فصل ششم
اسپکتروسکوپی رزونانس مغناطیسی الکترون[1] (ESR)

۶-۱. تئوری ESR:

اسپکتروسکوپی رزونانس مغناطیسی الکترون (ESR) از نظر تئوری بسیار شبیه به NMR است. به همین دلیل، جنبه‌های بسیاری از اسپکتروسکوپی ESR بسیار شبیه به NMR می‌باشد. موادی که حاوی الکترون‌های جفت‌نشده هستند، پارامغناطیس نامیده می‌شوند و به همین علت ESR، رزونانس پارامغناطیس الکترون[2] (EPR) نیز نامیده می‌شود.

حرکت وضعی یک الکترون نیز تولید یک میدان مغناطیسی می کند که جهت یابی گشتاور مغناطیسی آن در یک میدان مغناطیسی خارجی به وسیله عدد کوانتایی اسپین الکترون مشخص می‌شود. عدد کوانتایی اسپین الکترون را با علامت M_s نشان می‌دهند و $M_s = \pm\frac{۱}{۲}$ است. شرایط رزونانس توسط رابطه زیر توصیف می‌شود:

$$\Delta E = h\upsilon = g\,\beta\,H \qquad (۱-۶)$$

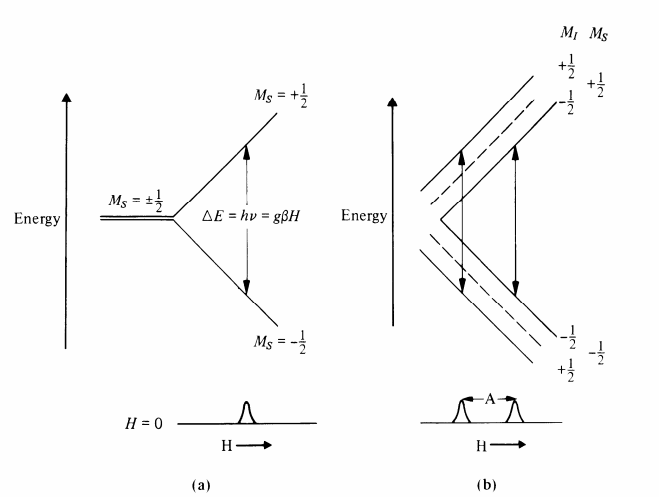
g یک ثابت بدون دیمانسیون است که فاکتور شکاف لاند[3] نامیده می‌شود. فاکتور g، نسبت گشتاور مغناطیسی الکترون به گشتاور زاویه‌ای اسپین الکترون است و از نظر عددی برابر با ۲/۰۰۲۳ می‌باشد. در نمونه‌های پارامغناطیس مختلف، g می‌تواند مقادیر متفاوتی داشته باشد. به علاوه، در نمونه‌های جامد (مثل کریستال‌ها) g می‌تواند بسته به جهت‌یابی گونه‌های پارامغناطیس دارای مقادیر متفاوتی باشد.

β، بوهر مگنتون[4] نامیده می‌شود که از رابطه $eh/۲\pi mc$ بدست می‌آید که در آن، e و m به ترتیب بار و جرم الکترون ، h ثابت پلانک و c سرعت نور است.

شرایط رزونانس الکترون را می‌توان به صورت زیر نشان داد (شکل ۶-۱):

---

[1] Electron Spin Resonance Spectroscopy
[2] Electron Paramagnetic Resonance
[3] Land Splitting Factor
[4] Bohr Magneton

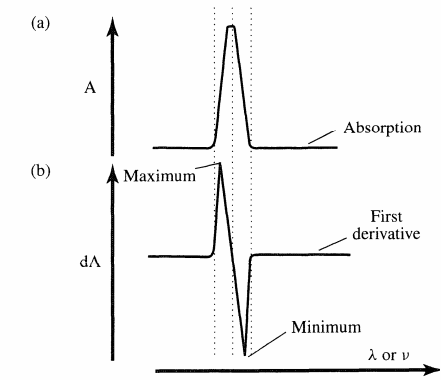


شکل (۶-۱): (a) شرایط رزونانس برای یک الکترون. (b) شرایط رزونانس برای الکترون در یک اتم هیدروژن.

۶-۲. اسپکترومتر *ESR*:

چون گشتاور مغناطیسی یک الکترون جفت نشده تقریبا ۱۰۰۰ بار بزرگتر از گشتاور مغناطیسی پروتون است، دستگاه مورد نیاز جهت مطالعه اسپین الکترون متفاوت از دستگاه NMR می‌باشد. به طور معمول اندازه‌گیری‌های ESR در میدان مغناطیسی حدود ۳۴۰۰ G و فرکانس $۹/۵ \times ۱۰^{۹}$ Hz و یا ۹/۵ GHz انجام می‌شود که چنین فرکانسی در ناحیه مایکروویو واقع می‌شود. اختلاف انرژی (ΔE) بین دو حالت اسپین الکترون در بخش مایکرو ویو طیف الکترومغناطیس واقع شده است در حالی که اختلاف انرژی بین اسپین هسته در بخش امواج رادیویی قرار دارد. این تفاوت موجب می‌شود که بتوان طیف‌های ESR و NMR را مستقل از یکدیگر اندازه‌گیری نمود.

اسپکترومترهای ESR خطوط ESR را به صورت مشتق اول خطوط جذبی نشان می‌دهند. رابطه بین یک خط جذبی و مشتق اول آن به صورت زیر است (شکل ۶-۲):



شکل (۶-۲): طیف ESR به صورت مشتق اول ثبت می‌شود. (a) یک طیف جذبی نمودار A در مقابل λ یا υ است. (b) یک نمودار مشتق اول از طیف جذبی. این نمودار نشان‌دهنده آهنگ تغییرات A است. توجه کنید که نقاط بیشینه و کمینه نمودار مشتق اول مربوط به نقاط نصف ارتفاع نمودار جذب می‌باشد.

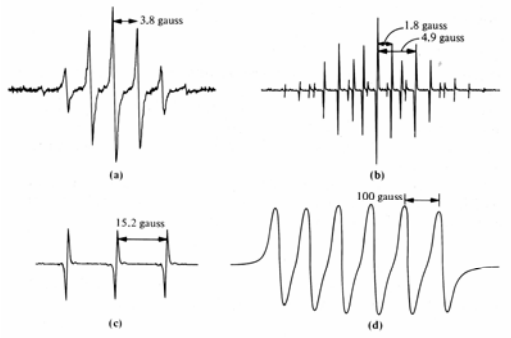
۶-۳. کروموفورهای ESR:

در بیشتر مولکول‌ها، الکترون‌ها به صورت جفت‌شده می‌باشند و هرجفت الکترون طبق اصل طرد پاولی دارای اسپین های مخالف یکدیگر هستند. درنتیجه، چنین مولکول هایی دارای جذب ESR نمی‌باشند. تعداد کمی از مولکول‌ها از قبیل O_2، NO، NO_2 و ClO_2 دارای یک یا چند الکترون جفت نشده در حالت پایه پایدارشان هستند و در نتیجه دارای جذب ESR می باشند. همچنین بسیاری از یون‌های فلزات واسطه از قبیل Fe^{3+}، Mn^{2+} و Cu^{2+} دارای الکترون‌های جفت‌نشده d هستند و مطالعه بر روی طیف ESR این یون‌های پارامغناطیس اهمیت ویـژه‌ای دارد چون این یون‌ها به عنوان کوفکتور برای پروتئین‌ها و آنزیم‌های بسیاری عمل می کنند. توجه داشته باشید اگر چه تمام یون‌های فلزات واسطه دارای الکترون‌های جفت نشده می‌باشند ولی همیشه نمی‌توان آزمایشات ESR را برروی این یون‌ها انجام داد. طبق تئوری کرامر[۵]، مناسب‌ترین یون‌ها جهت مطالعات ESR آنهایی می‌باشند که حاوی تعداد الکترون‌های جفت‌نشده فرد هستند. هر چند تنها یک انتقال و در نتیجه تنها یک خط برای الکترون‌های منفرد مشاهده می‌شود، ولی طیف ESR اتم‌های هیدروژن دارای دو خط با شدت یکسان می باشد (شکل ۶-۱-b). این شکافته شدن، شکافته شدن هایپرفاین[۶] نامیده می شود که ناشی از

[۵] Kramer
[۶] Hyperfine Splitting

میان‌کنش مغناطیسی بین الکترون جفت‌نشده و هسته است. به واسطه قواعد انتخابی تنها دو انتقال مجاز محسوب می‌شوند: انتقالاتی که در آنها؛ $\Delta M_I = ۰$ و $\Delta M_s = \pm ۱$ باشد.

تفسیر قواعد انتخابی این است که حرکت یک هسته بسیار کندتر از حرکت یک الکترون است به نحوی که اسپین هسته‌ای برای جهت‌یابی دوباره زمان کافی را در اختیار ندارد. جدایی بین دو خط توسط ثابت شکافته‌شدن هایپرفاین[۷] (A) داده می‌شود. به طور کلی تعداد خطوط هایپرفاین را می‌توان توسط رابطه $۲nI + ۱$ پیش بینی نمود که در این عبارت، n برابر با تعداد پروتون‌های از یک نوع یا معادل و I اسپین هسته‌ای است. شکل (۶-۳) نشان‌دهنده طیف ESR چند رادیکال است.



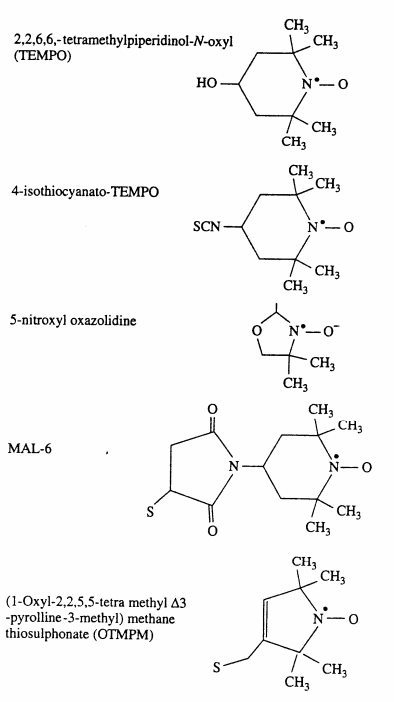
شکل (۶-۳): طیف ESR (a) آنیون رادیکال بنزن، (b) آنیون رادیکال نفتالین، (c) رادیکال دی- ترسیو- بوتیل نیتروکساید و (d) یون $Mn^{۲+}$ در آب.

۶-۴. کاربردهای ESR:

همان طور که گفته شد، ESR تکنیک مفیدی در مطالعه الکترون های جفت نشده است. هر فرآیندی که در طی آن چنین گونه‌هایی بوجود بیاید را می‌توان توسط ESR تعقیب نمود. به همین دلیل از این تکنیک به طور معمول و وسیع در مطالعات تولید رادیکال های آزاد و فرآیندهای بیولوژیکی که مستلزم فلزات واسطه می‌باشند، استفاده می‌شود. مثال‌های خوب در این زمینه شامل مطالعه بر روی زنجیره انتقال الکترون در میتوکندری، مکانیزم سینتیکی متالوآنزیم ها و فرآیند فوتوسنتز در سلول‌های گیاهی است. علاوه بر مطالعه نمونه‌های پارامغناطیس طبیعی، می‌توان گونه‌های

[۷] Hyperfine Splitting Constant

پارامغناطیس غیربیولوژیک را نیز به مولکول های بیولوژیک متصل نمود. این نشانگرهای اسپین[۸]، مولکول های پایداری هستند که به طور طبیعی حاوی الکترون های جفت نشده‌اند. نمونه هایی از این مولکول‌های نشانگر اسپین را در شکل (۶-۴) می‌توانید ببینید:

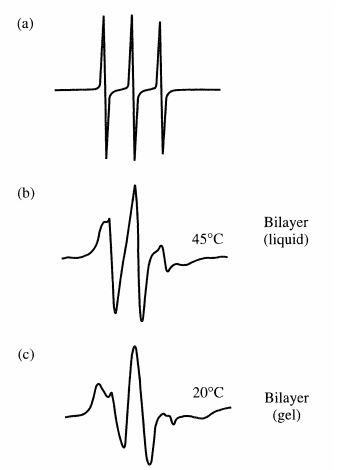


شکل (۶-۴): نشانگرهای اسپین مولکول های غیربیولوژیکی هستند که حاوی یک الکترون جفت نشده اند. TEMPO یکی از پرمصرف‌ترین نشانگرهای اسپین می‌باشد و مشتق ۴- ایزوتیوسیانات آن برای نشان‌دار کردن پروتئین‌ها در N-ترمینالشان مناسب است. ۵- نیتروکسیل اکسازولیدین برای نشان‌دار کردن اسیدهای چرب موجود در فسفولیپیدها، مناسب می‌باشد در حالی که مشتق متان‌تیوسولفونات OTMPM برای نشان‌دار کردن گروه تیول موجود در سیستئین بکار می‌رود.

اگر این مولکول‌ها به یک جایگاه منحصربفرد در ساختمان پروتئین‌ها و یا غشاءها متصل شوند، آنگاه می‌توانند به عنوان مولکول‌های گزارشگر عمل نمایند. الکترون‌های جفت نشده به ویژه، نسبت به آزادی

[۸] Spin Labels

جابجایی‌شان حساسند. هر چه جابجایی مرکز پارامغناطیس محدودتر باشد، خطوط ESR مربوط به این مرکز پهن‌تر می‌شود. در شکل (۶-۵) اثر تثبیت[۹] را بر روی طیف ESR یک نشانگر اسپین می‌توانید ببینید:



شکل (۶-۵): اثر تثبیت بر طیف ESR . یک پروتئین با ۴- ایزوتیوسیانو-TEMPO نشان‌دار شده است. طیف (a) نشانگر اسپین آزاد، (b) پروتئین نشان‌دار شده در دو لایه لیپیدی در $45\ ^{\circ}C$ و (c) پروتئین نشان‌دار شده در دو لایه لیپیدی در $20\ ^{\circ}C$. دو لایه فسفولیپیدی در $41\ ^{\circ}C$ متحمل انتقال ژل-مایع می‌شود. توجه نمایید که خطوط ESR با افزایش میزان تثبیت پهن‌تر می‌شود.

جابجایی مولکول‌های بیولوژیک در اثر کریستالیزه شدن، پایین آوردن دما، افزایش ویسکوزیته (مثلا به وسیله افزودن گلیسرول) و جای گرفتن در دو لایه لیپیدی محدود می شود. یکی از مفیدترین کاربردهای ESR شناسایی و تعیین تحرک دینامیک مولکول هایی از قبیل فسفولیپیدها، پپتیدها، پروتئین‌ها و داروها در سیستم‌های بیولوژیک به ویژه غشاءهاست. تغییر در تحرک (به عنوان مثال، به واسطه اتصال یک پروتئین به سطح سلول) می‌تواند توسط مطالعه اثرات آن بر روی طیف ESR مورد

[۹] Immobilization

تعقیب قرار گیرد. ESR همچنین ابزار مناسبی را برای شناسایی نواحی عبور کننده از غشاء[۱۰] در پروتئین‌های غشایی به وسیله تکنیک نشاندار کردن اسپین هدایت شده[۱۱] فراهم می‌کند.

می‌توان با استفاده از جهش‌زایی هدایت‌شده[۱۲]، باقی‌مانده‌های اسیدهای آمینه را با باقی‌مانده‌های سیستئین تعویض نمود. سپس می‌توان با استفاده از نشانگرهای اسپین ویژه سیستئین و اتصال آنها به این باقی‌مانده‌های سیستئین، جای‌گرفتن پروتئین‌های جهش‌یافته را در یک دو لایه فسفولیپیدی مورد بررسی قرار داد. وقتی که چنین باقی‌مانده جهش‌یافته‌ای در یک ناحیه عبور کننده از غشاء قرار می‌گیرد، اثر پهن‌شدن به وضوح در طیف ESR آن مشاهده می‌شود. چنین آزمایش‌هایی می‌توانند تائیدکننده پیش‌بینی‌های حاصل از آلگوریتم‌های کامپیوتری باشند.

[۱۰] Transmembrane Domains
[۱۱] Site-Directed Spin Labelling
[۱۲] Site-Directed Mutagenesis