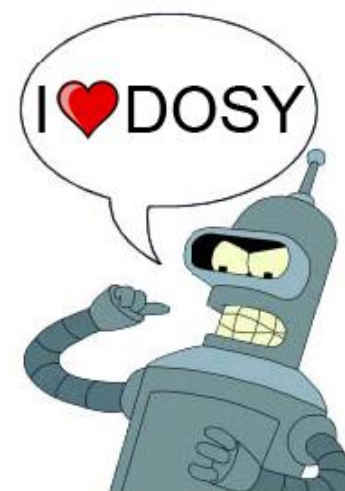


Kritikus micellaképződési koncentráció meghatározása NMR spektroszkópia segítségével

**Nagyműszeres gyakorlat, 700 MHz NMR
spektrométer, -1.108 labor**

Gyakorlatvezető: Dr. Bodor Andrea

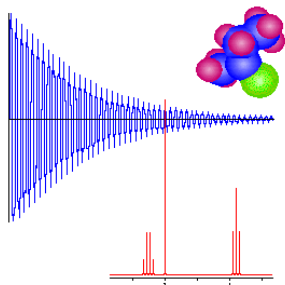
abodor@caesar.elte.hu



Ajánlott irodalom

The Basics of NMR

Joseph P. Hornak, Ph.D.



Copyright © 1997-2019 J.P. Hornak. All Rights Reserved.

<https://www.cis.rit.edu/htbooks/nmr/inside.htm>



Buday, Nyitrai, Perczel: Ezerarcú fehérjék, 2018

NMR spektroszkópia: 7. Fejezet

<https://www.semmelweiskiado.hu/termek/1463/ezerarcu-feherjek>

Jelmagyarázat

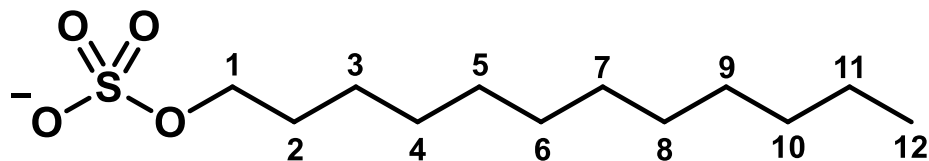


Az ilyen szövegdozok fontos megjegyzéseket tartalmaznak

A PowerPoint bemutatóban kérdések hangoznak el, melyekre a jegyzőkönyvben válaszolni kell. Ezeket kék betűvel jelöltük.

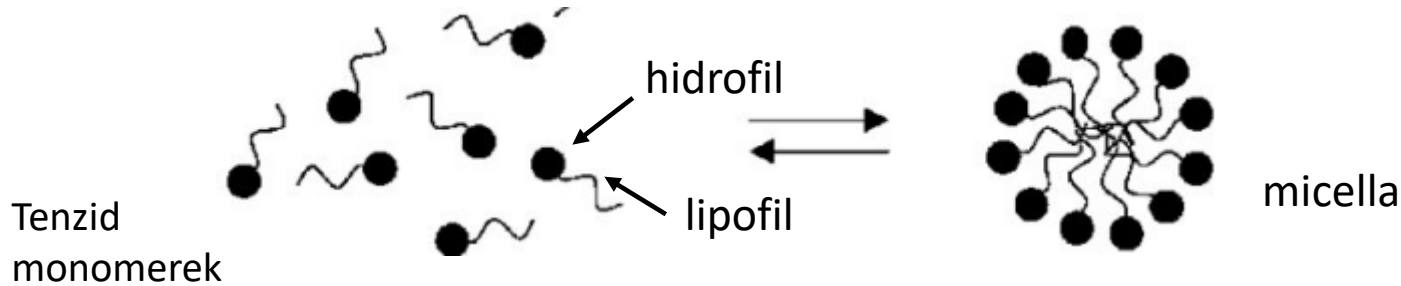
A gyakorlat célja

A gyakorlat során egy anionos felületaktív anyag, a nátrium-lauril-szulfát (sodium dodecyl sulphate, SDS) kritikus micellaképződési koncentrációját (cmc) határozzuk meg transzlációs diffúziós NMR mérésekkel.



Az SDS molekulában milyen NMR aktív magok találhatók? Jellemezzük őket!
Mennyire könnyű ezeket mérni?
A cmc meghatározáshoz mely magok mérése lehet alkalmas?

Elméleti háttér



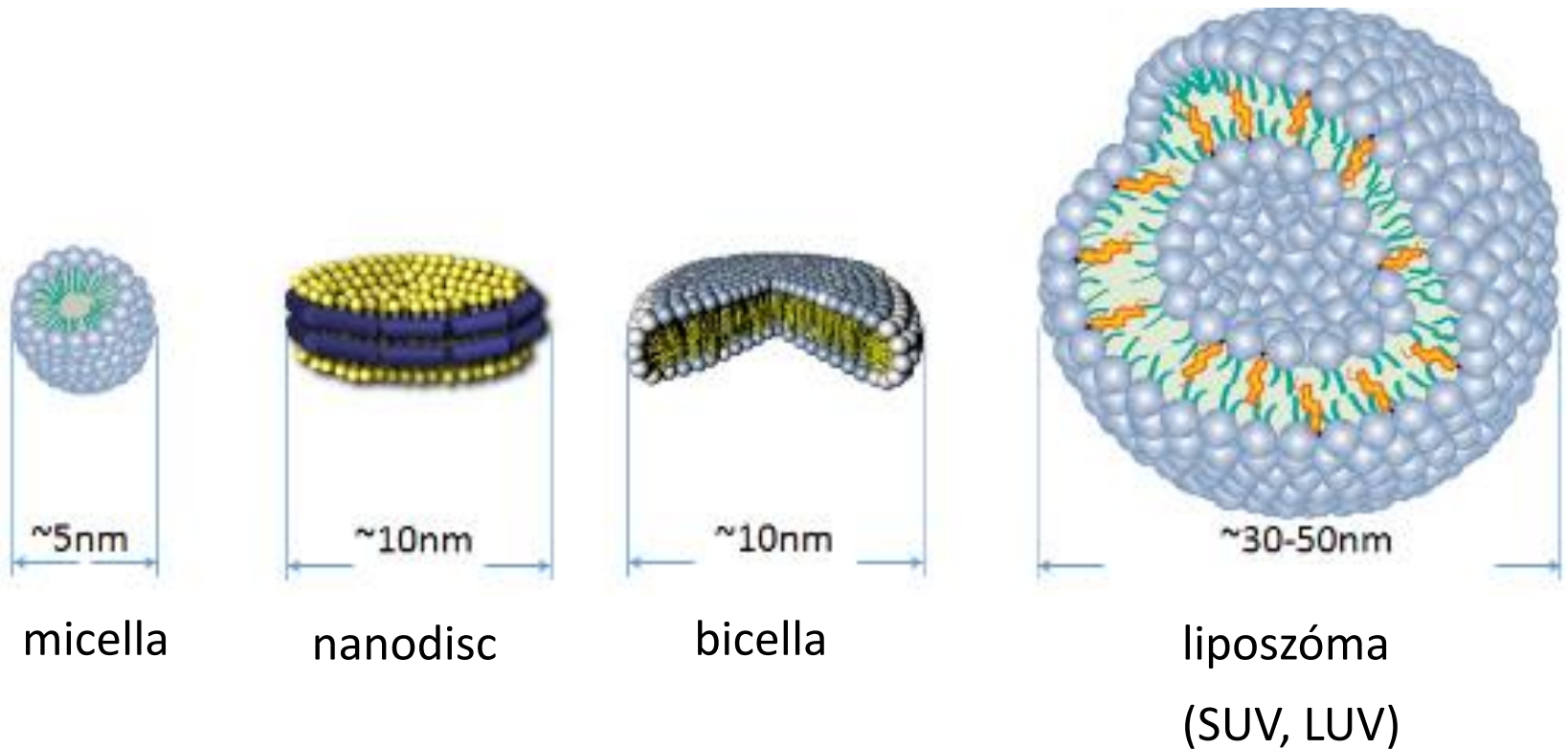
Rangel-Yagui, J Pharm Pharm Sci 2005

kritikus micellaképződési koncentráció (CMC)

A micellaképződés megindulásához szükséges minimális koncentráció, vagyis amfifil molekulák azon koncentrációja, mely felett az amfifil molekulák asszociációja során termodinamikailag stabilis micellák képződnek.

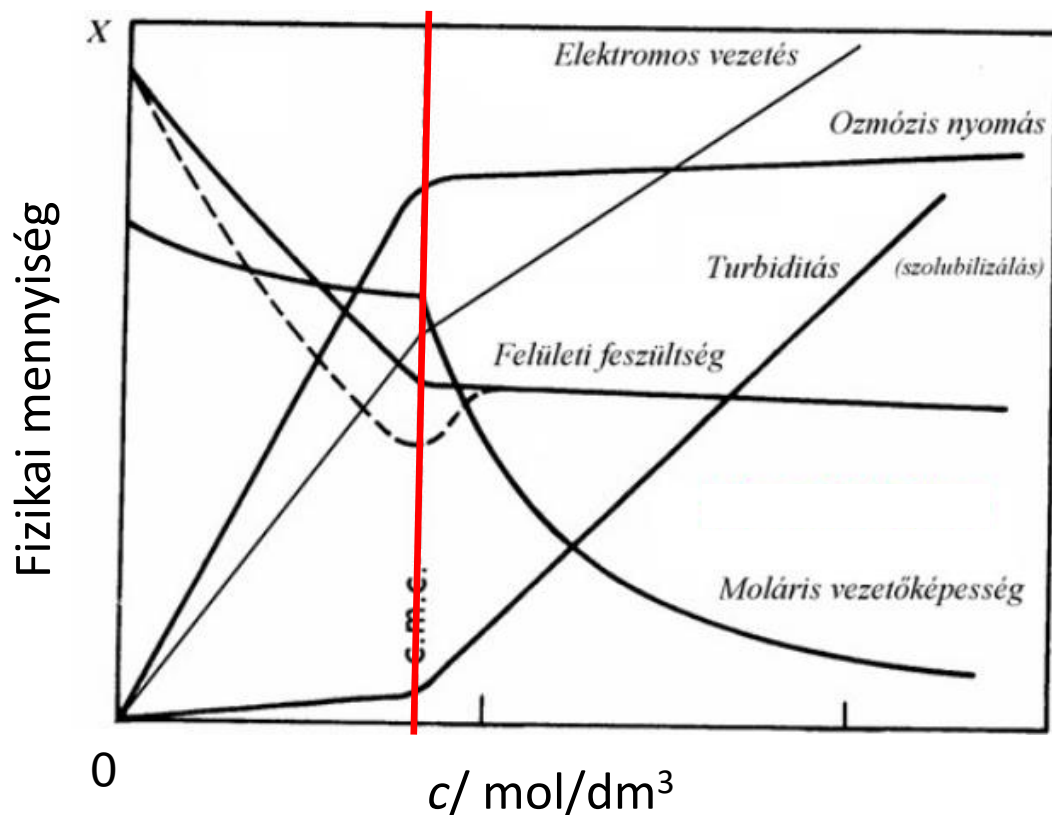
Soroljon fel néhány micellaképző vegyületet.
Milyen alkalmazásait tudná megnevezni?

Membránmimetikumok



+vezikulák stb.

cmc meghatározási módszerek



Tárgyaljuk a különböző módszerek előnyeit és hátrányait!

Mai gyakorlaton: cmc meghatározás diffúziós együtthatóból.
Diffúziós együttható meghatározása NMR méréssel.

Stokes-Einstein egyenlet

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta r_H}$$

D – diffúziós együttható

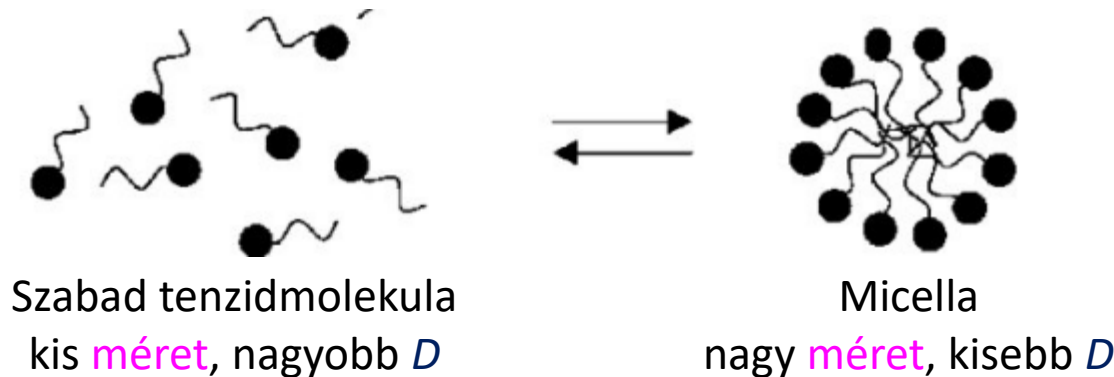
k – Boltzmann-állandó ($1,38 \cdot 10^{-23}$ J/K)

T – hőmérséklet

η – közeg viszkozitása

r_H – a diffundáló részecske hidrodinamikai sugara

A diffúziós együttható fordítottan arányos a részecske **oldatbeli méretével**.



A mért diffúziós együttható a szabad és a micellában kötött tenzid diffúziós együtthatójának molrtörtekkel súlyozott átlaga:

$$D_{\text{mért}} = x_{\text{szabad}} D_{\text{szabad}} + x_{\text{mic}} D_{\text{mic}}$$

Hogy változik a diffúziós együttható a tenzid összkoncentráció növelésével?

DOSY mérések

Az alapmérés sematikus ábrázolása

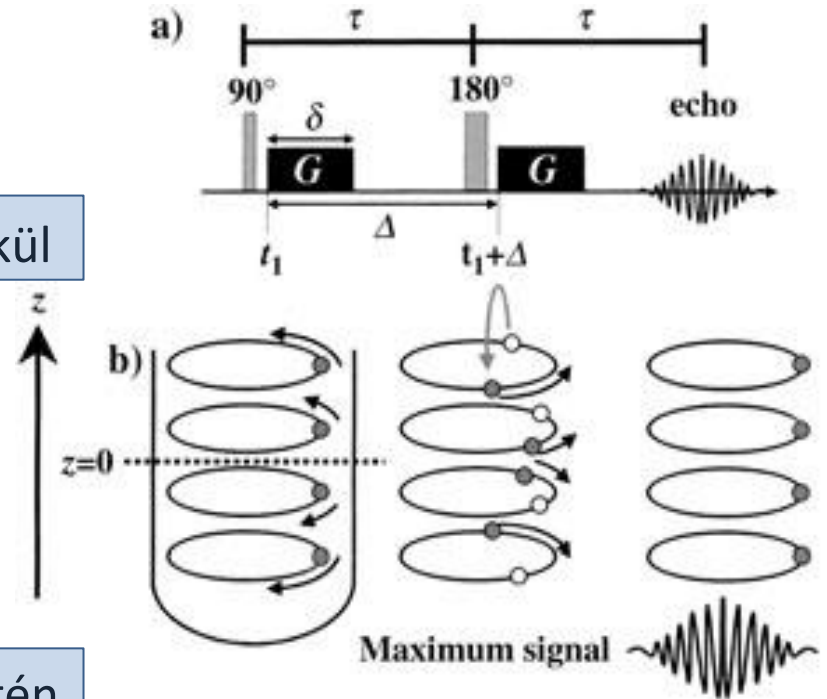
Fontos paraméterek:

G : gradienserősség (Hz/G)

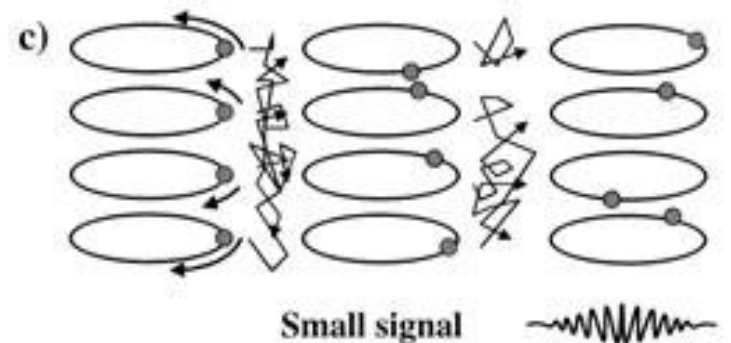
δ : gradiens időtartama ("kis delta")

Δ : diffúziós idő ("nagy delta")

Diffúzió nélkül



Diffúzió esetén

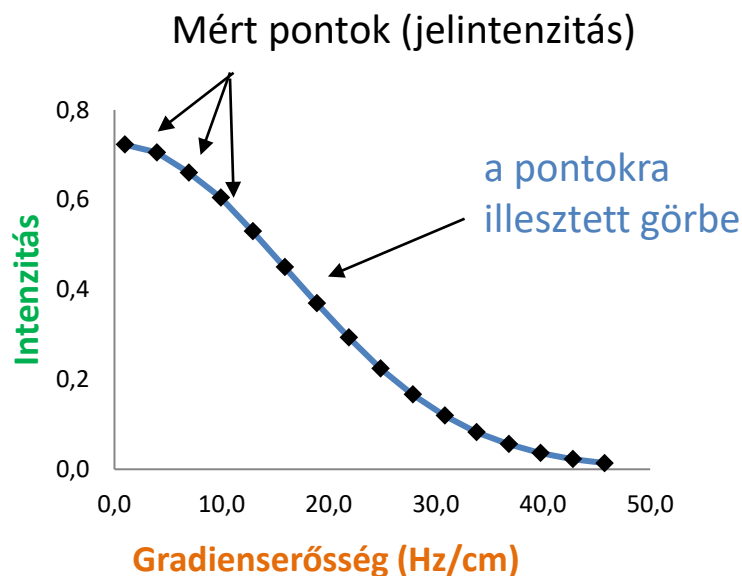
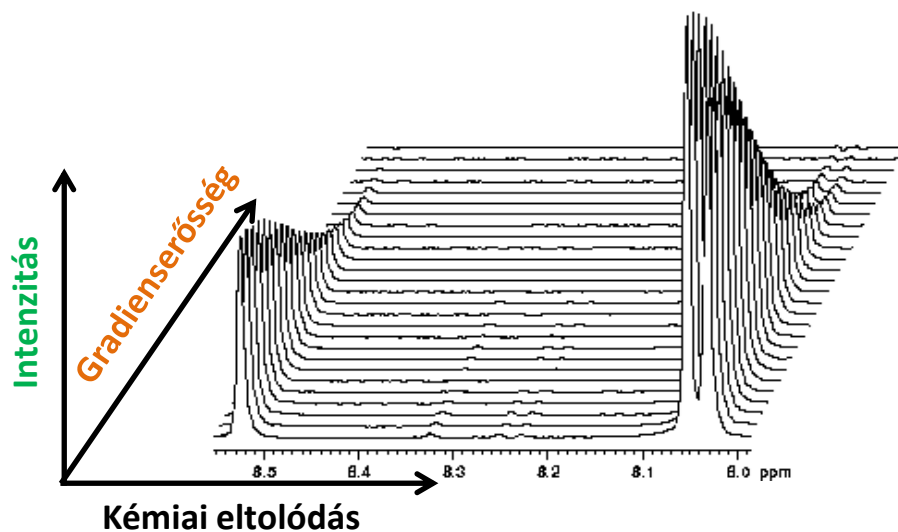


A gyakorlaton a következő
impulzusprogramot használjuk:
stebpgp1s19

A diffúziós együttható meghatározása Stejskal-Tanner egyenlet alapján

Az intenzitás (I) a gradienserősség (G) függvényében *Gauss-görbe* szerint csökken, ezt fejezi ki a Stejskal-Tanner egyenlet:

$$I = I_0 \exp\left[-D\gamma^2\delta^2 G^2 \left(\Delta - \frac{\delta}{3}\right)\right]$$



A mérés során beállítandó: δ , Δ

Egy kísérleten belül változtatjuk: **gradienserősség**

A nemlineáris illesztésből megkapjuk a **diffúziós együtthatót**.

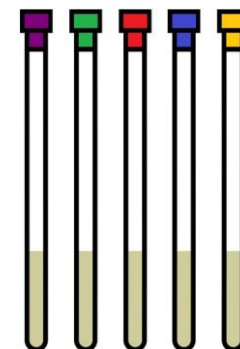
A gyakorlat menete

1. Mintaelőkészítés
2. NMR mérések
 1. Lock
 2. Atma proton
 3. Shim
 4. 1D ^1H spektrum felvétele
 5. DOSY mérés
3. Kiértékelés:
 1. Stejskal-Tanner egyenlet illesztése
 2. EDDOSY

Mintaelőkészítés

Rendelkezésre álló vegyszerek:

- 0.1 M SDS törzsoldat
- Desztillált víz
- D₂O



Készítsen 5 különböző hígítású SDS oldatot az alábbi koncentrációkban. A minták végtérfogata 600 μ l legyen és minden minta tartalmazzon 10 % D₂O-t.

Számítsa ki, mennyit kell bemérni az egyes anyagokból!

$c_{\text{SDS}} / \text{mM}$	$V_{\text{SDS}} / \mu\text{l}$	$V_{\text{H}_2\text{O}} / \mu\text{l}$	$V_{\text{D}_2\text{O}} / \mu\text{l}$
3			
6			
9			
12			
15			

NMR mérések

A mérések kiértékeléséhez használt program:

TopSpin 3.6.2

Ingyenesen letölthető:

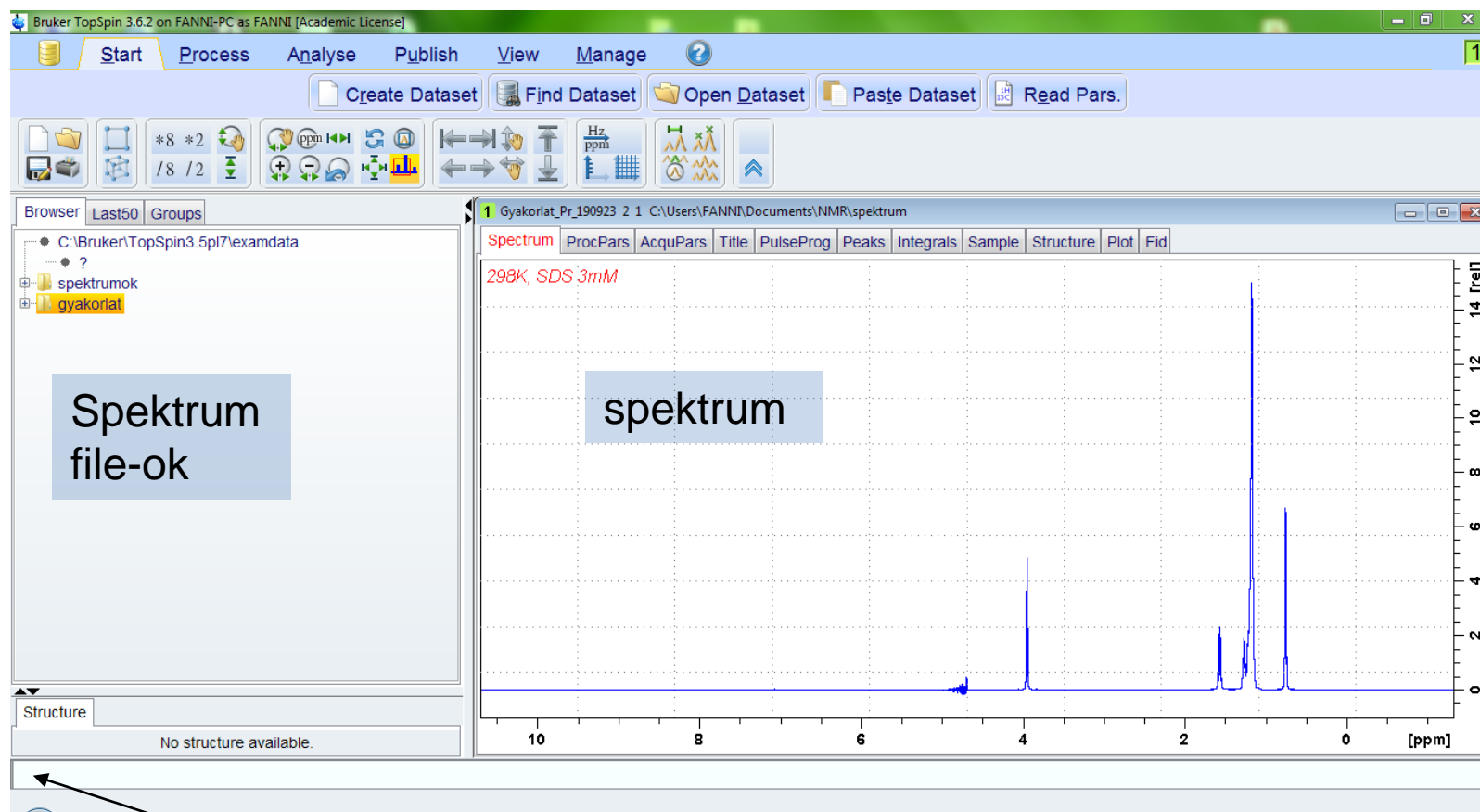
<https://www.bruker.com/service/support-upgrades/software-downloads/nmr/free-topspin-processing/nmr-topspin-license-for-academia.html>

Fontos hogy a **3.6-os verziót** töltsék le, ne legújabbat, a 4-est!!!
A Setup type választásnál a "Data processing only"-t válasszák.

TopSpin 3.6.2

Bevezető a TopSpin használatához:

<https://www.youtube.com/watch?v=FocoABJ2rvw>



Ide lehet beírni a parancsokat

Mérési mappa hozzáadása: jobb klikk a Spektrum file ablakban → Add new data dir.
Spektrum megnyitása: egérrel (nyomva tartott bal billentyűvel) áthúzni a mappát a spektrum ablakhoz (drag-and-drop)

A virtuális laborgyakorlaton végigvesszük az 1D ^1H és diffúziós NMR mérések lépéseit (16-20 és 24-28 dia).

A gyakorlat segédanyaga részletes leírást tartalmaz a spektrumok értékeléséről (22-23 és 30-44. dia), ezeket a hallgatóknak otthon el kell végezniük a mellékelten küldött adatfájlokon.



Mérés menete I. – új mérés

edc: új mérési mappa létrehozása korábbi mérés paramétereinek lemásolásával

Create New Dataset - new

Prepare for a new experiment by creating a new data set and initializing its NMR parameters according to the selected experiment type.
For multi-receiver experiments several datasets are created.
Please define the number of receivers in the Options.

NAME: Gyakorlat_Pr_190923

EXPNO: 12

PROCNO: 1

☒ Use current parameters

☐ Experiment: [Select]

☒ Options

☐ Set solvent: H2O+D2O

☐ Execute 'getprosol'

☐ Keep parameters: P 1, O1, PLW 1 [Change]

DIR: C:\Egyetem\ELTE\PhD\Oktatas\Nagymuszeres_DOSY

☐ Show new dataset in new window

Number of additional datasets: (1,2, ...,16) 1

TITLE: 298K, 3mM SDS

OK Cancel More Info... Help

Mappa neve: Gyakorlat_Pr_[ÉÉHHNN]

Mérés sorszáma a mappában

Az alábbi méréseket kell létrehozni:

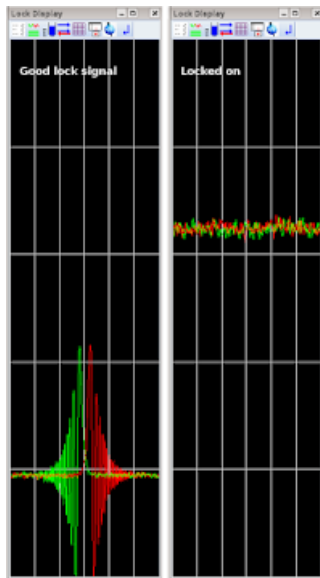
- **zgpr**: 1D ^1H spektrum vízelnyomással, csak O1 és p1 beállítására használjuk (1 db)
- **zgesgp**: 1D ^1H spektrum jobb vízelnyomással (mintánként 1 db)
- **stebpgp1s19**: DOSY mérés vízelnyomással (mintánként 1 db)

Mérés címe: minta adatai

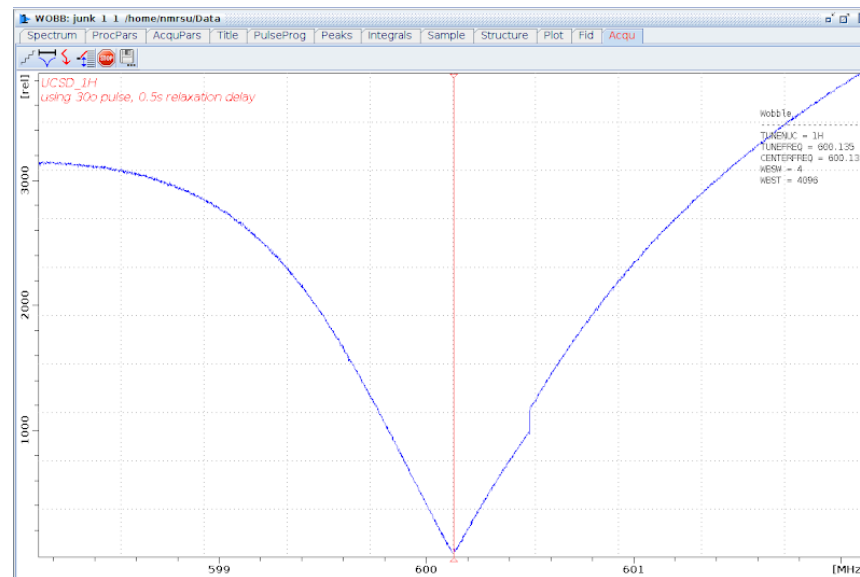
Mérés menete II. - előkészületek

1. *lock*: a mágneses tér időbeli változásait kompenzálja az oldószer deutériumjének folyamatos monitorozásával → deuterált oldószert meg kell adni
2. *atma proton*: A proton rezonanciafrekvenciájára hangolja az RF tekercset
3. *shim*: mágneses tér térbeli homogenitását biztosítja → shim-tekercsekkel kompenzáljuk a 14.6 T mágneses tér inhomogenitásait (procedúra: Z, Z², Z, Z²... továbbá Z³, X, Y)

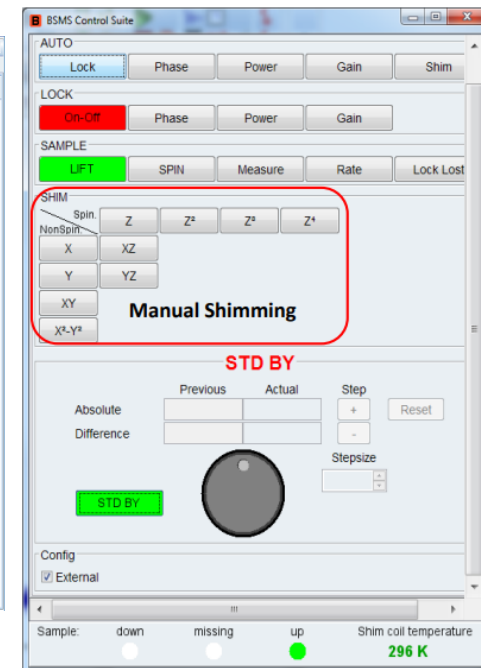
1. lock



2. Megfelelő hangolás

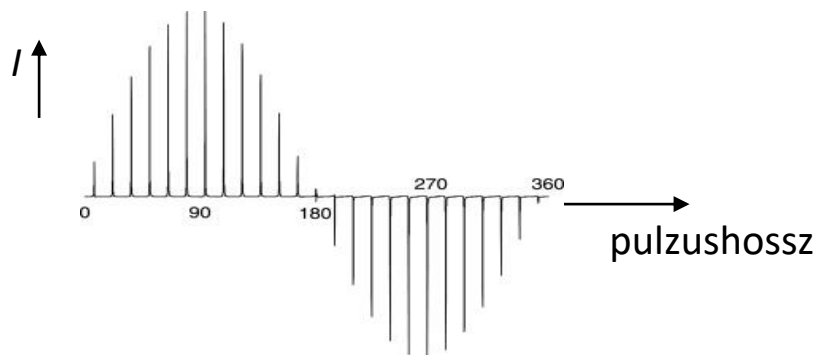


3. Shim

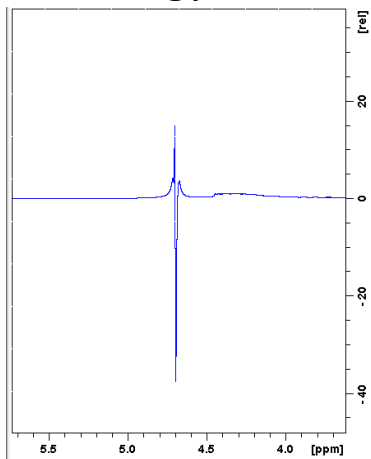


Mérés menete III. – p1 és o1

- *zg*: mérés indítása ← indítsuk el a létrehozott **zgpr** mérést
- *pulsecal*: a proton mágnesezettség 90 °-os kibillentéséhez szükséges kemény pulzus hosszát (*p1*) számítja ki μ s-ban



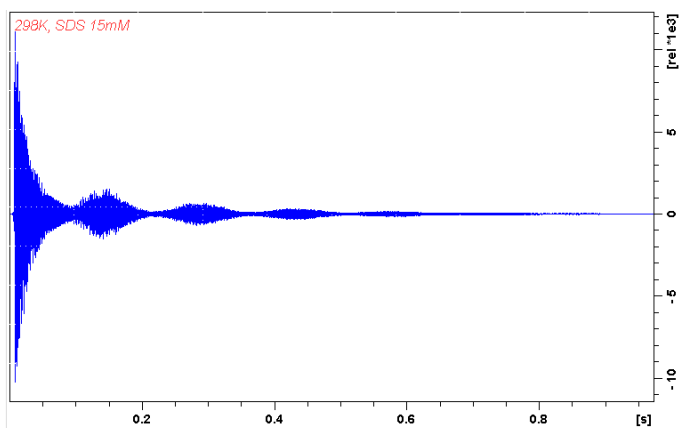
- *o1*: A spektrum közepét adja meg Hz-ben. Értékét a vízjel maximumára kell beállítani, hogy hatékony legyen a vízelnnyomás.



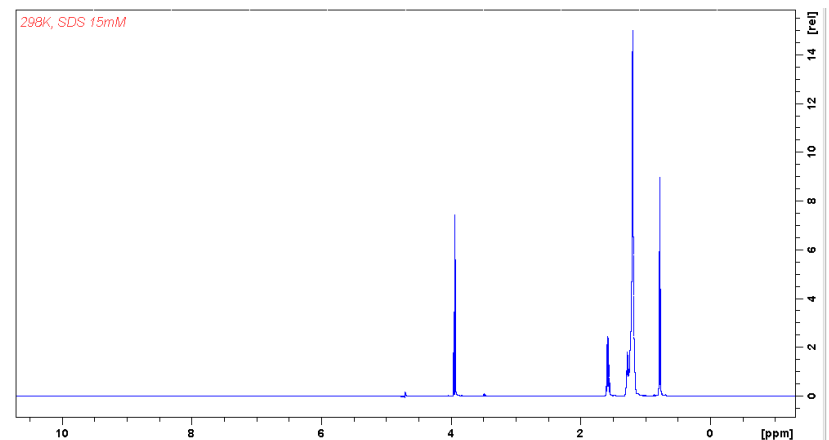
Jól beállított o1 - hatékony vízelnnyomás:
A maradék vízjel kicsi, az alakja torz

Mérés menete IV. – 1D ^1H spektrum

- **zgesgp** mérés létrehozása
- *getprosol 1H [p1] -12.55:*
 - *[p1]* helyére a pulsecal paranccsal meghatározott érték kerül
 - beállítja p1-et (és kiszámolja p1 alapján a formázott pulzusok teljesítményét)
- *o1 - zgpr*-ből meghatározott *o1*-et beírjuk
- *zg* – mérés indítása → mit kapunk?
- *efp* – Exponenciális simítófüggvény + Fourier-transzformáció + automata fáziskorrekció → mit kapunk meg ezzel a paranccsal?

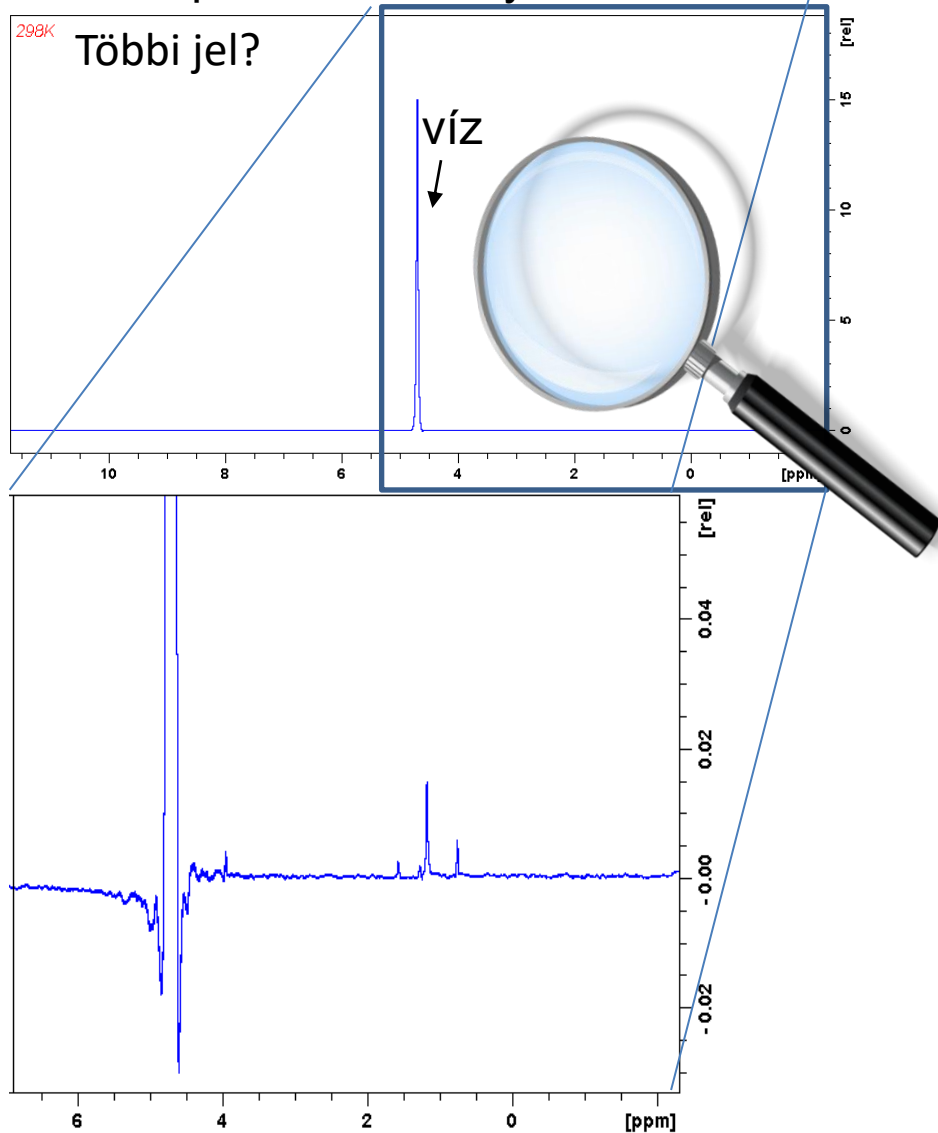


FT

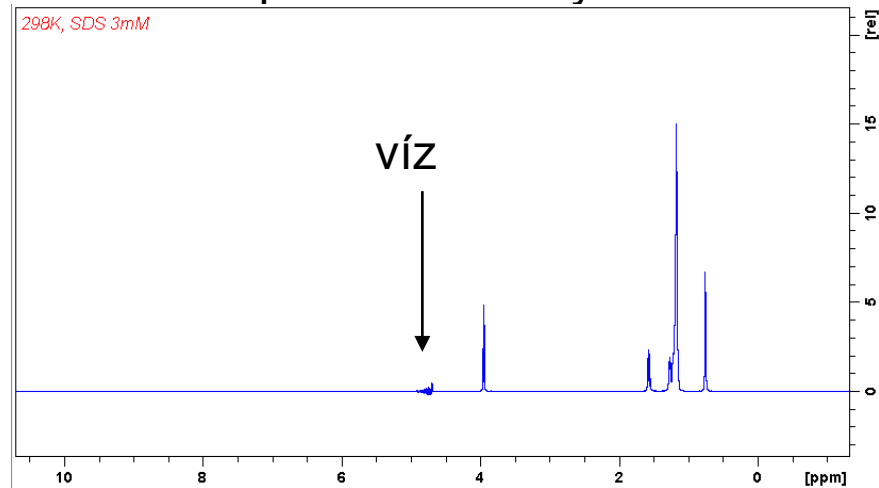


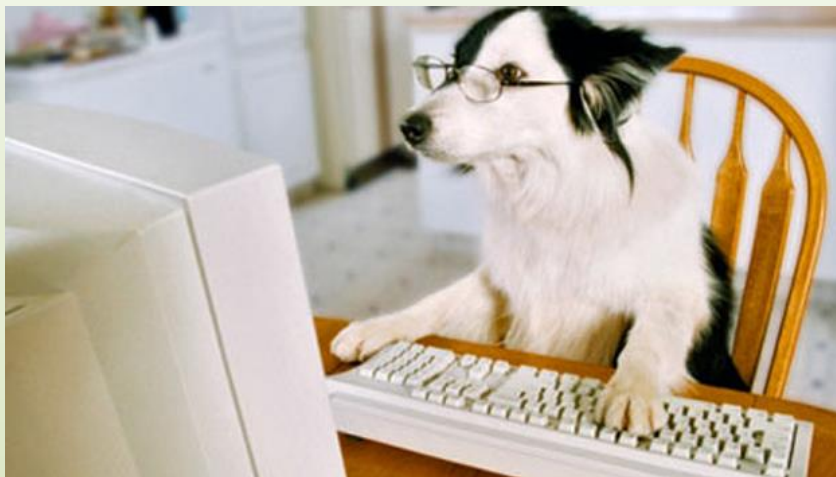
Vízelnymás jelentősége

1D ^1H spektrum vízelnymás nélkül



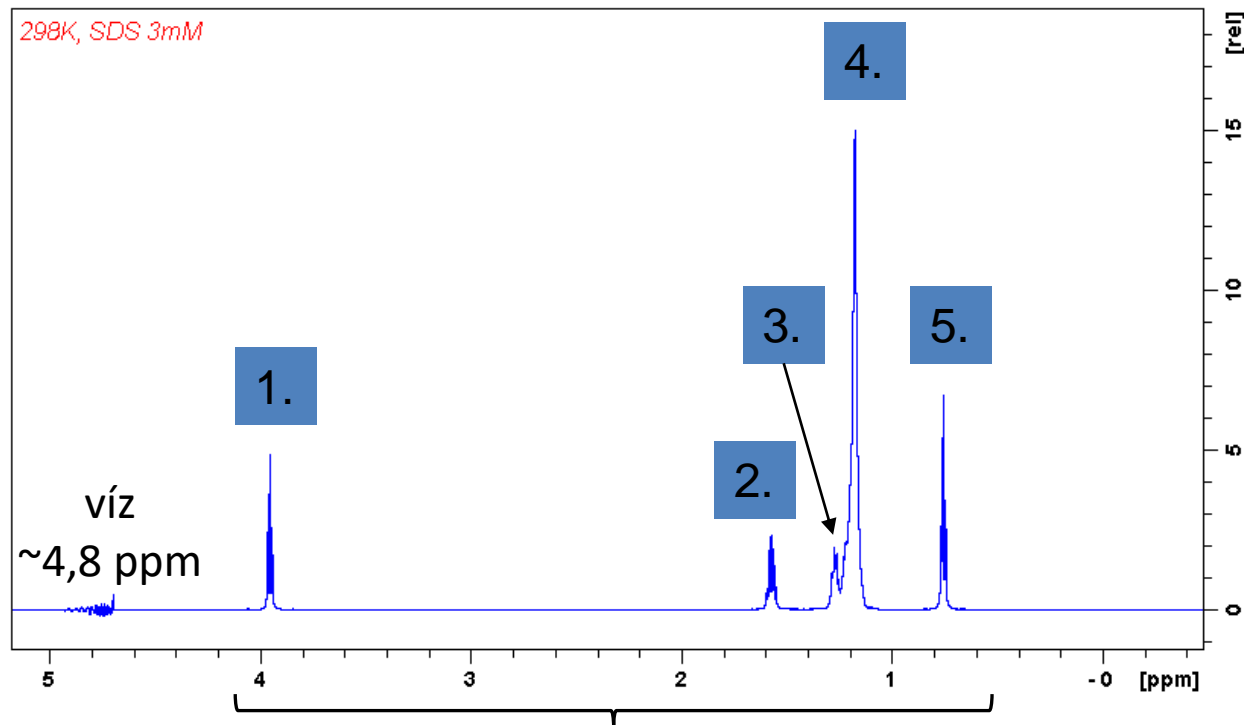
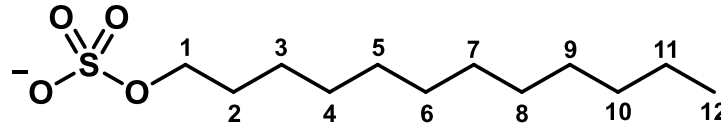
1D ^1H spektrum vízelnymással





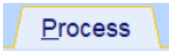


A következő diákon (22-23.) szereplő feladatokat el kell végezni, az eredményeket a jegyzőkönyvben fel kell tüntetni!

1D ^1H spektrumok kiértékelése



SDS-hez tartozó jelek – 5 jelcsoportot különíthetünk el

A jelek melyik SDS protonhoz tartoznak?

Jelcsoportok integrálása:  →  A spektrum ablak menüje átvált integrálás menüre. Manuális integrálás kiválasztása:  majd a jelek integrálása kattintással és az egér húzásával. A relatív integrál értékek pirossal jelennek meg. Milyen információt hordoz az integrál?

A jegyzőkönyvben szerepeljen az asszignáció:

Jelcsoport száma (lásd előző dia)	Kémiai eltolódás (jegyzőkönyvbe pontos értékeket!)	Asszignáció	Multiplicitás	Integrál
	~4,8 ppm	H ₂ O	-	-
1.	~3,9 ppm			
2.	~1,6 ppm			
3.	~1,3 ppm			
4.	~1,2 ppm			
5.	~0,8 ppm			

Diffúziós mérések paramétere

A mérés során beállítandó:

P1, O1, SW stb.

DOSY paraméterek: δ , Δ , gradienserősséget hány pontban,
milyen függvény szerint változtatjuk

δ beállítása:

parancs: P30: itt a δ értékének a felét kell megadni μ s-ban!

Δ beállítása:

parancs: D20: itt a Δ értékét kell megadni s-ban!

Gradienserősség változtatása:
Lásd „DOSY mérés indítása” dia



Figyeljen a
mértékegységekre!

A paraméterek megadásánál
 δ *fele* μ s-ban, Δ s-ban van!

A végső DOSY kiértékelésnél
 δ és Δ értékeit ms-ban kell
megadni!

Mérési paraméterek

Ajánlott értékek δ – hoz és Δ – hoz :

– Kisebb molekuláknál: $\delta = 2$ ms, $\Delta = 75, 100$ ms

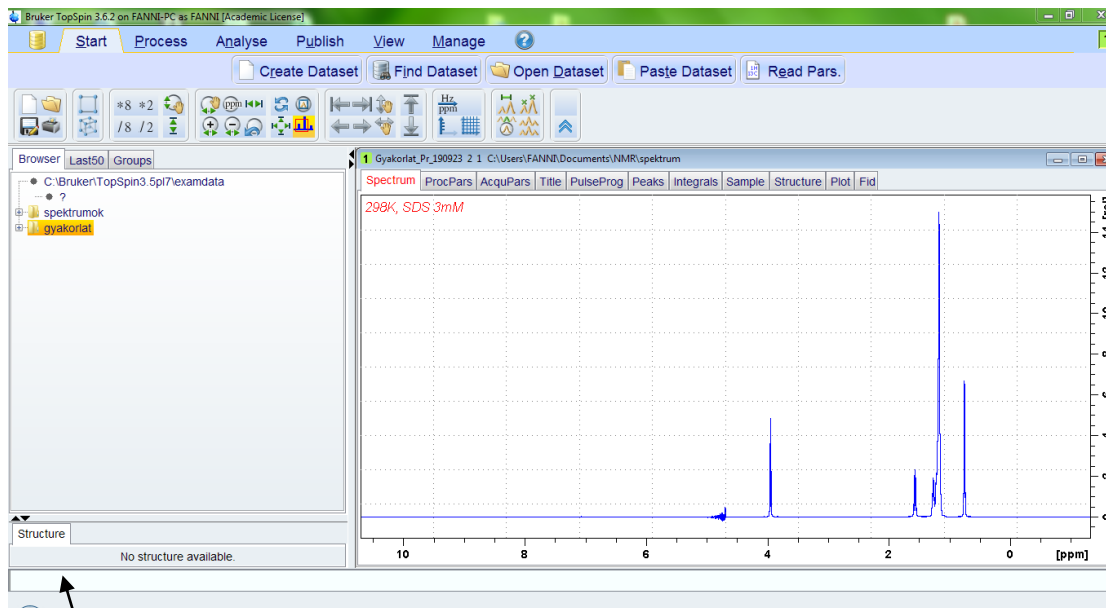
P30 = 1000, D20 = 0.75, 0.1

– Nagyobb molekuláknál (10 kDa <): $\delta = 4$, $\Delta = 200$ ms

P30 = 2000, D20=0.2

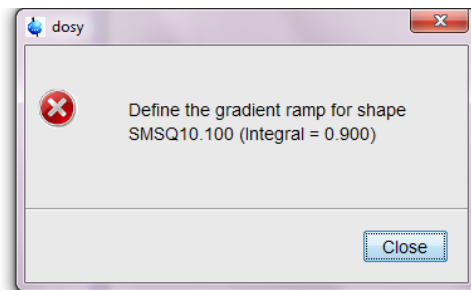
SDS-hez: $\delta = 2$ ms, $\Delta = 150$ ms

DOSY mérés indítása



dosy parancs beírása ide

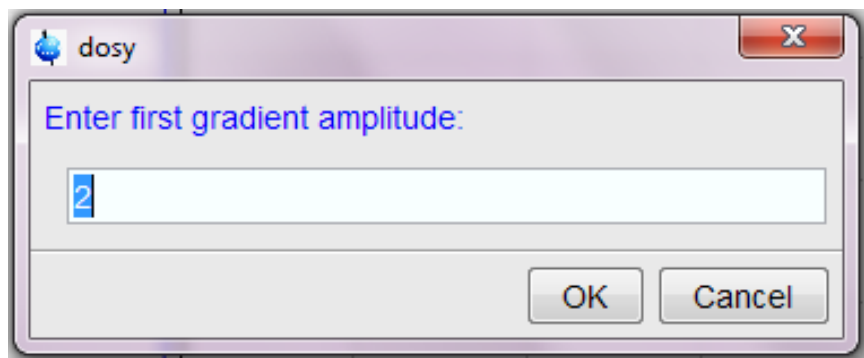
Majd egy párbeszédablak jelenik meg, ahol a gradienserősség változtatásának beállításait adjuk meg



Itt ENTER-t kell ütni

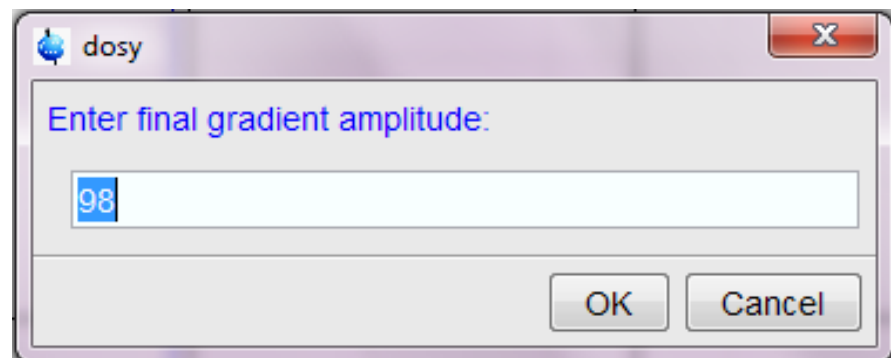
Paraméterek beállítása

1. A gradienserősség első értéke, a maximális gradienserősség %-ában



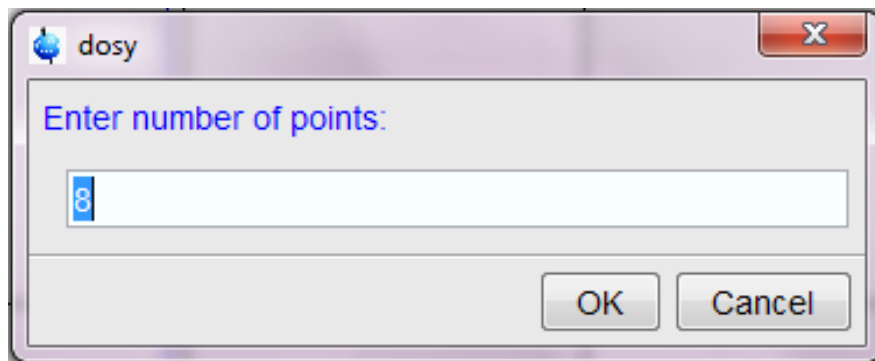
A screenshot of a dialog box titled 'dosy'. It contains a text input field with the value '2' and a label 'Enter first gradient amplitude:'. There are 'OK' and 'Cancel' buttons at the bottom right.

2. Végző gradienserősség



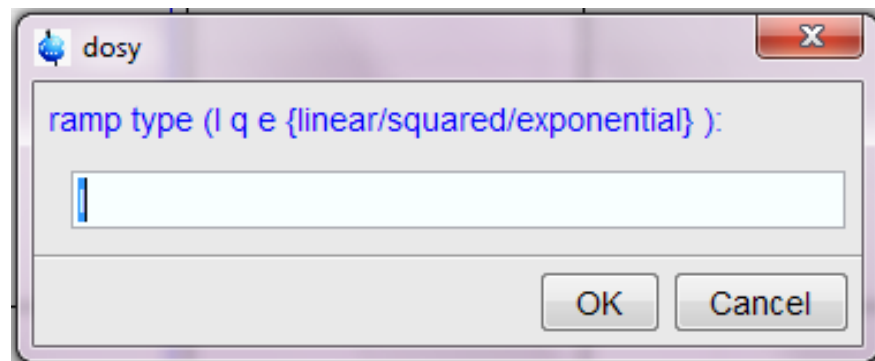
A screenshot of a dialog box titled 'dosy'. It contains a text input field with the value '98' and a label 'Enter final gradient amplitude:'. There are 'OK' and 'Cancel' buttons at the bottom right.

3. a gradienserősséget hány lépésben növeli



A screenshot of a dialog box titled 'dosy'. It contains a text input field with the value '8' and a label 'Enter number of points:'. There are 'OK' and 'Cancel' buttons at the bottom right.

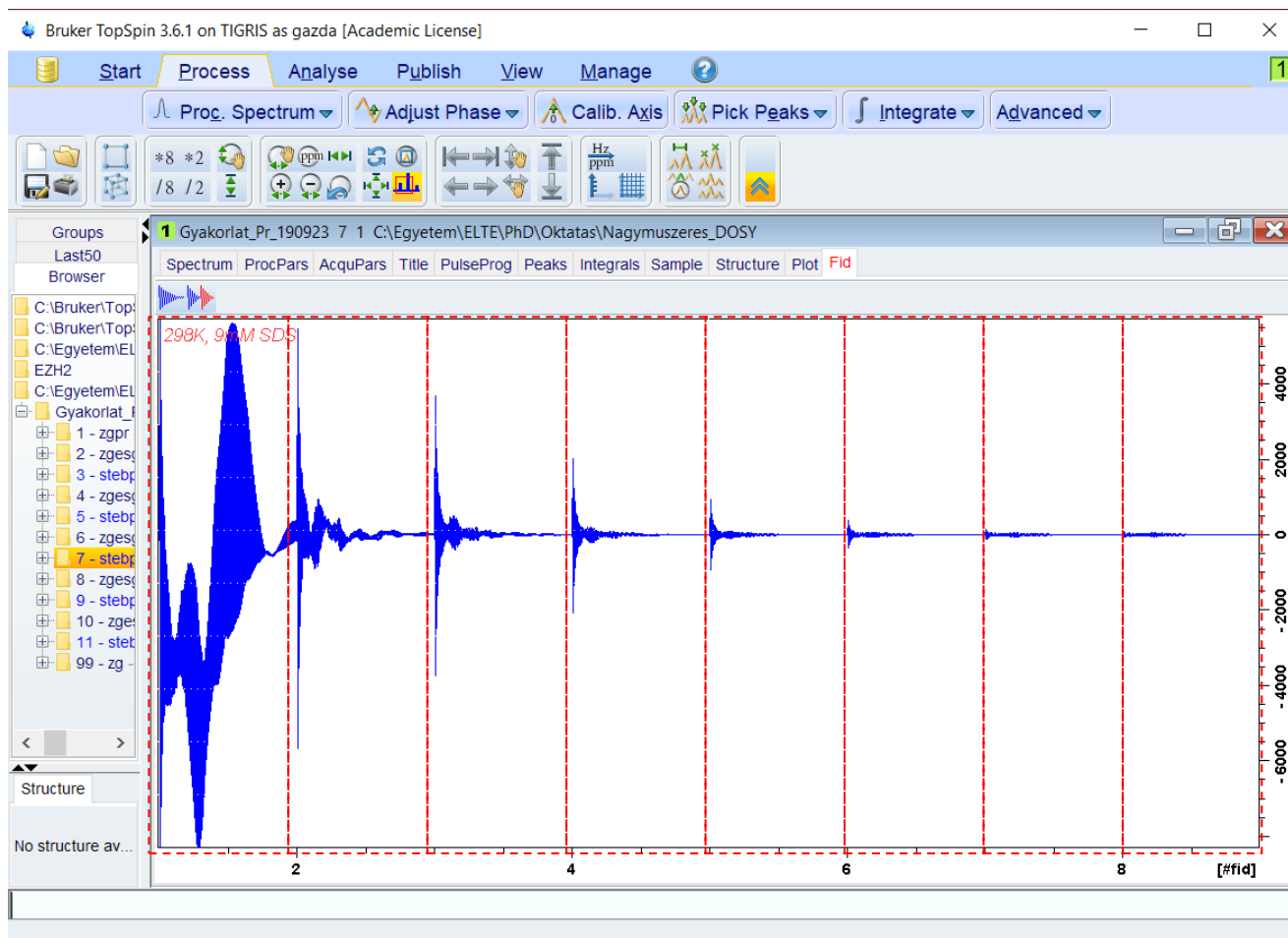
4. Milyen függvény szerint változtatjuk a gradienserősséget



A screenshot of a dialog box titled 'dosy'. It contains a text input field with a cursor and a label 'ramp type (l q e {linear/squared/exponential}):'. There are 'OK' and 'Cancel' buttons at the bottom right.

Itt a gyakorlaton 5 és 95% között, 8 lépésben lineárisan változtattuk.

Egy DOSY mérés 8 FID-je



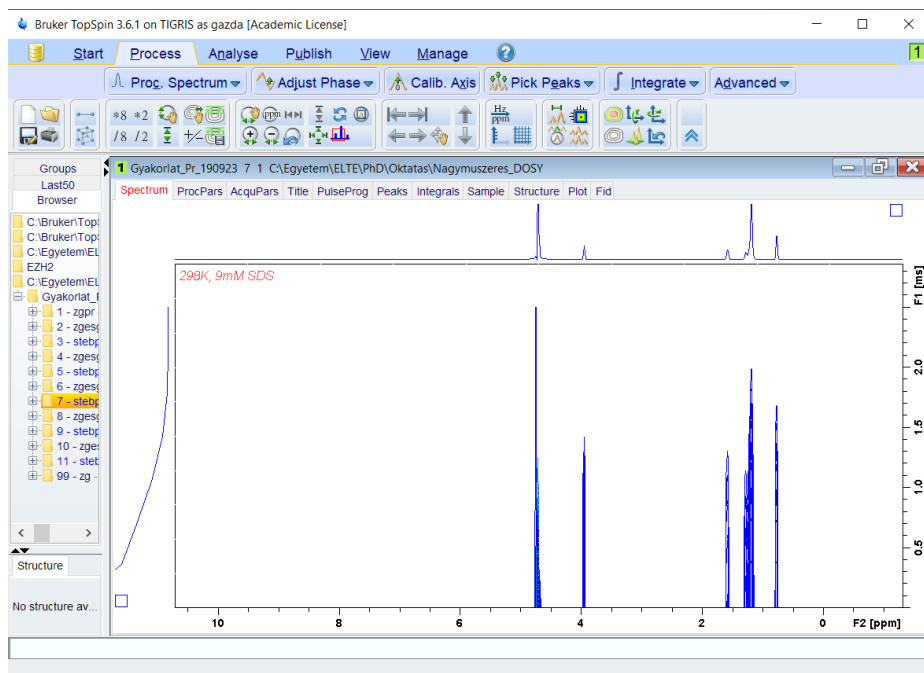
8 elemes mérés, 8 FID látható egymás után, egyre csökkenő intenzitással



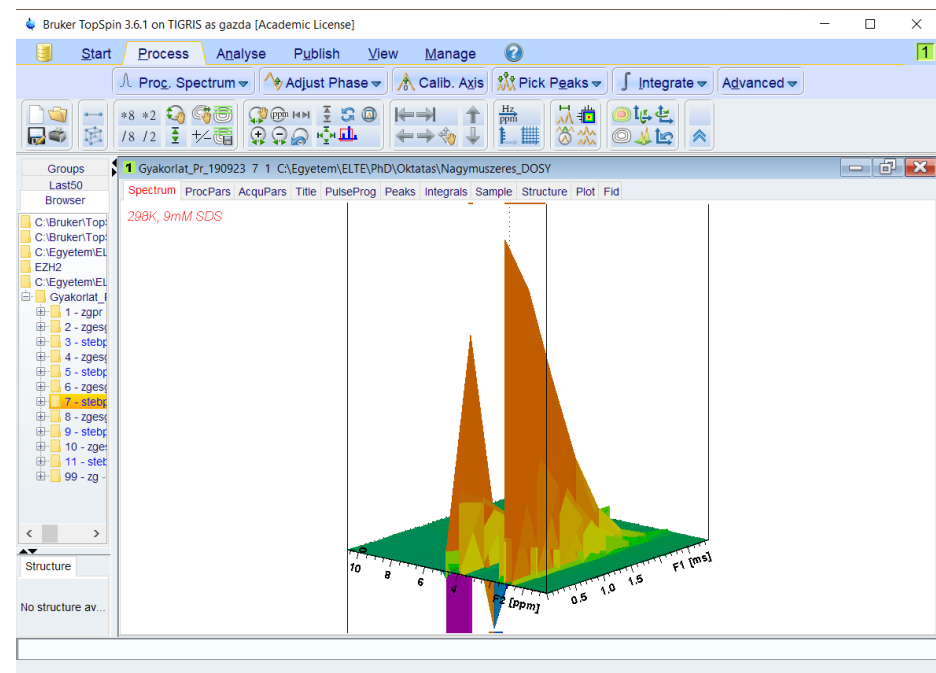
A következő diákon (30-44.) szereplő feladatokat el kell végezni, az eredményeket a jegyzőkönyvben fel kell tüntetni!

Diffúziós mérések kiértékelése

Pszeudo-2D adatsor Fourier-transzformációja *xf2* paranccsal

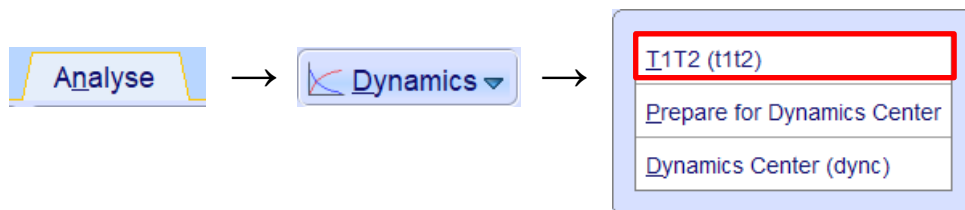



2D ábrázolás

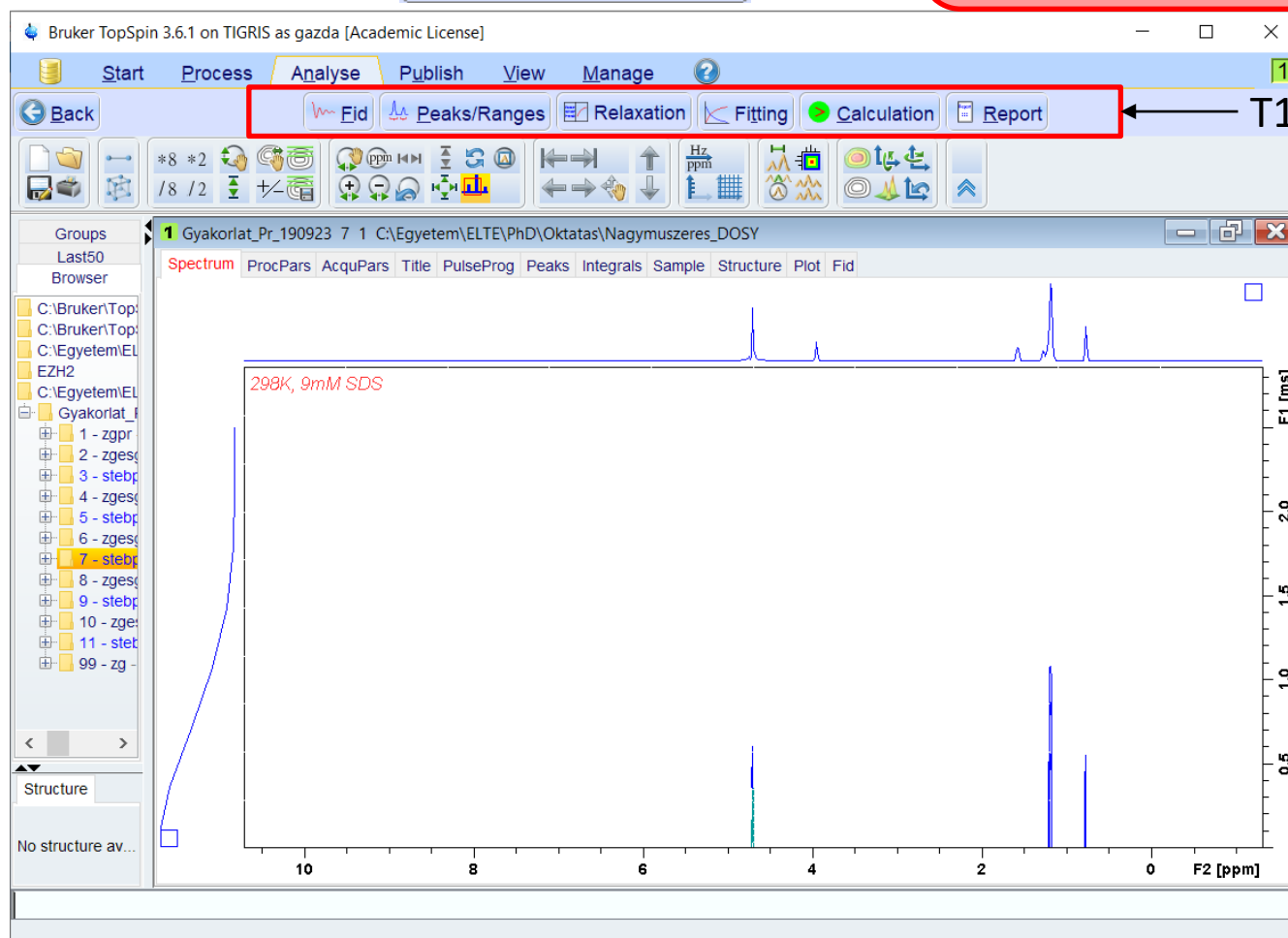


3D ábrázolás

Tanner-egyenlet illesztése

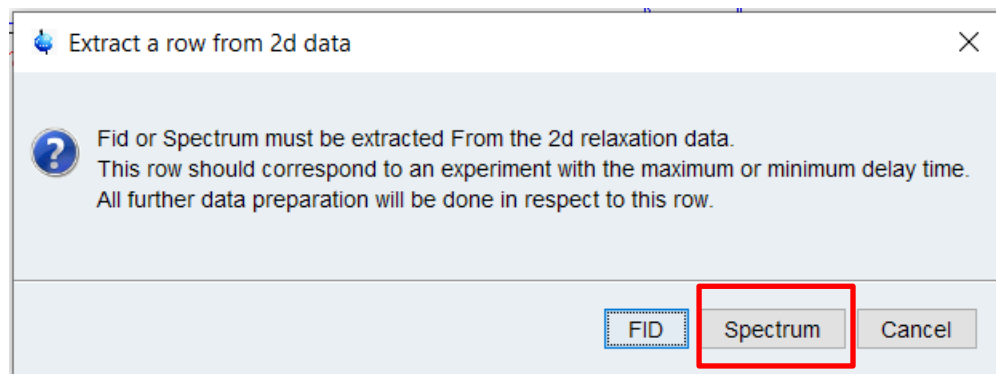


 A kiértékelésnél a Dynamics földre kell kattintani, nem a Dosy-ra!

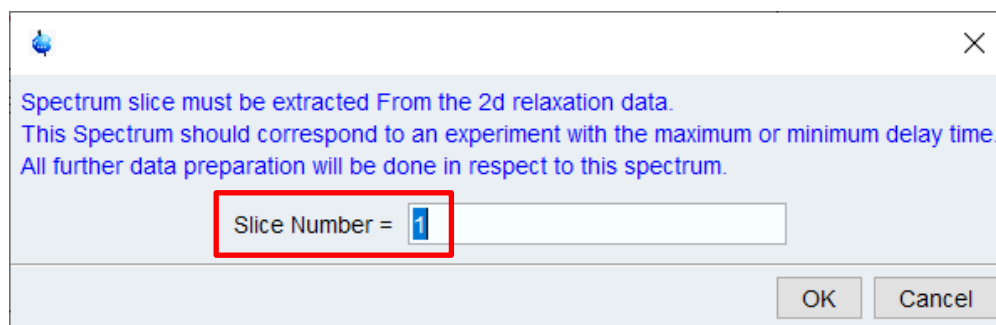


T1T2 menüsora

T1/T2 menüsorán  ikonra kattintunk: megjelenik egy párbeszédablak

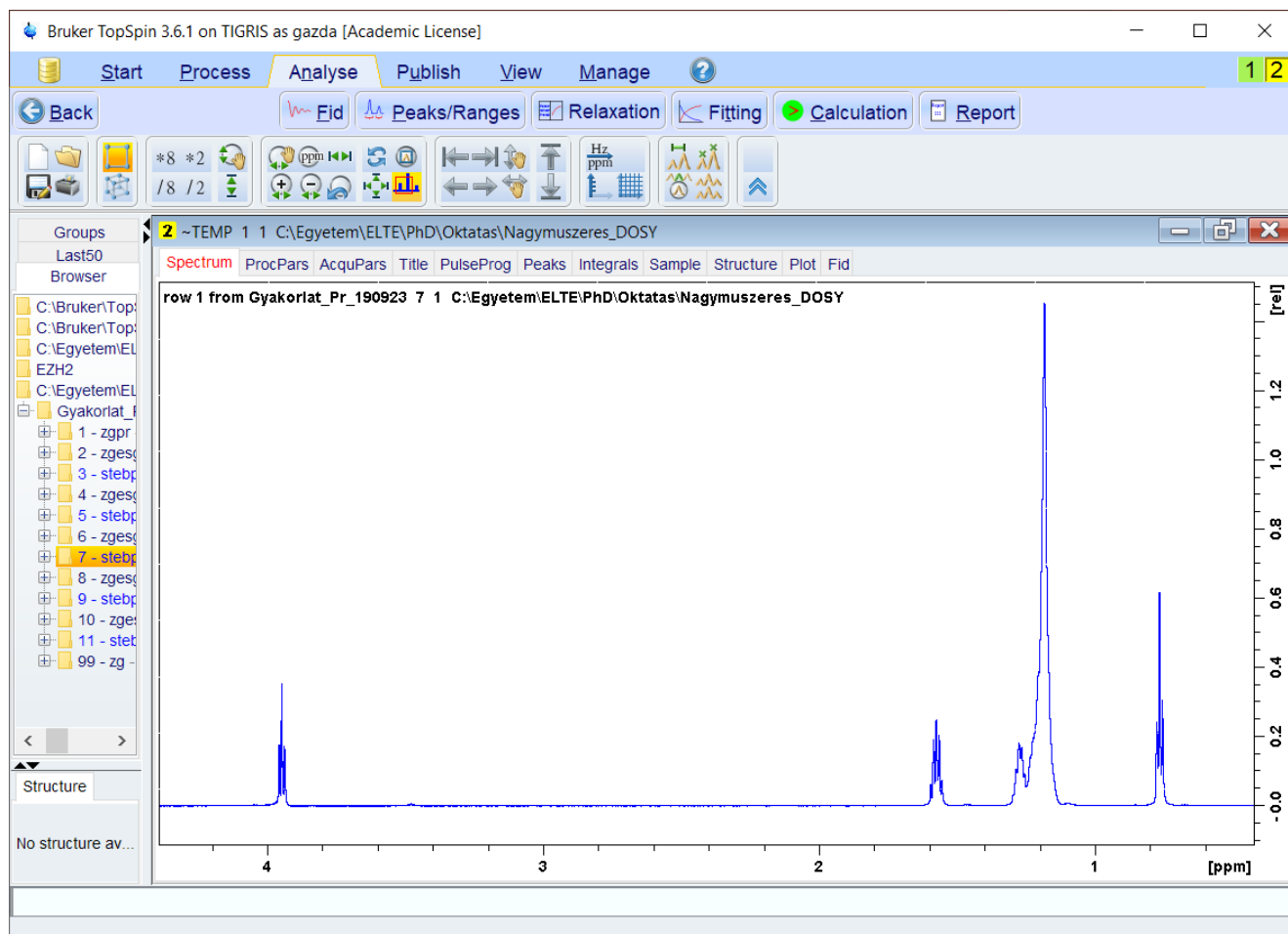


Párbeszédablakon kiválasztjuk „Spectrum”-ot: ezzel kiemelhetünk egy 1D ^1H spektrumot a DOSY méréssorozatából



Válasszuk ki az 1. spektrumot (legkisebb gradienserősséggel felvett): 1
Utána OK

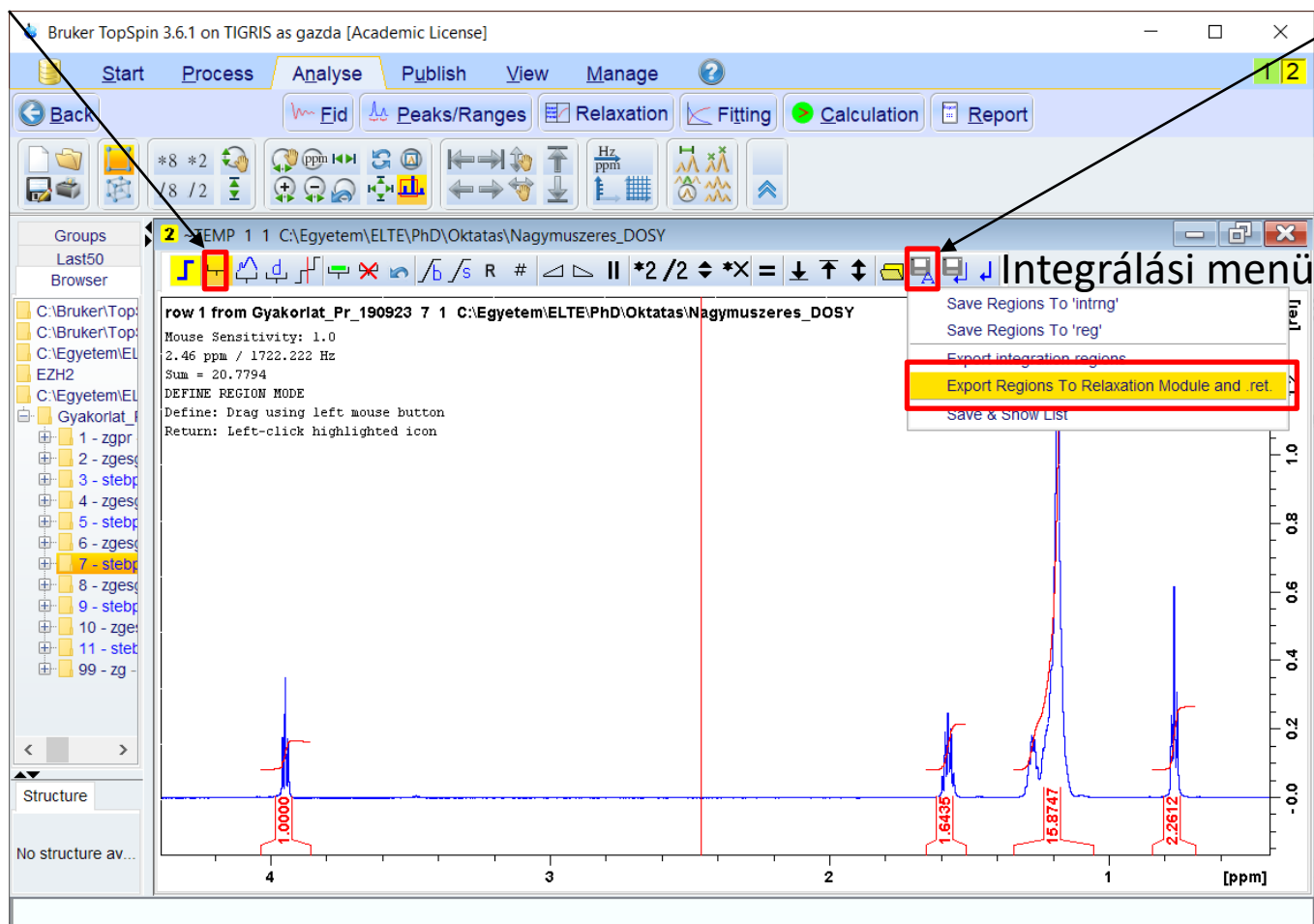
Megjelenik a megfelelő 1D ^1H spektrum.
Nagyítsuk ki az SDS jeleit tartalmazó régiót.




A **Peaks/Ranges** menüpontra kattintunk, majd a párbeszédablakon kiválasztjuk a „Manual integration”-t (a következő párbeszédablak [„Prepare relaxation data”] OK).

Válaszd ki az integrálás ikont (balról a második). Kiválasztás után kézzel kijelöljük az integrálási tartományokat (kattintás, majd egér húzása a spektrumon). Az integrálértékek pirossal jelennek meg.

Mentés másként: úgy kell elmentenünk, hogy ezek az integrálási tartományok minde spektrumra vonatkozzanak a pszeudo2Dadatsorban




A  Relaxation ikonra kattintva új ablak nyílik meg. A figyelmeztetést (vdlst fájlt nem találja) bezárjuk, majd megjelenik egy újabb ablak, ahol a DOSY mérés paramétereit állíthatjuk be.

Az első 9 pont a felvett spektrumok integrálásának módját határozzák meg: Mi mind a 8 spektrumot integrálni szeretnénk, az elsőtől kezdve, egy lépésenként haladva.

A következő 5 pont határozza meg, milyen függvényt illesztünk a kiszámított csúcsintenzitásokra/területekre. Mivel a gradienserősséget módosítottuk az előre definiált diffúziós lista szerint, így ezeket kell beállítani (ezzel egyúttal azt is megadjuk, hogy a Stejskal-Tanner-egyenletet kell illesztenie).

Az utolsó 4 pont a Tanner-egyenletben használt mérési paramétereket adjuk meg. Ezek a GAMMA (készülékállandó), kis delta és nagy delta. Az utolsó a gradienserősség, ez inaktív, mivel ez a független változó.

1.  Relaxation parameters

1	FID # for phase determination
10.0	Left limit for baseline correction
0.0	Right limit for baseline correction
5	Number of drift points
1.0E-5	Convergence limit
8	Number of points
1	First slice
1	Slice increment
1.0	Peak sensitivity

Function Type: vargrad

Number of components: 1

List file name: difflist

Increment (auto): 0.001

to pick data points: pd

5173.0	GAMMA(Hz/G)
2.0	LITDEL(msec)
150.0	BIGDEL(msec)
1.0	GRADIEN(G/cm)

OK Apply Cancel

Elemsszám: 8


Function type: vargrad

List file: difflist

Stejskal-Tanner egyenlet illesztéséhez szükséges paraméterek:

- GAMMA (γ): 5173 (készülékállandó)
- LITDEL: kis delta, δ ms-ban megadva
- BIGDEL: nagy delta, Δ ms-ban megadva

Ha mindent beállítottunk: OK

2.  Diff. : Var. Gradient $I[t]=I[0]\exp(-D*\text{SQR}(2*PI*\text{gamma}*G*LD)*(BD-LD...$

Guess I0	1.0	Step I0	0.1
Guess D	1.0E-9 m2/s	Step D	1.0E-10 m2/s

OK Apply Cancel

Az illesztéshez szükség van kezdeti paraméterek megadására, ezek szerepelnek ebben az ablakban. Ezeket fogadjuk el (OK).

A relaxációs paramétereket (35. dia)
itt lehet visszahívni, ha elsőre
valamit rosszul állítunk be.

Teljes adatsor mutatása (ha nem
jelenik meg mind a 8 pont)

Navigálás a
régiók között

Tanner-egyenlet
illesztése az
összes régióra

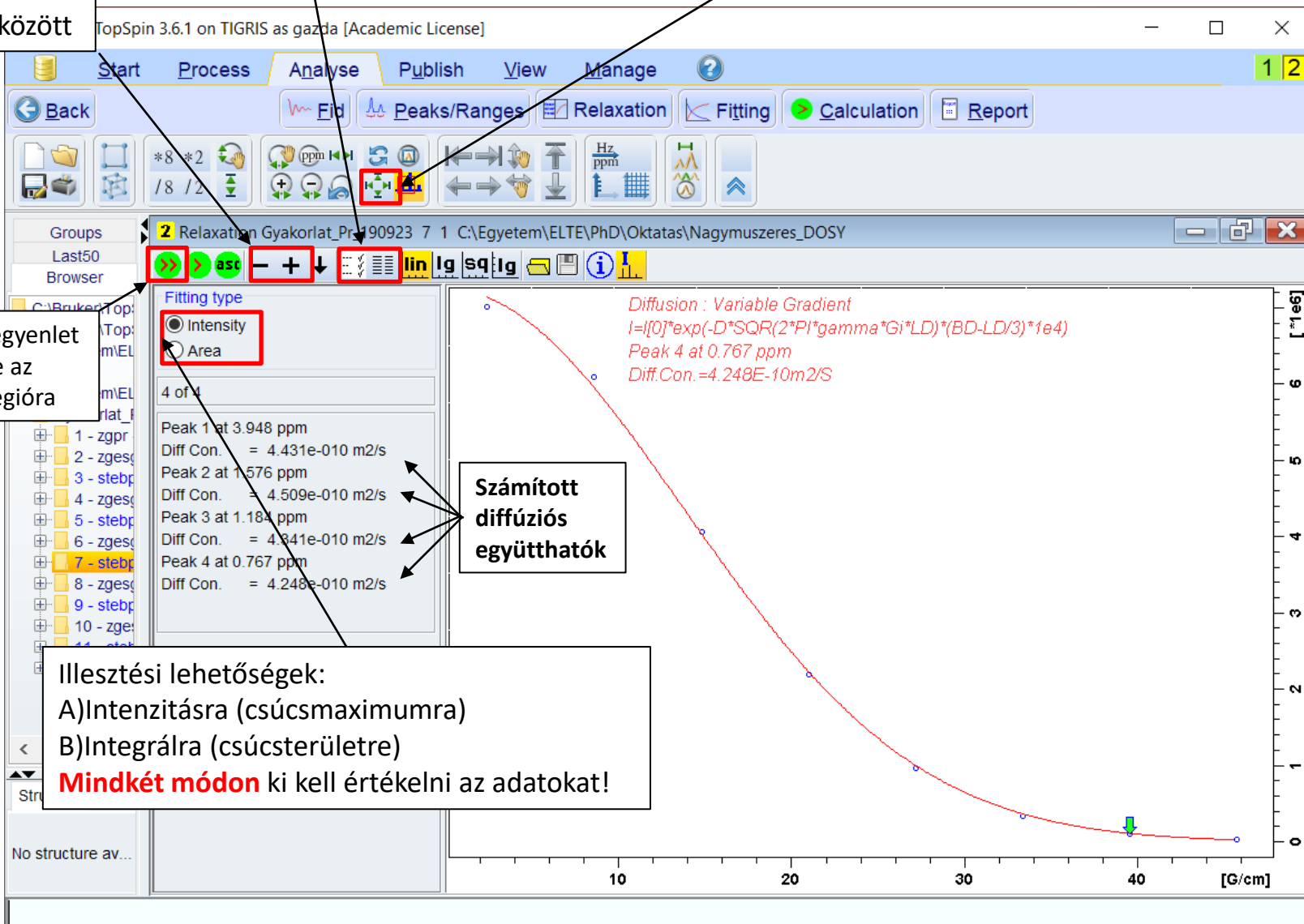
Számított
diffúziós
együtthatók

Illesztési lehetőségek:

A) Intenzitásra (csúcsmaximumra)

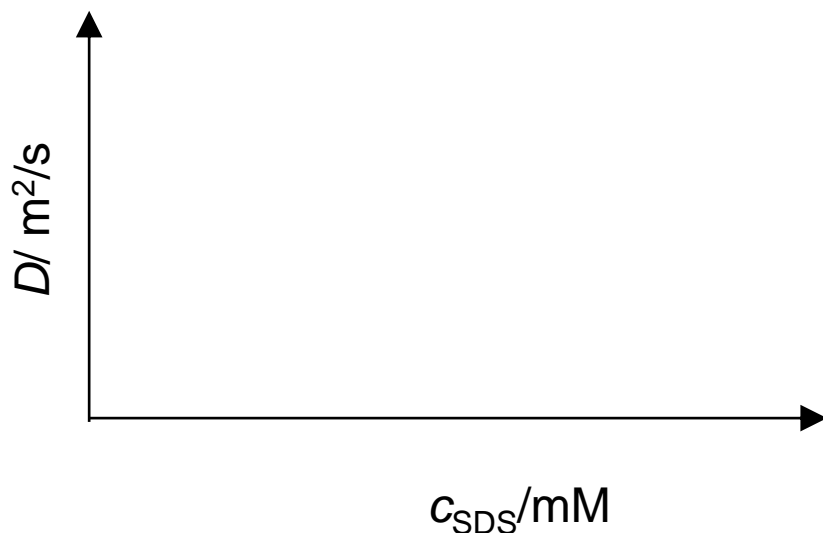
B) Integrálra (csúcsterületre)

Mindkét módon ki kell értékelni az adatokat!



Diffúziós mérések kiértékelése I.

Az előbbi műveletsort (30-36.dia) elvégezzük a különböző koncentrációjú SDS oldatok DOSY mérésein (a pseudo2D DOSY adatfájlokat kékkel, az 1D ^1H spektrumokat feketével jelöli a TopSpin a spektrum fájlok között). Az egyes SDS koncentrációkhoz kapott diffúziós együtthatókat az alább látható grafikonon ábrázoljuk. A két illesztett egyenes metszésponja adja meg a cmc-t.

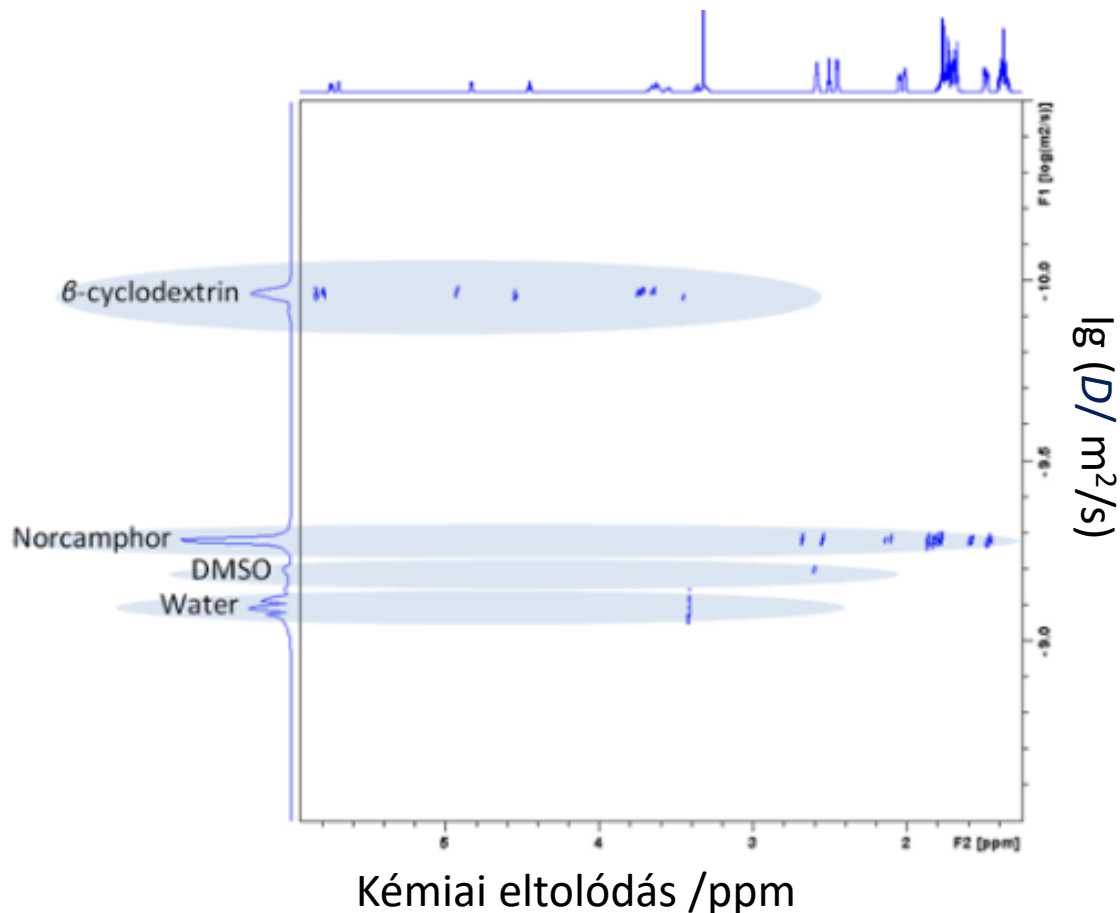


Figyelje meg hogyan változnak a jelek az 1D ^1H spektrumokon! (kémiai eltolódás)
Az SDS melyik protonjain jelentős a változás? Magyarázza a megfigyeléseit!
(Az 1D ^1H spektrumokat a 🌊 ikonnal lehet egymásra rakni.)

Diffúziós mérések kiértékelése II.

eddosy kiértékelés

A kiértékelés eredménye egy 2D spektrumra emlékeztető NMR „kromatogram”, ahol a függőleges tengelyen a diffúziós együttható logaritmusa ($\text{Log}D$), a vízszintes tengelyen az 1D ^1H spektrum szerepel. Többkomponensű rendszer esetén az egyes molekulák vízszintes sávokként jelennek meg a nekik megfelelő $\text{log}D$ -nél. Az alábbi ábra bemutatja, hogy lehet ez alapján komponenseket elkülöníteni egy keverékben.

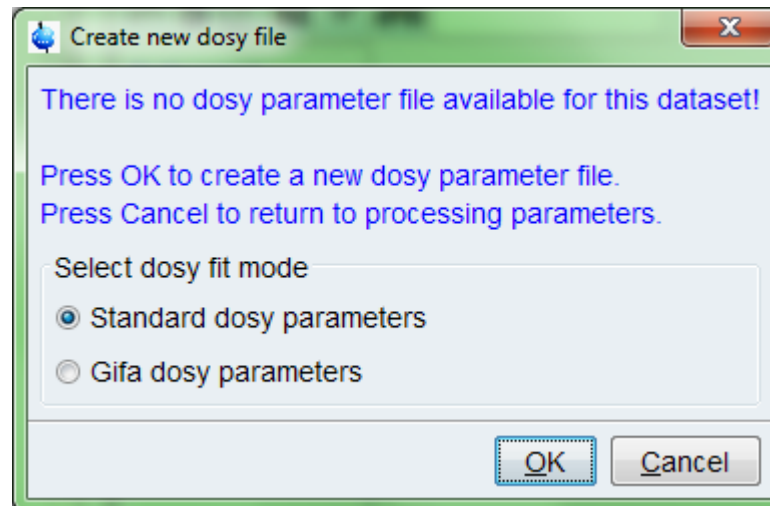


eddosy kiértékelés

Menete:

1. Behívjuk a DOSY spektrumot (bezárunk minden más TopSpinen belül megnyitott ablakot)
2. *xf2* parancs (ezzel Fourier-transzformáljuk az összes spektrumot az adatkészletben)
3. *eddosy* parancs

Következő párbeszéd ablak jelenik meg, OK-ra kell kattintani



eddosy kiértékelés 2.

A következő ablak jelenik meg:

1 Gyakorlat_Pr_190923 3 1 C:\Users\FANNI\Documents\NMR\spektrum

Spectrum ProcPars AcqPars Title PulseProg Peaks Integrals Sample Structure Plot Fid

PG [Icons]

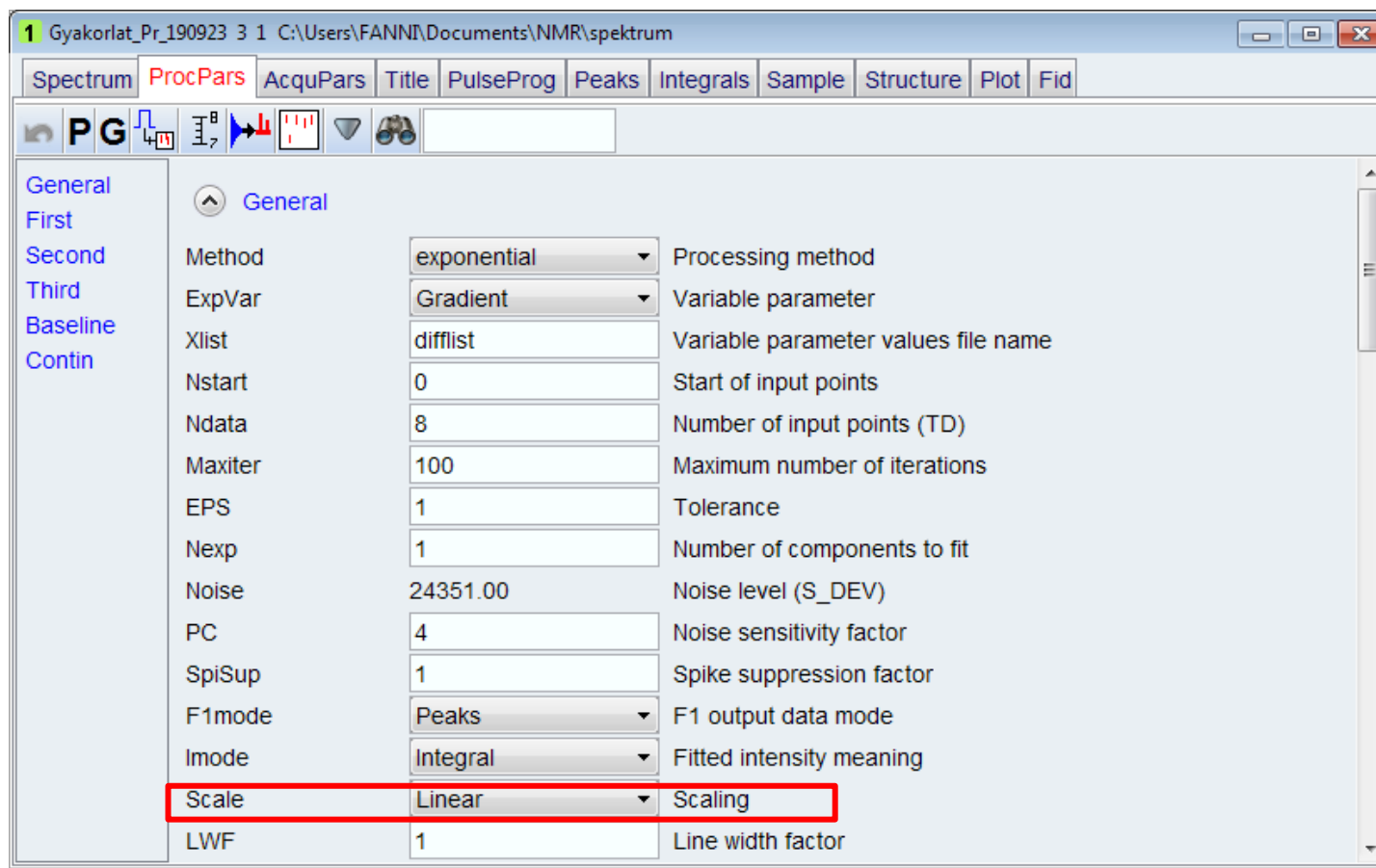
General
First
Second
Third
Baseline
Contin

General

Method	exponential	Processing method
ExpVar	Gradient	Variable parameter
Xlist	difflist	Variable parameter values file name
Nstart	0	Start of input points
Ndata	8	Number of input points (TD)
Maxiter	100	Maximum number of iterations
EPS	1	Tolerance
Nexp	1	Number of components to fit
Noise	24351.00	Noise level (S_DEV)
PC	4	Noise sensitivity factor
SpiSup	1	Spike suppression factor
F1mode	Peaks	F1 output data mode
lmode	Integral	Fitted intensity meaning
Scale	Linear	Scaling
LWF	1	Line width factor

eddosy kiértékelés 3.

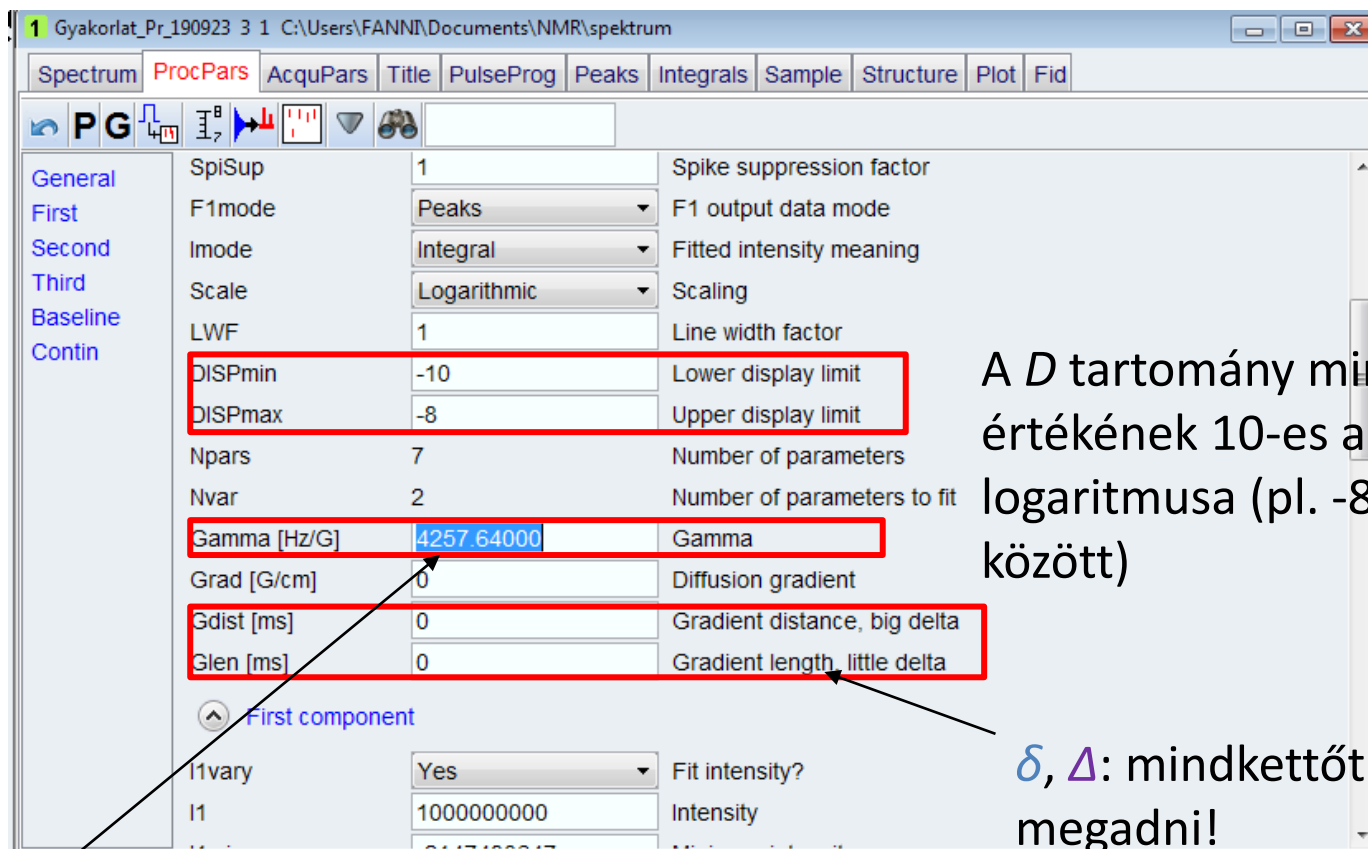
A következőt kell átállítani:



Scale legyen a Linear helyett Logarithmic!

eddosy kiértékelés 4.

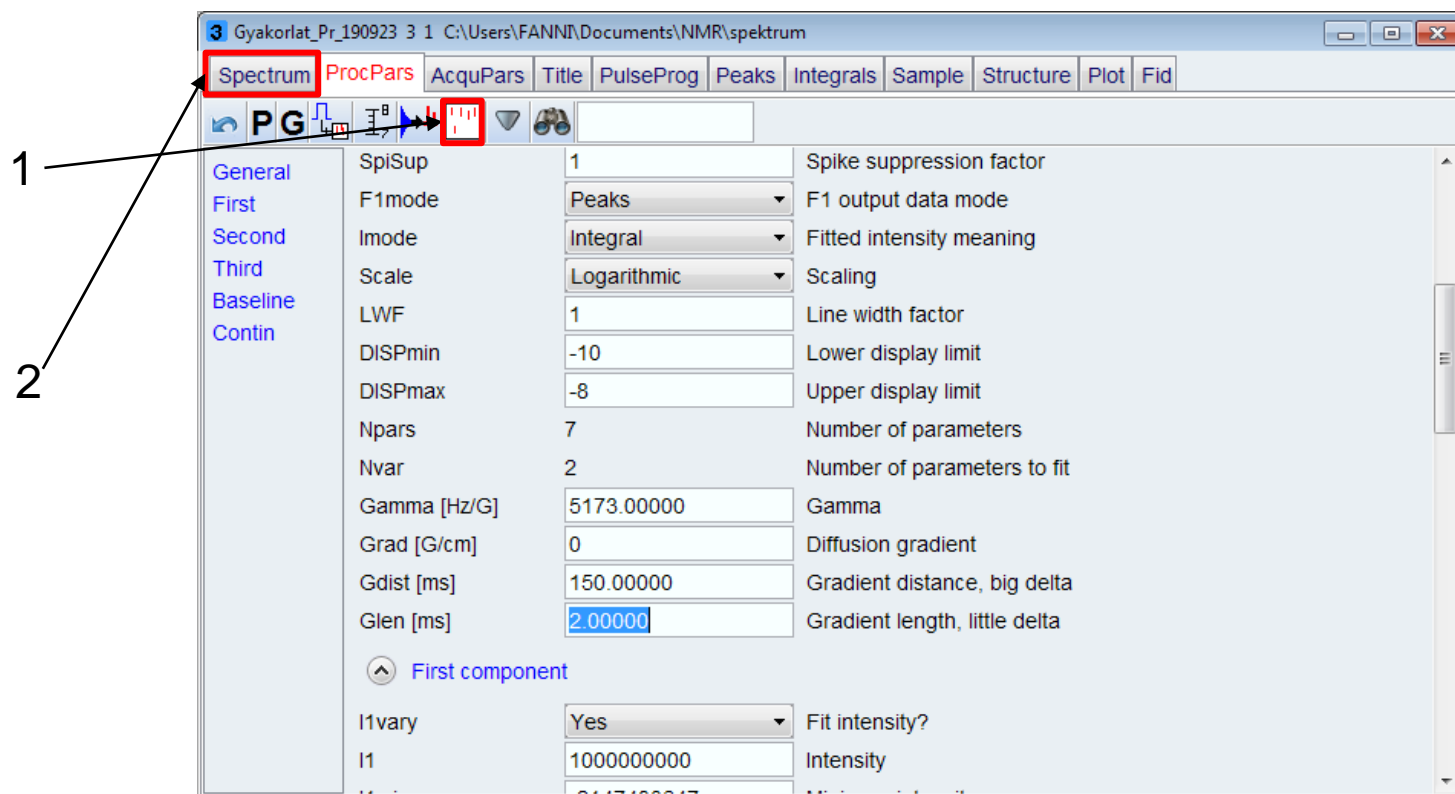
A következőt kell átállítani:



GAMMA: 5173 Hz/G

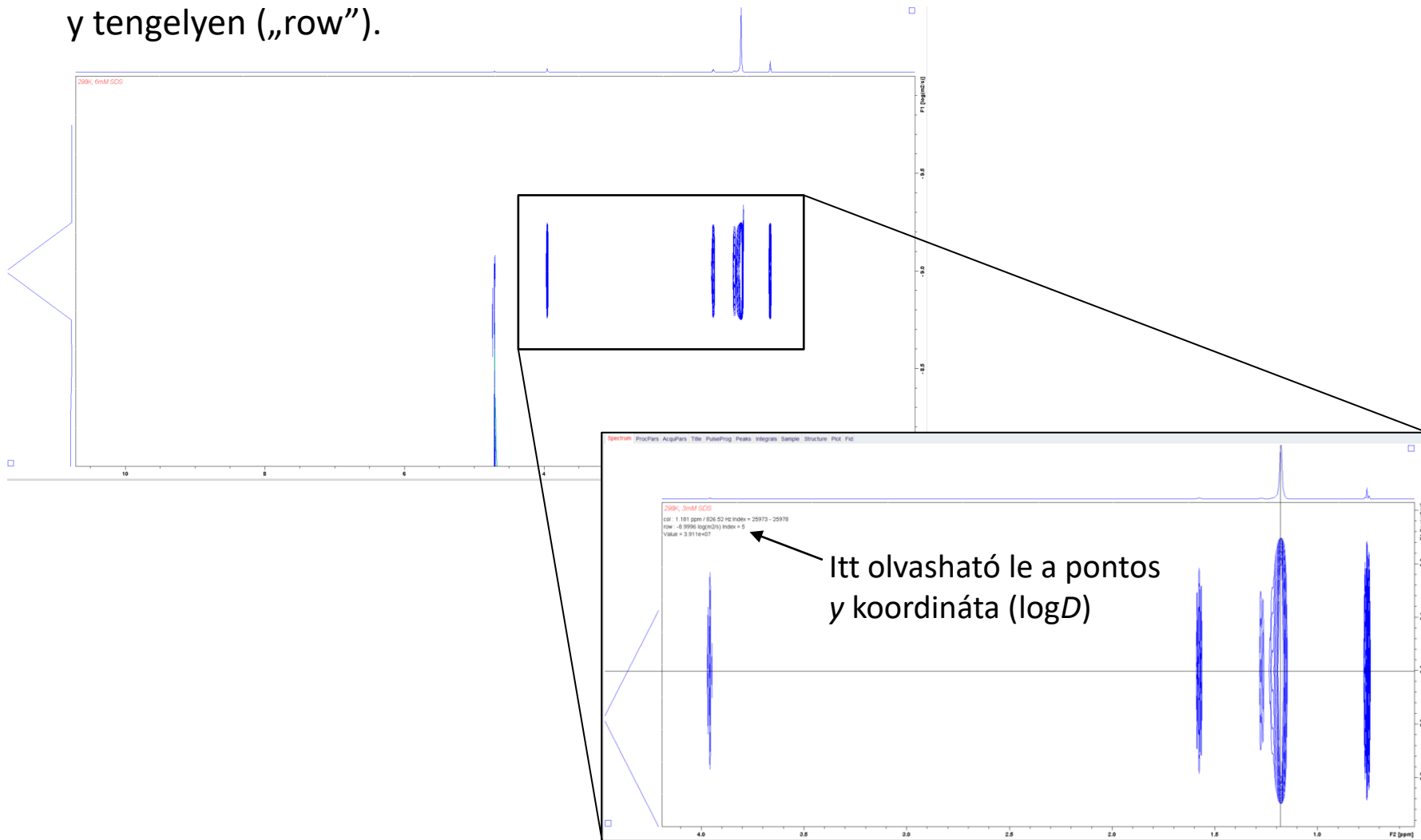
eddosy kiértékelés 5.

Ha mindent beállítottunk, akkor először az 1 gombra kattintunk – elvégzi a számításokat. Utána átlépünk a Spektrumra (2), ahol az "NMR kromatogramot" fogjuk látni.



eddosy kiértékelés 6.

Nagyítsunk rá az SDS jeleire és olvassuk le a $\log D$ értéket a kurzor csúcs közepére való mozgásával. A bal felső sarokban leolvashatjuk a kurzor pontos pozícióját az y tengelyen („row”).



Jegyzőkönyvben szerepeljen:

- ◆ mérést végző hallgatók neve, a mérés dátuma
- ◆ a mérés címe, célja
- ◆ rövid elméleti háttér (SDS, micella, cmc és meghatározása, DOSY, Stejskal-Tanner-egyenlet)
- ◆ mérés menete
- ◆ felhasznált törzsoldatok, bemérés
- ◆ diffúzió paramétereit ($\delta, \Delta, \gamma, p1, o1$)
- ◆ eddosy 2D lg D
- ◆ 1D spektrumok az egyes koncentrációk esetén
- ◆ diffúzió illesztett görbe
- ◆ eredmények táblázatban minden jelre (c , kémiai eltolódás (ppm), D , átlag, szórás), 1D (külön intenzitás és integrál értékekre), 2D kiértékelésből
- ◆ koncentráció-diffúziós együttható görbék, az illesztett egyenesek egyenletei, számolt cmc
- ◆ összevetés irodalmi adatokkal, forrás
- ◆ hibák eredete, az eltérések magyarázata
- ◆ a gyakorlati anyagot tartalmazó PowerPoint bemutatóban elhangzó kérdésekre a válasz

Jegyzőkönyv beadása: 1 héten belül
Emailben: abodor@caesar.elte.hu