

Risonanza Magnetica Nucleare

Complessità di alimenti

Composizione chimica

Acqua

Macronutrienti

Carboidrati

Lipidi

Proteine

Micronutrienti (vitamine, minerali, etc)

Fibre

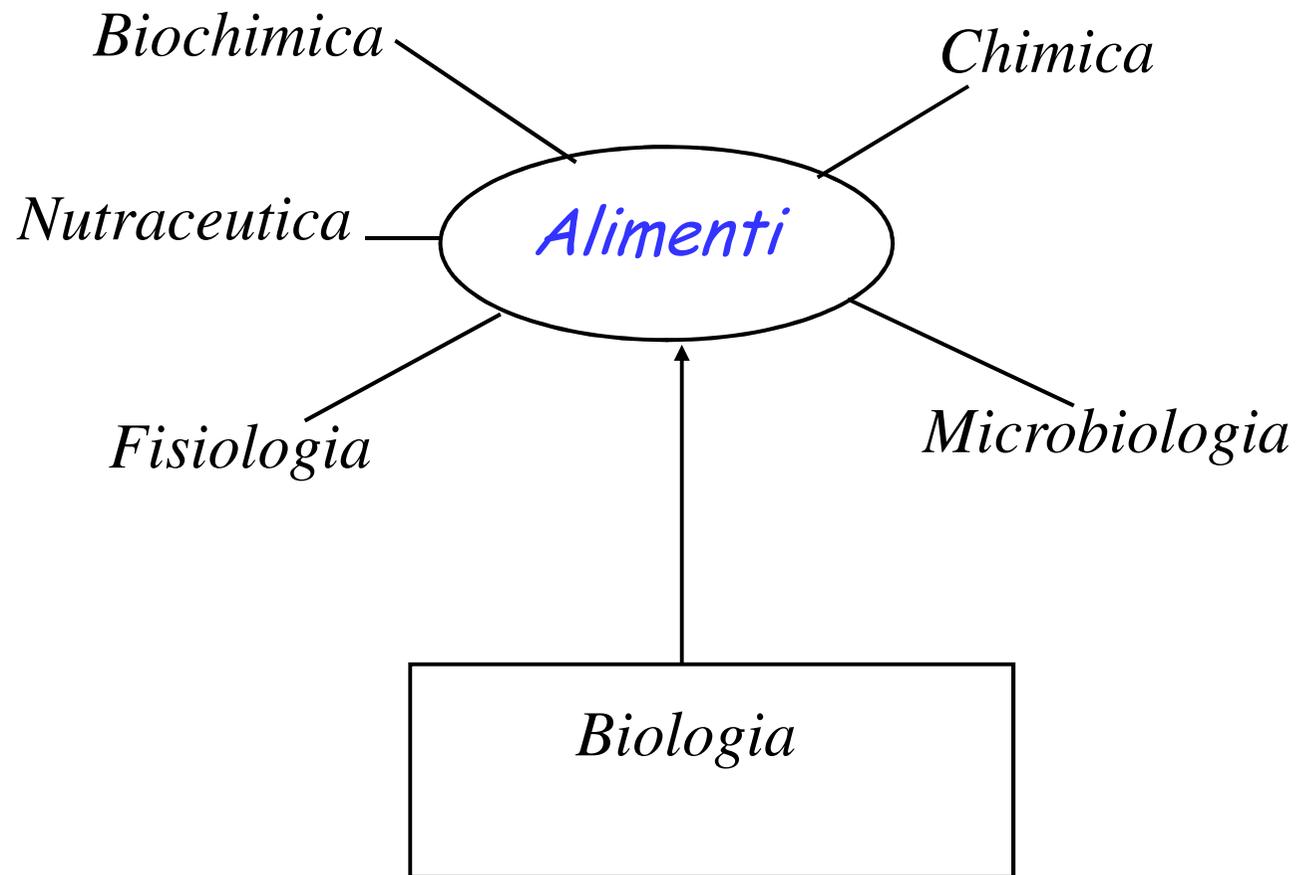
Struttura e stato

Liquidi (colloidi, emulsioni...)

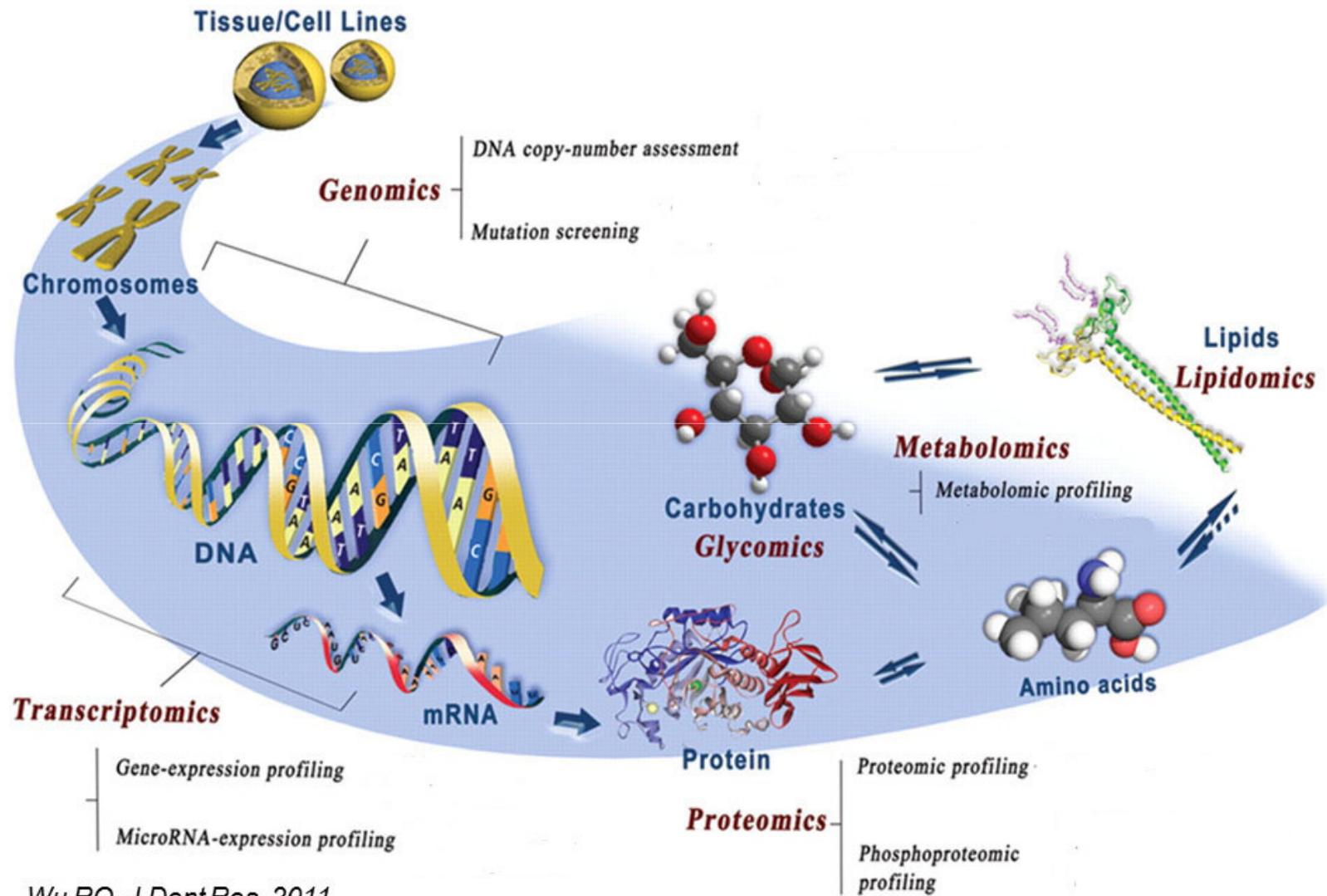
Semisolidi (sistemi bi- e multifasici, gel...)

Solidi

Approccio multidisciplinare



La vita al livello molecolare è...



Wu RQ, J Dent Res. 2011

Metaboloma

Corredo completo dei metaboliti presenti in una cellula, tessuto, organismo, ecc.

processi metabolici,

la conservazione e trasformazione

Metabolomica

*Identificazione e quantificazione di tutti i metaboliti (*metaboloma*) di un sistema biologico*

Genoma *4 nucleotidi*

Proteoma *20 aminoacidi*

Metaboloma *???*

HMDB

114100 metaboliti

Vari approcci all'analisi degli alimenti tramite NMR

Analisi "target" → *Analisi quantitativa di singoli metaboliti*

Profilo metabolico → *Analisi di gruppi di metaboliti*

Fingerprinting metabolico → *Spettri NMR come le impronte digitale dell'alimento*

Metabolomica → *Analisi del metaboloma*

Metaboloma



Corredo completo dei metaboliti presenti in una cellula, tessuto, ecc. (formati durante tutti i processi metabolici+ durante la conservazione e lavorazione)

Risonanza Magnetica da Premio Nobel

- **Isidor I. Rabi, USA: Premio Nobel in Fisica 1944**, "for his resonance method for recording the magnetic properties of atomic nuclei"
- **Felix Bloch, USA and Edward M. Purcell, USA: Premio Nobel in Fisica 1952**, "for their discovery of new methods for nuclear magnetic precision measurements and discoveries in connection therewith"
- **Richard R. Ernst, Switzerland: Premio Nobel in Chimica 1991**, "for his contributions to the development of the methodology of high resolution nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy"
- **Kurt Wüthrich, Switzerland: Premio Nobel in Chimica 2002**, "for his development of nuclear magnetic resonance spectroscopy for determining the three-dimensional structure of biological macromolecules in solution"
- **Paul C. Lauterbur, USA and Peter Mansfield, United Kingdom: Premio Nobel in Fisiologia e Medicina 2003**, "for their discoveries concerning magnetic resonance imaging"

Struttura della materia

La materia è fatta di atomi. Gli atomi sono fatti di elettroni e nuclei.

Ciascun nucleo atomico ha 4 proprietà fisiche: massa, carica, magnetismo e spin

La massa della materia è dovuta largamente alla massa dei nuclei.

La carica è importante perché atomi e molecole sono legate insieme da forti interazioni elettrostatiche tra i nuclei carichi positivamente e gli elettroni carichi negativamente

Magnetismo nucleare

Il magnetismo nucleare e lo spin nucleare sono proprietà meno ovvie.

Il magnetismo di un nucleo vuol dire che il nucleo interagisce con i campi magnetici come un piccolo magnete. E' una proprietà intrinseca del nucleo. Elettroni e nuclei hanno un magnetismo permanente, hanno un momento magnetico.

Il magnetismo nucleare è molto debole ed influenza molto poco la struttura atomica molecolare

Lo spin di un nucleo è ancora meno tangibile.

Lo spin di un nucleo indica **in un certo** senso che il nucleo atomico si comporta **come se** esso ruotasse come un pianeta.

Il concetto di spin è difficile perché è un concetto altamente astratto ed è difficile da cogliere interamente senza far uso di equazioni quantomeccaniche.

Il magnetismo e lo spin nucleare non hanno quasi nessun effetto sul comportamento fisico e chimico delle sostanze.

Comunque queste due proprietà permettono di avere informazioni sulla struttura interna della sostanza.

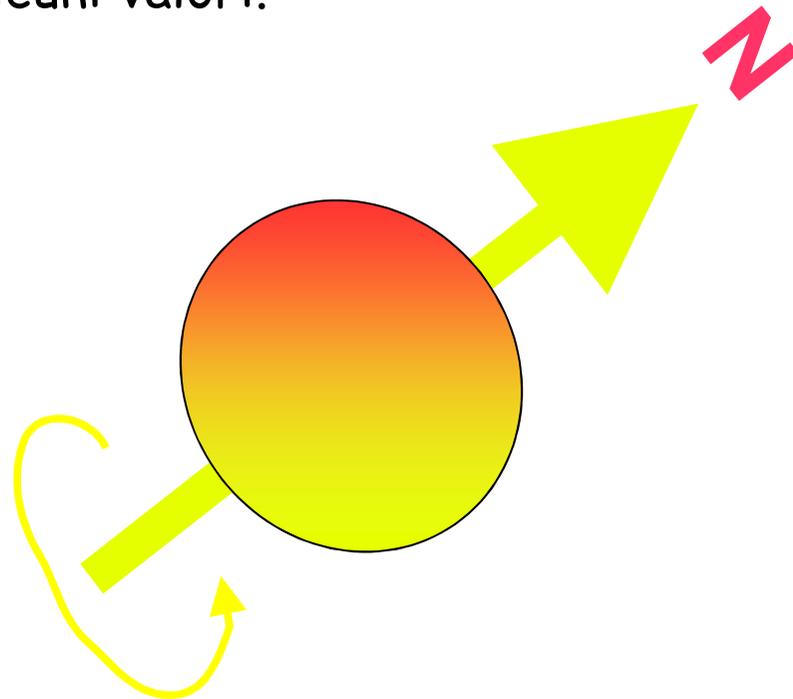
I nuclei magnetici interagiscono con i campi magnetici che possono provenire dall'ambiente molecolare per esempio dagli elettroni circostanti o da altri spin nucleari o da strumentazioni esterne.

Momento angolare classico

Nella fisica classica il momento angolare è associato con il moto rotazionale. Un oggetto che ruota possiede una quantità chiamata **momento angolare**. Questo può essere visualizzato come un vettore che punta lungo l'asse intorno al quale l'oggetto ruota.

Momento angolare quantizzato

In *meccanica quantistica* il momento angolare è quantizzato ovvero può assumere soltanto alcuni valori.



Momento angolare di spin nucleare

Quindi alcuni nuclei sembrano possedere una sorgente intrinseca di momento angolare chiamato **momento angolare di spin nucleare**.

Il nome può creare un problema perché potrebbe sembrare il momento angolare sia dovuto ad una reale rotazione (spinning) del nucleo che certamente invece non avviene.

Il momento angolare è una proprietà intrinseca del nucleo come la massa e la carica.

Come il momento angolare classico anche il momento angolare di spin nucleare è un vettore avente sia direzione che intensità.

Proprietà del momento angolare di spin

Valore assoluto del momento angolare

$$|I| = \hbar \sqrt{I(I+1)}$$

$$\hbar = 1.054 \times 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{s}$$

Componente del momento angolare lungo una direzione:

$$I_z = m_I \hbar$$

$$m_I = -I, -I+1, \dots, I-1, I$$

N° di stati di spin per un nucleo con spin I:

$$2I + 1$$

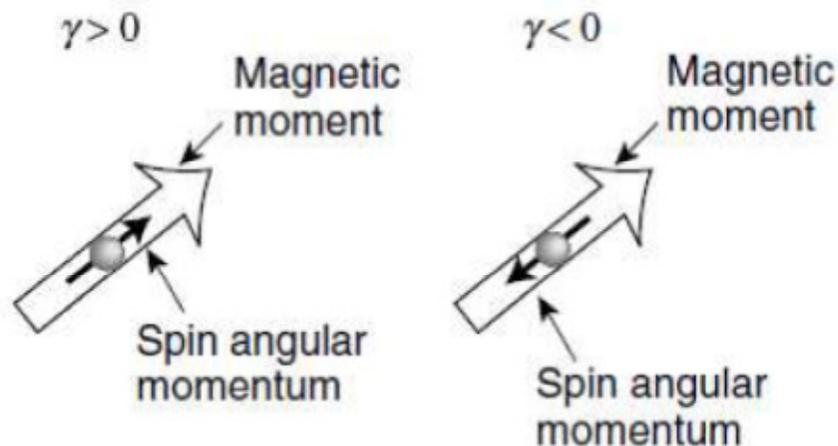
I sottolivelli di spin in assenza di campi esterni hanno tutti la stessa energia.

Momento di dipolo magnetico nucleare

Poiché una carica in movimento genera un campo magnetico, al momento angolare nucleare è anche associato un momento di dipolo magnetico

$$\hat{\mu} = \gamma \cdot \hat{I} \quad m_z = \gamma I_z = \gamma m_I \hbar$$

γ - rapporto giromagnetico



	$\gamma/10^7 \text{T}^{-1} \text{s}^{-1}$
^1H	26.75
^2H	4.11
^{13}C	6.73
^{14}N	1.93
^{15}N	-2.71
^{17}O	-3.63
^{19}F	25.18

Nuclei e numeri di spin

Z (numero atomico)	A (massa atomica)	Spin	Esempi	NMR-attivi
pari	pari	0	^{12}C , ^{16}O , ^{32}S	no
pari/dispari	dispari	semintero $1/2, 3/2, 5/2, 7/2, 9/2$...	^1H , ^{19}F , ^{31}P , ^{13}C , ^{11}B , ^{35}Cl , ^{127}I , ^{17}O , ^{27}Al , ^{29}Si	si
dispari	pari	intero $1, 2, 3, \dots$	^2H , ^{14}N	si

Nuclei NMR attivi importanti in spettroscopia NMR delle molecole biologiche

Isotopo	spin /	Abbondanza Naturale [%]	Rapporto giromagnetico, (<i>gamma</i>) [10 ⁷ *rad/(T*s)]	Sensibilità relativa	Sensibilità assoluta
¹ H	1/2	99.98	26.7519	1.00	1.00
² H	1	0.016	4.1066	9.65 · 10 ⁻³	1.45 · 10 ⁻⁶
¹² C	0	98.9	--	--	--
¹³ C	1/2	1.108	6.7283	1.59 · 10 ⁻²	1.76 · 10 ⁻⁴
¹⁴ N	1	99.63	1.9338	1.01 · 10 ⁻³	1.01 · 10 ⁻³
¹⁵ N	1/2	0.37	-2.712	1.04 · 10 ⁻³	3.85 · 10 ⁻⁶
¹⁶ O	0	98.9	--	--	--
¹⁷ O	5/2	0.037	-3.6279	2.91 · 10 ⁻²	1.08 · 10 ⁻⁵
³¹ P	1/2	100	10.841	6.63 · 10 ⁻²	6.63 · 10 ⁻²

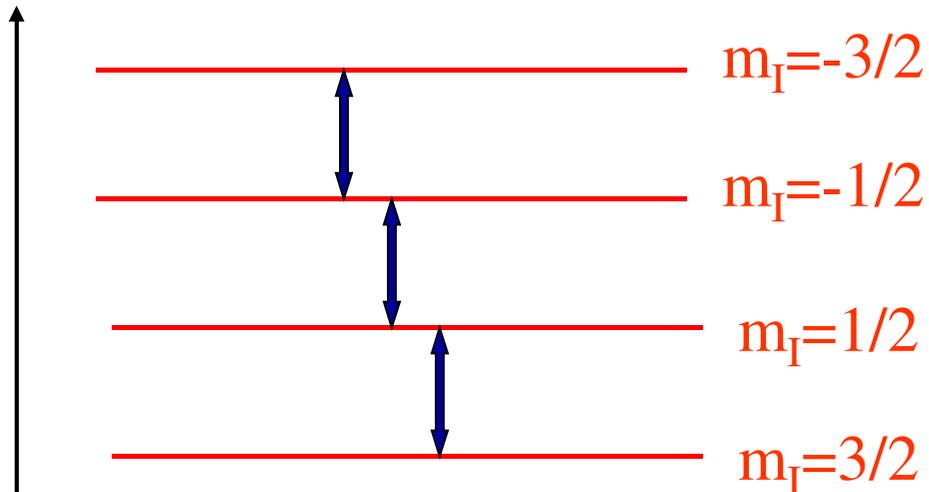
In presenza di un campo magnetico esterno applicato in direzione z, il momento magnetico ha una energia:

$$E_m = -\gamma I_z B_0 = -\gamma m_I \hbar B_0, \quad B_0 \text{ è la forza del campo magnetico statico.}$$

può assumere $(2I+1)$ valori, ci sono $(2I+1)$ livelli energetici non degeneri con separazione $|\gamma \hbar B|$

In presenza di un campo magnetico statico le proiezioni del momento angolare del nuclei lungo l'asse z risulta in $2I + 1$ livelli energetici egualmente spazati conosciuti come livelli di Zeeman

Esempio: livelli energetici di ^{11}B ($I=3/2$)



Regola di selezione: $\Delta m_I = \pm 1$

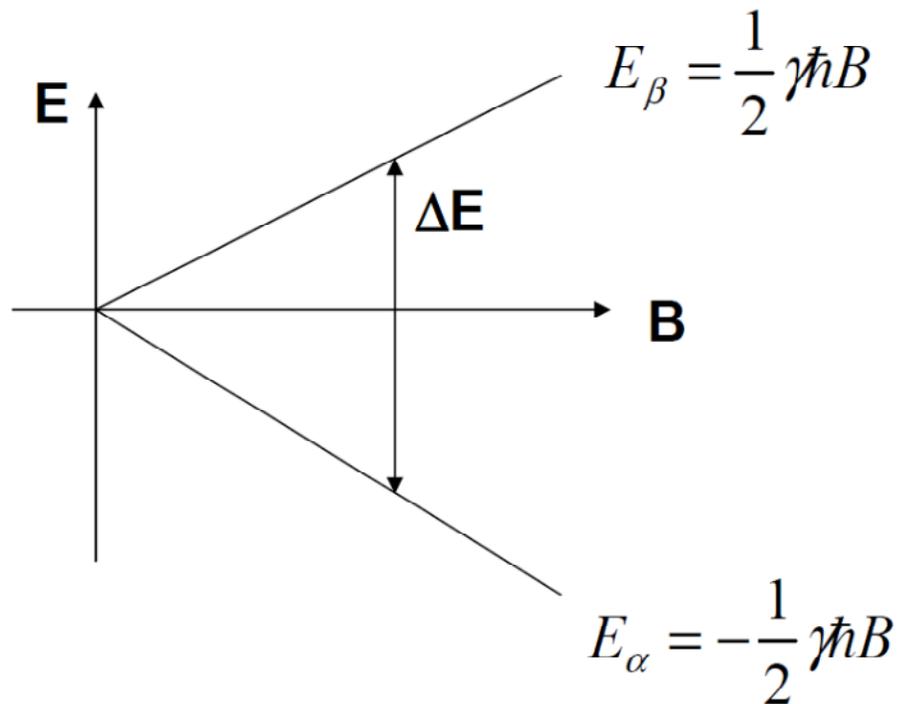
L'energia è trasferita se $\Delta E = h\nu$ $E = -\gamma\hbar m_I B$

Transizioni NMR per un singolo nucleo:

$$h\nu = |\gamma\hbar B \Delta m_I|$$

$$\nu = \left| \frac{\gamma}{2\pi} \right| B$$

La separazione in energia dei livelli di spin in un campo magnetico B per uno spin $I=1/2$ è



$$\Delta E = \gamma\hbar B$$

Condizione di risonanza

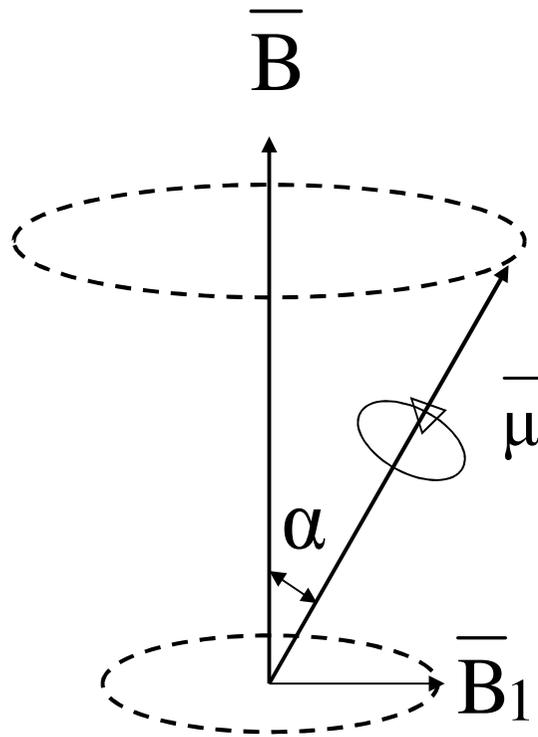
$$h\nu = |\gamma\hbar B\Delta m_I|$$

$$\nu = \frac{\gamma}{2\pi} B$$

$$\omega_0 = \gamma B$$

ν – la frequenza di Larmor (Hz/s)

ω_0 (rad/s)

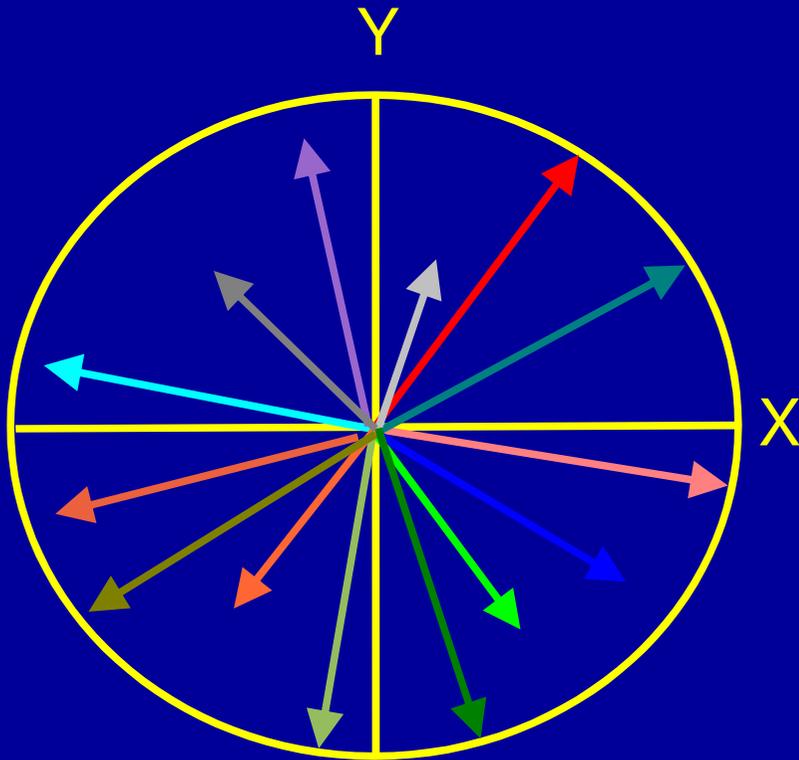


Un nucleo con spin $I \neq 0$ in presenza di un campo magnetico \vec{B} compie un moto di precessione intorno alla direzione del campo magnetico applicato.

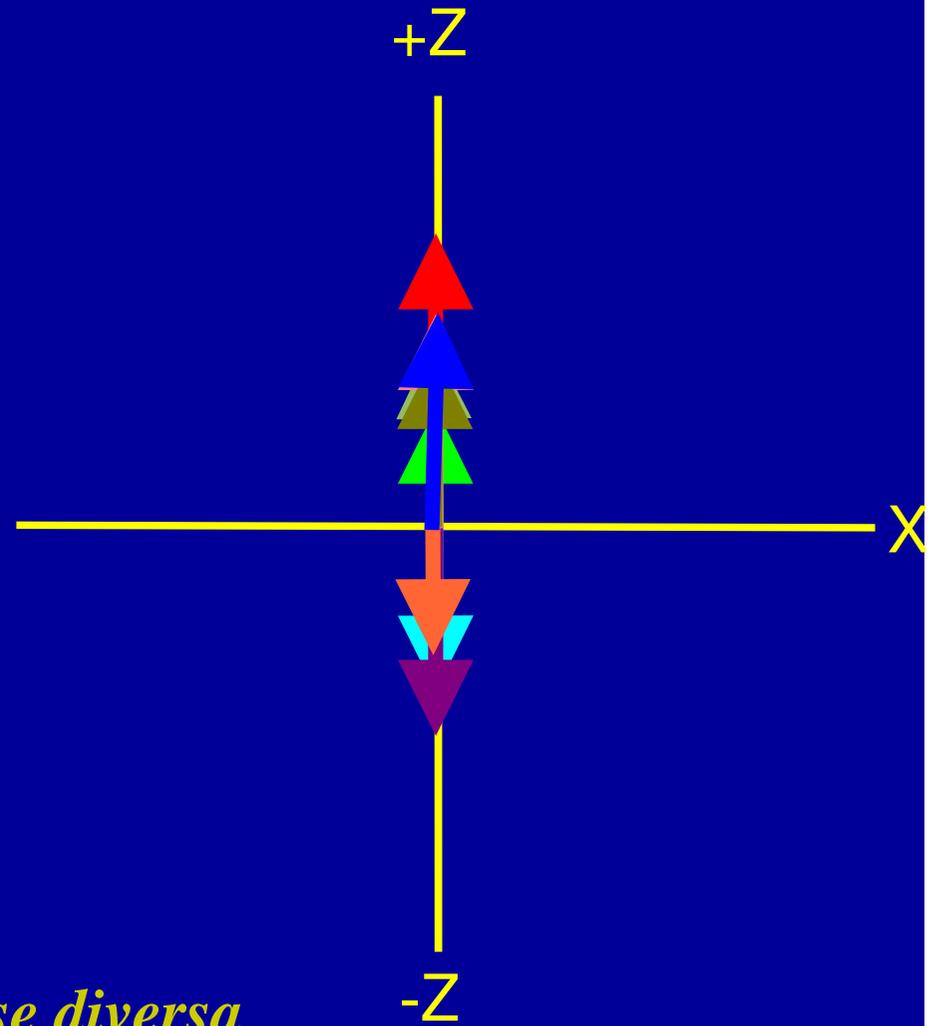
La frequenza di precessione ω_0 è la frequenza di Larmor

Se \vec{B}_1 ruota con frequenza ω_0 esso causa grandi oscillazioni di α .

In un campione reale...

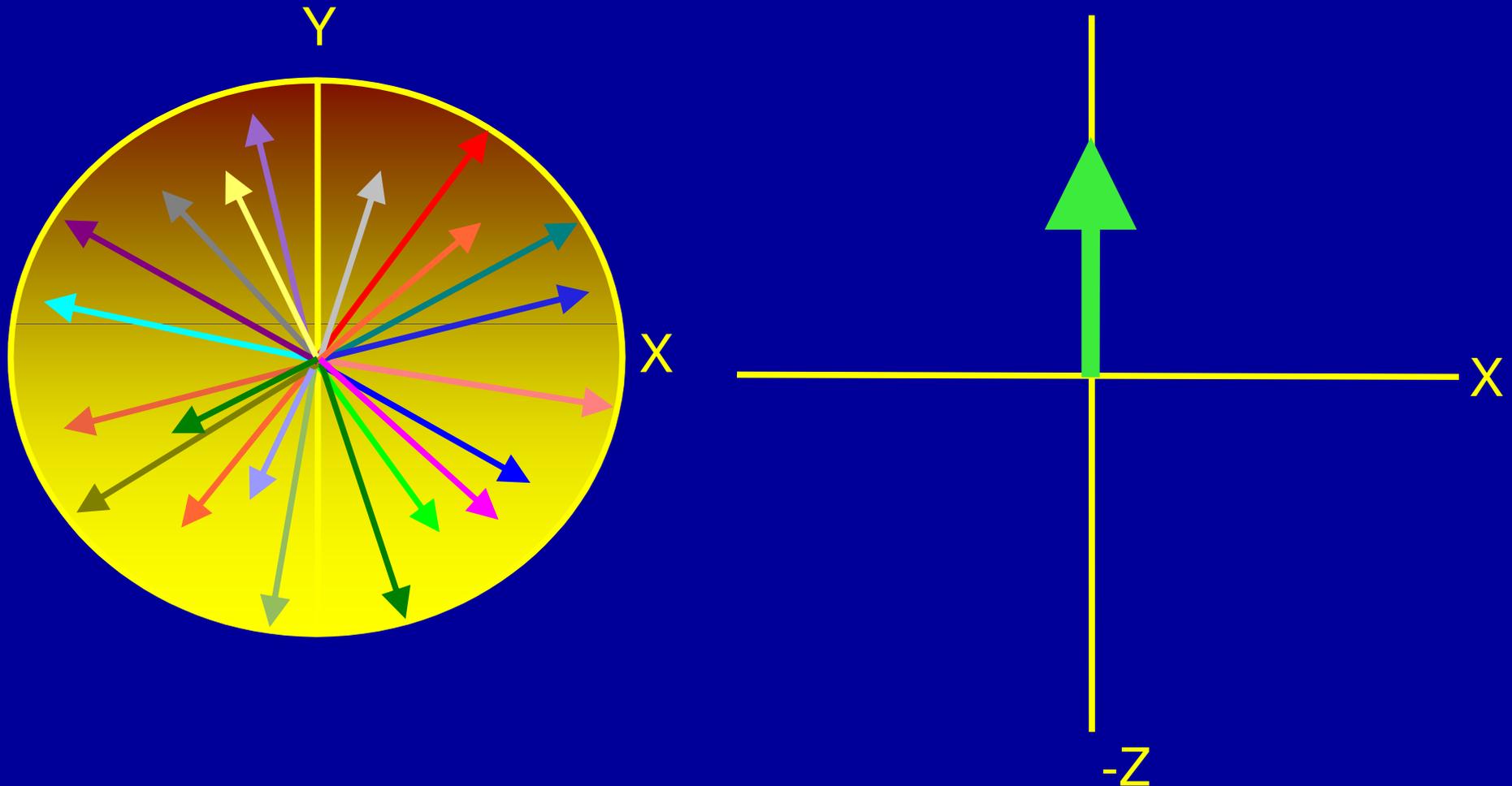


...ogni nucleo ha fase diversa



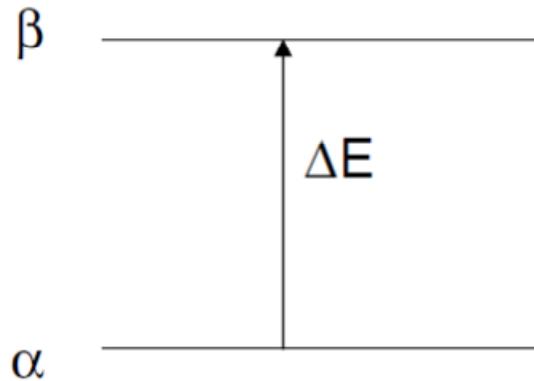
Dunque in media in presenza di campo magnetico esterno B ...

Nessuna magnetizzazione sul piano XY $+Z$



Magnetizzazione macroscopica lungo Z

All'equilibrio si ha una popolazione degli stati di spin (numero di spin nei diversi stati) definita dalla formula di Boltzmann:



$$\frac{N_{\beta}}{N_{\alpha}} = e^{-\frac{\Delta E}{kT}} \approx 1 - \frac{\Delta E}{kT}$$

All'equilibrio:

$kT \gg \Delta E$ T=temperatura di spin

$$\frac{N_{\beta}}{N_{\alpha}} \approx 0.9998$$

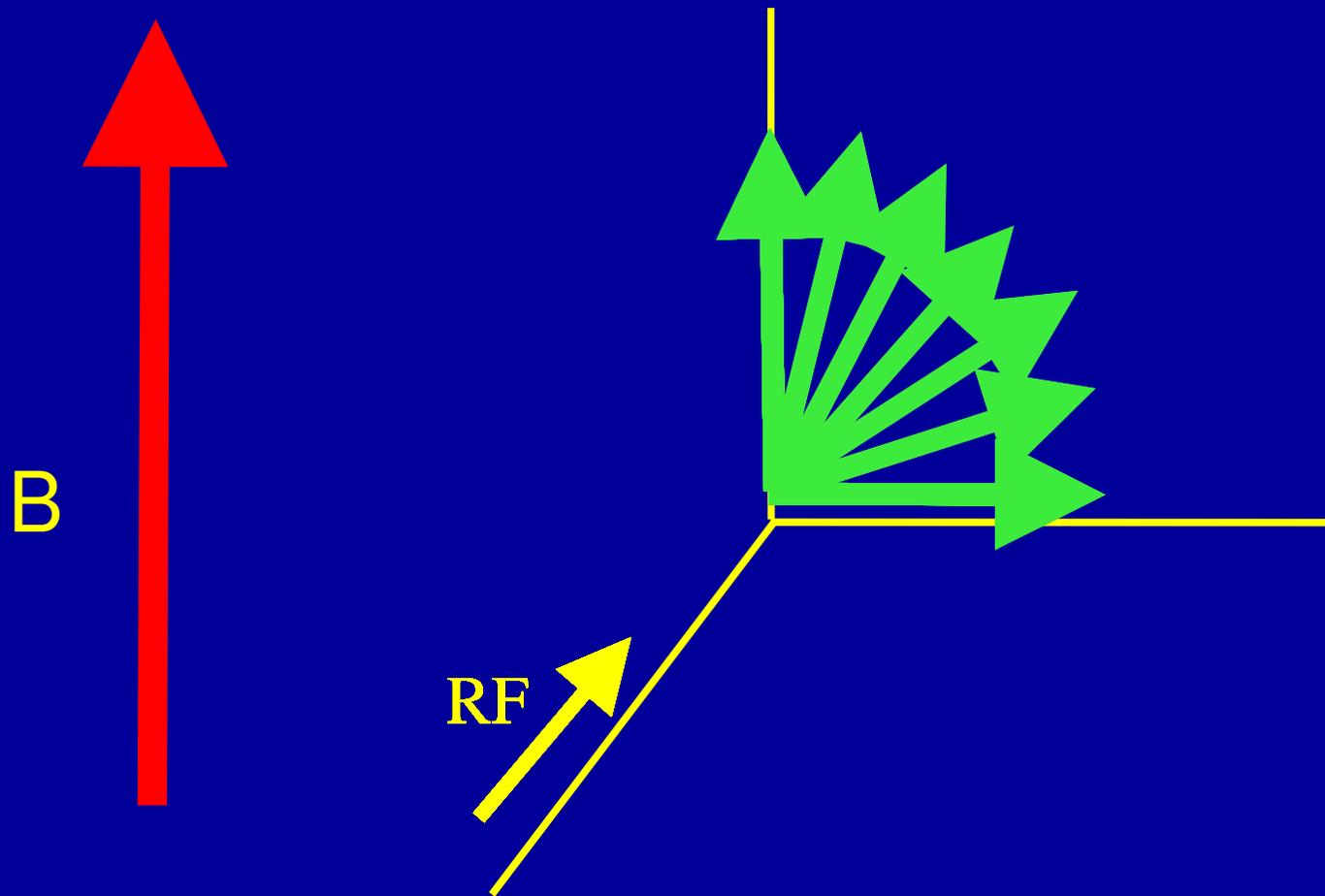


Scarsa sensibilità della tecnica NMR



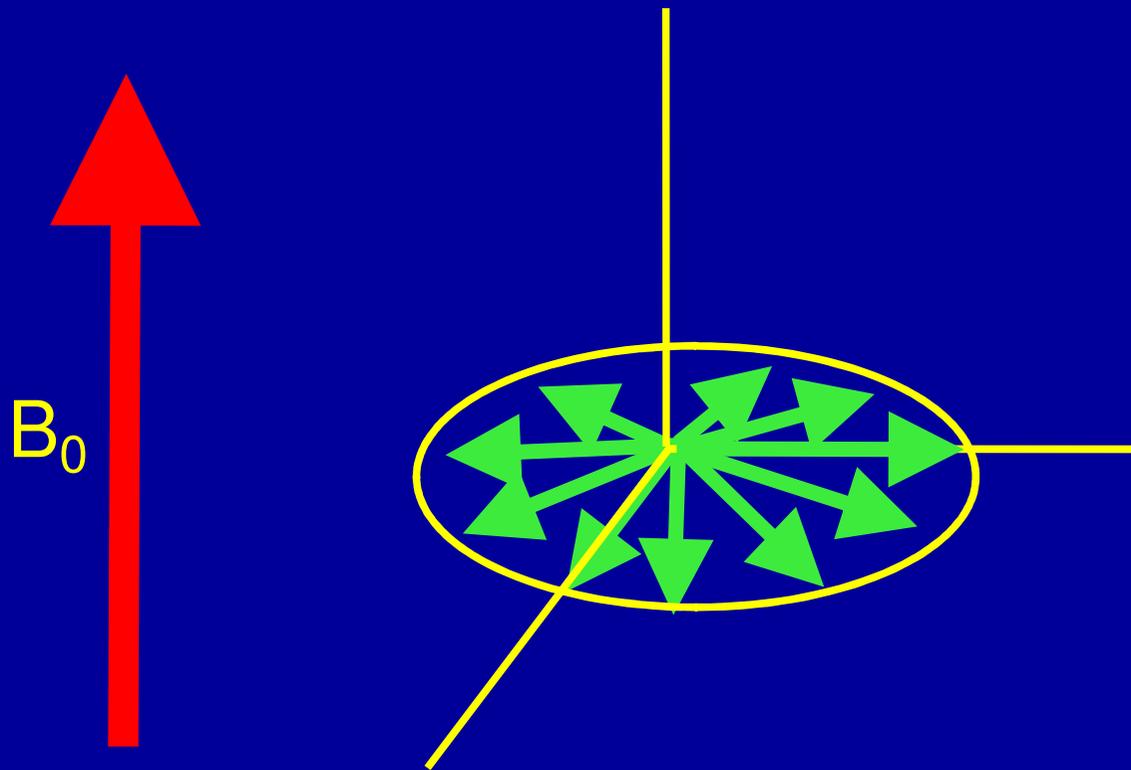
Vantaggio di campi intensi:
incremento di sensibilità

Quando si applica un impulso RF al sistema lungo una direzione perpendicolare al campo magnetico statico...



... si porta la magnetizzazione sul piano XY ...

... dove in assenza di ulteriori sollecitazioni ...

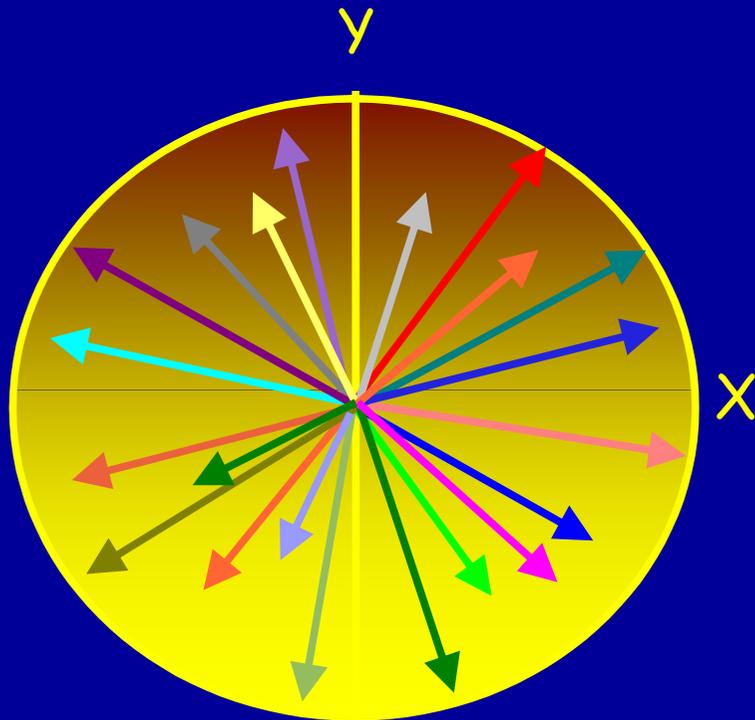


... ruota con velocità angolare pari alla
frequenza di risonanza dei nuclei.

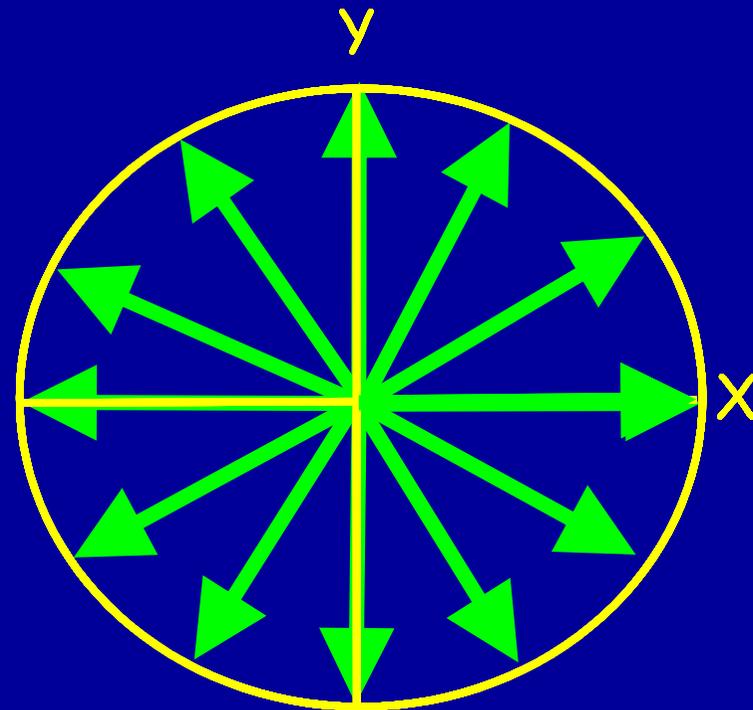


Situazione sul piano XY

Prima dell'impulso...



Dopo l'impulso...

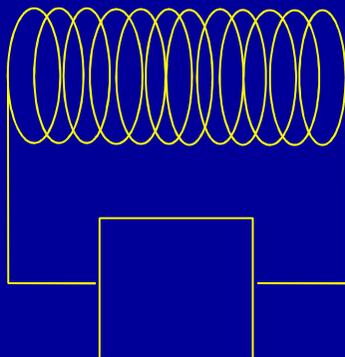
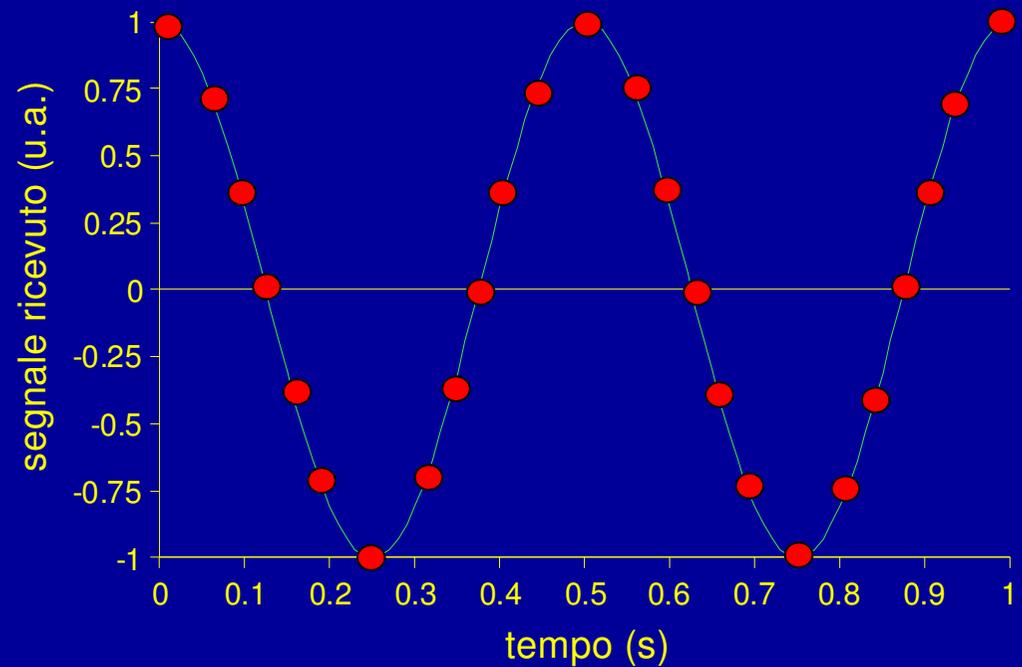
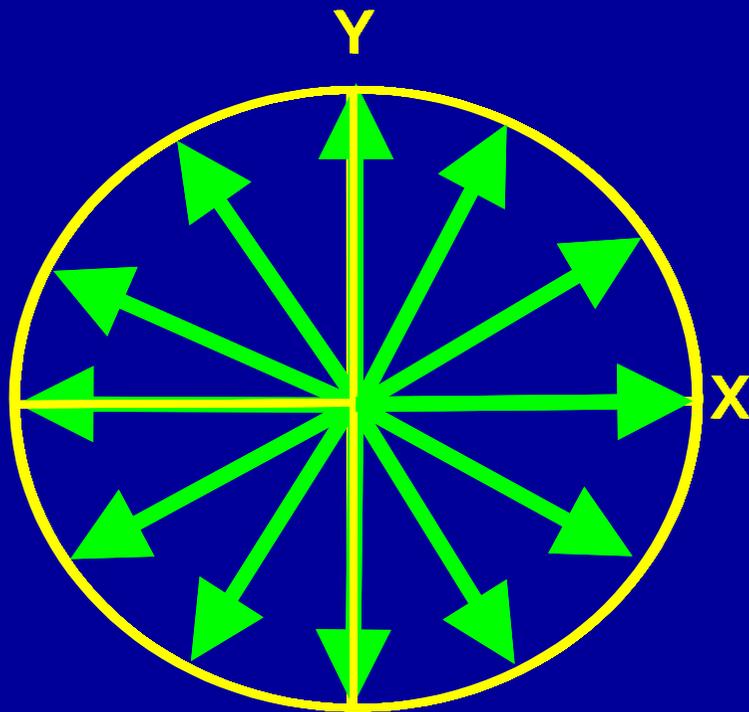


... nessuna magnetizzazione su XY.

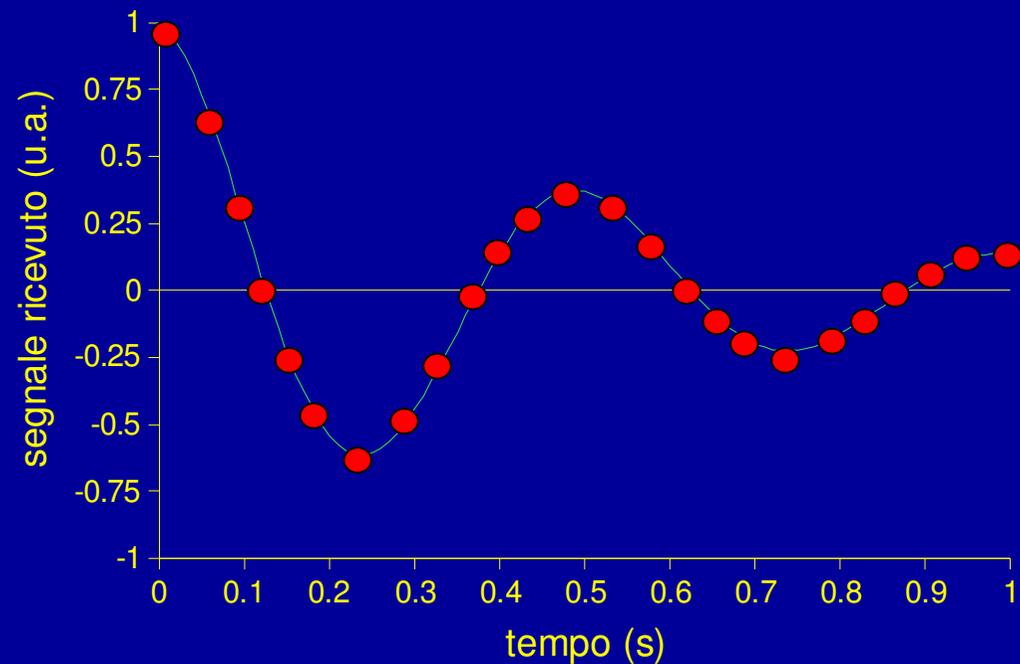
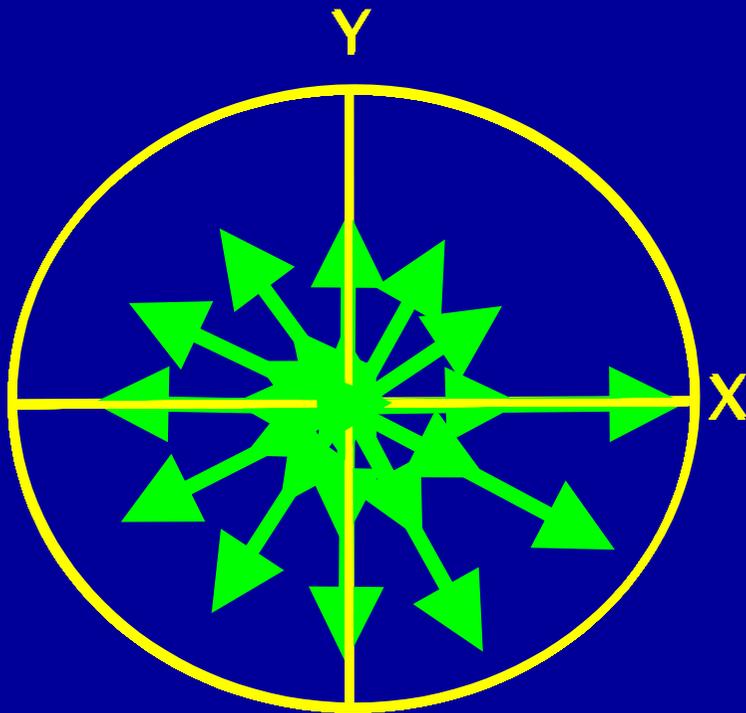
... magnetizzazione "visibile" su XY.



Il ricevitore "vede" sempre la proiezione della magnetizzazione su di esso.



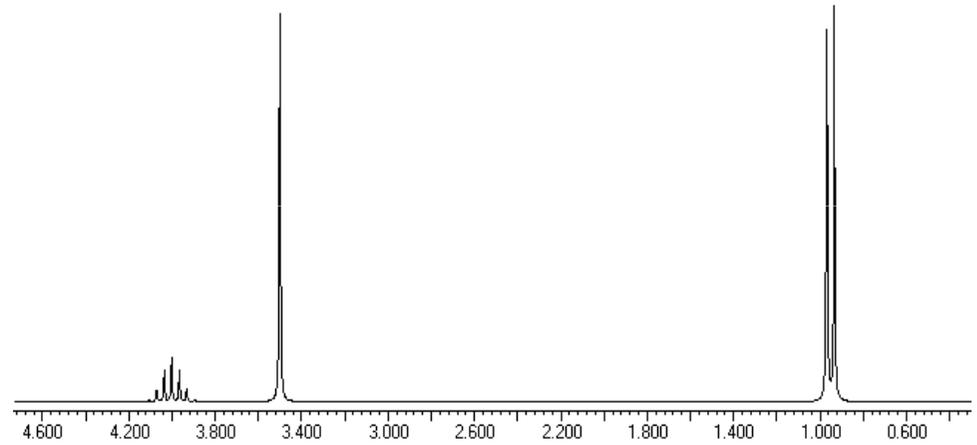
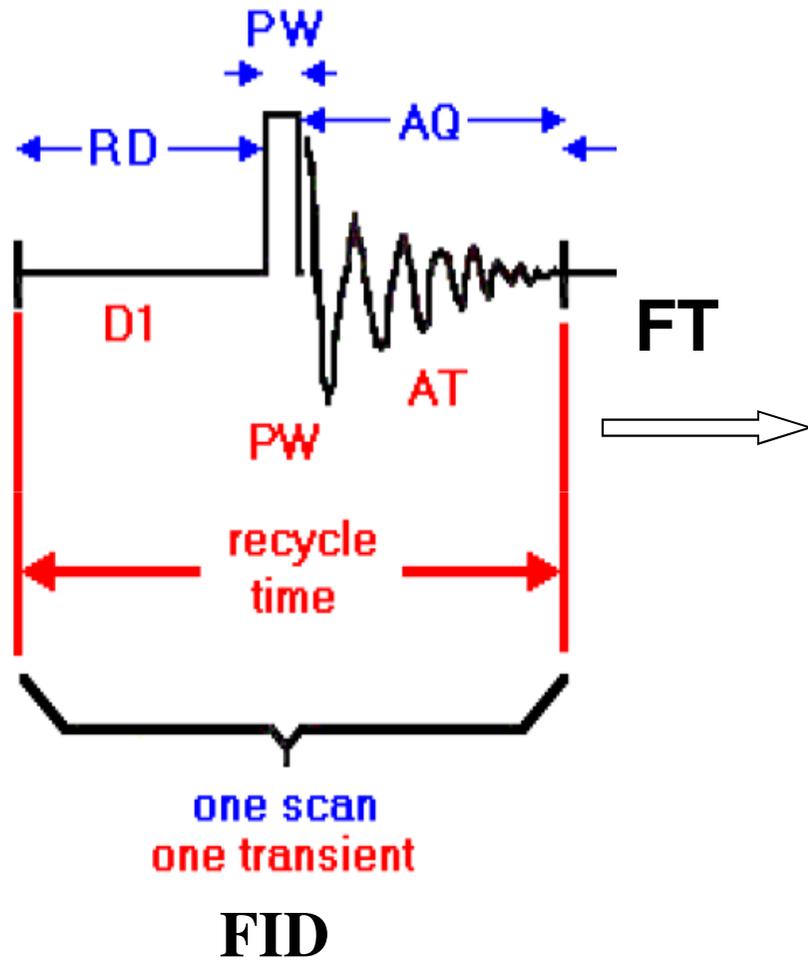
In realtà l'oscillazione è smorzata...



...con una costante di tempo chiamata T_2^* che dipende:
dal tipo di campione (ad esempio solido/liquido)
dall'omogeneità del campo magnetico



Il più semplice esperimento (“sequenza”) NMR è dunque:



spettro

Lo spettrometro NMR è quindi capace di:

- creare una magnetizzazione netta attraverso un elevato campo magnetico
- rotare la polarizzazione attraverso impulsi di radiofrequenza per produrre una magnetizzazione trasversale
- rilevare le correnti elettriche oscillanti indotte dalla precessione della magnetizzazione trasversale

Chemical shift

Poiché il momento di dipolo magnetico μ di un certo nucleo è una costante allora si potrebbe pensare che tutti i nuclei di un certo tipo, per esempio i protoni risuonino alla stessa frequenza in un determinato campo magnetico applicato. In questo caso nello spettro avremmo sempre un unico segnale e la spettroscopia NMR sarebbe inutile!

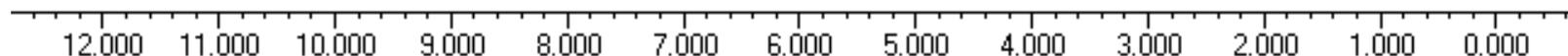
La frequenza di risonanza di un nucleo dipende dal suo intorno chimico. Infatti gli elettroni immersi in un campo magnetico generano essi stessi un piccolo campo magnetico opposto al campo magnetico applicato che scherma il nucleo. Tanto maggiore è la densità elettronica tanto maggiore è la schermatura

H deschermati

sentono un campo magnetico più forte
subiscono transizione a frequenze maggiori
hanno spostamenti chimici maggiori

H più schermati

sentono un campo magnetico più debole
subiscono transizione a frequenze minori
hanno spostamenti chimici minori



Si definisce un parametro di schermo chimico σ tale che:

$$\mathbf{B}_{\text{loc}} = \mathbf{B}_0 - \mathbf{B}_i = \mathbf{B}_0(1 - \sigma_i)$$

$$\nu_0 = \left| \frac{\gamma}{2\pi} \right| \mathbf{B}_0 \rightarrow \nu_i = \left| \frac{\gamma}{2\pi} \right| \mathbf{B}_{\text{loc}} = \left| \frac{\gamma}{2\pi} \right| \mathbf{B}_0 (1 - \sigma_i) \rightarrow \nu_i = \nu_0 (1 - \sigma_i)$$

Schermo elettronico

campo magnetico indotto

In generale nei liquidi il chemical shift dovuto allo schermo elettronico, è uno scalare.

Nei solidi è invece un tensore del secondo ordine in quanto dipende dall'orientazione della molecola rispetto al campo magnetico

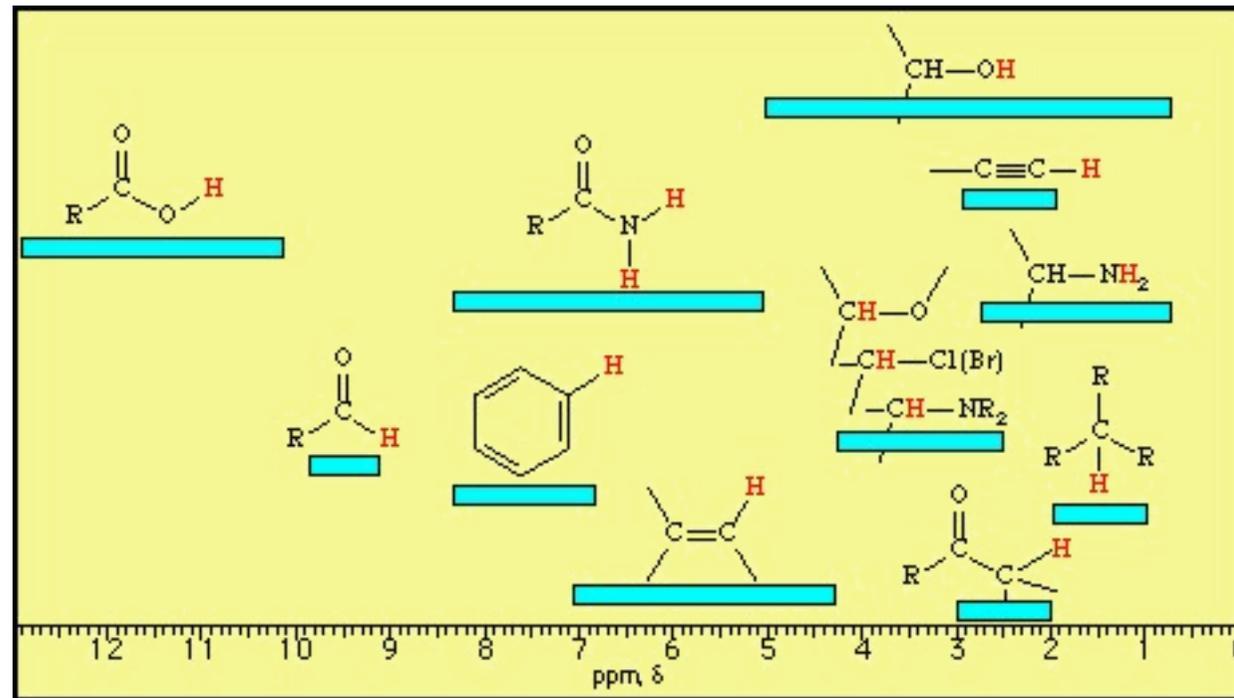
$$\bar{\sigma} = \begin{bmatrix} \sigma_{xx} & \sigma_{xy} & \sigma_{xz} \\ \sigma_{yx} & \sigma_{yy} & \sigma_{yz} \\ \sigma_{zx} & \sigma_{zy} & \sigma_{zz} \end{bmatrix}$$

Si definisce la scala di chemical shift (δ) usando come riferimento la frequenza di risonanza di un composto standard.

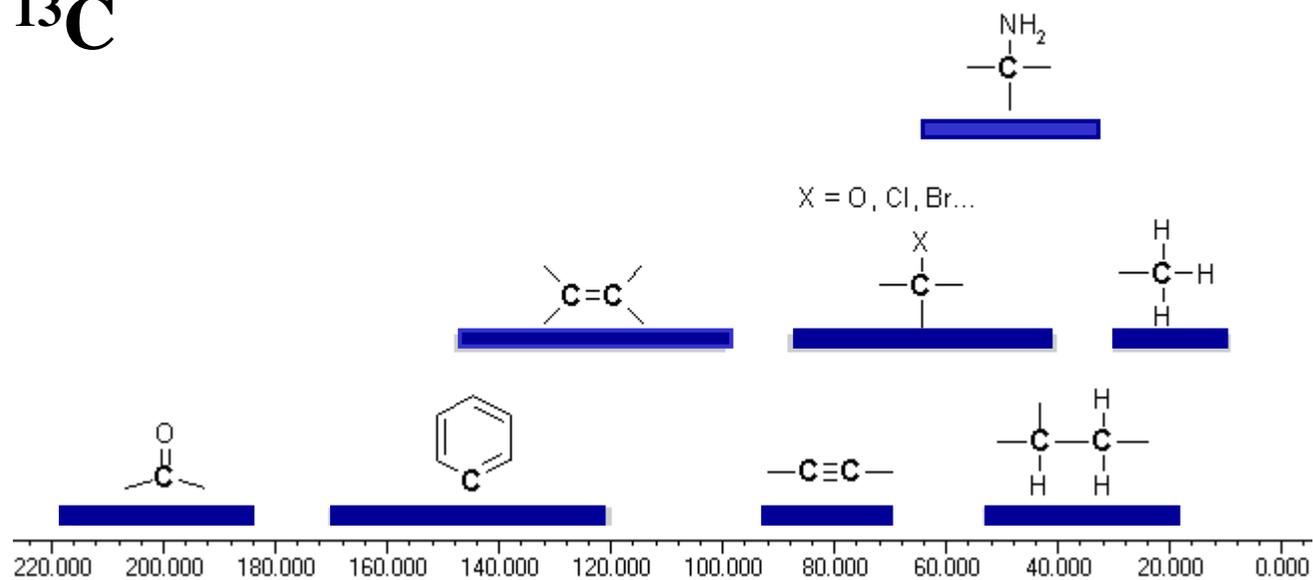
$$\delta(\text{ppm}) = \frac{\nu - \nu_0}{\nu_0} 10^6$$

Come ν_0 si considera la frequenza di risonanza di una molecola "standard"

^1H

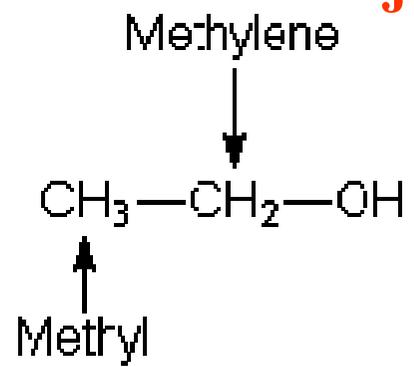


^{13}C



Gli spettri sono complicati dagli accoppiamenti fra i nuclei: accoppiamento spin-spin o scalare

J = costante di accoppiamento spin-spin

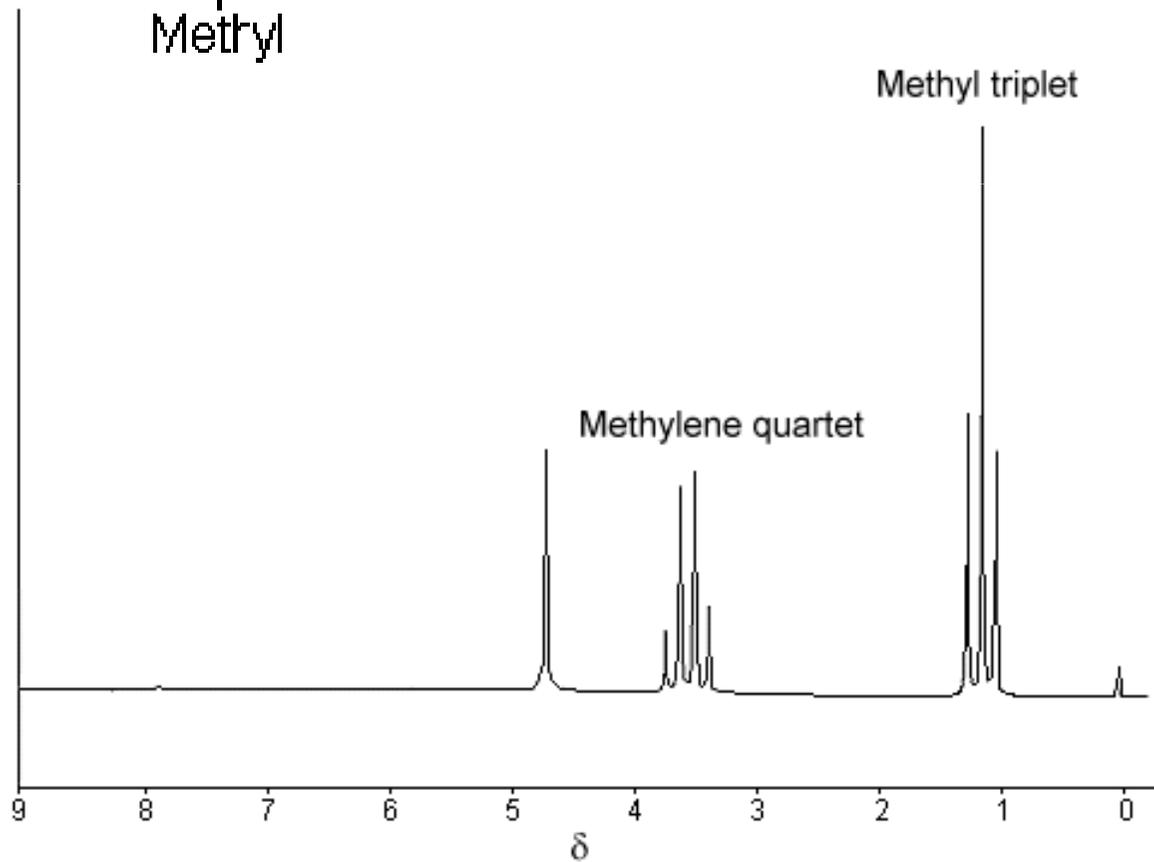


I_1, I_2

$$I_1 \longrightarrow 2I_2 + 1$$

$$I_2 \longrightarrow 2I_1 + 1$$

Questo effetto è osservabile se la distanza fra i due nuclei è ≤ 3 legami

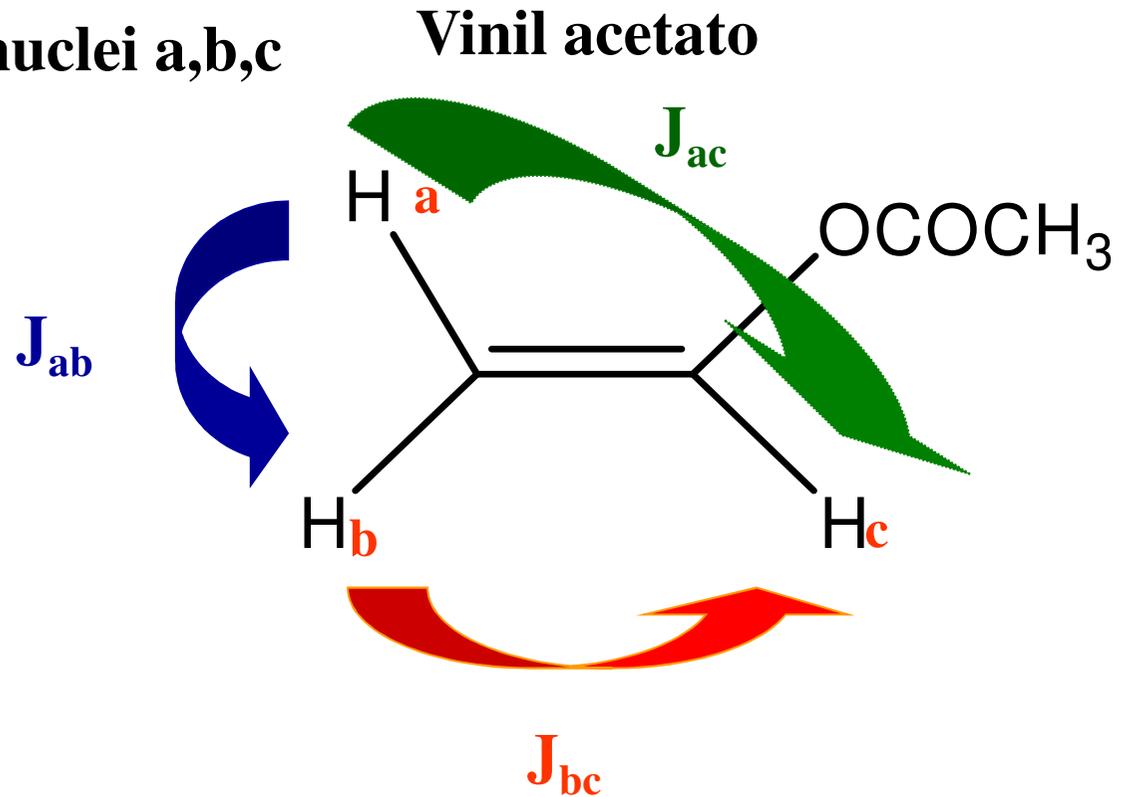


Esempio: sistema a tre nuclei a,b,c

J_{ab} geminale

J_{bc} vicinale (cis)

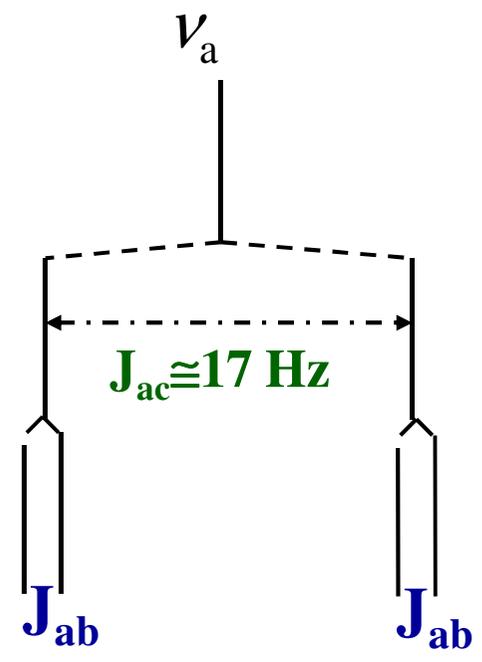
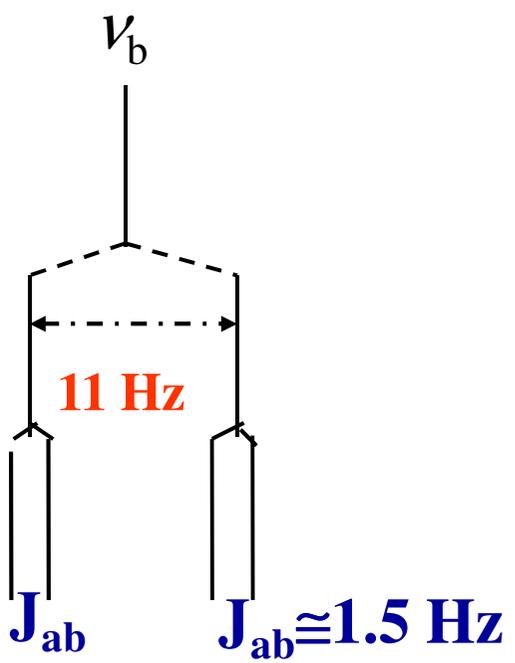
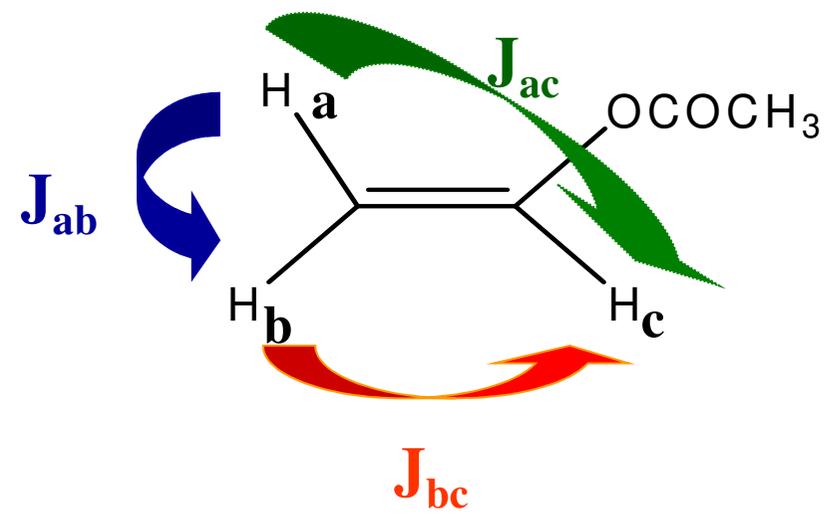
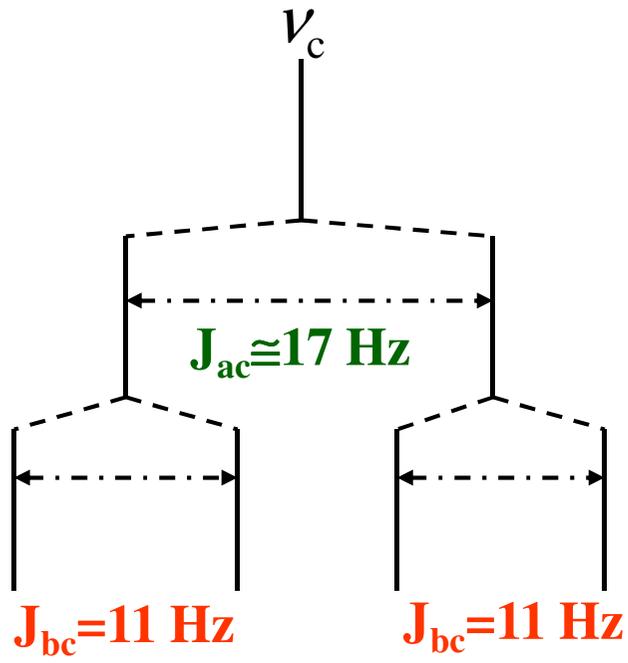
J_{ac} vicinale (trans)

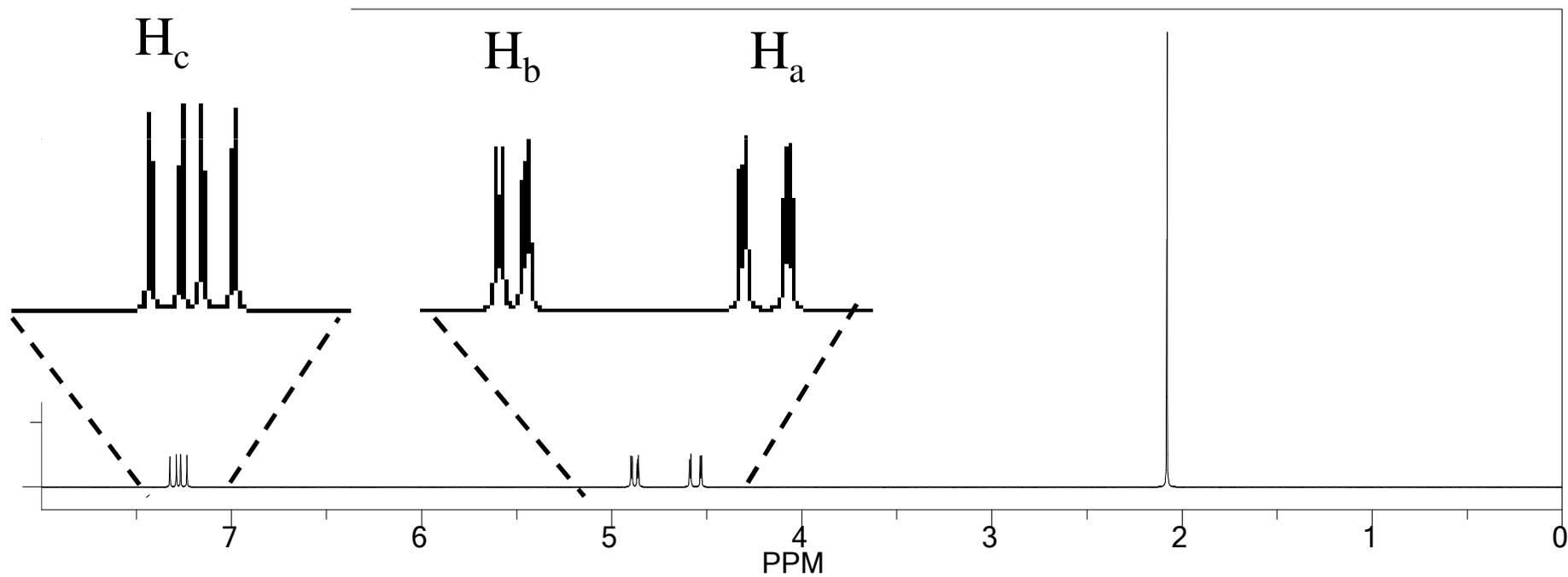
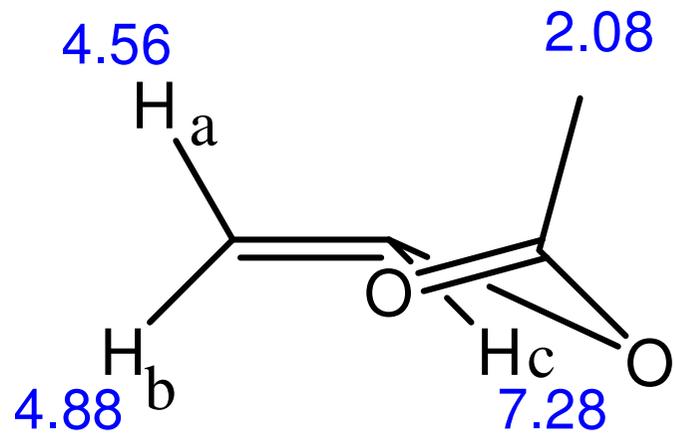


Accoppiamento attraverso un legame: 1J

Accoppiamento attraverso 2 legami: 2J
geminale

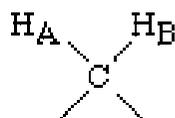
Accoppiamento attraverso 3 legami: 3J
vicinale





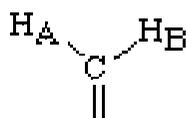
Magnitude of Coupling Constants

12-15 Hz



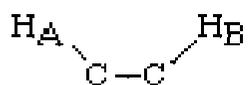
2-bond coupling
 sp^3 carbon

0-2 Hz



2-bond coupling
 sp^2 carbon

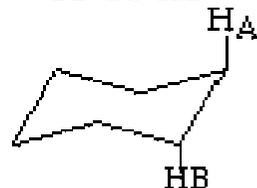
6-8 Hz



3-bond coupling
single bond
acyclic system

The magnitude of the coupling constant is a function of the dihedral angle between H_A and H_B . Dihedral angles near 0 and 180 degrees result in maximal coupling of 9 and 13 Hz respectively, while a dihedral angle of 90 degrees produces a coupling constant near 0.

10-13 Hz



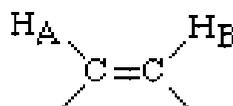
6-membered ring
anti (ax-ax)

2-5 Hz



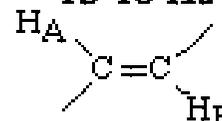
6-membered ring
gauche (eq-eq, or ax-eq)

6-12 Hz



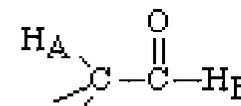
3-bond coupling
double bond
cis

12-18 Hz



3-bond coupling
double bond
trans

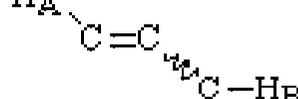
2-3 Hz



3-bond coupling
aldehyde

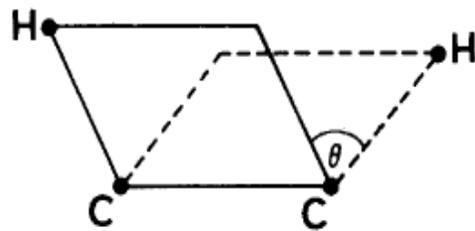
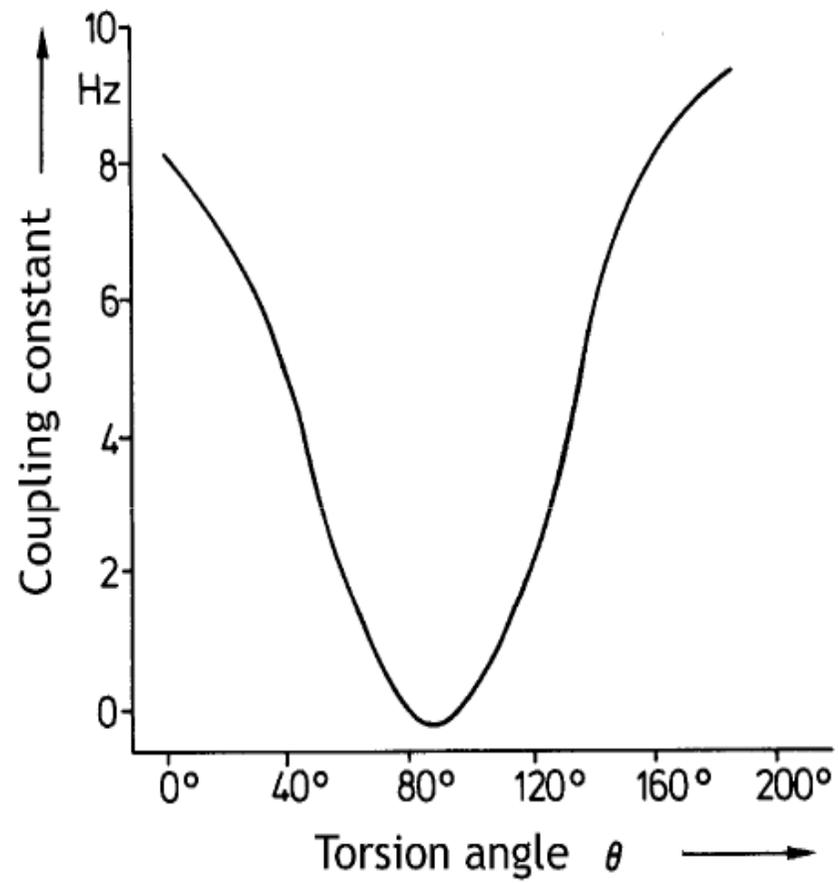
One of the best ways to determine the double bond stereochemistry (i.e., cis or trans).

0-3 Hz



4-bond coupling
with multiple bond

4-bond couplings are usually not observed if there is not a multiple bond between the two hydrogens.

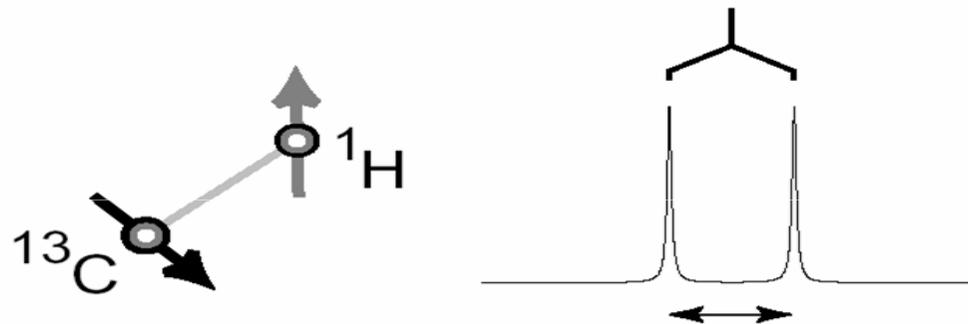


Accoppiamento fra spin diluiti e spin abbondanti.

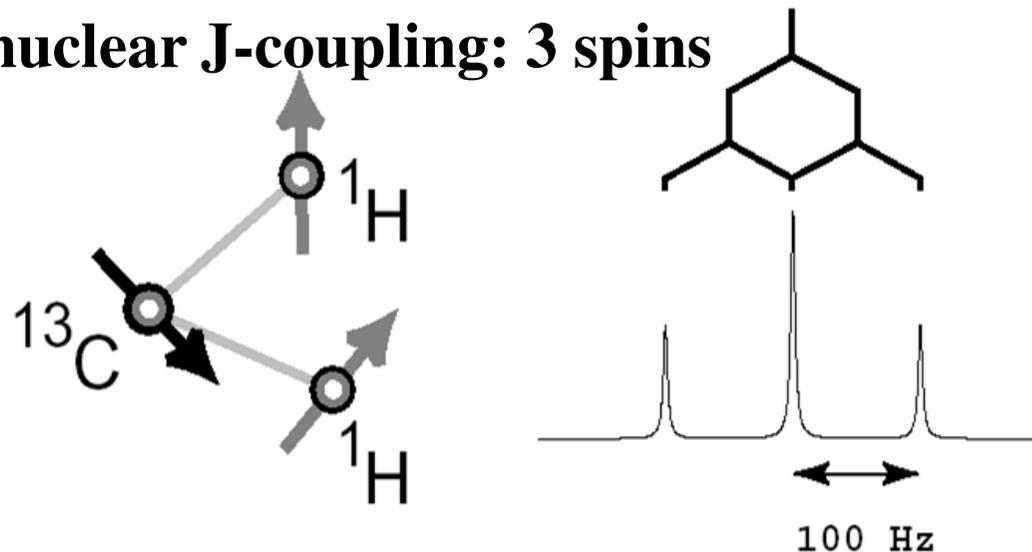
Gli accoppiamenti fra spin diluiti sono normalmente trascurabili

Negli spettri di spin diluiti gli splitting delle risonanze sono dovuti solo agli accoppiamenti con gli spin abbondanti: (^{13}C , ^1H)

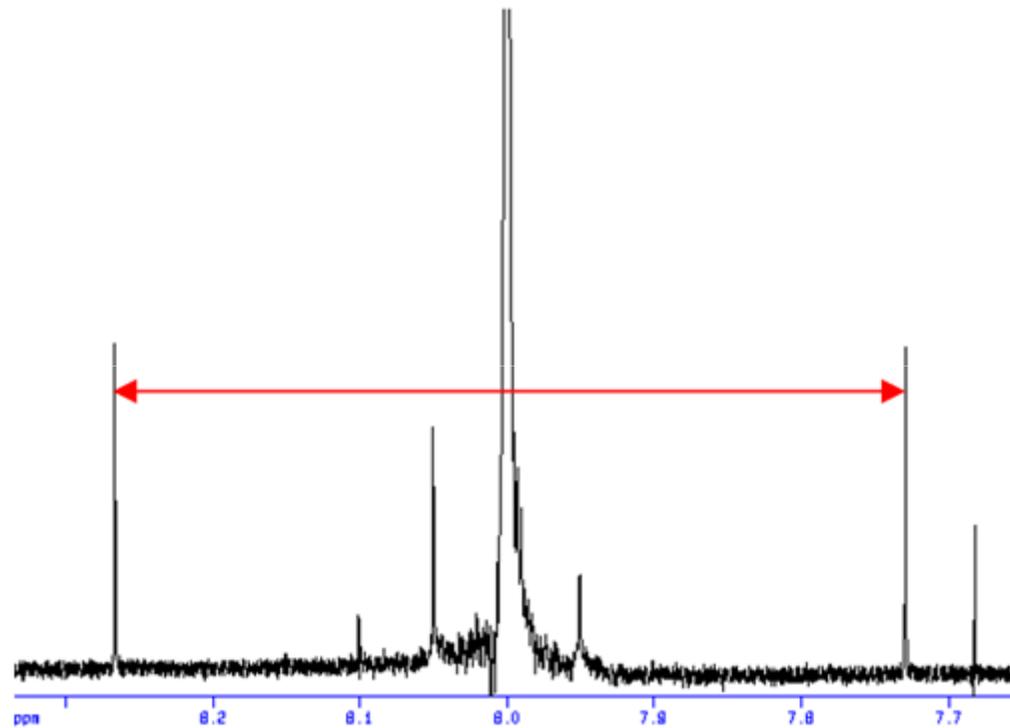
Heteronuclear J-coupling: 2 spins



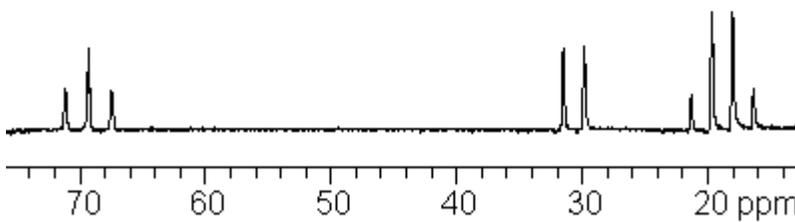
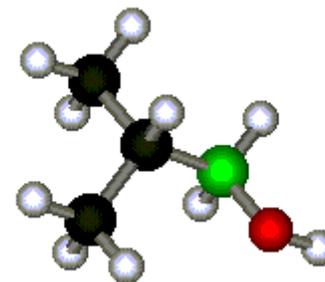
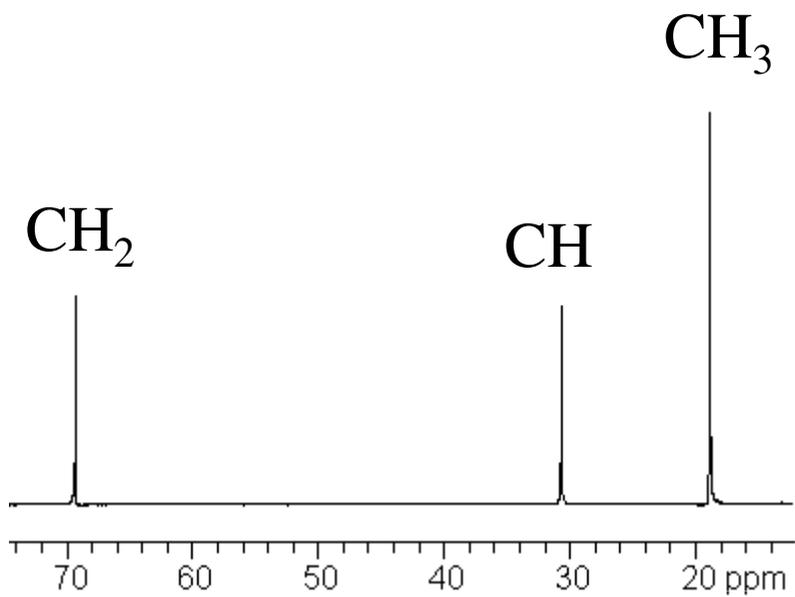
Heteronuclear J-coupling: 3 spins



Segnali satelliti dovuti all'accoppiamento fra ^{13}C e ^1H nello spettro protonico del cloroformio



Isobutanolo

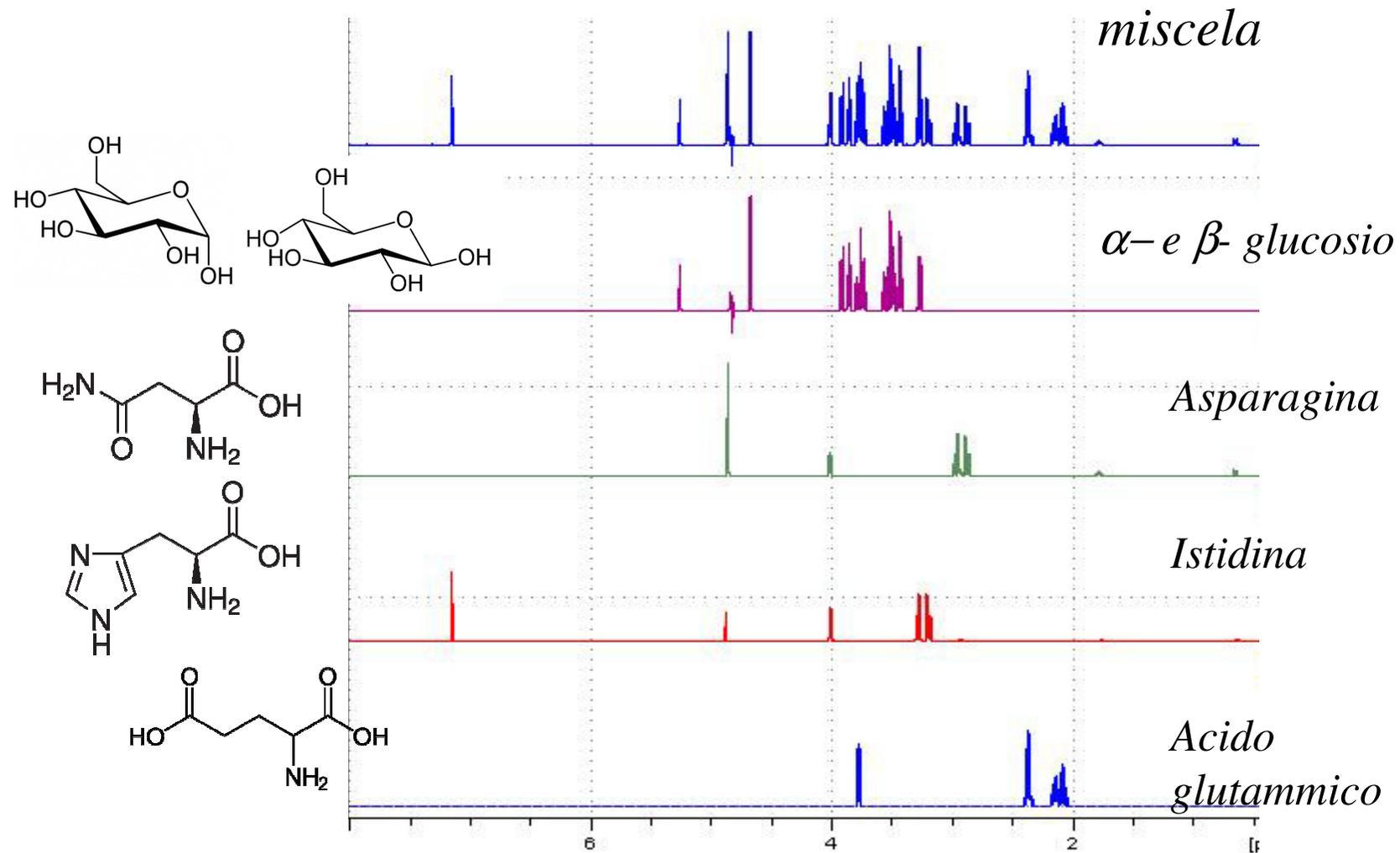


Vantaggi e svantaggi della Risonanza Magnetica (NMR)

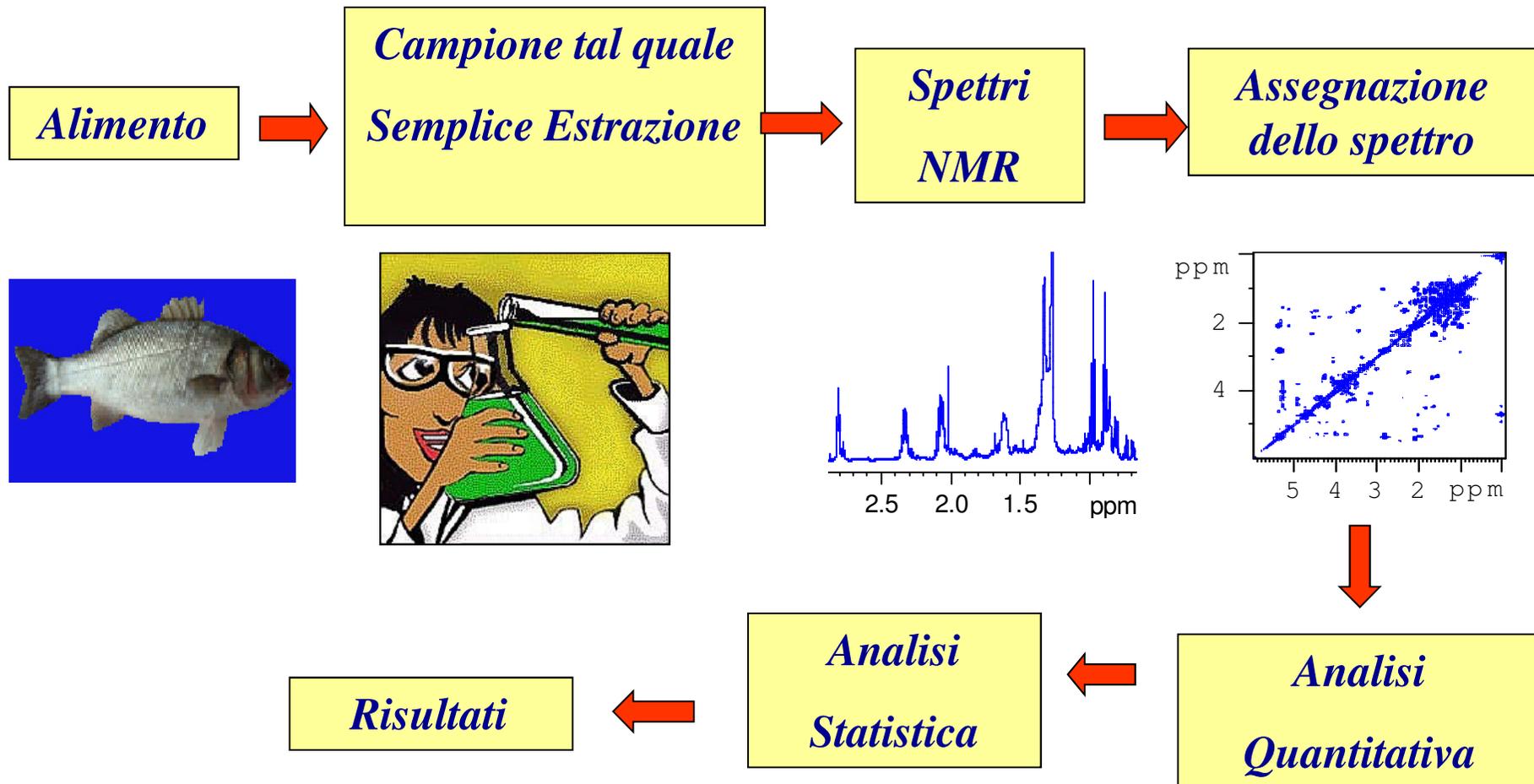
- ***Universale e imparziale (non è specifico solo per un classe di metaboliti)***
- ***Separazione delle miscele, purificazione o derivatizzazione non sono necessari***
- ***Differenza fino a 10^5 tra la più alta e la più bassa concentrazione in una stessa misura***
- ***Identificazione dei composti sconosciuti o inaspettati***

Sensibilità

Spettri NMR come impronte digitali



Schema generale di applicazione della tecnica NMR per la determinazione del profilo metabolico di un alimento



Lattuga transgenica: effetti metabolici desiderati ed inaspettati



Piante non trasformate e transgeniche

Asparagine Synthetase B



Solo piante transgeniche

Asparagine Synthetase A (EC 6.3.1.1)



L'espressione del transgene *Asparagine Synthetase A* nella lattuga

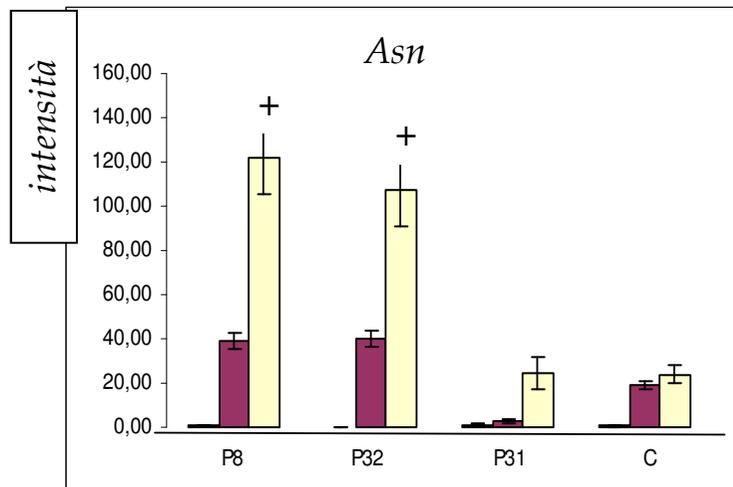
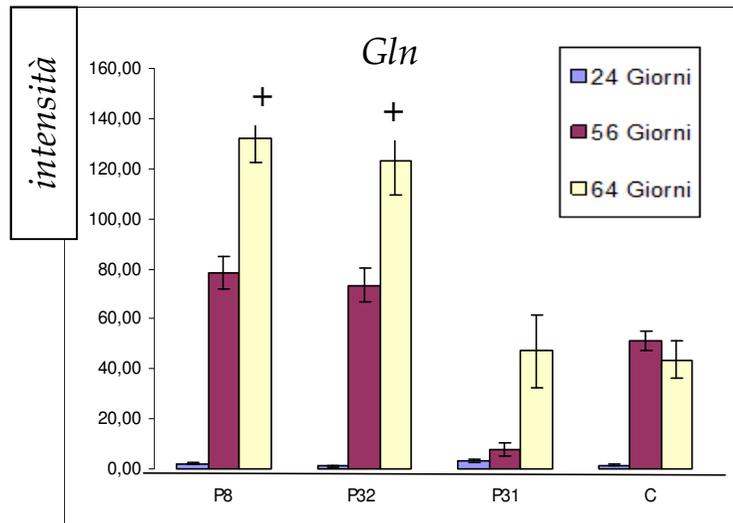
- Aumento della massa fogliare e del peso secco
- Fioritura anticipata
- Migliore assimilazione d'azoto e CO₂

Effetto metabolico mirato



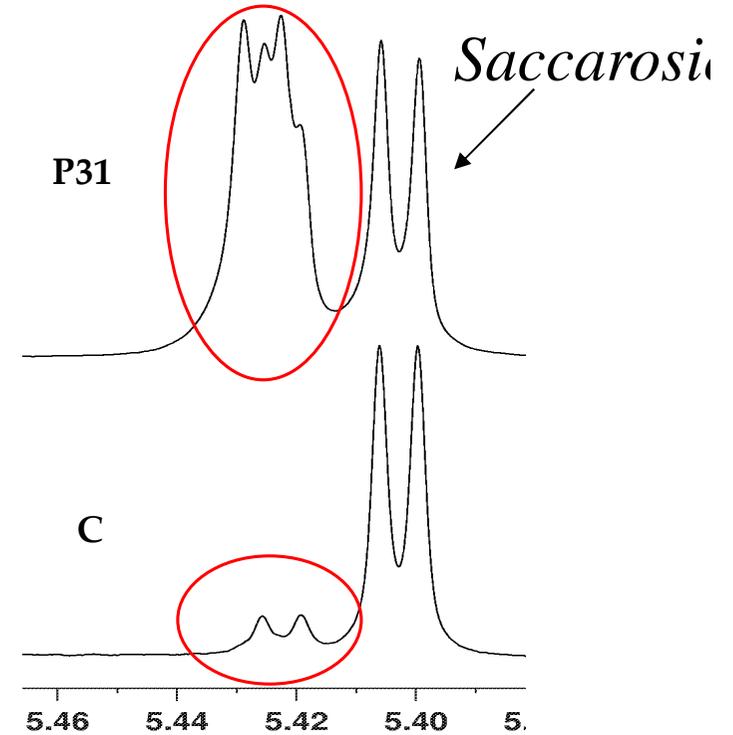
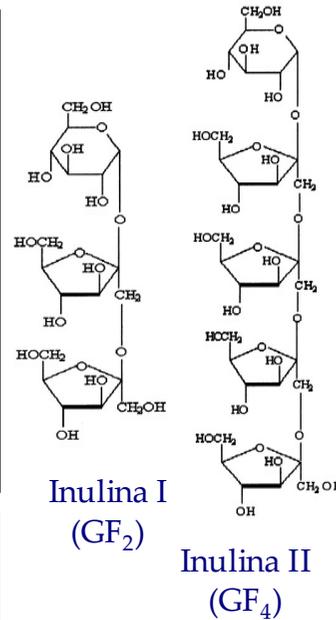
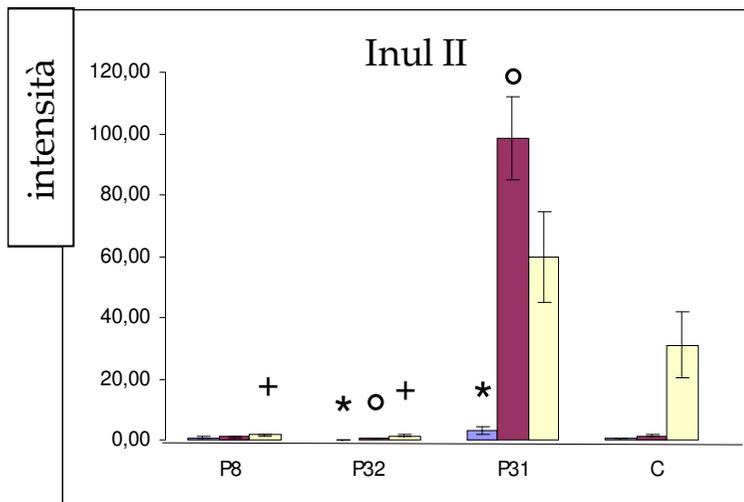
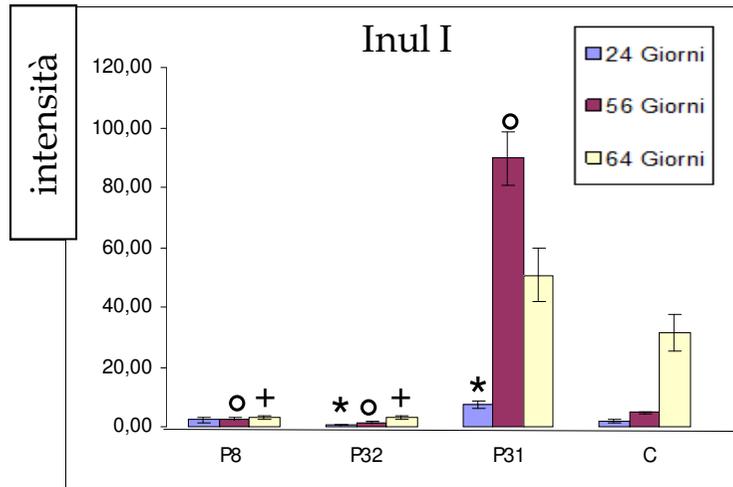
Più alto contenuto degli amino acidi di N-trasporto (Asn, Asp, Gln, Glu)

Amino acidi: l'effetto c'è!



- ✓ *La quantità di tutti gli amminoacidi aumenta con la maturazione in tutte le linee.*
- *Nelle linee P8 e P32 la concentrazione di amminoacidi è considerevolmente maggiore rispetto alle altre due linee (56 e 64 gg).*

Inuline: effetto inaspettato



- Le inuline contribuiscono in maniera determinante alla distinzione tra la linea transgenica P31 e tutte le altre. A 56 giorni si arriva ad una quantità fino a **30 volte** più elevata rispetto a quella osservata in P32, P8 e C.

Variazione del profilo metabolico dei mirtilli: l'influenza dei fattori genetico e stagionale

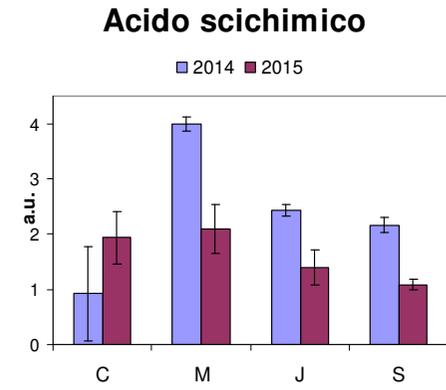
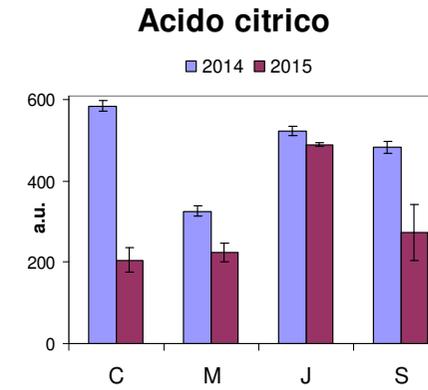
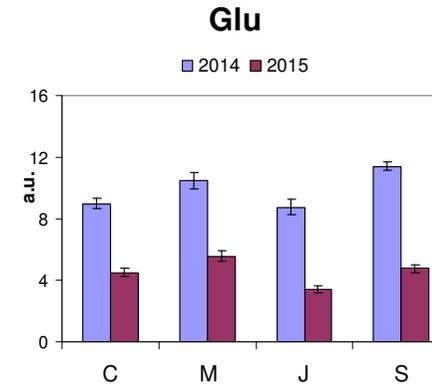
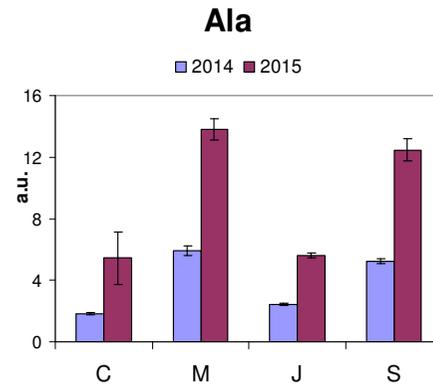
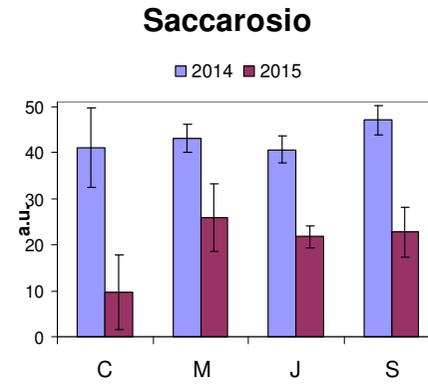
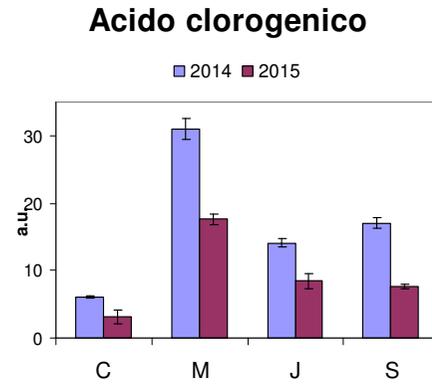
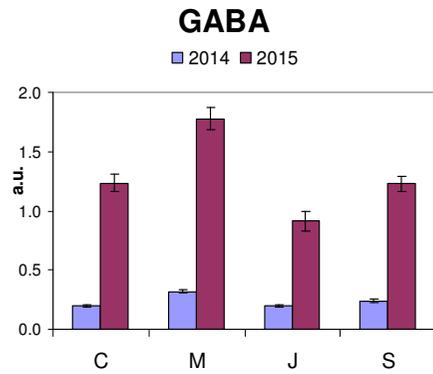
4 varietà: Camelia, Misty, Jewel, Spartan

2 stagioni: Giugno 2014, Giugno 2015

Campionamento: macinazione a freddo, 100 g

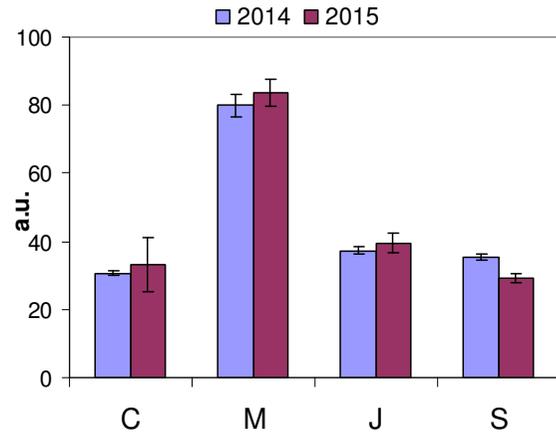


Effetto della stagione

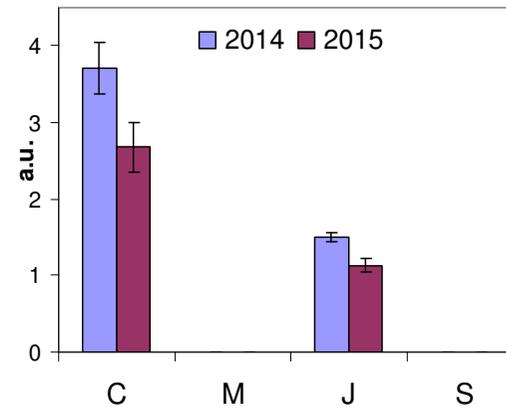


Effetto genetico: I marcatori delle cultivar

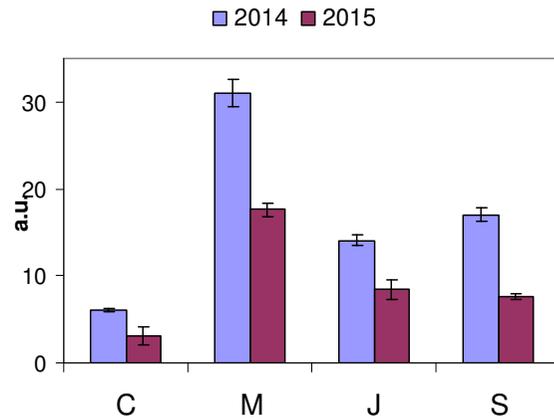
Acido Chinico



Quercitina-3-ramnoside



Acido clorogenico



Val

