotačním* pohybu molekuly jako celku (tzv. globální reorientace molekuly). V biochemii je významnou aplikací studium relaxace jader  $^{15}\text{N}$  v páteři proteinové molekuly, které kromě globální reorientace poskytuje informaci o lokální pohyblivosti, kterážto je často důležitá pro pochopení funkce příslušného proteinu.

## 1.4 Interpretace NMR spektra

### 1.4.1 Chemický posuv

Spektroskopie NMR využívá skutečnosti, že rezonanční frekvence je citlivá na velikost magnetického pole *v místě jádra*. Ta je totiž ovlivněna jeho blízkým okolím, elektrony v molekulách přispívají k hodnotě magnetické indukce na jádře, mohou tedy zvyšovat či snižovat její velikost oproti vnějšímu magnetickému poli  $B_0$ . I jádra stejných izotopů na různých pozicích v molekule tak často rezonují na frekvencích, které se od sebe mírně liší (typicky o *stovky až tisíce* Hz).

Tento jev se nazývá *chemický posuv*. Z praktických důvodů se u spekter na vodorovné ose vynášší tento frekvenční rozdíl v relativních jednotkách ppm<sup>3</sup>.

$$\delta \equiv \frac{\nu - \nu_0}{\nu_0}, \quad (5)$$

Frekvence  $\nu_0$  přísluší rezonanci standardu, kterým pro vzorky rozpustné ve vodě obvykle bývá DSS – 3-(Trimethylsilyl)propan-1-sulfonová kyselina. Frekvenční osa se z historických důvodů zpravidla zobrazuje tak, že posuv  $\delta$  roste zprava doleva.

Chemické posuny ve spektrech <sup>1</sup>H (mluvíme také o protonových spektrech) v kapalinách leží přibližně v rozmezí 0 – 15 ppm. Signály jednotlivých zbytků (CH<sub>3</sub>-, -CH<sub>2</sub>-, -OH, -NH-) se vyskytují v typických rozmezích, což analýzu spekter usnadňuje.

K rozlišení signálů dvou nebo několika jader s velice podobným chemickým posuvem je třeba dbát na to, aby pole **B**<sub>0</sub> v prostoru vzorku dosahovalo co nejlepší homogenity a časové stability; současné spektrometry umožňují relativní přesnosti řádu min. 10<sup>-9</sup>.<sup>4</sup>

#### 1.4.2 Původ štěpení signálů: Skalární interakce

Na spiny jader nepůsobí jen vnější magnetické pole **B**<sub>0</sub> a pole indukované elektrony v obalech (způsobující chemický posuv), nýbrž také magnetické pole vytvořené jinými jádry v okolí. Toto pole je *nezávislé na vnějším poli B*<sub>0</sub> a jeho velikost se proto udává přímo v jednotkách frekvence (Hz).

Přímé působení jaderných dipólových momentů přes prostor je velice silnou interakcí, která se ve spektrech kapalných vzorků přímo neprojevuje, protože její vliv je vystředován k nule díky rychlé reorientaci molekul v roztoku. Tato interakce však i v kapalinách poskytuje silný tzv. *relaxační mechanismus* umožňující návrat excitovaného systému k termodynamické rovnováze.

Nepřímo spolu jaderné spiny mohou interagovat skrze vazebné elektrony. Interakci lze tedy pozorovat pouze mezi jádry spojenými chemickými vazbami. Tato tzv. skalární nebo J-interakce se s rostoucím počtem vazeb mezi jádry zeslabuje a obvykle ji nepozorujeme přes více než 3 vazby.

Evidentním projevem J-interakce ve spektru je štěpení spektrálních čar: každé jádro se spinem 1/2 v dosahu J-interakce zapříčiní rozdělení na dvě čáry (dublet). Konkrétněji, pokud se v *sousedství* skupiny CH<sub>3</sub> nachází např. skupina CH<sub>2</sub> pak signál methylové skupiny bude štěpen na *triplet*. Vysvětlení je následující: methyl "vidí" všechny možnosti stavů spinů ve skupině svého souseda – tedy skupiny CH<sub>2</sub>, viz Tabulka 2. Počet možností odpovídá poměru intenzit

počet možností	uspořádání spinů
1	↑ ↑
2	↓ ↑
1	↓ ↓

Tabulka 2: Štěpení signálu skupiny CH<sub>3</sub> v sousedství skupiny CH<sub>2</sub>

jednotlivých signálů v multipletu. Obdobnou analýzou je možné dospět k závěru, že signál skupiny CH<sub>2</sub> v sousedství skupiny CH<sub>3</sub> (bez dalších interakcí) bude kvartet s intenzitami v poměru 1:3:3:1.

<sup>3</sup>z anglického *parts per million*, tedy 10<sup>-6</sup>

<sup>4</sup>tj. při nosné frekvencích ve stovkách MHz bychom měli být schopni rozlišit rozdíl ≤ 1 Hz

## 2 Návod k pracovním úkolům

### 2.1 Stanovení objemové koncentrace alkoholů ve vzorku

Analýzou počtu, štěpení a plochy signálů přítomných v 1D  $^1\text{H}$  spektru vzorku alkoholu určete počet a molární koncentraci jednotlivých druhů alkoholů přítomných ve zkoumaném vzorku.

Získané číselné hodnoty molárních koncentrací přepočtete na koncentrace hmotnostní. Diskutujte zdravotní (ne)závadnost zkoumaného vzorku.

#### 2.1.1 Postup

1. importujte textový soubor s  $^1\text{H}$  NMR spektrem do tabulkového editoru.
2. nakreslete graf sloupce *intensity*. Jako typ grafu zvolte *XY bodový s rovnými spojnicemi* (tedy bez jednotlivých bodů)
3. ve spektru nalezněte oblasti signálů příslušných skupin a tyto signály zintegrujte (tj. pomocí funkce *suma* spočtete součty příslušných buněk)
4. při analýze integrálních intenzit nezapomeňte, že poměry intenzit *ze stejné molekuly* musí odpovídat počtu jader  $^1\text{H}$  v jednotlivých skupinách, tedy: je-li integrální intenzita EtOH ( $\text{CH}_3$ ) = 3, pak pro EtOH ( $\text{CH}_2$ ) musí být 2, jelikož skupiny příslušné obsahují 3 resp. 2 jádra  $^1\text{H}$ .
5. údaje o skupině EtOH ( $\text{CH}_2$ ) už pak dále nepotřebujeme, protože oba tyto signály pocházejí ze stejné molekuly ethanolu a jejich OH skupina je tudíž společná.
6. doplňte Tabulku 3.
7. dále spočtete příspěvky jednotlivých molekul od integrální intenzity skupiny OH. Uvažte vzájemný poměr intenzit skupin obsahujících stejně vodíkových atomů (EtOH ( $\text{CH}_3$ ) a MeOH ( $\text{CH}_3$ )) a také fakt, že molekula vody obsahuje dvě skupiny OH.
8. doplňte Tabulku 4.

skupina	hrubá int. intenzita	normalizovaná int. intenzita
EtOH ( $\text{CH}_3$ )		3
MeOH ( $\text{CH}_3$ )		
EtOH ( $\text{CH}_2$ )		
OH		
celkem		

Tabulka 3: Zjištění integrálních intenzit signálů z  $^1\text{H}$  NMR spektra vzorku slivovice. Do druhého sloupce tabulky vepište hodnoty zjištěné sumací příslušných buněk. Do třetího sloupce přepočítejte intenzity tak, aby intenzita  $\text{CH}_3$  skupiny ethanolu byla rovna 3 (předvyplněná hodnota).

molekula	příspěvek do intenzity skupiny OH	molární c [%]	hmotnostní c [%]
EtOH ( $\text{CH}_3$ )	1		
MeOH ( $\text{CH}_3$ )			
$\text{H}_2\text{O}$			
celkem			

Tabulka 4: Výpočet koncentrací ethanolu a methanolu ve vzorku slivovice. V této normalizaci pak odpovídá příspěvek ethanolu k intenzitě signálu OH roven 1 (předvyplněná hodnota).

## 2.2 Semikvantitativní analýza 2D $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ spektra proteinu

V dvoudimenzionálním  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  korelovaném spektru molekuly proteinu pozorujeme signály takových jader vodíku  $^1\text{H}$ , která mají za nejbližšího souseda jádro  $^{15}\text{N}$ . Takovéto spinové systémy se v uniformě  $^{15}\text{N}$  značených proteinech vyskytují zejména v páteři molekuly a dále pak v postranních řetězcích některých aminokyselin (tryptophan, asparagin, glutamin, arginin).

Využijte následujících empirických pozorování k tomu abyste k zadanému 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  korelovanému spektru přiřadili tu nejpravděpodobnější ze zadaných primárních sekvencí peptidu:

1. signály NH skupiny postranního řetězce tryptophanu mají zvláště vysoký chemický posun v obou spektrálních dimenzích
2. signály  $\text{NH}_2$  skupin asparaginu a glutaminu se vyskytují v pravé horní části spektra a jsou zdvojené (pozorujeme dvojici signálů se stejným chemickým posuvem v  $^{15}\text{N}$  dimenzi). Každá dvojice odpovídá jedné skupině  $\text{NH}_2$ .
3. jako pomocné kritérium lze použít signály jader  $^{15}\text{N}$  glycinu, které se často vyskytují v horní části spektra (malý chemický posun v  $^{15}\text{N}$  dimenzi).

## 2.3 Určení oligomerního stavu proteinu z relaxace jader $^{15}\text{N}$

Proložením zadaných experimentálních dat exponenciální závislostí

$$I(t) = A \exp(-R_i t), \quad (6)$$

kde  $i \in \{1, 2\}$  a  $A$  je amplituda signálu, určete relaxační rychlosti  $R_1$  a  $R_2$ . Využitím vztahu

$$\tau_C^{\text{experiment}} \approx \frac{1}{4\pi\nu_N} \sqrt{6 \frac{R_2}{R_1} - 7}, \quad (7)$$

kde  $\nu_N$  je rezonanční frekvence jader  $^{15}\text{N}$  v Hz (v magnetickém poli o intenzitě 11.74 T je  $\nu_N$  rovno 50.7 MHz), určete odhad globálního korelačního času  $\tau_C^{\text{experiment}}$ , který popisuje isotropní globální reorientaci molekuly. Ze zadané molekulové hmotnosti a využitím

$$\tau_C^{\text{monomer}}(\text{ns}) \approx 0.6 M_W(\text{kDa}) \quad (8)$$

získejte odhad globálního korelačního času odpovídajícího monomerní jednotce proteinu. Vztah 8 poskytuje hodnotu  $\tau_C$  přímo v nanosekundách (ns). Diskutujte oligomerní stav molekuly ve světle získaných odhadů globálních korelačních časů  $\tau_C^{\text{experiment}}$  a  $\tau_C^{\text{monomer}}$ .

## 3 Odkazy

1. <http://www.protein-nmr.org.uk/solution-nmr/spectrum-descriptions/1h-15n-hsqc/>
2. <http://technology.sbkb.org/portal/page/199/>
3. [http://www.nmr2.buffalo.edu/nesg.wiki/NMR\\_determined\\_Rotational\\_correlation\\_time](http://www.nmr2.buffalo.edu/nesg.wiki/NMR_determined_Rotational_correlation_time)

# A Dodatek k řešení úloh

## A.1 Gnuplot

### A.1.1 Základní informace

Instalační balíky pro windows i linux, stejně jako manuál a příklady použití jsou k nalezení na adrese [gnuplot.info](http://gnuplot.info).

### A.1.2 Práce s GNUplotem

Doporučeným způsobem použití GNUplotu je tzv. dávkový mód, kdy v nějakém oblíbeném textovém editoru vytvoříme skript s příkazy, které chceme provést, a tento pak zavoláme buď z GNUplotu příkazem `load "název souboru"`, nebo z příkazové řádky pomocí `gnuplot název_souboru`. V interaktivním režimu naopak můžeme spouštět příkazy rovnou.

### A.1.3 Nejdůležitější příkazy:

- `plot`  
`plot sin(x)`  
`plot "data.dat" using 1:3 with lines lw 2 title "brand new curve"`
- `set` se používá k nastavení všemožných vlastností objektů např.:  
`set out "vystup.ps"`  
`set xlabel "delka [m]"`
- `help` se hodí velmi často, například `help set` prozradí jaké všechny parametry lze nastavit.
- `fit` provede proložení dat zadanou funkcí kterou je třeba předtím definovat, stejně jako počáteční hodnoty fitovaných parametrů  
`fit f(x) "soubor.dat" u 1:3 via par1,par2`

### A.1.4 Příklady skriptů

- vykreslení dat ze souboru s výstupem do souboru postscript (ps)  
`set terminal postscript eps color enhanced`  
`set output "vystupni_obrazek.ps"`  
`set xrange [zleva:doprava]`  
`set yrange [zdola:nahoru]`  
`set xtics 5 out`  
`set mxtics`  
`set grid`  
`set ylabel "popisek osy y"`  
`plot "soubor.sdaty" u 1:2 w l lw 2 lc rgb "red" title "navez krivky"`
- fit funkcí zadaného tvaru  
`set terminal postscript eps color enhanced`  
`set output "vystupni_obrazek.ps" f(x)= a*exp((x-b)**2/c)`  
`a=100; b=5; c=115;`  
`fit f(x) "data.dat" using 1:3 via a,b,c`  
`plot "data.dat" u 1:3 w points ps 5`  
`"a*exp((x-b)**2)/c" title "fit funkci f"`

### A.1.5 GNUplot skript k řešení úlohy 2.3

```
A=0.5;
R=0.001;
f(x)=A*exp(-x*R);
fit f(x) "datovy_soubor.DAT" u 1:2 every ::4 via A,R
plot "datovy_soubor.DAT" u 1:2 every ::4 , A*exp(-x*R)
```

Tento skript provede proložení dat ze souboru `datovy_soubor.DAT` monoexponenciálně klesající funkcí  $f(x)=A \cdot \exp(-x \cdot R)$ . Soubor se skriptem otevřete v editoru **Notepad** (nebo v nějakém podobném editoru ASCII souborů) a proved'te následující změny:

- nahraďte `datovy_soubor.DAT` v obou jeho výskytech ve skriptu aktuálním názvem souboru
- pro fitování relaxační rychlosti  $R_1$  zvolte první a druhý sloupec (u 1:2), pro  $R_2$  pak první a třetí (u 1:3)

Takto upravený skript zavolejte potom z příkazové řádky GNUplotu příkazem `load "jmeno_skriptu.pripona"`.

Pozor, nezapomeňte se přepnout do adresáře, ve kterém se nachází skript i datový soubor – ve Windows pomocí záložky **ChDir** ( Linuxu si spusťte GNUplot přímo z příslušného adresáře).

Po doběhnutí skriptu se v hlavním okně GNUplotu (popř. v souboru `fit.log`) lze dočíst nafitované hodnoty relaxační rychlosti  $R_{1,2}$ , které pak použijeme dále dle návodu k úloze 2.3.