

Введение в ЯМР

С.А.Спирин
2022

Два факта из квантовой механики

Факт 1. Электромагнитные волны испускаются и поглощаются только порциями (квантами), энергия которых связана с частотой волны соотношением:

$$E = h\nu$$

где $h = 6,626 \cdot 10^{-34}$ Дж·сек – постоянная Планка.

Два факта из квантовой механики

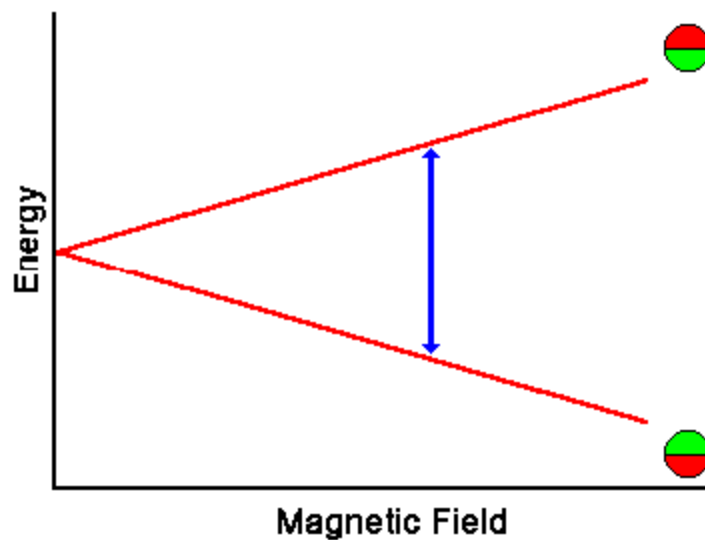
Факт 2. Некоторые частицы (в том числе протоны, электроны, ядра атомов большинства элементов) имеют собственный магнитный момент. Это значит, что энергия такой частицы зависит от напряжённости магнитного поля.

При этом проекция направления намагниченности на направление поля принимает не **непрерывный**, а **дискретный спектр значений**.

Например, проекция направления намагниченности **протона** на направление поля может принимать только **два** значения.

«Потому что спин протона равен $1/2$ »

Энергия протона в магнитном поле

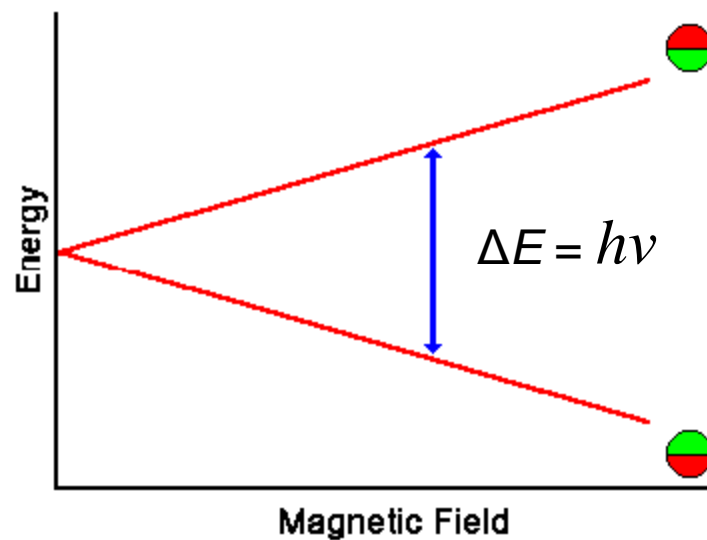


При любом направлении магнитного поля протон может иметь ровно два возможных значения энергии (соответствующие направлениям его «оси вращения» точно по полю или точно против поля).

Разница между энергиями линейно растёт с ростом величины поля.

NB: реально у протона нет никакой «оси», это не более чем метафора!

Энергия протона в магнитном поле



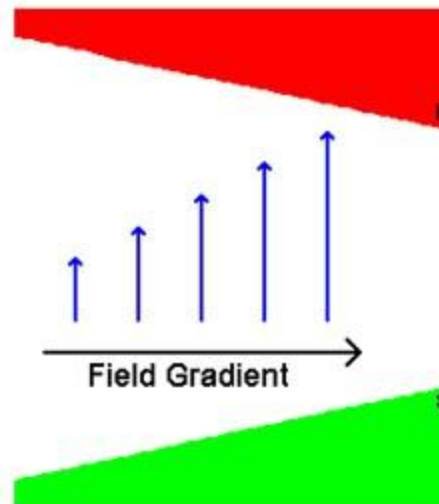
Определённой разнице между уровнями энергии соответствует совершенно определённая частота электромагнитного излучения, которое может излучать или поглощать протон.

Зависимость частоты излучения/поглощения от магнитного поля и называется **ядерный магнитный резонанс**.

ЯМР-томография

(переименована в МРТ – магнитно-резонансную томографию – после Чернобыльской аварии, поскольку больные стали бояться слова «ядерный»)

- образец, содержащий протоны, помещается в неоднородное магнитное поле
- э/м волны частоты ν поглощаются только теми протонами, у которых разница между уровнями энергии равна $h\nu$ («резонанс»)
- по величине поглощения на определённой частоте можно судить о числе протонов, находящихся в магнитном поле определённой силы
- зная распределение силы поля, можно получить информацию о плотности протонов в различных областях



ЯМР-спектроскопия

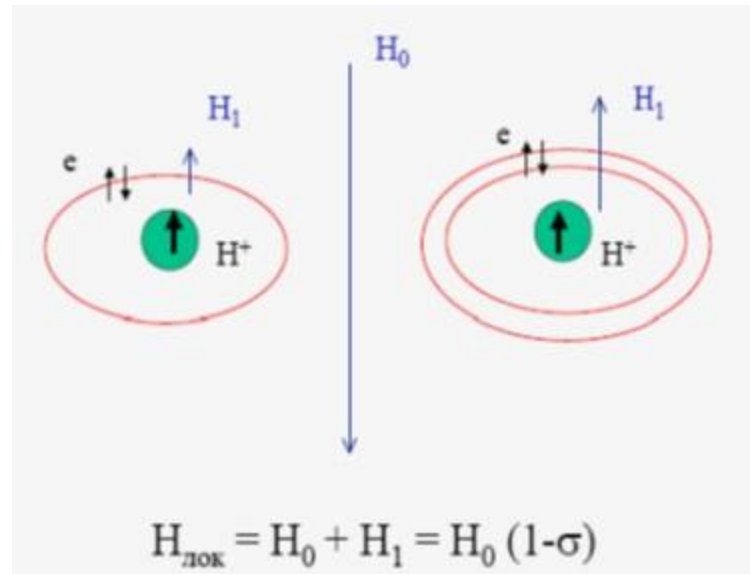
В ЯМР-спектроскопии биомолекул поступают наоборот: измеряют не поглощаемые, а испускаемые протонами при переходе с верхнего уровня на нижний электромагнитные волны.

Для этого образец помещают в магнитное поле и «накачивают» мощным электромагнитным импульсом, а затем определяют частотный спектр испускаемых волн.

В отличие от медицинской ЯМР-томографии, невозможно создать регулярно меняющееся в пределах молекулы поле.

Источник информации в ЯМР-спектроскопии – влияние электронных оболочек атомов на поле, в котором находятся ядра атомов водорода.

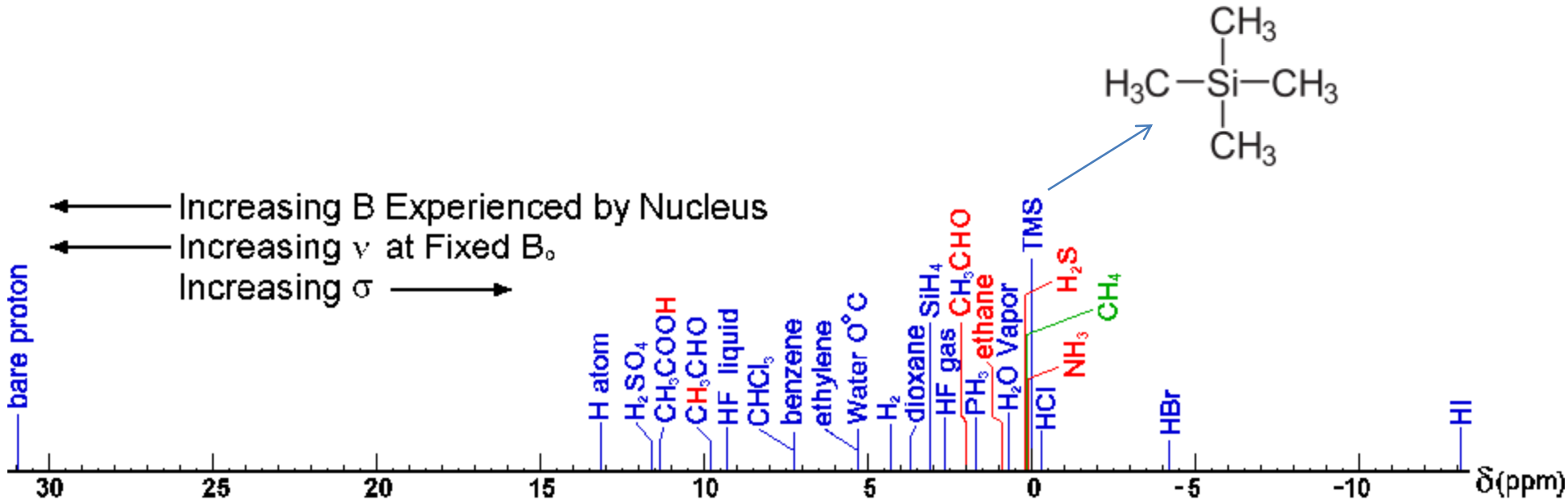
Химический сдвиг



Источник: <http://www.myshared.ru/slide/643097/>

На этой картинке чёрные буквы H обозначают протоны (ядра атома водорода), а синие – напряжённость магнитного поля!

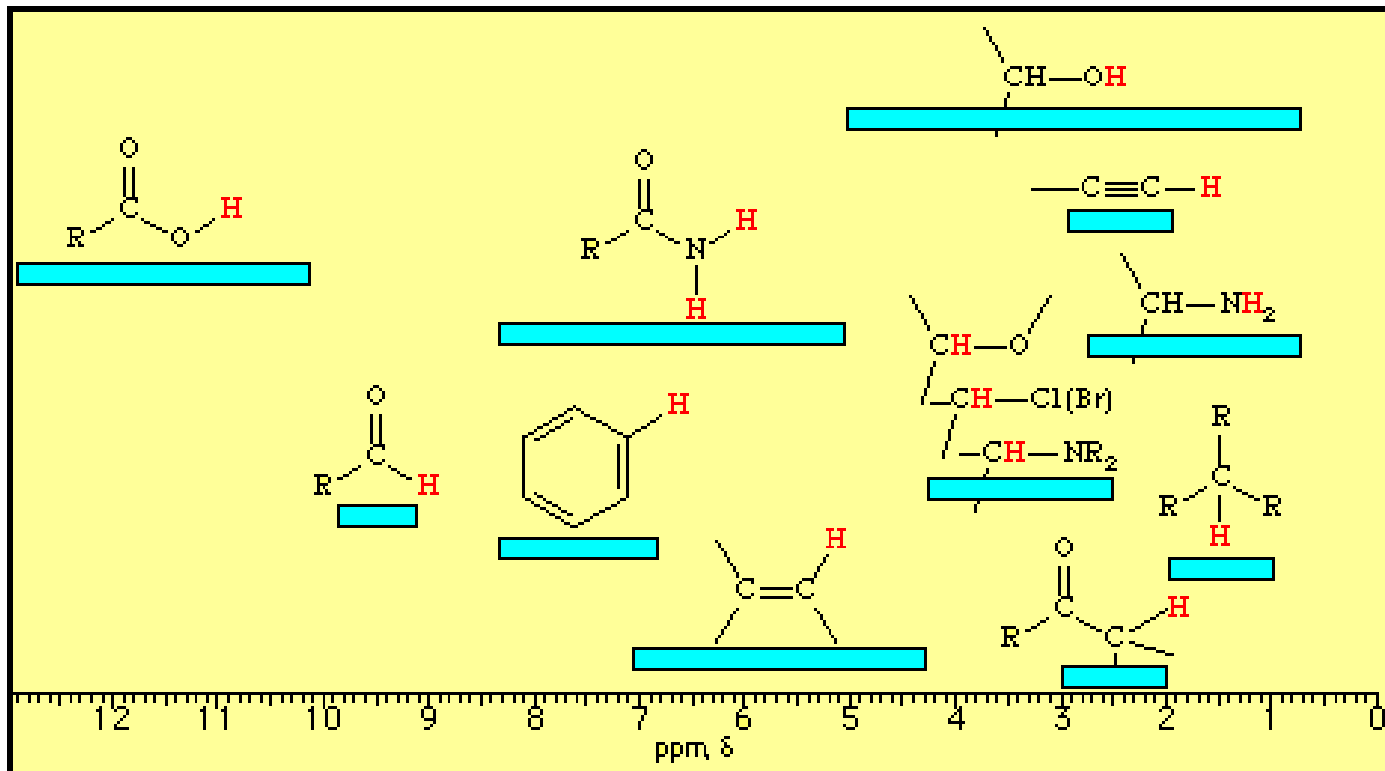
Химический сдвиг



$$\delta = (\nu - \nu_{\text{REF}}) \times 10^6 / \nu_{\text{REF}}$$

Протон в разном химическом окружении будет испытывать разное поле B при приложении одинакового внешнего поля B_0 . Это явление вызвано экранировкой поля электронами. Относительное отклонение резонансной частоты в данном химическом окружении называется химическим сдвигом и измеряется в миллионных долях (ppm). За нулевую отметку принята резонансная частота протонов в составе «референсного соединения» – тетраметилсилана (TMS). Химический сдвиг измеряется в пропромилле (миллионных долях), ppm

Химические сдвиги для протона



Кроме химического окружения, δ зависит также от температуры, pH, концентрации, растворителя...

Химические сдвиги для углерода-13 и фосфора-31

Carbon-13* Environment	Chemical Shift Range (ppm)	Phosphorous-31 Environment	Chemical Shift Range (ppm)
(CH ₃) ₂ C*O	-12	PBr ₃	-228
CS ₂	0	(C ₂ H ₅ O) ₃ P	-137
CH ₃ C*OOH	16	PF ₃	-97
C ₆ H ₆	65	85% phosphoric acid	0
CHCl CHCl (cis)	71	PCl ₅	80
CH ₃ C*N	73	PH ₃	238
CCl ₄	97	P ₄	450
dioxane	126		
C*H ₃ CN	196		
CHI ₃	332		

Кроме протонов, для измерений ядерного магнитного резонанса пригодны другие ядра со спином ½ : ¹³C, ³¹P, ¹⁵N, ¹⁹F,...

Для исследования нуклеиновых кислот, помимо ядра водорода ¹H, удобен ³¹P, поскольку фосфора много в нуклеиновой кислоте и ³¹P – природный изотоп.

Для изучения белков можно искусственно обогатить их изотопами ¹⁵N и ¹³C, выращивая бактериипродуценты на среде, содержащей данные изотопы.

ЯМР-спектрометр





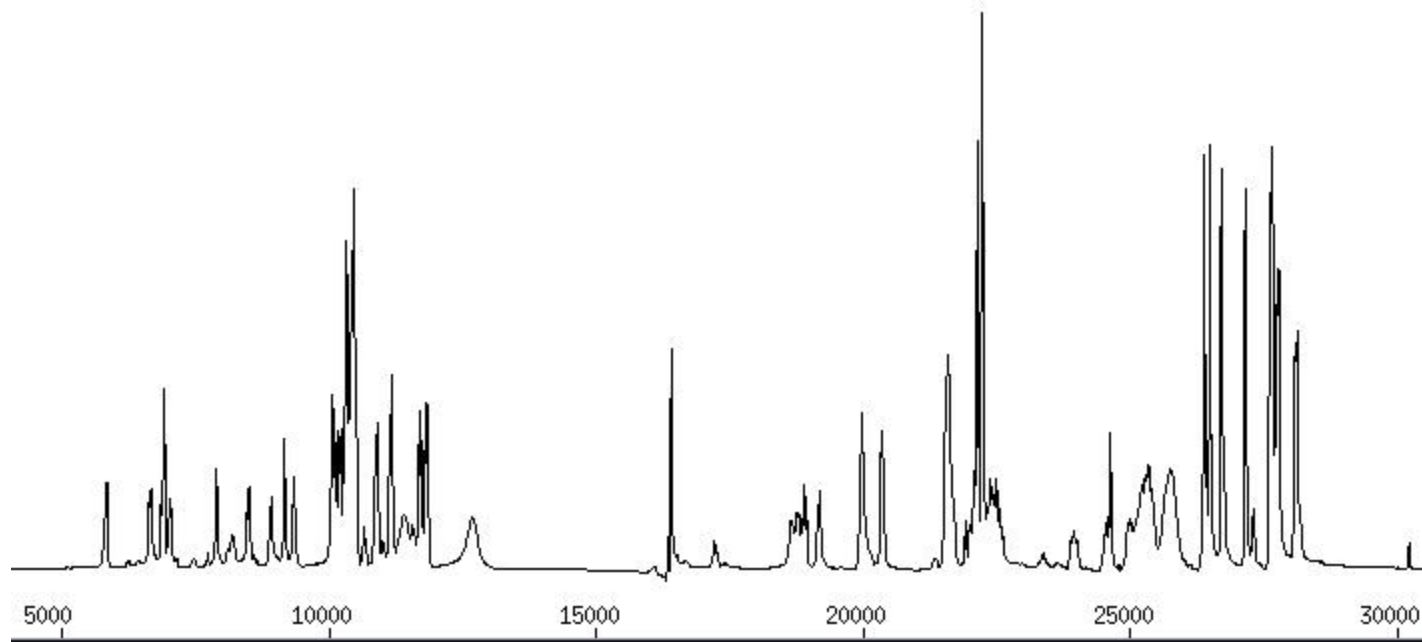
ЯМР-спектрометр – загрузка образца



Исследуемый образец

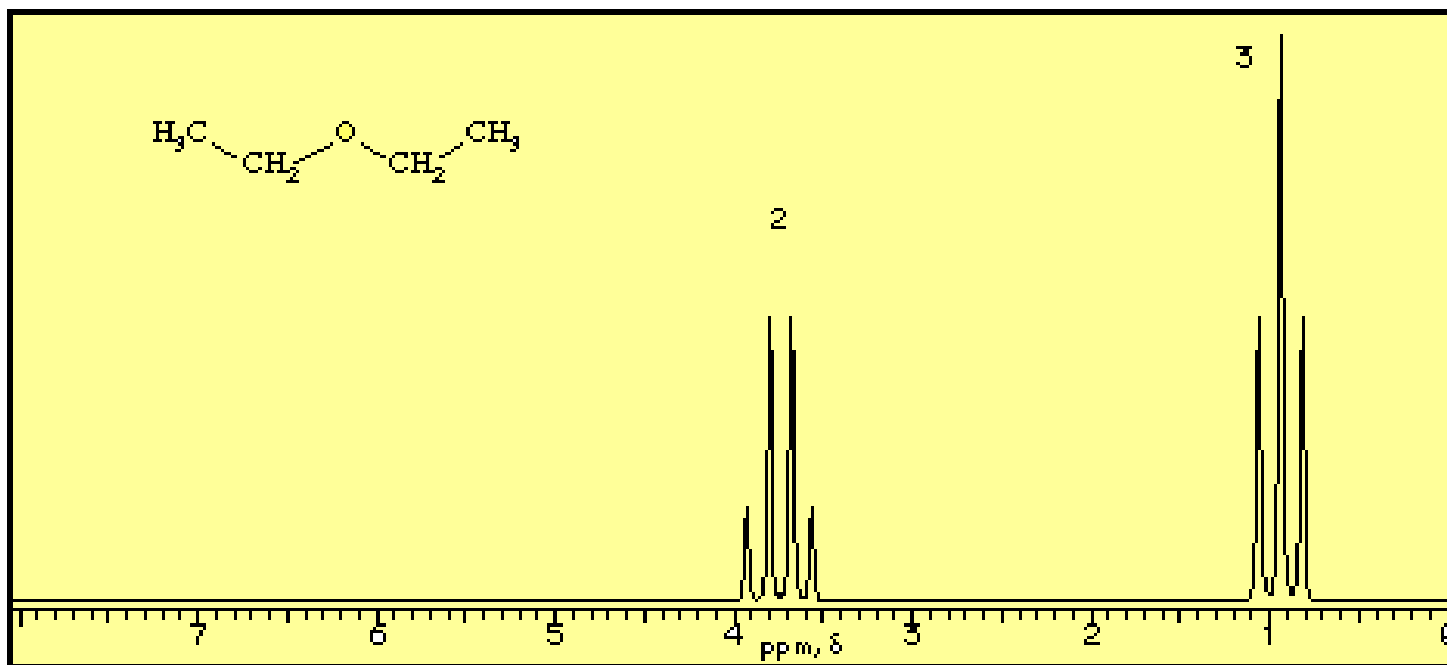
http://en.wikipedia.org/wiki/File:NMR_sample.JPG

ЯМР-спектр



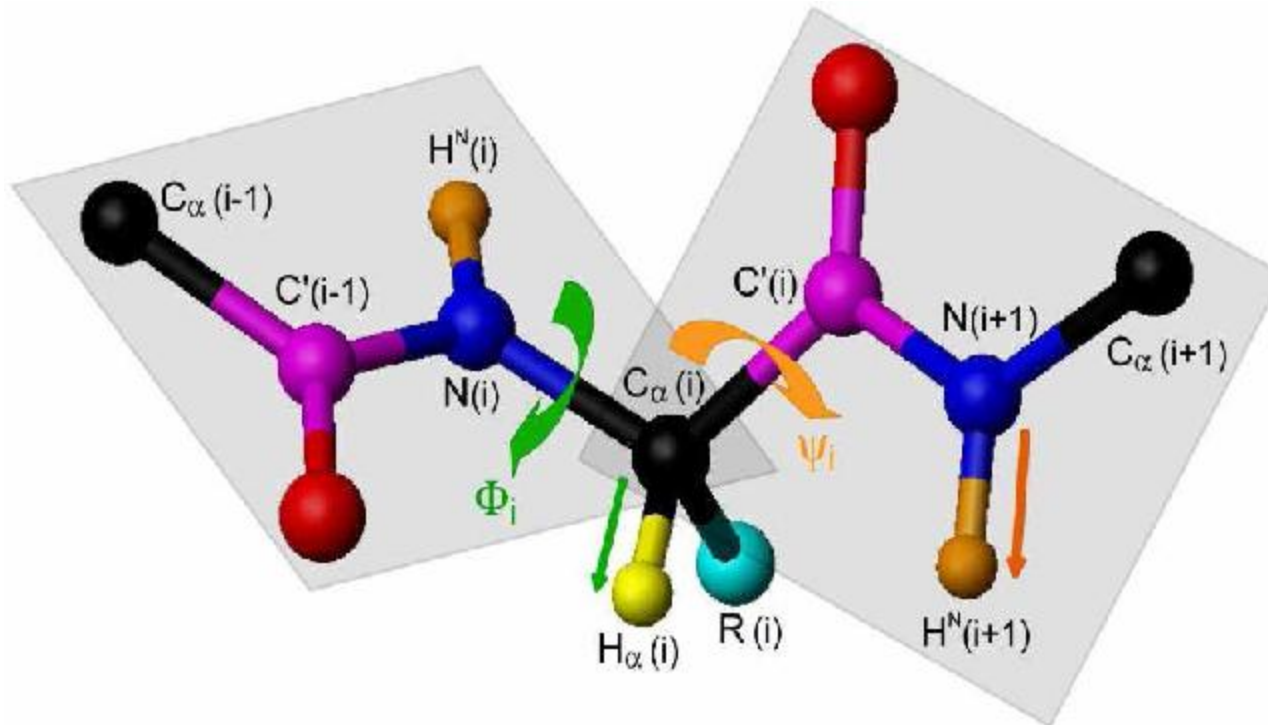
<http://tonga.usp.edu/gmoyna/biochem341/lecture16.html>

ЯМР-спектр протонов для диэтилового эфира



Расщепление пиков вызвано влиянием магнитного поля от соседних протонов (для пика 2 – от протонов CH_3 -группы, для пика 3 – от протонов CH_2 -группы). Такое «спин-спиновое» взаимодействие позволяет изучать конформацию молекул (чем ближе протоны соседней группы, тем сильнее расщепление). Смещение от влияния соседних пиков – абсолютное, а не относительное!

Измерение торсионного угла φ



- (1) Right-handed alpha helix, $\varphi = -57^\circ$, ${}^3J_{HNHA} = 3.9$ Hz
- (2) Right handed 3.10 helix, $\varphi = -60^\circ$, ${}^3J_{HNHA} = 4.2$ Hz
- (3) Antiparallel beta sheet, $\varphi = -139^\circ$, ${}^3J_{HNHA} = 8.9$ Hz
- (4) Parallel beta sheet, $\varphi = -119^\circ$, ${}^3J_{HNHA} = 9.7$ Hz
- (5) Left-handed alpha helix, $\varphi = 57^\circ$, ${}^3J_{HNHA} = 6.9$ Hz

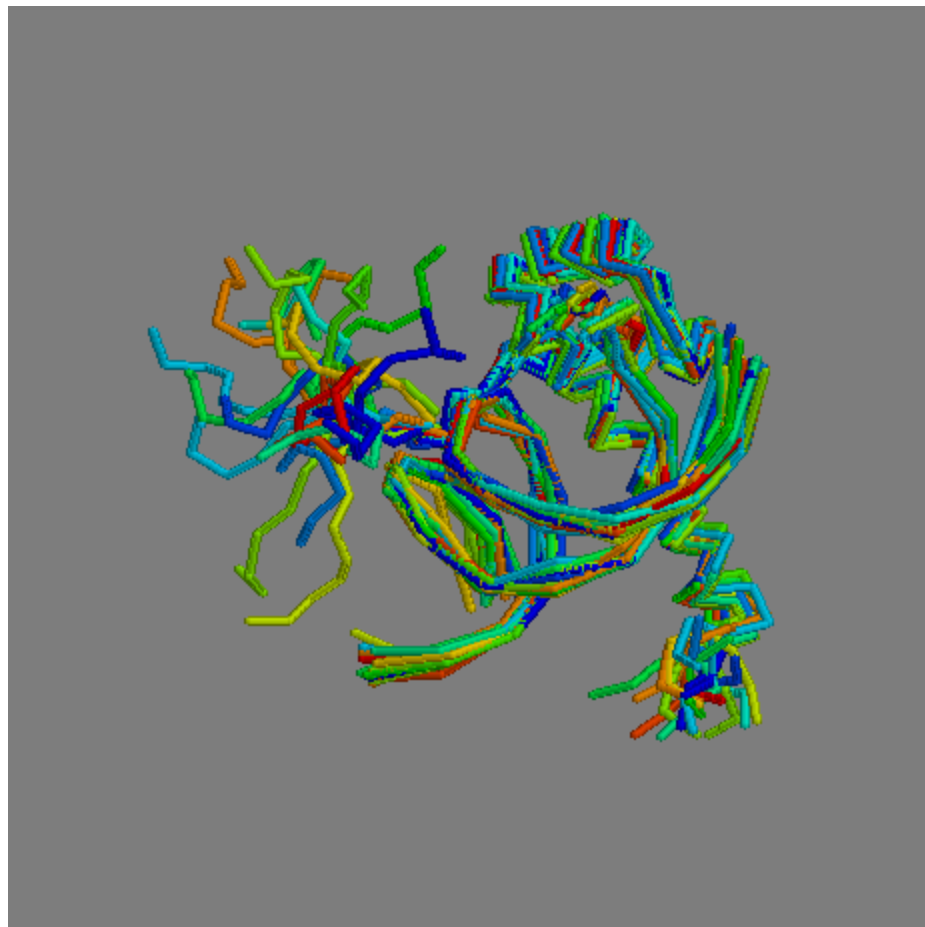
${}^3J_{HNHA}$ – это сдвиг частоты для водорода при остоном азоте, вызванный спин-спиновым взаимодействием с водородом при CA-атоме. Обратите внимание, что этот сдвиг, в отличие от химического, не зависит от внешнего поля и потому измеряется не в относительных единицах (ppm), а в абсолютных (Hz).

Двумерный ЯМР

Двумерный ЯМР – сложная технология, основанная на измерении передачи энергии с возбуждённых ядер на другие, находящиеся поблизости. Именно двумерный ЯМР позволяет расшифровывать структуру небольших белков и их комплексов с ДНК и лигандами.

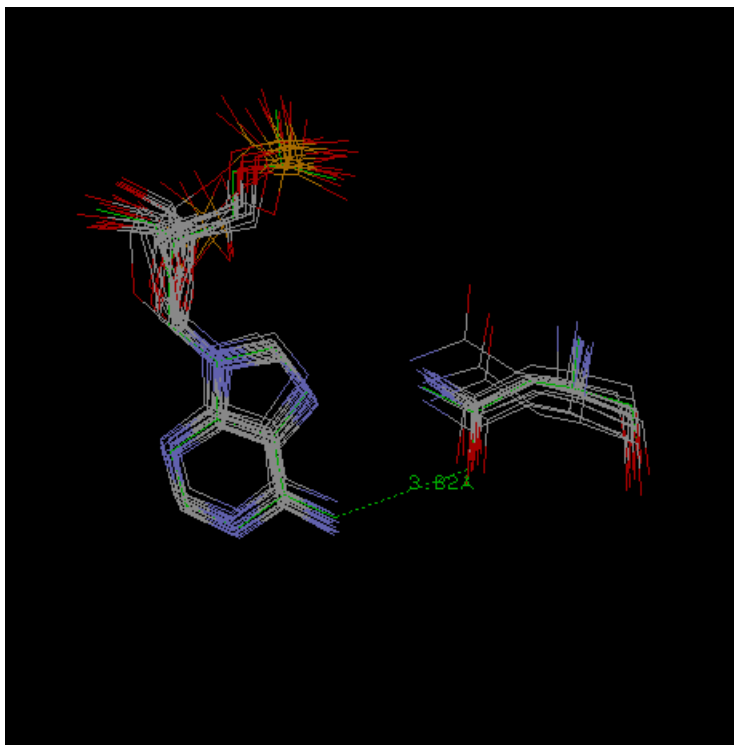
- Ядро может «перевернуть» свой спин, отдав энергию не обязательно в виде кванта э/м излучения, но и путём передачи её в соседние ядра (соседние по ковалентным связям или же соседние в пространстве), которые при этом оказываются в «верхнем» положении и могут излучать на «своей» частоте
- По спектру таких «вторично возбуждённых» ядер можно судить о соседстве разных химических групп
- В конечном итоге сигналы от всех ядер приписываются конкретным остаткам белка и лигандам, после чего вычисляются небольшие расстояния ($< 5 \text{ \AA}$) между ядрами
- Из этого набора данных восстанавливается укладка белка

Результат: множество моделей

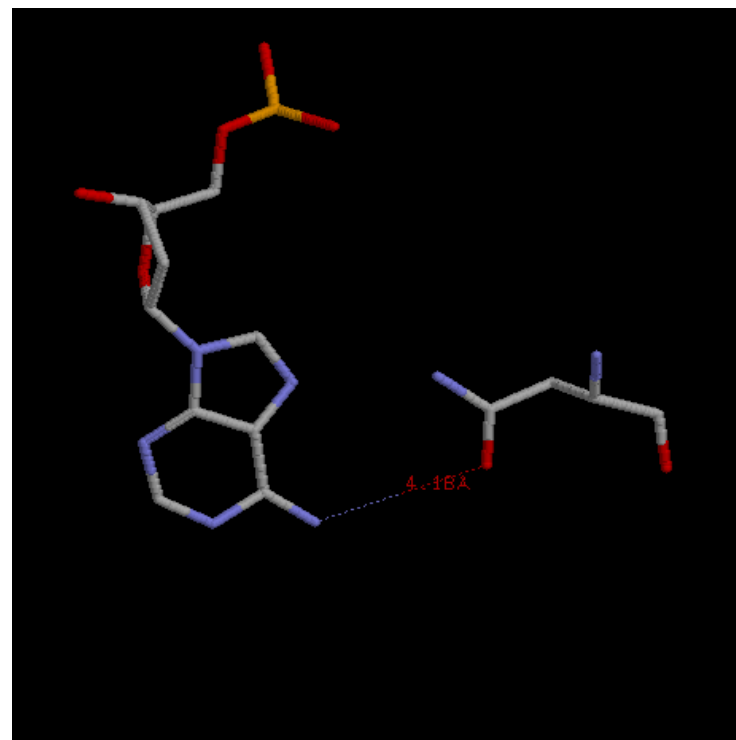


1NK2 (20 моделей)

Усреднённая модель



1NK2
(20 моделей)



1NK3
(усреднённая модель)

На картинке слева видно, что в 17 из 20 моделей детектируется водородная связь между кислородом OD1 аспарагина и азотом N6 аденина. В остальных моделях аспарагин повернут вбок и взаимодействует с растворителем. Справа – усреднённая модель, на которой положение аспарагина нереалистично: он повернут в сторону ДНК, не образуя при этом водородных связей. Это обычно для усреднённых моделей, они мало достоверны.

Сравнительная таблица

ЯМР	РСА
Структура молекул в растворе	Структура кристаллов
Небольшие молекулы (белки или домены до ~150 а.о., их комплексы с ДНК или РНК)	Как малые, так и довольно большие молекулы и комплексы (например, рибосома)
Много моделей	Одна модель (иногда с альтернативными конформациями)
Присутствуют координаты атомов водорода	Как правило, координаты атомов водорода отсутствуют (кроме случаев очень хорошего разрешения)