

3 МЕТОД ЭЛЕКТРОННОГО ПАРАМАГНИТНОГО РЕЗОНАНСА

3.1 Принцип метода ЭПР

3.1.1 История открытия метода ЭПР

Метод электронного парамагнитного резонанса (ЭПР, EPR – *electron paramagnetic resonance*, ESR – *electron spin resonance*) является основным методом для изучения парамагнитных частиц. К парамагнитным частицам имеющим важное биологическое значение относятся два основных типа – это свободные радикалы и комплексы металлов переменной валентности (таких как Fe, Cu, Co, Ni, Mn).

Метод электронного парамагнитного резонанса был открыт в 1944 г. Е.К. Завойским при исследовании взаимодействия электромагнитного излучения микроволнового диапазона с солями металлов. Он заметил, что монокристалл CuCl_2 , помещенный в постоянное магнитное поле 40 Гаусс (4 мТл), может поглощать излучение с частотой около 133 МГц.

Пионерами применения ЭПР в биологических исследованиях в СССР были Л.А. Блюменфельд и А.Э. Калмансон, которые начали изучать свободные радикалы белков, полученные под действием ионизирующего излучения.

Со временем, синтез стабильных нитроксильных радикалов существенно расширил область применения метода ЭПР в биологических и медицинских исследованиях. Сегодня этот метод является одним из широко используемых методов современной науки.

3.1.2 Механический и магнитный моменты электрона

В основе метода ЭПР лежит поглощение электромагнитного излучения радиодиапазона неспаренными электронами, находящимися в магнитном поле.

Хорошо известно, что электрон в атоме участвует в орбитальном и спиновом движении, которые можно охарактеризовать с помощью соответствующих механических и магнитных моментов. Так, орбитальный магнитный момент связан с механическим выражением

$$\mu_l = \frac{e}{2m} P_l \quad (0.1)$$

где μ_l – магнитный орбитальный момент, а P_l – механический орбитальный момент. В свою очередь механический орбитальный момент может быть выражен через орбитальное квантовое число

$$P_l = \frac{h}{2\pi} \sqrt{l(l+1)}. \quad (0.2)$$

Подставив выражение (0.2) в (0.1) получим, что

$$\mu_l = \frac{eh}{4\pi m} \sqrt{l(l+1)} \quad (0.3)$$

Величина $eh/4\pi m$ является элементарным магнитным моментом и носит название – магнетон Бора для электрона. Она обозначается буквой β и равна $9,27 \cdot 10^{-24}$ Дж/Тл.

Для спинового магнитного момента можно написать аналогичные выражения

$$\mu_s = \frac{e}{m} P_s \quad (0.4)$$

$$P_s = \frac{h}{2\pi} \sqrt{s(s+1)} \quad (0.5)$$

$$\mu_s = \frac{eh}{2\pi m} \sqrt{s(s+1)} \quad (0.6)$$

где μ_s – спиновый магнитный момент, P_s – механический магнитный момент, а s – спиновое квантовое число. Важно отметить, что коэффициент пропорциональности между μ_s и P_s (e/m) вдвое больше, чем для μ_l и P_l ($e/2m$).

В итоге полный магнитный момент электрона, являющийся вектором, будет равен сумме векторов орбитального и спинового магнитных моментов

$$\vec{\mu}_j = \vec{\mu}_l + \vec{\mu}_s. \quad (0.7)$$

Поскольку абсолютные значения μ_s и μ_l могут сильно отличаться, то для удобства учета вклада орбитального и спинового магнитных моментов в суммарный магнитный момент электрона вводят коэффициент пропорциональности, показывающий долю каждого из моментов в полном магнитном моменте – величину g или g -фактор.

$$\vec{\mu}_j = -g \frac{e}{2m} \vec{P}_j, \quad (0.8)$$

где P_j – полный механический момент электрона, равный $P_l + P_s$. g -Фактор равен единице при $s = 0$ (т.е. при отсутствии спинового движения) и равен двум, если орбитальный момент равен нулю ($l = 0$). g -Фактор идентичен фактору спектроскопического расщепления Ланде и может быть выражен через полные квантовые числа S , P и J :

$$g = 1 + \frac{J(J+1) - L(L+1) + S(S+1)}{2J(J+1)},$$

где $S = \sum_i s_i$, $L = \sum_i l_i$, $J = \sum_i j_i$. (0.9)

Поскольку в большинстве случаев электронные орбитали сильно отличаются от сферических, то орбитальный магнитный момент дает относительно небольшой вклад в суммарный магнитный момент. Для упрощения вычислений этим вкладом можно пренебречь. Кроме того, если заменить спиновый механический момент его проекцией на выделенное направление (например, на направление магнитного поля), то мы получим следующее выражение

$$\mu_j = -g \frac{eh}{4\pi m} m_s = \pm \frac{1}{2} g\beta \quad (0.10)$$

где $eh/4\pi m$ – магнетон Бора, $P_s = (h/2m) m_s$, а m_s – магнитное квантовое число, являющееся проекцией спинового магнитного момента на выделенное направление и равное $\pm 1/2$.

3.1.3 Эффект Зеемана

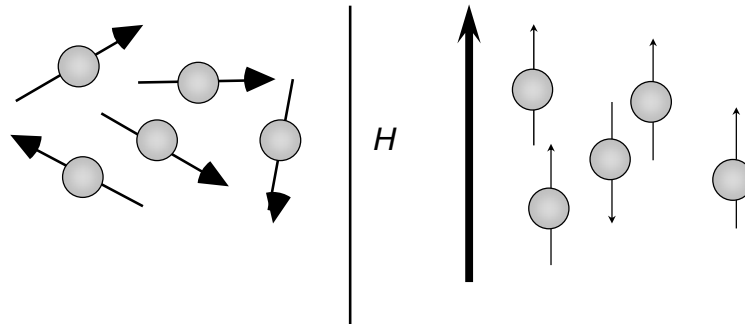


Рис. 3.1. Ориентация электронов во внешнем магнитном поле (H)

В отсутствие внешнего магнитного поля магнитные моменты электронов ориентированы случайным образом (рис. 3.1 *слева*), и их энергия практически не отличается друг от друга (E_0). При наложении внешнего магнитного поля магнитные моменты электронов ориентируются в поле в зависимости от величины спинового магнитного момента (рис. 3.1. *справа*), и их энергетический уровень расщепляется на два (рис. 3.2).

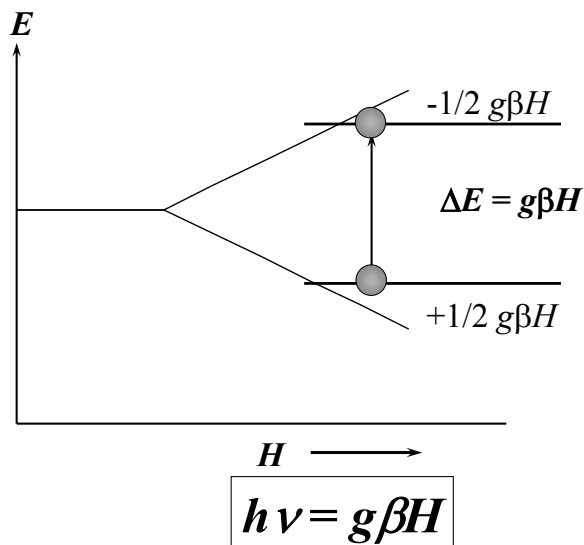


Рис. 3.2. Расщепление энергетических уровней одиночных электронов в магнитном поле (эффект Зеемана).

Объяснение в тексте

Энергия взаимодействия магнитного момента электрона с магнитным полем выражается уравнением

$$E = -\mu H = -\mu H \cos(\mu H), \tag{0.11}$$

где μ – суммарный магнитный момент электрона, H – напряженность магнитного поля, а $\cos(\mu H)$ – косинус угла между векторами μ и H .

В нашем случае энергия взаимодействия электрона с внешним магнитным полем составит величину

$$E = \mu_j H = \pm \frac{1}{2} g \beta H, \quad (0.12)$$

а разница в энергии между двумя уровнями составит

$$\Delta E = g \beta H \quad (0.13)$$

Таким образом энергетические уровни электронов, помещенных в магнитное поле, расщепляются в этом поле в зависимости от величины спинового магнитного момента и интенсивности магнитного поля (*эффект Зеемана*).

3.1.4 Основное уравнение резонанса.

Количество электронов в изучаемой системе, имеющих ту или иную энергию, будет определяться в соответствии с распределением Больцмана, а именно

$$\frac{n_{1/2}}{n_{-1/2}} = e^{\frac{\Delta E}{kT}} = e^{\frac{g \beta H}{kT}}, \quad (0.14)$$

где $n_{1/2}$ и $n_{-1/2}$ количество электронов на более высоком или более низком энергетическом уровне, соответствующем магнитному моменту электрона со спином $+1/2$ или $-1/2$.

Если на систему электронов, находящуюся в магнитном поле, падает электромагнитная волна, то при определенных значениях величины энергии падающих квантов будут происходить переходы электронов между уровнями.

Необходимое условие – равенство энергии падающего кванта ($h\nu$) и разности энергий между уровнями электронов с различными спинами ($g\beta H$).

$$\Delta E = h\nu = g\beta H \quad (0.15)$$

Это уравнение выражает основное условие поглощения энергии электронами и называется *основным уравнением резонанса*. Под влиянием излучения электроны, находящиеся на более высоком энергетическом уровне, будут испускать энергию и возвращаться на нижний уровень, это явление называется индуцированной эмиссией. Электроны же, находящиеся на нижнем уровне, будут поглощать энергию и переходить на более высокий энергетический уровень, это явление называется *резонансным поглощением*. Поскольку вероятности одиночных переходов между энергетическими уровнями равны, а общая вероятность переходов пропорциональна количеству электронов, находящихся на данном энергетическом уровне, то поглощение энергии будет преобладать над ее излучением. Это связано с тем, что как следует из распределения Больцмана заселенность нижнего уровня выше заселенности верхнего энергетического уровня.

Следует помнить, что различие в уровнях энергии электрона в магнитном поле (а также и других заряженных частиц, обладающих спином, например, у протонов) связано с наличием у электрона собственного магнитного момента. У спаренных электронов магнитные моменты скомпенсированы, и они на внешнее магнитное поле не реагируют, поэтому обычные молекулы не дают сигналов ЭПР. Таким образом, ЭПР позволяет обнаруживать и изучать свойства *свободных радикалов* (имеющих неспаренный электрон

на внешних орбиталях) и комплексов *металлов переменной валентности* (у которых неспаренный электрон принадлежит более глубоким электронным оболочкам). Эти две группы парамагнитных частиц часто называют *парамагнитными центрами*.

3.2 Характеристики спектров ЭПР

Метод ЭПР позволяет нам изучать свойства парамагнитных центров посредством спектров поглощения электромагнитного излучения этими частицами. Зная характеристики спектров можно судить и о свойствах парамагнитных частиц. К основным характеристикам спектров относятся амплитуда, ширина линии, форма линии, g -фактор и сверхтонкая структура спектров.

3.2.1 Амплитуда сигнала

Сигнал ЭПР представляет собой первую производную от спектра поглощения (рис. 3.3). Площадь под линией поглощения пропорциональна концентрации парамагнитных частиц в образце. Таким образом, концентрация парамагнитных центров пропорциональна первому интегралу под линией поглощения или второму интегралу от спектра ЭПР. Если два сигнала имеют одинаковую ширину, то концентрации парамагнитных центров соотносятся как амплитуды сигналов в спектрах поглощения.

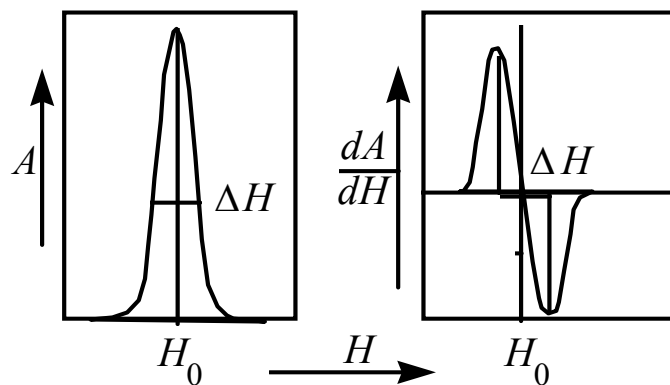


Рис. 3.3. Сигнал ЭПР. Слева – зависимость поглощения СВЧ от напряженности магнитного поля (H); справа – первая производная этой зависимости. ЭПР-спектрометры регистрируют кривые второго типа

Для определения концентрации измеряют площади под кривой поглощения у образца сравнения с известной концентрацией парамагнитных центров и у измеряемого образца и неизвестную концентрацию находят из пропорции, при условии, что оба образца имеют одинаковый объем:

$$c_x = c_0 \frac{S_x}{S_0}, \quad (0.16)$$

где c_x и c_0 – концентрации измеряемого образца и образца сравнения соответственно, а S_x и S_0 – площади под линиями поглощения измеряемого сигнала и образца сравнения.

Для определения площади под линией поглощения неизвестного сигнала можно воспользоваться приемом численного интегрирования

$$S = \int \int_{-\infty}^{\infty} f'(H) dH = \int_{-\infty}^{\infty} F(H) dH, \quad (0.17)$$

где $f'(H)$ – первая производная линии поглощения (спектр ЭПР), $F(H)$ – функция линии поглощения, а H – напряженность магнитного поля.

$$S = \int_{-\infty}^{\infty} F(H) dH = F(H)H \Big|_{-\infty}^{\infty} - \int_{-\infty}^{\infty} H dF(H), \quad (0.18)$$

Учитывая, что $F(H) \cdot H$ в точках $-\infty$ и ∞ равно нулю и $dF(H)$ равно $f'(H)dH$, получим

$$S = \int_{-\infty}^{\infty} H f'(H) dH \quad (0.19),$$

где $f'(H)$ – первая производная от линии поглощения, или спектр ЭПР. От интеграла легко перейти к интегральной сумме, учитывая, что $H = n\Delta H$, получим

$$S = \sum_{i=1}^{\infty} n_i \Delta H_i^2 f'_i(H) = \Delta H^2 \sum_{i=1}^{\infty} f'_i(H) \cdot n_i, \quad (0.20)$$

где ΔH – шаг изменения магнитного поля, а n_i – номер шага. Таким образом площадь под кривой поглощения будет равна произведению квадрата величины шага магнитного поля на сумму произведений амплитуды спектра ЭПР на номер шага. Из выражения (0.20) легко видеть, что при больших n (т.е. вдали от центра сигнала) вклад удаленных частей спектра может быть достаточно большим даже при малых значениях амплитуды сигнала.

3.2.2 Форма линии

Хотя согласно основному уравнению резонанса поглощение происходит только при равенстве энергии падающего кванта разности энергии между уровнями неспаренных электронов, спектр ЭПР является непрерывным в некоторой окрестности точки резонанса. Функция, описывающая сигнал ЭПР называется функцией формы линии. В разбавленных растворах, когда можно пренебречь взаимодействием между парамагнитными частицами, кривая поглощения описывается функцией Лоренца:

$$F_L(H) = F_{L0} \left(1 + \frac{(H - H_0)^2}{\Delta H_{1/2}^2} \right)^{-1}, \quad (0.21)$$

где F_{L0} – функция кривой поглощения в точке резонанса, H_0 – значение поля в точке резонанса, $\Delta H_{1/2}$ – ширина сигнала на половине высоты. Аналогичные обозначения используются для кривой поглощения, описываемой функцией Гаусса.

$$F_G(H) = F_{G0} e^{-\frac{(H - H_0)^2}{\Delta H_{1/2}^2}} \quad (0.22)$$

Функция Гаусса является огибающей спектра ЭПР если между парамагнитными частицами существует взаимодействие. Учитывать форму линии особенно важно при

определении площади под кривой поглощения. Как видно из вышеприведенных формул у Лоренцевой линии более медленное убывание и соответственно более широкие крылья, что может давать значительную ошибку при интегрировании спектра.

3.2.3 Ширина линии

Ширина спектра ЭПР зависит от взаимодействия магнитного момента электрона с магнитными моментами окружающих ядер (решетки) (спин-решеточное взаимодействие) и электронов (спин-спиновое взаимодействие). В отсутствие этих взаимодействий энергия, поглощенная электронами, приводила бы к снижению разности заселенности уровней и прекращению поглощения.

Однако, в эксперименте изменения разности заселенности уровней не наблюдается благодаря тому, что существуют процессы, в которых поглощенная энергия передается окружению и электроны возвращаются на исходный уровень. Такие процессы называются процессами релаксации, они поддерживают постоянной разность заселенности энергетических уровней. Механизм релаксации заключается в передаче электромагнитной энергии кванта решетке или окружающим электронам и возвращении электрона на низкоэнергетический уровень. Время, в течение которого электрон пребывает на высокоэнергетическом уровне, называется временем релаксации. Соответственно существует время спин-решеточной (T_1) и спин-спиновой (T_2) релаксации.

Одна из причин уширения полос поглощения в сигналах ЭПР кроется в волновых свойствах элементарных частиц, которые проявляются в существовании известного принципа соотношения неопределенностей Гейзенберга. Согласно этому принципу, чем точнее задано время наблюдения (чем меньше Δt), тем больше неопределенность в величине энергии частицы (ΔE):

$$\Delta E \geq \frac{h}{2\pi} \cdot \frac{1}{\Delta t} \quad (0.23)$$

Если принять, что Δt это время релаксации T , а ΔE соответствует $g\beta\Delta H$, то мы получим, что

$$\Delta H \geq \frac{h}{2\pi g\beta} \cdot \frac{1}{T}, \quad (0.24)$$

т.е. неопределенность в ширине линии обратно пропорциональна времени релаксации. Наблюдаемое время релаксации считают суммой времени спин-решеточной и спин-спиновой релаксации.

$$\Delta H \geq \frac{h}{2\pi g\beta} \cdot \frac{1}{T} = \frac{h}{2\pi g\beta} \cdot \frac{2T_1 + T_2}{2T_1T_2} \quad (0.25).$$

Свободные радикалы в растворах имеют $T_1 \gg T_2$, следовательно ширина линии будет зависеть в основном от T_2 .

«Естественное» уширение сигнала ЭПР, зависящее от времени спин-решеточной и спин-спиновой релаксации – не единственный механизм, влияющий на ширину линии сигнала. Важную роль играют также *диполь-дипольное взаимодействие; анизотропия g-фактора; динамическое уширение линии и спиновый обмен.*

В основе **диполь-дипольного взаимодействия** лежит взаимодействие магнитного момента неспаренного электрона с локальным магнитным полем, создаваемым соседними электронами и ядрами. Напряженность магнитного поля в точке, где находится неспаренный электрон, зависит от взаимной ориентации магнитных моментов неспаренного электрона и другого электрона или ядра и расстояния между этими центрами. Изменение энергии неспаренного электрона определяется уравнением

$$\Delta E = h\Delta\nu = g\beta\Delta H = g\beta\frac{\mu}{R^3}(3\cos^2\theta - 1), \quad (0.26)$$

где μ – магнитный момент электрона, θ – угол между взаимодействующими магнитными моментами R – расстояние между ними.

Вклад **анизотропии g-фактора** в уширение линии ЭПР связан с тем, что орбитальное движение электрона создает магнитное поле, с которым взаимодействует спиновый магнитный момент. Это создает сдвиг величины напряженности внешнего поля., при которой наблюдается резонанс, т.е. к сдвигу положения максимума сигнала ЭПР. В свою очередь, это проявляется в кажущемся отклонении g-фактора свободного электрона от значения 2,00. С другой стороны, влияние орбитального магнитного поля на электрон зависит от ориентации молекулы по отношению к внешнему магнитному полю, что приводит к уширению сигнала ЭПР при измерении в системе, состоящей из множества хаотически ориентированных молекул.

Уширение сигнала ЭПР может быть связано также с взаимным превращением двух парамагнитных частиц. Так, если каждая из частиц имеет свой спектр ЭПР, то увеличение скорости взаимного превращения друг в друга будет приводить к уширению линий, т.к. при этом уменьшается время жизни радикала в каждом состоянии. Такое изменение ширины сигнала называется **динамическим уширением** сигнала.

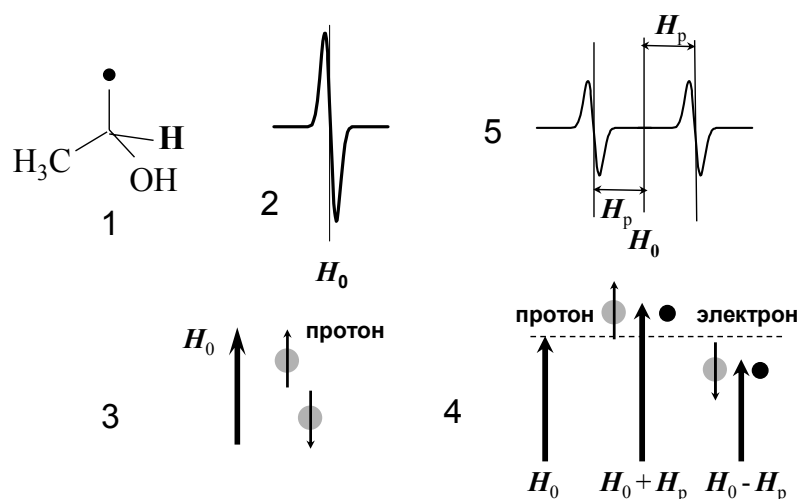
Спиновый обмен является еще одной из причин уширения сигнала ЭПР. Механизм уширения сигнала при спиновом обмене заключается в изменении направления спинового магнитного момента электрона на противоположное при соударении с другим неспаренным электроном или иным парамагнетиком. Поскольку при таком соударении уменьшается время жизни электрона в данном состоянии, то опять-таки сигнал ЭПР уширяется. Наиболее частым случаем уширения линии ЭПР по механизму спинового обмена является уширение сигнала в присутствии кислорода или парамагнитных ионов металлов.

3.2.4 Сверхтонкая структура спектров ЭПР

В основе расщепления одиночной линии ЭПР на несколько лежит явление **сверхтонкого взаимодействия**, т. е. взаимодействия магнитных моментов неспаренных электронов (μ_S) с магнитными моментами соседних ядер (μ_N).

На рисунке 3.4 дано пояснение сверхтонкого взаимодействия. Неспаренный электрон в радикале может быть расположен близко к протону, например как в радикале этанола (1). В отсутствие влияния близлежащих протонов электрон имеет сигнал в форме одиночной линии (2). Однако протон также имеет магнитный момент, который ориентирован во внешнем магнитном поле (H_0) в двух направлениях (по полю либо против поля) потому, что, подобно электрону, имеет спиновое число $S = \frac{1}{2}$. Будучи маленьким магнитом, протон

создает магнитное поле, которое в месте расположения электрона имеет определенные значения $+H_p$ или $-H_p$ в зависимости от ориентации протона (3). В результате суммарное магнитное поле, приложенное к неспаренному электрону (4), имеет значение, немного большее ($H_0 + H_p$) или немного меньшее ($H_0 - H_p$), чем в отсутствие протона (H_0). Поэтому сигнал ЭПР радикала состоит из двух полос, расстояние от которых до прежнего центра полосы H_0 равно H_p (5).



Сверхтонкое расщепление сигнала ЭПР в радикале этанола.

1 – радикал этанола. 2 – сигнал ЭПР электрона во внешнем поле. 3 – ориентация протонов во внешнем магнитном поле H_0 . 4 – увеличение или уменьшение поля, действующего на электрон в результате наложения магнитного поля протона (H_p) на внешнее магнитное поле. 5 – сигнал ЭПР радикала, в котором магнитное поле протона накладывается на внешнее магнитное поле

В рассмотренном нами примере спин ядра, взаимодействующего с неспаренным электроном, был равен $\pm 1/2$, что в конечном итоге дало нам расщепление на две линии. Такая величина спина характерна для протонов. У ядер атомов азота (N^{14}) спин *целочисленный*. Он может принимать значения ± 1 и 0 . В этом случае при взаимодействии неспаренного электрона с ядром атома азота будет наблюдаться расщепление на три одинаковых линии, соответствующих величине спина $+1$, -1 и 0 . В общем случае число линий в спектре ЭПР равно $2m_N + 1$. (см. далее, рис. 3.9)

Естественно, что количество неспаренных электронов и соответственно площадь под кривой поглощения ЭПР не зависят от величины спина ядра и являются постоянными величинами. Следовательно, при расщеплении одиночного сигнала ЭПР на два или три, интенсивность каждой компоненты будет соответственно в 2 или 3 раза ниже.

Очень похожая картина возникает, если неспаренный электрон взаимодействует не с одним, а с несколькими эквивалентными (с одинаковой константой сверхтонкого взаимодействия) ядрами, имеющими магнитный момент отличный от нуля, например двумя протонами. В этом случае возникает три состояния, соответствующие ориентации

спинов протонов: (а) оба по полю, (б) оба против поля и (в) один по полю и один против поля. Вариант (в) имеет вдвое большую вероятность, чем (а) или (б), т.к. может быть осуществлен двумя способами. В результате такого распределения неспаренных электронов одиночная линия расщепится на три с соотношением интенсивностей 1:2:1. В общем случае, для n эквивалентных ядер со спином m_N число линий равно $n2m_N + 1$.

3.3 Устройство радиоспектрометра ЭПР

Устройство радиоспектрометра ЭПР лишь весьма отдаленно напоминает устройство спектрофотометра для измерения оптического поглощения в видимой и ультрафиолетовой частях спектра (рис. 3.5).

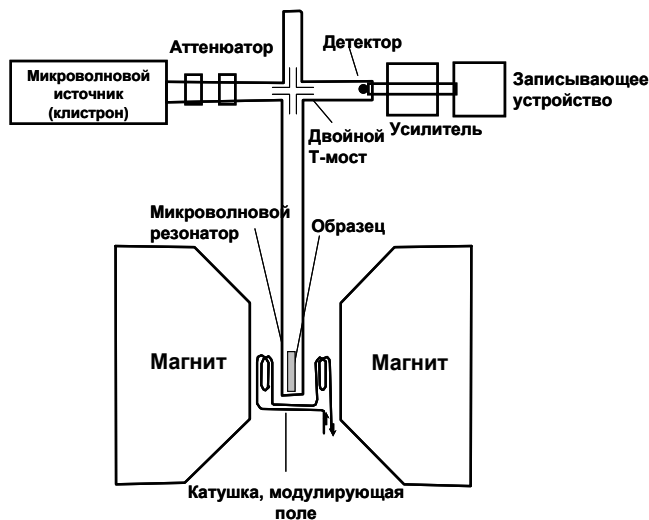


Рис. 3.5. Устройство ЭПР спектрометра

Источником излучения в радиоспектрометре является клистрон, представляющий из себя радиолампу, дающую монохроматическое излучение в диапазоне сантиметровых волн. Роль диафрагмы в радиоспектрометре выполняет аттенюатор, позволяющий дозировать мощность, падающую на образец. Кювета с образцом в радиоспектрометре находится в специальном блоке, называемом *резонатором*. Резонатор представляет собой изготовленный из металла полый параллелепипед, полость которого имеет цилиндрическую или прямоугольную форму. В ней находится поглощающий образец. Размеры резонатора таковы, что входящее излучение образует в нем стоячую электромагнитную волну. Элементом, полностью отсутствующим в оптическом спектрометре, является электромагнит, создающий постоянное магнитное поле, необходимое для расщепления энергетических уровней электронов. Излучение, прошедшее измеряемый образец, попадает на детектор, затем сигнал детектора усиливается и регистрируется на самописце или компьютере. Своеобразие конструкции радиоспектрометра заключается в том, что излучение радиодиапазона передается от источника к образцу и далее к детектору с помощью специальных трубок прямоугольного сечения, служащих *волноводами*. Размеры сечения волноводов определяются длиной волны передаваемого излучения. Эта особенность передачи радиоизлучения по волноводам и определяет тот факт, что для регистрации спектра ЭПР в радиоспектрометре используется постоянная частота излучения, а условие резонанса достигается изменением величины магнитного поля.

Еще одной важной особенностью радиоспектрометра является то, что этот прибор измеряет не поглощение (A) электромагнитных (свч) волн, а первую производную поглощения по напряженности магнитного поля dA/dH . Дело в том, что для измерения поглощения нужно сравнивать интенсивности прошедшего излучения у измеряемого и контрольного объекта (скажем, пустой кюветы), а при измерении первой производной контрольный объект не нужен. При *изменении* магнитного поля интенсивность свч волн, прошедших через пустое пространство или непоглощающий объект, не изменяется и первая производная поглощения *равна нулю*. Если же свч волны проходят через объект с парамагнитными центрами, то поглощение имеет место, а его величина зависит от напряженности магнитного поля. Изменяем поле и изменяется поглощение, что проявляется в изменении интенсивности измеряемого свч колебания. Именно это изменение интенсивности измеряемого свч при небольшой модуляции магнитного поля около заданной его величины позволяет определять dA/dH в каждой точке H , получая тем самым спектры, или сигналы ЭПР.

3.4 Сигналы ЭПР, наблюдаемые в биологических системах

Применение метода ЭПР в биологических исследованиях связано с изучением двух основных видов парамагнитных центров – свободных радикалов и ионов металлов переменной валентности. Изучение свободных радикалов в биологических системах связано с трудностью, заключающейся в низкой концентрации свободных радикалов, образующихся при жизнедеятельности клеток. Концентрация радикалов в нормально метаболизирующих клетках составляет по разным источникам примерно $10^{-8} - 10^{-10}$ М, в то время как современные радиоспектрометры позволяют измерять концентрации радикалов $10^{-6} - 10^{-7}$ М. Повысить концентрацию свободных радикалов можно затормозив их гибель или повысив скорость их образования. В условиях эксперимента образование радикалов легче всего наблюдать при облучении биологических объектов при очень низкой температуре (скажем 77К) в ходе их облучения УФ или ионизирующей радиацией. Изучение структуры радикалов более или менее сложных биологически важных молекул, полученных в таких условиях, и было одним из первых направлений применения метода ЭПР в биологических исследованиях (рис. 3.6). Вторым направлением применения метода ЭПР в биологических исследованиях было изучение металлов переменной валентности и/или их комплексов, существующих *in vivo*. Из-за коротких времен релаксации сигналы ЭПР металлопротеинов тоже можно наблюдать только при низкой температуре, например, температуре жидкого азота или даже гелия.

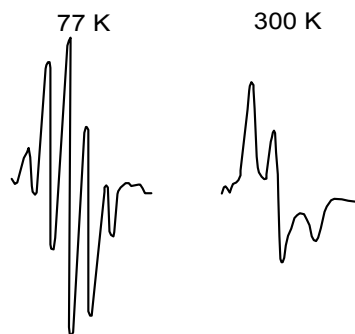


Рис. 3.6. Спектры ЭПР УФ-облученного цистеина при температуре жидкого азота (77 К) и обычной температуре (300 К)

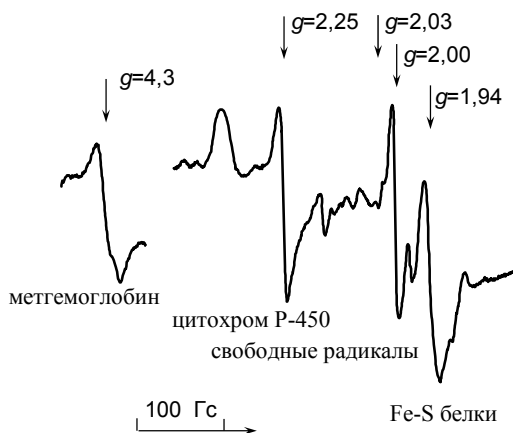


Рис. 3.7. Спектр ЭПР печени крысы (объяснение в тексте)

В качестве примера на рис. 3.7 дан спектр ЭПР печени крысы. На нем можно увидеть сигналы цитохрома Р-450, имеющие g -фактор 1,94 и 2,25, сигнал метгемоглобина с g -фактором 4,3 и сигнал свободных радикалов, принадлежащий семихинонным радикалам аскорбиновой кислоты и флавинов с g -фактором 2,00.

Впрочем, сигналы ЭПР некоторых радикалов можно наблюдать и при комнатной температуре. К таким сигналам относятся сигналы ЭПР многих семихинонных или феноксильных радикалов, таких как семихинонный радикал убихинона, феноксильный и семихинонный радикал α -токоферола (витамина Е), витамина D, и многие другие (рис. 3.8).



Рис. 3.8. Сигналы ЭПР семихинонных и феноксильных радикалов

3.5 Метод спиновых меток и зондов

Важным этапом в развитии применения метода ЭПР в биологических исследованиях стал синтез стабильных свободных радикалов. Среди таких радикалов наибольшую популярность получили нитроксильные радикалы.

Стабильность нитроксильных радикалов обусловлена пространственным экранированием группы N–O, имеющей неспаренный электрон, четырьмя метильными группами, препятствующими протеканию реакции с участием свободной валентности. Однако, такая экранировка не является абсолютной и реакция восстановления свободной валентности все-таки может происходить. Аскорбиновая кислота, например, является хорошим восстановителем нитроксильных радикалов.

Спектр ЭПР нитроксильных радикалов обычно состоит из трех линий равной интенсивности, благодаря взаимодействию неспаренного электрона с ядром атома азота (рис. 3.9).

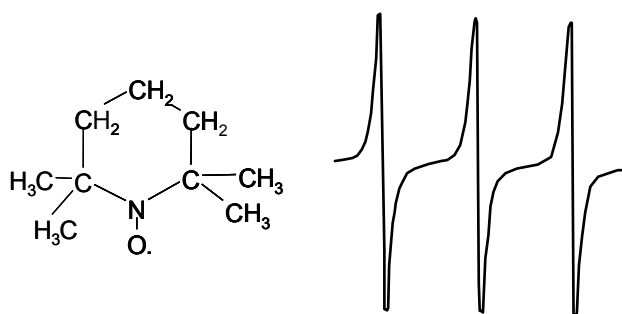


Рис. 3.9. Формула и спектр ЭПР нитроксильного радикала 2,2,6,6-тетрамил-пиперидин-1-оксил (ТЕМПО).

Оставим в стороне непростую теорию, объясняющую зависимость формы сигнала ЭПР от подвижности зонда и ограничимся весьма схематическим изложением того, что наблюдается в опытах. Если нитроксильный радикал находится в водном растворе, то его вращение является изотропным и достаточно быстрым, при этом наблюдается сигнал ЭПР, состоящий из трех узких симметричных линий (рис. 3.10, *вверху*). При уменьшении скорости вращения наблюдается уширение линий и изменению амплитуды компонент спектра (рис. 3.10, *в середине*). Дальнейшее увеличение вязкости среды приводит к еще большему изменению сигнала ЭПР спинового зонда (рис. 3.10, *внизу*).

Для количественного описания вращательного движения радикала используют понятие *времени вращательной корреляции* (τ_c). Оно равно времени поворота нитроксильного радикала на угол $\pi/2$. На основании анализа сигнала ЭПР время корреляции можно оценить, используя эмпирическое уравнение

$$\tau_c = 6,65 \cdot 10^{-10} \cdot \Delta H_{+1} \left(\sqrt{\frac{I_{+1}}{I_{-1}}} - 1 \right) \quad (0.27)$$

где ΔH_{+1} – ширина полосы спектра ЭПР при низком значении поля, а I_{+1} и I_{-1} – интенсивность высокопольной и низкопольной компоненты спектра ЭПР. Это уравнение можно использовать при времени корреляции от $5 \cdot 10^{-11}$ до 10^{-9} с.

Синтез стабильных нитроксильных радикалов семейства ТЕМПО был важным этапом в использовании метода ЭПР для изучения внутренней вязкости биологических мембран и белков решению медико-биологических задач.

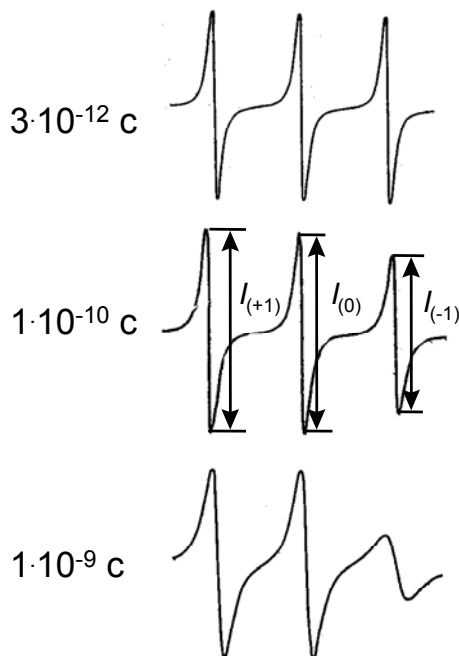


Рис. 3.10. Спектр ЭПР ТЕМПО при разных временах вращательной корреляции τ_c (цифры слева от спектров).

Однако производные ТЕМПО, имеют, к сожалению, один существенный недостаток – вследствие их амфифильности трудно бывает определить локализацию этого зонда и таким образом ответить на вопрос, где мы, собственно говоря, определяем микровязкость. Эта проблема была практически решена, когда появились так называемые «жирнокислотные спиновые зонды», т.е. соединения, в которых молекула нитроксильного радикала была ковалентно присоединена к молекуле жирной кислоты. В этом случае спектр ЭПР несомненно отражает свойства именно гидрофобной (липидной) фазы изучаемой системы, куда встраивается зонд. На рисунке 3.11 приведено схематическое строение молекулы жирнокислотного спинового зонда, 5-доксилстеарата, в которой нитроксильный радикал (доксил, соединение родственное ТЕМПО по структуре) присоединен к 5 атому углерода молекулы стеариновой кислоты. Характеристикой движения такого зонда служит величина, называемая параметром упорядоченности S , который характеризует степень асимметрии вращения зонда относительно продольной и поперечной осей его молекулы. Найти параметр упорядоченности можно из характеристик спектра ЭПР по эмпирическому уравнению

$$S = \frac{A_{\parallel} - A_{\perp}}{A_{\parallel} - 2A_{\perp}} \cdot 1,66 \quad (0.28)$$

,где A_{\parallel} и A_{\perp} – параметры, указанные на рисунке. Теоретически, параметр упорядоченности может изменяться от 0 до 1, с изменением вязкости и структурированности мембраны. При совершенно симметричном вращении, когда скорость вращения вокруг трех осей одинакова (что характерно для сферических частиц в

изотропной среде), параметр упорядоченности равен нулю. Параметр упорядоченности равен 1, если ось вращения зонда совпадает с нормалью к мембране, а вращение относительно иных осей полностью отсутствует. При низких температурах или в мембранах из синтетических насыщенных фосфолипидов, вращение зонд вращается преимущественно вокруг длинной оси молекулы, ориентированной поперек мембраны. При этом параметр упорядоченности имеет высокие значения. При уменьшении вязкости мембраны значение параметра упорядоченности уменьшается.

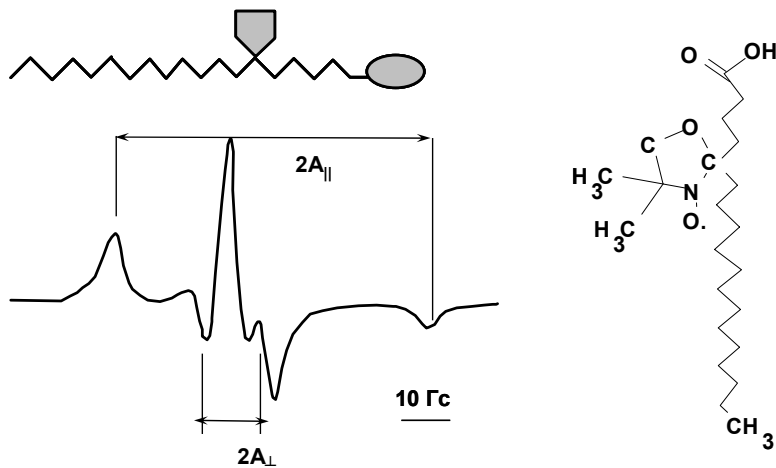


Рис. 3.11. Химическая формула и спектр ЭПР 5-доксилстеарата (объяснение в тексте)

Очень ценным качеством спиновых зондов, содержащих жирную кислоту, является возможность измерения с их помощью параметра упорядоченности на разном расстоянии от поверхности мембраны, так называемого *профиля* упорядоченности или профиля вязкости. Для этого используют набор спиновых зондов, которые представляют собой молекулы одной и той же жирной кислоты, которые содержат нитроксильный фрагмент на разном расстоянии от карбоксильной группы. Например, используются спиновые зонды с нитроксильным радикалом у 5, 7, 12 и 16 атома углерода стеариновой кислоты. Набор этих соединений позволяет измерять параметр S на расстоянии 3,5, 5, 8,5 и 10,5 ангстрем от поверхности мембраны (рис. 3.12).

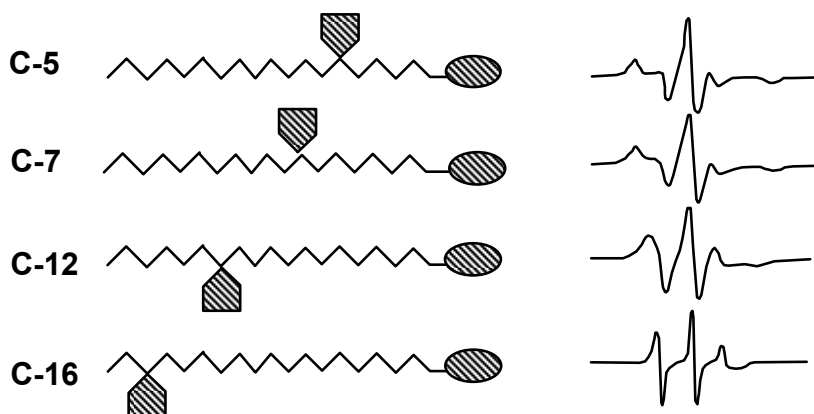


Рис. 3.12. Изменение сигнала ЭПР при удалении нитроксильного радикала от полярной карбоксильной группы жирной кислоты

Обычно спектры ЭПР спинового зонда, включенного в мембрану, и зонда, находящегося в окружающем водном растворе, могут существенно различаться. Это свойство было использовано для создания нового класса спиновых зондов, позволяющих измерять межфазный потенциал мембраны (часто называемый *поверхностным* потенциалом). Для измерения этого потенциала измеряют коэффициент распределения вода/мембрана нейтрального и заряженного зондов. Поскольку заряженный зонд взаимодействует с зарядами, расположенными на поверхности мембраны, то его коэффициент распределения будет отличаться от такового у нейтрального зонда. Отношение коэффициентов распределения служит мерой поверхностного потенциала изучаемой мембраны. Химическая формула спинового зонда, используемого для измерения поверхностного потенциала приведена на рис. 3.13.

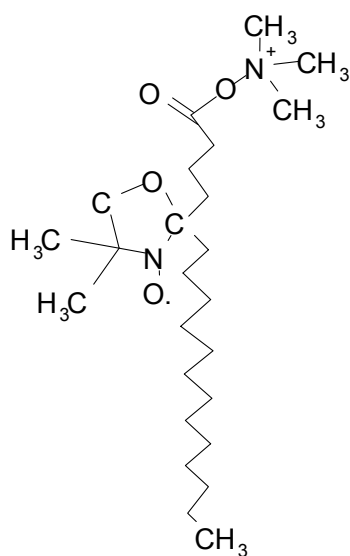


Рис. 3.13. Химическая формула заряженного спинового зонда

Еще одним важным применением метода спинового зонда является измерение рН в микрообъемах, например, внутри лизосом или фагосом клеток. Для этих целей применяют специальные рН-чувствительные спиновые зонды (рис. 3.14). В основе метода рН-метрии с применением спиновых зондов лежит способность зонда давать разные спектры ЭПР в протонированной и депротонированной формах. Таким образом, в зависимости от рК спинового зонда, существует некоторый диапазон рН в котором и происходит его протонирование и соответствующее изменение спектра ЭПР (рис. 3.15).

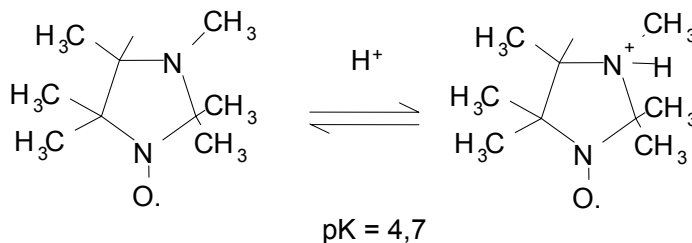


Рис. 3.14. Химические формулы рН-чувствительного спинового зонда

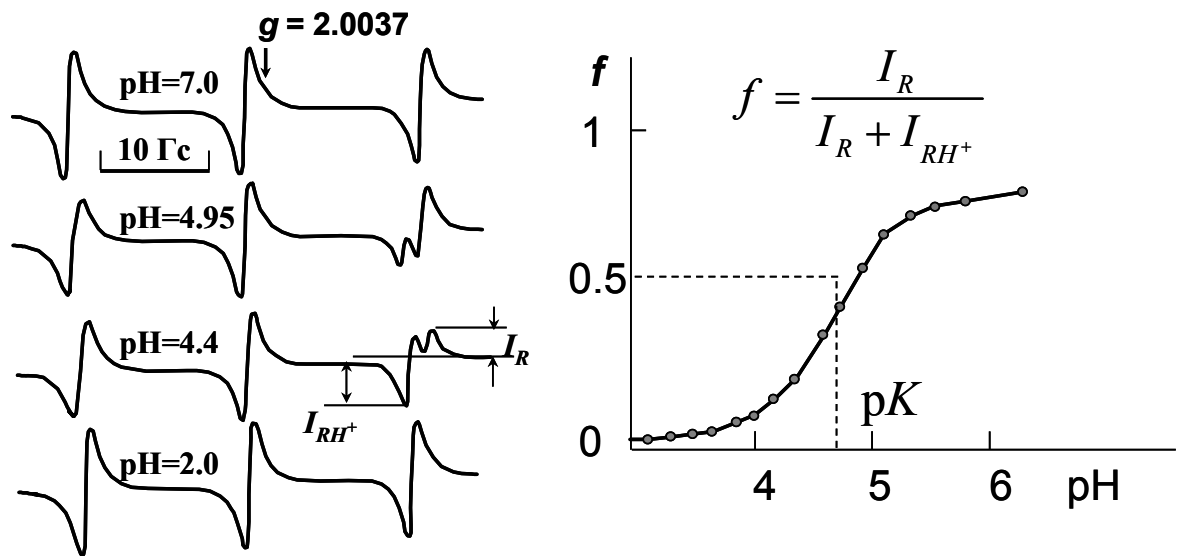


Рис. 3.15. Спектры ЭПР и зависимость концентрации депротонированного рН-чувствительного спинового зонда от рН (объяснение в тексте).

Все о чем до сих пор говорилось в данном разделе касалось *метода спиновых зондов*. Однако не менее интересным является и *метод спиновых меток*. В основе метода спиновых меток лежит тот же принцип изменения спектра ЭПР нитроксильного радикала в зависимости от скорости и изотропности его вращения. Отличием же метода является тот факт, что спиновая метка ковалентно связывается с другой более или менее крупной молекулой.

Одним из первых и удачных применений метода спиновой метки было измерение количества и доступности SH-групп белков (рис. 3.16). Химическая формула и спектр ЭПР спиновой метки, взаимодействующей с сульфгидрильными группами, в свободном состоянии и после присоединения к белку приведены на рис. 3.17.

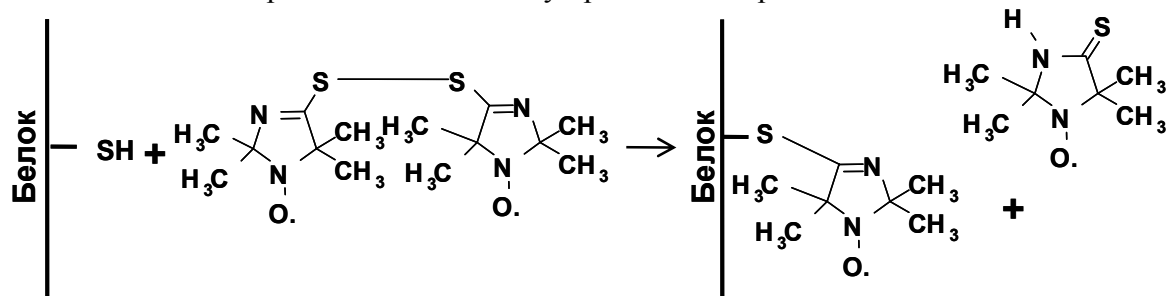


Рис. 3.16. Схема взаимодействия спинового зонда с тиоловой группой белка

Из рисунка можно видеть, что спектры ЭПР спиновой метки в свободном и связанном состоянии сильно отличаются, что связано с различием в скорости и направлении вращения. Естественно, что связанная спиновая метка имеет значительно более низкую скорость вращения, чем в свободном виде. Более того, количество связанных спиновых

меток и соответственно интенсивность сигнала ЭПР пропорциональны количеству прореагировавших со спиновой меткой сульфгидрильных групп, что позволяет определять не только подвижность зонда, но и его количество.

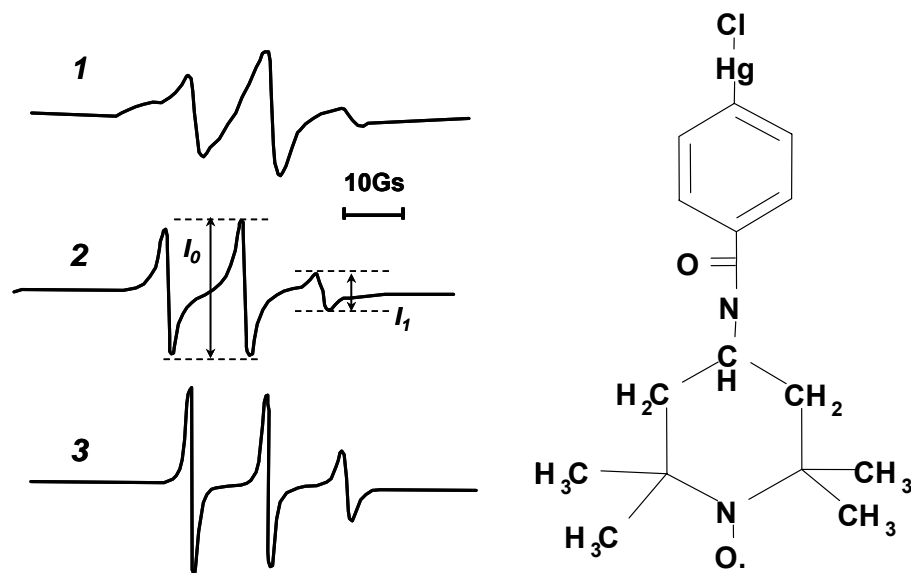


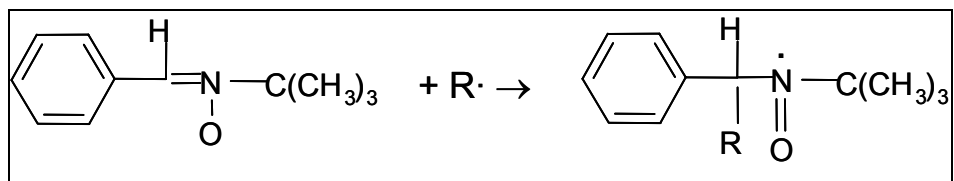
Рис. 3.17. Химическая формула спиновой метки для SH-групп и спектры ЭПР иммобилизованной (1), связанной (2) и свободной (3) спиновой метки.

В настоящее время существует множество методических приемов, позволяющих изучать топографию белковой глобулы с использованием спиновых меток. Поскольку многие ионы металлов переменной валентности являются парамагнетиками и кроме того могут находиться в активном центре фермента, то взаимодействие спиновой метки, прикрепленной, например, к остатку цистеина или гистидина белковой глобулы, с ионом металла будет приводить к уширению спектра ЭПР в результате диполь-дипольного взаимодействия парамагнетиков.

3.6 Метод спиновых ловушек

Появление нитроксильных радикалов оказалось решающим событием в решении проблемы обнаружения и исследования свободных радикалов, образующихся в живых системах. Обнаружение радикалов оказалось возможным благодаря появлению метода спиновых ловушек. Суть метода заключается в том, что некоторое соединение, не являющееся нитроксильным радикалом, но имеющее структуру близкую к нитроксильному радикалу (*спиновая ловушка*), взаимодействует со свободным, короткоживущим радикалом и превращается в долгоживущий нитроксильный радикал (*спиновый аддукт*), спектр ЭПР которого, уникален для данного радикала или семейства радикалов.

По химической природе спиновые ловушки можно отнести к двум основным классам – это нитроны и нитрозосоединения. К нитронам относятся две наиболее популярные спиновые ловушки – С-фенил-N-трет-бутил нитрон (ФБН) и 5,5-диметил-пирролин-1-оксил (ДМПО). **Реакция взаимодействия ФБН с радикалом выглядит следующим образом:**



Стабильность образующегося нитроксильного радикала ФБН (*спинового аддукта*) объясняется тем, что атом кислорода, на котором локализован неспаренный электрон, пространственно экранирован тремя метильными группами. Спиновый аддукт радикала обладает уникальным спектром ЭПР (см. рис. 3.18). При этом форма спектров ЭПР спиновых аддуктов зависит от природы присоединившегося свободного радикала (табл. 4.1). Таким образом удается проводить исследование свободнорадикальных реакций в биологических объектах методом ЭПР при физиологических температурах.

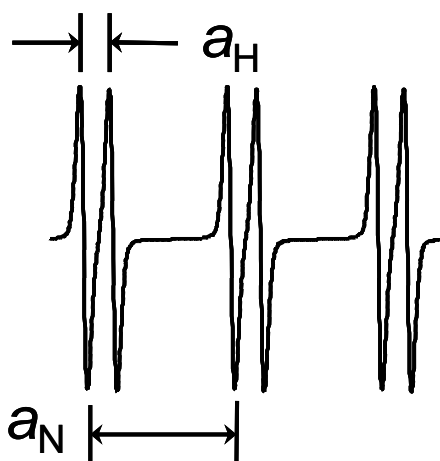


Рис. 3.18. Спектр ЭПР спинового аддукта и значения констант сверхтонкого расщепления для некоторых радикалов.

a_H и a_N – константы сверхтонкого расщепления на протоне и атоме азота соответственно

a_N (Гс)	a_H (Гс)	Радикал
14,8	2,7	$\cdot O_2^-$
15,3	3,2	HO \cdot
16,1	3,3	LO \cdot

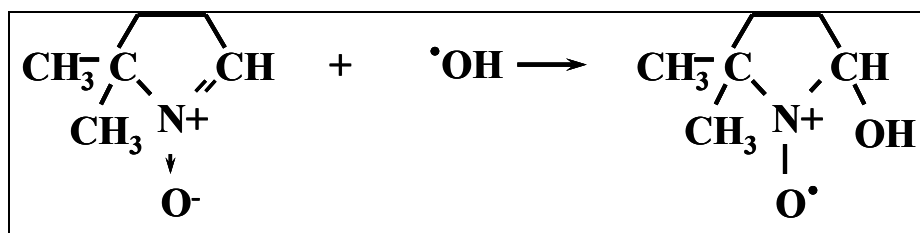


Рис. 3.19. Схема реакции спиновой ловушки ДМПО и ОН радикала.

На рис. 3.19 показана реакция другой спиновой ловушки, ДМПО с гидроксильным радикалом и образование спинового аддукта этого радикала. Опять-таки, измеряя константы сверхтонкого расщепления спектра спинового аддукта можно идентифицировать короткоживущий радикал.

Метод спиновых ловушек занимает одно из важнейших мест в медико-биологических исследованиях, т.к. позволяет обнаруживать и идентифицировать радикалы, образующиеся в живых клетках и тканях. Среди таких радикалов следует отметить супероксидный и гидроксильный радикалы, а также оксид азота. Кроме того, применение метода спиновых ловушек дает возможность изучать антиоксидантные свойства веществ и величину антиоксидантного резерва.

Рекомендуемая литература.

1. Дж. Вертц и Дж. Болтон, Теория и практические приложения метода ЭПР, Москва: Мир, 1975.
2. Современные методы биофизических исследований. Практикум по биофизике, под редакцией А.Б. Рубина, Москва: Высшая школа, 1988.
3. Метод спиновых меток. Теория и применение, под редакцией Л. Берлинера, Москва: Мир, 1979.
4. А.Н. Кузнецов, Метод спинового зонда, Москва: Наука, 1976.
5. В.Е. Зубарев, Метод спиновых ловушек, Москва: Издательство МГУ, 1984.