

Korszerű mérés technikák az NMR-ben

Batta Gyula, az MTA doktora

Debreceni Egyetem, OEC, Gyógyszerészi Kémia Tanszék

MTA Antibiotikum-kémiai Kutatócsoport

batta@tigris.unideb.hu

Bevezetés

A „korszerű”, nagyfelbontású, folyadékfázisú NMR ¹⁻² módszerek idestova negyven éve, 1966-ban kezdődtek, az impulzus Fourier módszer R. R. Ernst által történt bevezetésével. De nem is biztos, hogy ez volt a kezdet, hiszen a Hahn féle csodálatos spin-visszhang és más impulzus kísérletek már az ötvenes évektől kezdve felbukkantak. Miután a kémiai eltolódást és a skaláris spin-spin csatolást (Gutowski) felfedezték, az NMR kémiai alkalmazásai igen vonzóknak tündek. Azonban a széleskörű alkalmazásnak számos gyakorlati és elméleti problémája volt. A legnagyobb gond mindmáig az NMR viszonylagos érzéketlensége. Ennek az a magyarázata, hogy a magspinektől származó mágnesezettség viszonylag csekély pl. az elektron spinéhez képest. Ugyanis az erős, külső, állandó mágnesez tér hatására létrejövő kollektív magspin-rendezettség ellen munkáló hőmérséklet hatására a térrel paralel orientált mágnesez magok száma alig haladja meg az antiparalel helyzetűekét. Mivel az eredő mag-mágnesezettség ezzel a 10^{-6} nagyságrendű betöltöttség különbséggel arányos, nem meglepő, hogy a folyadékfázisú, szokásos hőmérsékletű mintáknál az érzékenység gyenge volt. A stabil, nagyterű, szupravezető mágnesez megjelenése az 1970-es években, majd a hűtött tekercsű mérőfejek bevezetése az ezredforduló környékén és az impulzus Fourier módszerben testet öltő paralel gerjesztés alkalmazása a szekvenciális (cw, folyamatos pásztázás) helyett, nagyságrendekkel javította az érzékenységet. A 70-es években csúcstechnológiának számító 80-100 MHz-es proton frekvenciájú spektrométerek mai testvérei már 7-900 MHz-en működnek. A nagyobb mágnesez tér nem csak nagyobb érzékenységet, de jóval kedvezőbb spektrális felbontást is ad, hiszen ugyanazon ppm értékű kémiai eltolódás tartomány csaknem tízszeres frekvencia ablakban jelentkezik. Szerencsés módon a szupravezető technikával paralel fejlődött a rádiófrekvenciás elektronika és a számítástechnika is. Úgy tündek, hogy az előbb felsorolt mérnöki tudományok és az NMR kísérleti és elméleti módszerfejlesztés kölcsönösen és gyümölcsözően befolyásolták egymást.

Mi áll az NMR módszerek permanens fejleszthetőségének háttérében a csúcstechnológiák beépítésén kívül? Hogyan lehetséges az, hogy a nyolcvanas évek legtöbbet idézett kémikusa egy NMR módszerfejlesztő, Ad Bax volt? Nem lehet véletlen, hogy az NMR felfedezéséért, kémiai alkalmazásáért majd a biomolekuláris kiterjesztésért eddig három alkalommal adtak Nobel díjat ! Nos, a titok nyitja abban áll, hogy az NMR spektroszkópia meglehetősen különbözik az elektromágnesez színképtartomány más sávjaiba eső, illetve a részecske spektroszkópiák világától. Az NMR Zeeman átmenetek frekvenciái ugyanis a mért magtól és az állandó mágnesez erősségétől függően a néhány MHz-

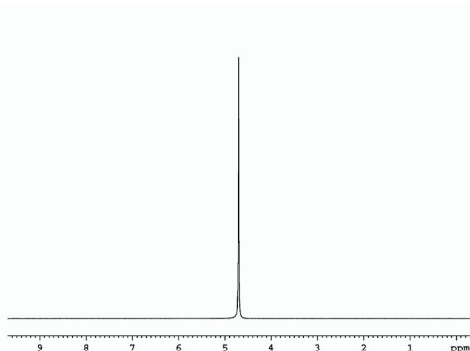
től a néhány 100 MHz-ig terjedő sávban található. Ebben a rádióhullám sávban a spontán emisszió valószínűsége Einstein és a tapasztalatok szerint is elhanyagolható. A magspin rendszer az NMR átmeneti (Larmor) frekvencián alkalmazott rádióhullámmal lehet stimulálni. A gerjesztett magspinrendszer energiafeleslegétől a környezetével (amit tradicionálisan „rácsnak” neveznek) való energiacsere során szabadul meg. A spin-rács (vagy longitudinális, a B_0 térrel paralel) és a spin-spin (transzverzális) relaxáció sebessége – amivel a rendszer visszatér az egyensúlyi állapotba – valamilyen különös szerencse folytán a másodperc, a szívdobbanás periódusideje körüli tartományban van. E különös „szerencse” háttérében a molekulák oldatban történő rendezetlen Brown mozgása áll. Ez a mozgás stimulálja a relaxációs átmeneteket, s mivel a rotációs diffúzió számára nincsenek kitüntetett irányok, az egyébként erős, anizotróp kölcsönhatások (dipólus-dipólus ill. kémiai eltolódás anizotropia) kiátlagolódnak és nem szélesítik az NMR spektrum jeleit.

Nagy molekulákban a spin-spin relaxációs idő (T_2) rövid (10-100 ms nagyságrendű), míg egy kis oldószer molekulánál a T_1 és a T_2 akár 10-100 s is lehet. Kis molekuláknál a kétféle relaxációs idő gyakorlatilag megegyezik, nagy molekuláknál és szilárd anyagokban a spin rács relaxációs idő (T_1) jelentősen megnőhet. Igaz azonban, hogy a spin-spin relaxáció mindig gyorsabb a spin-rács relaxációnál, azaz $T_2 < T_1$. Az első NMR kísérletek kudarcát annak idején az okozta, hogy a vizsgált szilárd anyag T_1 relaxációs ideje túl hosszú volt és a kísérletek ismétlése közben a mágnesezettség nem tért vissza az egyensúlyi állapotba s emiatt a nívó populációk kiegyenlítődtek, s így a „telítés” miatt nem kaptak jelet. Ha a spin-spin relaxációs idők az optikai spektroszkópiákban szokásos gerjesztett állapotok élettartamának megfelelően skálázódnának, akkor az NMR spektrum vonalai használhatatlanul szélesek lennének, és elveszítenék azt az előnyt, amit a homogén mágnesez 10^{-9} - 10^{-10} mértékű inhomogenitása megenged. E bevezetőt összegezve megkockáztathatjuk, hogy az NMR sikertörténet háttérében a kedvező relaxációs sajátságok állnak. A következőkben pedig megkíséreljük néhány példán keresztül illusztrálni a mai nagyfelbontású NMR teljesítőképességét és a mérések elvét.

Az NMR módszer teljesítőképessége

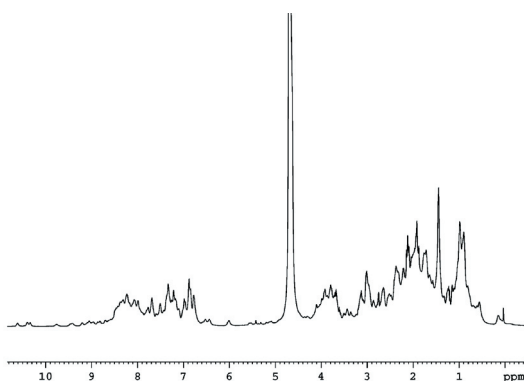
A folyadékfázisú NMR metodikai fejlesztések célja 40 év alatt mit sem változott: cél az érzékenység és a felbontás javítása. Az 1.a-b-c ábrák ezt a fejlődést jól demonstrálják. A ¹⁵N-¹³C jelzett calretinin I-II (CR I-II) fehérje ³ 1 mg-nyi mennyiségéből készült „sima” egydimenziós proton NMR

csak az oldószer jelét képes detektálni (1.a). NMR csak az oldószer jelét képes detektálni (1.a).



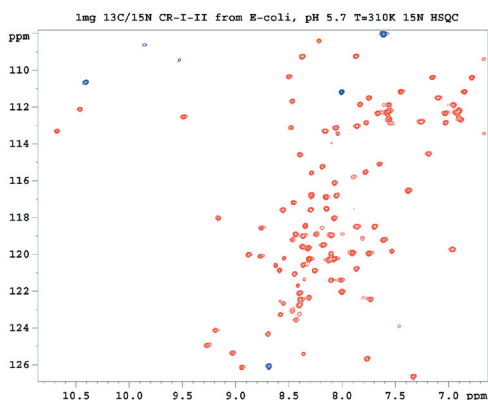
1a. Ábra. A calretinin (CR) I-II fehérje ^1H NMR spektruma vízelnyomás nélkül

A gradiens „WATERGATE” módszerrel elnyomható a kb. háromszázszerszer erősebb H_2O (~ 100 M/L ^1H koncentráció) jele és láthatóvá válnak a fehérje ($\sim 3 \times 10^{-4}$ M/L koncentráció) ^1H -NMR jelei (1.b).



1b. Ábra. A CR I-II fehérje ^1H NMR spektruma vízelnyomással

A kétdimenziós ^1H - ^{15}N HSQC spektrumban (1.c) viszont csak az amid NH csoportok adnak jeleket.

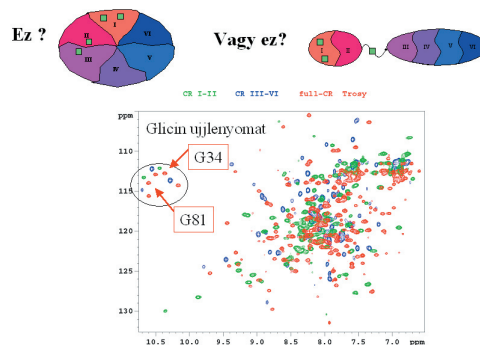


1c. Ábra. A CR I-II fehérje kétdimenziós $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ kémiai eltolódás korreláció (HSQC) NMR spektruma

A száz egységből álló fehérje spektrumában kb. száz pöttyöt

számolhatunk meg, ha az oldallánc NH_2 jelektől eltekintünk. Ezek a kereszt-csúcsok egy NH csoport ^1H és ^{15}N kémiai eltolódásait (ppm) rendelik egymáshoz. A félreértések elkerülése érdekében kiemeljük, hogy egy ilyen térkép önmagában még semmiféle geometriai jelentést sem hordoz. A röntgen-krisztallográfiai leképezéseknél közvetlenül kapunk molekula geometriát, ezért ott a jelhozzárendelési probléma fel sem merül. Az NMR szerkezetvizsgálat viszont a jelek azonosításával kezdődik, tehát esetünkben minden egyes pöttyre 1 és 100 közé eső számot kell írunk. Ennél a fehérjénél erre kb. $100!$ (faktoriális) $\sim 10^{157}$ lehetőség lenne, ami csillagászati szám. Szerencsére ezt nem találgatással és csak adatbankokra hivatkozva kell megtenni, hanem a molekula topológiájától függő célzott kísérletek sorozatával⁴. A jelhozzárendelés sok esetben szerkezetbizonyító erejű is, legalábbis a molekula konstitúcióját illetően.

Mire jók az előzőhöz hasonló 2D térképek? Pl. a teljes CR fehérje moduláris szerkezetét (a kis modul független a nagytól) három egymásra úsztatott spektrum már első ránézésre igazolja (2. ábra). A kicsi (I-II) modul és a nagyobbik (III-VI) modulok spektrumainak összege kádja a teljes fehérje spektrumát (a modulok spektrumát ÉNy-i irányban eltoltuk a láthatóság kedvéért). Az ujjlenyomat glicin régió pedig pontosan azonosítja az öt Ca^{2+} kötő helyet. glicin régió pedig pontosan azonosítja az öt Ca^{2+} kötő helyet.



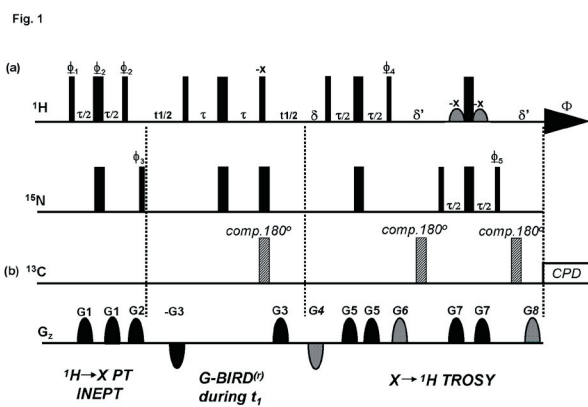
2. Ábra. A calretinin és a CR I-II, III-VI moduljainak egymásra rajzolt $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ TROSY és HSQC spektrumai. A modulok spektrumának összege nagyon hasonlít a teljes fehérje (kicsit elcsúsztatott) spektrumához, ami azt sugallja, hogy a modulok függetlenek egymástól.

Elmélet, dióhéjban

Hogyan készülnek a 2. ábrához hasonló 2D spektrumok? Egy-egy speciális NMR mérési módszer lényege egy rádiófrekvenciás tüimpulzus sorozat, amelyet pontosan meghatározott idejű szünetek „darabolnak” (a 3. ábra pl. egy „TROSY”⁵ szekvenciát mutat).

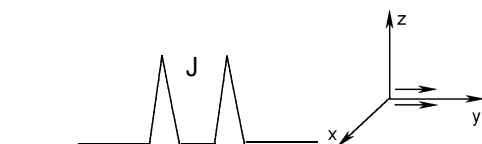
A tüimpulzus sorozat a módja a mágneszettségi információk szinte tetszés szerinti terelgetésének, amivel pl. a kémiai eltolódások kapcsolatát lehet követni. Megérthető-e, tervezhető-e a bonyolultnak tűnő kísérletek? A válasz igen, és a tervezéshez itt is a modulok használata segít. Az első „INEPT” modul, amely esetünkben az ^1H mágneszettséget viszi át a ^{15}N magokra, könnyen megérthetjük. Háromféle elméleti módszert használhatunk: a mágneszettségi

vektormodellt (szemléletes), a szorzat-operátor modellt (hatékony és szemléletes) ⁶ valamint a sűrűség-mátrix (egzakt, de nem szemléletes) leírását.



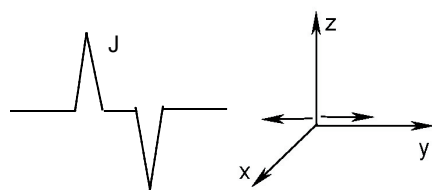
3. Ábra. A nagy móltömegű, duplán jelzett fehérjék vizsgálatára alkalmas ún. TROSY (Transverse Relaxation Optimized Spectroscopy) kísérlet egyik változata. A mérés a relaxációs interferencia vonalkeskenyítő hatásán alapul.

Képzelnünk el egy egyszerű két-spin rendszert, pl. a CHCl_3 molekula ^1H - ^{13}C (I és S spin) magjait. Az egyensúlyi, z-irányú proton mágnesszettséget egy x-irányú rádiófrekvenciás tüimpulzussal elforgatva y-irányú mágnesszettséget kapunk. Ez később ellenfázisú jellé is alakulhat, mert a dublett két komponense a frekvencia különbség miatt eltérő sebességgel precesszál az xy síkban.



Egyfázisú y-mágnesszettség

$$\mathbf{I} = \frac{i}{2} \begin{bmatrix} 0 & 0 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & -1 \\ 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 \end{bmatrix}$$



Ellenfázisú y-mágnesszettség

$$2\mathbf{I}_Y\mathbf{S}_Z = \frac{i}{2} \begin{bmatrix} 0 & 0 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \\ 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & -1 & 0 & 0 \end{bmatrix}$$

Már ebben az egyszerű két-spin rendszerben is sokféle „mágnesszettség” képződhet a kísérletek során, amelyek a derékszögű szorzat operátorok formájában összesen 16 félék lehetnek, ha az egységmátrixot is hozzávesszük. Ezek súlyozott összegével a rendszer pillanatnyi állapotára jellemző sűrűségmátrix felírható, amiből a mágneses jellemzők várható értéke is kiszámítható. A kísérletek követéséhez gyakran elegendő azonban az alábbi szorzat operátorok változásának kiszámítása: 1. a rádiófrekvenciás (RF) impulzus, 2. a δ kémiai eltolódás moduláció és 3. a J csatolási moduláció során. Az ezekre vonatkozó forgatási transzformációk egyszerűek, de itt nem részletezzük őket.

\mathbf{I}_z és \mathbf{S}_z longitudinális mágnesszettség

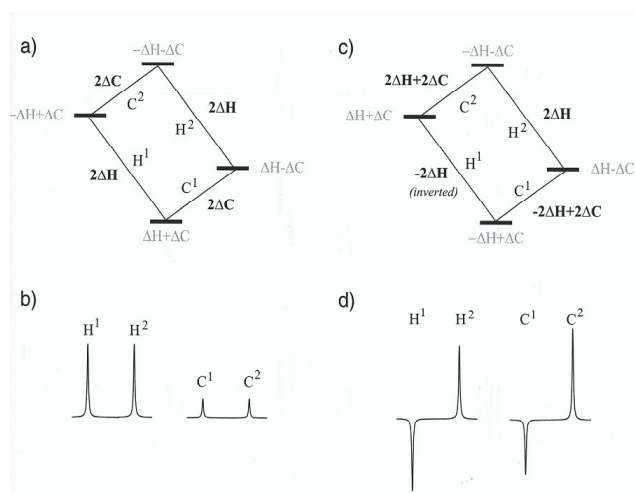
$\mathbf{I}_x, \mathbf{I}_y, \mathbf{S}_x,$ és \mathbf{S}_y transzverzális (detektálható jel, $\Delta m = \pm 1$)

$2\mathbf{I}_x\mathbf{S}_z$ nem Boltzmann-eloszlású, két-spin rend

$2\mathbf{I}_x\mathbf{S}_z, 2\mathbf{I}_y\mathbf{S}_z, 2\mathbf{S}_x\mathbf{I}_z, 2\mathbf{S}_y\mathbf{I}_z$ antifázisú (detektálható jel, $\Delta m = \pm 1$)

$2\mathbf{I}_x\mathbf{S}_x, 2\mathbf{I}_x\mathbf{S}_y, 2\mathbf{I}_y\mathbf{S}_x, 2\mathbf{I}_y\mathbf{S}_y$ (nulla és két-quantum rezgés, $\Delta m = 0, \pm 2$)

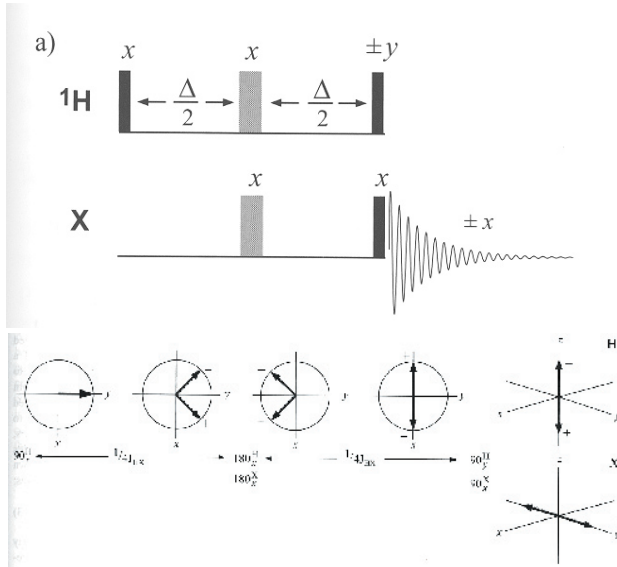
Hogyan megy át a protonok mágnesszettsége mondjuk a szén magokra? Ezt egy szelektív populáció átvitel (SPT) példáján mutatjuk be először. A 4. ábrán egy csatolt C-H spinrendszer Zeeman energiaszintjeit látjuk a nívók betöltöttségével együtt.



4. Ábra. A szelektív mágnesszettség átvitel (SPT) elve. Az egyensúlyi mágnesszettségénél kialakult populációkat az egyik ^1H átmenet invertálásával jelentősen meg lehet változtatni, ami a csatolt ^{13}C mag átmeneteit a kiindulási +1 +1 -hez képest -3 +5 intenzitására növeli.

Tudnunk kell, hogy egy adott NMR átmenet intenzitása az átmenethez tartozó energiaszintek populáció különbségével arányos. Egyensúlyi állapotban a proton átmenetekhez tartozó különbségek négyszer nagyobbak mint a szén átmenetekhez tartozók ($\Delta H \sim 4\Delta C$), mert a proton giromágneses tényezője is négyszer nagyobb. Ha most a proton dublett egyik mágnesszettségét kellően szelektív rádiófrekvenciás impulzussal a +z irányból a -z irányba forgatjuk, azaz invertáljuk, akkor a nívók betöltöttsége megváltozik. Mivel a két szén átmenetnek vannak közös nívói az invertált proton átmenettel, ezért az összekötött szintek betöltöttsége azonnal megváltozik. Az ábra alapján triviális számolással kapjuk, hogy az egyik szén átmenet mágnesszettsége -3, míg a másiké +5 lesz a kiindulási +1 +1 dublett helyett. A jel/zaj viszonyt tehát jelentősen növeltük, ráadásul a besugárzott proton jeléhez így megtalálhatjuk a

szomszédos szén jelét a ^{13}C -spektrumban is. G. Morris 1979-ben arra gondolt, hogy hasznos lenne az SPT kísérlet nem-szelektív változata is; ez lett a nevezetes INEPT (magyarítva: HATÁSTALAN) módszer. A valóságban a kétdimenziós NMR ötlete és 1976-os bevezetése után ez volt az egyik leghatásosabb új technika. Az 5. ábra a vektormodellel és a szorzatoperátorokkal is értelmezi a kísérlet lényegét.



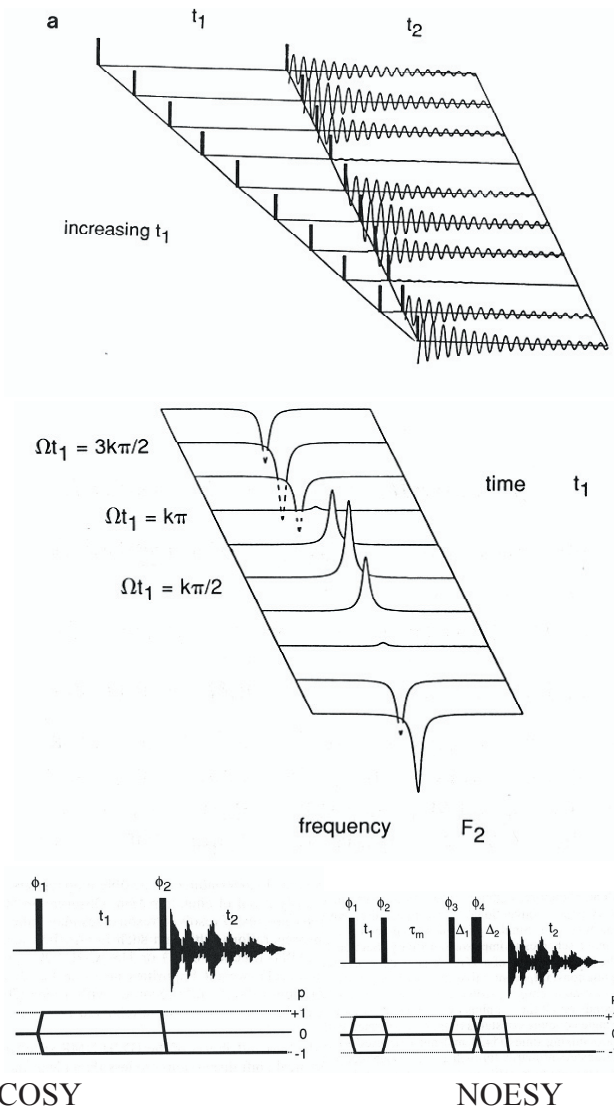
5. Ábra. Az INEPT, nem szelektív mágneszettség átvitel impulzus-sorozata, vektorábrája és szorzat-operátor értelmezése. A kísérletben ellenfázisú ^1H mágneszettségből ellenfázisú ^{13}C mágneszettség lesz.

Az INEPT esetében minden RF impulzus igen rövid időtartamú (kb. 10-20 μs) és így egyformán érinti a teljes spektrális ablakot, vagyis nem szelektív. Az első 90° -os ^1H impulzus az y irányba forgatja az ^1H dubletteket, majd a dublett két jele egymáshoz képest $\pm J/2$ frekvenciának megfelelő szögsebességgel távolodik egymástól az xy síkban. Ha $1/(4J)$ idő után egy $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ 180° -os impulzuspárt alkalmazunk, akkor a két mágneszettséget a másik félsíkba forgatjuk, ám a lassabb komponens most a gyorsabb lesz és fordíva. Így a két komponens tovább távolodik egymástól (folytatódik a „csatolási moduláció”), majd a spin-echo második $1/(4J)$ periódusa után a mágneszettséget x -irányú ellenfázisú ^1H jelként kaphatnánk. Ebben a pillanatban ezt az x -irányú mágneszettséget a z -irányba forgathatjuk egy y -irányú ^1H 90° -os impulzussal. Ekkor zz mágneszettséget, másnéven két-spin rendet kapunk. Ez a nemegyensúlyi mágneszettség nagyon hasonlít ahhoz a helyzethez, mint amikor az SPT kísérletben az ^1H dublett egyik felét invertáltuk. Az INEPT kísérlet végén a zz mágneszettséget egy ^{13}C 90° -os impulzussal ellenfázisú ^{13}C mágneszettséggé alakíthatjuk át. Ez a jel is nyer az eltérő giromágneses tényezők okozta jel/zaj növekményből, és detektálható is. Az NMR kísérletek nagy részében az információ átadás módja ehhez hasonlít. Az egyik mag ellenfázisú jelétől juthatunk a másik mag ellenfázisú jeléhez. Az INEPT a beépített spin-echo révén működhet igazán jól, ugyanis ennek jótékony hatása folytán a kapott jelek fázisa nem függ az ^1H magok kémiai eltolódásától. Az INEPT mérés „refókuszált” változatában adatgyűjtés alatt lehet protonlecsatolást alkalmazni, ha gondoskodunk

az ellenfázisú mágneszettség egyfázisúvá alakításáról. Ezzel a méréssel az eredeti ^{13}C dublettünk intenzitása egy nyolcszoros intenzitású szinglettben összegződik.

Újabb dimenziók - végtelen szelektivitás nem szelektív gerjesztésekkel

Az érzékenység tehát polarizáció átvitelével növelhető. Vajon a jelek diszperziója növelhető-e a mágneses tér erősségének növelése nélkül? A választ erre Jean Jeener belga fizikus adta meg 1971-ben, egy jugoszláviai NMR nyári iskolán. Az a zseniális ötlete támadt, hogy az impulzus kísérletekben a detektálási (valós) időn kívül újabb, indirekt idődimenziót lehetne bevezetni. A 6. ábrán láthatjuk az általa javasolt homonukleáris COSY és a későbbi NOESY kísérletet.



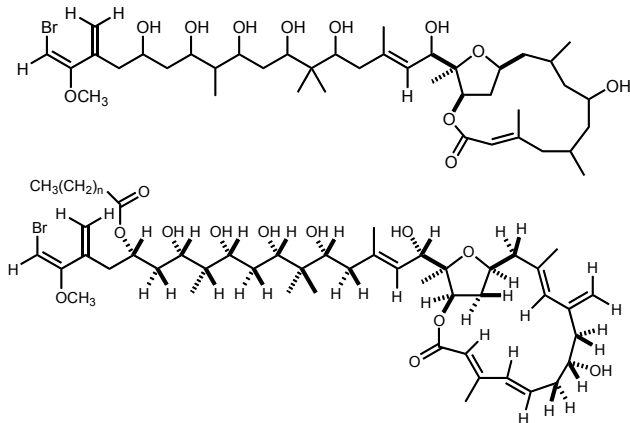
COSY

NOESY

6. Ábra. A kétdimenziós mérések alapelve. A valós, t_2 időben detektált jelek a szisztematikusan inkrementált t_1 idő alatt is modulálódnak. Két, egymást követő Fourier-transzformációval mindkét tengely mentén frekvencia skálát kapunk. Az így nyert kontúrvonalas COSY térkép a kémiai kötések mentén való szomszédosságot, a NOESY pedig a térbeli közelséget állapítja meg a különböző magok között. A kísérletek szelektivitását csak a természetes vonalszélesség és a digitalizálás mértéke befolyásolja.

A második idődimenziót úgy lehet bevezetni, hogy a kísérletben egy időintervallumot kísérletről kísérletre, azonos időközökkel megnövelünk (a COSY esetében pl. a két egymást követő 90° -os ^1H impulzus közt eltelt időt). Az inkrementált t_1 idő alatt pl. a kémiai eltolódás modulálja a jeleket a t_1 idő függvényében, amit a t_2 valós idejű detektálás alatt mért interferogram (FID) is örököl. Ha először a valós idő szerint Fourier transzformáljuk a jeleket, akkor azt vehetjük észre, hogy az egymást követő spektrumokban a jelek fázisa vagy amplitúdója nem állandó, hanem a t_1 függvényében modulált. Ha ezeket a jeleket ezután t_1 szerint is (t_2 -re merőlegesen) Fourier transzformáljuk, akkor olyan kétdimenziós (2D) spektrumot kapunk, amelyeknek mindkét tengelye frekvencia dimenziójú. Az így nyert COSY térképről triviálisan leolvasható a magok kémiai kötés menti szomszédossága: a spin-spin csatolásban lévő magok kémiai eltolódásának megfelelő koordinátáknál észleljük az ún. „kereszt-csúcsokat”, kontúrvonalas ábrázolásban a „pöttyöket”. A 2D-NOESY kísérlet legalább még egy 90° -os ^1H impulzust tartalmaz, és az utolsó két impulzus közt beiktatott fix „ τ_m keverési idő” értékétől függően ad keresztcsúcsokat a térszomszédos protonok kémiai eltolódásainak megfelelő koordinátáknál. A 2D kísérletek csodáját abban foglalhatjuk össze, hogy nem-szelektív gerjesztésekkel juthatunk – elvileg – végtelen szelektív információhoz.

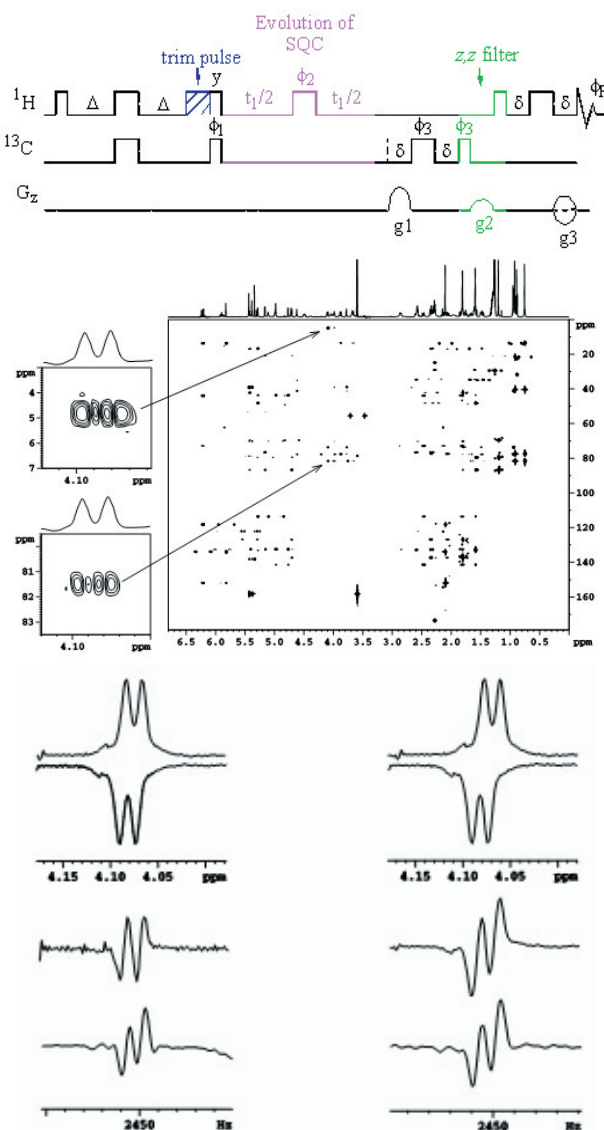
Első példaként most nem homonukleáris kísérletet – COSY, NOESY, stb. – hanem heteronukleárisat választunk. Még hozzá olyat, amelyik nem csak a skaláris csatolás meglétét jelzi, hanem annak értékét is kiadja. A távolható – kettő és háromkötéses - ^1H - ^{13}C spin-spin csatolások általában 10 Hz-nél kisebbek, de nagyon fontosak a természetes anyagok szerkezetfelfedezésénél. A phormidolide makrolid (7. ábra) esetén 11 királis centrum sztereokémiáját határozták meg⁷, többek között a HSQMBC (Heteronuclear Single Quantum Multiple Bond Correlation) módszerrel⁸.



7. Ábra. A „phormidolide” nevű makrolid természetes anyag.

A 8. ábra a mérési metodikát, a nyert 2D spektrumot és annak néhány metszetét mutatja. A HSQMBC a távolható csatolásokra optimált INEPT-tel kezdődik, a t_1 idő alatt kapunk ^{13}C kémiai eltolódás jelzést, majd az aktív csatolásnak megfelelő ellenfázisú szén mágnesszéttséget alakítjuk vissza ellenfázisú proton mágnesszéttséggé. Ez szuperponálódik az adagyűjtés alatt az egyfázisú proton multipletre. Ha szerencsés a csatolási kép, akkor közvetlenül leolvasható az $^n\text{J}_{\text{CH}}$ heteronukleáris csatolás nagysága. Bonyolult ^1H multiplett esetén számítógépes illesztéssel kell próbálkozni.

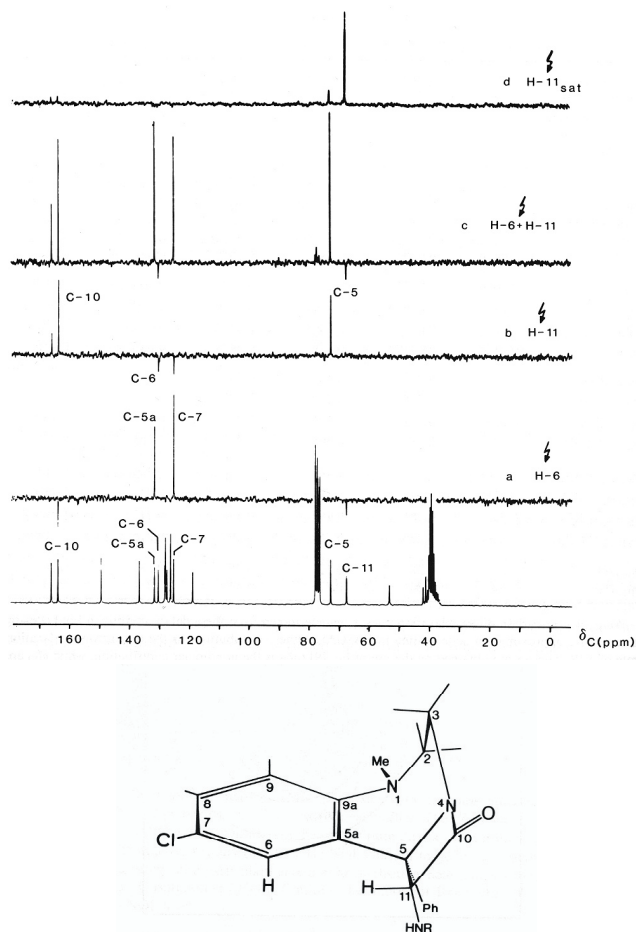
Az eddigiekben részletezett „koherens” mágnesszéttség átvitelek gyakorlatilag pillanatszerűen megtörténnek. A már említett NOESY ezzel szemben „inkoherens” z-mágnesszéttség átvitel a kereszt-relaxáció segítségével. Relaxációs jelenség lévén, a NOE felépüléséhez vagy lebomlásához a relaxációs időkkel összemérhető időtartamokra van szükség.



8. Ábra. A távolható ^1H - ^{13}C spin-spin csatolások mérésére alkalmas HSQMBC módszer. A 2D térkép vízszintes tengelye az ^1H kémiai eltolódás, a függőleges pedig a ^{13}C eltolódás. A keresztcsúcsok megjelenését az aktív távolható csatolások okozzák, amelyek ellenfázisú felhasadást adnak az ^1H tengellyel párhuzamos metszetekben. A felhasadásból leolvasható az $^n\text{J}_{\text{CH}}$ csatolás értéke, amelyből pl. a csatoló partnerek által bezárt diéeres szög becsülhető.

A klasszikus egyensúlyi (steady-state) NOE kísérletekben valamely S multiplett előtelítésének hatására a térszomszédos magok jelintenzitása megváltozhat. A változás mértéke definíció szerint: $\text{NOE}_1\{S\} = (I - I_0) / I_0$ amit százalékosan szoktak kifejezni (I_0 az egyensúlyi, referencia jelintenzitás). A 2D NOESY mérés viszont a tranziens (nem-egyensúlyi) NOE mérések sorába tartozik, amelynek 1D megfelelője a multiplett invertálást követő jelintenzitás változás. A tranziens NOE kísérletekben a jelnövekedés üteme eleinte

arányos a kereszt-relaxációs sebességgel, ami a két mag közötti távolság hatodik hatványa szerint csökken, $\sigma_{IS} \sim (w_2 - w_0) \sim r_{IS}^{-6}$. Az erős távolságfüggés miatt a NOE igen alkalmas a molekula geometria meghatározására a 0.2-0.5 nm tartományban. A 9. ábrán bemutatott példa $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ egyensúlyi heteronukleáris NOE kísérletsorozat mutat, amelynek eredményeképpen számos proton-szén távolságot 0.01 nm pontossággal lehetett megmérni egy diazepam származékban.

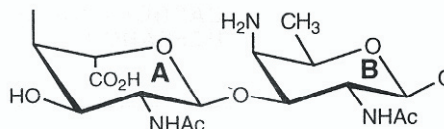
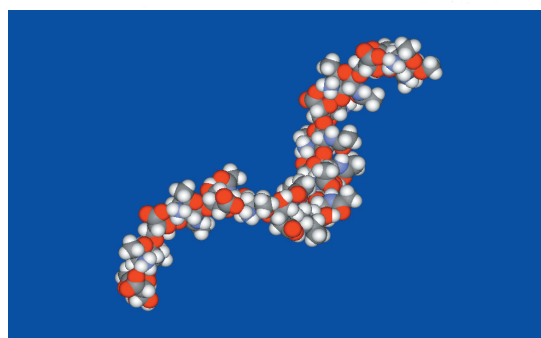
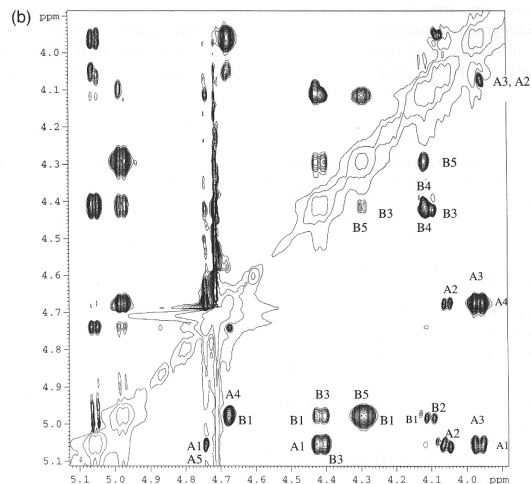


9. Ábra. Proton-szén magtávolságok mérése szelektív, heteronukleáris NOE differencia kísérletekkel, egy kis szerves molekulában. A mérési pontosság elérheti a ± 0.01 nm értéket

A NOE – hasonlóképpen a relaxációs időkhöz – a molekulák mozgási sajátságaitól is függ. Elméletileg levezethető, hogy közepes méretű molekulák viszkózus oldatában a homonukleáris NOE akár zérus is lehet, mert a mozgási tartománytól függően a NOE +50% és -100% határok közt mozoghat. Ha azonban a NOE kísérletet „forgó vonatkoztatási rendszerben” a transzverzális síkban, a B_1 RF térhez „ragasztott” spinek közt próbáljuk ki, akkor az így mért „ROE” mindig pozitív. A 10. ábrán egy kb. 20 kDa molekulásúlyú poliszacharidon mért ROESY spektrumot látunk, amely az interglikozidos CH-csatolásokkal

kiegészítve alkalmas a *Shigella Sonnei* baktérium sejtfalából származó alkotó konformációjának megállapítására ⁹.

Biomolekulák vizsgálata esetén a két dimenzió nem mindig ad kellő disperziót és a jelek átlapolhatnak. A 2D módszer kiterjesztésével lehetőség van további dimenziók



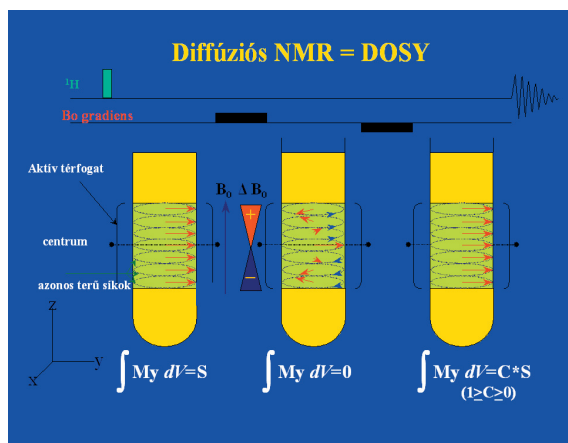
10. Ábra. Proton-proton távolságok mérése 2D-ROESY kísérlettel. A B_1 térhez ragasztott spinek közötti kereszt-relaxációt mérjük a forgó vonatkoztatási rendszerben. Előnye, hogy effektus tetszőleges méretű molekula esetén is van. Egy ~ 20 kDa móltömegű poliszacharidon történt alkalmazást látunk.

bevezetésére is. A 3D-NMR gyakran használatos fehérjék és nukleinsavak szerkezetvizsgálatához, sőt a 4D-NMR-t is alkalmazzák néha. Ennél magasabb dimenziójú kísérleteket a mérési időkorlátok miatt nemigen futtatnak. A 11. ábra a $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ jelzett fehérjék jelhozzaendeléséhez használatos 3D HNCA szekvenciát mutatja. Az impulzus szekvenciában az ^1H és ^{15}N impulzusok mellett sávselektív ^{13}CO és $^{13}\text{C}_\alpha$ impulzusok is szerepelnek. Ez a kísérlet $^1\text{H} \gg ^{15}\text{N}$ INEPT-tel kezdődik, amit a ^{15}N kémiai eltolódás moduláció követ a t_1 idő alatt. A t_2 idő folyamán a mágneszettség hármas-quantum rezgés formájában létezik, de a C_α kémiai eltolódása modulálja (észrevehetjük, hogy minden csatormán van $t_2/2$ -nél 180° -os lecsatoló impulzus a C_α csatornát kivéve). Ezután a mágneszettséget ismét ^{15}N ellenfázisú mágneszettséggé alakítjuk, amit a kísérlet végén

A relaxációs mechanizmusok különös összjátéka folytán megesik, hogy a DD és a CSA relaxáció „interferenciája” egy dublett egyik vonalát kiszélesíti, míg a másikat keskenyíti. A vonalkeskenyedés paradox módon annál markánsabb, minél nagyobb a molekula. Ezt a jelenséget használják ki biomakromolekulák NMR méréseire, amikor csak a keskeny vonalat tartják meg a kísérletekben. A TROSY⁵ mérés alkalmazásánál nagyon erős mágneses terekben a leglátványosabb a hatás; 800-1000 MHz körüli berendezéseken várható az optimum, akár 100 kDa móltömegű fehérjéknél. A nagy molekulák felső tömeghatárának kiterjesztésén kívül a változatos relaxációs interferencia kísérletekből további fontos dinamikai és szerkezeti információkat nyerhetünk. Az előbbieken megismert antibiotikum modell esetében a CSA-DD effektus mértéke alapján azonosítható a cisz peptid kötés ill. a ligandum kötés helye is.

Elválasztás nélküli „kromatográfia” az NMR csőben; DOSY

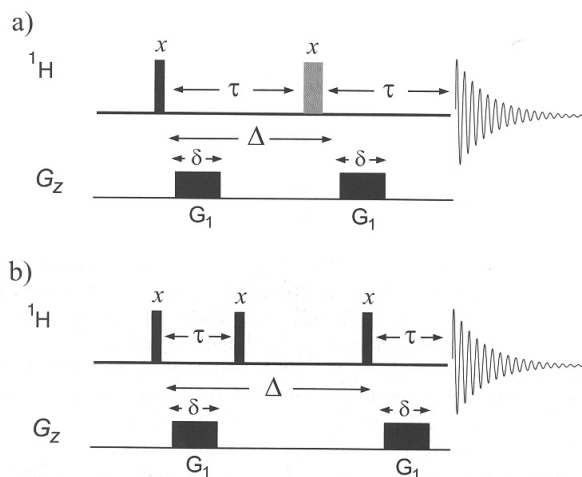
A molekulák méretétől, alakjától és a közegtől függő translációs diffúziós állandó a korszerű, B_0 gradiens impulzusokat adó spektrométereken egyszerűen mérhető. A mérés elvét¹² szematikusan a 14. ábra mutatja.



14. Ábra. A diffúziós NMR (DOSY) alapelveinek szematikusan ábrázolása. Az aktív térfogattól gyorsan eldifundáló molekulákhoz tartozó magoknál a fáziskohérenca nem áll vissza, ezért ezek a jelforrások „elvesznek”, és a detektálásnál kisebb jelet észlelünk.

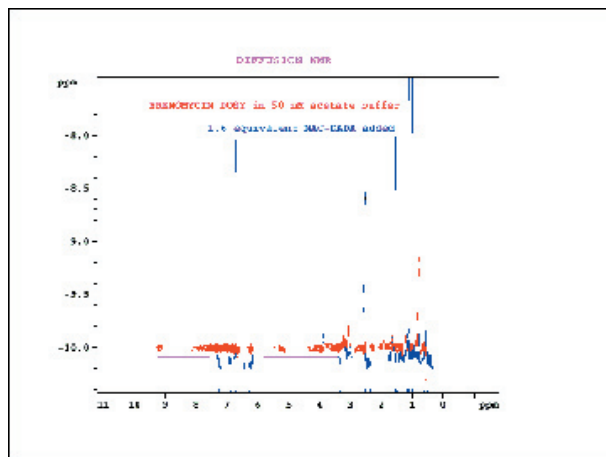
Ha a z-tengely irányában a B_0 tér homogenitását egy lineárisan változó tér bekapcsolásával néhány ms időtartamra „elrontjuk” akkor az NMR mintacső minden kis szeletében más és más lesz a rezonancia frekvencia. A kísérlet eredménye, hogy az összegzett xy síkbeli mágneszettség gyorsan megszűnik, nem lesz detektálható jel. Ha azonban, ezt követően egy azonos időtartamú és erősségű, de ellentétes irányú gradiens impulzust adunk a minta térfogatában, akkor a gyorsan és a lassan pörgő mágneszettségek szerepet cserélnek és a kísérlet végére a különböző síkokban forgó mágneszettségek újból szinkronban lesznek, és az összegzett jelben visszakaphatnánk az eredeti jelünket (a relaxációs veszteségtől eltekintve). Azonban azoknak a molekuláknak a jelét elveszítjük, amelyek a kísérlet időtartama alatt „megszöknek” az aktív térfogattól. Így a jelcsökkenés mértéke annál nagyobb lesz, minél gyorsabban

diffundálnak a molekuláink. A valóságban célszerűbb a kísérleteket egy spin-echo részeként végrehajtani (15. ábra), amikor a centrális 180°-os impulzus felcseréli a forgásirányokat, így azonos gradienssel nyerhetjük vissza a jelet.



15. Ábra. A DOSY kísérletek gyakorlati megvalósítása spin visszhang kísérletekben történik. Az ismételt kísérletekben a térgradiens erősségét növelik, és a gradiens függvényében csökkenő jel intenzitásának illesztésével kapható a diffúziós állandó.

Még kedvezőbb, ha a gradienssel jelölt mágneszettséget a diffúzió idején z-mágneszettségként tároljuk, mert a hosszabb longitudinális relaxáció előnyös a diffúzió során. A diffúziós állandó meghatározásához a kísérleteket változó erősségű gradienssekkel meg kell ismételni, és a növekvő gradiens függvényében gyengülő jelek intenzitását az elméleti Stajskel-Tanner formulával illesztve a „D” diffúziós állandó meghatározható. Zsúfolt, átlapoló ^1H NMR spektrumok esetében a jelenkénti illesztések nem egyszerűek. A vizuális megjelenítés érdekében az exponenciális illesztések helyett inverz Laplace transzformációt használnak, amely a diffúziós állandót közvetlenül jeleníti meg mint egy pseudo 2D kísérlet diffúziós frontját.



16. Ábra. Az eremomicin dimer DOSY spektruma. Az oligomerizáló dipeptid ágens hozzáadása után újabb két diffúziós front jelenik meg, feltehetően a tetramer és az oktamer jelei. Ebben az ábrázolásban a \log_{10} alapú skálán a diffúziós sebesség 0.1 egységnyi változása kb. kétszeres tömegváltozásnak tulajdonítható.

A 16. ábrán bemutatott DOSY spektrum start pontját az eremomicin dimer éles frontja adja. Oligomerizáló ágenszt az oldathoz adva újabb két diffúziós front jelenik meg kétszeres és négyszeres móltömegnél. Sok esetben használnak DOSY-t a molekulák hidrodinamikai sugarának mérésére és ebből következően az oldatfázisú móltömeg becslésre a $D_1/D_2 = (M_2/M_1)^{(1/3)}$ formula alapján (D diffúziós állandó, M molekulatömeg jelölésekkel), továbbá homo- vagy hetero aggregátumok detektálására, ligandum kötődés jellemzésére, fehérje konformáció változás észlelésére.

Zárszó

Összegzőképpen azt mondhatjuk, hogy az NMR sikertörténet töretlenül folytatódik a nagyfelbontású NMR spektroszkópia területén (is). Az elméleti módszerek bevonulnak a gyakorlatba, a technológia inspirálja a mérés technika fejlődését. A szilárd- és folyadékfázisú, sőt a leképező (orvosi, MRI) mérés technikák kölcsönösen ötleteket adnak egymásnak. Ma az NMR molekulaszervezeti és dinamikai vizsgálatok lehetőségei összehasonlíthatatlanul jobbakként mint akár a tíz évvel ezelőttiek. Ne felejtjük el azonban, hogy a biomolekuláris és természetes anyagok szerkezetvizsgálatához szükséges nagyterű NMR spektrométerek drágák, és ha évtizedes elmaradásunkat nem tudjuk pótolni ezen a téren, akkor reménytelenül távol kerülhetünk az NMR kutatások és alkalmazások élvonalától.

Köszönetnyilvánítás

Abban a szerencsében van részem, hogy több mint húsz esztendeje dolgozhatok egy laboratóriumban Dr. E. Kövér Katalinnal és Dr. Szilágyi Lászlóval, akiknek ezúton is köszönöm eddigi együttműködésüket, önzetlen segítségüket.

Irodalom

1. Hore, P.J. *Mágneses Magrezonancia* (ford. Szilágyi László) Nemzeti Tankönyvkiadó (ISBN 963 19 4426 3), **2004**.
2. Harris, R.K. *Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy: A Physicochemical View*, Longman Ltd. (ISBN 0 582 44653-8), **1997**.
3. Palczewska, M.; Groves, P.; Batta, Gy.; Heise, B.; Kuznicki, J. *Protein Science* **2003**, *12*, 180-184
4. Cavanagh, J.; Fairbrother, W.J.; Palmer III, A.G.; Skelton, N.J. *Protein NMR Spectroscopy*, Academic Press (ISBN 0-12164490-1), **1996**.
5. Pervushin, K.; Riek, R.; Wider, G.; Wüthrich, K. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1997**, *94*, 12366-12371.
6. Sorensen, O.W.; Eich, G. W.; Levitt, M. H.; Bodenhausen, G.; Ernst, R. R. *Progress in NMR Spectroscopy* **1983**, *16*, 163-190.
7. Boulanger, A.; Vulpanovici, A.; Roberts, M. A.; Gerwick, W. H. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 7927-7936.
8. Williamson, R.T.; Marquez, B. L.; Gerwick, W. H.; Kövér, K.E. *Magn. Reson. Chem.* **2000**, *38*, 265-273.
9. Batta, Gy.; Lipták, A.; Schneerson, R.; Pozsgay, V. *Carbohydr. Res.* **1998**, *305*, 93-99.
10. Lipari, G.; Szabo, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 4546-4559.
11. Batta, Gy.; Sztaricskai, F.; Makarova, M. O.; Gladkikh, E. G.; Pogozheva, V. V.; Berdnikova, T. F. *Chem. Com.* **2001**, 501-502.
12. C.S. Johnson, Jr. *Progr. NMR Spectr.* **1999**, *34*, 203-256.