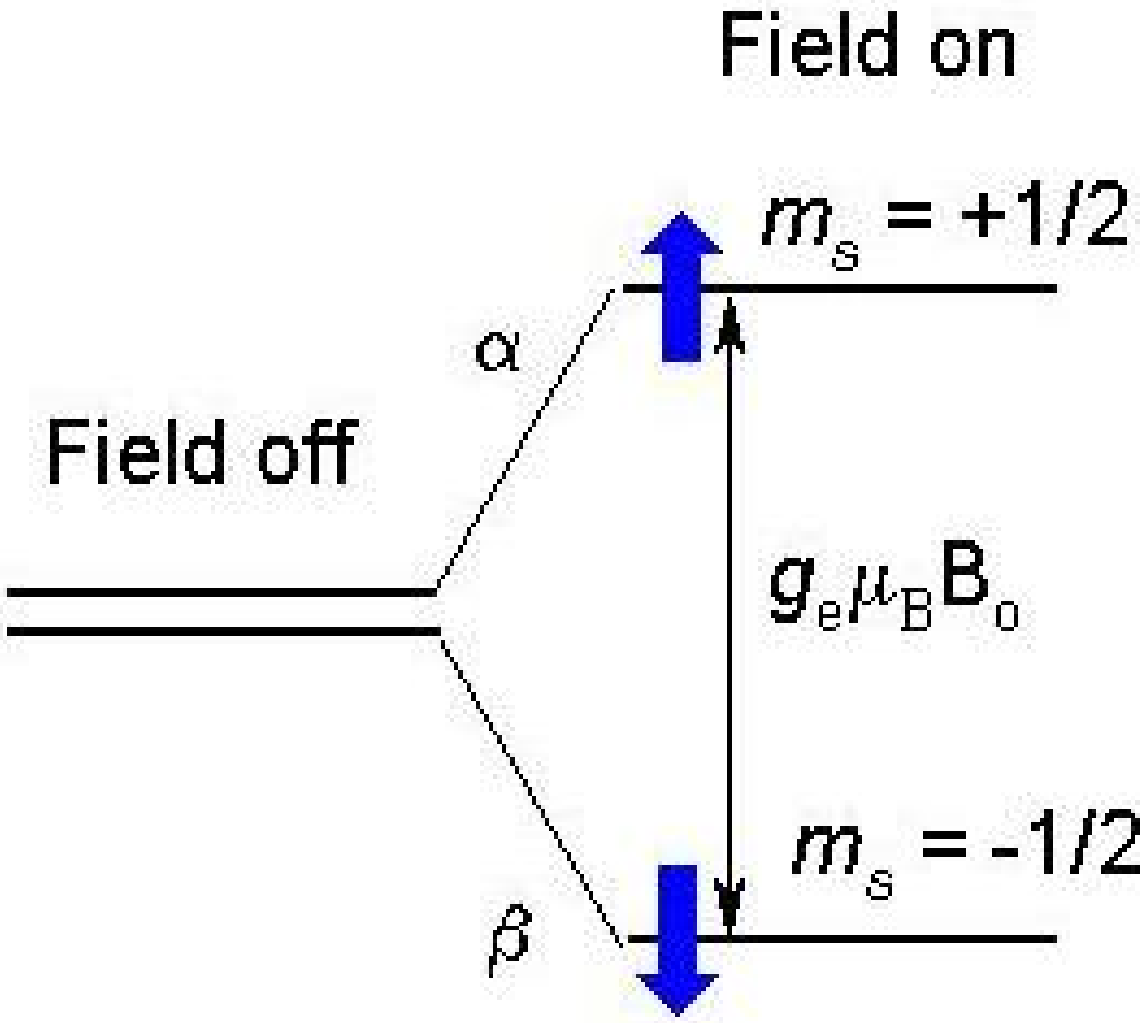
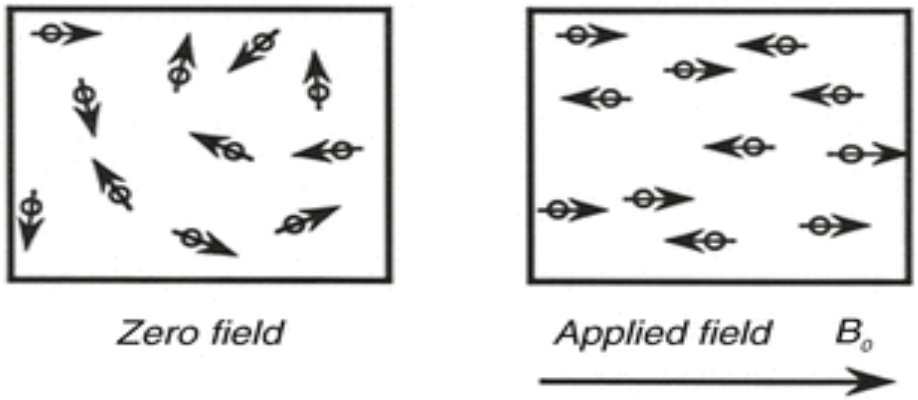
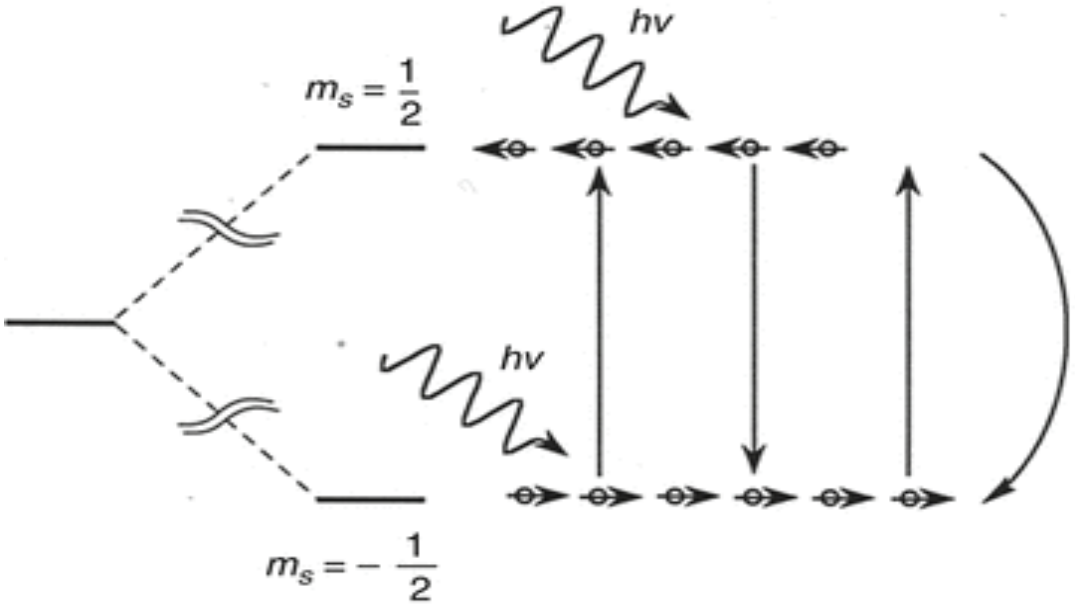
Лекция 5
Методы радиоспектроскопии: ЭПР и ЯМР

Электронный парамагнитный резонанс (ЭПР)

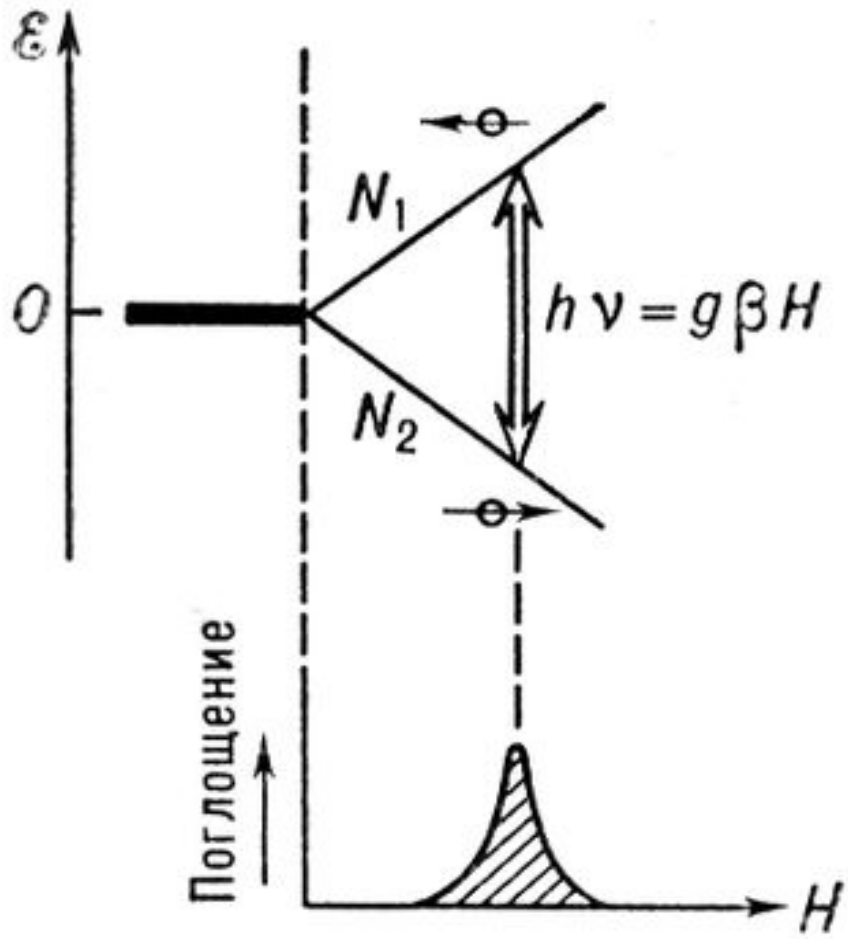


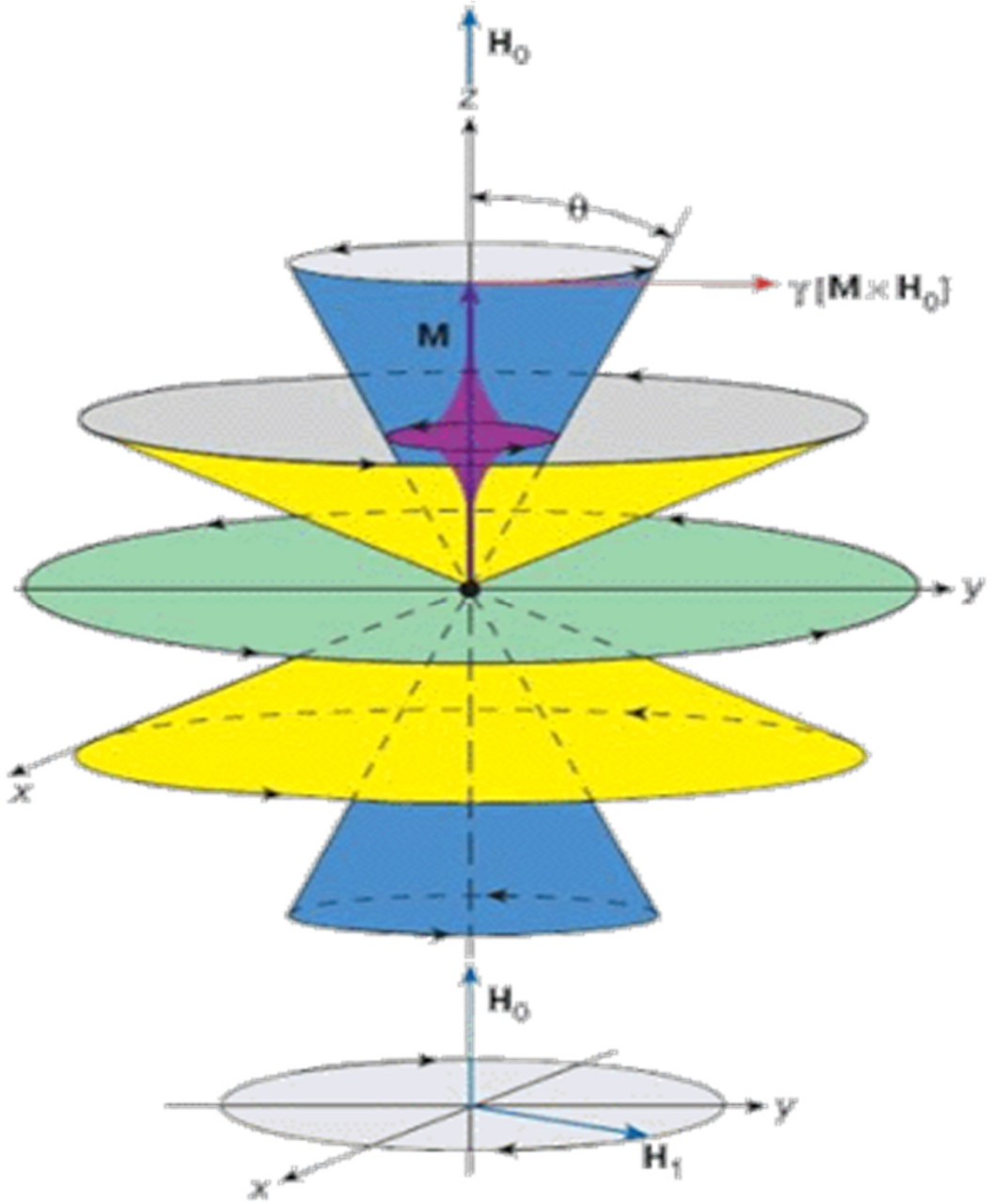
Ориентация спиновых моментов в магнитном поле

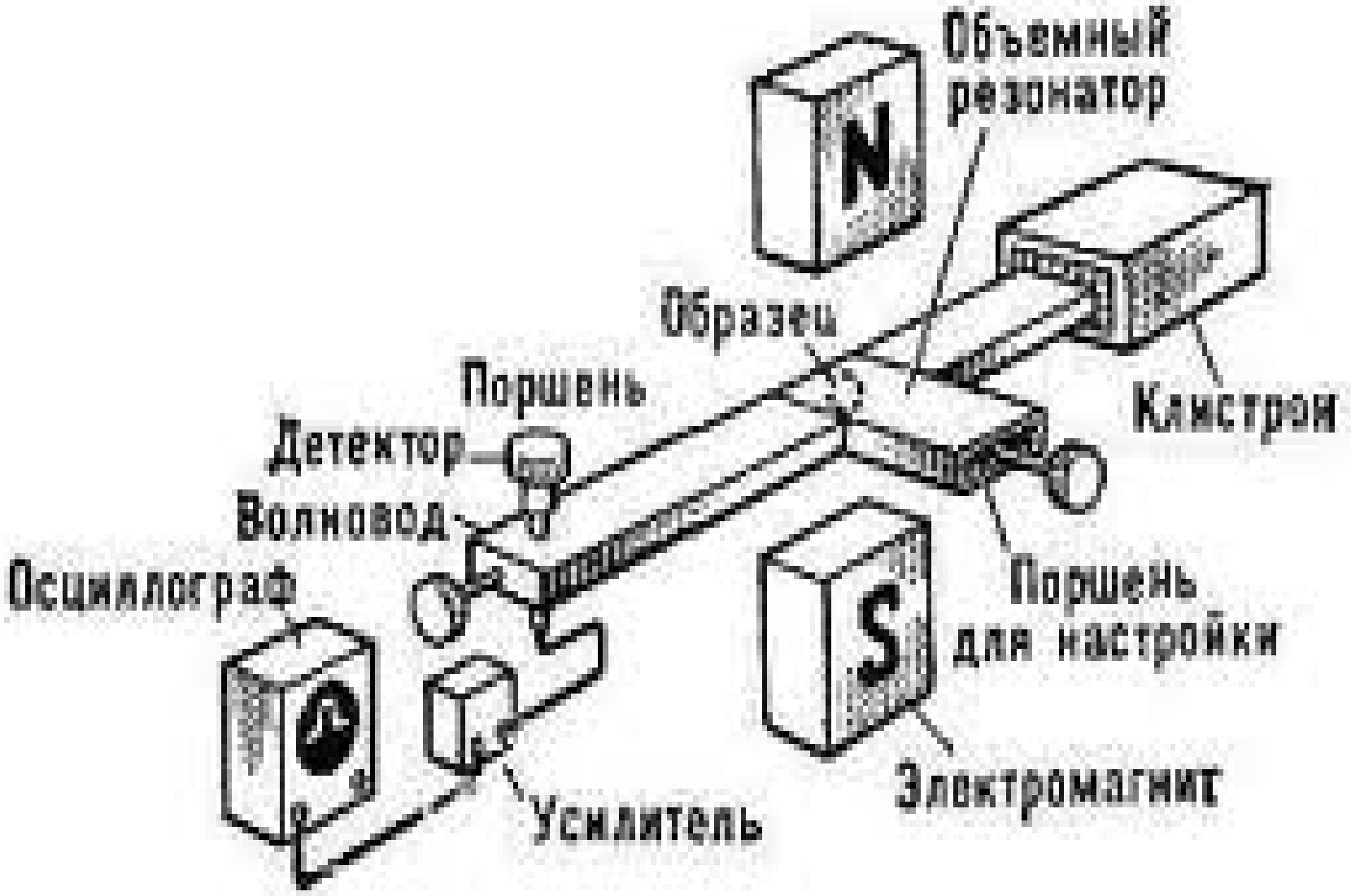




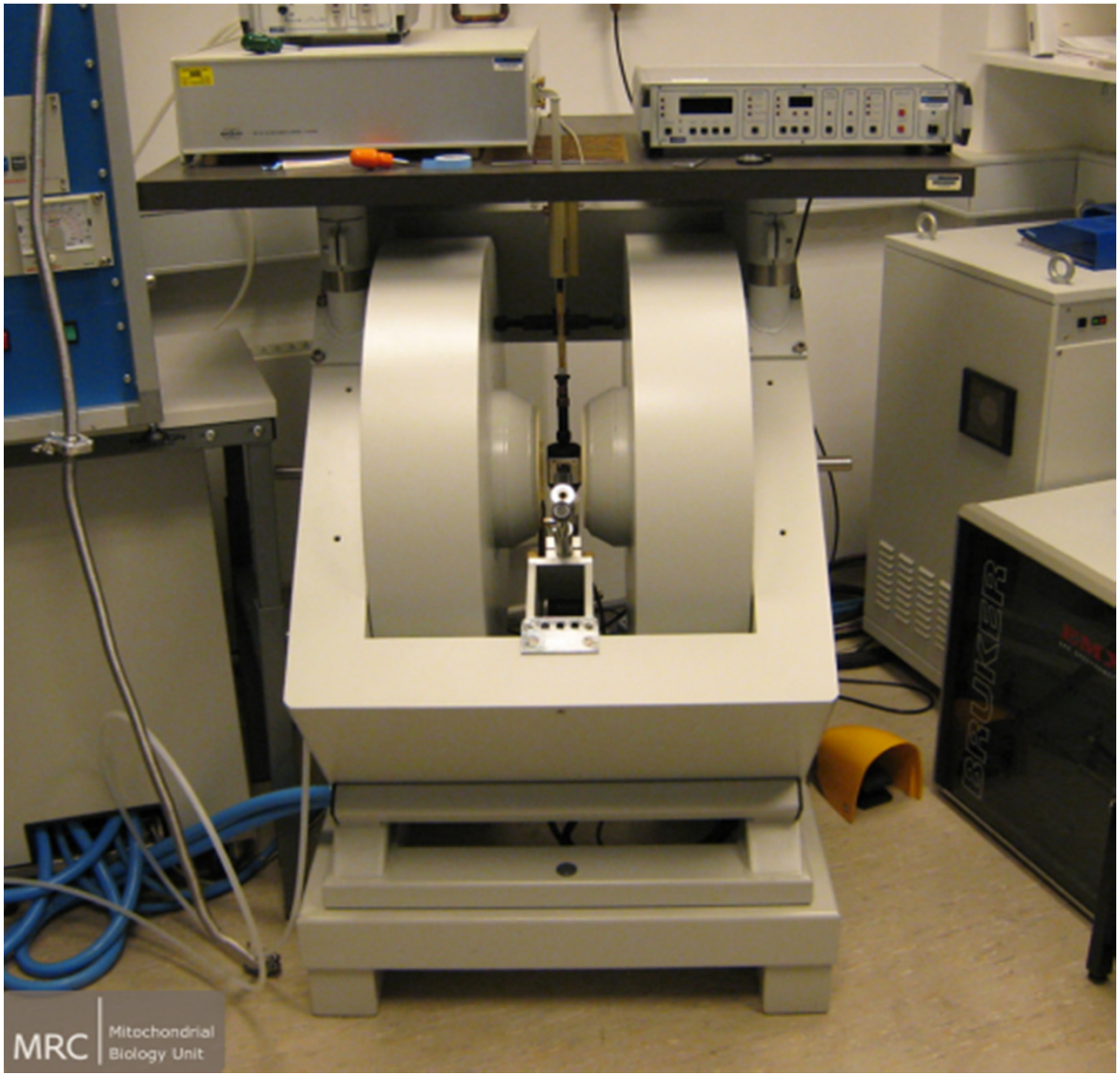
Электронный парамагнитный резонанс (ЭПР)



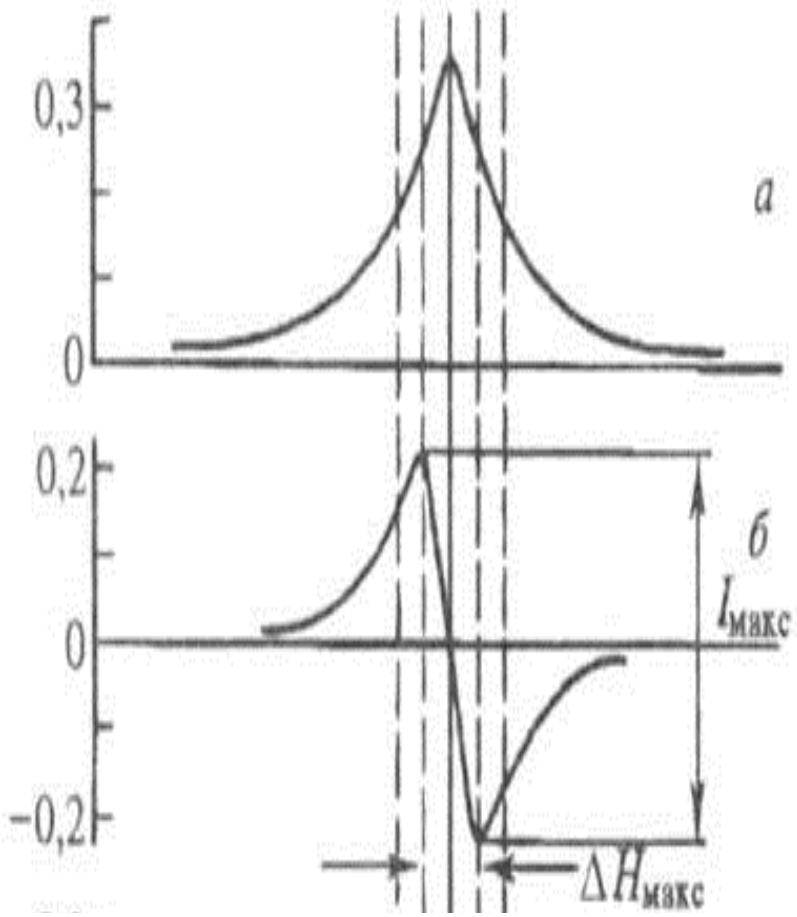

H0
z
θ
γ[M×H0]
M
y
x
H0
y
H1
x

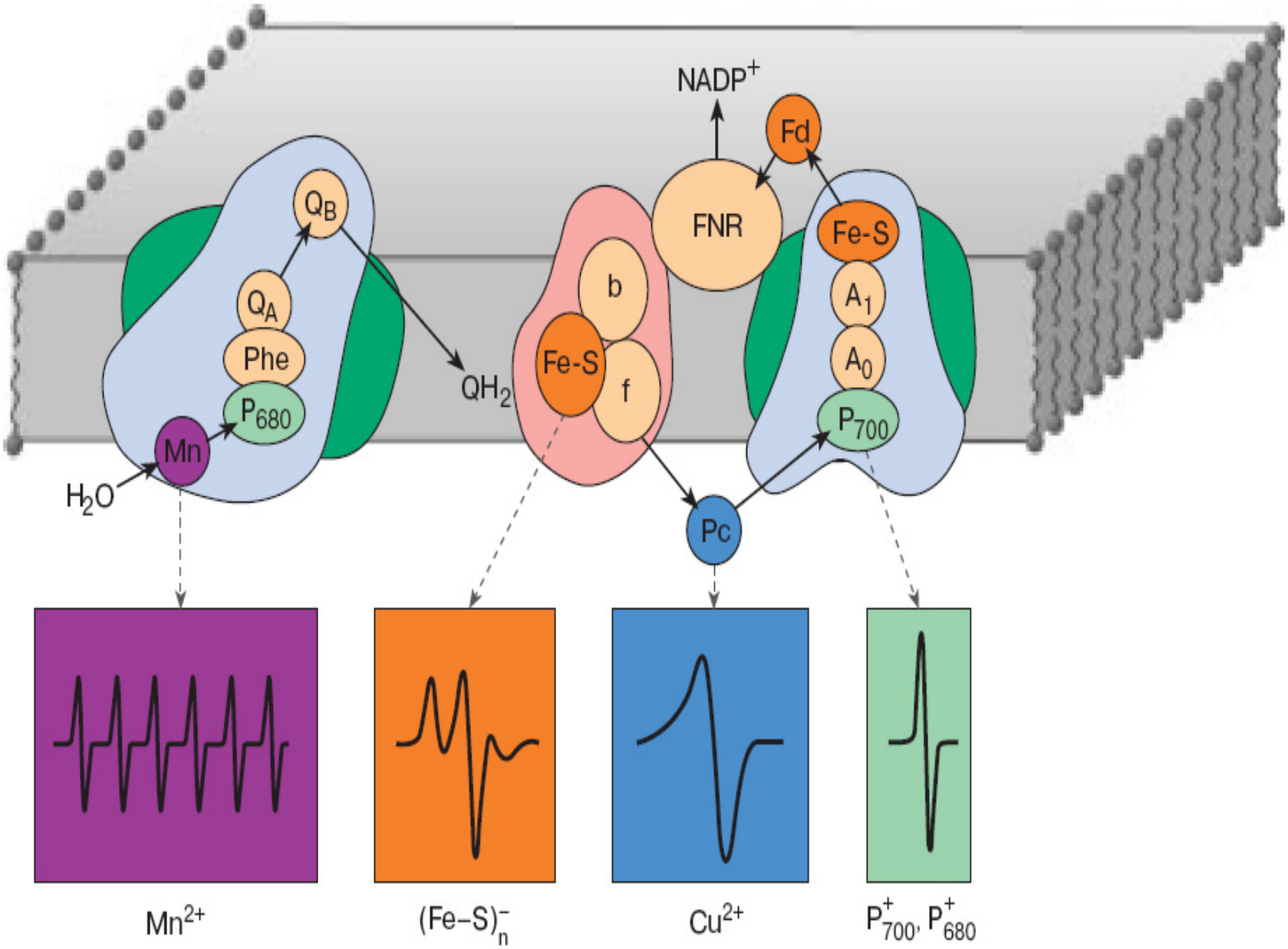

Объемный
резонатор
N
Образец
Поршень
Детектор
Волновод
Осциллограф
Клистрон
Поршень
для настройки
S
Электромагнит
Усилитель

ЭПР-спектрометр

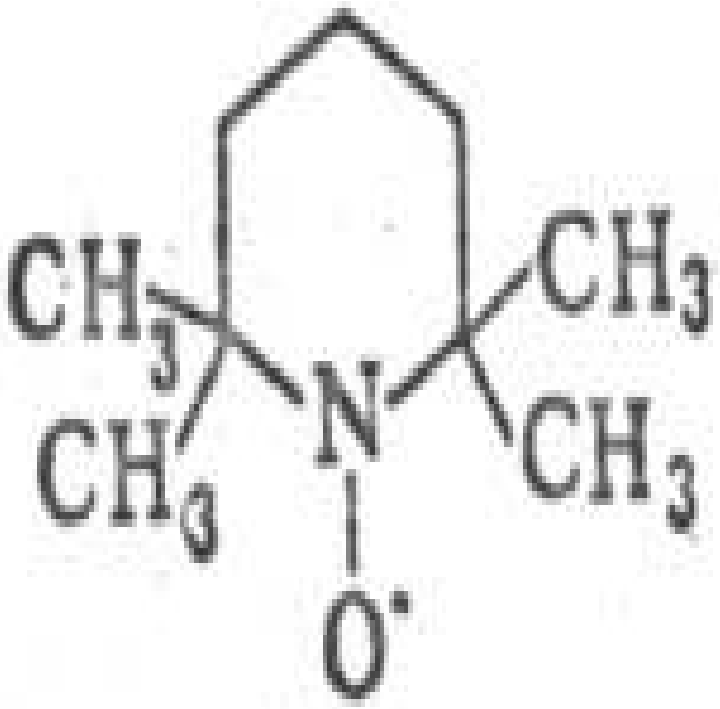


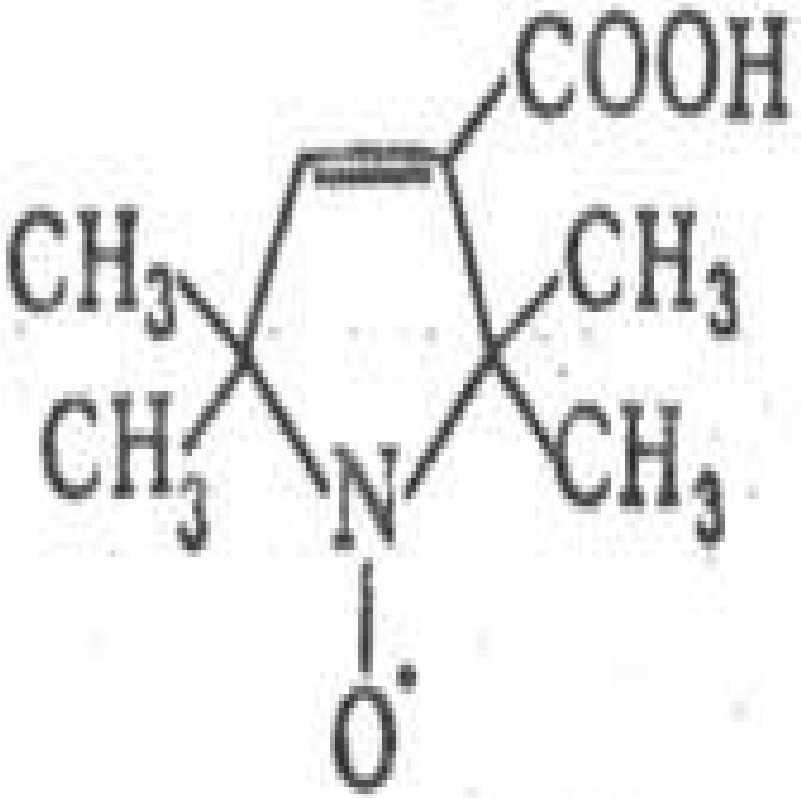
Спектр ЭПР

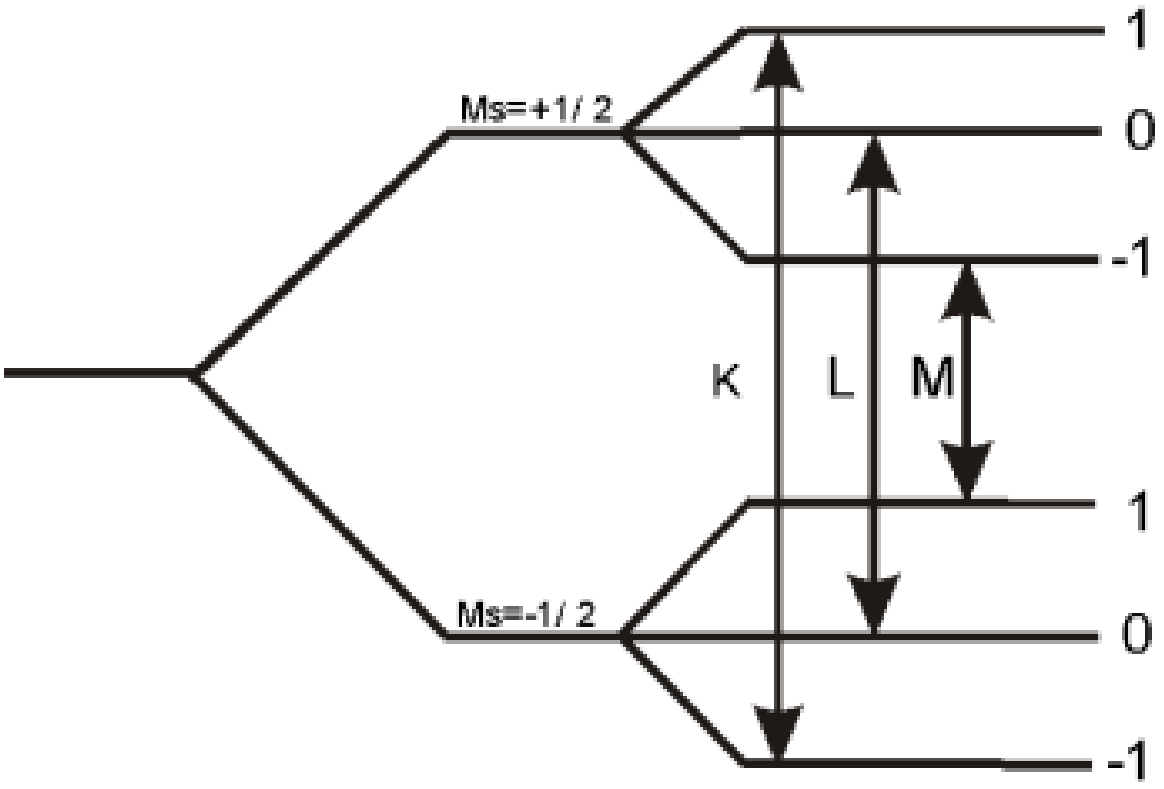


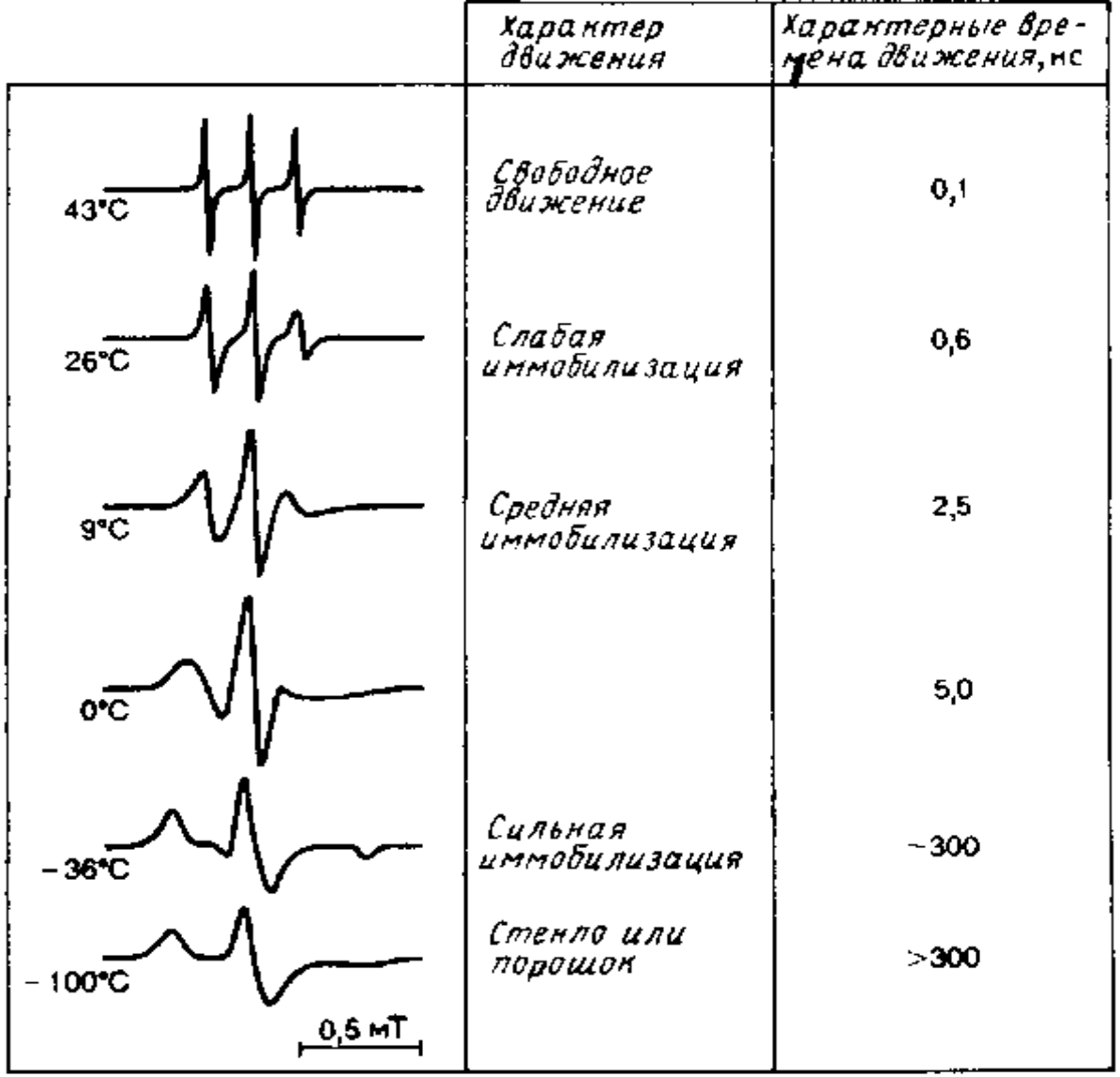

NADP+
Fd
FNR
Fe-S
A1
A0
P700
b
Fe-S
f
QB
QA
Phe
P680
Mn
H2O
QH2
Pc
Mn2+
(Fe–S)n−
Cu2+
P+700, P+680

Иминоксильные радикалы






Ms=+1/ 2
Ms=-1/ 2
1
0
-1
1
0
-1
K
L
M



Зависимость ЭПР-спектров нитроксидной спиновой метки от скорости молекулярного вращения. Спектры, представляющие собой первую производную сигнала, получены при разных температурах и, следовательно, при разной вязкости среды [182].

Спектры ЭПР спиновой метки при взаимодействии с SH-группами белка

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 или макромолекулой.

Основы метода спиновых ловушек (spin trapping assay)

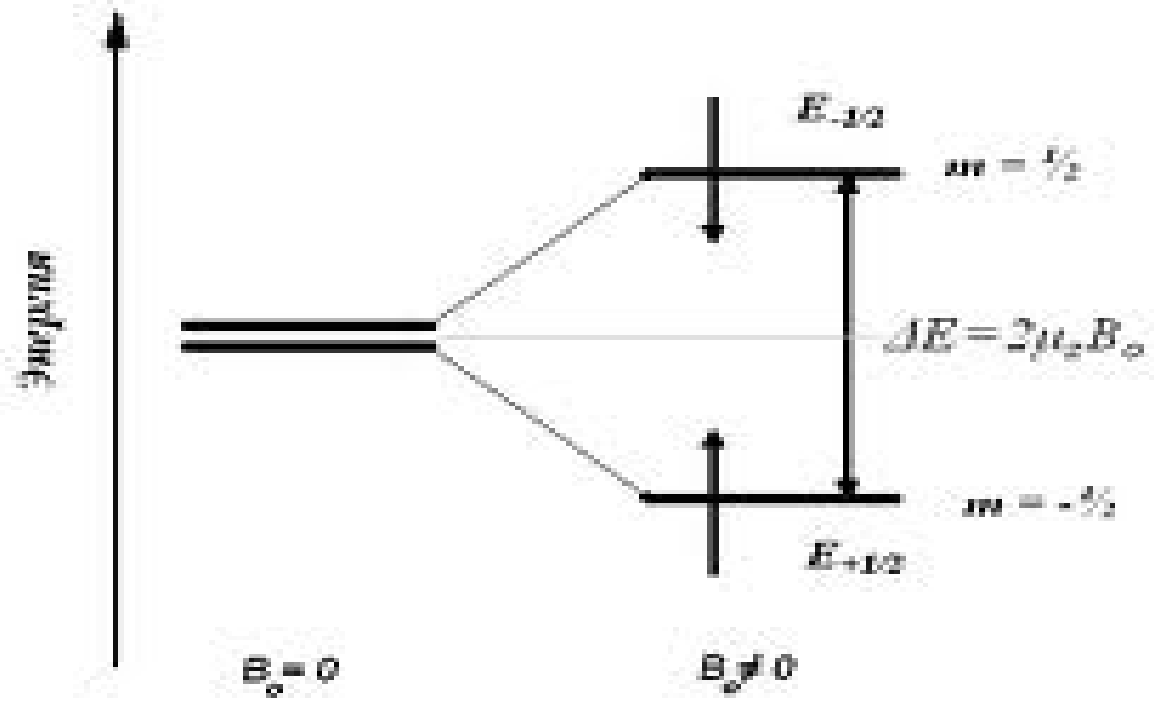
- **Концентрация свободных радикалов в клетках и тканях не превышает 10 нМ.**
- **Минимальная концентрация свободных радикалов, которую можно обнаружить методом ЭПР 100 нМ**

$$R^{\bullet} + ST \rightarrow SA^{\bullet}$$

Предложен в 1965-67 независимо Konaka T. (Япония), R. Lagercranz (Швеция) и E. Janzen (Канада).

MyShared

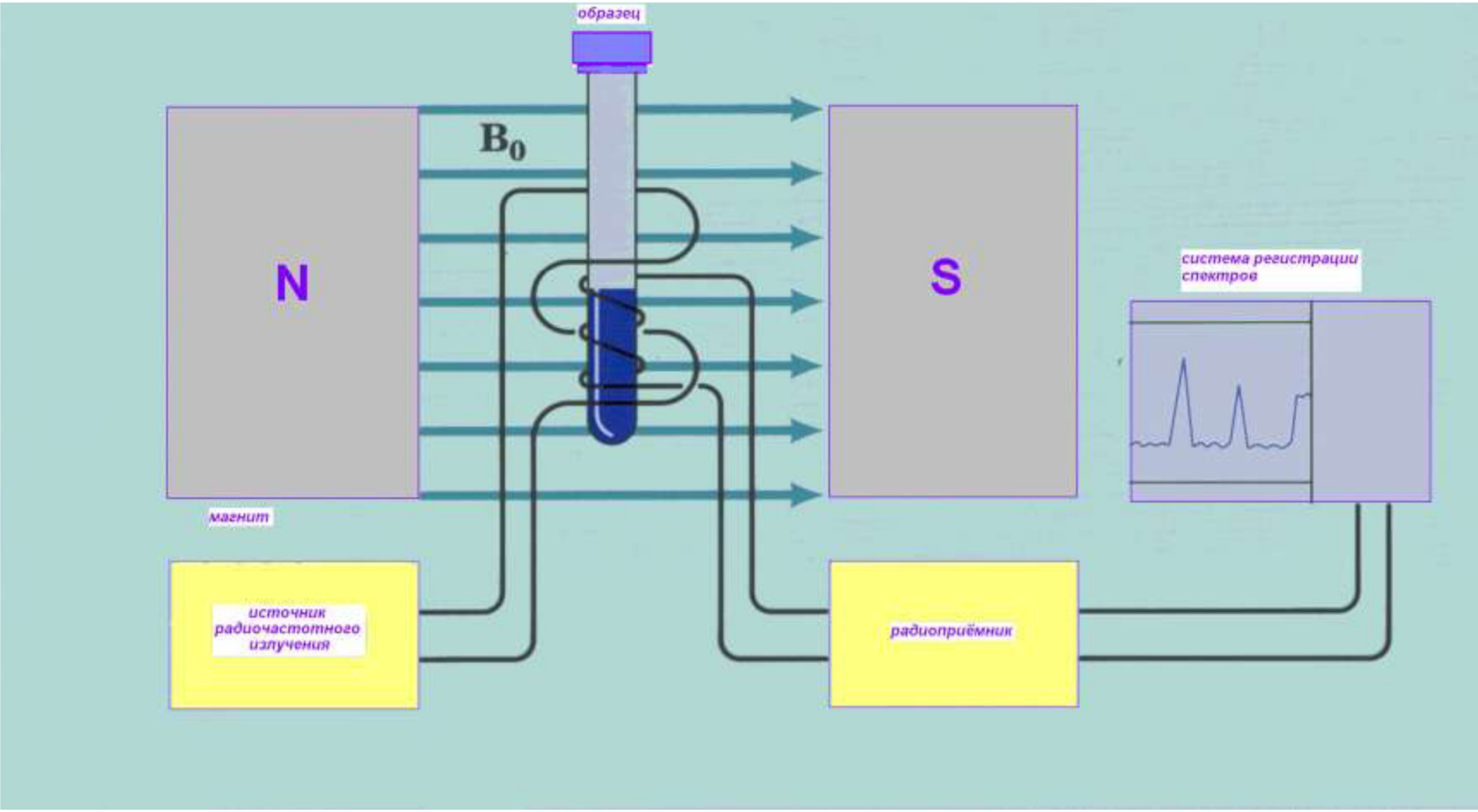
Ядерный магнитный резонанс (ЯМР)



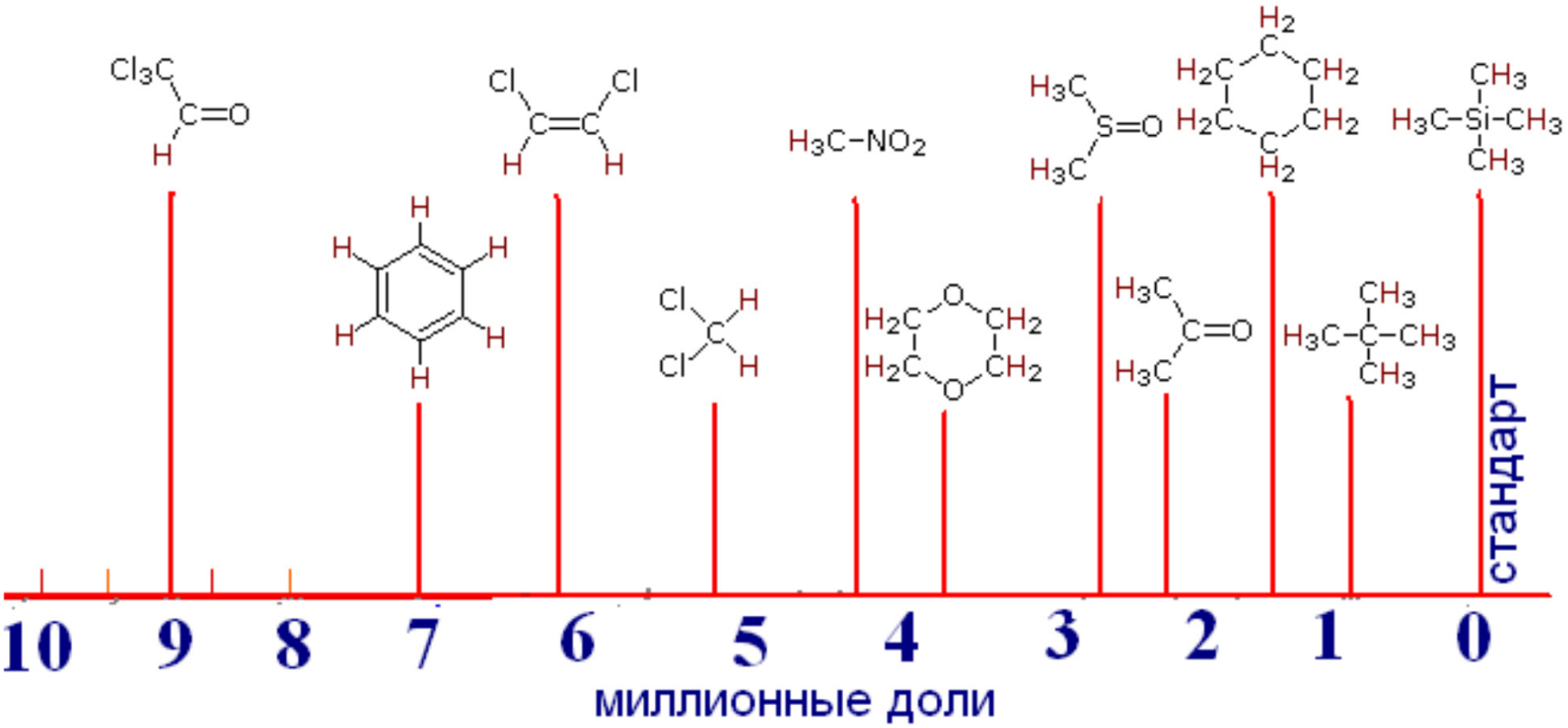
ЯМР

- **Ядра с четным числом протонов и нейтронов (четный заряд Z и четная масса M не имеют магнитных моментов**
- **(спин I = 0) 12**
- Все другие ядра имеют магнитные моменты и их можно изучать методом ЯМР (на конец 2000 года были измерены магнитные моменты 118 стабильных изотопов 104 химических элементов)
- **Спиновое квантовое число ядра I может принимать**
- **полуцелые и целые значения от 1/2 до 9/2.**
- **Спин определяет число возможных (разрешенных)**
- **ориентаций магнитного момента во внешнем**
- **магнитном поле: N = 2I +1**
- •

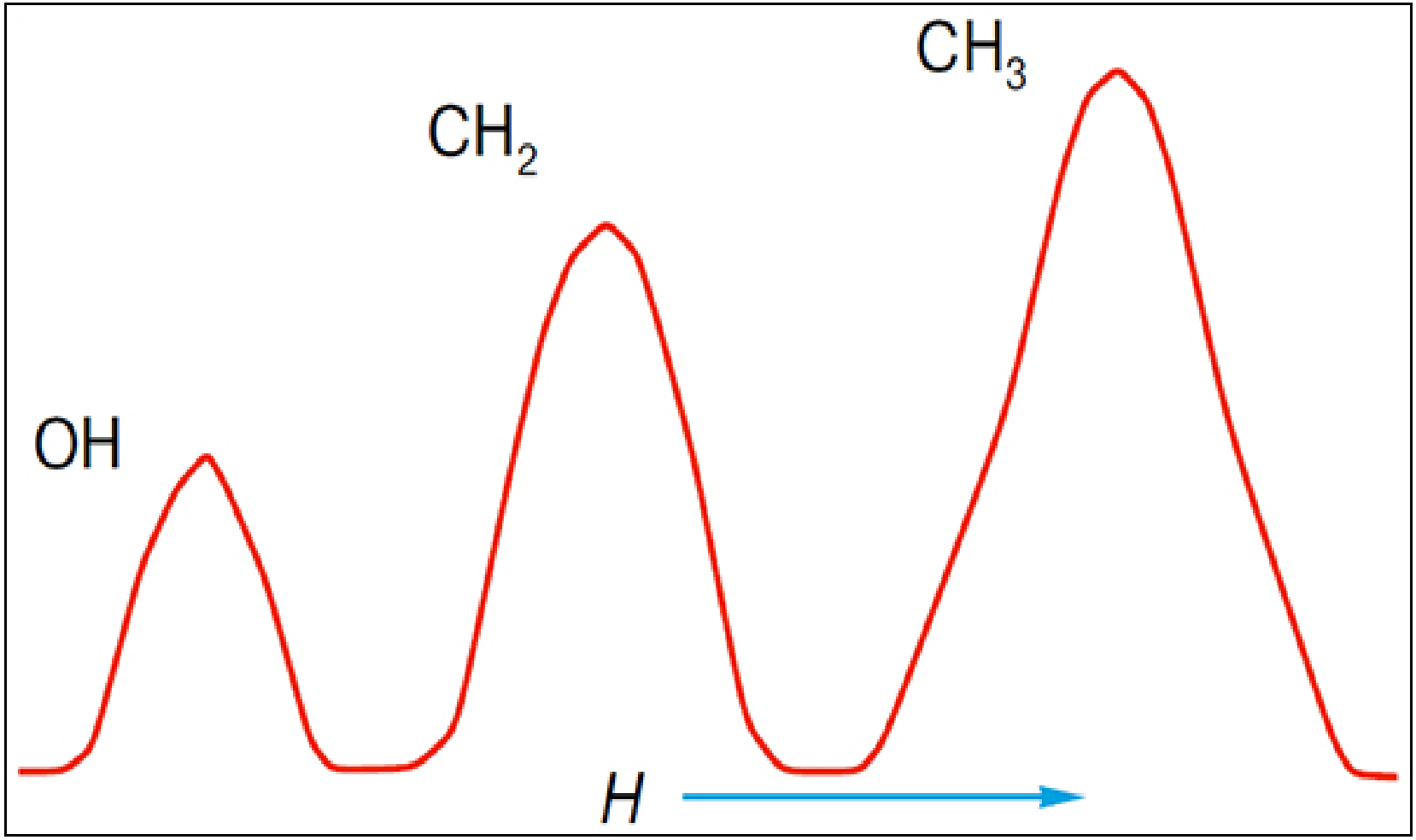
Схема простейшего ЯМР спектрометра



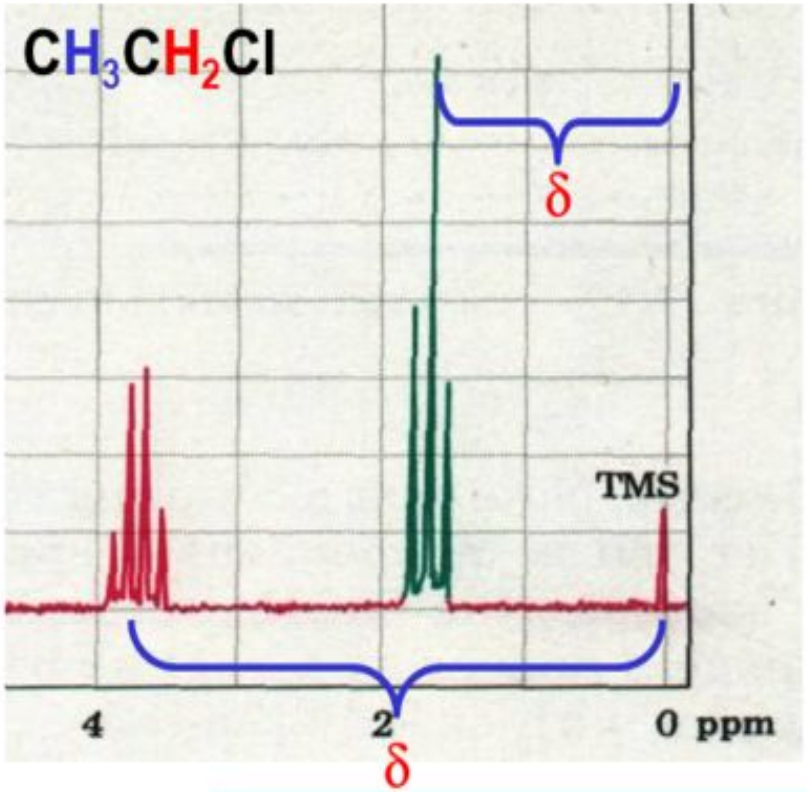
Химические сдвиги сигналов различных протонов в спектрах **протонного** магнитного резонанса.



Спектр ЯМР этилового спирта



Химический сдвиг



Электроны, прецессируя вокруг вектора внешнего магнитного поля, создают дополнительное магнитный момент:

$$H' = \sigma * H_0$$

H' – дополнительный магнитный момент,

H_0 – вектор внешнего магнитного поля,

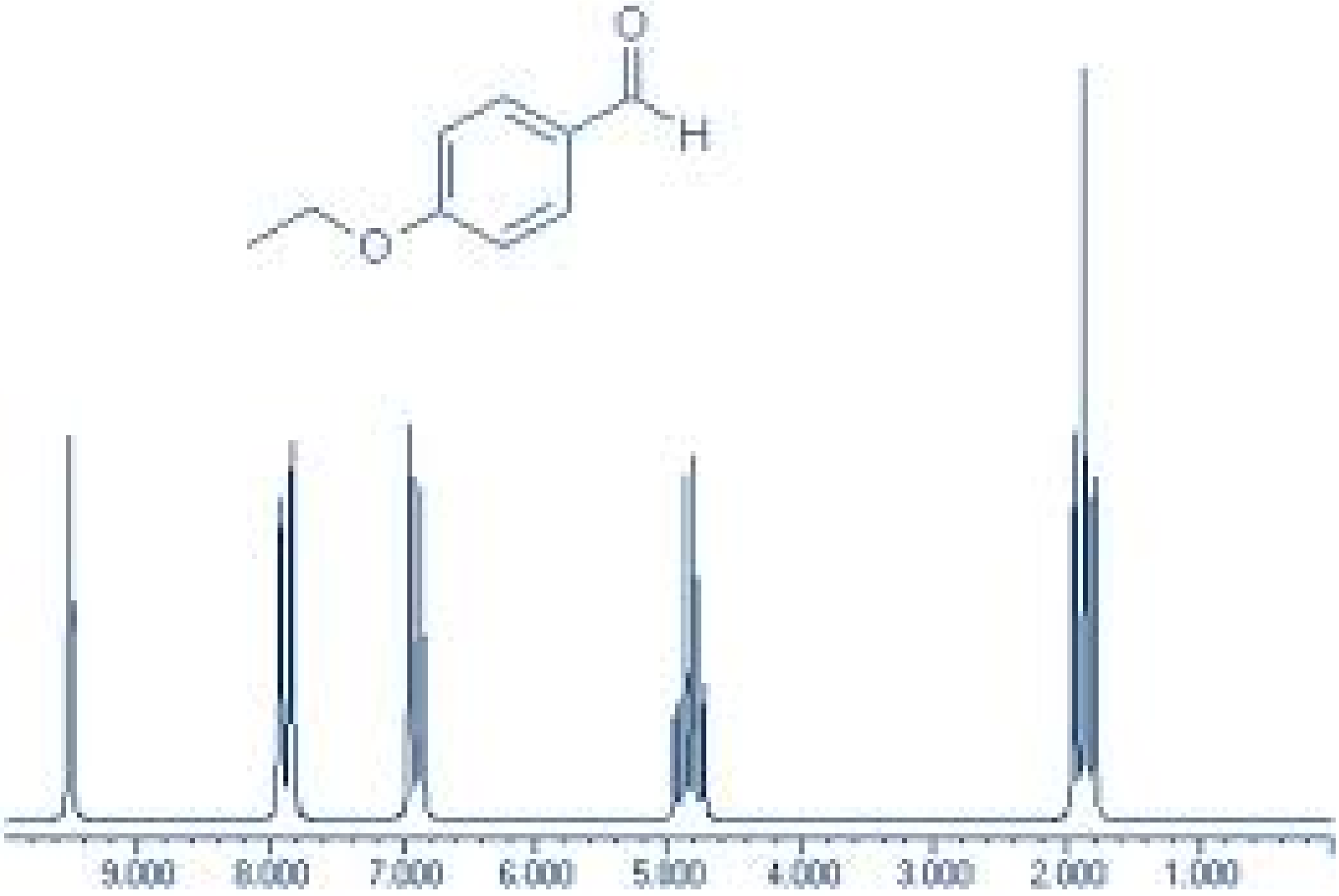
σ - константа экранирования

$$H_{эфф} = H_0 - H' = H_0 - \sigma H_0 = H_0(1-\sigma)$$

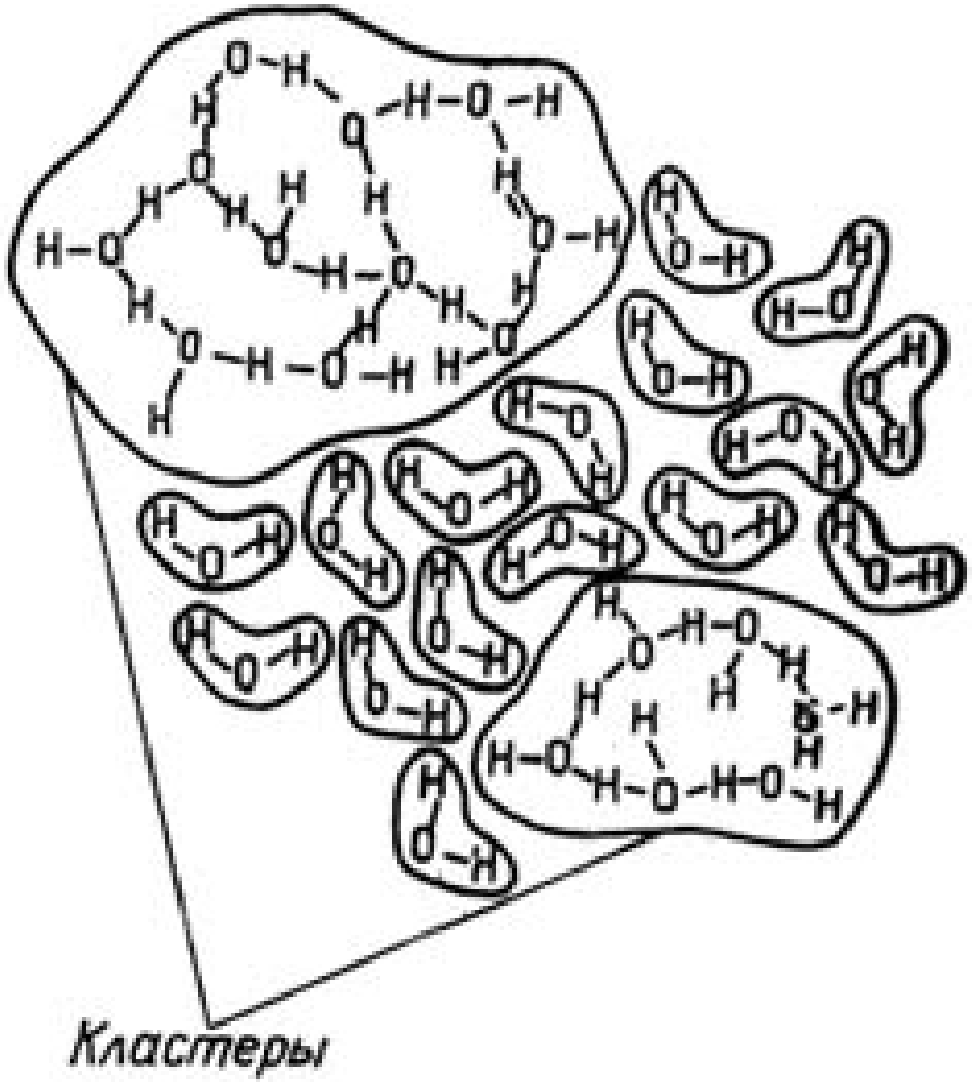
Химический сдвиг измеряется в относительных единицах, называемых «миллионными долями» (“ppm”) и вычисляется как:

$$\delta = \Delta\nu/\nu_0 * 10^6 = \Delta H/H^0 * 10^6$$

MyShared


O
H
O
9.000
8.000
7.000
6.000
5.000
4.000
3.000
2.000
1.000

Кластерная структура воды



Термодинамика биологических систем

Термодинамическая система — это некая физическая система, состоящая из большого количества частиц, способная обмениваться с окружающей средой энергией и веществом. Такая система подчиняется статистическим закономерностям. Для термодинамических систем справедливы законы **термодинамики**.

Первое начало термодинамики:

Сумма энергии материальной системы остается постоянной величиной независимо от изменений, происходящих в самой системе; изменение энергии системы возможно только в результате обмена энергией с окружающей средой.

dU = dQ + dA , где dQ – теплота, поглощенная системой из среды;

dA – работа против внешних сил.

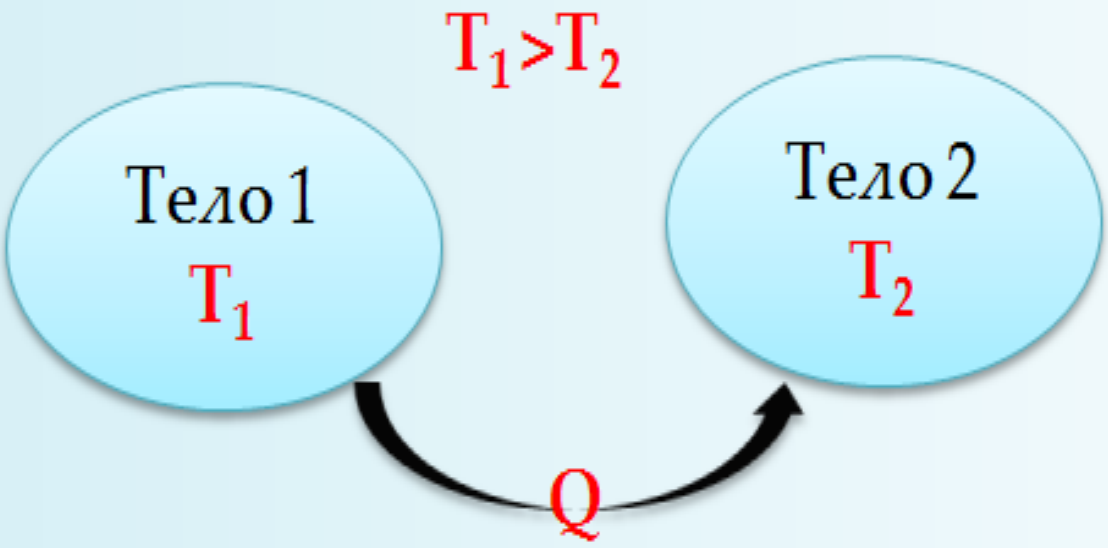
Согласно первому началу термодинамики, термодинамическая система может совершать работу только за счет своей внутренней энергии или каких-либо внешних источников энергии. Отклонения от этого закона возможны в пределах **соотношения неопределенностей Гейзенберга: $\Delta E \Delta t > h/4$**

Для биологических систем первое начало термодинамики полностью выполняется и, следовательно, введение принципиально новой «биологической» энергетики не обосновано.

Закон Гесса:

Тепловой эффект химического процесса, развивающегося через ряд промежуточных стадий, не зависит от пути превращения, а определяется лишь начальным и конечным состоянием химической системы.

- **Энтропия – это физическая величина, характеризующая значение связанной энергии данной системы, приходящейся на единицу температуры (1^0К).**
- ***Принцип Больцмана:*** между количеством микросостояний **w** и энтропией существует соотношение:
- **S = k ln w**
- где k —постоянная Больцмана (k = $1.38*10^{-23}$) [Дж*$К^{-1}$] или 8,617 ×10^{-5}эВ·$К^{-1}$
- ***Второе начало*** **термодинамики: В изолированной системе общее изменение энтропии всегда положительно, т. е. необратимые термодинамические процессы протекают в направлении возрастания энтропии.**
- **ΔSобщее > 0**



$$\Delta S_1 = -Q/T_1 \qquad \Delta S_2 = +Q/T_1$$

$$\Delta S_{\text{общее}} = \Delta S_1 + \Delta S_2 = (-Q/T_1 + Q/T_2) \quad \Rightarrow \quad \mathbf{\Delta S_{\text{общее}} > 0}$$

- Для описания биохимических систем используют ряд термодинамических потенциалов.
- Протекание химических реакций в жидкой фазе не изменяет давления, но может вызывать изменение объема. Поэтому для таких систем вместо изменения внутренней энергии системы используется изменение ее ***энтальпии*** **(ΔH),** которое равно:
- **ΔH = ΔU + pΔV,** где p — давление, ΔV — изменение объема.
- Для изотермических реакций, протекающих при постоянном давлении, функцией отражающей влияние на направление протекания процесса, как тенденции к уменьшению внутренней энергии, так и тенденции к достижению наиболее вероятного состояния системы служит ***энергия (потенциал) Гиббса***. Энергия Гиббса связана с энтальпией, энтропией и температурой соотношением:
- **ΔG = ΔH – TΔS**
- ***В условиях постоянства температуры и давления реакции протекают самопроизвольно в сторону уменьшения энергии Гиббса.***

- **Константа равновесия химической реакции К непосредственно связана с изменением потенциала Гиббса:**
- **$\Delta G = -RT\ln K$,** где **R=8,314 Дж/моль**

- Для р-ции **A + B $\leftrightarrow$ C + D**

- **$\Delta G = \Delta G_0 + RT\ln [C][D]/[A][B]$**

- **Пример: АДФ + Ф ↔ АТФ**
- **Кр = 4,2*10^{-7} м$^{-1}$** при этом **ΔG_0 = 36 кДж/моль**

- В случае, когда [**АДФ**] и [**Ф**] – 10 мМ, а [**АТФ**] – 1 мМ (хлоропласты в темноте)
- **$\Delta G_т$= 36 + 8,314*300*ln (10^{-3}/10^{-2} *10^{-2}) =42 кДж/моль**

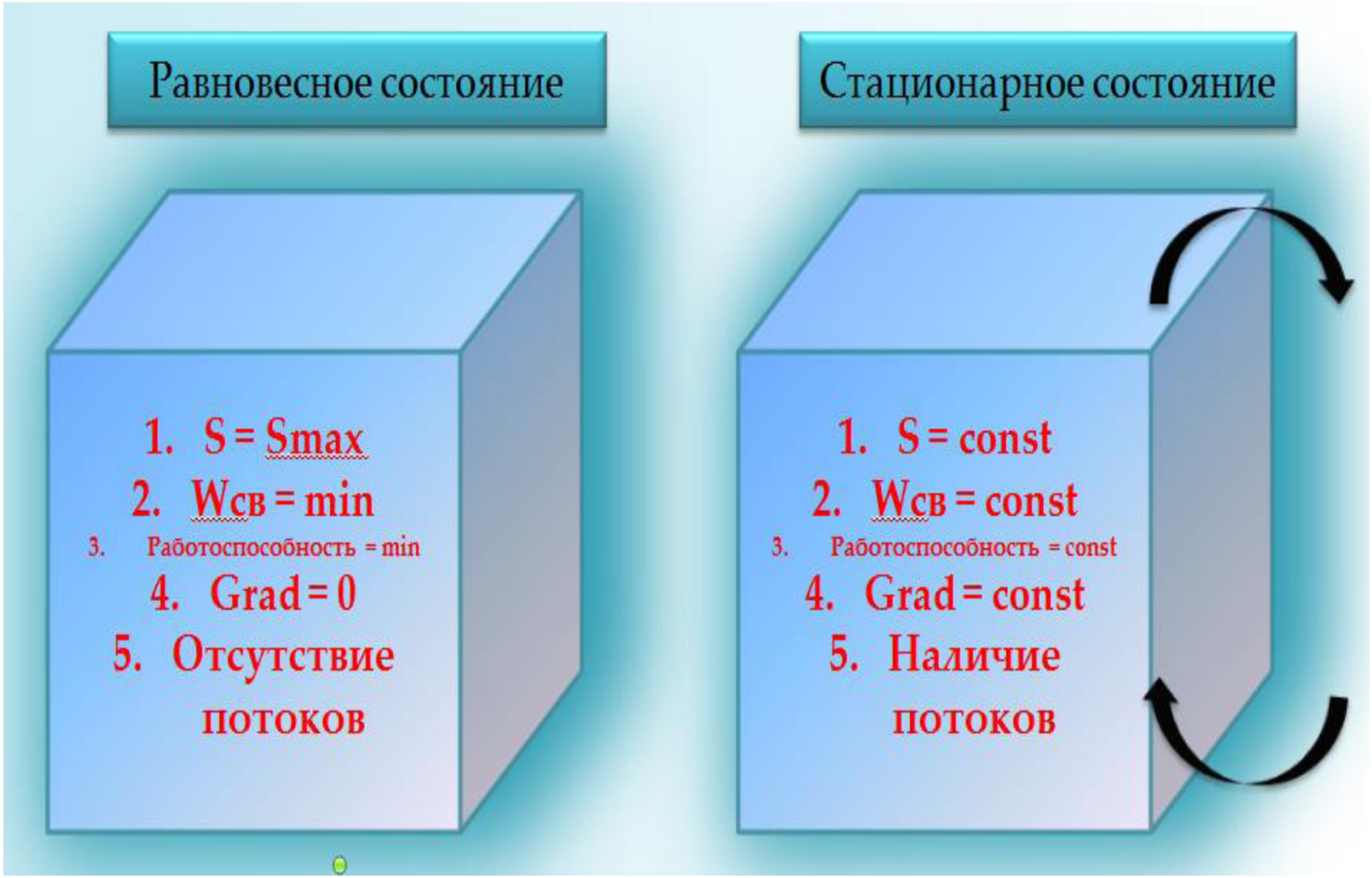
- В случае, когда [**АДФ**] и [**Ф**] – 1 мМ, а [**АТФ**] – 10 мМ (хлоропласты на свету)
- **$\Delta G_с$= 36 + 8,314*300*ln (10^{-2}/10^{-3} *10^{-3}) =59 кДж/моль**

- **Пример: A + B ↔ C**
- **пусть ΔG_0 = -17,2 кДж/моль**
- Куда направлена реакция при концентрациях реагентов
- **1м; 10^{-3} м; 10^{-6} м ?**
- **1м**
- **ΔG= -17,2 + 8,314*300*ln (1/1 *1)= -17,2 кДж/моль**
- **(прямая р-ция)**

- **10^{-3} м**
- **ΔG= -17,2 + 8,314*300*ln(10^{-3}/10^{-3} *10^{-3}) =0 кДж/моль (равновесие)**

- **10^{-6} м**
- **ΔG= -17,2 + 8,314*300*ln(10^{-6}/10^{-6} *10^{-6}) =17,2 кДж/моль (обратная р-ция)**

- **Изменения энтропии в открытых системах и ее обмен с окружающей средой**
- В открытой системе общее изменение энтропии будет складываться из двух составляющих:
- ***dS=diS+deS,*** где diS – внутренний источник энтропии, deS – внешний источник энтропии
- Энтропия в системе ***(dS/dt)*** изменяется за счет процессов производства энтропии в самой системе ***(diS/dt)*** и за счет обмена энтропии между системой и окружающей средой ***(deS/dt).***
- Таким образом, скорость изменения энтропии в системе равна сумме скорости продукции энтропии в самой системе и скорости обмена энтропией между системой и окружающей средой. Скорость продукции энтропии в системе всегда больше 0, так как термодинамические процессы в ней необратимы.


Равновесное состояние
1. S = Smax
2. Wсв = min
3. Работоспособность = min
4. Grad = 0
5. Отсутствие потоков
Стационарное состояние
1. S = const
2. Wсв = const
3. Работоспособность = const
4. Grad = const
5. Наличие потоков

- **Термодинамический критерий стационарного состояния Теорема Пригожина**
- Состояние термодинамической системы, при котором ее параметры со временем не изменяются, но происходит обмен веществом и энергией, называется стационарным состоянием. Стационарное состояние характерно для большинства биосистем.
- ***Термодинамическим критерием стационарного состояния*** является равенство между продукцией энтропии организмом и потоком отрицательной энтропии из окружающей среды
- ***(diS/dS) = -(deS/dt),***
- вследствие чего полное изменение энтропии в организме равно нулю:
- **dS/dt = 0 (*гомеостаз)***.

- **Постулат Пригожина состоит в том, что общее изменение энтропии dS открытой системы может происходить независимо либо за счет процессов обмена с внешней средой (deS), либо вследствие внутренних необратимых процессов (diS):**
- **dS = deS + diS.**

- ***Теорема Пригожина: в стационарном состоянии при фиксированных внешних параметрах продукция энтропии в системе постоянна во времени и минимальна по величине.***
- **diS/dt = const ; diS/dt → min**

- **Электрохимический потенциал**
- В физико-химических системах изменение свободной энергии обычно описывают через изменение ***электрохимического потенциала μ***:
- **ΔG = mΔμ**
- где m — количество вещества (моли) в системе.
- Изменение электрохимического потенциала при переходе системы из состояния 1 в состояние 2 определяется изменением химической, осмотической и электрической э

$$\Delta\bar{\mu} = \mu_{02} - \mu_{01} + RT\ln\left(\frac{c_2}{c_1}\right) + zF(\varphi_2 - \varphi_1)$$

$$\Delta\bar{\mu} = \mu_{02} - \mu_{01} + RT\ln\left(\frac{c_2}{c_1}\right) + zF(\varphi_2 - \varphi_1)$$

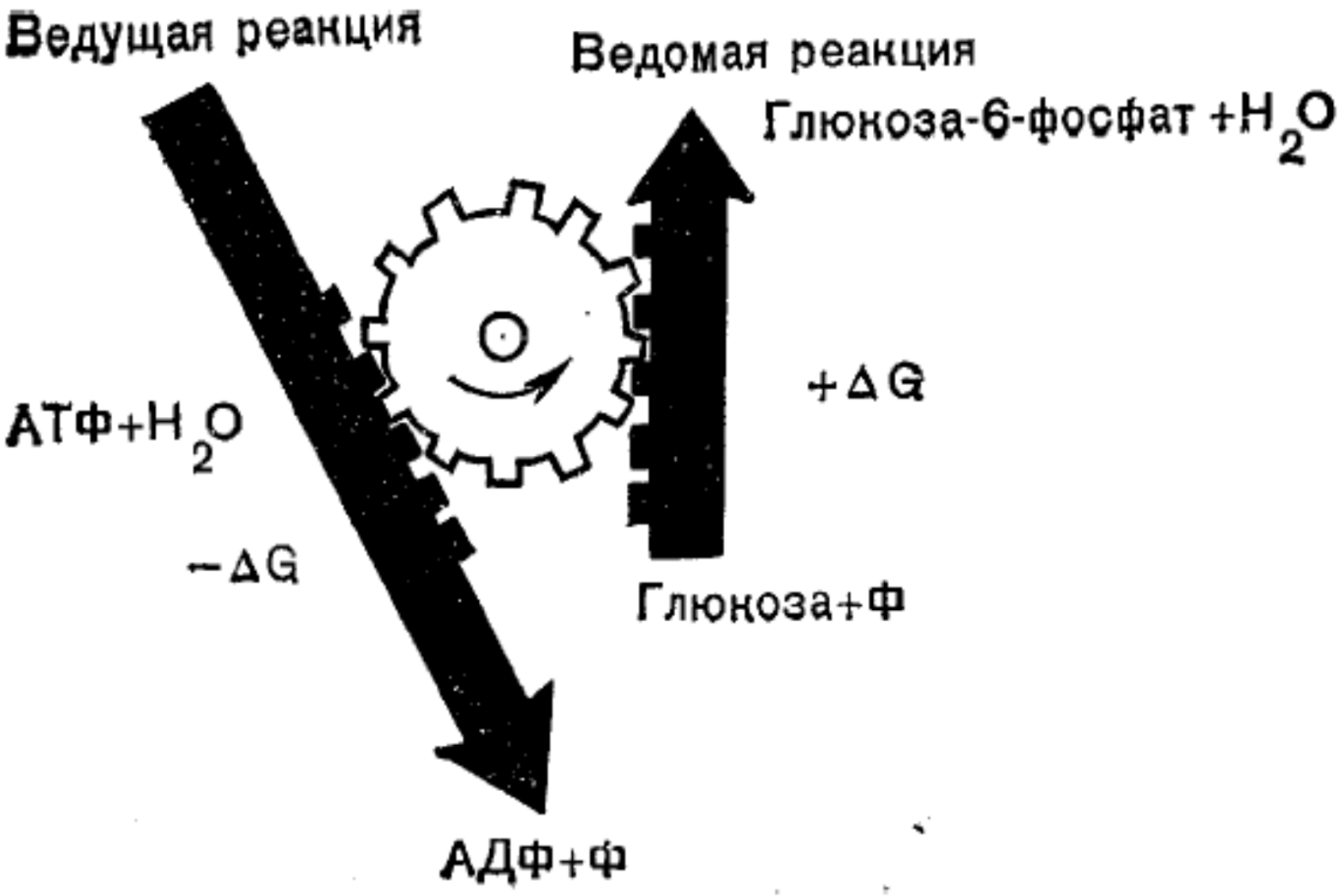
- Физический смысл электрохимического потенциала заключается в том, что его изменение равно работе, которую необходимо затратить, чтобы:
- а) синтезировать 1 моль вещества (состояние 2) из исходных веществ (состояние 1) и поместить его в растворитель (слагаемое $\mu_{02} - \mu_{01}$).
- б) изменить концентрацию раствора с C_1 до C_2 (слагаемое **RTln (C2/C1).**
- в) преодолеть силы электрического отталкивания, возникающие при наличии разности потенциалов (***φ2-φ1***) между растворами (слагаемое **zF (φ2-φ1)**),
- где **z –** заряд иона, **F –** число Фарадея $9{,}65 \cdot 10^4$ Дж*К$^{-1}$

- ***Соотношение взаимности Онзагера*** одна из основных теорем термодинамики неравновесных процессов, которое было установлено в 1931 г. Онзагером. В термодинамических системах, в которых имеются градиенты температуры, концентраций компонентов, химических потенциалов, возникают необратимые процессы, связанные с теплопроводностью, диффузией, протеканием химических реакций. Эти процессы характеризуются тепловыми и диффузионными потоками, скоростями химических реакций и т.д. Они называются общим термином ***«потоки»,*** а вызывающие их причины (отклонения термодинамических параметров от равновесных значений) - ***термодинамическими силами***. Связь между потоками и силами, если термодинамические силы малы, записывают в виде линейных уравнений (закон Ома, закон Фика и др.).

- В случае взаимодействия потоков при перекрестных процессах, уравнения взаимности Онсагера, устанавливают связь между кинетическими коэффициентами. Ниже приведены уравнения Онсагера для двух потоков (***J1***и ***J2)*** и сил (***X1*** и ***X2***):
- ***J1 = L11 X1 + L12 X2***
- ***J2 = L22 X2 + L21 X1***
- ***L12 = L21***

- **Биологическое значение сопряжения потоков. Коэффициент сопряжения**
- Энергетический обмен у живых организмов организован таким образом, что они могут обходить энтропийный термодинамический критерий и в них протекают не только возможные, но и невозможные с термодинамической точки зрения реакции.
- Два условия необходимы для осуществления энергетического сопряжения:
- 1) Свободная энергия, даваемая термодинамически возможной реакцией, должна превышать энергию, потребляемую реакцией термодинамически невозможной, то есть должен быть некоторый избыток энергии с учетом вероятных потерь при ее передаче
- 2) Обе сопрягаемые реакции должны иметь общий компонент. Такими компонентами в биологических системах могут быть, например, электрохимический градиент протонов.
- В биологических системах сопряжены множество процессов: перенос растворимых веществ и воды, сопряжены многие биохимические процессы. Примером сопряженных биохимических реакций может служить фосфорилирование глюкозы на первой стадии гликолиза.

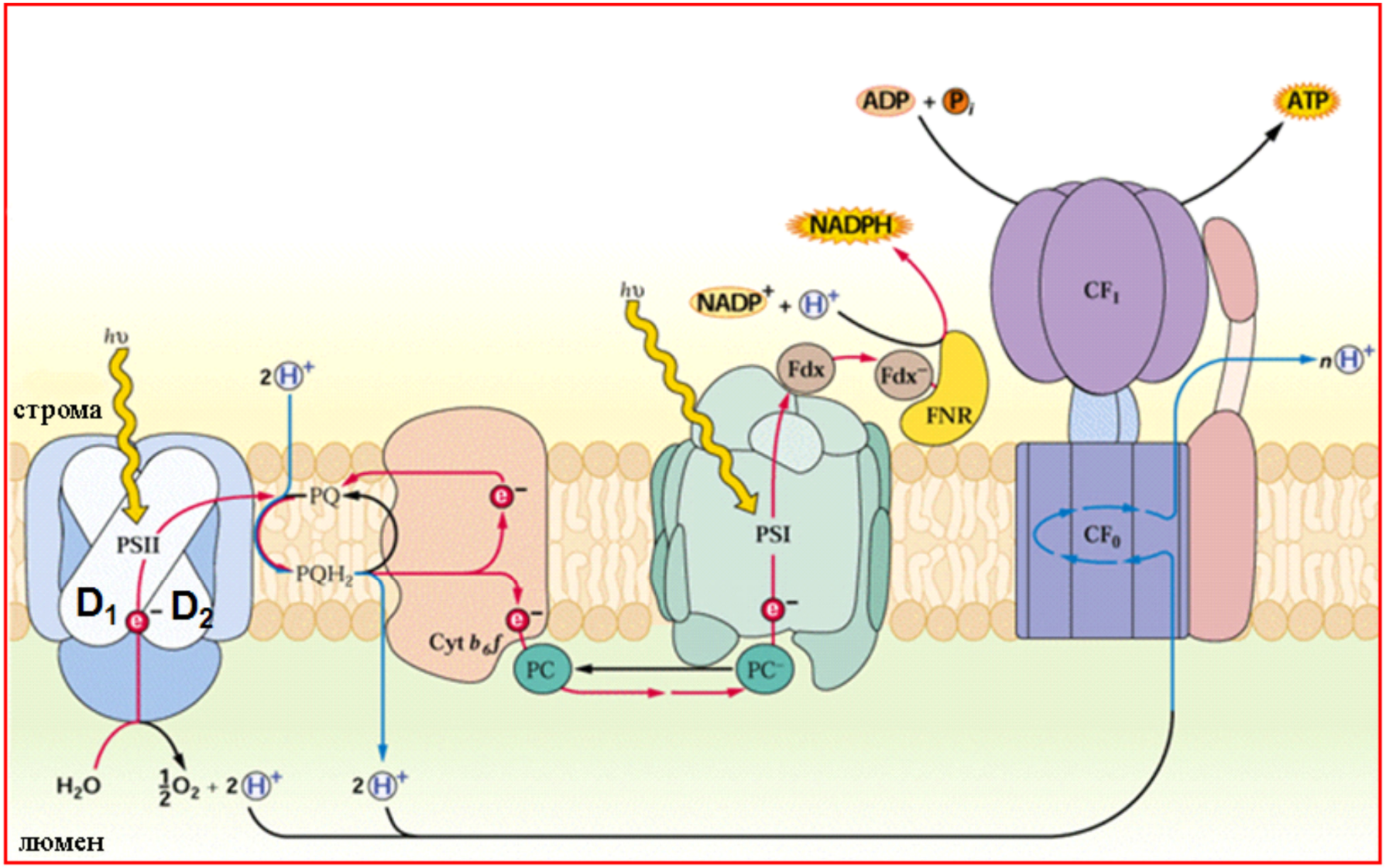
- Схема сопряжения химических реакций.



- Пример фосфорилирование глюкозы при гликолизе по схеме:
- *глюкоза + Ф → глюкозо-6-фосфат + H_2O*
- ΔG = 13 кДж/моль
- Этот процесс не может идти самопроизвольно, он протекают за счет сопряжения с другой химической реакцией, изменение свободной энергии которой отрицательно, например с реакцией гидролиза АТФ по уравнению:
- *АТФ + H_2O → АТФ + Ф* ΔG = *–36 кДж/моль*
- Объединение первой и второй реакции дает:
- *АТФ + глюкоза → АДФ + глюкозо-6-фосфат*
- Складывая изменения свободной энергии реакций при их совместном протекании, получаем для фосфорилирования глюкозы с участием АТФ:
- ΔG = –36 кДж/моль + 13 кДж/моль = –23 кДж/моль.

- **Окислительно-восстановительный потенциал** (**редокс-потенциал**) — мера способности химического вещества присоединять электроны (восстанавливаться). Окислительно-восстановительный потенциал
- E_o выражают в мВ.
- Связь ΔG с E_o
    - $\mathbf{\Delta G = - nF\Delta E_o}$

Перенос электронов на фотосинтетической мембране



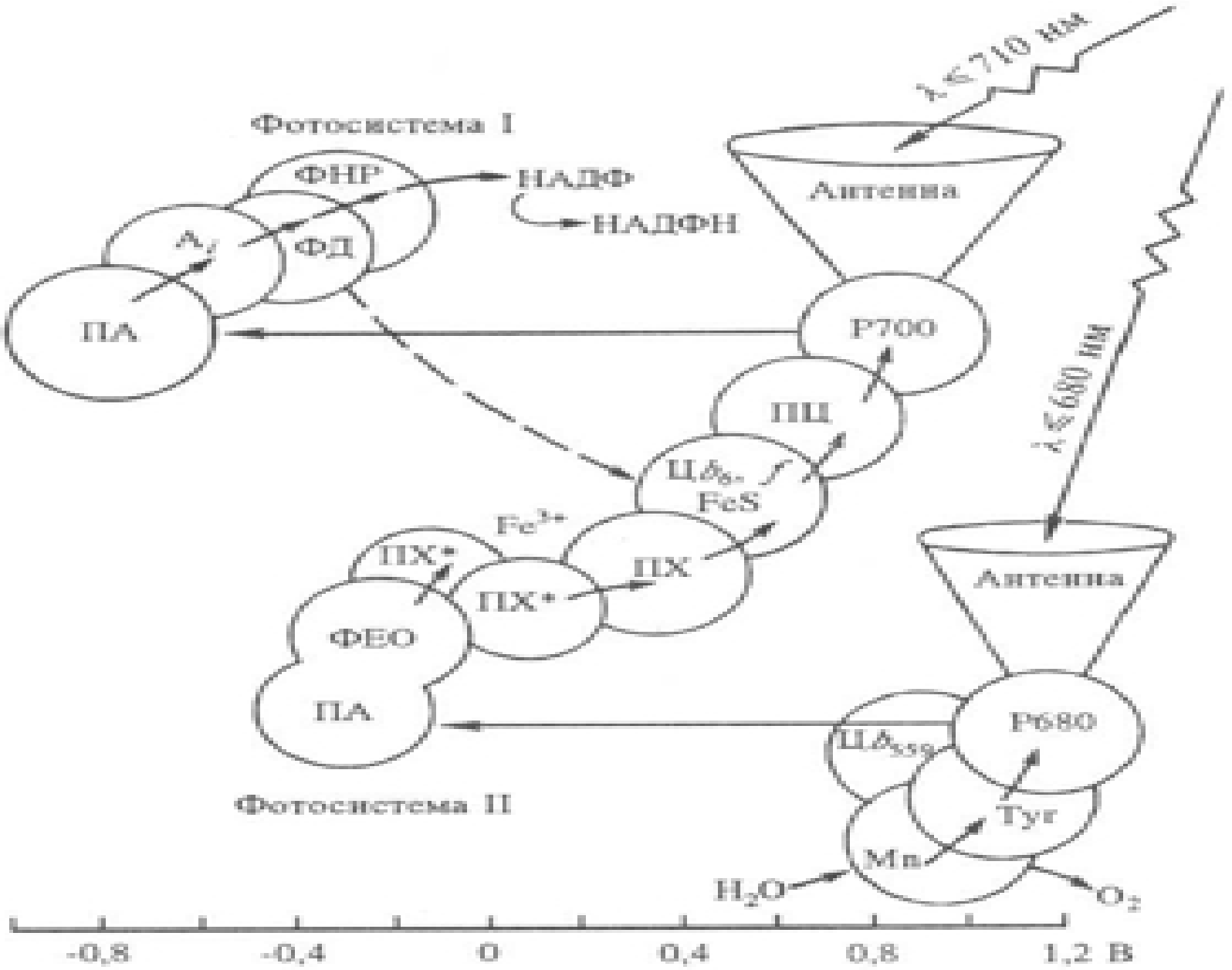
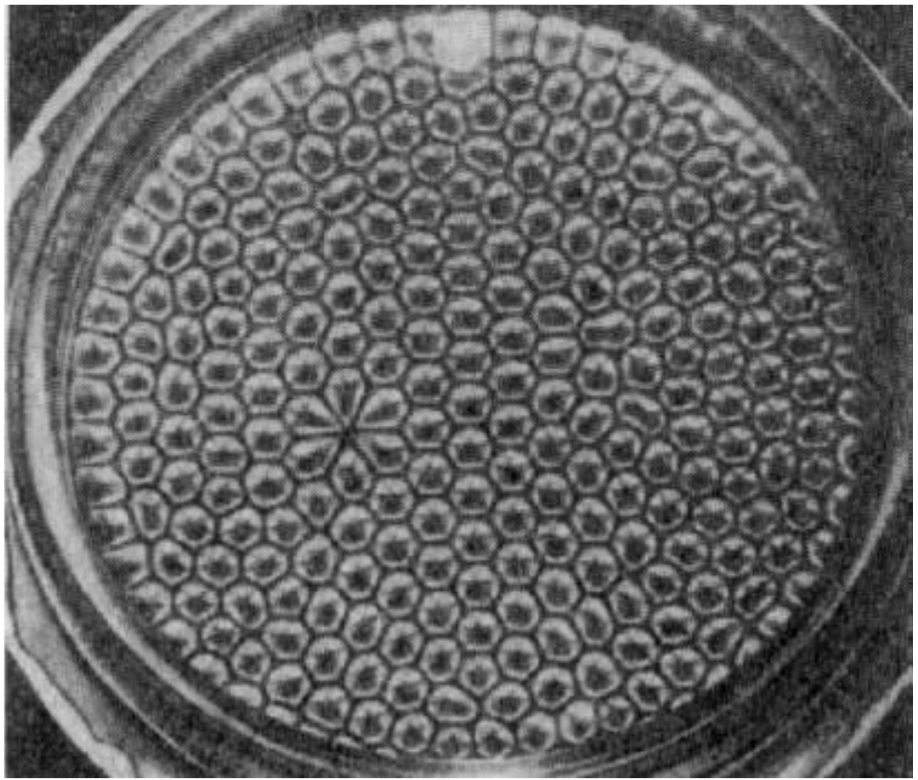
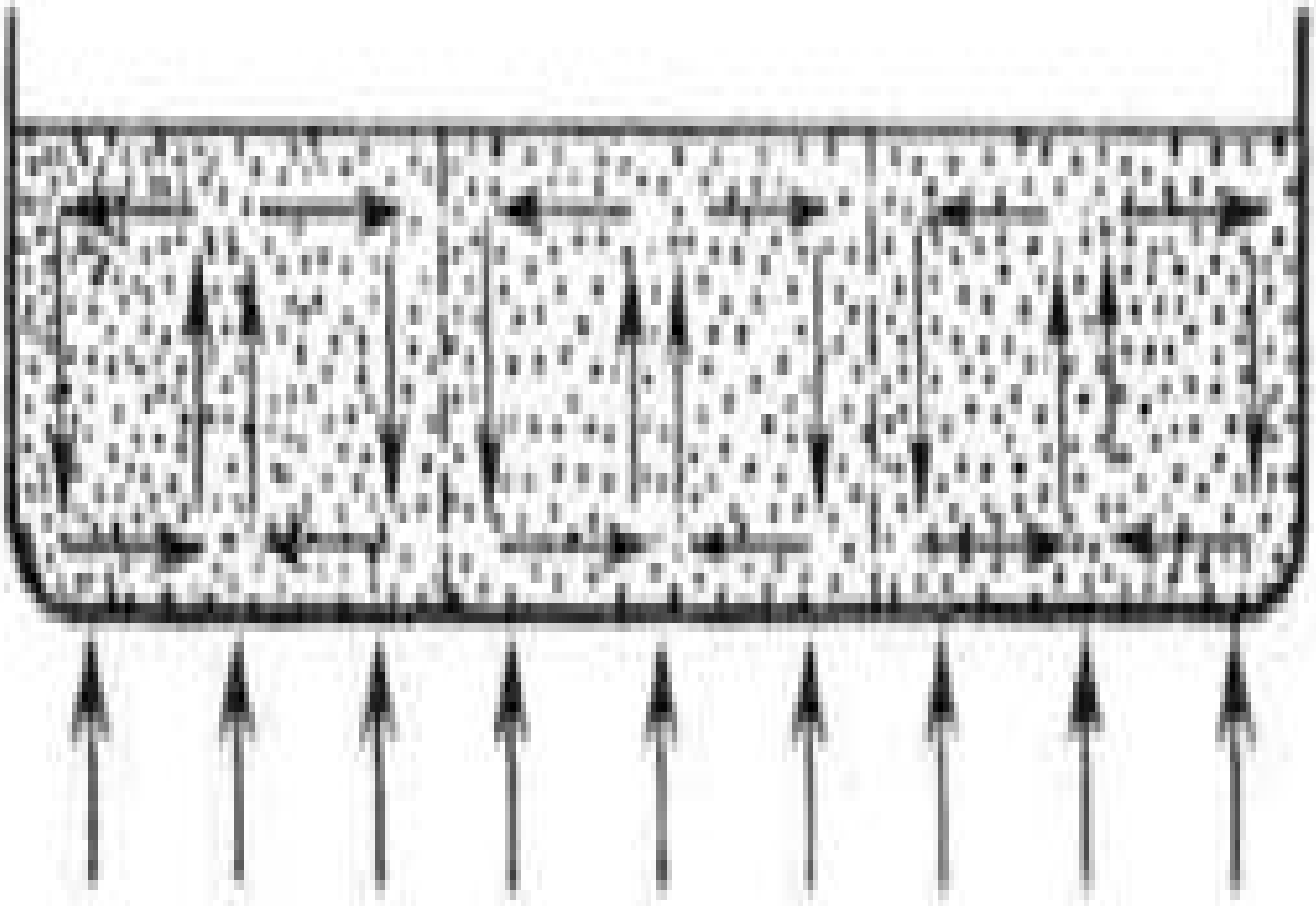


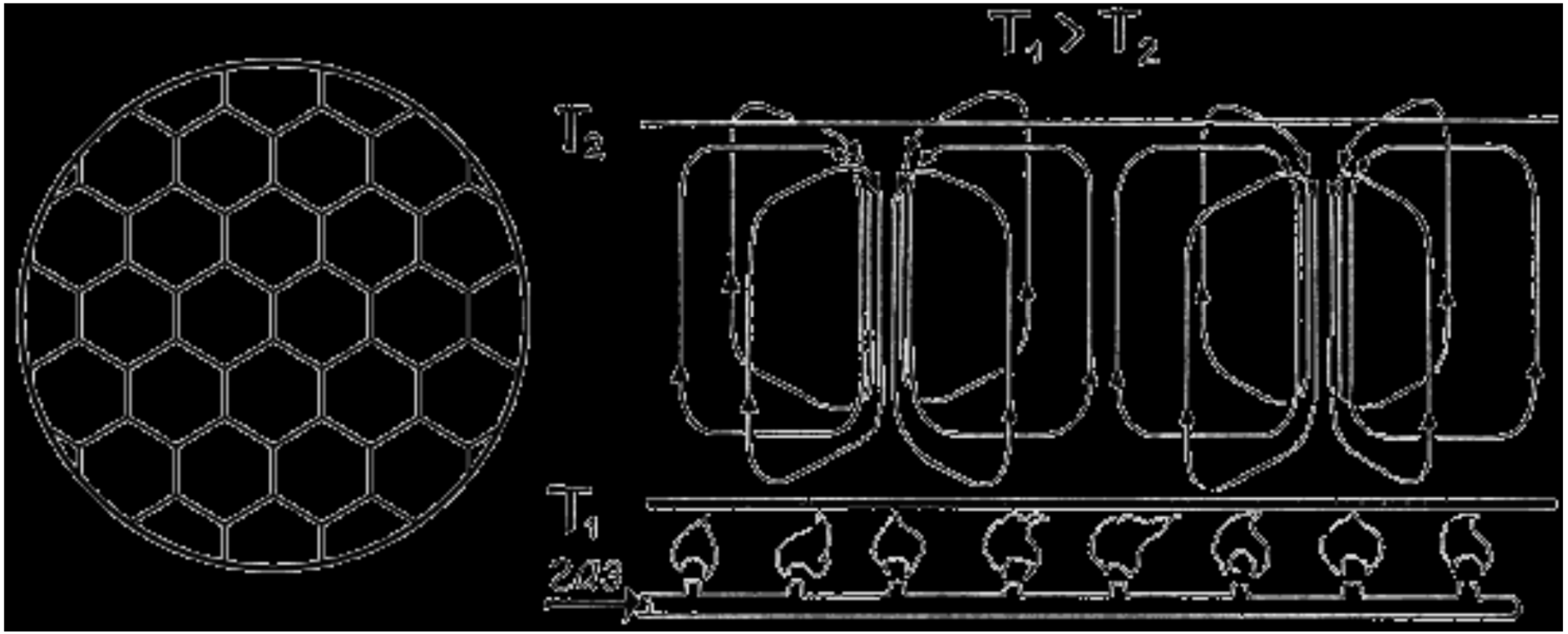
Рис. 2. Схема электронтранспортной цепи Ф. растений и синезеленых во-

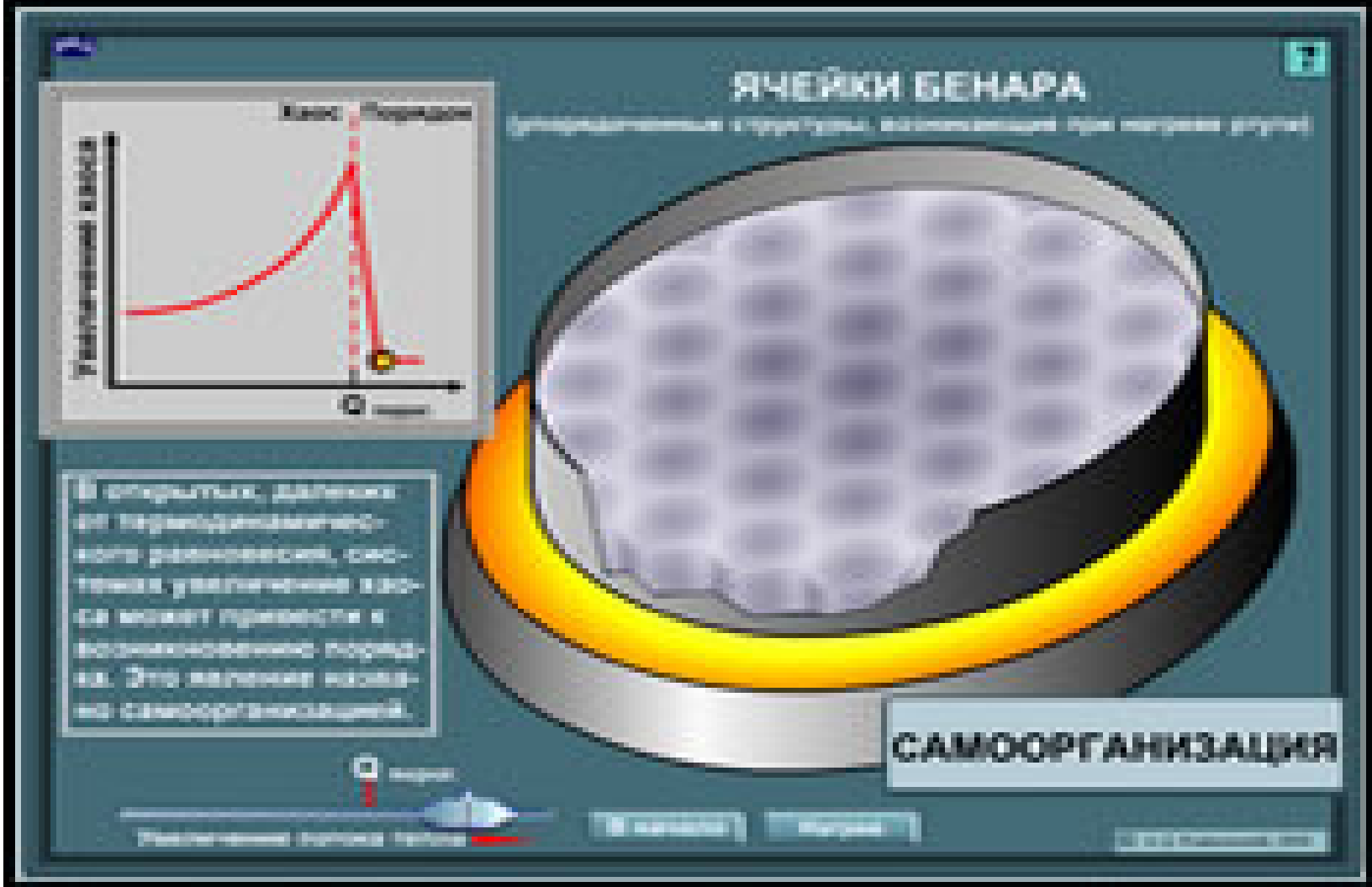
Диссипативные структуры

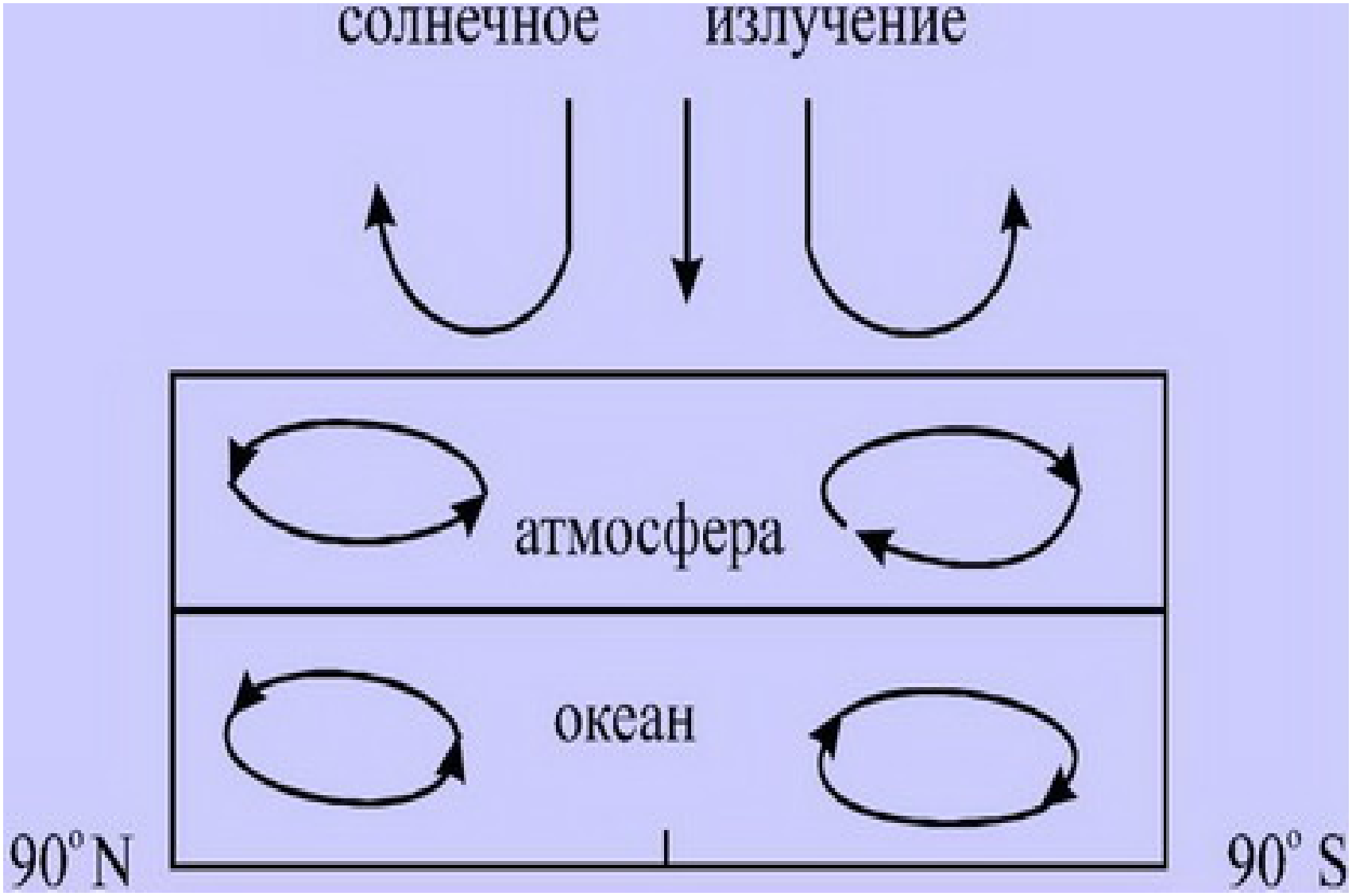
- Диссипативная структура это устойчивое состояние, возникающее в неравновесной среде при условии диссипации (рассеивания) энергии, которая поступает извне. Диссипативная система характеризуется спонтанным появлением сложной, зачастую хаотичной структуры.

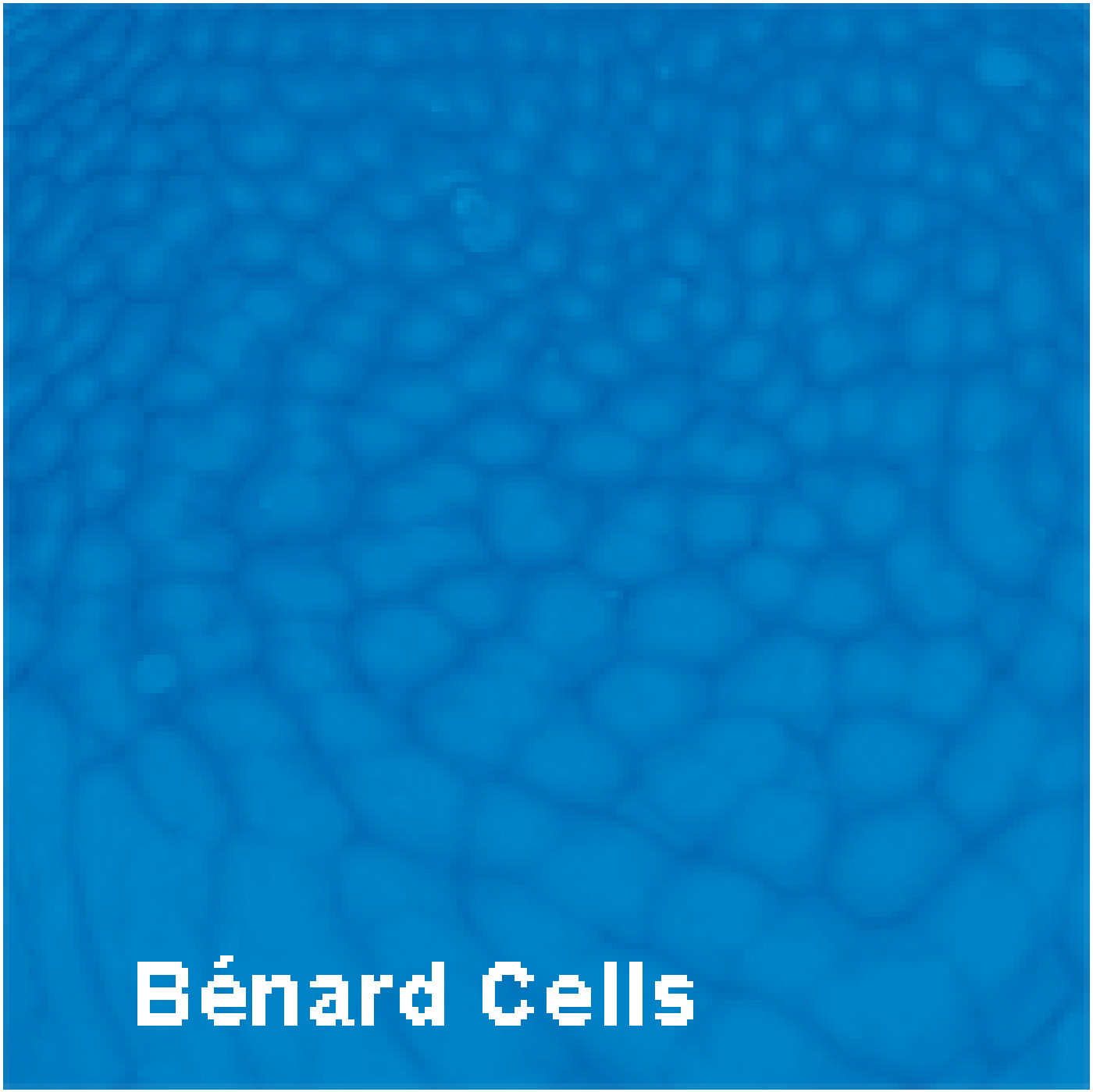




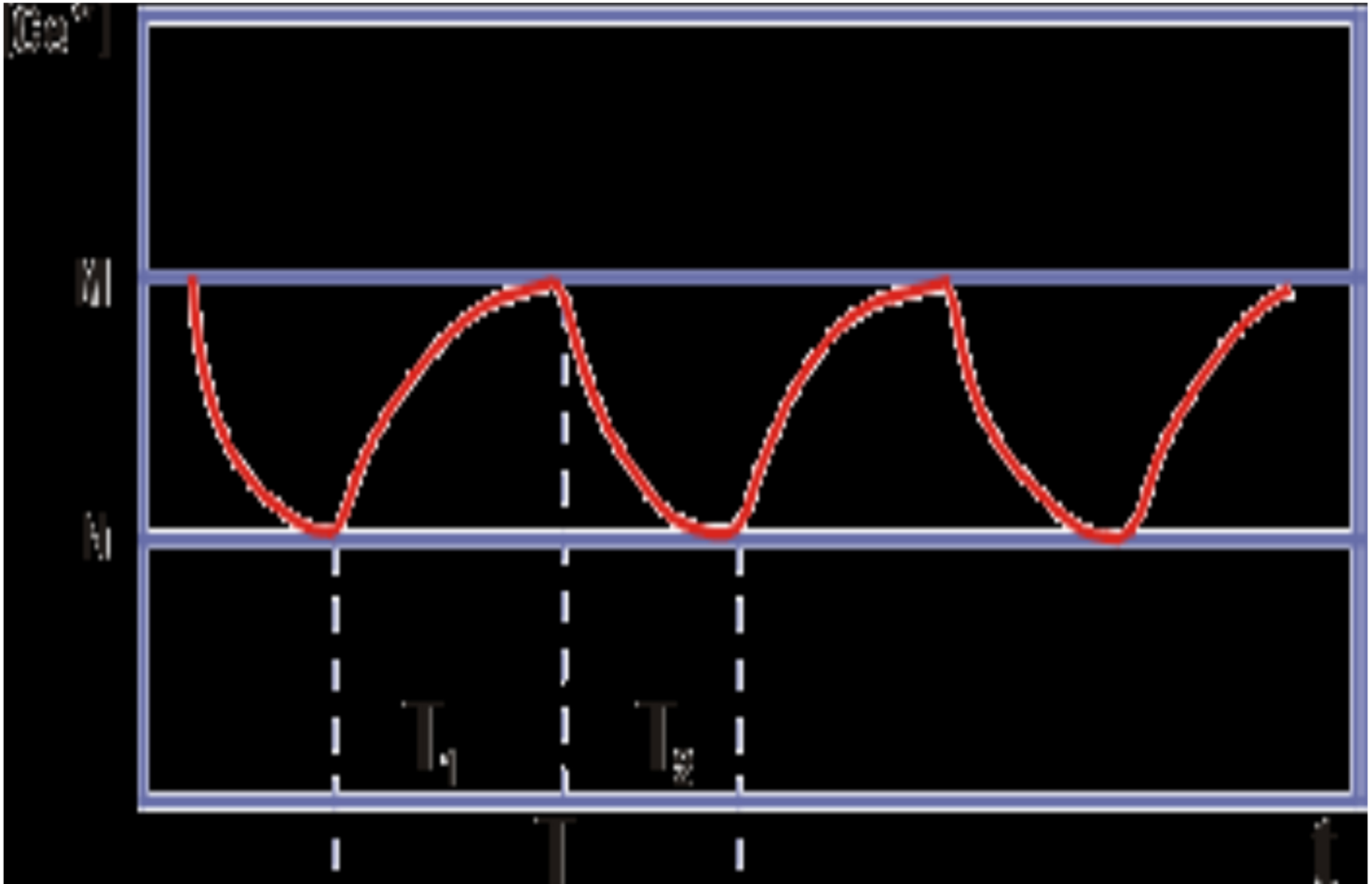

T1 > T2
T2
T1
243

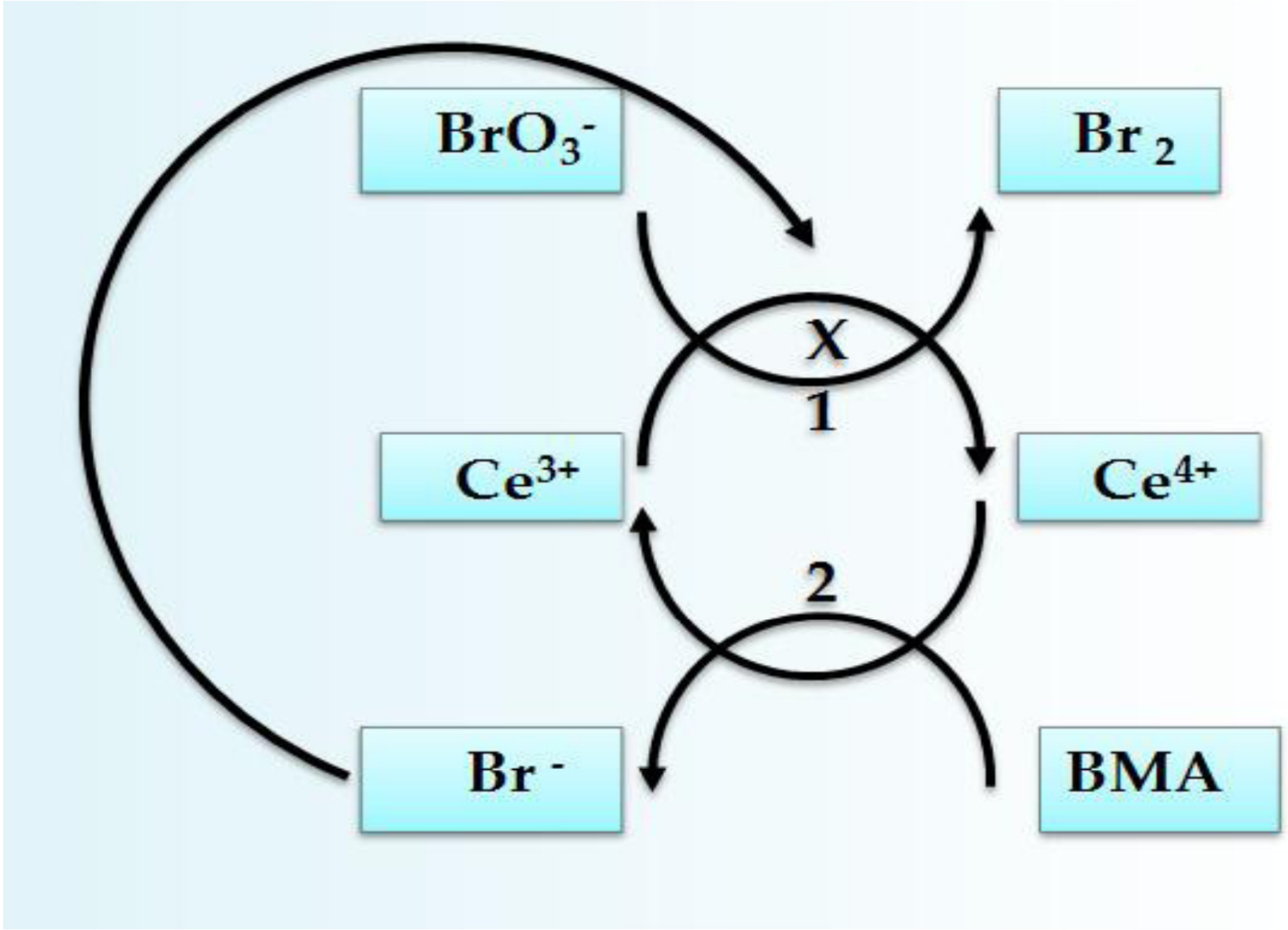

ЯЧЕЙКИ БЕНАРА
САМООРГАНИЗАЦИЯ

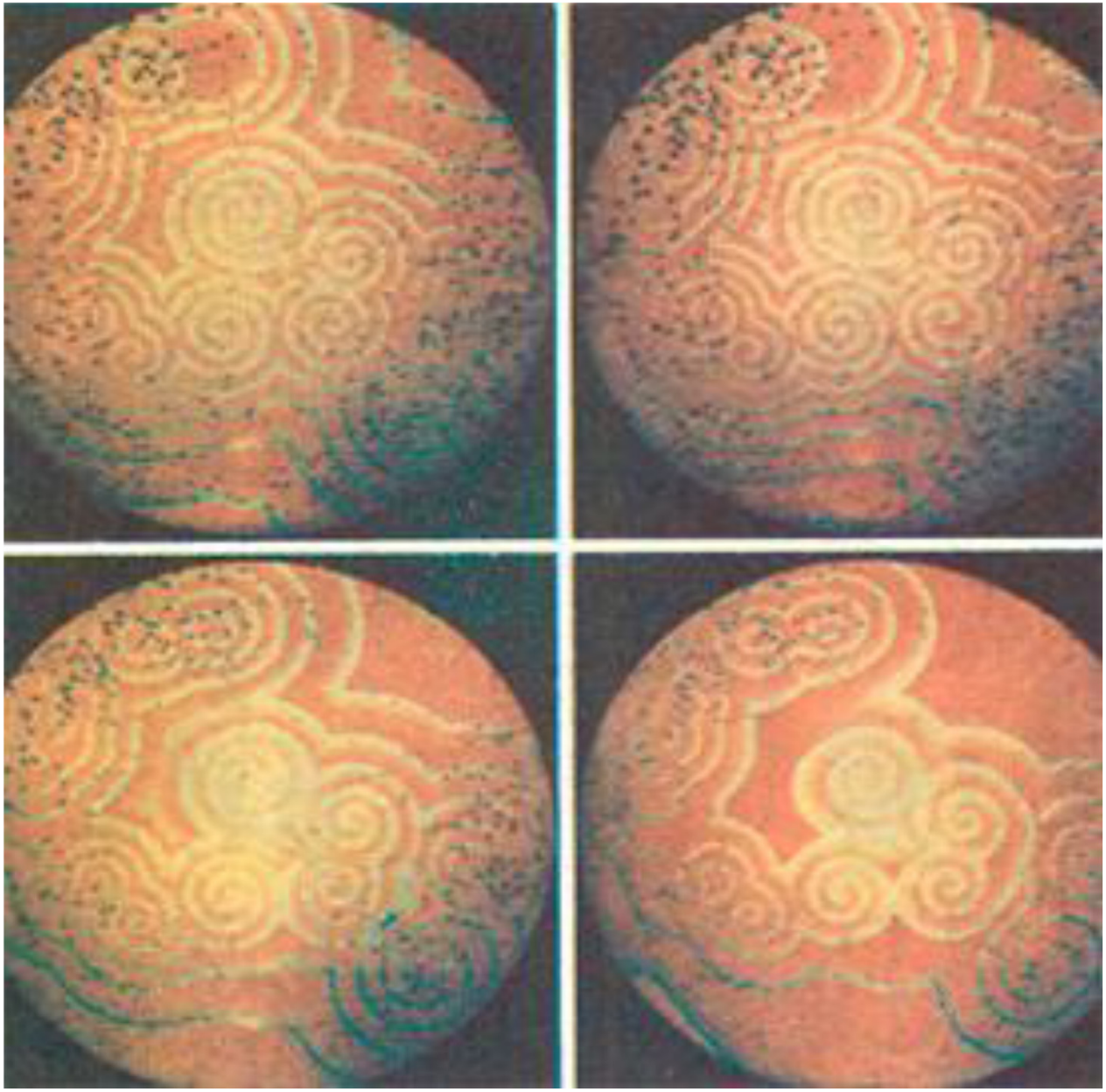

солнечное излучение
атмосфера
океан
90° N
90° S


Bénard Cells

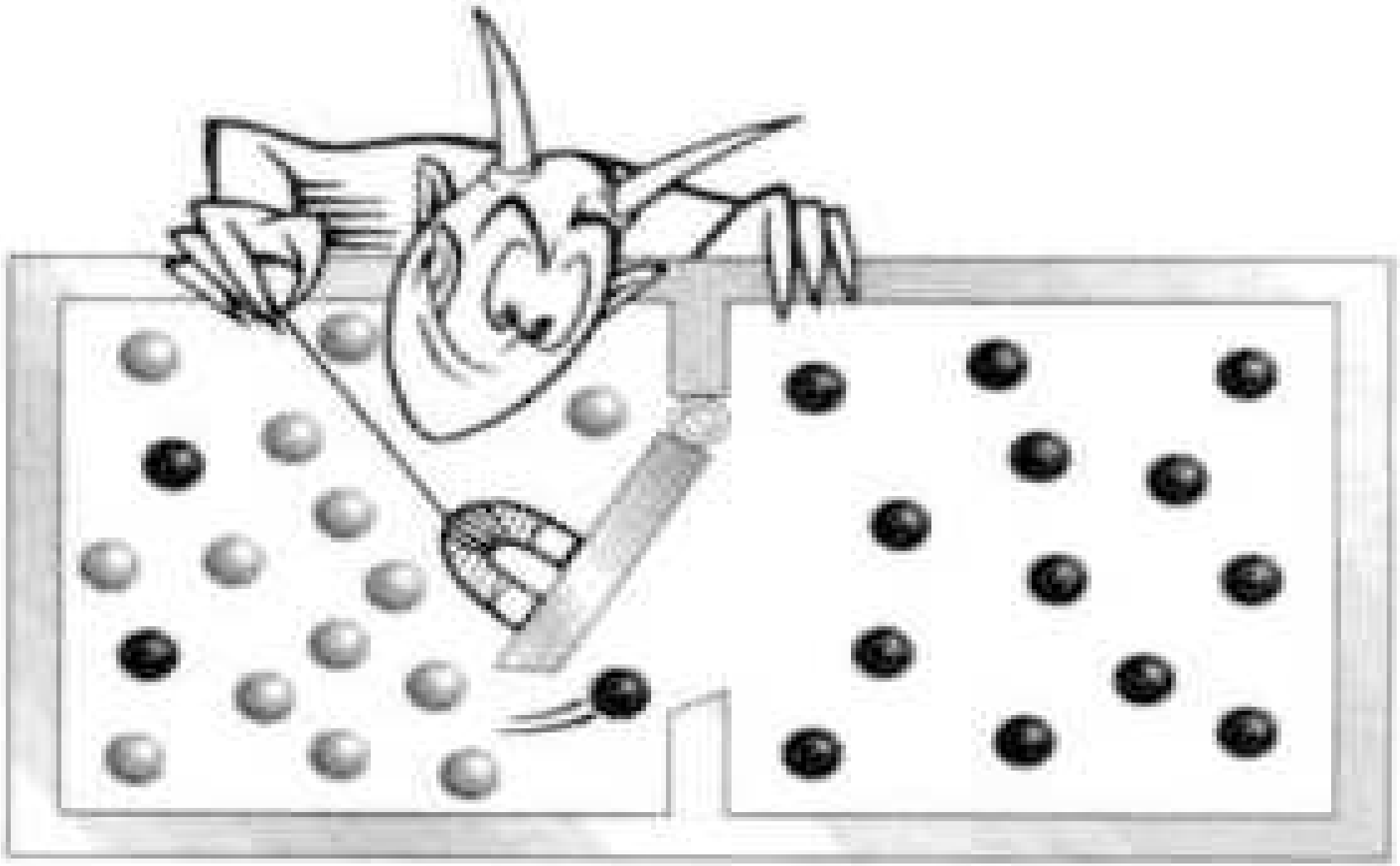
- **Реакция Белоусова - Жаботинского**




BrO_3^-
Br_2
X
1
Ce^{3+}
Ce^{4+}
2
Br^-
BMA



Демон Максвелла



ИНФОРМАЦИЯ И ЭНТРОПИЯ

- **Информация $I = - \log_2 P$**
- В качестве единицы информации I принимают количество информации в достоверном сообщении о событии, априорная вероятность которого равна 1/2.
- **Энтропия $S = k \ln w$**
- где k —постоянная Больцмана ($k = 1.38*10^{-23}$) [Дж*К$^{-1}$] или 8,617 $\times 10^{-5}$эВ·К$^{-1}$
- «Информационное решение парадокса демона Максвелла»
- заключается в том, что информацию нельзя получать бесплатно.
- **Связь между информацией (I) и микросостоянием системы (W) выражается в формуле:**
  - $$I = \log_2 W$$
  - **Энтропия системы в данном макросостоянии, есть количество информации, недостающее до ее полного описания. S (э.е) $= 2,3 * 10^{-24}$ I бит**

- **Энтропия** измеряется в *кал/*(*моль·* К) (энтропийная единица – э. е.) и *дж/*(*моль·К*). При расчётах обычно применяют значения **Энтропия** в *стандартном состоянии,* чаще всего при 298,15 К (25 °С), т. е. S0298; таковы приводимые ниже в статье значения **Энтропия**

  Энтропия увеличивается при переходе вещества в состояние с большей энергией. D S сублимации > DS парообразования >> DS плавления >DS полиморфного превращения. Например, **Энтропия** воды в кристаллическом состоянии равна 11,5, в жидком - 16,75, в газообразном - 45,11 э. е.

  Чем выше твёрдость вещества, тем меньше его **Энтропия**; так, **Энтропия** алмаза (0,57 э. е.) вдвое меньше **Энтропия** графита (1,37 э. е.). Карбиды, бориды и другие очень твёрдые вещества характеризуются небольшой **Энтропия**

Упорядоченность построения многоклеточного организма

- Тело человека содержит примерно 10^{13} клеток. Допустим, что среди них нет ни одной пары одинаковых и что ни одну пару нельзя поменять местами без нарушения функционирования организма. Это значит, что относительное расположение клеток в теле человека однозначно.
- **$I = \log_2(10^{13}) = 10^{13}\log_2 10^{13} = 4 \cdot 10^{14}$ бит**
- понижение энтропии строения организма человека из клеток

  $\delta S = 2{,}3 \cdot 10^{-24} \cdot 4 \cdot 10^{14} = 10^{-9}$ эе (соответствуют энергии испарения 10^{-9} г воды)
- Для создания единственной аминокислотной последовательности белков организма человека необходимо 10^{26} бит.
- Для ДНК необходимо $4{,}3 \cdot 10^{23}$ бит.
- Упорядоченность этих веществ изменяют энтропию на 300 эе, что соответствует испарению 170 г воды.
- ***Ценность биологической информации определяется возможностью ее запоминания, хранения, переработки и дальнейшей передачи для***