

Biofizyka II

przedmiot obieralny
Materiały pomocnicze do wykładów
prof. dr hab. inż. Jan Mazerski

5. SPEKTROSKOPIA EPR

Spektroskopia elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR, ang. *Electronic Paramagnetic Resonance*) jest jedyną znaną dotychczas techniką pomiarową pozwalającą badać bezpośrednio układy (w tym układy biologiczne) zawierające wolne rodniki. Zjawisko rezonansu paramagnetycznego występuje w układach zawierających niesparowane elektrony. Niesparowane elektrony występują w wielu tworach chemicznych, m.in. w:

- wolnych rodnikach
- jonorodnikach
- jonach metali przejściowych
- stanach tripletowych wzbudzonych cząsteczek, np. $^3\text{O}_2$
- cząsteczkach obojętnych o niezamkniętych powłokach elektronowych, takich jak NO czy NO_2 .

Twory takie występują zarówno w układach nieożywionych jak i biologicznych.

Twory zawierające niesparowane elektrony występują w układach biologicznych zarówno na poziomie biopolimerów:

- metaloproteiny
- flawoproteiny
- melaniny

jak i jako pośrednie produkty przemian biochemicznych takich jak:

- fotosynteza
- fosforylacja oksydacyjna
- metabolizm utleniająco-redukujący.

Do badania tych układów wykorzystuje się spektroskopię EPR.

Technikę tą można również stosować do badania układów, w których normalnie nie występują centra paramagnetyczne. Wymaga to wprowadzenia ich sztucznie w postaci tzw. [zinczników spinowych](#). Jako znaczniki spinowe stosuje się nieduże podstawniki lub cząsteczki posiadające trwałe centra paramagnetyczne. Najczęściej stosuje się znaczniki spinowe posiadające ugrupowanie nitroksylowe:



Znaczniki spinowe mogą być połączone z badanym układem:



- [kowalencyjnie](#) poprzez odpowiednie reaktywne grupy funkcyjne, lub

- **fizykochemiczne** poprzez silne oddziaływania międzycząsteczkowe, np. hydrofobowe.

Rodniki powstające jako pośrednie produkty przemian biochemicznych są zwykle nietrwałe i ich badanie jest bardzo utrudnione. Stosuje się wtedy tzw. **pułapkowanie spinowe** polegające na utworzeniu przez powstały rodnik adduktu paramagnetycznego o długim czasie życia. Najczęściej powstający addukt posiada ugrupowanie nitroksylowe.

5.1 Podstawy fizyczne

Układy z niesparowanym elektronem posiadają wypadkowy spinowy moment magnetyczny μ różny od 0. W nieobecności pola magnetycznego orientacje wektorów momentów magnetycznych poszczególnych centrów paramagnetycznych są chaotyczne. W zewnętrznym polu magnetycznym wektory te przyjmować mogą tylko dwie orientacje:

- zgodną z polem zewnętrznym , oraz
- przeciwną do zewnętrznego pola .

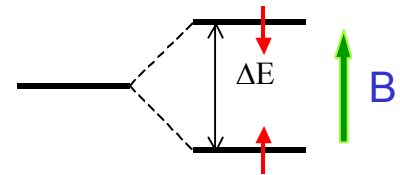
Orientacje te różnią się stanem energetycznym: orientacja zgodna posiada niższą energię.

Tak więc w zewnętrznym polu magnetycznym niesparowany elektron występować może na dwóch poziomach energetycznych. Poziomy te różnią się energią ΔE równą:

$$\Delta E = gB\mu_B$$

gdzie: g - wsp. giromagnetyczny elektronu B – indukcja zewn. pola magnetycznego

m_B – magneton Bohra (stała)



5.1.1 Warunek rezonansu

Przeniesienie niesparowanego elektronu na wyższy poziom energetyczny jest możliwe tylko wtedy, gdy elektron pochłonie kwant promieniowania elektromagnetycznego o energii dokładnie równej różnicy poziomów energetycznych:

$$gB\mu_B = h\nu$$

Przy stosowanych zwykle wartościach indukcji magnetycznej B jest to energia odpowiadająca promieniowaniu mikrofalowemu. Wartość indukcji spełniającą powyższy **warunek rezonansu** obliczamy ze wzoru:

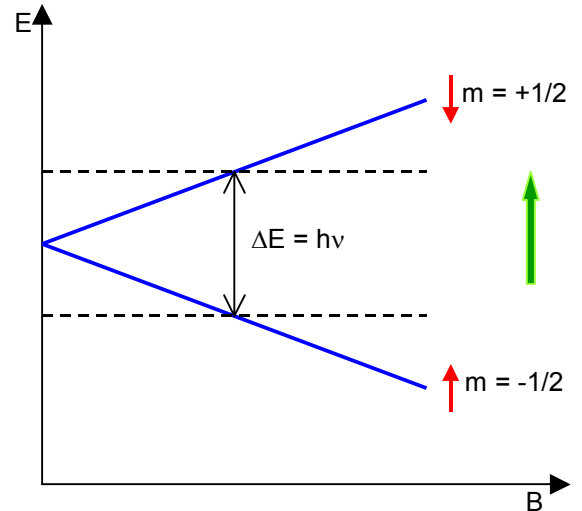
$$B_{\text{rez}} = \frac{h\nu}{g\mu_B}$$

5.1.2 Absorpcja rezonansowa

Ze względów technicznych widma EPR wykonuje się przy stałej częstotliwości generatora mikrofal i zmiennej indukcji magnetycznej. Ze wzrostem indukcji zewnętrznego pola magnetycznego rośnie liniowo różnica poziomów energetycznych. Gdy różnica ta zrówna się z energią kwantu

promieniowania mikrofalowego dochodzi do absorpcji energii przez elektrony znajdujące się na niższym poziomie energetycznym.

Elektron który zaabsorbował kwant o częstotliwości rezonansowej przechodzi na wyższy poziom energetyczny. Wzbudzony elektron wracając do stanu podstawowego oddaje nadmiar energii w postaci promieniowania mikrofalowego o tej samej częstotliwości. Promieniowanie to jest wykrywane przez układ detektorów i po wzmocnieniu służy do sporządzenia widma EPR.

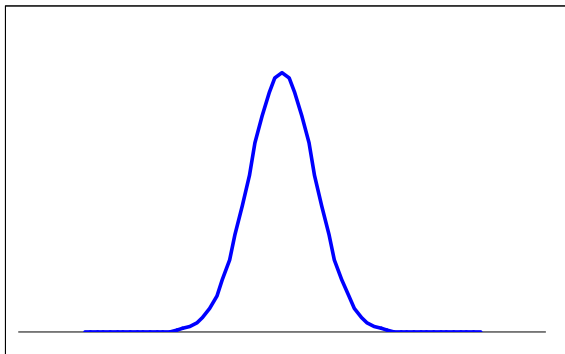


5.1.3 Charakterystyka widma

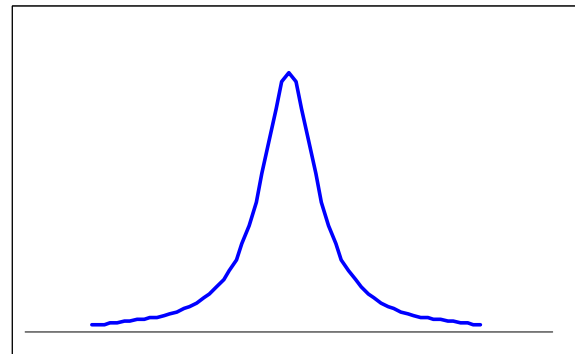
Wymogi kwantowo-chemiczne powodują, że warunek rezonansu „rozmywa się” do postaci pasma rezonansowego. Maksimum pasma odpowiada teoretycznej częstotliwości rezonansowej. Szerokość pasma rezonansu zależy od:

- czasu relaksacji stanu wzbudzonego oraz
- stopnia lokalizacji gęstości niesparowanego elektronu w cząsteczce.

Im krótszy czas relaksacji oraz silniejsza lokalizacja niesparowanego elektronu tym większa szerokość pasma.



krzywa Gaussa

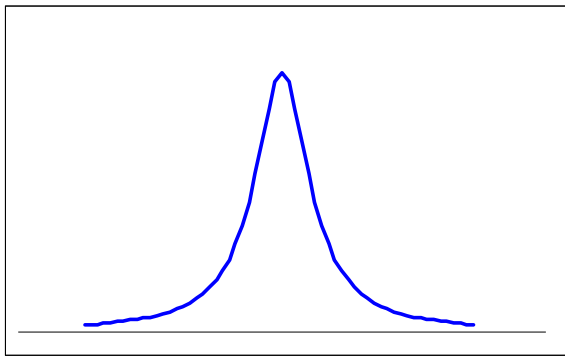


krzywa Lorentza

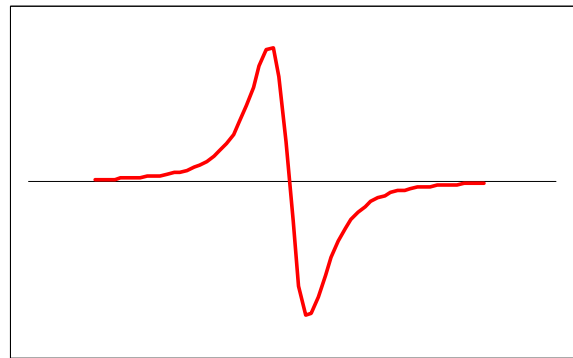
Pojedyncze pasma rezonansu mogą mieć kształt zbliżony do krzywej Gaussa lub krzywej Lorentza.

Szerokie pasma, zwłaszcza o kształcie krzywej Lorentza, mogą zachodzić na siebie, co utrudnia określenie szczegółów widma. Dlatego powszechnie przyjętą praktyką jest zapis widma EPR nie w skali intensywności (lewy panel), lecz w formie pierwszej pochodnej (prawy panel).

Położenie miejsca zerowego 1. pochodnej odpowiada położeniu maksimum na widmie, czyli indukcji rezonansowej. Łatwo jest też określić szerokość pasma. Jest ona równa odległości minimum i maksimum na wykresie pochodnej.



widmo



1. pochodna

Jeżeli w sąsiedztwie niesparowanego elektronu pojawi się inne centrum paramagnetyczne, to dochodzi do sprzężenia i pojawiają się dodatkowe poziomy energetyczne. Centrum tym może być:

- inny niesparowany elektron – mówimy wtedy o tzw. [sprzężeniu subtelnym](#)
- jądro paramagnetyczne (np. proton) – występuje wtedy tzw. [sprzężenie nadsubtelne](#).

Warunkiem wystąpienia obu rodzajów sprzężeń jest niewielka odległość sprzęgających się centrów paramagnetycznych.

5.1.4 Subtelna struktura widma

Jeżeli dwa niesparowane znajdują się dostatecznie blisko siebie, to dochodzi do oddziaływania ich spinów. Układ taki może występować w dwóch orientacjach:

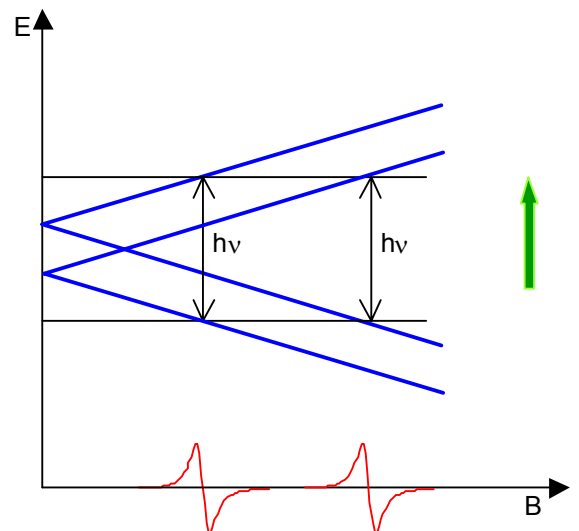
- obydwa spiny mają taki sam zwrot (układ równoległy)
- spiny małą różne znaki (są sparowane).

Orientacji o sparowanych spinach odpowiada przy tym niższa energia nawet w nieobecności zewnętrznego pola magnetycznego.

Przyłożenie zewnętrznego pola magnetycznego powoduje, że każdy z układów spinowych przyjmuje jedną z dwóch orientacji względem wektora indukcji tego pola. Między tymi orientacjami występuje różnica energii proporcjonalna do indukcji pola magnetycznego. Napromieniowanie próbki mikrofalami o energii $h\nu$ może doprowadzić do wystąpienia absorpcji rezonansowej i wzbudzenia układów spinowych. Nie każde przejście energetyczne w takim układzie spinowym jest dozwolone. Przejścia dozwolone muszą spełniać tzw. [regułę wyboru](#) która w przypadku sprzężenia subtelnego ma postać:

$$\Delta m_s = 1$$

Oznacza to, że dozwolone są tylko przejścia przy których dochodzi do zmiany orientacji jednego ze spinów układu.



W rozpatrywanym układzie warunek rezonansu wystąpi przy dwóch wartościach indukcji pola magnetycznego. Taki dublet pasm rezonansowych nosi nazwę **struktury subtelnej** widma.

5.1.5 Nadsubtelna struktura widma

Jeżeli orbital niesparowanego elektronu znajduje się w pobliżu jądra paramagnetycznego (posiadającego niezerowy spin jądrowy m_I), to powstaje specyficzny układ spinowy znajdujący swoje odbicie w strukturze widma. W układach biologicznych jądrami paramagnetycznymi są najczęściej atomy wodoru ^1H i azotu ^{14}N .

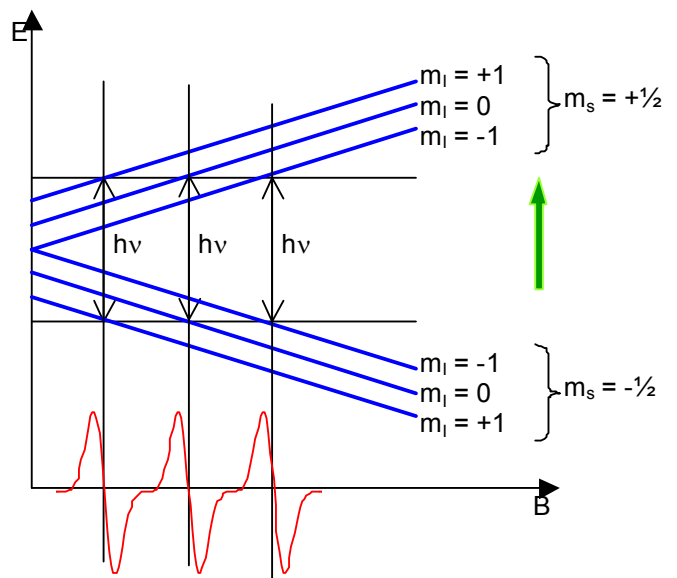
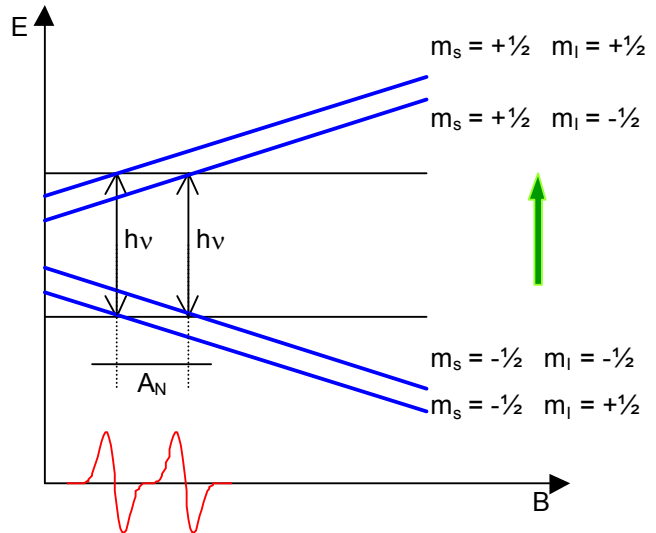
Rozważmy układ zawierający niesparowany elektron i 1 jądro o spinie $m_I = \frac{1}{2}$. Jądrem tym może być na przykład atom wodoru. Układ taki może występować w dwóch stanach energetycznych. W stanie o niższej energii spin elektronu i jądra mają przeciwne znaki (układ sparowany), a w stanie o wyższej energii takie same. W obecności zewnętrznego pola magnetycznego stany energetyczne spinu elektronowego rozsuwają się proporcjonalnie do indukcji pola.

W układzie takim obowiązują dwie reguły wyboru:

$$\begin{cases} \Delta m_S = 1 \\ \Delta m_I = 0 \end{cases}$$

Z analizy zamieszczonego powyżej diagramu wynika, że absorpcja rezonansowa zachodzić może przy dwóch wartościach indukcji pola. Takie rozszczepienie pasma nazywamy strukturą nadsubtelną widma EPR.

Rozważmy teraz układ zawierający niesparowany elektron i jądro paramagnetyczne o $m_I = 1$. Jądro o takim spinie posiada np. atom azotu. Jądro o spinie 1 występować może w trzech stanach spinowych: $I = -1, 0$ i $+1$. Rozpatrywany układ występować może w trzech geometriach. W zewnętrznym polu magnetycznym dochodzi jeszcze orientacja układu jako całości zależna liniowo od indukcji pola. Reguły wyboru są tu identyczne jak w poprzednim przykładzie.



W efekcie struktura nadsubtelna widma zawiera trzy położone blisko siebie pasma absorpcji o intensywnościach względnych jak 1:1:1.

Istnieje wzór opisujący krotność multipletu struktury nadsubtelnej widma EPR w zależności od spinu jądra:

$$k = 2I + 1$$

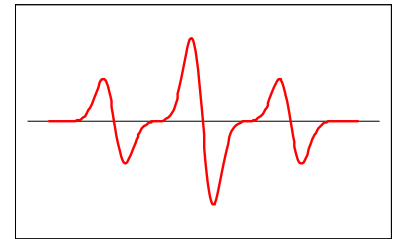
Wzór ten można stosować tylko dla układu zawierającego jedno jądro paramagnetyczne oddziałujące z niesparowanym elektronem. Układy zawierające więcej niż jedno takie jądro wymagają bardziej skomplikowanej analizy. Przykłady dwóch takich analiz podane są

Rozważmy układ zawierający niesparowany elektron i dwa **równocenne magnetycznie** jądra paramagnetyczne o spinie $I = \frac{1}{2}$. Ten układ jąder może występować w 4 orientacjach:

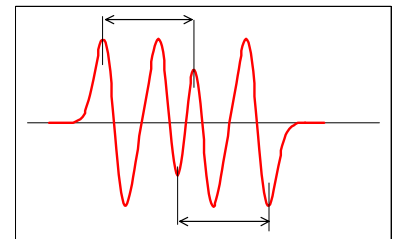
- | | |
|--------------------|-----------------|
| 1) $m_I(1) = +1/2$ | $m_I(2) = +1/2$ |
| 2) $m_I(1) = +1/2$ | $m_I(2) = -1/2$ |
| 3) $m_I(1) = -1/2$ | $m_I(2) = +1/2$ |
| 4) $m_I(1) = -1/2$ | $m_I(2) = -1/2$ |

Jeżeli jądra są magnetycznie równocenne, to orientacje 2) i 3) są nieodróżnialne. Każdy stan spinowy elektronu rozszczepiany jest więc

na trzy poziomy nadsubtelne o obsadzeniu 1:2:1. Oznacza to, że struktura nadsubtelna widma EPR zawierać będzie triplet o względnej intensywności sygnałów jak 1:2:1 (rysunek powyżej).



Jeżeli jądra nie są równocenne magnetycznie, to orientacje 2) i 3) są rozróżnialne i struktura nadsubtelna zawierać będzie dublet dubletów. Teoretycznie intensywność każdej składowej multipletu powinna być taka sama, jednak często ze względu na nakładanie się sygnałów otrzymuje się skomplikowany multiplet o zróżnicowanych intensywnościach składowych (rysunek obok).

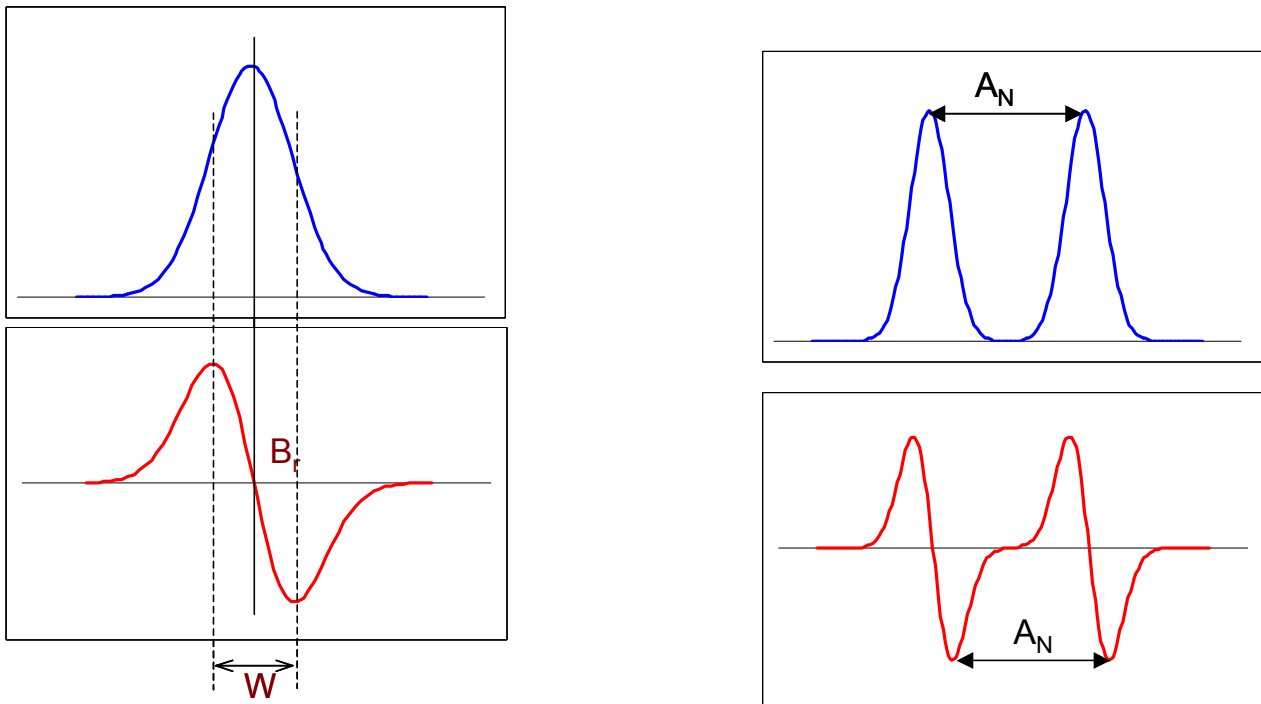


5.2 Analiza widm

Przy analizie widm EPR należy określić szereg wielkości charakteryzujących widmo. Zwykle bierze się pod uwagę:

- położenie rezonansu, B_r
- szerokość pasma rezonansu, W
- kształt pasma
- obecność struktury subtelnej lub nadsubtelnej
- intensywność pasma (gęstość centrów paramagnetycznych)

Wielkości te najdokładniej można określić z widm zapisanych w postaci ich 1. pochodnych (rysunki poniżej).



Pewne wątpliwości budzić może ustalenie intensywności pasma na podstawie jego 1. pochodnej. Problem ten można rozwiązać dwojako:

- jeżeli składowe multipletów nie zachodzą na siebie, to różnica minimum i maksimum 1. pochodnej jest proporcjonalna do intensywności pasma
- jeżeli pasma nachodzą na siebie, to należy wykonać dwukrotne całkowanie sygnału – otrzymamy krzywą schodkową pozwalającą na odczytanie intensywności poszczególnych pasm.

5.3 Próbniki spinowe

Układy w których nie występują centra paramagnetyczne można analizować z zastosowaniem techniki EPR jeżeli zastosuje się tzw. **próbniki spinowe**. Są to trwałe rodniki sztucznie wprowadzone do badanego układu. Aby uzyskać jak najwięcej informacji w formie łatwej do analizy próbnikom takim stawia się zwykle dosyć ostre wymagania:

- muszą charakteryzować się dużą stabilnością
- mieć małe rozmiary, aby nie deformować badanego układu
- powinny być niewrażliwe na przemiany biochemiczne pod wpływem badanego układu
- powinny generować niezbyt skomplikowane widma EPR
- widma te powinny być wrażliwe na lokalne warunki panujące w układzie

Wszystkie te wymagania spełniają próbki zawierające układ nitroksydowy: $\text{N}^{\cdot-}\text{O}$.

5.3.1 Próbniki nitroksydowe

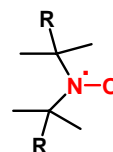
Układ nitroksydowy wbudować można w wiele różnych struktur chemicznych. Jest to bardzo wygodne z punktu widzenia badań biofizycznych. Jednakże aby uzyskać przydatny do badań znacznik budowa chemiczna otoczenia znacznika musi spełniać szereg wymagań.

Warunkiem stabilności centrum paramagnetycznego jest brak atomów wodoru bezpośrednio związanych z atomem azotu układu nitroksydowego. Najczęściej bezpośrednio z atomem azotu



związane są atomy węgla. Zapewnia to dużą stabilność rodnika. Atom azotu na którym zlokalizowana jest większość gęstości niesparowanego elektronu jest jądrem paramagnetycznym o liczbie spinowej $I = 1$. Oznacza to, że w widmie EPR rodników nitroksydowych wystąpi triplet struktury nadsubtelnej. Obecność struktury nadsubtelnej komplikuje widmo, ale z drugiej strony stała sprzężenia nadsubtelnej A_N jest bardzo wrażliwa na zmiany lokalnego otoczenia. Może więc być bardzo dogodnym próbnikiem tych zmian.

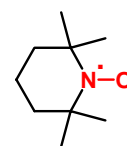
Aby nadmiernie nie komplikować struktury widma większość znaczników nie posiada atomów wodoru na węglach α sąsiadujących z nitroksydowym atomem azotu. Ponieważ atom wodoru jest również jądrem paramagnetycznym, więc jego obecność (a szczególnie obecność dwóch takich atomów) prowadzi do bardzo skomplikowanych multipletów struktury nadsubtelnej.



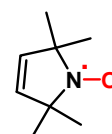
Aby ograniczyć liczbę rotacyjnych stopni swobody znaczniki spinowe mają zwykle strukturę cykliczną.

Powszechnie stosowane centra paramagnetyczne zawierające ugrupowanie nitroksydowe należą do kilku klas struktur chemicznych:

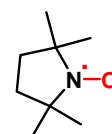
po pochodne 2,2,6,6-tetrametylo**piperydyny**



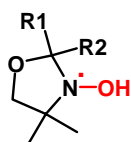
po pochodne 2,2,5,5-tetrametylo**piroliny**



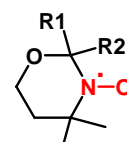
po pochodne 2,2,5,5-tetrametylo**pirolidyny**



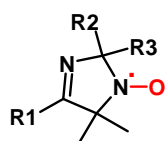
W użyciu są również znaczniki nitroksydowe o strukturze heterocyklicznej, takie jak:



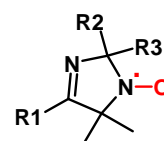
po pochodne **oksazolidyny**



po pochodne **oksazydyny**



po pochodne **imidazolidyny**



po pochodne **imidazolidyny**

Próbniki spinowe stosowane w badaniach biofizycznych podzielić można na: i) **znaczniki spinowe** oraz ii) **sondy spinowe**.

5.3.2 Znaczniki spinowe

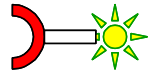
Znaczniki spinowe są to centra paramagnetyczne przyłączone do wybranych elementów biopolimerów, np. grup tiolowych białek. Znaczniki mogą wiązać się z badanym układem poprzez:

- tworzenie wiązań kowalencyjnych,
- tworzenie kompleksów, lub
- oddziaływania fizykochemiczne.

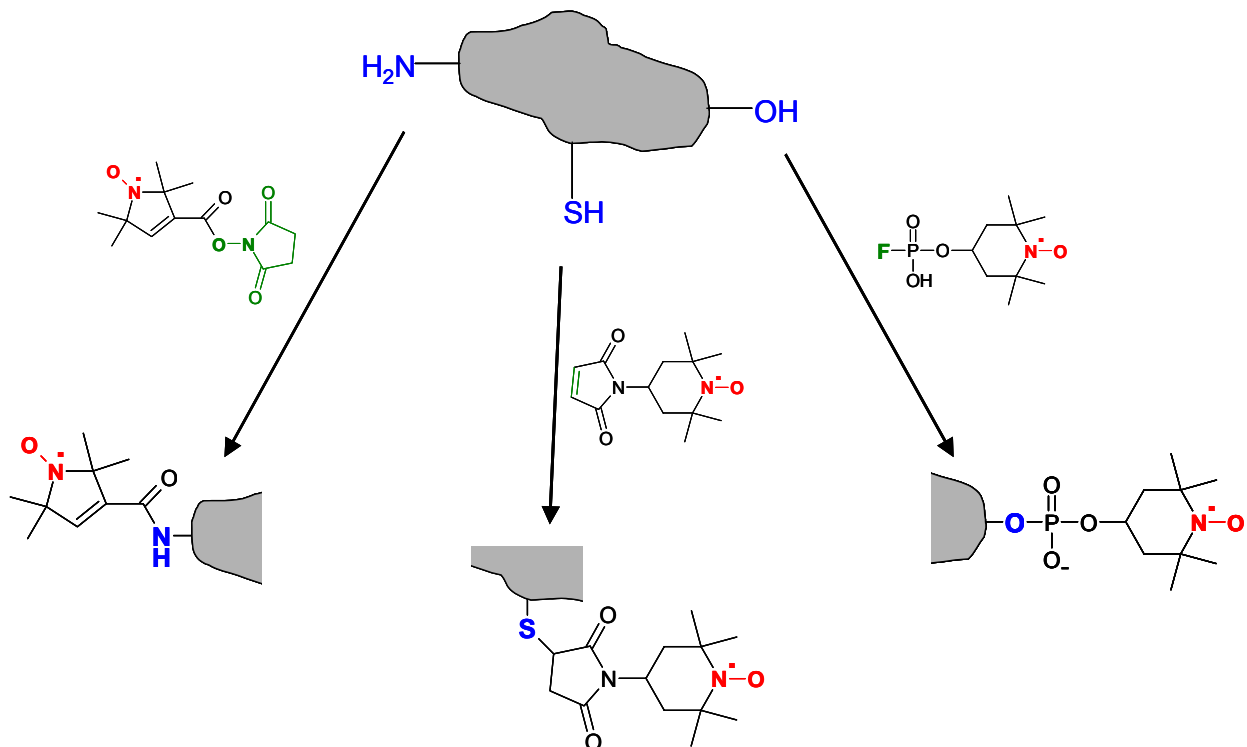
Zwykle najbardziej powtarzalne wyniki uzyskuje się dzięki utworzeniu wiązań kowalencyjnych.

Odczynniki umożliwiające kowalencyjne związanie znacznika z biopolimerem zawierają dwa centra:

- centrum reaktywne umożliwiające utworzenie wiązania kowalencyjnego, oraz
- centrum paramagnetyczne (zwykle rodnik nitroksydowy)



Odczynnik wprowadzający powinien reagować szybko, wydajnie i selektywnie z odpowiednimi grupami funkcyjnymi biopolimerów. Poniższy rysunek pokazuje przykłady odczynników wprowadzających centra paramagnetyczne na określone grupy funkcyjne białek.

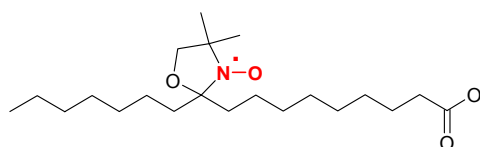


Analogiczne odczynniki opracowano również dla innych biopolimerów (policukrów, kwasów nukleinowych, itp.).

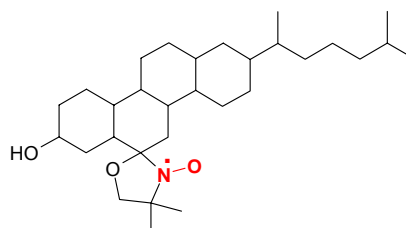
5.3.3 Sondy spinowe

Odmienne podejście do wprowadzania centrów paramagnetycznych wykorzystano w tzw. **sondach spinowych**. Są to zwykle związki małowczątkowe do których podczas ich syntezy świadomie wprowadzono centrum paramagnetyczne. Są one **analogami strukturalnymi** naturalnych składników badanego układu. Związki takie mogą następnie wchodzić w skład układów supramolekularnych lub stanowić części składowe biopolimerów.

Najszersze zastosowanie w biofizyce znalazły sondy tego typu w badaniach sztucznych błon lipidowych i naturalnych błon komórkowych. Dostępne są w handlu np. analogi kwasów tłuszczowych (lub zbudowanych z nich fosfolipidów) znakowanych na określonym atomie węgla łańcucha alifatycznego. Wykorzystuje się również analogi innych składników błon komórkowych, np. steroli błonowych.



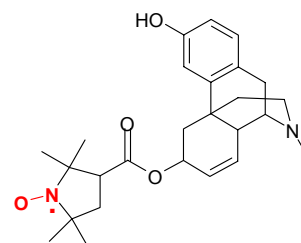
znakowany kwas tłuszczowy



analog sterolu błonowego

Widmo EPR sondy spinowej znajdującej się na określonym atomie węgla kwasu tłuszczowego dostarcza szeregu cennych informacji na temat warunków fizykochemicznych (np. mikrolepkości) panujących na określonej głębokości w błonie.

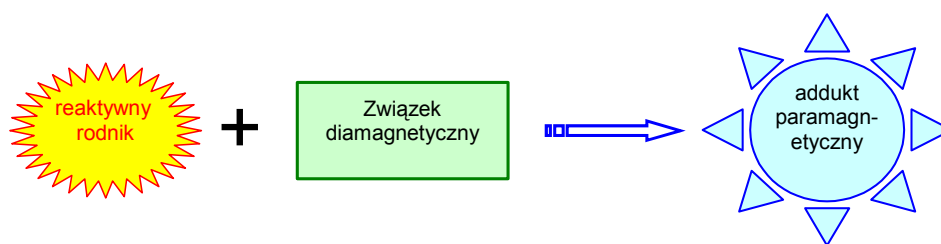
Sondy spinowe mogą być również analogami substratów określonych enzymów lub leków. Dostarczają one wtedy informacji na temat warunków panujących w centrum aktywnym enzymu lub w miejscu wiązania na receptorze. Rysunek obok pokazuje strukturę analogu morfiny stosowanego w badaniach receptorów opioidowych w mózgu.



5.4 Pułapkowanie spinów

W wielu reakcjach biochemicznych powstają wolne rodniki. Mogą to być produkty pośrednie szlaków metabolicznych lub szkodliwe produkty uboczne. Są to zwykle twory bardzo reaktywne o skrajnie krótkim czasie życia. Ich bezpośrednie wykrywanie i badanie techniką EPR jest praktycznie niemożliwe.

Rodniki takie można w pewnym sensie „utrwalić” stosując metodę zwaną **pułapkowaniem spinów**. Założenia tej metody przedstawia poniższy schemat. W wyniku reakcji zachodzącej pomiędzy reaktywnym rodnikiem i odpowiednio dobranym związkiem organicznym dochodzi do utworzenia trwałego adduktu paramagnetycznego, np. układu nitroksydowego. Ponieważ powstający addukt jest trwały, więc w miarę przebiegu badanej reakcji nagromadza się on w układzie.



5.4.1 Pułapki spinowe

Opracowano szereg związków organicznych mogących z powodzeniem spełniać rolę pułapek spinowych. Poniższa tabela przedstawia powszechnie przyjęte symbole tych związków oraz reakcje jakim one ulegają w obecności reaktywnych rodników.

Symbol zw. pułapkującego	Przebieg reakcji
NMP	
TBNB	
DMPO	
POBN	

5.4.2 Identyfikacja pułpkowanych rodników

Zaproponowane pułapki spinowe posiadają bardzo niską selektywność – reagują praktycznie ze wszystkimi dostatecznie reaktywnymi rodnikami. Są więc w stanie „utrwalić” rodniki:

- ponadtlenkowe $O_2^{\cdot -}$
- hydroksylowe HO^{\cdot}
- nadtlenkowe ROO^{\cdot}
- alkoksylowe RO^{\cdot}
- centrowęgłowe C^{\cdot}
- nitroniowe NO^{\cdot}

i szereg innych.

Do identyfikacji spułapkowanego rodnika wykorzystuje się stałe sprzężeń nadsubtelnych występujące w widmach EPR próbki.

Pułapkowanie spinów stosuje się zarówno do badania samych reakcji biochemicznych (np. fotosyntezy lub szlaku łańcucha oddechowego) jak i produktów powstających podczas metabolizmu leków i innych ksenobiotyków.

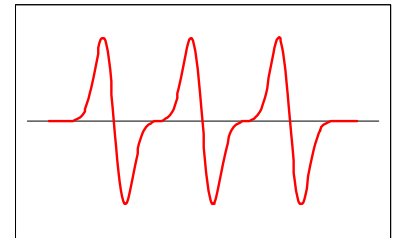
5.5 Znakowanie spinowe biopolimerów

Próbki spinowe dostarczyć mogą wielu rodzajów informacji o warunkach panujących w swoim otoczeniu. Wartości stałych sprzężenia nadsubtelnego są np. zależne od:

- polarności środowiska
- mikrolepkości
- orientacji znacznika względem zewnętrznego pola magnetycznego.

5.5.1 Swoboda rotacyjna znacznika

Ponadto kształt samego multipletu zależy od ruchliwości znacznika. Gdy znacznik nitroksydowy ma swobodę rotacji, to odpowiadający triplet ma jednakowe intensywności poszczególnych składowych.



Ograniczenie ruchliwości znacznika prowadzi do wystąpienia

asymetrii tripletu. Składowe zewnętrzne mają wtedy inną intensywność i szerokość niż składowa środkowa. Pozwala to ocenić stopień unieruchomienia znacznika i jego preferowaną orientację względem zewnętrznego pola magnetycznego.

Liczbowym miernikiem ruchliwości orientacyjnej znacznika może być tzw. czas korelacji rotacyjnej, τ_R .

Wykazano, że czas ten jest liniową funkcją różnicy szerokości składowych i można go wyznaczyć ze wzoru:

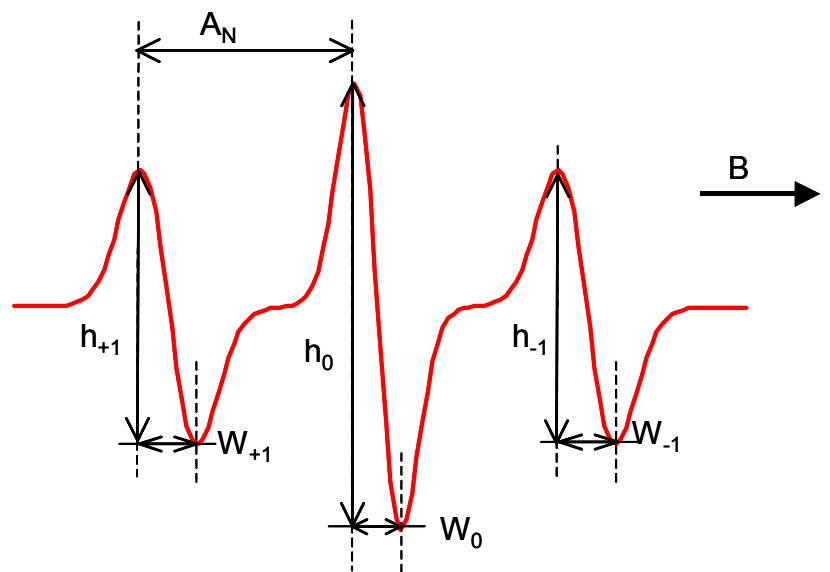
$$\tau_R = K(W_{-1} - W_0)$$

w którym wielkość stałej K jest charakterystyczna dla danego znacznika.

Czas korelacji rotacyjnej jest również

funkcją stosunku intensywności składowej centralnej i składowych skrajnych:

$$\tau_R = kW_0 \left(\sqrt{h_0/h_{-1}} - 1 \right)$$

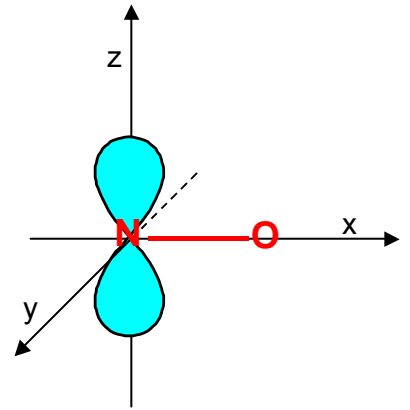


W konkretnym przypadku używamy jednego z tych wzorów w zależności od tego czy łatwiej jest odczytać szerokość składowej czy jej wysokość.

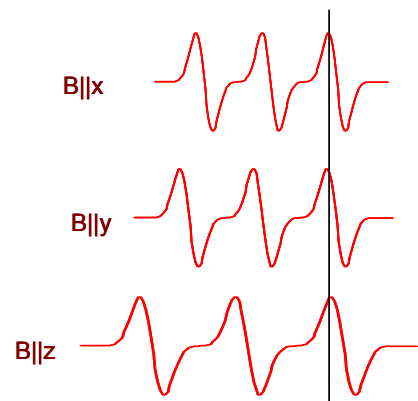
5.5.2 Orientacja znacznika

Jeżeli ruch rotacyjny znacznika jest silnie ograniczony (duży czas korelacji rotacyjnej) i istnieje możliwość makroskopowej orientacji biopolimeru w próbce to z analizy widm EPR można ustalić jaka jest orientacja znacznika względem kierunku orientacji próbki. Okazuje się bowiem, że stała sprzężenia nadsubtelnego zależy od orientacji znacznika względem pola magnetycznego.

Przyjmuje się zwykle, że lokalny układ współrzędnych związany ze znacznikiem zorientowany jest jak na rysunku obok. Początek układu zlokalizowany jest na atomie azotu grupy nitroksydowej. Oś O_x pokrywa się z kierunkiem wiązania N-O, kierunek osi O_z jest zgodny z osią orbitalu p niesparowanego elektronu i oś O_y jest prostopadła do dwóch pozostałych.

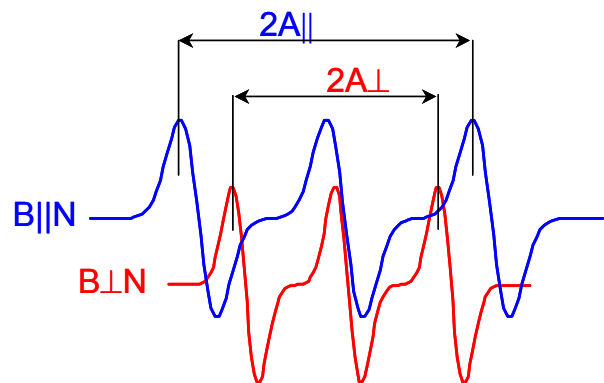


Wykazano doświadczalnie, że stała rozszczepienia nadsubtelnego jest najmniejsza, gdy znacznik zorientowany jest w taki sposób, że kierunek indukcji pola magnetycznego jest równoległy do osi O_x ($B||x$), a największa gdy z kierunkiem indukcji pola pokrywa się oś O_z ($B||z$). Wykonując widma EPR w trzech prostopadłych do siebie kierunkach można wyznaczyć kąt pomiędzy kierunkiem orientacji makrocząsteczek, a kierunkiem wiązania N-O w znaczniku.



Gdy obiektem badań jest układ płaskich błon lipidowych, to interesują nas dwie wielkości: i) stopień uporządkowania cząsteczek niosących znacznik, oraz ii) kąt θ pomiędzy normalną do błony,

N, i osią znacznika. Wykonuje się dwa widma EPR. Jedno przy kierunku indukcji B równoległym do normalnej do błony ($B||N$) i drugie przy kierunku indukcji prostopadłym do normalnej ($B\perp N$). Dla każdego z widm wyznacza się odległość skrajnych składowych tripletu. Są one równe podwojonej stałej rozszczepienia nadsubtelnego (rysunek obok).



Wyznaczone wartości $A_{||}$ i A_{\perp} umożliwiają obliczenie parametru uporządkowania S zgodnie ze wzorem:

$$S = \frac{A_{\parallel} - A_{\perp}}{A_{\parallel} + A_{\perp}}$$

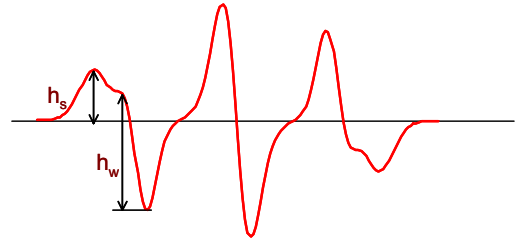
Z rozważań statystycznych wynika, że pomiędzy parametrem uporządkowania S , a kątem θ istnieje zależność:

$$S = \frac{3}{2}(\cos^2 \theta - 1)$$

Można z niej obliczyć wartość interesującego nas kąta.

5.5.3 Widma złożone

Widma EPR białek znakowanych znacznikami spinowymi wiążącymi się z grupami aminowymi małą często bardzo złożony charakter. Widma te są często dużo bardziej skomplikowane niż wynikałoby to z możliwych do przewidzenia sprzężeń nadsubtelnych (rysunek obok).



Wysunięto hipotezę, że widma te są w rzeczywistości sumą dwóch lub więcej widm o takim samym położeniu składowej centralnej, lecz różnych szerokościach składowych i różnych stałych rozszczepienia nadsubtelnego. Sytuacja taka może zaistnieć, gdy grupy aminowe dostępne dla odczynnika wprowadzającego znacznik należą do dwóch lub więcej subpopulacji różniących się stopniem ograniczenia swobody rotacyjnej. Zarówno szerokość składowej jak i wartość stałej rozszczepienia są bowiem wrażliwe stopień unieruchomienia znacznika. Widmo posiadające szersze składowe odpowiadałoby wg tej hipotezy subpopulacji bardziej unieruchomionych znaczników. Wydaje się, że stosunek h_w/h_s jest jednym z najbardziej czułych wskaźników stanu konformacyjnego białka.