

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«НОВОСИБИРСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ».

Физический факультет
Кафедра общей физики

Одуд Илья Михайлович

КУРСОВАЯ РАБОТА

«Исследование влияния буферных солей на метаболомный профиль
методом ЯМР-спектроскопии»

Практикум электричества и магнетизма, 2курс, группа № 18305

Научный руководитель:

к.ф-м.н Е.А. Зеленцова

Оценка научного руководителя:

« _____ » _____ 2019г.

Преподаватель практикума:

к.ф-м.н И.А. Иванов

Оценка преподавателя практикума:

« _____ » _____ 2019г.

Куратор практикума:

к.т.н. В.Т. Астрелин

Итоговая оценка:

« _____ » _____ 2019г.

Новосибирск, 2019г.

Аннотация

Анализ экстрактов тканей животных и растений является наиболее частым подходом в метаболомике, поскольку позволяет проводить метаболомное профилирование как с помощью ЯМР, так и с помощью ВЭЖХ-МС и дает огромное количество информации о метаболомном составе биологических объектов. При этом одним из неотъемлемых этапов пробоподготовки экстрактов для ЯМР анализа метаболомного состава экстракта является его лиофильная сушка, позволяющая перевести анализируемые метаболиты из воды в дейтерированный буфер. В работах по метаболомике неоднократно описано присутствие летучих соединений в экстракте, претерпевшем стадию лиофильной сушки, однако нет объяснения эффекта сохранения данных соединений в экстракте. В настоящей работе исследуется влияние буферных солей на задержку некоторых веществ (хлороформ, метанол, этанол, муравьиная кислота, уксусная кислота) в метаболомной экстракте после лиофильной сушки методом ЯМР — спектроскопии.

В итоге, из веществ: хлороформ, метанол, этанол, муравьиная кислота, уксусная кислота, буферные соли задержали муравьиную и уксусную кислоту.

Оглавление

Аннотация

1. Введение	4
2. Литературный обзор.....	5
2.1. Явление ядерного магнитного резонанса.....	5
2.2. Протонный магнитный резонанс (ПМР), или ЯМР ^1H	5
2.3. Химический сдвиг	6
2.4. Спин-спиновое взаимодействие	7
2.5. Поведение спиновых систем во внешнем магнитном поле	8
3. Экспериментальная часть	10
3.1. Постановка эксперимента	10
3.2. Используемые материалы	10
3.3. Оборудование.....	10
3.4. Подготовка	11
4. Результаты и обсуждение	16
5. Выводы.....	19
6. Список литературы.....	20

1. Введение

Изучение химических процессов, в которые вовлечены промежуточные и конечные продукты обмена веществ, размером не более 1 КДа (К а.е.м.), называется метаболомикой, а такие вещества — метаболитами. В метаболомике существует три вида анализа данных: качественный (регистрирует наличие исследуемых веществ), полуколичественный (определяется относительное содержание веществ в образце), количественный (измеряются концентрации исследуемых веществ).

В метаболомике широко используется две основные инструментальные платформы:

Масс — спектрометрия в сопряжении с жидкостной хроматографией (ВЭЖК-МС); позволяет проводить метаболомный анализ после предварительного разделения метаболомного экстракта на фракции. Это крайне чувствительный метод, позволяющих регистрировать тысячи соединений, но количественные измерения в масс-спектрометрии очень трудоемкие.

Спектроскопия ЯМР; даёт возможность анализировать экстракт целиком, без предварительного разделения, а также позволяет очень легко перейти от качественных измерений к количественным. Для использования данного метода на этапе подготовки образца используется лиофильная сушка, которая позволяет перевести анализируемые метаболиты из водной среды в дейтерированный буфер.

В ряде исследований [1, 2], связанных с определением метаболомного состава, неоднократно описывалось присутствие летучих соединений в экстракте, претерпевшем стадию лиофильной сушки, однако нет объяснения эффекта сохранения данных соединений в образце. Возможно, буферные соли биологических систем могут вызывать описанный выше эффект.

Целью данной работы было исследование влияния соли хлорида натрия на задержку в образце летучих веществ после лиофильной сушки.

2. Литературный обзор

2.1. Явление ядерного магнитного резонанса

Спектроскопия ядерного магнитного резонанса – вид спектроскопии, который регистрирует переходы между магнитными энергетическими уровнями атомных ядер, вызываемые радиочастотным излучением. Только ядра со спиновым квантовым числом I , отличным от «0», могут вызывать сигнал ЯМР (I равно «0» для ядер с четным числом протонов и нейтронов).

В приложенном магнитном поле с напряженностью H_0 ядро со спиновым числом I может принимать $2I + 1$ ориентаций. Количество энергии, на которое отличаются эти уровни, возрастает с возрастанием H_0 , однако при данном значении H_0 разность энергий между двумя соседними уровнями есть величина постоянная.

Разность энергий двух соседних уровней ΔE определяется выражением (1):

$$\Delta E = H_0 \gamma h / 2\pi \quad (1)$$

где γ – гиромагнитное отношение; H_0 - напряженность внешнего магнитного поля; h - постоянная Планка.

Эксперимент ЯМР состоит в следующем: передача энергии ядру, перевод ядра на более высокий уровень. Поскольку значение ΔE зависит от молекулярного окружения возбуждаемого ядра, имеется возможность связать величину ΔE со строением молекулы и в конечном итоге определить структуру всей молекулы.

2.2. Протонный магнитный резонанс (ПМР), или ЯМР 1H

Для исследования с помощью ЯМР спектроскопии, вещество растворяют в подходящем растворителе.

В магнитном поле протоны мгновенно ориентируются в направлении поля H_0 . В первый момент после внесения образца число ядер, ориентированных вдоль поля и против поля, одинаково (50% на 50%) (рисунок 1).

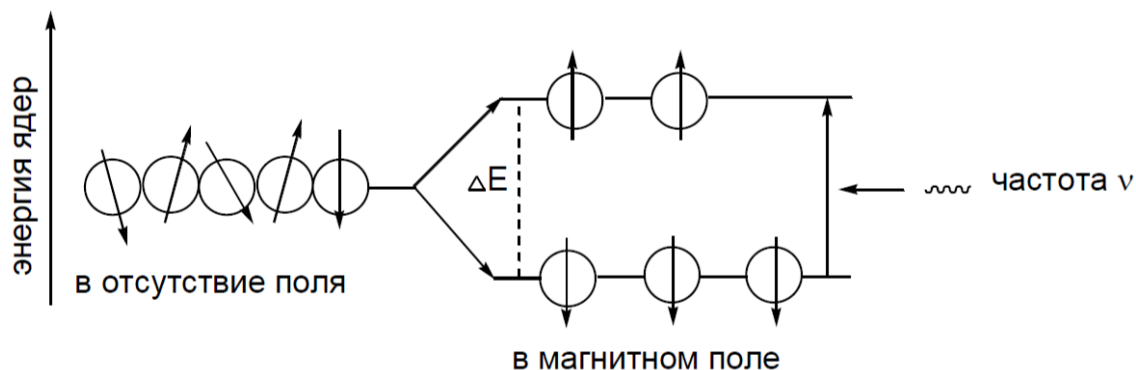


Рисунок 1. Ориентация протонов под действием внешнего магнитного поля H_0 .

Итоговое соотношение: $\Delta E = h\nu_i$; значит, если на ядро воздействовать частотой, которая равна разности энергий между более высоким энергетическим состоянием ядра и более низким его состоянием, то оно будет взаимодействовать с излучением и изменит свое энергетическое состояние. Те ядра, которые находились в более высоком энергетическом состоянии, перейдут на нижний уровень, и наоборот. Однако, поскольку на нижнем энергетическом уровне существует некоторый избыток ядер, в более высокое энергетическое состояние перейдет большее число ядер, и в результате взаимодействия ядер с излучением данной частоты произойдет поглощение электромагнитного излучения. Именно это поглощение и вызывает сигнал ЯМР (ν_i - резонансной частотой конкретного ядра).

Для существования различия в заселенности энергетических уровней необходим перенос энергии молекулярного движения на спины ядер. Различие в заселенности возникает только тогда, когда ядра окажутся в магнитном поле.

2.3. Химический сдвиг

Химический сдвиг протона - разность положения сигнала данного протона и положение сигнала стандарта.

В качестве стандарта используют 3-метилсилилпропансульфонатом натрия (DSS). Отображение ЯМР-спектра проводят таким образом, чтобы H_0 возрастало слева направо. При этом химический сдвиг сигнала стандарта принимают за ноль, и регистрируется в наиболее сильном поле.

Химический сдвиг выражают в миллионных долях (м.д. или ppm) и обозначают как « δ »:

$$\delta = \Delta\nu * 10^6 / \text{рабочая частота, (Гц)} \quad (2)$$

Оказалось, что химические сдвиги протонов органических соединений различных классов лежат в разных областях и, таким образом, по положению сигнала ЯМР можно определить строение вещества и идентифицировать присутствие метаболитов в экстракте биологических объектов.

2.4. Спин-спиновое взаимодействие

Сигналы протона в спектре могут быть представлены в виде одиночной линии или в виде групп линий.

Если сигнал представлен в виде двух линий определенной интенсивности (рисунок 2) – сигнал называется «дублет»; в виде трех линий – «триплет», в виде четырех линий – «квадруплет», или «квартет». Сигнал может быть представлен группой из шести и более линий, в этом случае говорят о мультиплете [3, стр. 4-19].

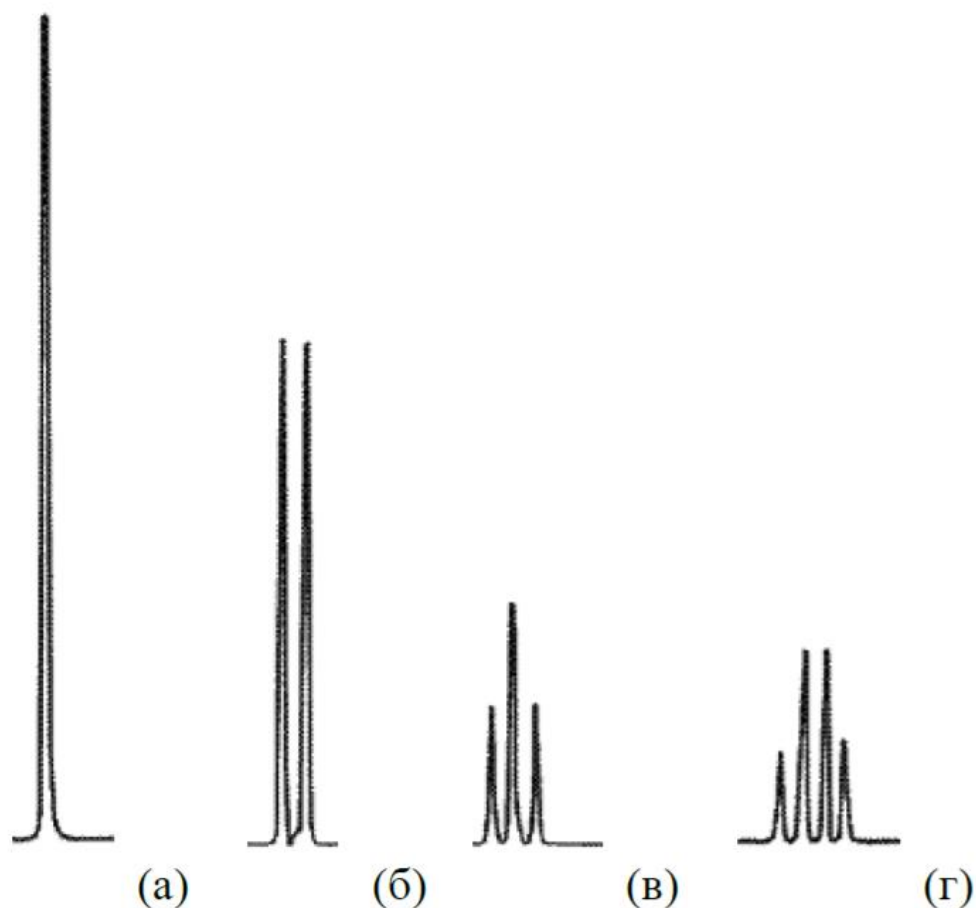


Рисунок 2. Сигналы ЯМР ^1H : а – синглет; б – дублет; в – триплет; г-квадруплет.

2.5. Поведение спиновых систем во внешнем магнитном поле

Ряд свойств спектров ЯМР возможно путём классического рассмотрения.

Момент сил, действующий на магнитный момент, наклонённый под произвольным углом θ к направлению магнитного поля (рисунок 3), заставляет магнитный момент ядра испытывать прецессию вокруг направления поля с частотой, определяемой формулой Лармора (3):

$$\nu_0 = - \gamma H_0 / 2\pi \quad (3)$$

где γ - гиромагнитное отношение, H_0 - внешнее магнитное поле.

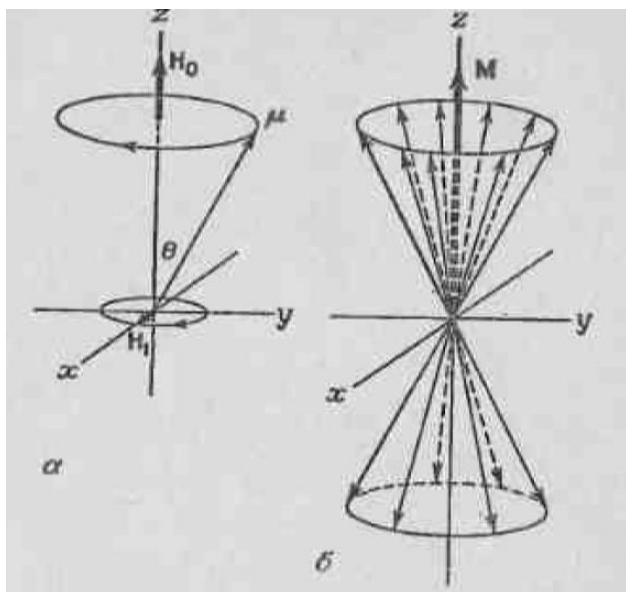


Рисунок 3. Прецессия магнитного момента.

а — прецессия магнитного момента μ вокруг направления постоянного магнитного поля H_0 . Вектор высокочастотного поля H_1 вращается в плоскости xu ; б — прецессия ансамбля одинаковых магнитных моментов ядер с $I=1/2$. Результирующая макроскопическая намагниченность направлена вдоль H_0 (оси z), и её равновесное значение равно M_0 .

Зачастую, рассматривается ансамбль магнитных моментов, содержащий большое число одинаковых ядер. На рисунке 3 б изображена прецессия ядерных моментов с $I=1/2$.

Все моменты прецессируют с одинаковой частотой; направления x и y идентичны, нет причин, по которым сохранялась бы фазовая когерентность моментов в плоскости xu . Однако в системе имеется выделенное направление оси z , задаваемая направлением магнитного поля и H_0 параллельная ему. В результате наблюдается макроскопическая намагниченность M , направленная вдоль оси z .

Далее, при рассмотрении импульсных процессов почти всегда вполне достаточно иметь дело с макроскопической намагниченностью [4, стр. 23-25].

3. Экспериментальная часть

3.1. Постановка эксперимента

Требуется проверить влияние буферных солей на задержку летучих веществ в растворе после лиофильной сушки. Пронаблюдать зависимость эффекта от концентрации хлорида натрия в растворе.

1. В каждую пробирку добавлялся раствор хлорида натрия 1,5 мл (таблица 1, рисунок 4) и раствор веществ 20 мкл (таблица 2, рисунок 5).
2. Пробирки помещались на автоматическую мешалку.
3. Проводилась лиофильная сушка образца.
4. Экстракт разводился в дейтерированном буфере с DSS.
5. Снимались ЯМР спектра образцов, использовалось преднасыщение воды и 90-градусный импульс с последующей регистрацией спада свободной индукции.

3.2. Используемые материалы

В работе использовались следующие летучие жидкости: метанол, этанол, муравьиная кислота, уксусная кислота, хлороформ. Хлорид натрия брался в виде мелкозернистых кристаллов. Экспериментальных растворов приготавливался в дистиллированной воде (18 МОм). Для съёмки образцы растворялись в дейтерированном буферном растворе (0.02M pH 7.05) с DSS ($2 \cdot 10^{-6}$ M).

3.3. Оборудование

Взвешивание соли производилось на весах Sartorius TE1245. Образцы перемешиваются на автоматическом шейкере Вортекс MSV – 3500. Лيوфильная сушка происходила центрифуге Christ RVC 2-25 CD plus с ловушкой Christ CT 02-50 и форвакуумным насосом. ЯМР-спектры получена на ЯМР-спектрометре AVANCE III HD 700 MHz (Bruker BioSpin, Германия), оборудованном криомагнитом Ascend с полем 16.44 Тесла. Для получения

ЯМР спектра образца использовалось преднасыщение воды и 90-градусный импульс с последующей регистрацией спада свободной индукции.

3.4. Подготовка

1. Для эксперимента необходимо приготовить растворы соли определённых концентраций (таблица 1). Значения для концентраций соли взяты в значимых точках.

$2 \cdot 10^{-4}\%$ — значение соответствует примерной концентрации (по порядку величины) исследуемых веществ в метаболомных работах (30 мкМ) [1, 2].

$10^{-3}\%$ — пятикратное значение предыдущего столбца (соответствует концентрации всех летучих веществ).

0,1% — половинка от концентрации соли в физиологическом растворе (опорное значение; большая часть образцов — биологические ткани).

1%, 3% — десятикратные концентрации относительно концентрации соли в физиологическом растворе — «избыток».

Таблица 1. Концентрации хлорида натрия.

1	2	3	4	5	6
0%	$2 \cdot 10^{-4}\%$	$10^{-3}\%$	0,1%	1%	3%

2. Метанола, этанола, хлороформа, муравьиной и уксусной кислоты берём в равном количестве. Вещества добавляем в водный раствор. Методом «двойного разведения» получаем нужную концентрацию (2,25 мМ)

Таблица 2. Объём летучих веществ.

Муравьиная кислота	Уксусная кислота	Метанол	Этанол	Хлороформ
50 мкл	76 мкл	54 мкл	78 мкл	107 мкл

В таблице 2 записаны значения объёма чистых веществ. На рисунке 6 отображена схема процесса приготовления водного раствора веществ.

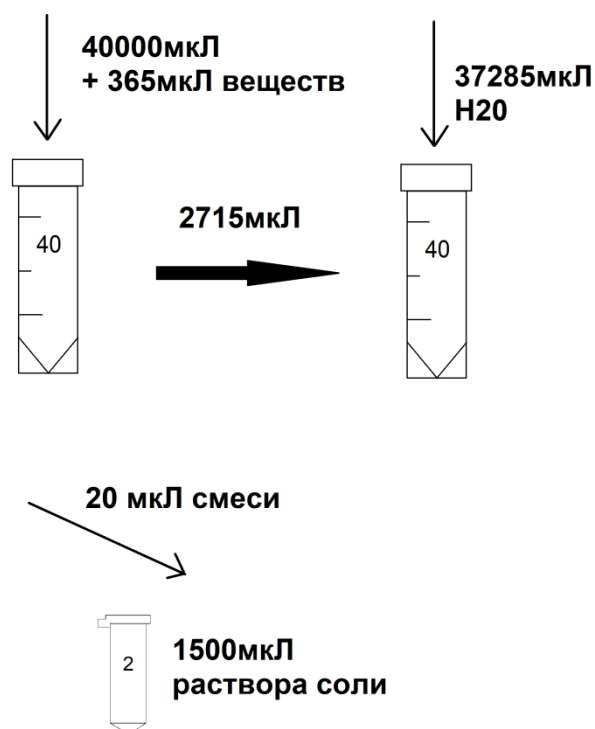


Рисунок 5. Схема двойного разведения летучих веществ.

3. Обработка сигнала осуществлялась с помощью программного пакета “Mestrenowa”. Полученные данные занесены в таблицу 3. Характерный вид ЯМР-спектра образца (с 0,1% содержанием соли), выглядит следующим образом (рисунок 6).

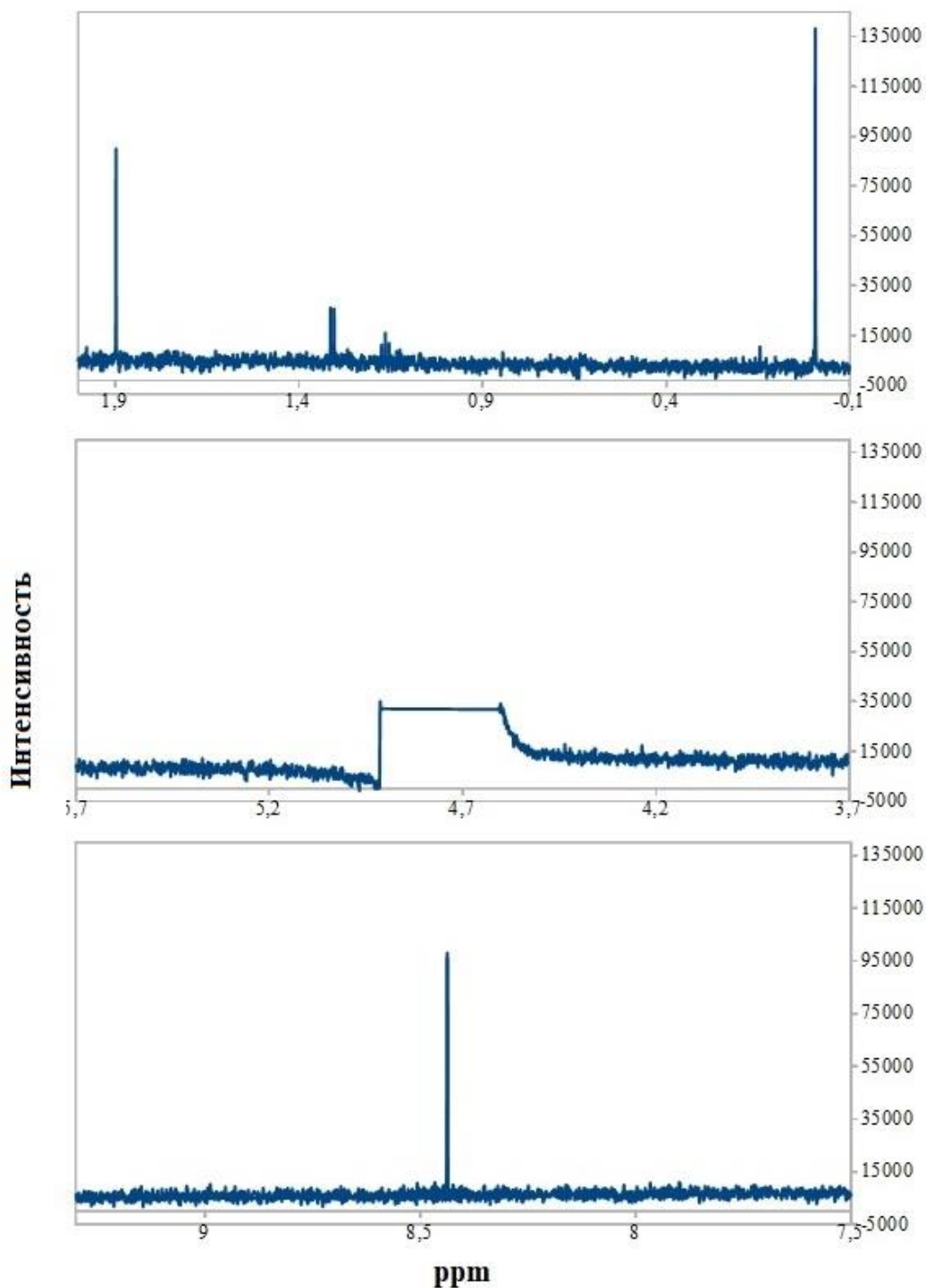


Рисунок 6. Спектр ЯМР от образца с 0,1% содержанием соли.

Таблица 3. Полученные данные. Мур.кис. - муравьиная кислота, укс.кис. - уксусная кислота.

NaCl, концентрация	Названия веществ	Химический сдвиг, ppm	Кол.про-тонов в сигнале	Знач. интеграла	Концентрация, М	Кол.вещ., Моль	Конц. теор., М	Относительная
0	DSS	0	6	1,72E+06	7,61E-07	-	-	-
	Укс.кис.	1,9	3	79420,3	9,21E-08	1,38E-10	4,5E-08	0,31%
	Мур.кис.	8,44	1	170432	5,93E-07	8,90E-10	4,5E-08	1,98%
2*10 ⁻⁴ %	DSS	0	6	2,20E+06	1,51E-06	-	-	-
	Укс.кис.	1,91	3	506663	4,60E-07	6,90E-10	4,5E-08	1,53%
	Мур.кис.	8,44	1	507150	1,38E-06	2,07E-09	4,5E-08	4,61%
10 ⁻³ %	DSS	0	6	2,26E+06	1,74E-06	-	-	-
	Укс.кис.	1,9	3	769839	6,81E-07	1,02E-09	4,5E-08	2,27%
	Мур.кис.	8,44	1	935770	2,48E-06	3,73E-09	4,5E-08	8,28%
0,1%	DSS	0	6	2,04E+06	1,87E-06	-	-	-
	Укс.кис.	1,9	3	1,29E+06	1,26E-06	1,89E-09	4,5E-08	3,19%
	Мур.кис.	8,44	1	1,01E+06	2,96E-06	4,44E-09	4,5E-08	9,86%
1%	DSS	0	6	937998	1,83E-06	-	-	-
	Укс.кис.	1,9	3	296105	6,31E-07	9,47E-10	4,5E-08	2,50%
	Мур.кис.	8,44	1	522001	3,34E-06	5,01E-09	4,5E-08	11,13%
3%	DSS	0	6	374927	1,70E-06	-	-	-
	Укс.кис.	1,87	3	416519	2,22E-06	3,33E-09	4,5E-08	7,41%
	Мур.кис.	8,44	1	407897	6,53E-06	9,79E-09	4,5E-08	21,76%
1	2	3	4	5	6	7	8	9

Концентрации веществ (столбец 6) вычислялись по формуле (5):

$$\mu_i = J_i / J_{DSS} * N_{DSS} / N_i * \mu_{DSS} \quad (5)$$

где J_{DSS} - значение площади сигнала эталона, J_i - значение площади сигнала вещества, $N_{DSS} = 6$ - количество протонов в сигнале эталона, N_i - количество протонов в сигнале вещества, $\mu_{DSS} = 2 \cdot 10^{-6} \text{ М}$ - концентрация эталона.

Значения столбца 7 мы считаем из столбца 6 по следующей формуле (6):

$$v_i = \mu_i * V \quad (6)$$

где v_i - количество вещества в молях, μ_i - концентрация вещества, $V=1,5*10^{-3}$ л - объём раствора. Теоретическая концентрация (столбец 8) — та концентрация, которая была перед сушкой. Последний столбец (столбец 9) — это отношение итогового количества вещества (столбец 7) к теоретической (столбец 8) (7):

$$\xi = v / v_{\text{теор}} \quad (7)$$

где ξ - относительная величина, v - количество вещества итоговое, $v_{\text{теор}}$ - количество вещества теоретическое.

4. Результаты и обсуждение

К растворам соли добавлялось пять веществ: метанол, этанол, хлороформ, уксусная кислота, муравьиная кислота. На ЯМР спектрах были обнаружены два вещества: уксусная кислота, муравьиная кислота. В таблице 4 приведено процентное содержание веществ (концентрация найденного вещества к концентрации первоначальной 30мкМ).

Таблица 4. Относительное содержание веществ.

Содержание соли	Уксусная кислота	Муравьиная кислота
0%	0,31%	1,98%
$0,2*10^{-3}\%$	1,53%	4,61%
$10^{-3}\%$	2,27%	8,28%
0,1 %	3,19%	9,86%
1%	2,50%	11,13%
3%	7,41%	21,76%

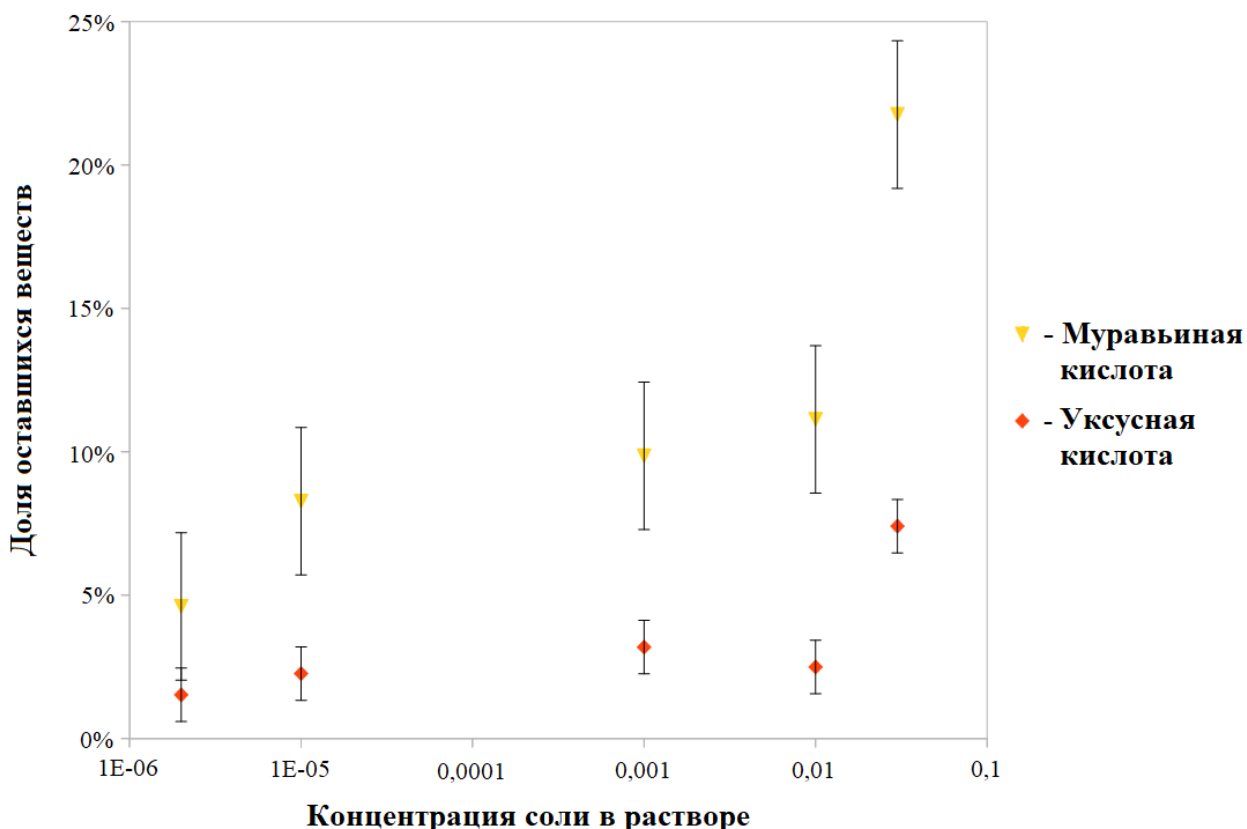


Рисунок 7. График зависимости доли найденных веществ от концентрации соли в растворе.

При изучении раствора без соли (0%) значение концентраций веществ не было нулевым, сигнал местами слабо подымался от линии шума. Вероятно, пластик, из которого состоят пробирки, не идеальный, он содержит микротрещины, вещества могут задерживаться в них.

Вода — полярный растворитель. Все вещества в нашем эксперименте смешиваются с водой в любом количестве, за исключением хлороформа.

В процессе испарения концентрация соли монотонно растет. После определённого момента концентрация соли становится критической, соль постепенно кристаллизуется в растворе и выпадает на дно пробирки.

В процессе кристаллизации соль может образовывать структуры, способны задерживать в себе часть раствора — «солевые ловушки».

В центрифуге давление ниже атмосферного, по примерным оценкам оно около 100 – 400 мм.р.с. Вещества при таком низком давлении могут активно испаряться и при комнатной температуре (рисунок 8). Это означает, что во время сушки раствор кипит, а центробежная сила не даёт выплёскиваться ему на стенки камеры.

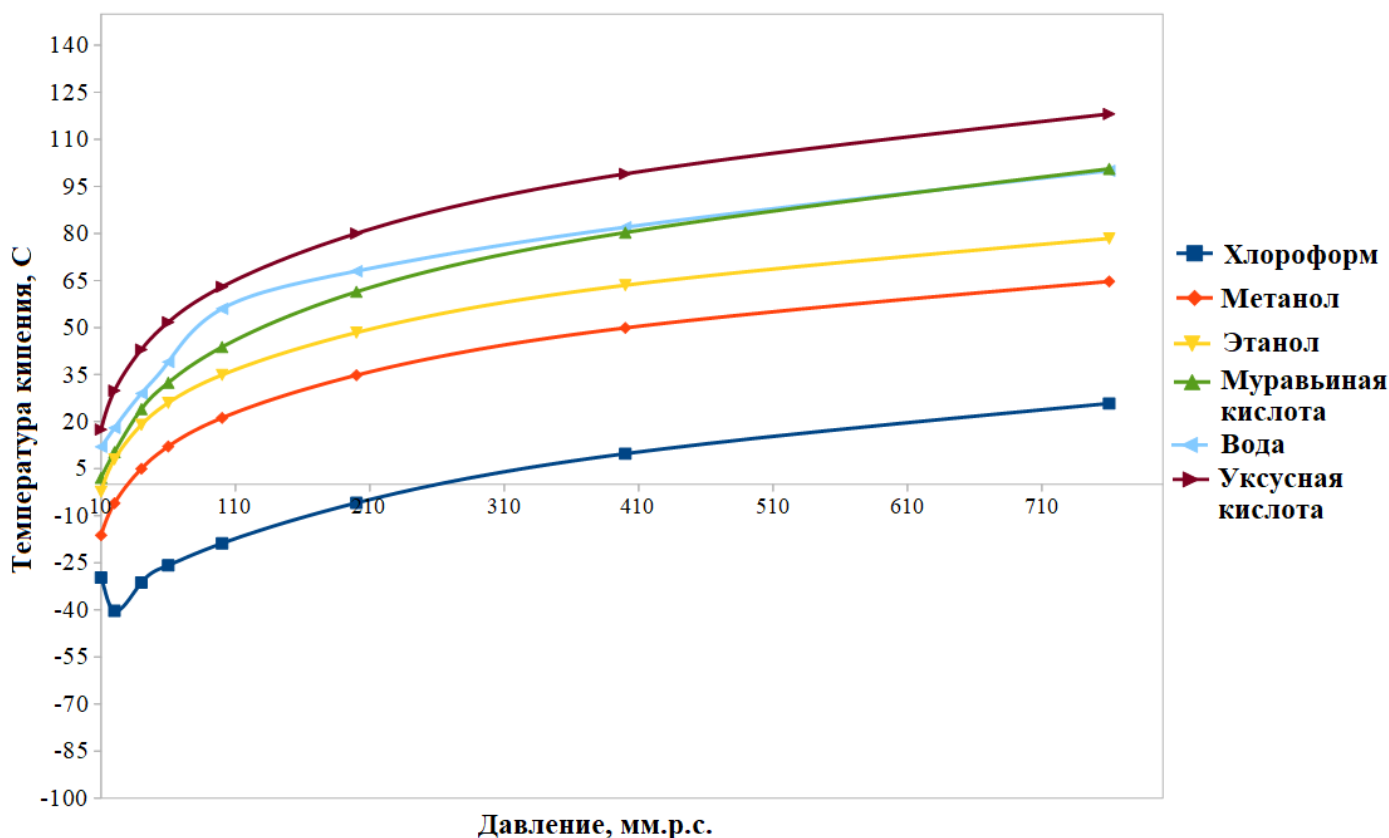


Рисунок 8. Температура кипения некоторых веществ в зависимости от внешнего давления.

При добавлении пяти различных веществ в воду, у нас получается азеотропная смесь, но стоит обратить внимание на то, что концентрация воды много больше, чем концентрация веществ, это значит, что вещества слабо влияют друг на друга, стоит рассматривать только влияние воды на отдельно взятое вещество.

В растворе образуются двойные системы веществ: метанол - вода, этанол - вода, уксус - вода, муравьиная кислота - вода. Активное испарение будет происходить поэтапно. Хлороформ не смешивается с водой и его график зависимости температуры кипения от внешнего давления (ЗТКОВД) лежит

ниже других графиков (рисунок 8), это значит, что хлороформ полностью испариться из раствора первым. График ЗТКОВД (рисунок 8) у метанола, этанола ниже, чем у воды, значит, системы метанол-вода, этанол-вода из раствора начнут испаряться раньше, чем уксус-вода, муравьиная кислота-вода.

В итоге, финальный «концентрированный» раствор соли будет содержать самые устойчивые вещества к испарению, такие как уксус, муравьиная кислота. Стоит отметить, что муравьиной кислоты остаётся больше, чем уксусной, объяснение данного факта требует дополнительных экспериментов.

5. Выводы

В экстракте после лиофильной сушки найдены вещества: муравьиная кислота, уксусная кислота. Данный результат значителен, так как экспериментально зафиксирован эффект, который во многих работах не рассматривался. Концентрация задержанных веществ зависит от концентрации хлорида натрия. Детальное изучение этой зависимости позволит учитывать этот эффект в будущих исследованиях.

В биологических системах, буферные соли это не единственные вещества, способные задерживать летучие жидкости в экстракте после лиофилизации, следует провести исследования с использованием других компонентов, содержащихся биологических тканях.

Полное изучение картины явления выйдет за рамки одной курсовой работы.

6. Список литературы

1. Tsentalovich Y. P. et al. Metabolomic composition of normal aged and cataractous human lenses //Experimental eye research. – 2015. – Т. 134. – С. 15-23.
2. Zelentsova E. A. et al. Post-mortem changes in the metabolomic compositions of rabbit blood, aqueous and vitreous humors //Metabolomics. – 2016. – Т. 12. – №. 11. – С. 172.
3. Краснокутская Е. А., Филимонов В. Д. Спектральные методы исследования в органической химии. Часть 2: ЯМР-спектроскопия, масс-спектрометрия //Томск: ТПУ. – 2013. – 88с.
4. Фаррар Т., Беккер Э. Импульсная и Фурье-спектроскопия ЯМР //М: Мир. – 1973. – 164 с.
5. База данных метаболитов человека: [сайт]. URL: <http://www.hmdb.org/>