

Лекция 9 МЕТОДЫ, ОСНОВАННЫЕ НА ВЗАИМОДЕЙСТВИИ ВЕЩЕСТВ С МАГНИТНЫМ ПОЛЕМ

- 1 Электронный парамагнитный резонанс
- 2 Ядерный магнитный резонанс
- 3 Масс-спектроскопия

Большинство элементарных частиц, подобно волчкам, вращаются вокруг собственной оси. Если частица обладает электрическим зарядом, то при ее вращении возникает магнитное поле, т.е. она ведет себя подобно крошечному магниту. При взаимодействии этого магнита с внешним магнитным полем происходят явления, позволяющие получить информацию о ядрах, атомах или молекулах, в состав которых входит данная элементарная частица. Метод магнитного резонанса представляет собой универсальный инструмент исследований, применяемый в столь различных областях науки, как биология, химия, геология и физика. Различают магнитные резонансы двух основных видов: электронный парамагнитный резонанс (ЭПР) и ядерный магнитный резонанс (ЯМР). Оба явления основаны на эффекте Зеемана, заключающемся в расщеплении спектральных линий или уровней энергии в магнитном поле на отдельные компоненты.

1 Электронный парамагнитный резонанс

ЭПР был открыт в 1944 русским физиком Е.К.Завойским. Этот метод применяется для исследования соединений, обладающих *парамагнитными* свойствами, т. е. соединений, магнитный момент которых обусловлен неспаренными электронами. Магнитным моментом могут обладать ионы переходных металлов и их комплексы, свободные радикалы и соединения в возбужденном состоянии.

Принцип метода. Электроны обладают зарядом и механическим моментом вращения (спином) и тем самым ведут себя подобно магнитам, а точнее, обладают магнитным моментом. Во внешнем магнитном поле магнитные моменты электронов могут быть ориентированы по направлению ($m_s = -1/2$) магнитного поля или антипараллельно ему ($m_s = 1/2$). Первая ориентация отвечает более низкому энергетическому состоянию, чем вторая. Переход электрона в более высокое энергетическое состояние с антипараллельным спином происходит при наложении магнитного поля и поглощении определенного кванта энергии:

$$h\nu = g\beta H \quad (1)$$

где h – постоянная Планка,

ν – частота электромагнитного поля,
 g – константа, *фактор спектроскопического расщепления*, *g-фактор*
 β – магнитный момент электрона, называемый *магнетон Бора*,
 H – напряженность внешнего магнитного поля.

У свободного электрона магнитный момент равен одному магнетону Бора, а g -фактор равен 2,0023.

Если в магнитном поле с напряженностью 1Т (тесл) = 10^4 Гс (Гаусс) поглощаемая электромагнитная энергия лежит в *микроволновом диапазоне* ($\lambda = 10^{-3} \text{ м} - 1 \text{ м}$), то такое явление поглощения энергии называется электронным парамагнитным резонансом (ЭПР).

Из приведенной выше формулы видно, что частота поглощаемого микроволнового излучения зависит от парамагнетизма образца (β) и напряженности внешнего магнитного поля (H). Обычно частоту поля поддерживают постоянной и снимают зависимость поглощения от напряженности магнитного поля. Поглощение регистрируется в виде пика ЭПР, спектр которого соответствует парамагнетизму образца. Площадь пика зависит от концентрации неспаренных электронов в образце; ее можно определить, если предварительно снять спектр образца, содержащего неспаренные электроны известной концентрации.

Спин-решеточное взаимодействие, т. е. взаимодействие неспаренного электрона с остальной частью молекулы, уширяет пики поглощения на спектрах ЭПР. Величина такого уширения также дает информацию о структуре молекул.

Взаимодействие спинов электронов и ядра вызывает так называемое *сверхтонкое расщепление* спектров ЭПР на отдельные компоненты, обусловленное этим взаимодействием. Сверхтонкое расщепление дает ценную информацию о природе связи, электронной структуре и т.д.

Оборудование. Схематически устройство спектрометра ЭПР приведено на рис. 1. В этих приборах применяют постоянные электромагниты, дающие поле 50 - 500 мТ (миллитесла) с точностью 10^{-6} . Как правило, используют электромагнит, дающий постоянное поле 330 мТ, и варьруют его в пределах 10-100 мТ при помощи дополнительного *свин-магнита*. Клистроновый осциллятор генерирует электромагнитное излучение в сантиметровом диапазоне, обычная длина волны составляет $3 \cdot 10^{-2}$ м (частота 9000 МГц). Образец должен находиться в твердом состоянии, поэтому биологические объекты замораживают в жидком азоте.

Для удобства анализа спектр представляют не только в виде зависимости интенсивности поглощения от напряженности поля (рис. 2,а), но и в виде первой производной поглощения dA/dH от напряженности поля. Поэтому он представляет собой не набор симметричных пиков, а имеет вид, приведенный на рис. 2,б.

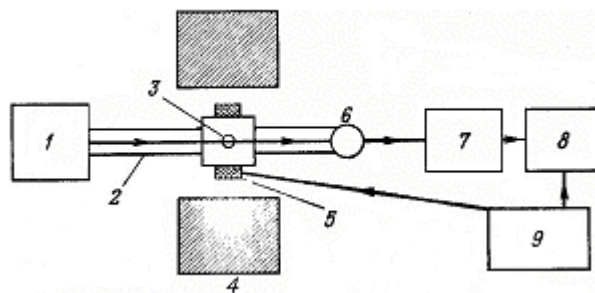


Рис. 1. Схема устройства спектрометра электронного парамагнитного резонанса: 1 – клистрон; 2 – металлический волновод; 3 – полость для образца; 4 – основной магнит; 5 – дополнительный магнит; 6 – кристаллический детектор; 7 – усилитель; 8 – самописец; 9 – осциллятор

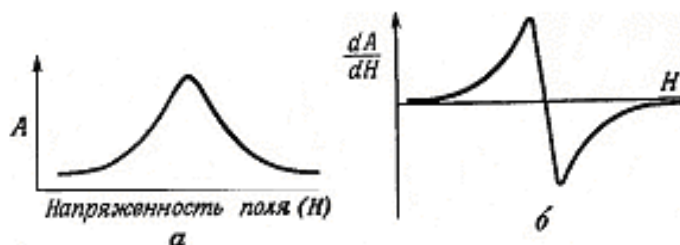


Рис. 2. Спектры ЭПР: зависимость поглощения A от напряженности поля H (а) и зависимость первой производной поглощения (dA/dH) от магнитного поля H (б)

Применение. Электронный парамагнитный резонанс – один из основных методов, применяемых при изучении металлоферментов, особенно тех, которые содержат молибден (ксантиноксидаза), медь (цитохромоксидаза) и железо (цитохромы, ферредоксин). Оба элемента, медь и не входящее в состав гема железо, не поглощают видимый и ультрафиолетовый свет, а в одном из своих окисленных состояний дают пики на спектрах ЭПР. Появление или исчезновение их сигналов ЭПР позволяет изучать роль этих элементов в работе многоферментных систем интактных митохондрий и хлоропластов, а также изолированных ферментов.

В металлоферментах атомы металлов имеют определенное число лигандов, расположенных по отношению к ним специфическим образом. Такими лигандами обычно являются аминокислотные остатки белков. Применение ЭПР убедительно показало, что пространственное расположение лигандов в металлоферментах часто отличается от того, которое получается в модельных системах. Возможно, такие отличия связаны с определенной биологической функцией металлоферментов.

Применение метода ЭПР расширилось с использованием *спиновой метки* – методики, состоящей в том, что стабильный

нереакционноспособный свободный радикал присоединяют к биологической макромолекуле, которая не имеет неспаренных электронов. Так, пометив стабильным радикалом нитроксидом глицерофосфатиды, удалось исследовать их диффузию в мембранах, а также их «перескакивание» между наружной и внутренней поверхностями бислоя липидов.

Электронный парамагнитный резонанс широко применяется для исследования свободных радикалов, возникающих под действием облучения. Наконец, в настоящее время появился новый метод, являющийся мощным орудием для изучения структур молекул – ДЭЯР (двойной электронно-ядерный резонанс), объединяющий ЭПР и ЯМР.

2 Ядерный магнитный резонанс

Этим методом регистрируют атомы, ядра которых обладают магнитным моментом. Это, как правило, атомы, имеющие нечетный заряд ядер, т. е. содержащие в ядре нечетное число протонов. Явление ЯМР открыли в 1946 г. американские физики Ф. Блох и Е. Перселл.

Принцип метода. Протоны обладают спином и зарядом, они, как и электроны, имеют магнитный момент, но у ядер он примерно в 2000 раз меньше, чем у электронов. Если элемент обладает нечетным порядковым номером или изотоп какого-либо (даже четного) элемента имеет нечетное массовое число, ядро такого элемента (изотопа) обладает спином, отличным от нуля. Очевидно, у изотопов четных элементов с четным массовым числом спин от нуля не отличается. Например, изотоп углерода ^{12}C с массовым числом 12 спином не обладает, а изотоп ^{13}C имеет спин, равный $1/2$. Наличие неспаренного спина у ^{13}C вызывает появление у него ядерного магнитного момента, в то время как ядра изотопов ^{12}C магнитного момента не имеют. В соответствии с этим внешнее магнитное поле не будет оказывать влияния на хаотическое распределение по энергии ядер ^{12}C , но будет влиять на распределение ядер ^{13}C , снимая вырождение энергетических уровней. Большинство исследований проводится с самым легким изотопом – протоном ^1H , в этом случае принято говорить о протонном магнитном резонансе (ПМР). В биохимических исследованиях используется также резонансное поглощение ядер ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F и ^{31}P , спин которых равен $1/2$. Ядра других элементов, часто встречающихся в биологических объектах, такие, как ^{12}C , ^{16}O и ^{32}S , имеют нулевой спин, поэтому не имеют магнитного момента, а, следовательно, не дают сигналов ЯМР.

В магнитном поле ядро со спином $1/2$ может находиться в двух состояниях; в одном из них магнитный момент направлен параллельно

полю, а в другом – антипараллельно. Антипараллельное расположение магнитного момента отвечает более высокоэнергетическому состоянию ядра. Переориентация магнитного момента ядра от параллельного к антипараллельному сопровождается резонансным поглощением электромагнитной энергии:

$$\Delta E = h \nu = 2 \mu H \quad (2)$$

где μ – магнитный момент ядра

H – напряженность внешнего поля

Если в магнитном поле напряженностью несколько сотен миллитесел (несколько тысяч гаусс) резонансное поглощение ядер происходит в **радиодиапазоне электромагнитных колебаний** ($\lambda > 1 \text{ м}$), то это явление называется **ядерным магнитным резонансом (ЯМР)**.

Из возбужденного состояния в нормальное ядра могут возвращаться, передавая энергию возбуждения окружающей среде – «*решетке*», под которой в данном случае понимаются электроны или атомы другого сорта, чем исследуемые. Этот механизм передачи энергии называют спин-решеточной релаксацией, его эффективность может быть охарактеризована постоянной T_1 , называемой *временем спин-решеточной релаксации*. Возбужденное ядро может также передать энергию возбуждения ядру такого же сорта, находящемуся в низшем энергетическом состоянии. Этот процесс называют *спин-спиновой релаксацией* и характеризуют величиной T_2 – *временем спин-спиновой релаксации*. Кроме постоянных T_1 и T_2 в практике используют и другие характеристики резонансного поглощения.

Совокупность сигналов ЯМР, т. е. зависимость интенсивности поглощения от напряженности магнитного поля (или от частоты), называют обычно спектром ЯМР (рис.3).

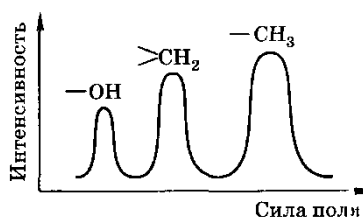


Рис. 3. Спектр ЯМР этанола

Основными его характеристиками являются высота (максимальная интенсивность) и ширина, измеренная на половине максимальной высоты сигнала. Ширина сигнала зависит от индивидуальных особенностей, структуры, агрегатного состояния вещества и других факторов. Теория ЯМР связывает ширину сигнала ($\Delta\nu$) с временем

спин-решеточной и спин-спиновой релаксации следующим соотношением:

$$\Delta\nu = 1/2\pi T_1 + 1/2\pi T_2 \quad (3)$$

Истинная напряженность магнитного поля, в котором находится ядро, зависит от его окружения и отличается от напряженности, создаваемой внешним электромагнитом. Это обусловлено тем, что при движении электронов, окружающих атомное ядро, создаются локальные магнитные поля, напряженность которых составляет $(15-20) \cdot 10^{-4}$ Т. Когда равнодействующая локальных магнитных полей направлена против внешнего поля, эффективная напряженность поля у каждого ядра будет ниже, чем внешнее магнитное поле. В этом случае говорят о **диамагнитном экранировании**. Экранирование тем слабее, чем сильнее притягиваются электроны соседними ядрами. В том случае, когда результирующая локальных полей направлена по внешнему полю, резонансный переход происходит при меньшем значении напряженности поля, поэтому говорят о **дезэкранировании**. В результате резонанс одних и тех же ядер в разных химических группах наблюдается при разных частотах, их полосы смещены одна относительно другой. Это смещение измеряется относительно сигнала некоего стандартного соединения и называется **химическим сдвигом**. В ПМР-спектроскопии в органических растворителях таким стандартным спектром является сигнал сильно экранированного протона тетраметилсилана, $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$. Химический сдвиг выражается обычно в безразмерных единицах – миллионных долях. Шкала современных спектрометров прокалибрована в единицах τ . По этой шкале пик $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$ наблюдается при $\tau = 10$, т. е. основные сдвиги происходят между $\tau = 0 - 10$. По интенсивности пиков, т. е. по их площади можно оценить относительное число протонов ^1H в каждой химической группе.

Как и спектры ЭПР, спектры ЯМР широко применяются для анализа химических структур. Величина химического сдвига позволяет идентифицировать отдельные химические группы соединения, а интенсивность линий Спектров ЯМР дает количественное соотношение таких групп. Сверхтонкая структура спектров ЯМР содержит информацию об окружении ядер, а величина сверхтонкого расщепления позволяет выяснить пространственное расположение различных групп в молекуле. Но как и спектры ЭПР и ИК- спектры, ЯМР-спектры очень сложны, и их анализ требует кропотливой и тщательной работы.

Оборудование. На рис. 4 схематически изображено устройство спектрометра ЯМР. Для создания постоянного магнитного поля

напряженностью 1-10 Т используются электромагниты весом 10^3 – 10^4 кг. Для изменения магнитного поля в пределах 10^{-2} Т применяют дополнительный *сви́п-электромагнит*.

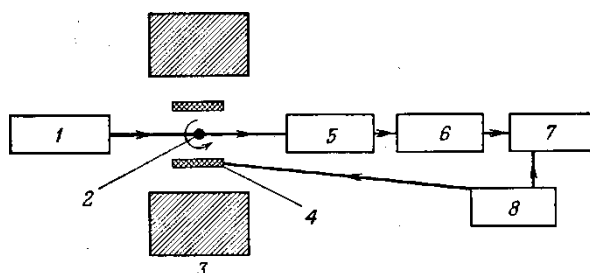


Рис. 4. Схема устройства спектрометра ядерного магнитного резонанса: 1 – источник радиоволн; 2 – образец; 3 – основной магнит; 4 – сви́п-магнит; 5 – радиоприемник; 6 – усилитель; 7 – самописец; 8 – сви́п-генератор

В качестве источника электромагнитных колебаний используется радиочастотный источник. Образец в высокой концентрации растворяют в растворителе, не содержащем протонов, например D_2O или $CDCl_3$. Для сведения к минимуму влияния колебаний магнитного поля образец помещают в трубку очень точного размера и быстро вращают ее. Поглощение регистрируется радиоприемником, усиливается и записывается на самописце.

Для расшифровки сложных спектров ЯМР применяются *вычислительные машины*, в которые вводят данные по 10^1 – 10^3 спектрам одного и того же образца. Машина эти данные сравнивает и дает средний спектр. Такие ЭВМ-приставки незаменимы при исследовании слабопоглощающих биологических образцов.

Применение. ЯМР-спектроскопия используется в основном для изучения структуры относительно простых органических молекул. Так, при помощи ЯМР удалось исследовать структуру антибиотиков грамицидина и валиномицина и связать ее с их биологической функцией. С помощью ЯМР-спектроскопии были исследованы влияние аламетицина и холестерина на подвижность лецитина в искусственных и эритроцитарных мембранах, а также относительная подвижность различных частей боковых цепей жирных кислот лецитина в двойном липидном слое.

При применении ЯМР для изучения биологических макромолекул приходится сталкиваться с рядом трудностей. Такие биополимеры, как белки, содержат несколько сотен и даже тысяч протонов, резонансное поглощение которых лежит в узкой области спектра. Применять ЯМР и биологии стало возможно только с появлением высокоразрешающего

оборудования с привлечением вычислительной техники. Но даже в этом случае полную сверхтонкую структуру удастся получить лишь для молекул, мол. вес которых не превышает 20 000. Так, при изучении механизма катализа рибонуклеазы при помощи ЯМР удалось идентифицировать протонный резонанс от четырех гистидиновых остатков молекул. Это оказалось возможным благодаря тому, что их сигналы были сильно сдвинуты относительно основной массы пиков. Более того, было показано, что два из четырех протонов находятся в каталитическом центре фермента. В действительности это уже было известно из химических данных и рентгеноструктурного анализа, однако полученные результаты являются показателем возможностей ЯМР. Основное преимущество ЯМР перед рентгеноструктурным анализом состоит в том, что при помощи этого метода можно следить за конформационными изменениями.

3 Масс-спектрометрия

Масс-спектрометрические методы иногда позволяют получить полное представление о структуре молекул. Применение их в биохимии особенно ценно, поскольку для эксперимента требуется всего 10^{-9} – 10^{-6} г. вещества.

Масс-спектр – это набор пиков разной высоты, соответствующих ионам разной массы, поэтому он не похож ни на один из приведенных в этом разделе электромагнитных спектров. К сожалению, при масс-спектроскопическом анализе образец разрушается, но это не большой недостаток метода, поскольку, потребляется весьма незначительное количество вещества.

Принцип метода. Первым шагом в масс-спектрометрическом опыте является ионизация вещества; при ионизации наряду с *ионами исходного соединения* образуются *ионизованные «осколки»* меньшего молекулярного веса. Как правило, все ионы заряжены положительно, а разделяются они по величине *отношения массы к заряду (m/e)*. Большинство образующихся ионов *однозарядны*, т. е. молекулы всех соединений теряют по одному электрону, поэтому ионы различаются только по массе. *Степень фрагментации* молекул при бомбардировке их электронами определяется энергией электронов. Органические молекулы обычно ионизуют, бомбардируя их пучком электронов в вакууме (*электронная бомбардировка*). Можно ионизовать вещество, поместив его в сильное электрическое поле (*полевая ионизация*) или облучая ультрафиолетовым светом (*фотоионизация*). Способ, которым фрагментируется соединение, и, следовательно, его масс-спектр, является индивидуальной характеристикой каждого вещества (можно

провести аналогию с характерными ИК- и ЯМР-спектрами – своеобразными «отпечатками пальцев»). С помощью масс-спектра можно затем установить структуру молекулы. Масс-спектры различных соединений собраны в виде каталога, который упрощает расшифровку масс-спектров неизвестных соединений. Для этого в настоящее время используются также вычислительные машины.

Масс-спектр представляет собой ряд пиков или линий, расположенных в соответствии с m/e получающихся осколочных ионов. Высота пика соответствует количеству данного вида ионов. Для калибровки горизонтальной оси по массам используется ион, m/e которого соответствует m/e исходного иона. Исходный ион на масс-спектре представлен пиком, отвечающим наибольшей массе (основной пик); однако этот ион вовсе не является преобладающим. Интенсивность линий в масс-спектре обычно выражают в процентах по отношению к интенсивности основного пика.

Оборудование. На рис. 5 схематически представлено устройство масс-спектрометра с необходимой для высокого разрешения двойной фокусировкой. В приборах с одинарной фокусировкой изменяется только магнитное поле, а электростатическое остается постоянным.

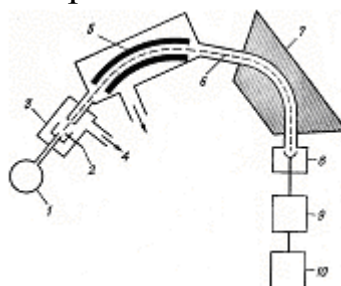


Рис. 5 Схема устройства масс-спектрометра: 1 – резервуар с парами образца; 2 – твердый образец; 3 – ионизационная камера; 4 – к вакуумному насосу; 5 – электростатическое поле; 6 – траектория иона; 7 – магнит; 8 – детектор; 9 – усилитель; 10 – самописец

Исследования необходимо проводить в высоком вакууме; это обеспечивает минимальное столкновение исследуемых ионов с молекулами газа, что уменьшает потери ионов и предотвращает образование побочных продуктов.

Очень важным фактором для масс-спектрометрического исследования соединения является давление его паров при температуре ионного источника. Если соединение при 100–200°C имеет давление паров около 1,3 Па, его можно поместить в резервуар, связанный с ионизационной камерой. Из-за разности давлений между парами образца в резервуаре и ионизационной камере (в ней поддерживается

вакуум 10^{-5} Па) молекулы образца через небольшую диафрагму поступают в ионизационную камеру.

Разделение ионов в анализаторе в соответствии с величинами их m/e происходит следующим образом. Сначала ионы ускоряются в вакууме с помощью ряда отрицательно заряженных пластин, а затем попадают в магнитное поле, где отклоняются от своей первоначальной траектории. Для ионов, имеющих одинаковый заряд, отклонение зависит только от массы, поэтому легкие ионы отклоняются сильнее.

Детектором обычно служит простой электрод (чаша Фарадея) или электронный умножитель. Ионный ток затем усиливается и регистрируется. Поскольку один масс-спектр содержит целый набор пиков сильно различающейся интенсивности, спектры регистрируют с разной чувствительностью, меняющейся обычно в 300 раз. Такой способ обеспечивает наиболее точную регистрацию всех пиков.

Применение. Впервые масс-спектрометрия в биохимии была применена для изучения метаболических процессов. Вещества, меченные с помощью необычных изотопов, например ^{15}N или ^{18}O , вводили в рацион животных и затем исследовали конечные продукты их метаболизма. Сравнивая непосредственно интенсивности спектров самих метаболитов, содержащих обычный и необычный изотопы, или продуктов их деградации, определяли относительное содержание изотопа (отношение количества необычного изотопа к обычному) в различных продуктах метаболизма. В тех случаях, когда это возможно, метаболические процессы, однако, лучше исследовать более простым и дешевым способом – с помощью радиоактивных изотопов.

В биохимии, как и в физической химии, масс-спектрометрия применяется в основном для определения структуры молекул и, следовательно, идентификации веществ, т. е. для качественного анализа относительно сложных органических молекул. Зная точный молекулярный вес органической молекулы, можно определить ее элементарный состав, имея таблицы точных масс атомов. Для правильной интерпретации данных по масс-спектрометрии очень важно, чтобы исследуемое вещество было чистым, поэтому целесообразно объединять масс-спектрометр с газожидкостным хроматографом.

В настоящее время масс-спектрометры применяются для анализа последовательности аминокислот в олигопептидах, получающихся в результате гидролиза белков. Пептидные связи легко расщепляются при бомбардировке их электронами.