

Физико-химические методы
исследования биополимеров:
Структурная формула соединения

Максим Анатольевич Дубинный

maxim@nmr.ru

+7(905)511-57-71

ИБХ РАН

Содержание

1. Очень краткое введение
2. Одномерный ЯМР
3. Масс спектрометрия высокого разрешения
4. Двумерный ЯМР
5. Примеры успеха - люциферины

История (Нобелевские премии)



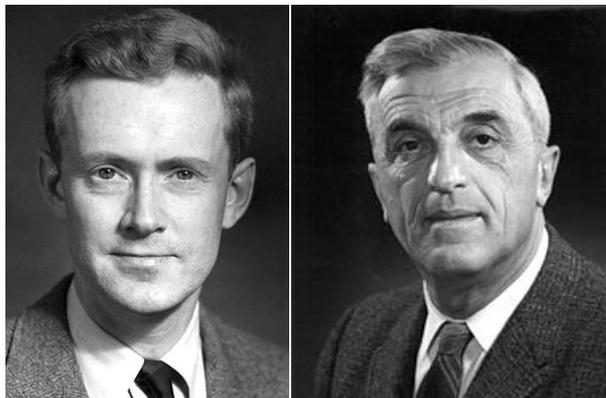
1943 *Отто Штерн*
Открытие спина ядер



1944 *Исидор Раби*
Магнитный резонанс в газах

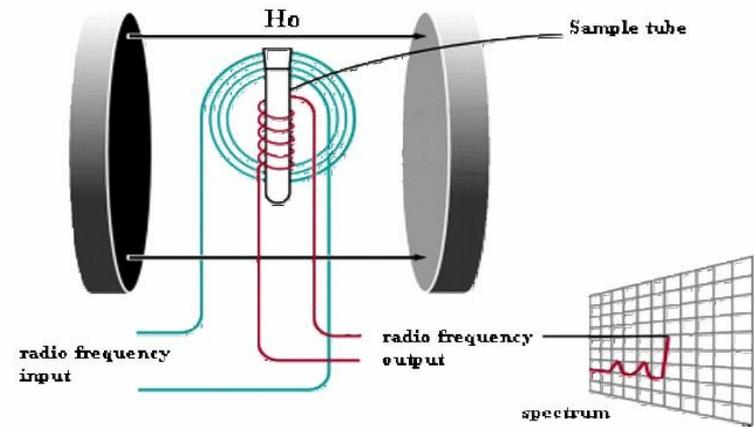
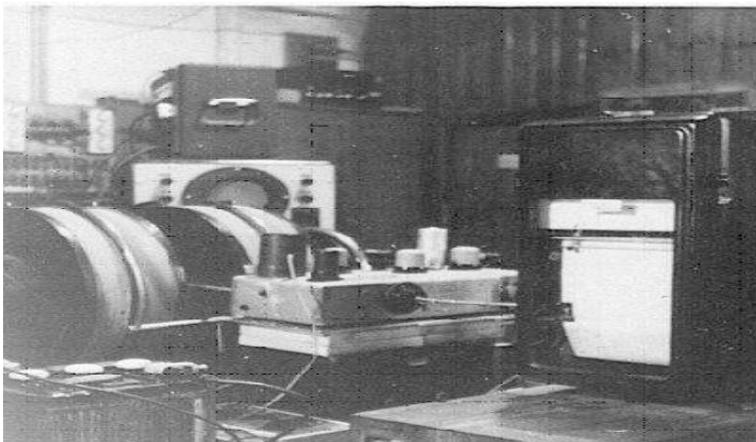


1945 *Вольфганг Паули*
Формализм, принцип запрета

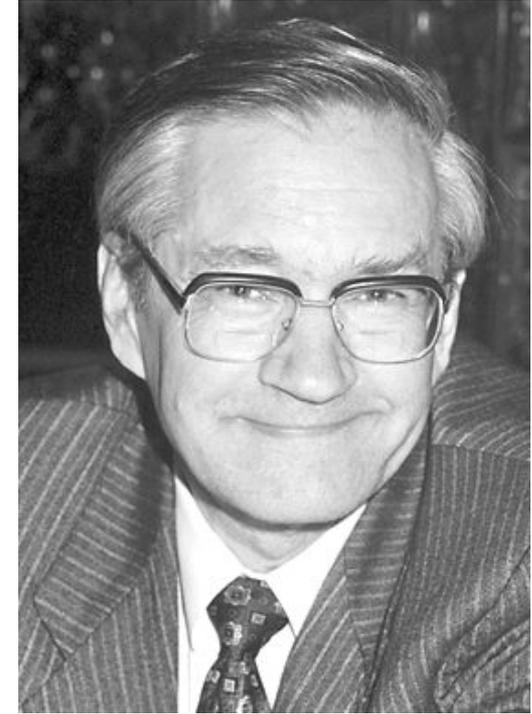
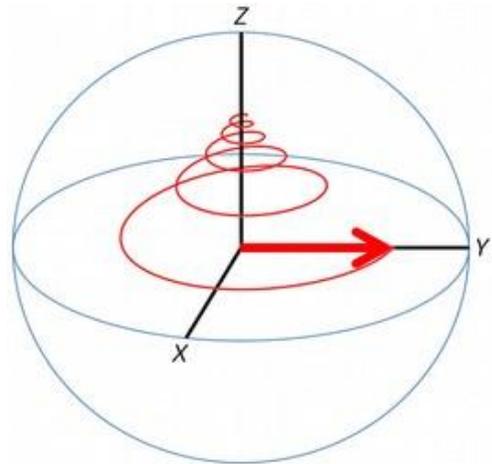
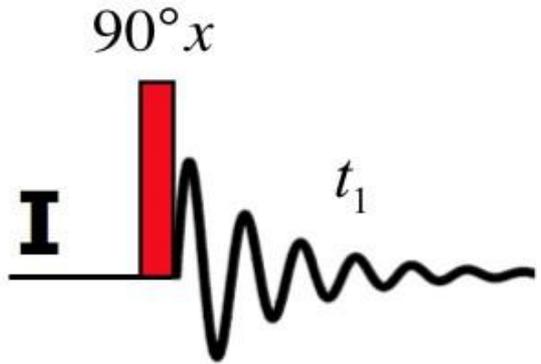


1952 *Эдвард Парселл*
Феликс Блох
Первый эксперимент ЯМР

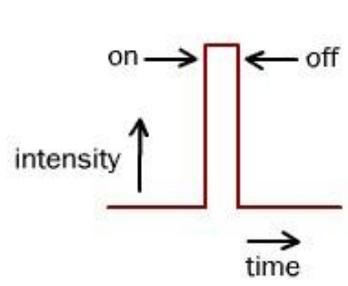
Древний ЯМР-Спектрометр



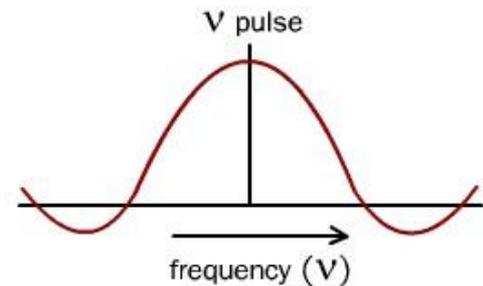
1991 - Фурье ЯМР



Ричард Эрнст
 Нобелевская премия (1991)
“За вклад в развитие
Методов ЯМР-спектроскопии
высокого разрешения”



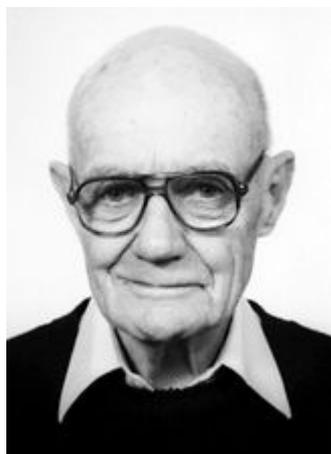
a) The original pulse



b) The frequency content of the same pulse

$$\Delta E \Delta t \geq \frac{\hbar}{2}$$

2002 — За развитие методов идентификации и структурного анализа биологических макромолекул



Джон Б. Фенн
1/4 премии
За МС



Коити Танака
1/4 премии
За МС



Курт Вютрих
1/2 премии
За ЯМР

2003 — за открытие магнитно-резонансной томографии

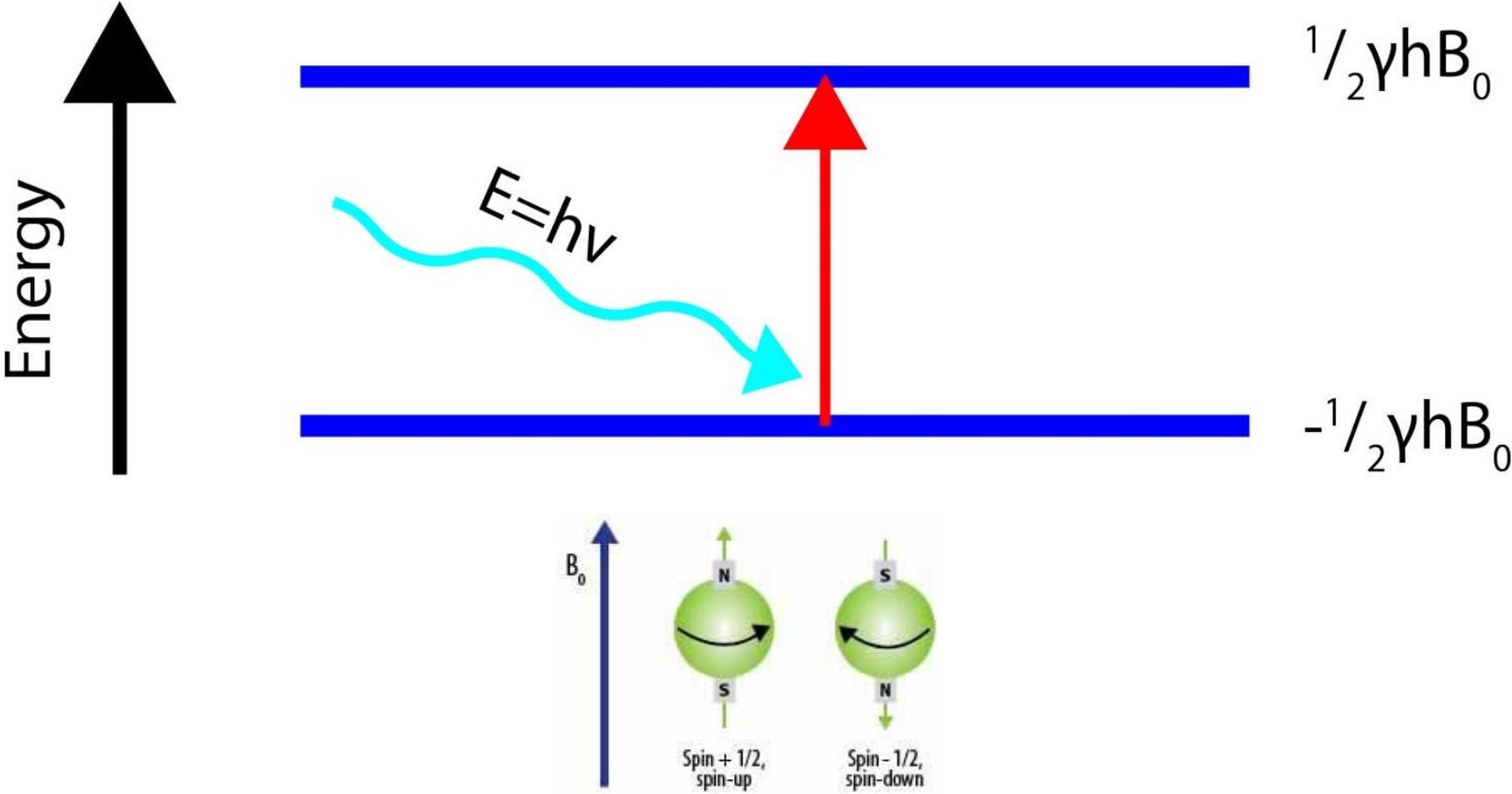


Пауль Ц.
Лаутербур



Питер Мансфилд

Ядерный магнитный резонанс

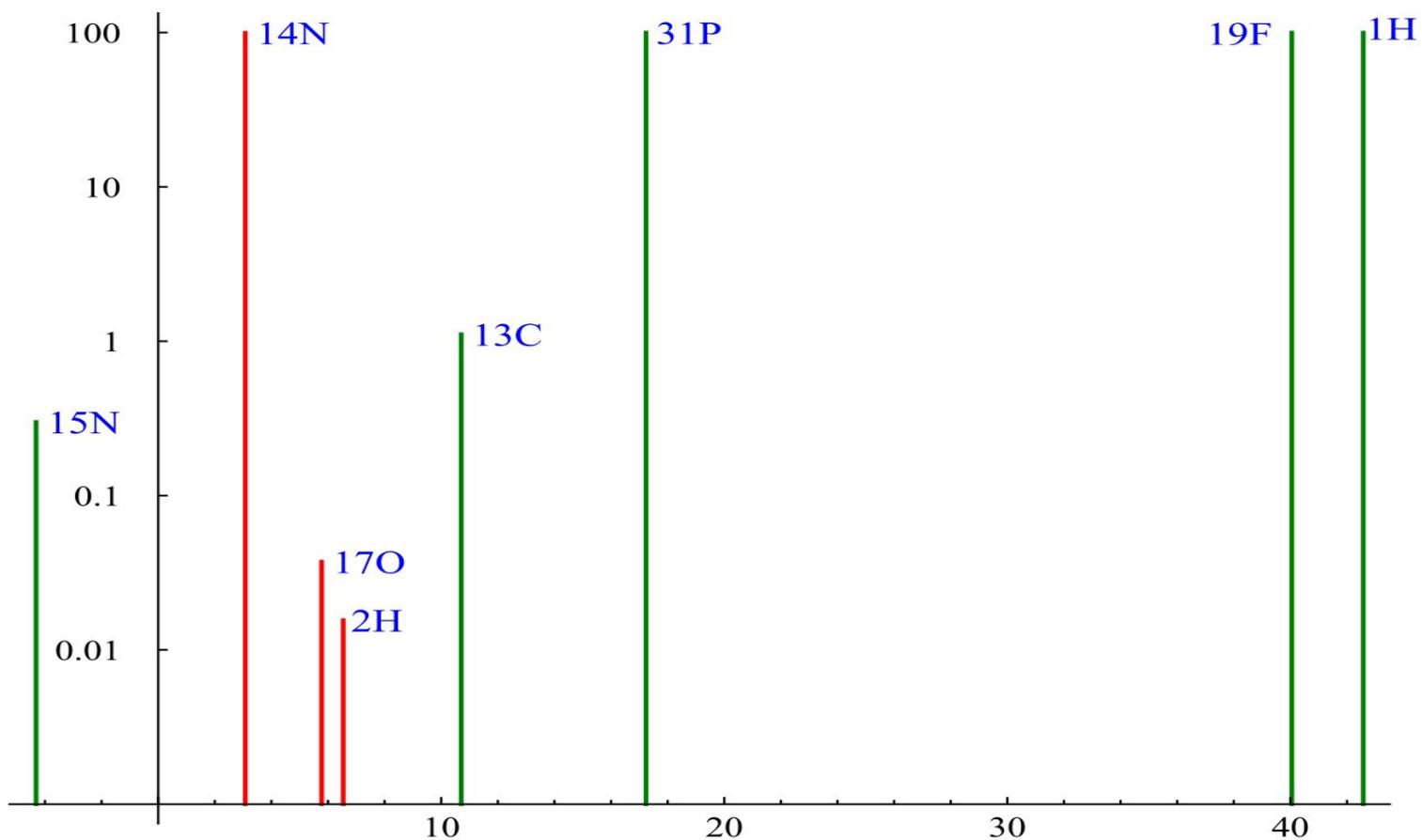


ЯМР-активные изотопы

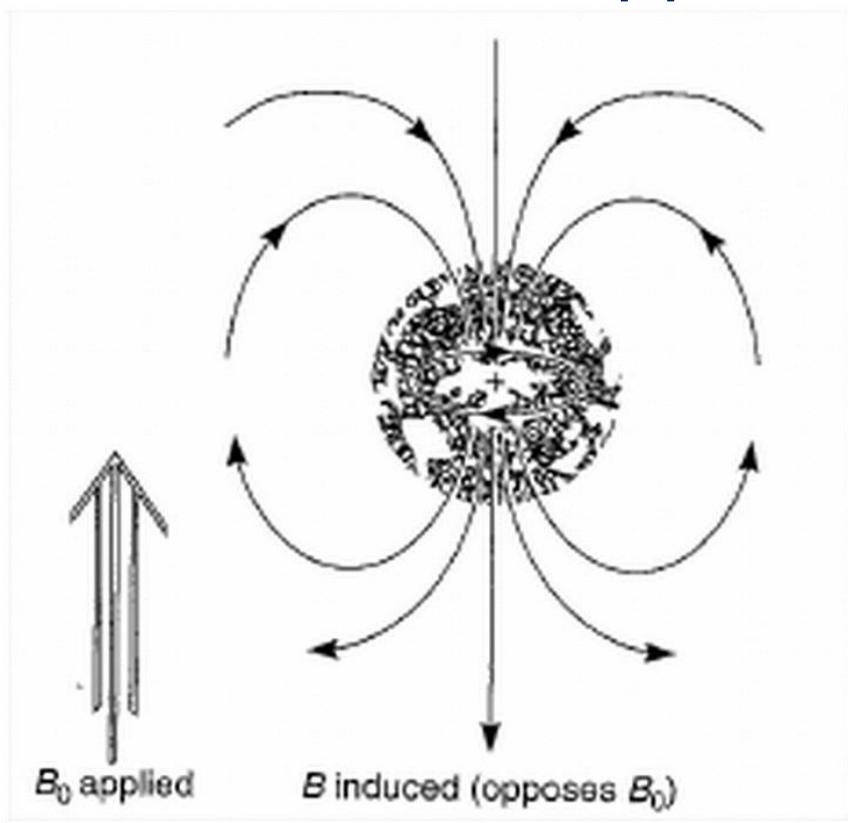
Isotope	Spin	Natural Abundance	Magnetic Moment μ/μ_N	Magnetogyric Ratio $\gamma/10^7 \text{ rad s}^{-1} \text{ T}^{-1}$	Larmor Frequency @ 400 MHz	Larmor Frequency @ 60 MHz	Relative Receptivity Δ^{proton}
^1H	$\frac{1}{2}$	99.9885	4.83735	26.7522	400	60	1
^2H	1	0.0115	1.21260	4.1066	61	9	1.11×10^{-6}
^{11}B	$\frac{3}{2}$	80.1	3.47103	8.5847	128	19	0.132
^{13}C	$\frac{1}{2}$	1.07	1.21661	6.7283	101	15	1.70×10^{-4}
^{15}N	$\frac{1}{2}$	0.368	-0.49049	-2.7126	41	6	3.84×10^{-6}
^{17}O	$\frac{5}{2}$	0.038	-2.24077	-3.62808	54	8	1.11×10^{-5}
^{19}F	$\frac{1}{2}$	100	4.55333	25.18148	376	56	0.834
^{31}P	$\frac{1}{2}$	100	1.95999	10.8394	162	24	6.65×10^{-2}

IA												VIII A						
H	IIA	Spin = $\frac{1}{2}$										B	C	N	O	F	Ne	
		Spin > $\frac{1}{2}$																
Li	Be											III A	IV A	V A	VIA	VII A	VIII A	
Na	Mg	III B	IV B	V B	VIB	VII B	VIII B				IB	II B	Al	Si	P	S	Cl	Ar
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br	Kr	
Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I	Xe	
Cs	Ba	La	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At	Rn	
Fr	Rd	Ac																
			Ce	Pr	Nd	Pm	Sm	Eu	Gd	Tb	Dy	Ho	Er	Tm	Yb	Lu		
			Th	Pa	U	Np	Pu	Am	Cm	Bk	Cf	Es	Fm	Md	No	Lr		

Гипотетический ЯМР спектр в поле 1Т



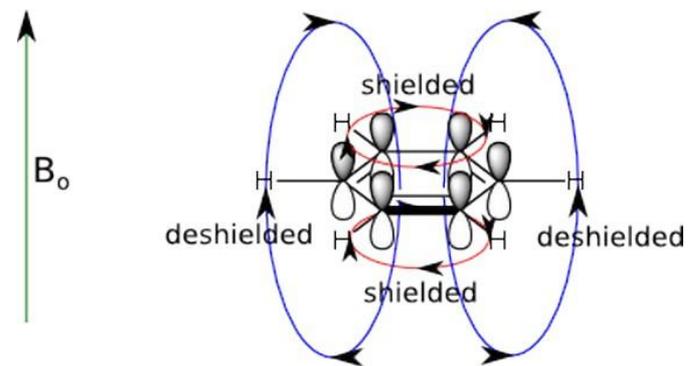
Химический сдвиг



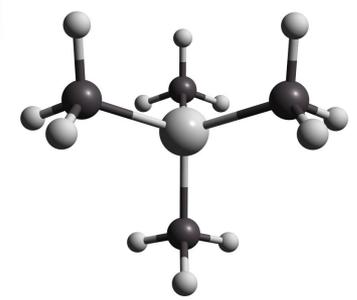
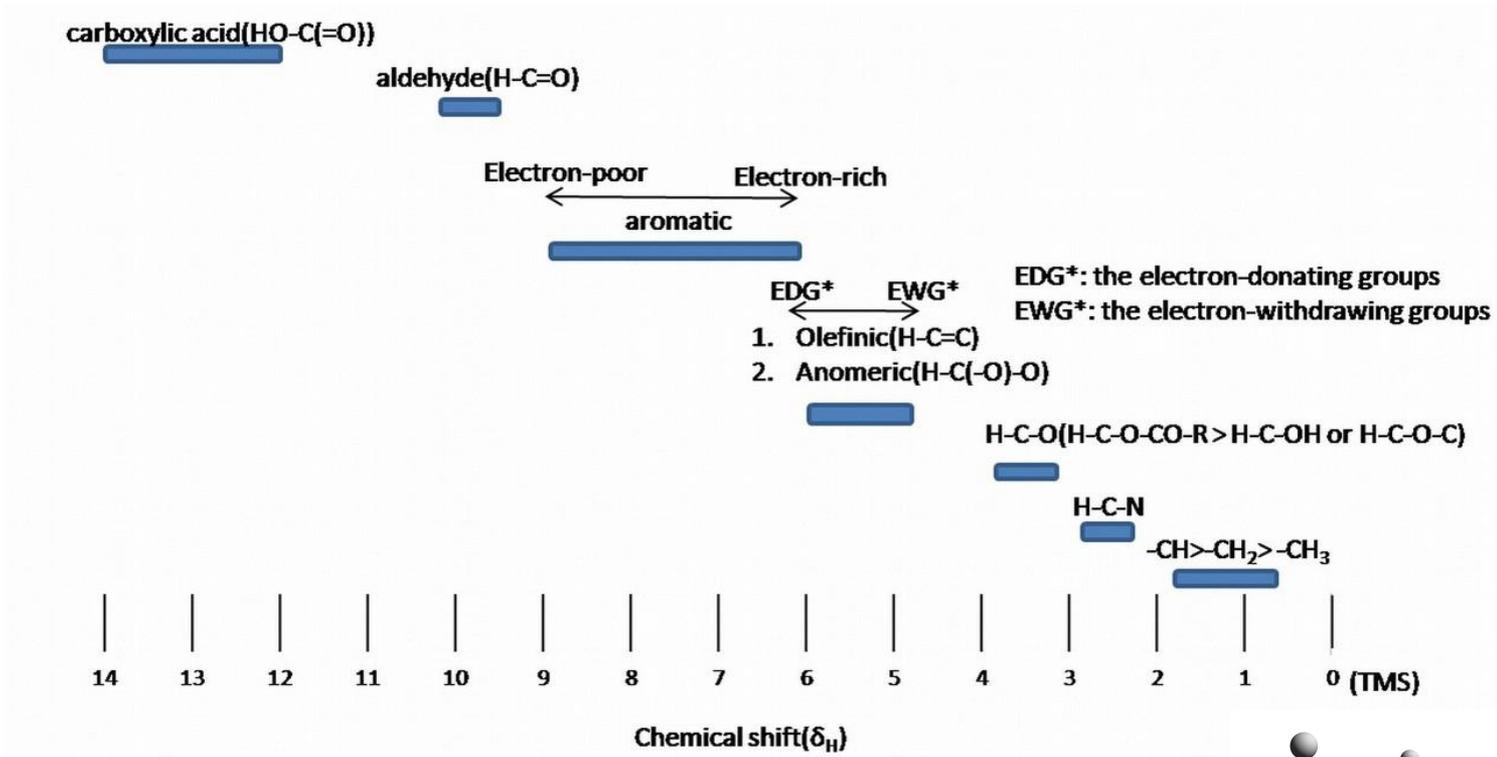
$$\nu = \frac{\gamma}{2\pi} B_0 (1 - \sigma)$$

$$\sigma = 1 - \left(\frac{2\pi\nu}{\gamma B_0} \right)$$

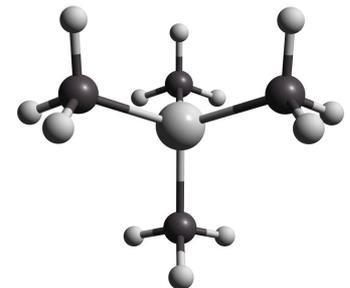
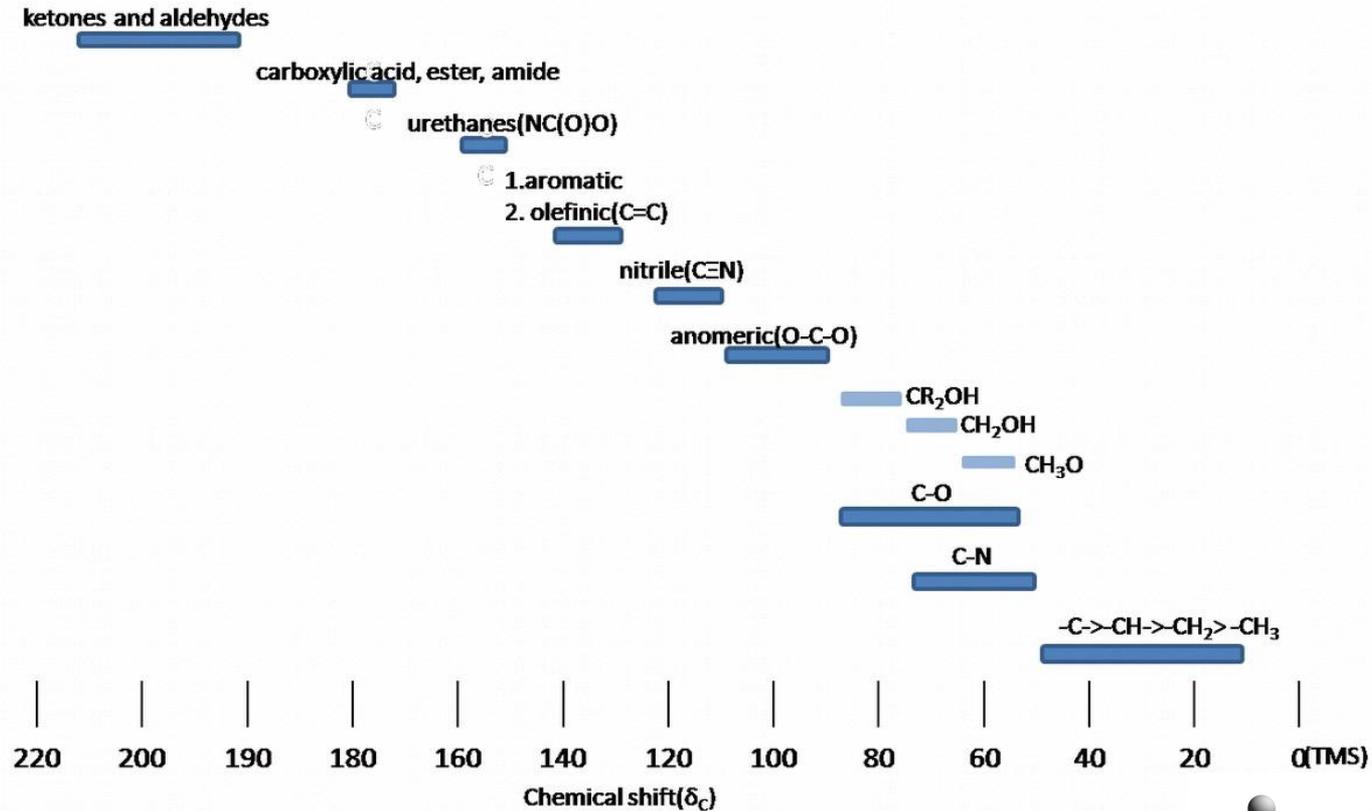
$$\sigma = \frac{e^2}{3mc^2} \int \frac{\rho(r)}{r} dr$$



Химические сдвиги ^1H

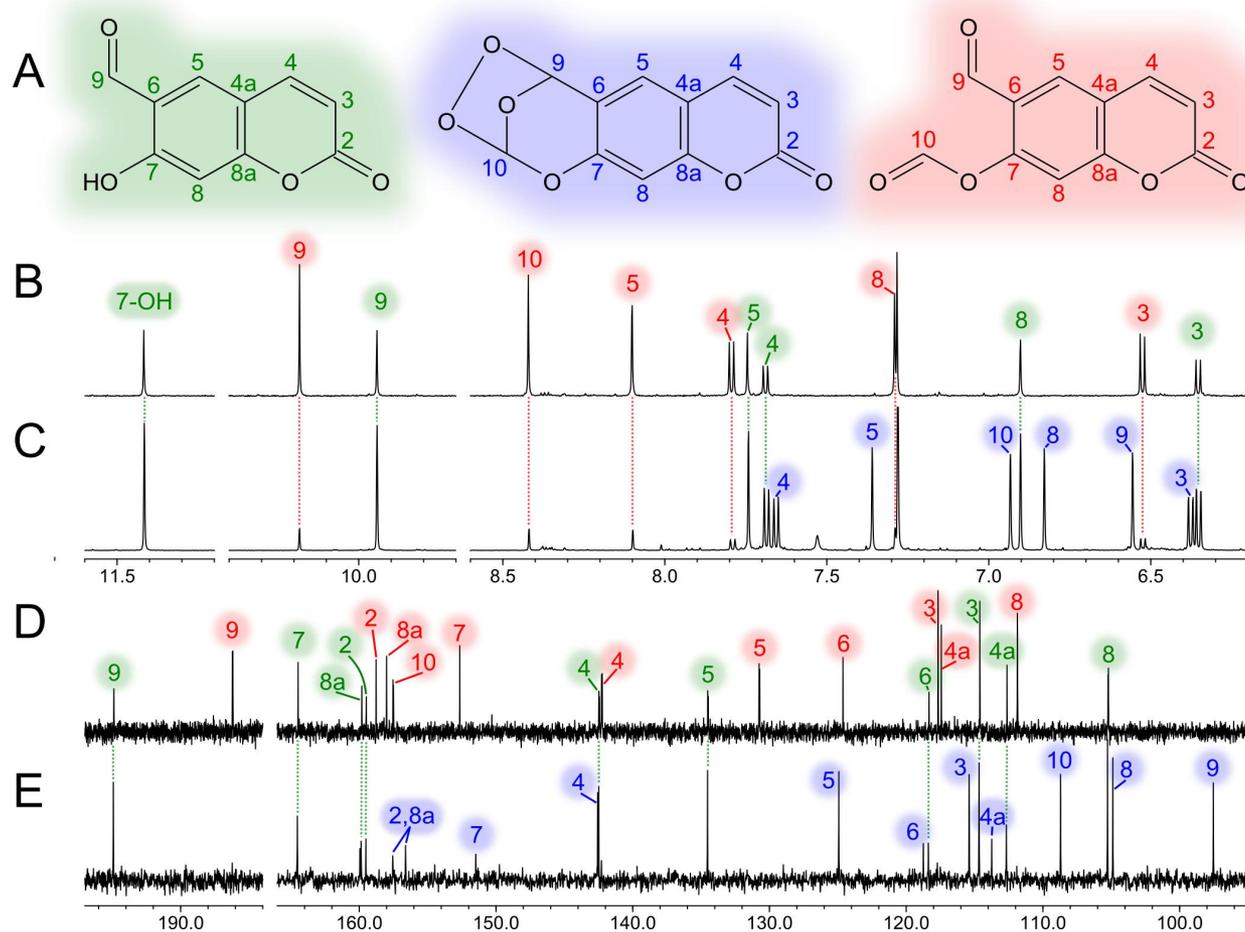


Химические сдвиги ^{13}C



Химические сдвиги разные у разных атомов, даже у очень похожих

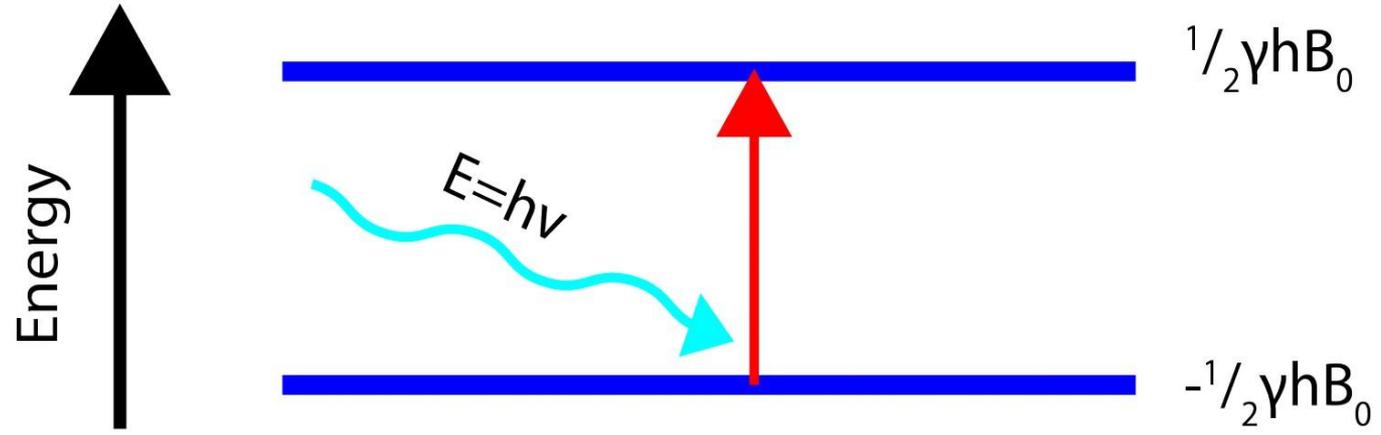
RCS Adv **2014**,
106(4)
61277-61280



Чувствительность ЯМР

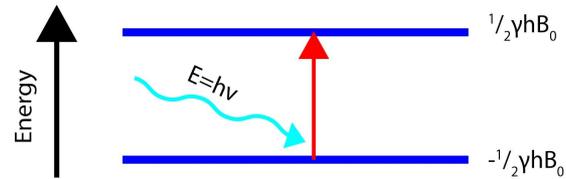
$$\frac{N_{+1/2}}{N_{-1/2}} = e^{\frac{-\Delta E}{kT}} = e^{\frac{-\hbar \gamma B_0}{kT}} \approx 1 - \frac{\hbar \gamma B_0}{kT} \approx 1 - 10^{-5}$$

Sens $\propto \gamma B_0$



Чувствительность ЯМР

$$Sens \propto \gamma B_0$$



- Повышаем B_0 — сверхпроводящие магниты
- Работаем с ядрами с высоким γ (^1H , ^{19}F)
- Снимаем все частоты сразу — Фурье-ЯМР
- Уменьшаем шум в усилителях сигнала — криогенно-охлажденные датчики
- Обогащаем образец редкими изотопами (^{13}C , ^{15}N)
- Оптимизируем ЯМР-эксперименты

Применение ЯМР-спектроскопии

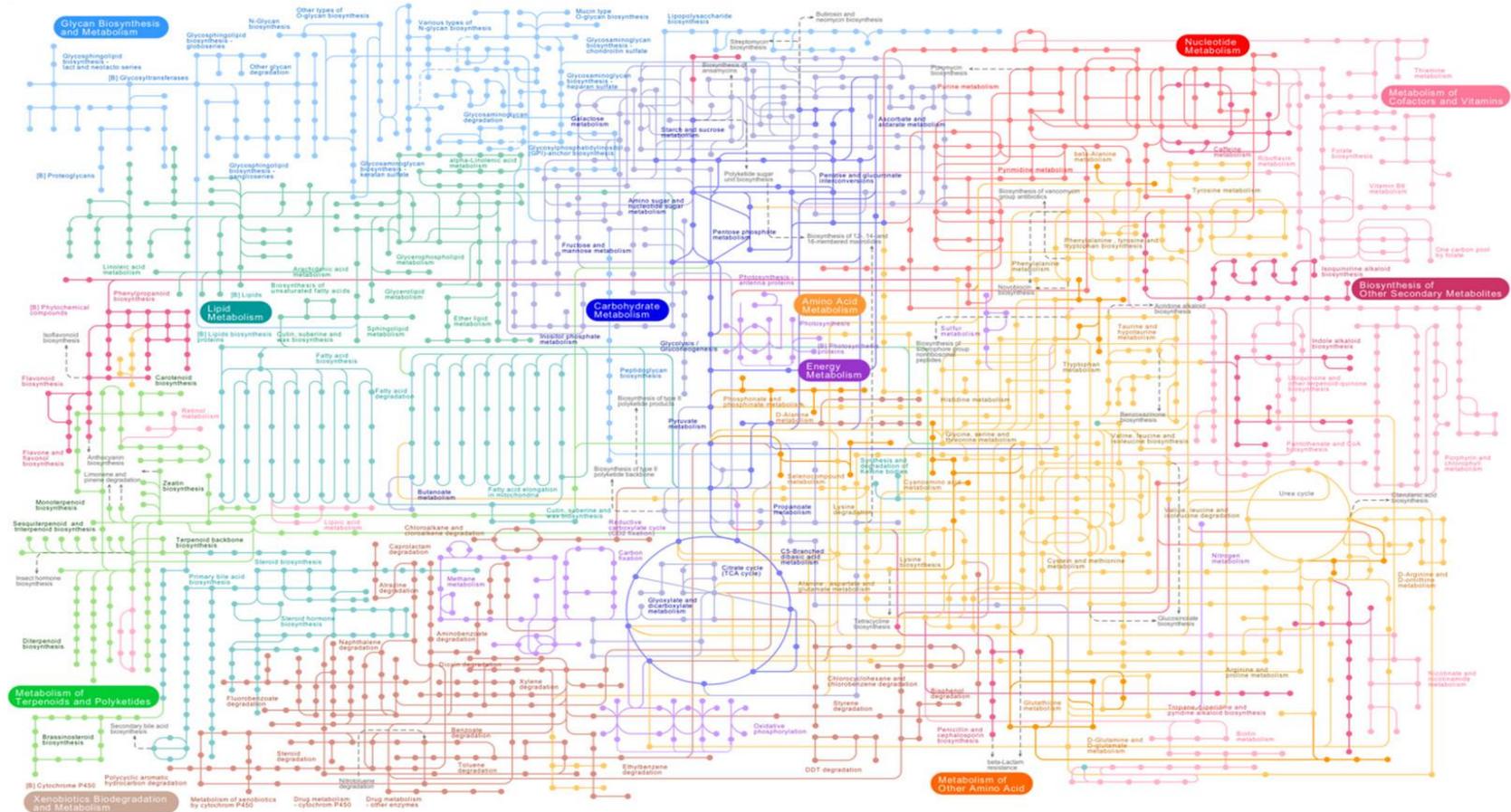
- **Оценка чистоты, контроль химических реакций**
- **Идентификация неизвестных химических соединений**
- **Метаболомика**
- **Получение структуры низкомолекулярных соединений**
- 3D структура макромолекул
- Локализация интерфейсов межмолекулярных взаимодействий
- Исследования подвижности макромолекул, кинетики, термодинамики конформационных переходов
- Свойства неупорядоченных белков
- Структура переходных состояний
- Верификация МД -траекторий, уточнение силовых полей

Где нужны химические формулы?

- **Установление химических формул** новых природных соединений при «нулевых» исходных данных
- **Контроль химического синтеза** положение защитных и реакционных групп, идентификация продуктов реакций
- **Промышленный шпионаж**
То же самое, но для «рукотворных» соединений

Метаболические пути живой клетки

http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?map01100



Физические методы

которые могут помочь для установления структурной формулы

- **ЯМР-спектроскопия**

- «+» Структурная формула или её фрагменты

- «-» Низкая чувствительность

- **Масс-спектрометрия**

- «+» Брутто-формула вещества и фрагментов

- «+» Высокая чувствительность

- «-» Не всё «летит», нет структурной информации

- **ИК-спектроскопия**

- «+» Наличие/отсутствие функциональных групп

- «-» Нет структурной информации

- **Рентгеноструктурный анализ**

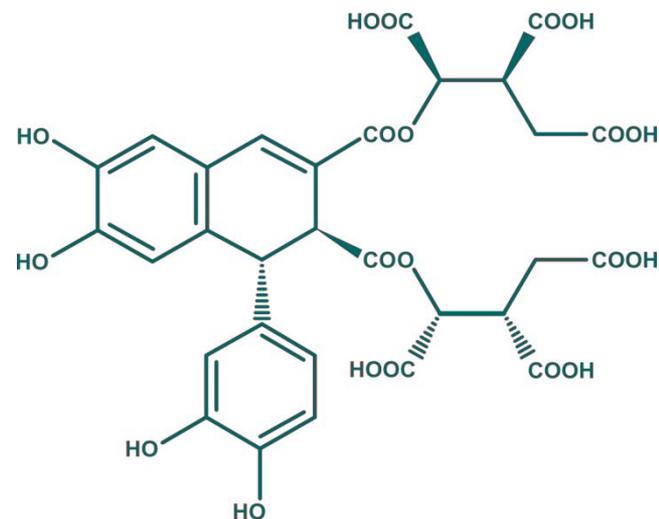
- «+» Структурная формула и пространственная структура

- «-» Нужен кристалл

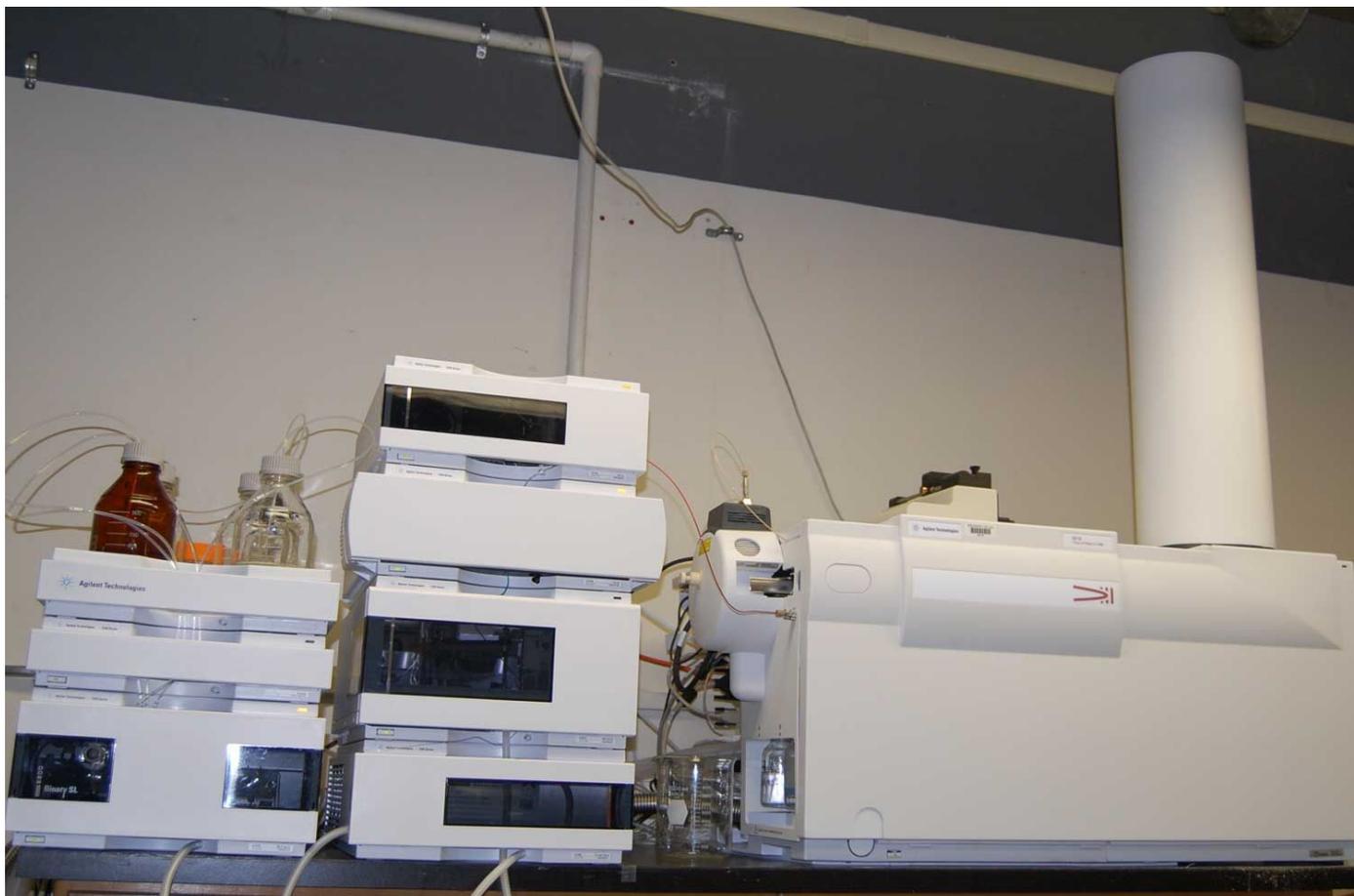
Два пути к структурной формуле

• Масс-спектры

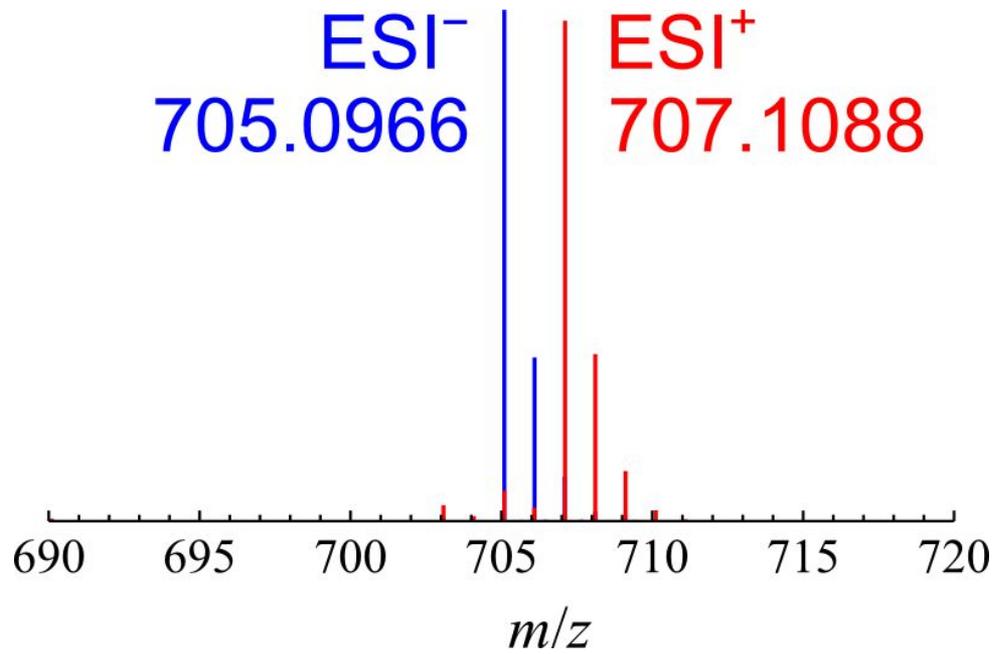
• ЯМР спектры



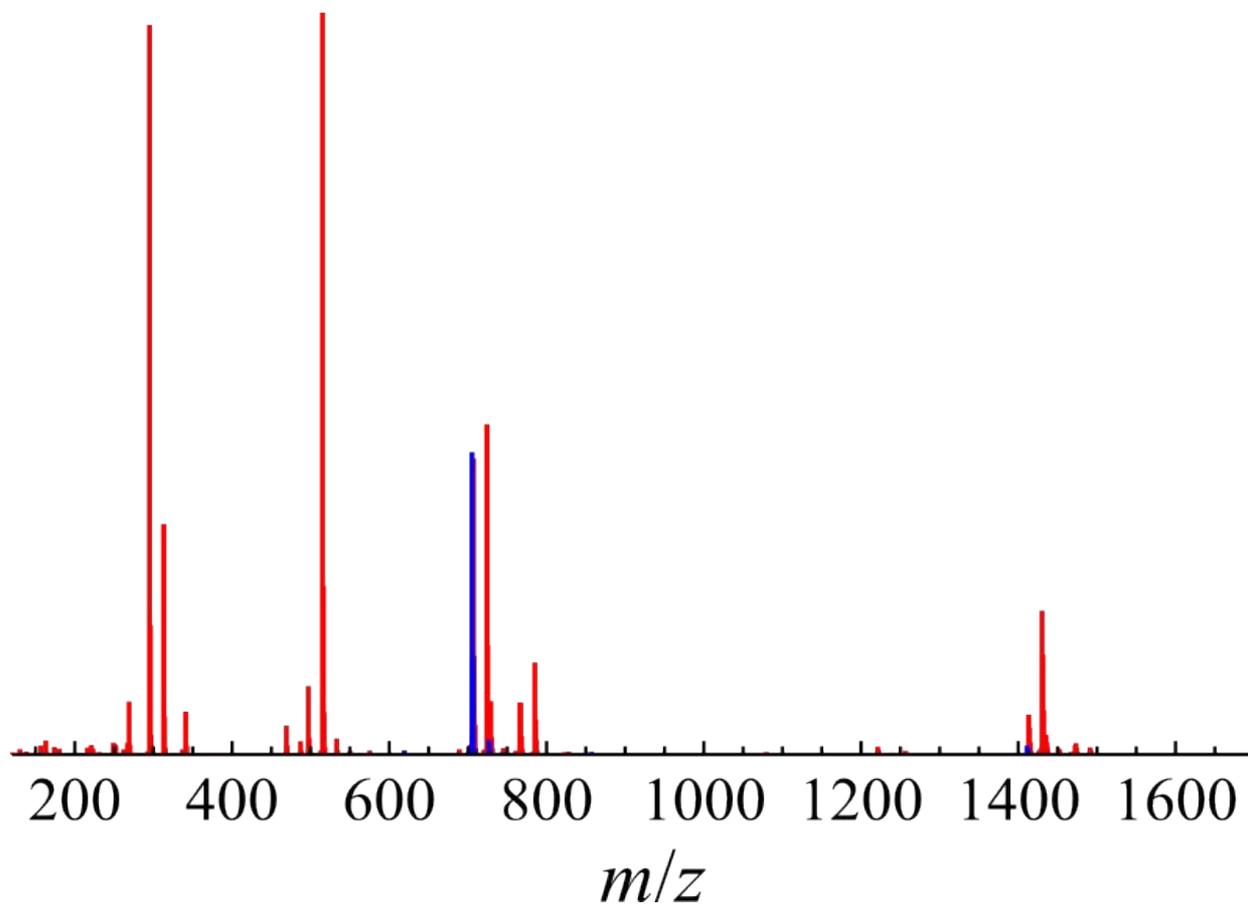
Современный масс-спектрометр



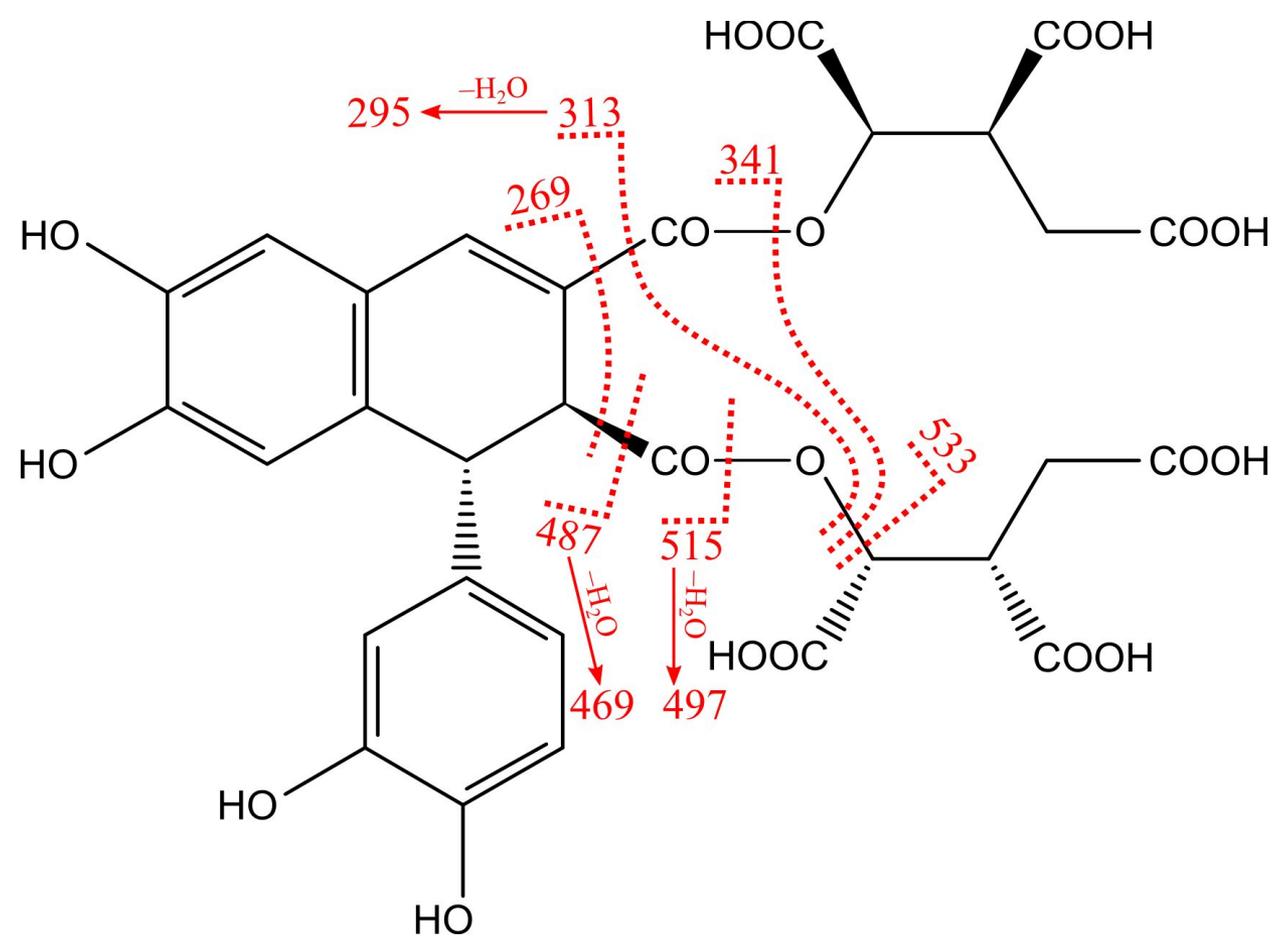
Масс спектр



На самом деле :(



Если известна формула



Если известна масса?

пример: ESI MH⁺=324.1067

Перебираем варианты: C₀₋₃₀H₀₋₆₀N₀₋₅O₀₋₂₀

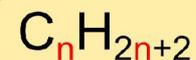
	Масса	Невязка
C ₁₃ H ₁₅ N ₄ O ₆	324.106437	-0.000252
C ₀ H ₂₃ N ₂ O ₁₇	324.106954	+0.000265 ???
C ₁₅ H ₁₇ N ₁ O ₇	324.107780	+0.001091
C ₁₂ H ₁₉ N ₀ O ₁₀	324.105101	-0.001588
C ₁₆ H ₁₃ N ₅ O ₃	324.109116	+0.002427
C ₁₀ H ₁₇ N ₃ O ₉	324.103758	-0.002931
C ₃ H ₂₁ N ₃ O ₁₄	324.109633	+0.002944
C ₁₈ H ₁₅ N ₂ O ₄	324.110459	+0.003770
C ₅ H ₂₃ N ₀ O ₁₅	324.110976	+0.004287

Как убрать очевидную

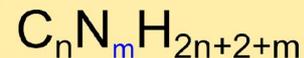
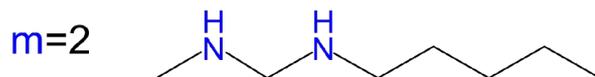
Ненасыщенность (unsaturation)

http://www.chemcalc.org/mf_finder/mfFinder_em_new

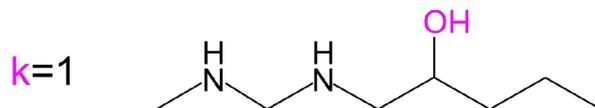
Насыщенный $n=n_C$ углеводород:



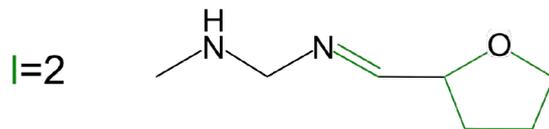
То же, с $m=n_N$ азотами:



То же, с $k=n_O$ кислородами:



То же, с l -кратной ненасыщенностью:



Число протонов $h=n_H=2n+m+2-2l$

Степень ненасыщенности $l=n+1+(h-m)/2$

Степень ненасыщенности l должна быть целым числом!

$$l=n_C+1-(n_H-n_N)/2$$

С учетом ненасыщенности

ESI MH⁺=324.1067

Перебираем варианты: C₀₋₃₀H₀₋₆₀N₀₋₅O₀₋₂₀

	Ненасыщ.	Масса	Невязка
C ₁₃ H ₁₅ N ₄ O ₆	9.5	324.106437	-0.000252
C ₀ H ₂₃ N ₂ O ₁₇	-9.5	324.106954	+0.000265
C ₁₅ H ₁₇ N ₁ O ₇	8.0	324.107780	+0.001091
C ₁₂ H ₁₉ N ₀ O ₁₀	3.5	324.105101	-0.001588
C ₁₆ H ₁₃ N ₅ O ₃	13.0	324.109116	+0.002427
C ₁₀ H ₁₇ N ₃ O ₉	4.0	324.103758	-0.002931
C ₃ H ₂₁ N ₃ O ₁₄	-5.0	324.109633	+0.002944
C ₁₈ H ₁₅ N ₂ O ₄	12.5	324.110459	+0.003770
C ₅ H ₂₃ N ₀ O ₁₅	-5.5	324.110976	+0.004287

Современные ЯМР спектрометры



На чем снимаем?

Ядро	Спин	Естественное содержание	Резонансная частота (600 МГц)	Относительная чувствительность (в сравнении с ^{13}C)
^1H	$+1/2$	99.98%	600.1 МГц	5.87×10^3
^2H	+1	0.02%	92.1 МГц	6.52×10^{-3}
^{13}C	$+1/2$	1.07%	150.9 МГц	1.00
^{15}N	$-1/2$	0.364%	60.8 МГц	2.23×10^{-2}
^{31}P	$+1/2$	100.0%	242.9 МГц	3.91×10^2
^{19}F	$+1/2$	100.0%	564.7 МГц	4.89×10^3

Что снимаем?

- **Одномерный ^1H спектр**
от секунд до минут
- **Двумерные ^1H - ^1H (гомоядерные) спектры**
от 10 минут до 12 часов
- **Двумерные ^1H - ^{13}C (гетероядерные) спектры**
от 10 минут до 12 часов
- **Одномерный ^{13}C спектр**
от 10 минут до 12 часов
- **+ Другие спектры** на ядрах ^{15}N , ^{31}P , ^{19}F и пр.

Когда НЕ снимаем?

- **Когда не растворяется** ни в одном из растворителей, используемых в ЯМР.
- **Когда мало вещества:**
 - Для ^1H спектров: до 0.1 мг
 - Для ^{13}C спектров: до 5-10 мг («видно глазом»)
 - Для ^{15}N спектров (только ^{15}N -HMBC): до 20 мг
- **Когда много примесей.** В образце должно быть 1-2 основных компонента + растворитель, остальное – в концентрации в 5-10 раз меньше.

Растворители для ЯМР спектроскопии: H_2O

- $\text{H}_2\text{O} + 10\% \text{D}_2\text{O}$. Используется для расчета структур белков в естественном окружении, а так же для съемки спектров любых соединений, растворимых в воде.
- **Сигнал растворителя:** $^1\text{H} = 4.7$ м.д.
- **Присутствуют** ^1H сигналы: NH , NH_2 , NH_3^+ .
- **Отсутствуют** ^1H сигналы: OH , COOH , PO_3^{-4}H , $\text{SO}_3\text{-4H}$
- **Съемка спектров:** любых, кроме HMBC. Искажены величины интегралов из-за подавления растворителя

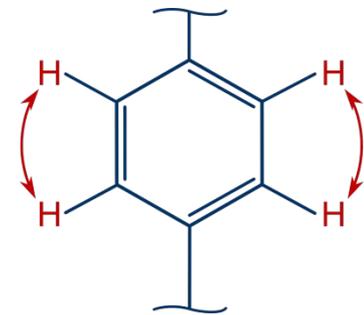
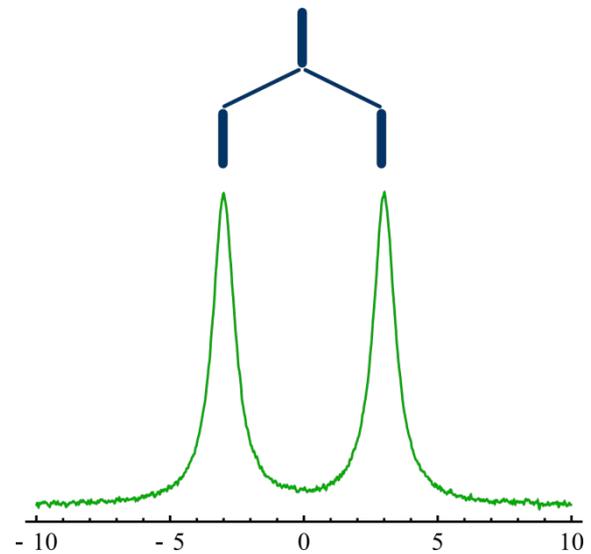
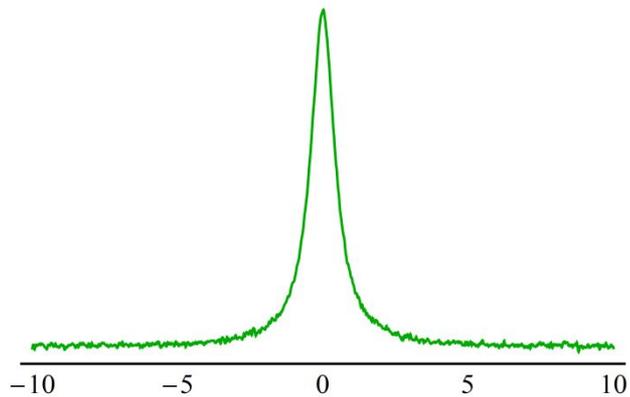
Растворители для ЯМР спектроскопии: D_2O ($D=^2H$)

- Хорошо подходит для образцов, не содержащих NH , NH_2 групп. Для белков медленная скорость обмена $NH \leftrightarrow ND$ говорит о наличии водородной связи.
- **Сигнал растворителя:** $1H = 4.7$ м.д.
- **Отсутствуют** 1H сигналы: те же, что и в $H_2O + NH$, NH_2 , NH_3^+
- **Съемка спектров:** любых

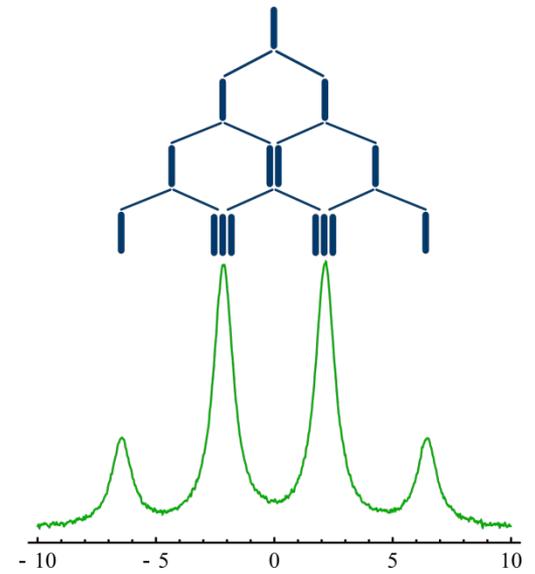
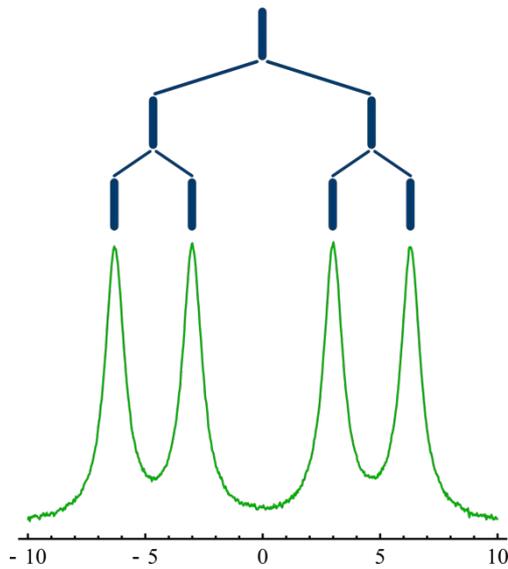
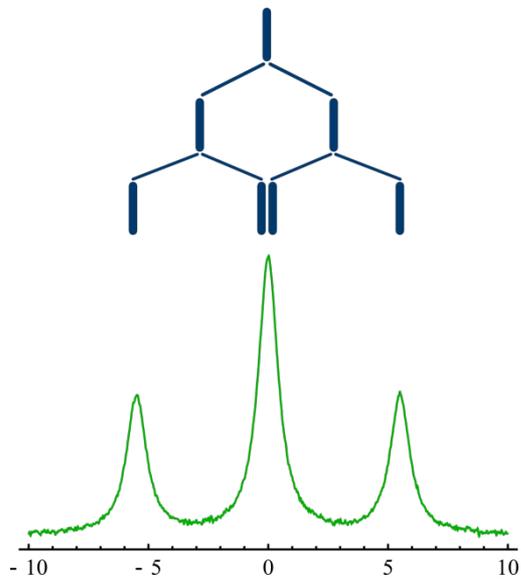
Другие растворители

Формула	¹ H, м.д. (мультиплетность)	¹³ C, м.д. (мультиплетность)	Сигнал NOD	Примечания
Метанол-d _{3,4}	4.78(1) 3.31(5)	49.15(7)	4.9	Протонный, гидрофильный
DMSO-d ₆	2.50(5)	39.51(7)	3.3	Апротонный, гигроскопичный
CDCl ₃	7.24(1)	77.23(3)	1.5	Апротонный, Гидрофобный
Этанол-d _{5,6}	5.19(1) 3.56(1) 1.11(m)	56.96(5) 17.31(7)	5.3	Протонный, гидрофильный
Ацетон-d ₆	2.05(5)	29.92(7) 206.68(1)	2.8	Апротонный
Цикло- гексан-d ₁₂	1.38(1)	26.43(5)	0.8	Апротонный, гидрофобный

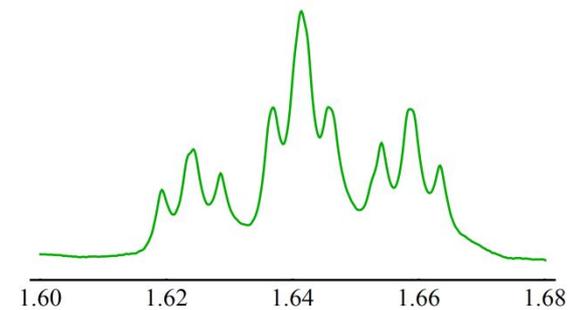
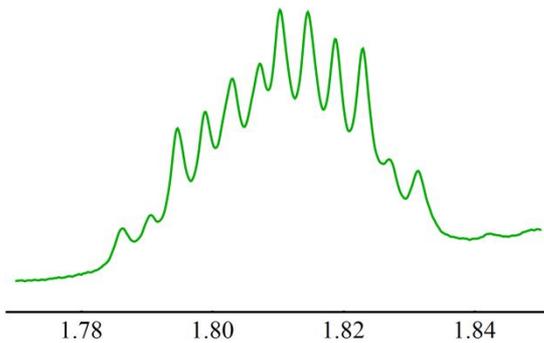
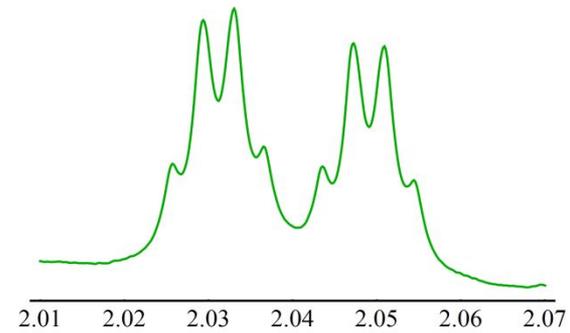
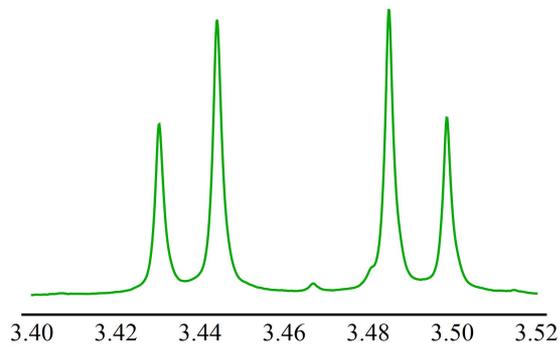
Мультиплетность сигналов ^1H



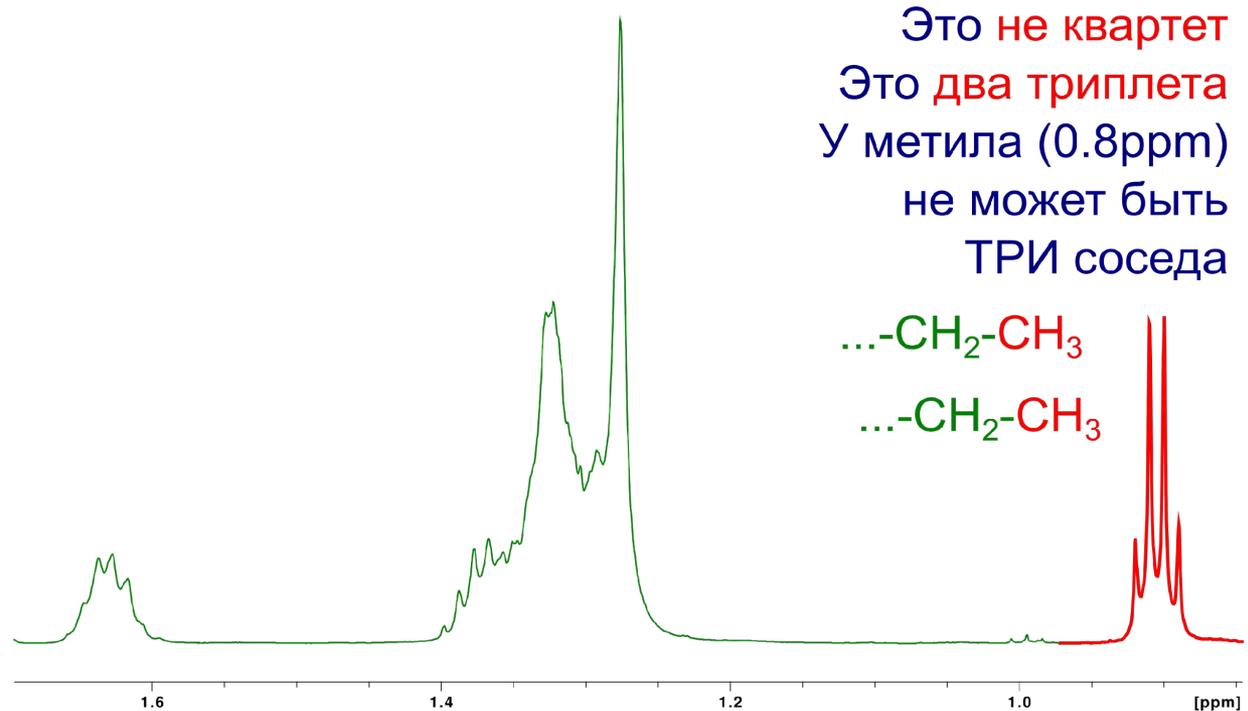
Мультиплетность сигналов ^1H



Сложные мультиплеты

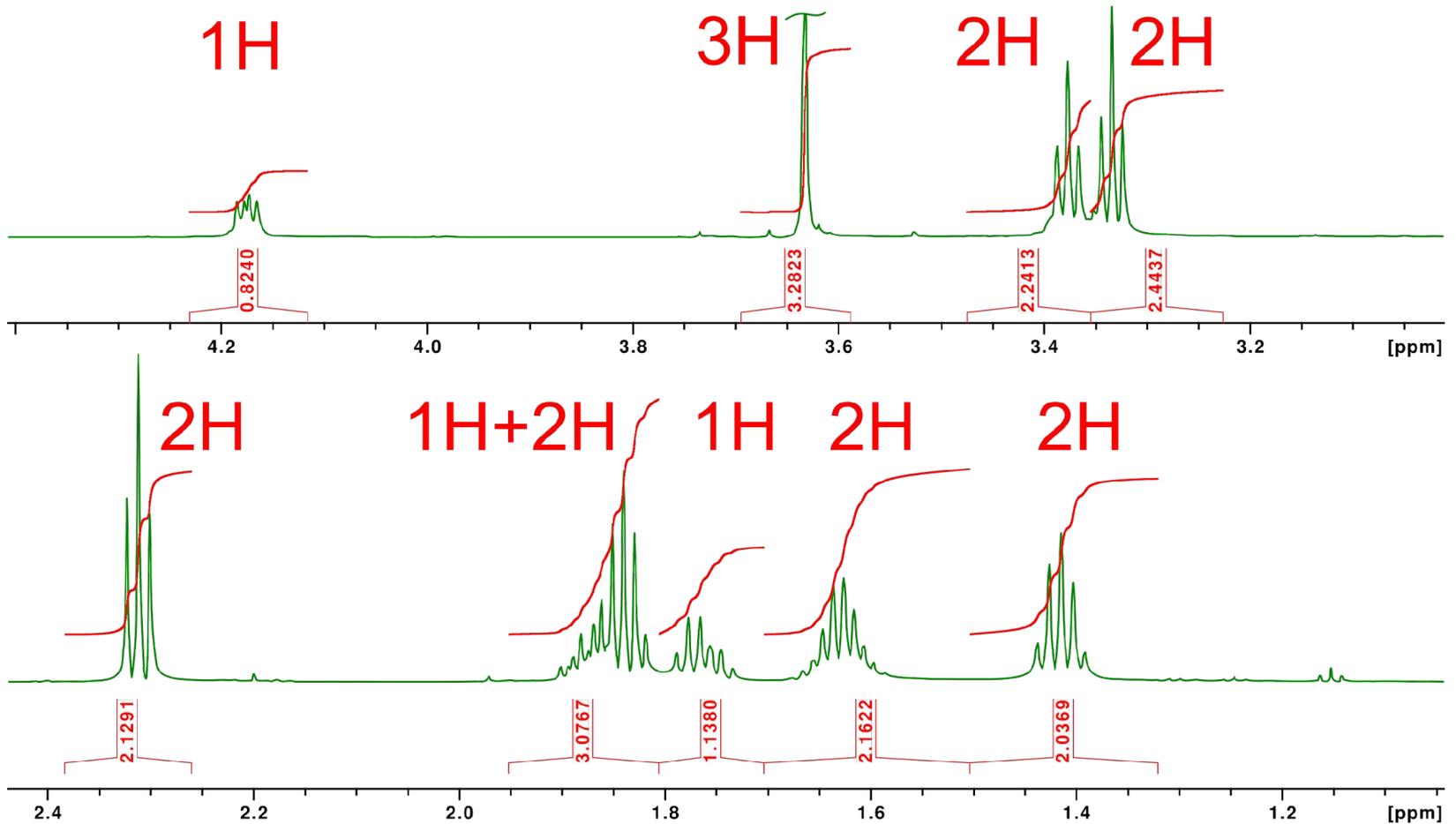


Ложные мультиплеты



Интегралы

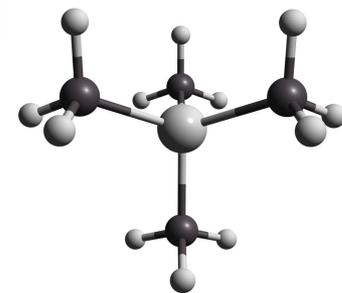
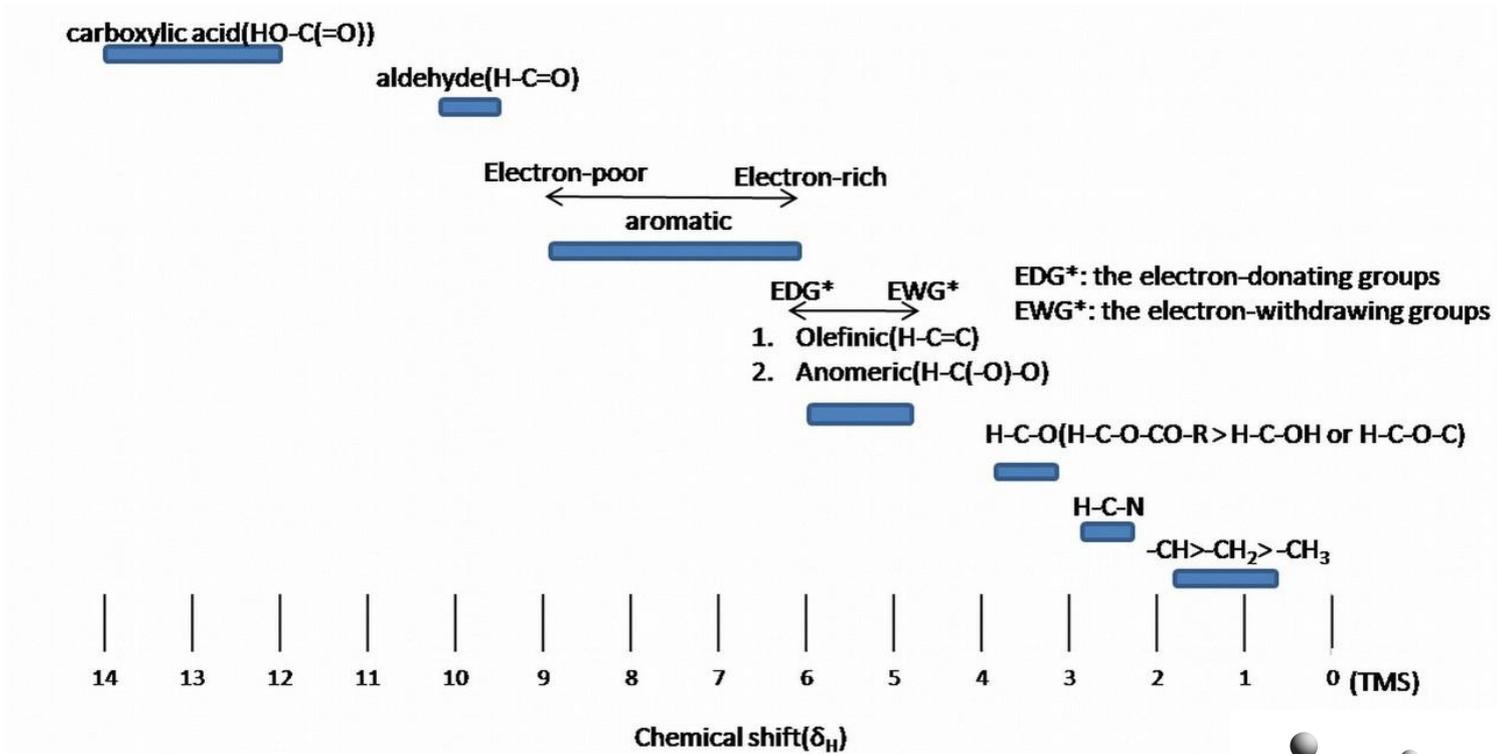
показывают число протонов в мультиплете



Химические сдвиги ^1H

- Метилы $\text{C}-\text{CH}_3$ $0 \div 1.5$ м.д.
- Метилы $\text{N}, \text{O}-\text{CH}_3$ $3-4$ м.д.
- Метилены $\text{C}-\text{CH}_{1,2}$ $1-3$ м.д.
- Метилены $\text{N}, \text{O}-\text{CH}_{1,2}$ $3-6$ м.д.
- Ароматика CH $6-7$ м.д.
- Амиды NH, NH_2 $6-11$ м.д.

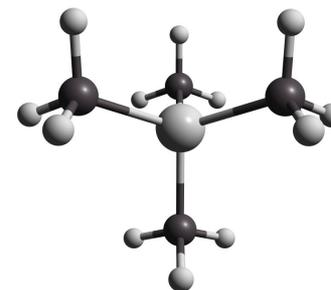
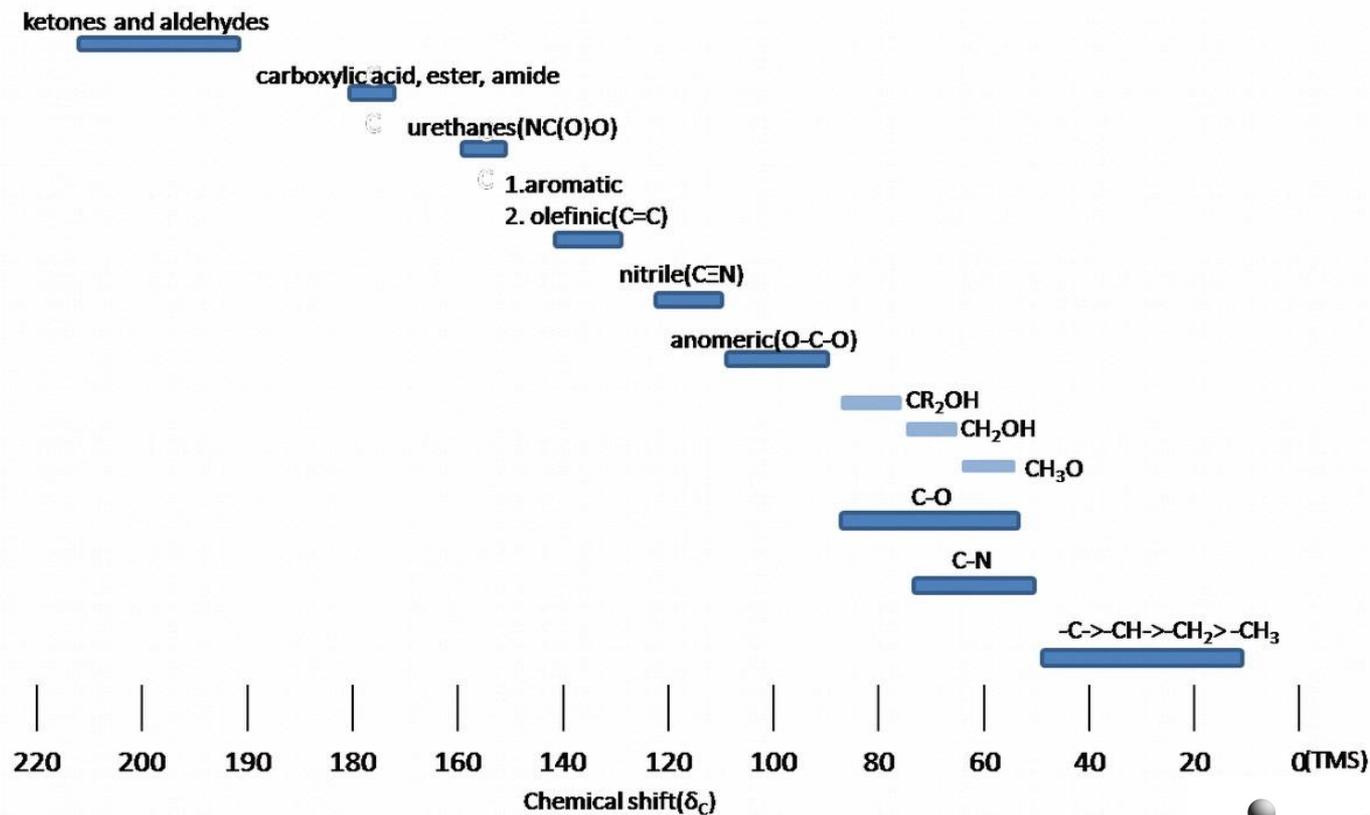
Химические сдвиги ^1H



Химические сдвиги ^{13}C

- Метилы $\text{C}-\text{CH}_3$ 5-15 м.д.
- Метилены $\text{C}-\text{CH}_{1,2}$ 20-60 м.д.
- Метилены $\text{O}-\text{CH}_{1,2}$ 60-90 м.д.
- Ароматика, C, CH 100-150 м.д.
- Олефины
- Карбоксилы $\text{C}=\text{O}$ 160-220 м.д.

Химические сдвиги ^{13}C



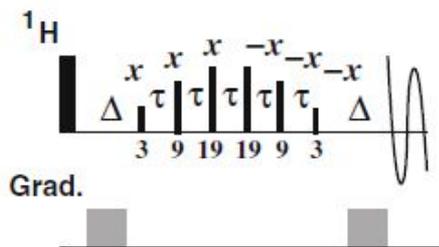
Виды 2D ЯМР спектров,

используемые для определения строения молекул

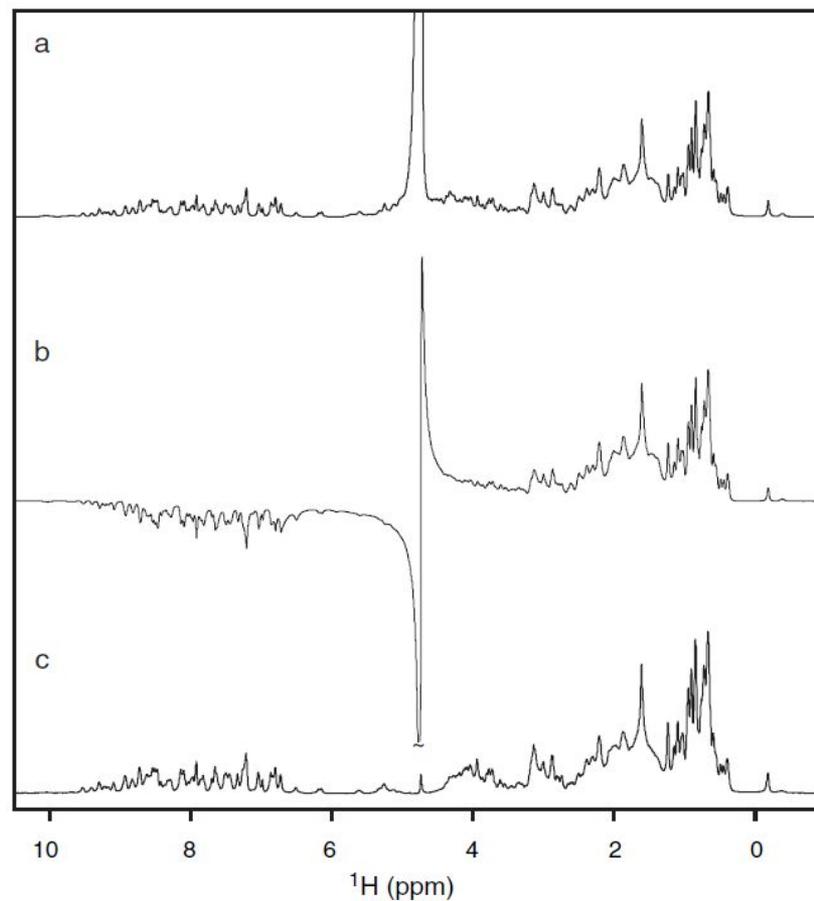
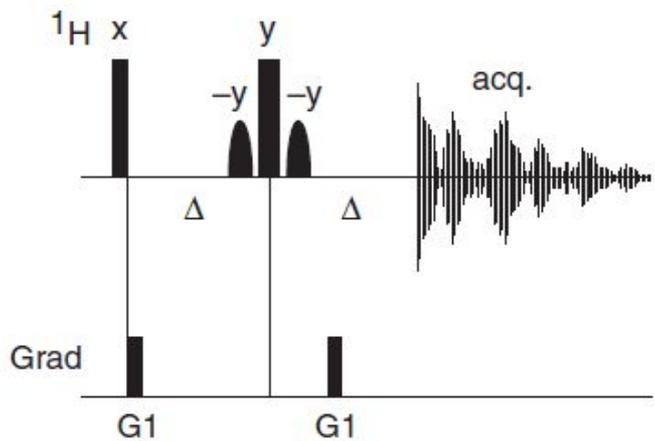
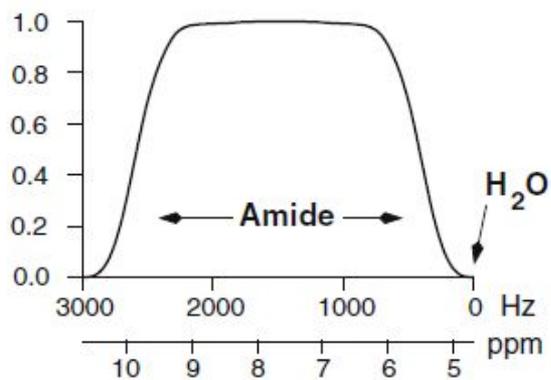
- Гомоядерная спектроскопия ($^1\text{H}^1\text{H}$):
 - **2D COSY**
 - **2D TOCSY**
 - **2D NOESY/ROESY**
- Гетероядерная спектроскопия ($^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ или $^1\text{H}^{15}\text{N}$):

Импульсные последовательности

A

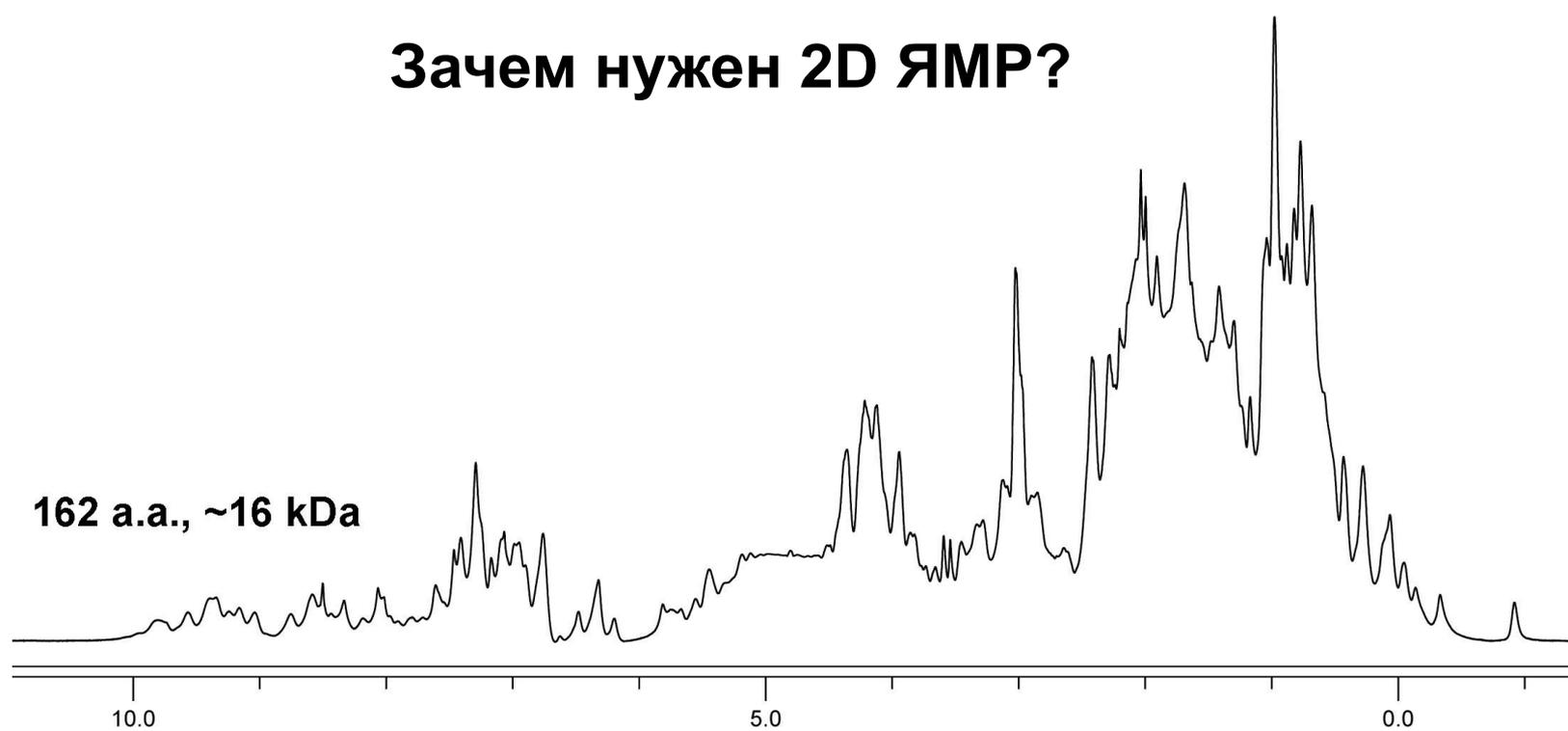


B

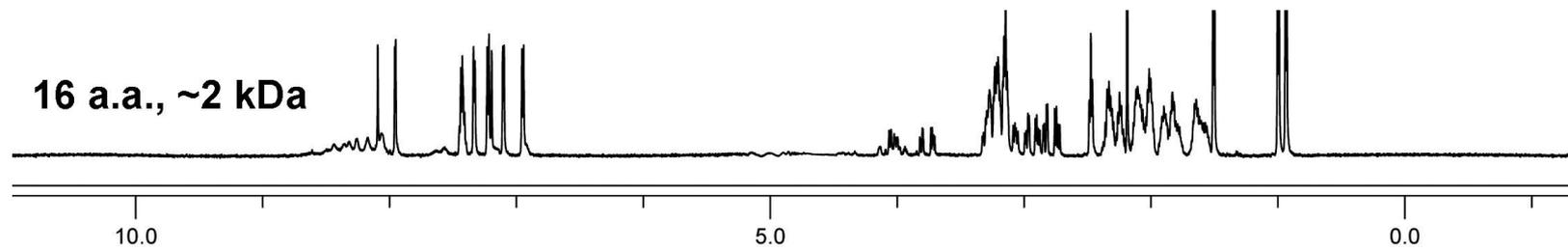


Зачем нужен 2D ЯМР?

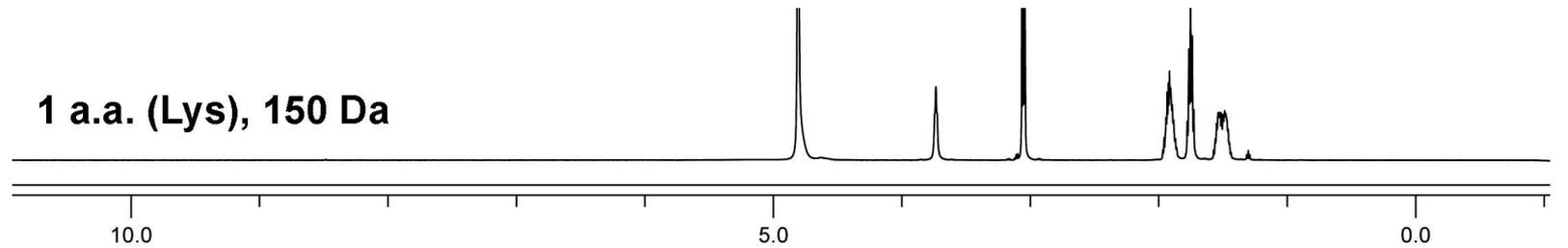
162 a.a., ~16 kDa



16 a.a., ~2 kDa



1 a.a. (Lys), 150 Da



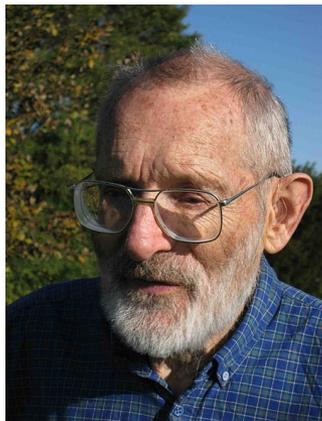
Двумерная спектроскопия ЯМР



Ричард Эрнст.

1964: Создание метода импульсной Фурье-спектроскопии ЯМР

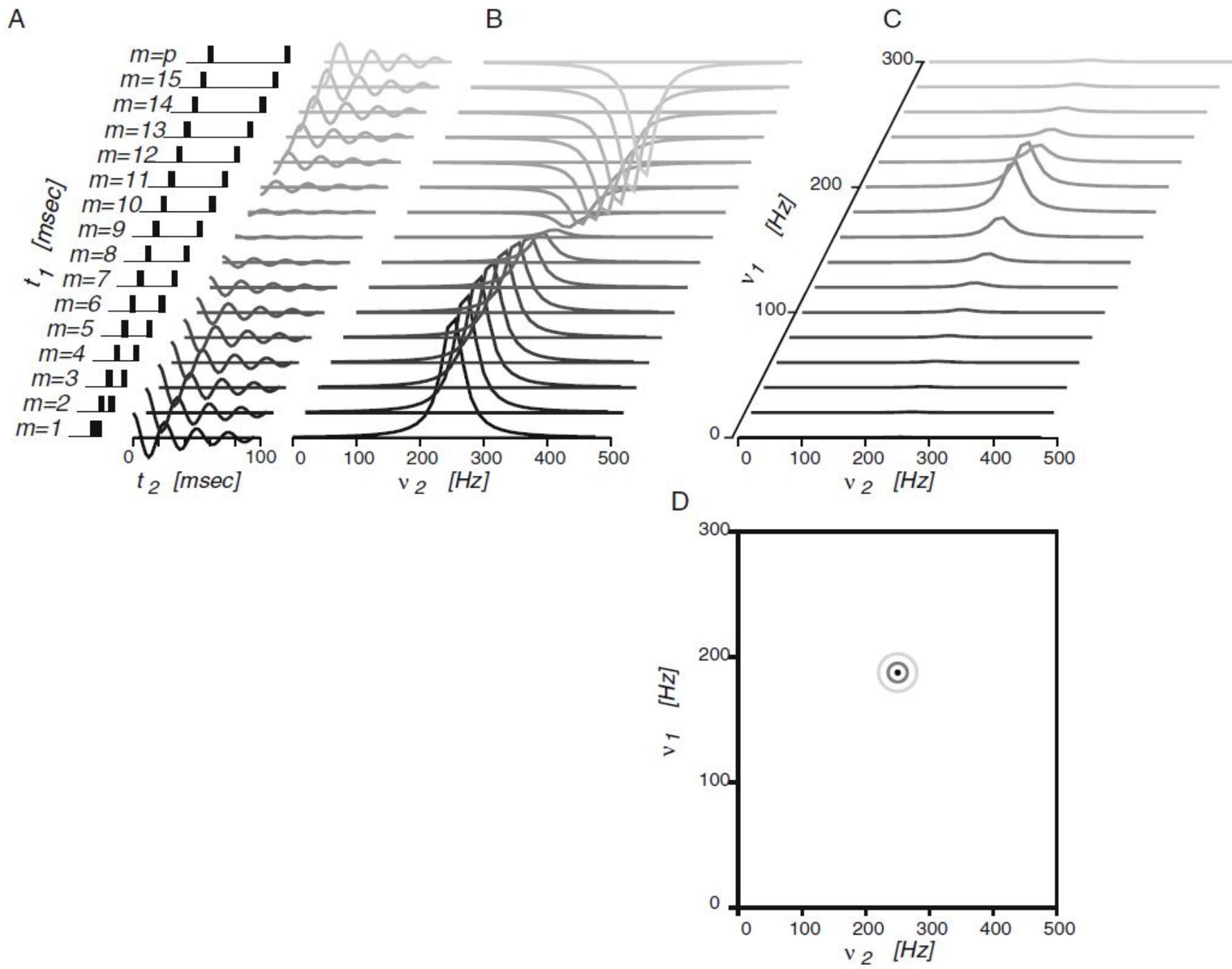
1974: Создание методов 2D спектроскопии ЯМР



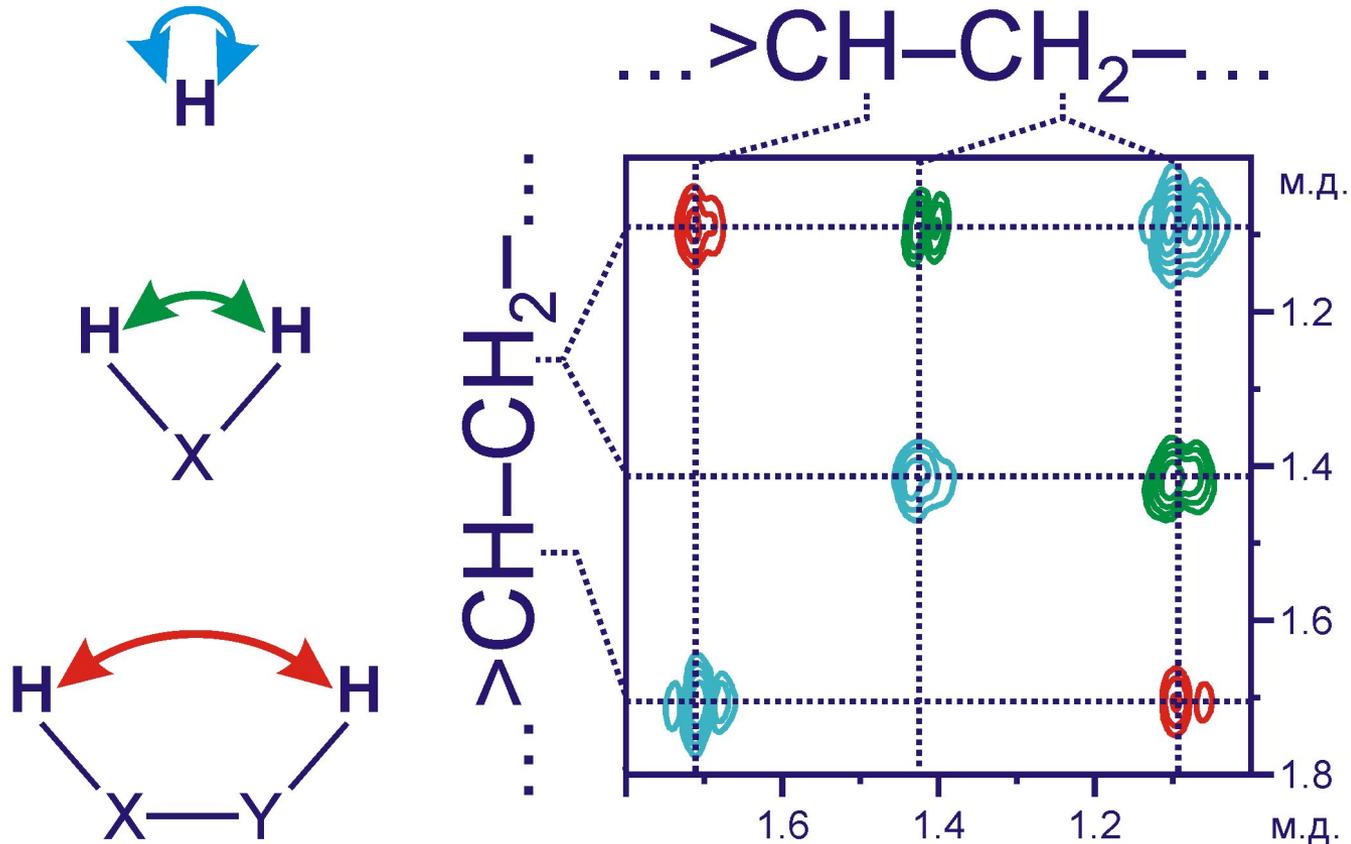
Джин Джинер.

1971. Предложена идея метода 2D спектроскопии ЯМР.

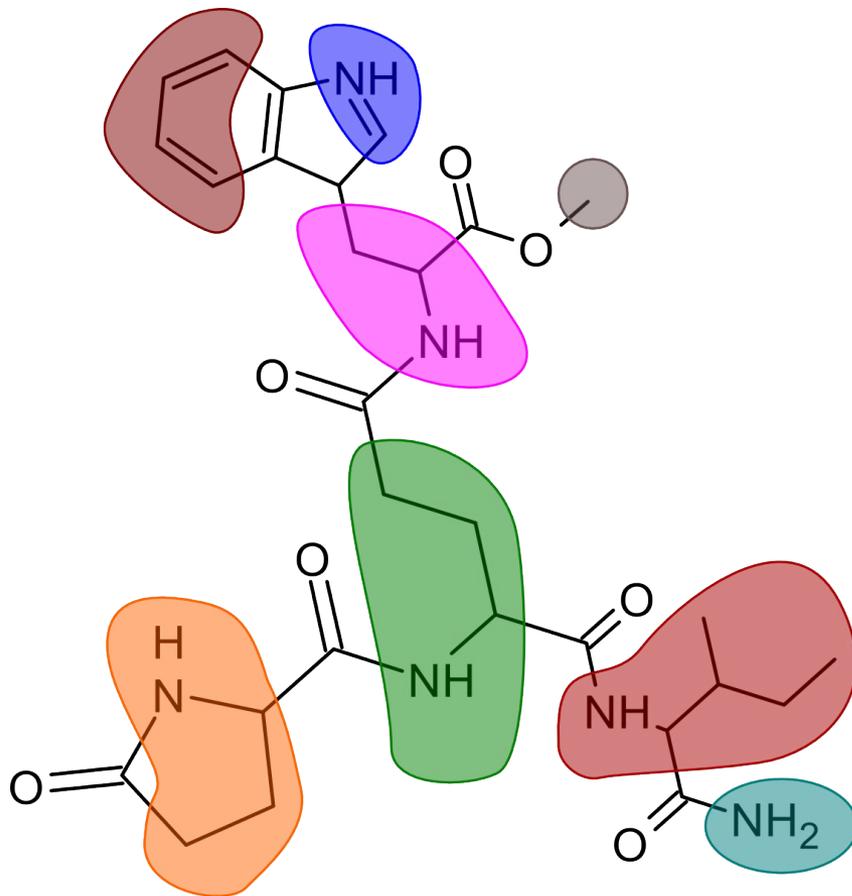
1979. Разработка совместно с Ричардом Эрнстом метода NOESY.



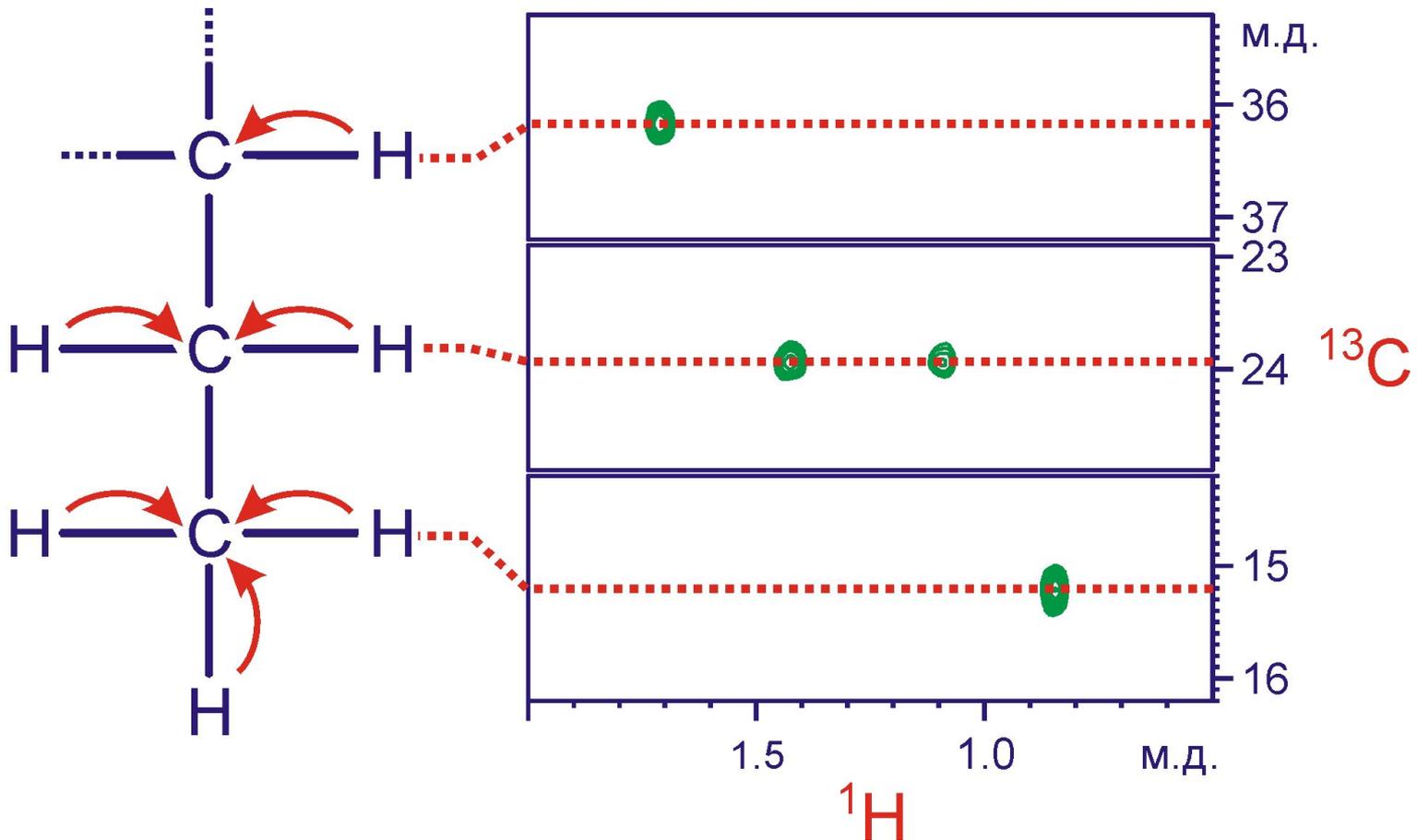
2D COSY (CORrelation SPECTROSCOPY)



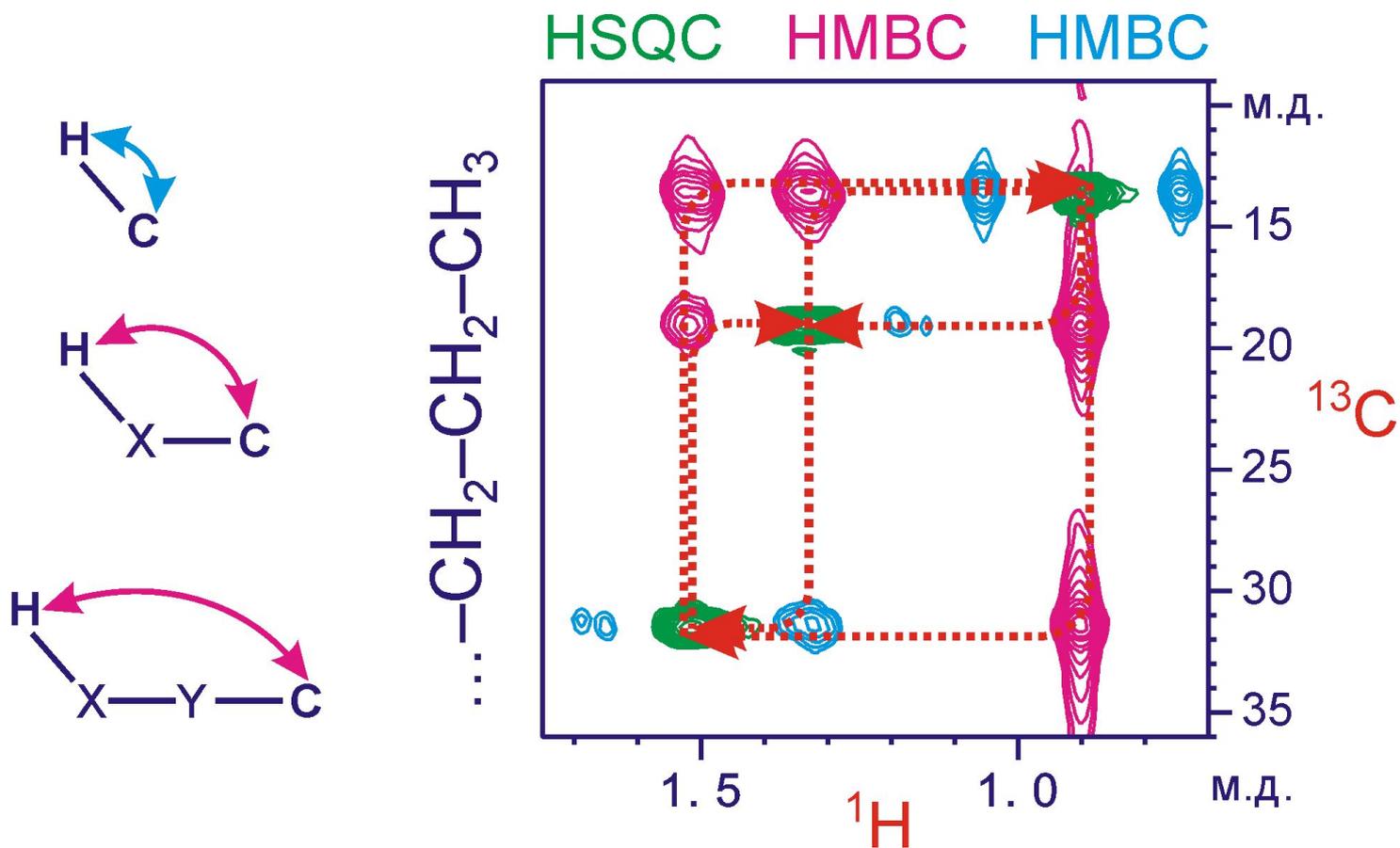
TOCSY/COSY спектры позволяют выделить **спиновые системы**



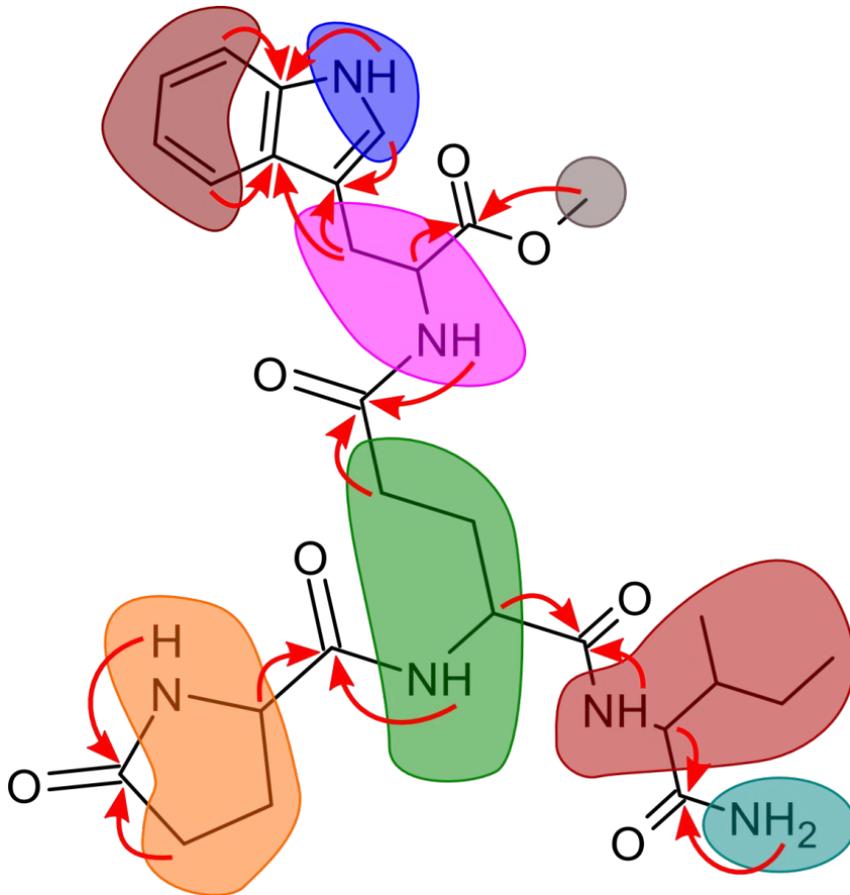
2D HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence)



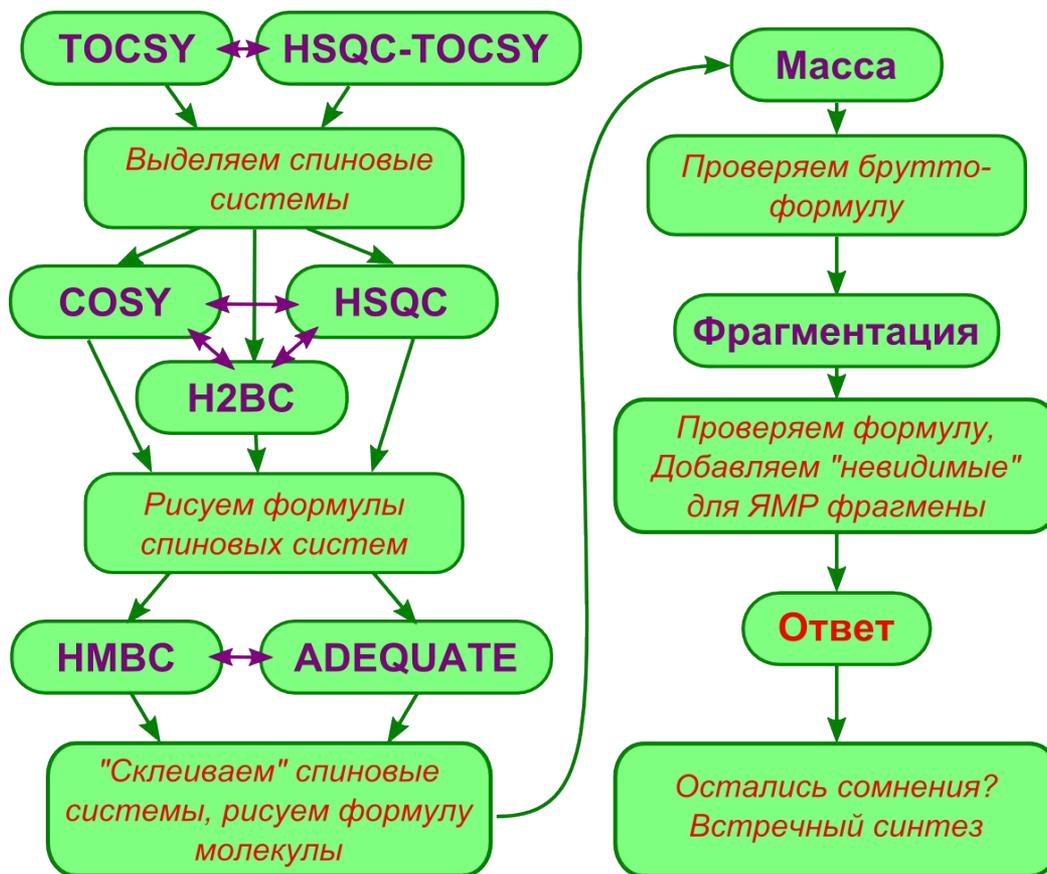
2D HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation)



НМВС связывает спиновые системы друг с другом

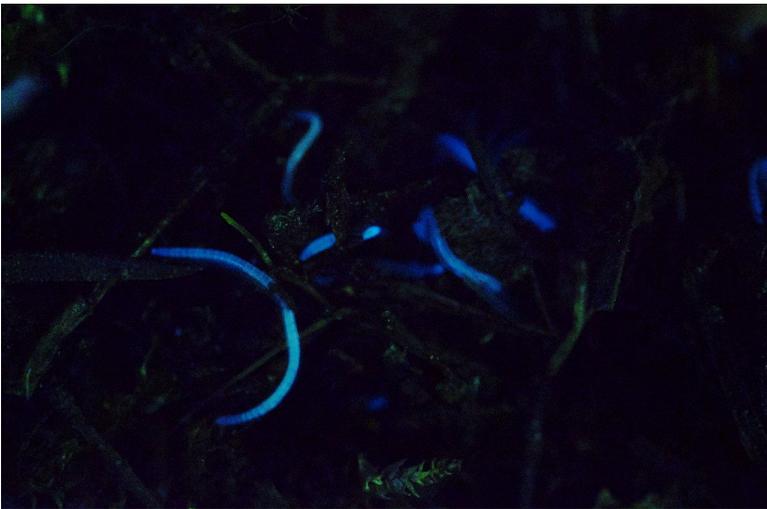


Порядок действий

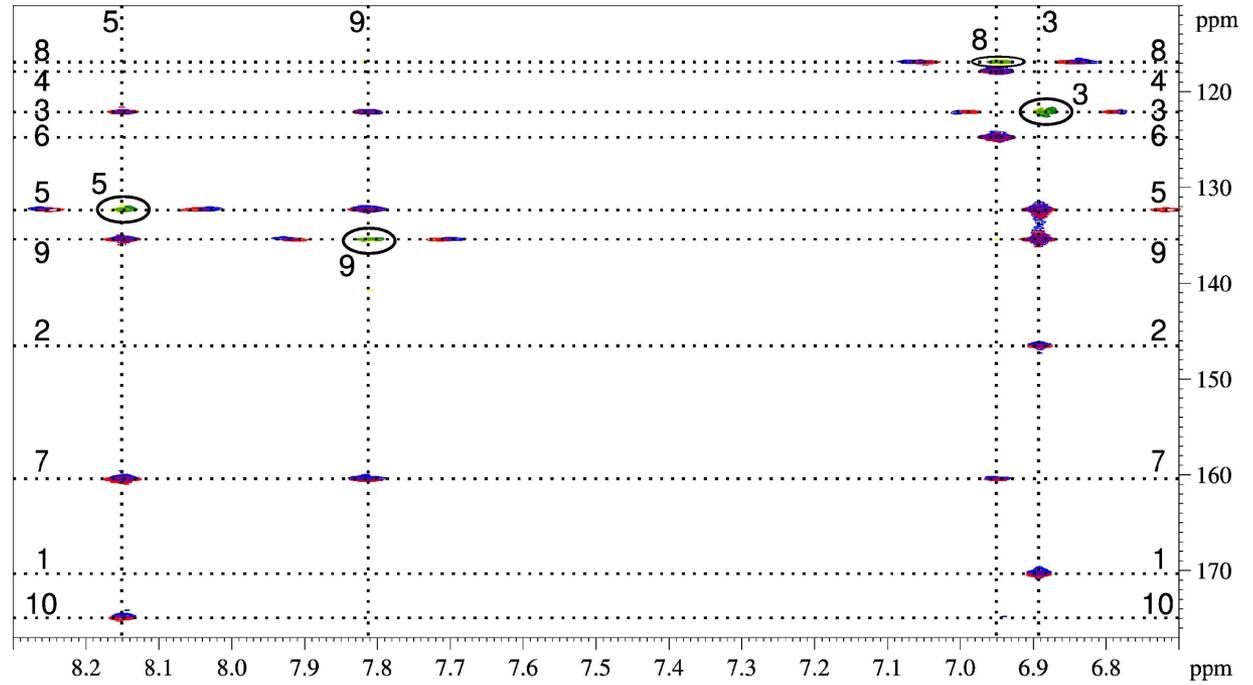
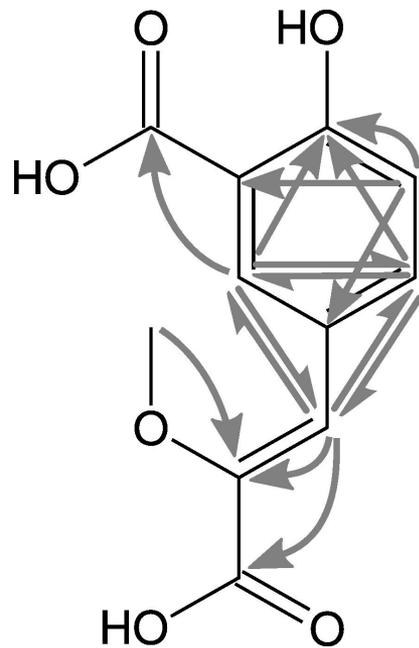


Билюминесценция

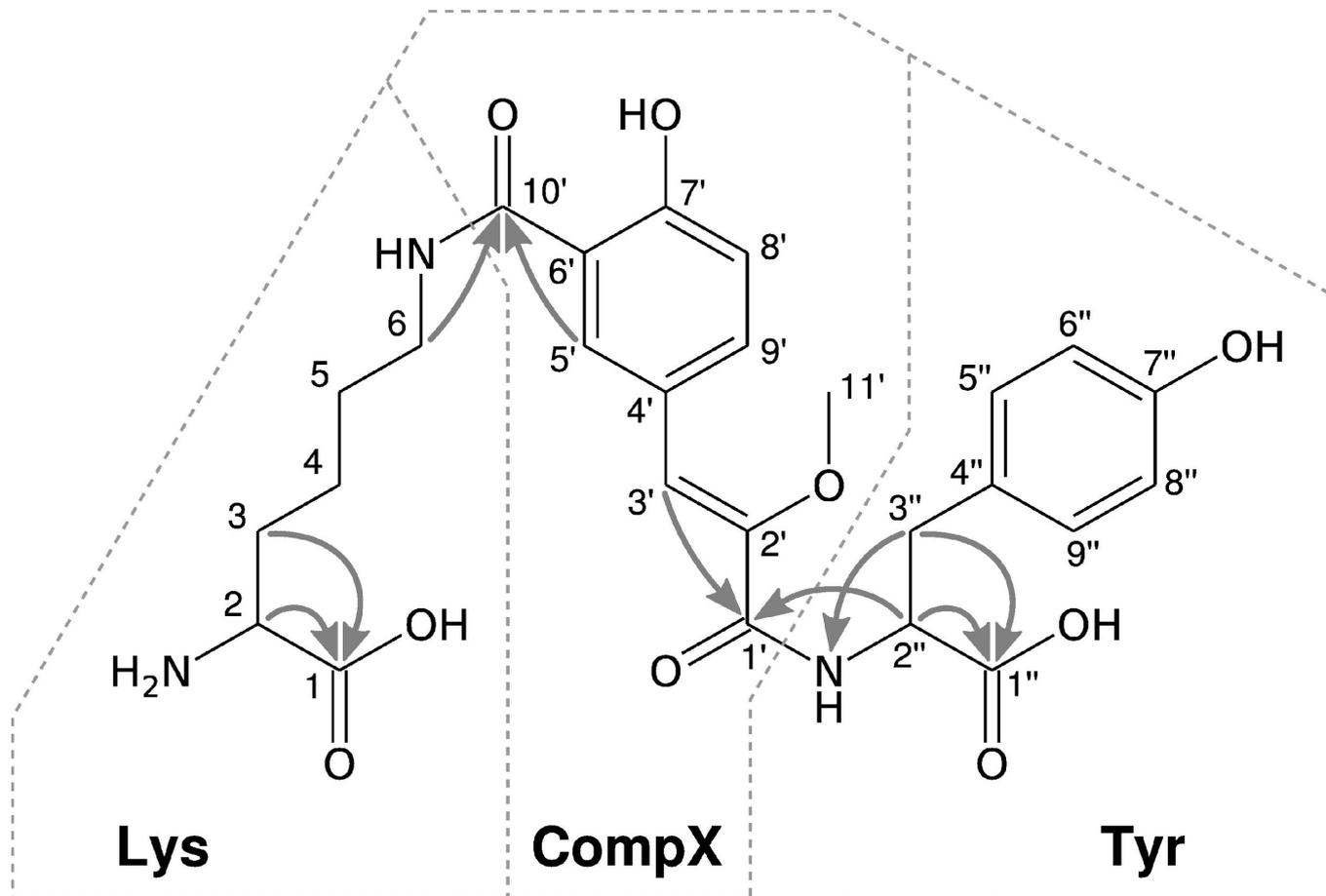
Fridericia heliota



Firdericia CompX

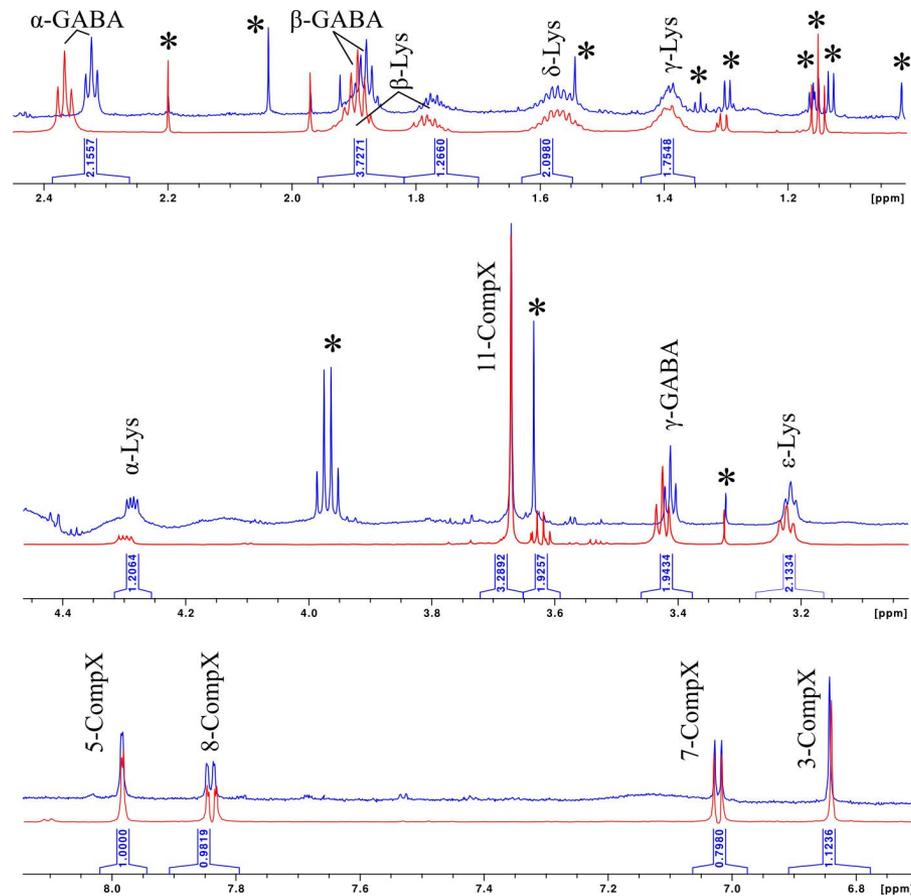


Fridericia AsLn2



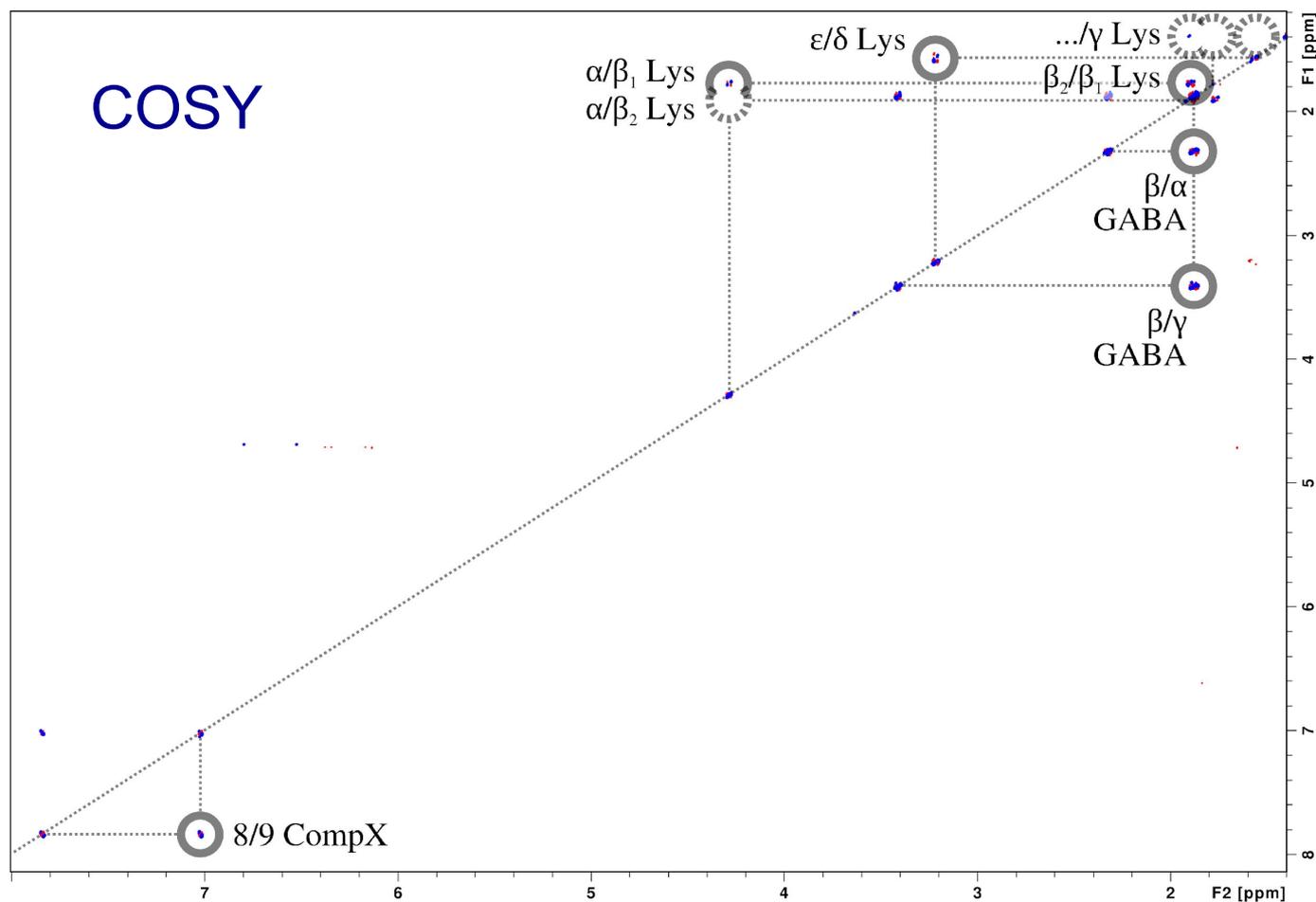
Fridericia Luciferin

5 микрограмм образца



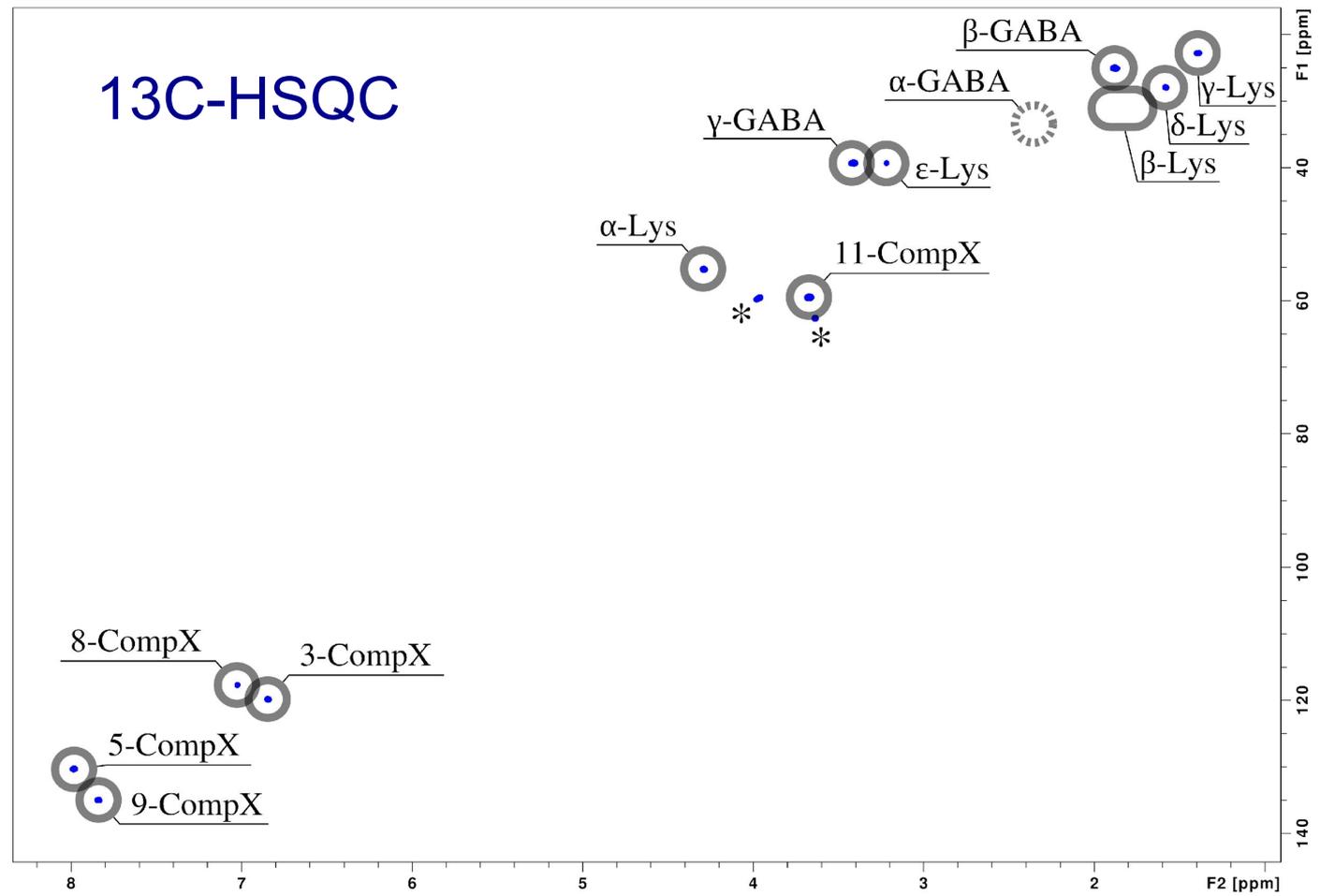
Fridericia Luciferin

5 микрограмм образца



Fridericia Luciferin

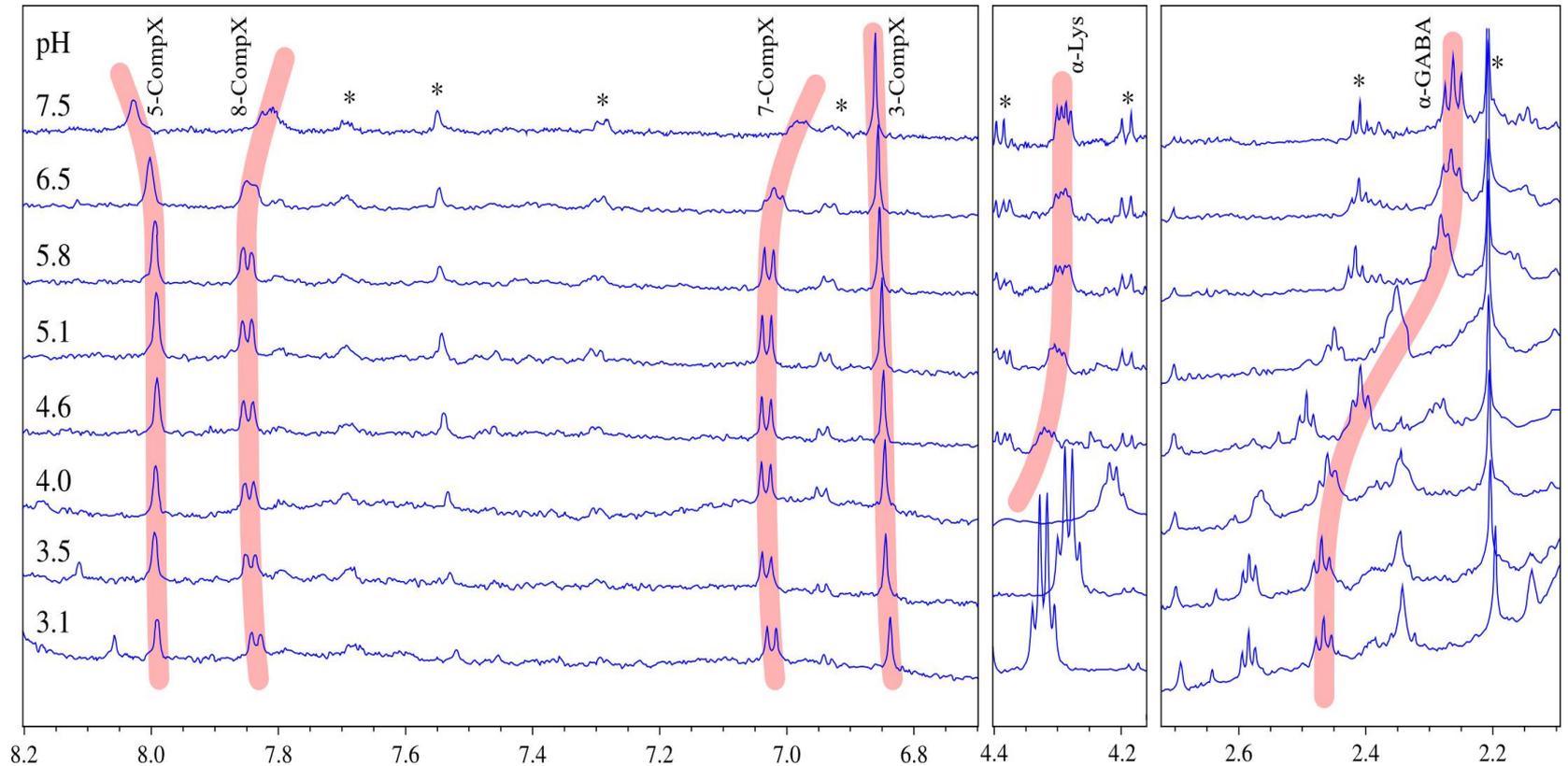
5 микрограмм образца



Fridericia Luciferin

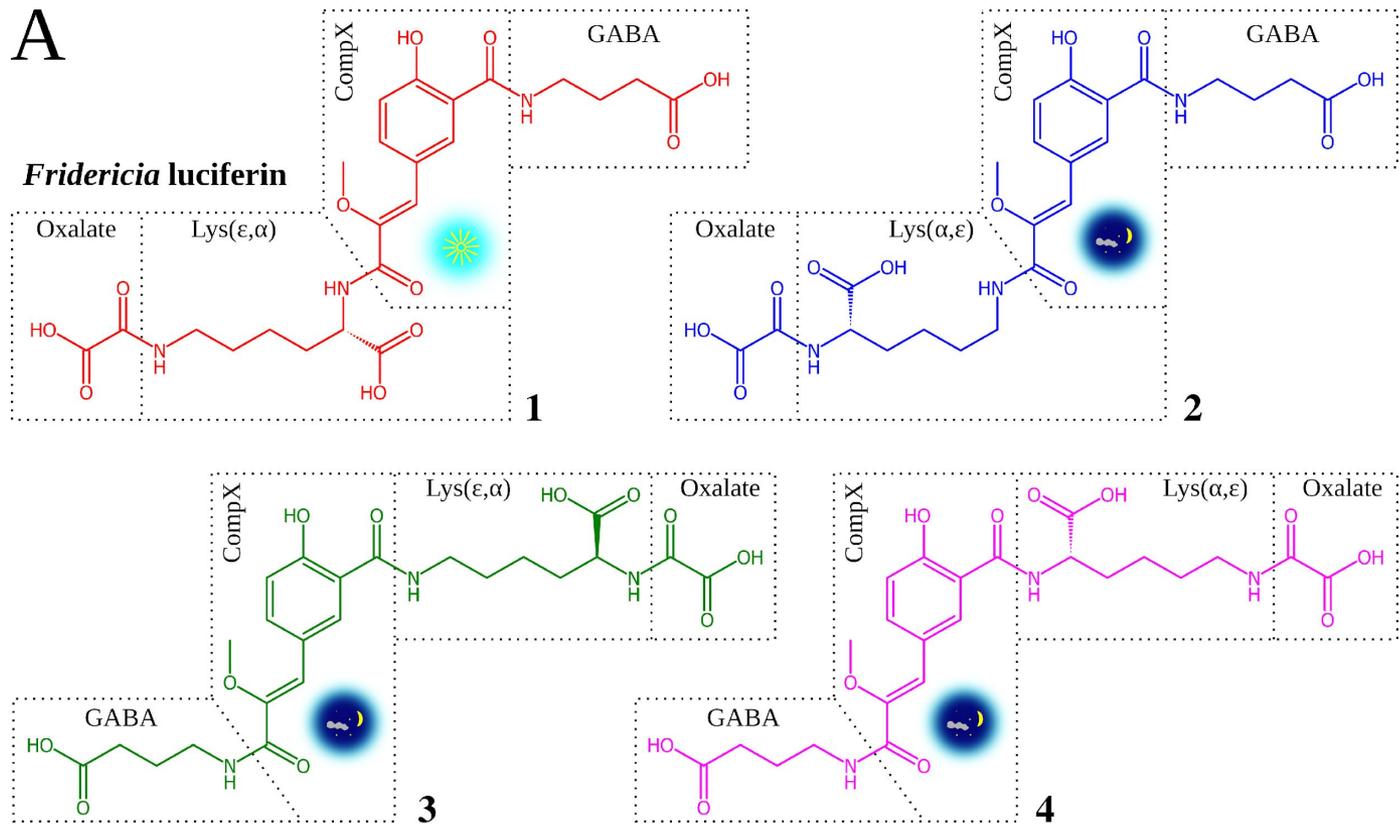
5 микрограмм образца

рН-зависимость ЯМР-спектра



Fridericia Luciferin

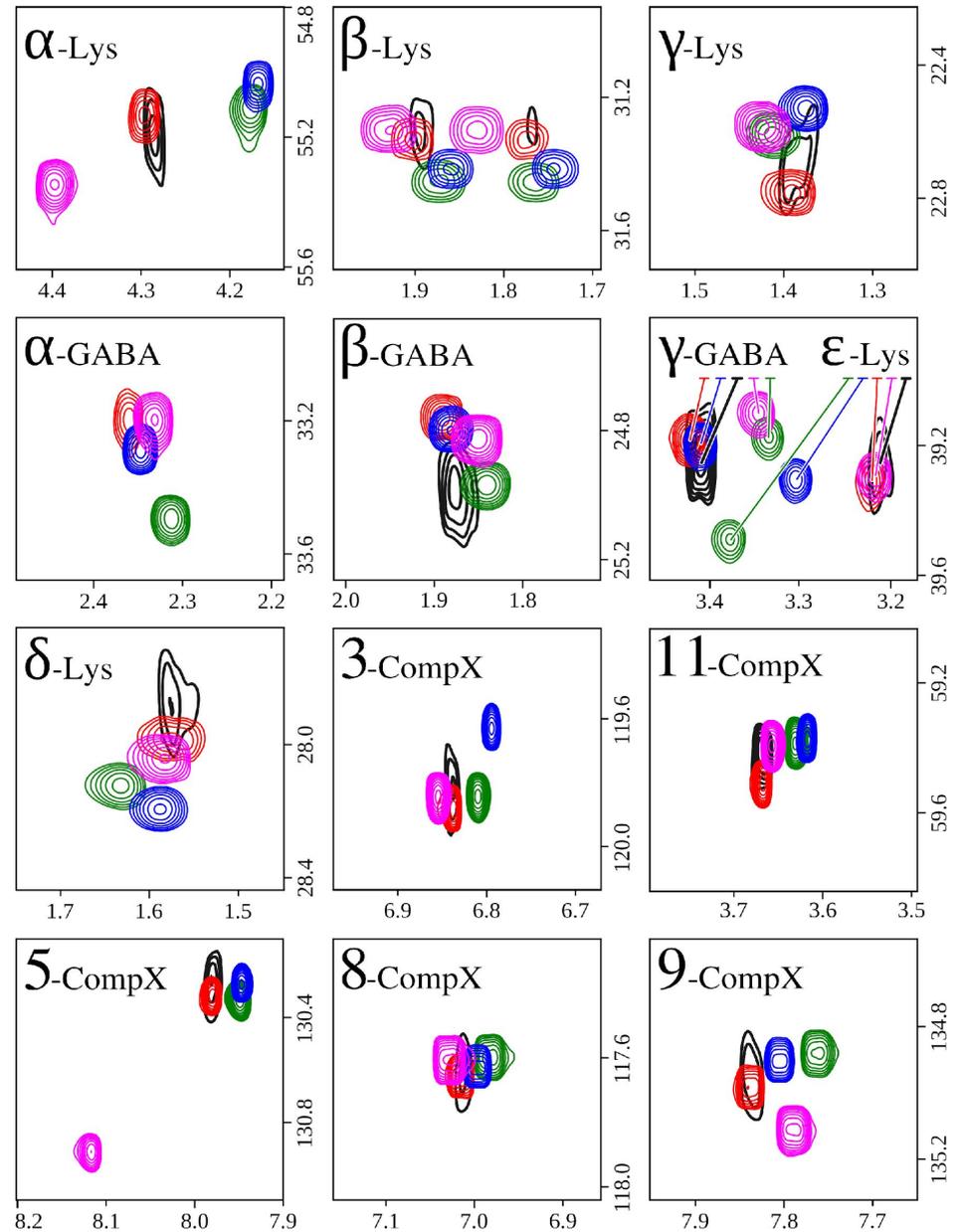
варианты структуры



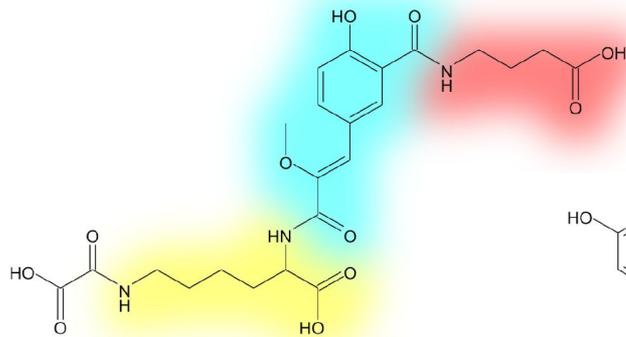
Fridericia Luciferin

сравнение
спектров

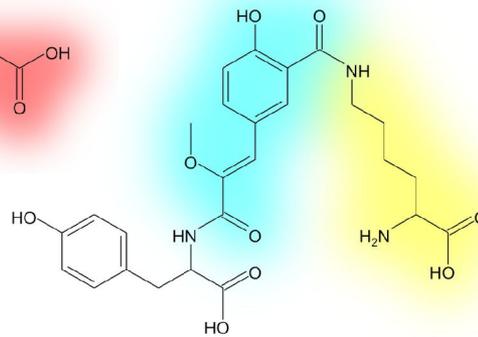
B



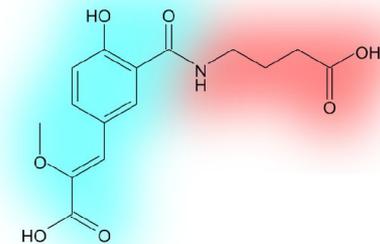
Другие компоненты *Fridericia heliota* новая пептидная химия?



Fridericia luciferin



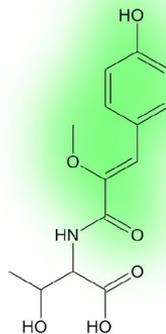
AsLn2



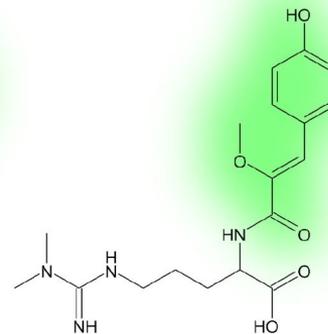
AsLn7



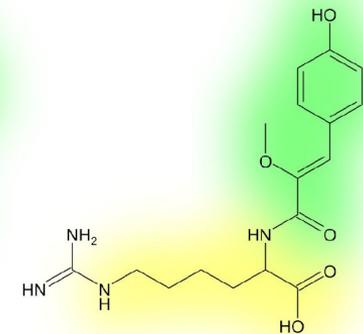
Fridericia heliota



AsLn5

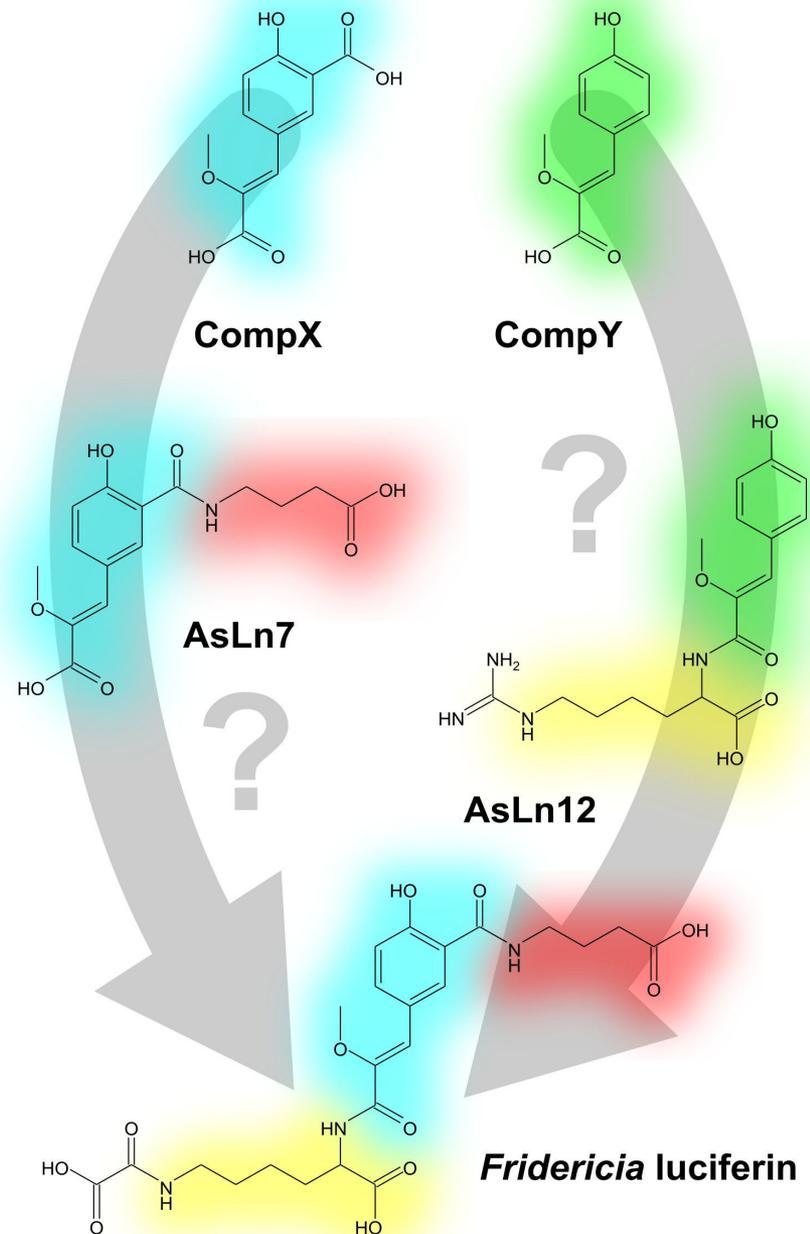


AsLn11

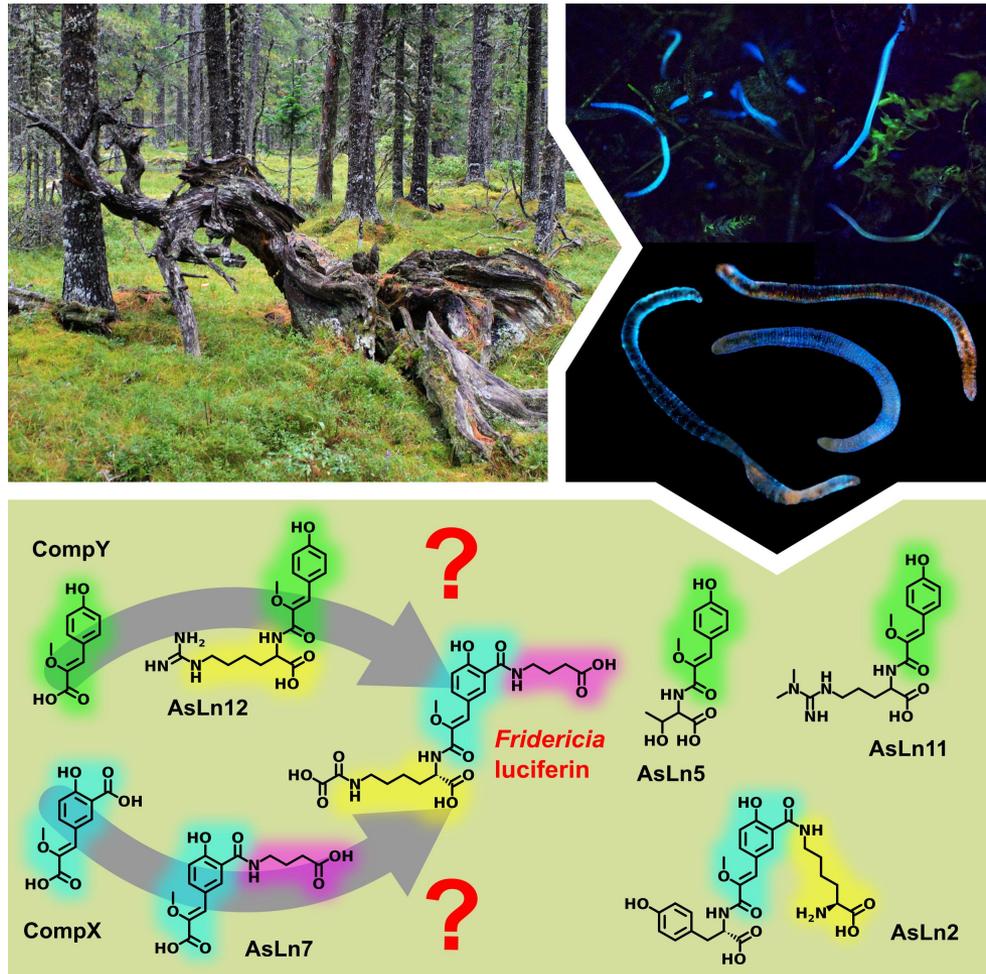


AsLn12

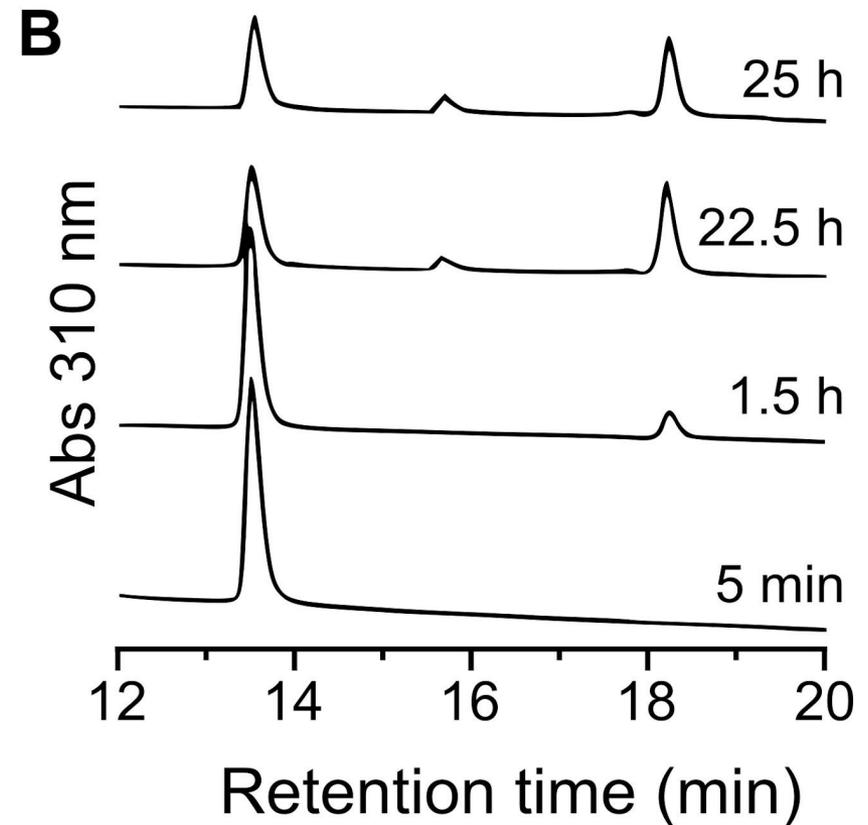
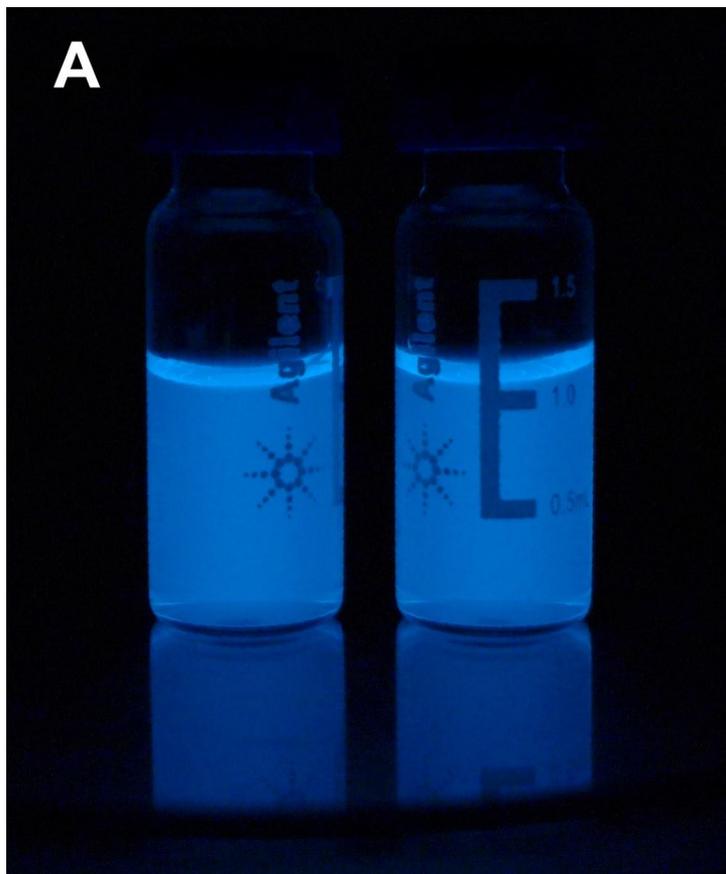
Возможные пути биосинтеза люциферина



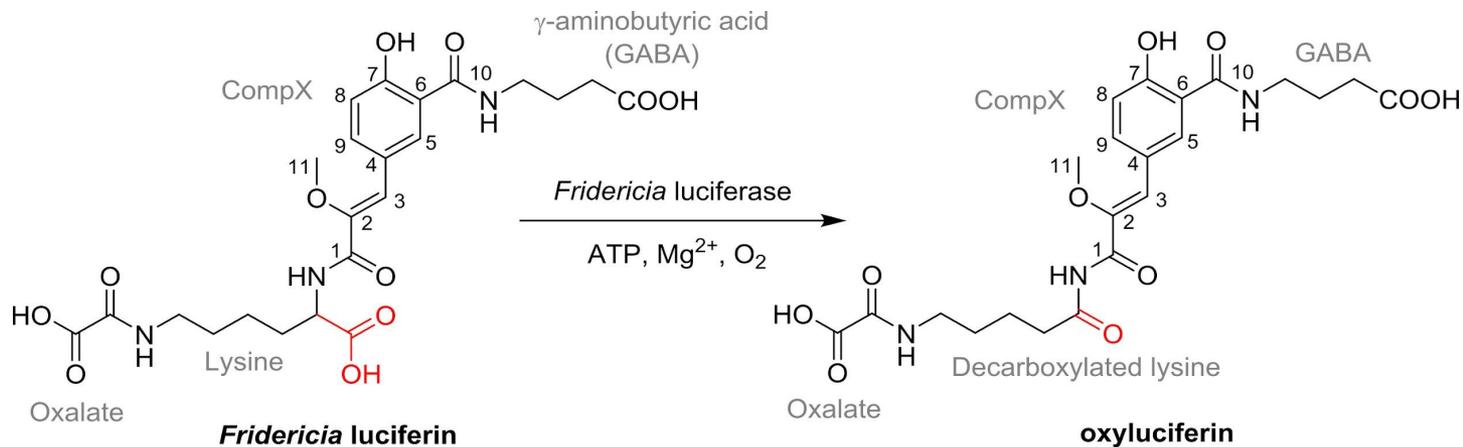
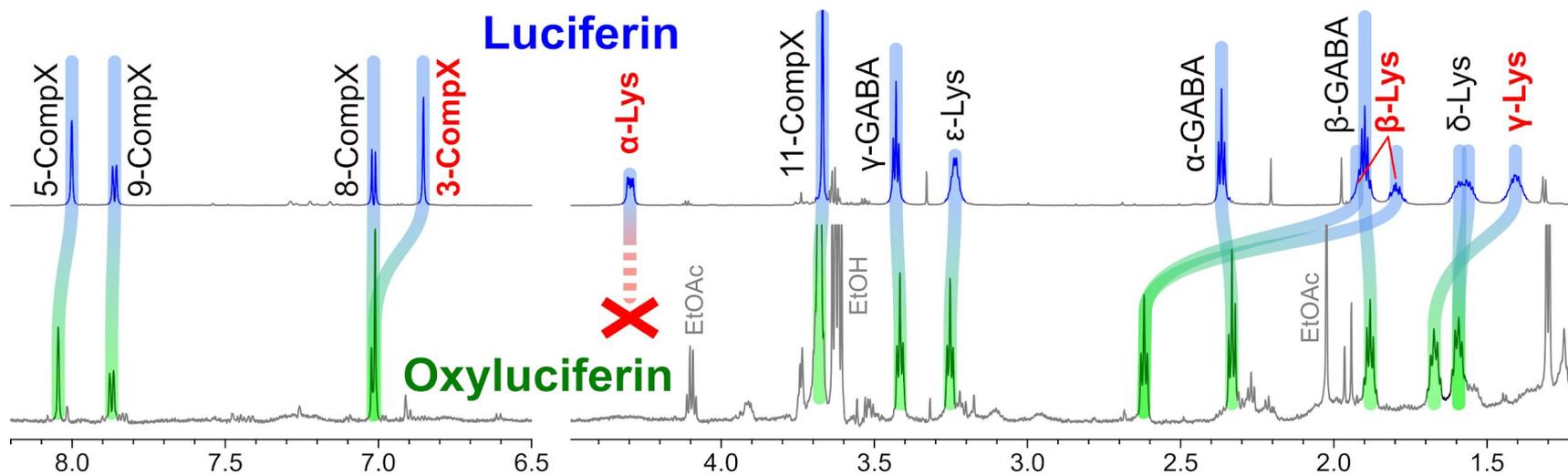
Красивая картинка для обложки журнала

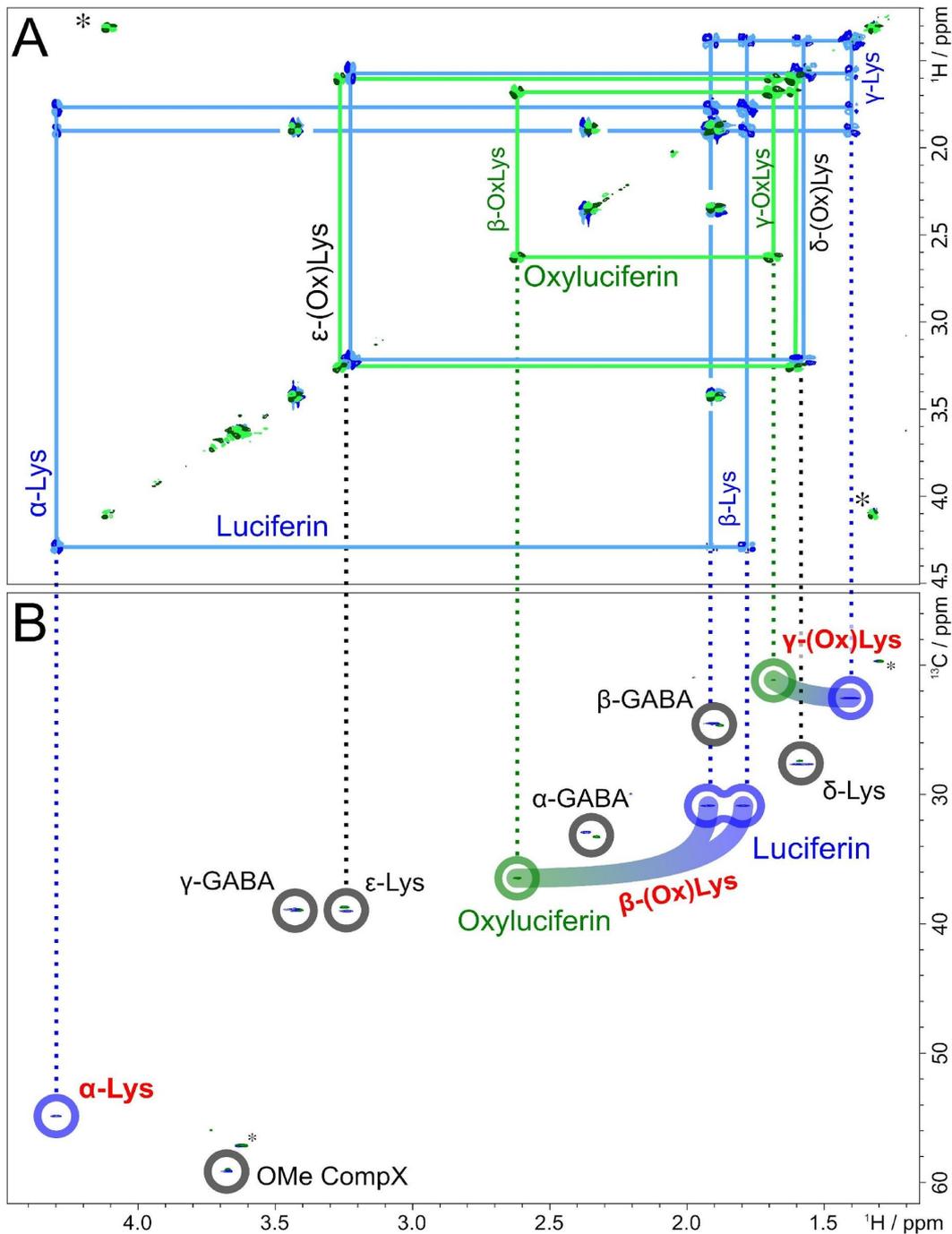


Окисление люциферина люциферазой

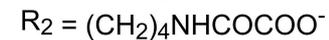
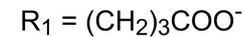
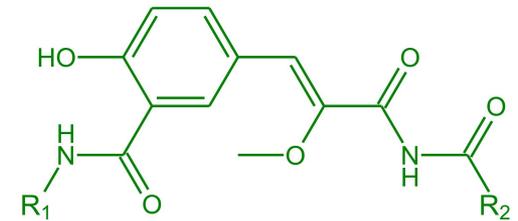
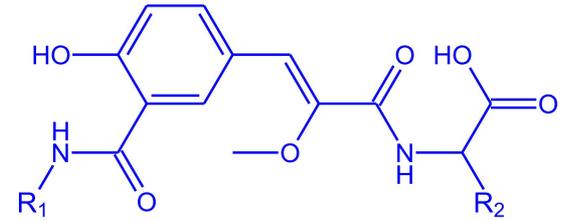


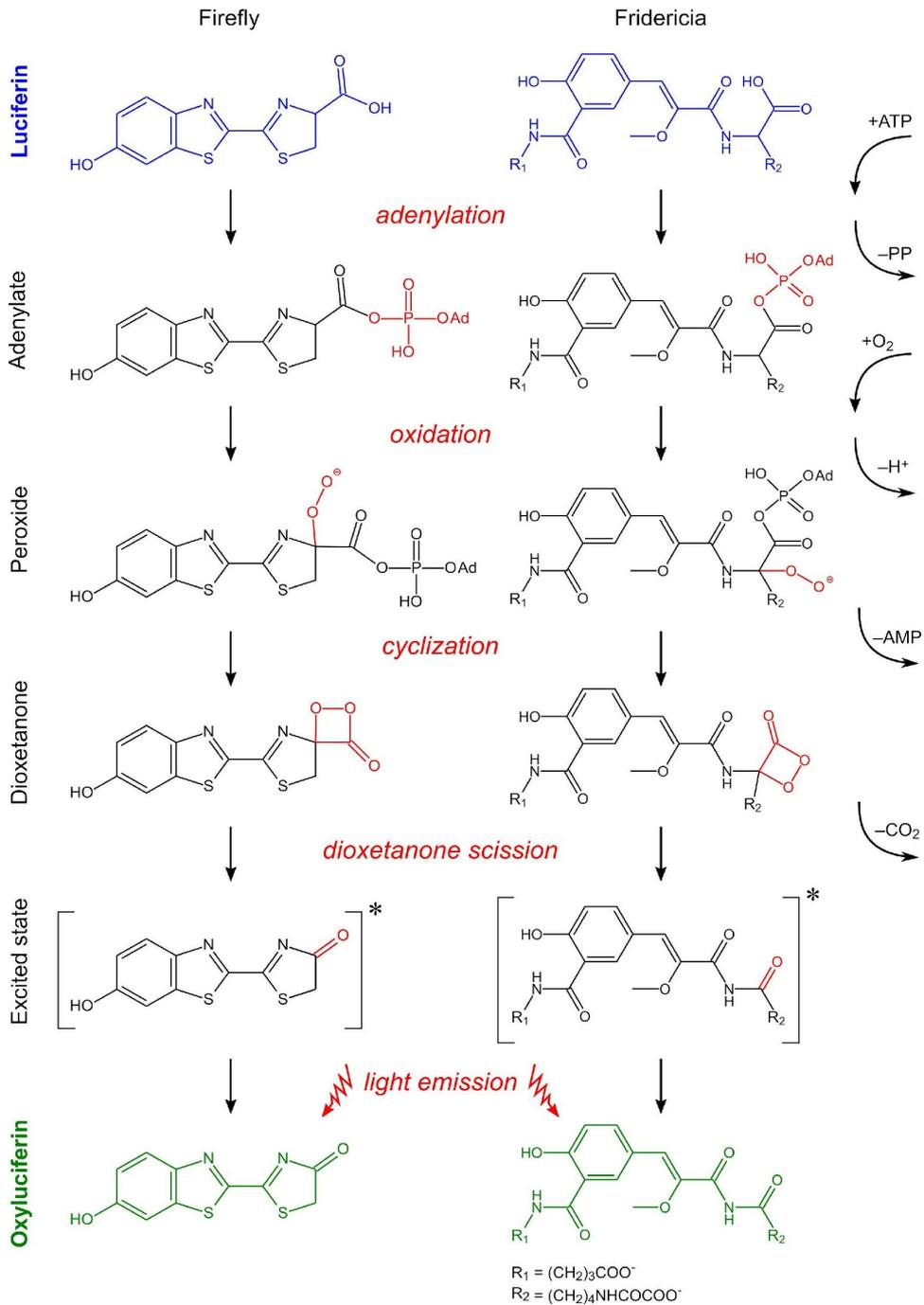
Изменение ^1H ЯМР-спектра





Изменения в спектрах COSY и HSQC





Механизм билюминесценции: сравнение светлячков и червяков

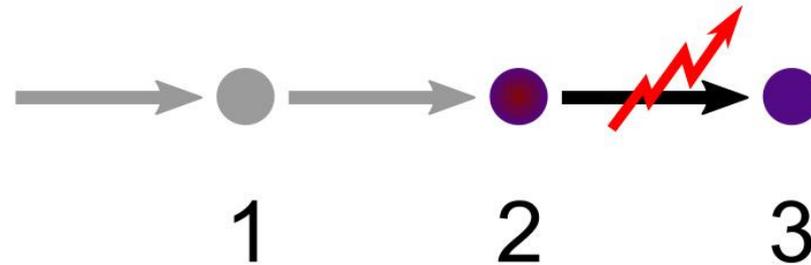
R₁ = (CH₂)₃COO⁻
 R₂ = (CH₂)₄NHCOCOO⁻

Грибы



Нам помогли не светящиеся грибы!

В светящихся грибах



В **НЕ**светящихся грибах

Люциферин грибов — 3-гидроксигиспидин



Второй люциферин подряд после 25-летнего перерыва :)

В лекции были использованы образцы и фрагменты спектров, предоставленные:

- **Абдильданова Асель Абаевна**, Алматы, Казахстан, Институт химических наук им. А.Б. Бектурова
- **Болдырев Иван Александрович**, ИБХ РАН, Лаборатория химии липидов
- **Дейгин Владислав Исаакович**, ИБХ РАН, Лаборатория биофармацевтики
- **Кемельбеков Улан Сатыбалдыулы**, Кокшетау, Казахстан, КГУ им. Ш. Уалиханова, Лаборатория инженерного профиля ЯМР-спектроскопии.
- **Константинова Ирина Дмитриевна**, ИБХ РАН, Лаборатория биотехнологии
- **Осмаков Дмитрий Игоревич**, ИБХ РАН, Лаборатория нейрорецепторов и нейрорегуляторов
- **Саблина Марина Александровна**, ИБХ РАН, Лаборатория углеводов
- **Ямпольский Илья Викторович**, ИБХ РАН, Группа синтеза природных соединений