

МЕТОД ЭЛЕКТРОННОГО ПАРАМАГНИТНОГО РЕЗОНАНСА (ЭПР).

Метод электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) основан на взаимодействии вещества с магнитным полем. Как следует из названия метода, он применяется для исследования парамагнитных частиц.

Известно, что при помещении парамагнетиков в магнитное поле, парамагнетик втягивается в это поле. Это связано с наличием у парамагнетиков магнитных моментов. Магнитные моменты создаются неспаренными электронами.

Примерами парамагнитных частиц, представляющих интерес для биологов, служат свободные радикалы, являющиеся промежуточными продуктами биохимических реакций, ионы металлов переменной валентности, таких как железо, медь, марганец и др.

Проявление магнитного момента у электрона связано с тем, что электрон является заряженной частицей, и при вращении электрона вокруг своей оси (спиновое движение) возникает магнитное поле, направленное вдоль оси вращения. При помещении парамагнитного образца в магнитное поле магнитные моменты неспаренных электронов ориентируются в этом поле, подобно тому, как это происходит с магнитными стрелками.

Магнитный момент неспаренного электрона во внешнем магнитном поле может ориентироваться двумя способами - по полю и против поля. Таким образом, если в исследуемой системе имеются неспаренные электроны, наложение внешнего магнитного поля приводит к разделению электронов по группам: магнитные моменты одних электронов ориентированы по полю, других - против (рис.1.).

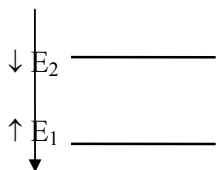


Рис. 1.

Каждой из ориентаций магнитных моментов электронов соответствует свободная энергия. Разница в энергии электронов определяется выражением

$$\Delta E_1 = E_2 - E_1 = g \cdot \beta \cdot H \quad (1)$$

где: β - константа, называемая магнетоном Бора и равная $9.27 \cdot 10^{-21}$ эрг/Гс, а g - константа, называемая g - фактором и равная 2, когда магнитный момент электрона является спиновым магнитным моментом, H - напряженность магнитного поля.

Изложенная ситуация иллюстрирует рис. 1, где маленькими стрелками указаны ориентации магнитных моментов неспаренных электронов, соответствующие каждому из уровней E₁ и E₂.

Как следует из выражения (1) величина ΔE зависит от напряженности внешнего магнитного поля. При величине H 3000 Гс, $\Delta E = 4 \cdot 10^{-5}$ эВ или 1 кал/моль, что при комнатной температуре существенно меньше средней энергии теплового движения молекул.

В соответствии с законом Больцмана заселенность нижнего и верхнего уровня описывается выражением

$$n_2 = n_1 e^{-\Delta E/kT} = n_1 e^{-g\beta H/kT} \quad (2)$$

где: n_1 и n_2 - заселенности верхнего и нижнего уровней.

В соответствии с выражением (2) заселенность нижнего уровня выше, чем заселенность верхнего уровня.

Величина ΔE может быть выражена и другим способом, а именно $\Delta E = h\nu$, где $h\nu$ - величина кванта энергии, необходимого для перевода электрона из одного состояния в другое.

Объединяя оба выражения для ΔE , можно записать:

$$h\nu = g \cdot \beta \cdot H \quad (3).$$

Из этого выражения, носящего название условия резонанса, можно понять и смысл явления электронного парамагнитного резонанса.

Действительно, если к находящейся в магнитном поле системе, содержащей неспаренные электроны, подвести высокочастотное излучение с частотой ν , определяемой условием (3), то в исследуемой системе возникнут вынужденные электронные переходы между соседними уровнями E_1 и E_2 . Переходы с одинаковой вероятностью будут происходить как из состояния E_1 в состояние E_2 , так и наоборот. Однако, число переходов снизу вверх больше числа переходов сверху вниз, поскольку в соответствии с законом Больцмана заселенность нижнего уровня выше. Переходы из верхнего состояния в нижнее происходят с испусканием энергии, а переходы из нижнего в верхнее - с поглощением. Но поскольку число переходов снизу вверх больше, то в целом при выполнении условия резонанса (3) в образце будет наблюдаться поглощение высокочастотного излучения. Частота, при которой наблюдается резонансное поглощение высокочастотного излучения образцом, связана с напряженностью магнитного поля, что следует из (3), а именно:

$$\nu = \frac{g \cdot \beta}{h} H$$

Из этого выражения видно, что резонансное поглощение можно наблюдать:

- а) при изменении частоты ν электромагнитного излучения при постоянстве H
- б) при изменении H при постоянстве ν .

Из технических соображений применяется второй способ регистрации. В этом случае линия парамагнитного резонанса выглядит как показано на рис.2.

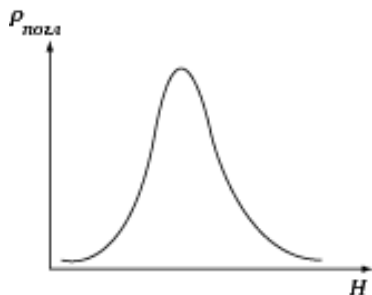


Рис. 2.

По оси ординат откладывается величина поглощенного образцом высокочастотного излучения, а по оси абсцисс - напряженность поля. Величина магнитного поля H , применяющегося при исследовании ЭПР и, следовательно, значение частоты высокочастотного излучения во многом определяется техническими возможностями создания. Для исследований применяются спектрометры, где напряженность магнитного поля, при которой наблюдается резонанс, равна 3500 Гс. Частота излучения ν при этом будет равна 10^4 мГц. Длина волны такого излучения λ равна приблизительно 3 см. такие излучения относятся к радиодиапазону. Поэтому метод ЭПР относится к методам радиоспектроскопии (спектроскопии в области радиочастот).

Изложенный выше принцип метода ЭПР позволяет представить себе структурную схему прибора, служащего для регистрации ЭПР - радиоспектрометра ЭПР.

Основными частями любого спектрометра ЭПР являются:

- а) магнит, создающий поле H ,
- б) источник радиочастотного излучения,
- в) система позволяющая подвести радиочастотное излучение к образцу и сконцентрировать это излучение на образце,
- г) схема, позволяющая зарегистрировать поглощение радиочастотного излучения.

В качестве источников магнитного поля используются электромагниты, которые снабжены специальными электронными схемами, позволяющими плавно изменять напряженность магнитного поля в определенных пределах с определенной скоростью. Это так называемые системы развертки поля.

Источниками высокочастотного излучения чаще всего служат специальные генераторные лампы - клистроны. Для передачи этого излучения к образцу применяются волноводы - металлические трубки определенного сечения, которые являются аналогами высокочастотных кабелей. Совокупность волноводов носит название волноводного тракта спектрометра. Помимо волноводов как таковых, в состав волноводного тракта входят и другие элементы. Один из таких элементов - резонатор находится между полюсами электромагнита. Именно в резонатор

помещается образец. Назначение резонатора заключается в концентрации радиочастотного излучения в месте расположения образца.

Поглощение радиочастотного излучения образцом в момент резонанса регистрируется с помощью специального кристаллического детектора. Сигнал ЭПР с этого детектора усиливается усилителем и далее поступает на регистрационное устройство (осциллограф или самописец).

В современных спектрометрах ЭПР часто используются специальные комплексы обработки сигналов, созданные на базе ЭВМ, что позволяет значительно расширить возможности обработки сигналов ЭПР.

Заканчивая краткое описание принципов построения спектрометров ЭПР, следует сказать, что в спектрометрах ЭПР сигнал регистрируется не в интегральном виде (рис.2.), а в виде первой производной (рис.3.).

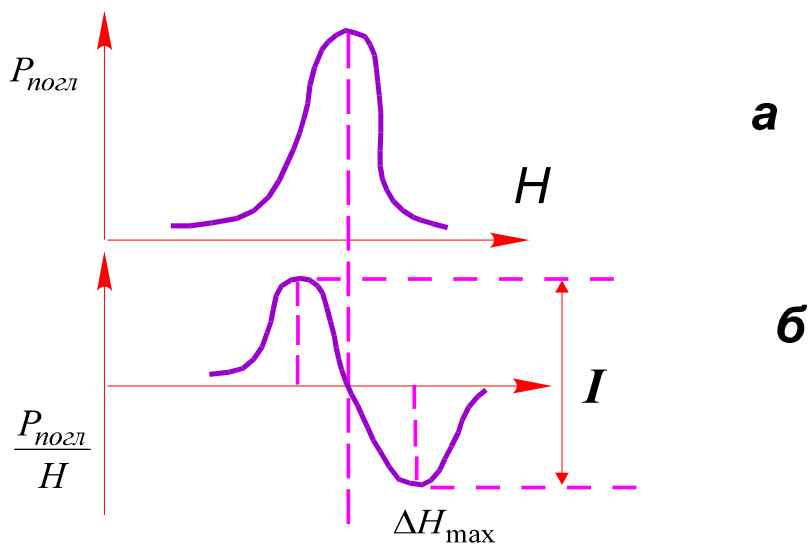


Рис. 3. Сигнал ЭПР /а/ и его первая производная /б/.

Максимуму сигнала (а) соответствует нулевая точка на кривой первой производной. Максимумы на кривой первой производной отвечают точкам перегиба (точкам максимального наклона) на кривой интегрального сигнала.

Регистрация сигнала ЭПР в виде первой производной оказывается предпочтительной в связи с тем, что при таком способе регистрации удастся поднять чувствительность спектрометра на несколько порядков по сравнению с регистрацией сигнала в интегральном виде.

Для характеристики сигналов ЭПР употребляется набор параметров. Одним из таких параметров является амплитуда сигнала I (рис.3б), которая характеризует интенсивность сигнала. Величина I измеряется в подавляющем большинстве случаев в относительных

единицах (например в мм). Ясно, что чем больше концентрация парамагнитных частиц в образце, тем больше будет величина (при неизменности ширины сигнала).

Величиной, характеризующей ширину сигнала, служит ΔH_{\max} - ширина линии между точками максимального наклона (рис.3б.). Эта величина измеряется в единицах магнитного поля - гауссах (Гс) или миллитеслах (мТл). Для того, чтобы измерить ΔH_{\max} в единицах магнитного поля, необходимо знать масштаб по оси абсцисс на ленте самописца (т.е. знать сколько гаусс приходится, например, на 1 см на ленте самописца). Для измерения ΔH_{\max} применяются специальные эталоны.

Как было сказано выше, метод ЭПР является одним из методов радиоспектроскопии, или спектроскопии в радиочастотном диапазоне. Этот метод служит тонким инструментом исследования парамагнитных частиц.

При рассмотрении принципа ЭПР мы рассматривали взаимодействие магнитного момента электрона с полем, создаваемым лабораторным магнитом. В реальных ситуациях, однако, надо иметь в виду, что неспаренные электроны могут взаимодействовать не только с магнитным полем магнита, но и с магнитными полями, создаваемыми окружением неспаренных электронов. Источниками таких магнитных полей служат магнитные поля, создаваемые неспаренными электронами соседних парамагнитных частиц, т.е. магнитные моменты соседних парамагнитных частиц могут взаимодействовать друг с другом. Другим источником локальных магнитных полей являются ядра целого ряда элементов. Например, протоны, ядра атомов азота, ядро изотопа углерода C^{13} и ряд других обладают магнитным моментом и тем самым создают локальные поля в месте расположения неспаренных электронов.

С учетом наличия локальных полей в условии резонанса (1) в качестве величины напряженности магнитного поля H нужно иметь в виду эффективное магнитное поле, являющееся суммой напряженностей поля: $H_{\text{эфф}} = H_0 + H_{\text{лок}}$, где H_0 - напряженность поля магнита и $H_{\text{лок}}$ - напряженность локального поля.

Метод ЭПР позволяет оценить эффекты, проявляющиеся в спектрах ЭПР из-за наличия локальных магнитных полей. В свою очередь локальные магнитные поля отражают картину магнитных взаимодействий в исследуемой системе. Таким образом, метод ЭПР позволяет исследовать как структуру парамагнитных частиц, так и взаимодействие парамагнитных частиц с окружением.

Одним из примеров, иллюстрирующем влияние магнитных полей ядер на вид спектра ЭПР, служит сверхтонкая структура спектров ЭПР (СТС).

Рассмотрим, какой вид имеет спектр ЭПР атомов водорода.

Как известно, в атоме водорода имеется один электрон, располагающийся на S-орбитали около протона.

Протон обладает магнитным моментом. В этом случае неспаренный электрон в атоме водорода находится в эффективном поле, складывающемся из поля, создаваемого магнитом, и поля протона:

$$H_{\text{эфф}} = H_0 + H_{\text{прот}}$$

С другой стороны, магнитный момент протона, подобно магнитному моменту неспаренного электрона, ориентируется в поле лабораторного магнита. Для магнитного момента разрешены 2 ориентации - в направлении поля и против поля.

В том случае магнитное поле протона будет или вычитаться из внешнего магнитного поля или складываться с ним. В соответствии с этим для одних атомов водорода $H_{эфф}$ будет равно сумме $H_0 + H_{прот}$, а для других разности $H_0 - H_{прот}$.

В спектре ЭПР атомарного водорода в соответствии с этим наблюдаются две линии, соответствующие резонансу в каждом из двух эффективных магнитных полей.

В том случае, когда неспаренный электрон может взаимодействовать с ядром азота в спектре ЭПР наблюдаются три линии, поскольку для магнитного момента ядра азота разрешены три ориентации во внешнем магнитном поле - по полю, против поля, и перпендикулярно полю.

Эффективное поле в этой ситуации равно:

$$H_0 + H_{азота} \quad (a)$$

$$H_{эфф} = H_0 \quad (б)$$

$$H_0 - H_{азота} \quad (в)$$

когда магнитный момент ядра ориентирован по полю (а), перпендикулярно полю (б), против поля (в).

Таким образом ЭПР является весьма информативным методом исследования парамагнитных частиц, благодаря чему он находит широкое применение в химии, физике и биологии.

В биологии метод ЭПР пригоден для изучения всех процессов, которые протекают с участием парамагнитных частиц, например, свободных радикалов как в интактных биологических образцах, так и в клеточных фрагментах и в модельных системах.

Хорошо известен факт, что количество свободных радикалов в тканях коррелирует с их метаболической активностью. Известно, что концентрация свободных радикалов изменяется при возникновении паталогических процессов.

С помощью методов ЭПР было исследовано большое число модельных фермент - субстратных систем, где удавалось наблюдать появление свободно - радикальных продуктов реакций, что явилось убедительным подтверждением теории Михаэлиса о появлении свободных радикалов в ходе ферментативных реакций.

Большое количество данных было получено с помощью метода ЭПР при исследовании действия излучений как на биологически важные макромолекулы, так и на ткани животных, семена и др. биологические объекты.

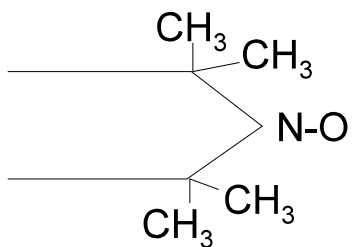
ЭПР широко применяется в исследованиях фотосинтеза, где с помощью этого метода изучаются первичные стадии фотохимических реакций переноса электрона от хлорофилла к первичным акцепторам электрона и дальнейший перенос электрона по электрон - транспортной цепи хлоропластов.

Таким образом, метод ЭПР может быть использован для исследования всех процессов, протекающих с участием парамагнитных частиц (свободных радикалов, атомов переходных металлов и т.д.).

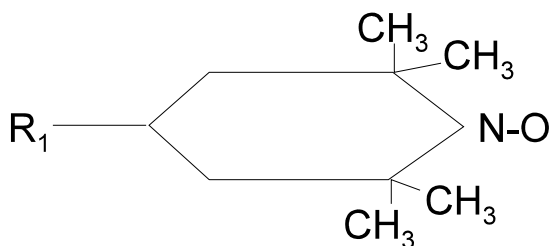
Метод ЭПР однако, находит широкое применение и в исследовании структуры белков, нуклеиновых кислот, а также биомембран.

Известно, что многие белки, нуклеиновые кислоты и один из важнейших компонентов биомембран - липиды не обладают собственными сигналами ЭПР. В этом случае в исследуемую систему вводят парамагнитные частицы, по поведению которых можно судить о свойствах той системы, в которую они внедрены.

Подобные методы получили названия методов спиновых зондов и спиновых меток. В качестве спиновых зондов и спиновых меток в подавляющем большинстве случаев используются стабильные нитроксильные радикалы, т.е. вещества находятся в свободно - радикальном состоянии с течение длительного времени. Нитроксильные радикалы содержат фрагмент:



который чаще всего включен в кольцевую структуру

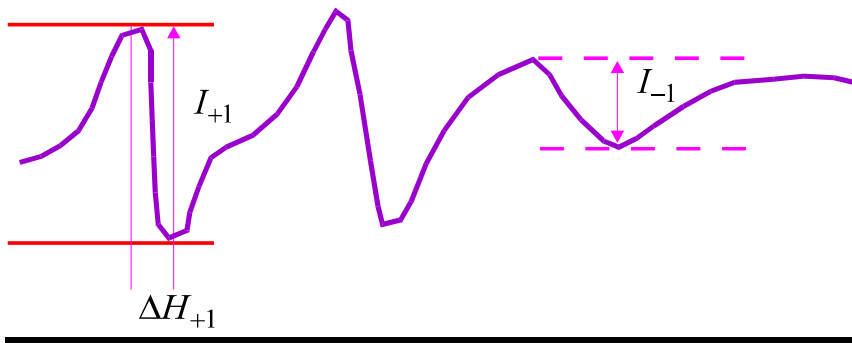


где: R - жирнокислотная цепь или другая группировка

Неспаренный электрон в таком радикале локализован на связи N - O. Спектр ЭПР такого радикала в маловязком растворителе (например, спирте) состоит из трех узких линий, обусловленных взаимодействием электрона с ядром азота.



Однако, спектр ЭПР такого радикала весьма чувствителен к характеру той матрицы, где он находится. Например, при увеличении вязкости системы происходит изменение относительной интенсивности компонент сигнала и изменение ширины отдельных линий.



При дальнейшем увеличении вязкости происходят еще больше трансформации спектра, выражающиеся как в изменении ширины линий, так и в сдвиге этих линий относительно их положения в спектрах радикалов для маловязких систем. Все эти эффекты связаны с тем, что вид спектра ЭПР «чувствует» как интенсивность движения радикала, так и тип этих движений, что находит объяснение в свете теории спектров ЭПР нитроксильный радикалов.

Одним из параметров, которым можно описать поведение радикала, внедренного в исследуемую систему, например мембрану, служит время корреляции - τ_c , которое можно представить для не очень вязких систем, как время поворота радикала на угол 90° относительно некоторой оси. Такой осью, например, может служить длинная жирнокислотная цепь. Если нитроксильный радикал связан с жирнокислотной цепью, то такой радикал будет встраиваться в липидную мембрану и по его поведению можно следить за состоянием мембраны. Например, если под действием температуры или других агентов вязкость мембраны изменяется, то это приводит к изменениям скорости вращения радикала, т.е. к изменению времени корреляции, что сразу отразится на виде спектра.

Разработанные теоретические модели позволяют вычислять время корреляции по виду спектра ЭПР.

Для времен корреляции, лежащих в диапазоне:

$5 \cdot 10^{-11}$ сек $< \tau_c < 1 \cdot 10^{-9}$ сек время корреляции можно вычислить по формуле:

$$\tau_c = 6.65 \cdot \Delta H_{+1} \left(\sqrt{\frac{I_{+1}}{I_{-1}}} - 1 \right) \cdot 10^{-10} \text{ с}$$

$$\tau_c = \frac{4}{3} \pi R^3 \frac{\eta}{kT}$$

η - вязкость,

R - радиус частицы

где I_{+1} и I_{-1} - интенсивности низкопольной и высокопольной компонент спектра, выраженные в относительных единицах, а ΔH_{+1} - ширина между точками максимального наклона для низкопольной компоненты, выраженная в единицах магнитного поля - в гауссах.

Таким образом, воздействуя на мембрану тем или иным способом и измеряя τ_c , можно сказать какие структурные перестройки претерпевает мембрана в интересующих нас условиях.

Задачи работы

1. Ознакомиться с устройством спектрометра ЭПР.
2. Зарегистрировать спектры ЭПР нитроксильных радикалов в растворителях разной вязкости и рассчитать времена корреляции из зарегистрированных спектров.

Литература

1. Д. Ингрэм Электронный парамагнитный резонанс в биологии. Изд-во «Мир», 1972.
2. Свободные радикалы в биологических системах. т.1, ст.88-175, 178-226. Изд-во «Мир», 1979.