

**Федеральное государственное автономное образовательное  
учреждение высшего профессионального образования  
«Казанский (Приволжский) федеральный университет»**

Утверждаю  
Проректор по научной  
деятельности

\_\_\_\_\_ Нургалиев Д.К.

Методические указания

Методика оценки проницаемости ориентированных бислоев  
липидов на основе данных, полученных методом ЯМР с  
импульсным градиентом магнитного поля

2011 г.

## Предисловие

### РАЗРАБОТАНА

Федеральным государственным автономным образовательным учреждением высшего профессионального образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет», кафедра физики молекулярных систем

ИСПОЛНИТЕЛИ: Филиппов А.В., д.ф.-м.н.

Рудакова М.А., к.ф.-м.н.

Архипов Р.В., к.ф.-м.н.

Мунавиров Б.В.

### СОГЛАСОВАНО

Заведующий кафедрой \_\_\_\_\_ Скирда В.Д.

Свидетельство об аттестации МВИ № \_\_\_\_\_

Регистрационный код МВИ по федеральному реестру: \_\_\_\_\_

Настоящая Инструкция устанавливает методику выполнения измерений проницаемости для воды в ориентированных липидных мембранах.

Измерения проводят в специально изготовляемых макроскопически ориентированных мембранах на основе липидных, липид-протеиновых, липид-полимерных композиций, определяемых и/или представляемых заказчиком.

Область применения настоящей Инструкции распространяется на однокомпонентные и многокомпонентные липидные системы, на основе как синтетических, так и природных липидов, в присутствии пептидов, протеинов и прочих полимеров, молекул лекарств и кандидатов в лекарственные средства и ограничивается следующими характеристиками объектов измерений:

- липидные компоненты и их смеси, в том числе в присутствии пептидов, протеинов и т.д., должны формировать липидный бислой, т.е. находиться в ламеллярном жидкокристаллическом фазовом состоянии;
- липидная система должна сохранять ламеллярную жидкокристаллическую организацию при содержании воды выше равновесной степени гидратации, а именно ~ 40-50 % вес.;
- температура фазового перехода гель-жидкий кристалл не выше 55 °С.

Настоящая Инструкция предназначена для выполнения измерений в сферах государственного регулирования обеспечения единства измерений.

## 1 НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

ГОСТ 6709-72. Вода дистиллированная. Технические условия.

ГОСТ 18300-87 Спирт этиловый ректификованный технический. Технические условия

ГОСТ 25336-82. Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры.

ГОСТ 24104-2001. Весы лабораторные. Общие технические требования.

ГОСТ Р ИСО 5725-1-2002. Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 1. Основные положения и определения.

ГОСТ Р ИСО 5725-2-2002. Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 2. Основной метод определения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерений.

ГОСТ Р ИСО 5725-3-2002. Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 3. Промежуточные показатели прецизионности стандартного метода измерений.

ГОСТ Р ИСО 5725-4-2002. Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 4. Основные методы определения правильности стандартного метода измерений.

ГОСТ 12.1.005-88. Система стандартизации безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны.

ГОСТ 12.0.004-90. Система стандартизации безопасности труда. Организация обучения безопасности труда. Общие положения

## 2 ТРЕБОВАНИЯ К ПОГРЕШНОСТИ ИЗМЕРЕНИЙ

Пределы допускаемой относительной погрешности измерений по данной методике:

- при определении проницаемости для воды липидных бислоев  $\pm 12,2 \%$ .

## 3 СРЕДСТВА ИЗМЕРЕНИЙ, ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЕ УСТРОЙСТВА, МАТЕРИАЛЫ, РАСТВОРЫ

При проведении измерений применяют следующие средства измерений, реактивы и материалы:

– ЯМР-диффузомер “Minispec” производства фирмы “Bruker Optics GmbH” (Германия), который зарегистрирован в государственном реестре средств измерений (номер 24484-08), допущенных к использованию на территории РФ. Технические характеристики ЯМР-диффузомера приведены в Приложении А;

– Термоблок, который позволяет измерять текущую температуру образца, а также устанавливать и поддерживать заданную температуру образца в датчике с точностью не хуже  $\pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$ ;

– Весы электронные специального класса точности по ГОСТ 24104-2001;

– Спирт этиловый ректификованный технический по ГОСТ 18300-87

– Вода дистиллированная по ГОСТ 6709-72;

– Пробирка по ГОСТ 25336-82 или пробирка, изготовленная из стекла, не содержащего парамагнитных и ферромагнитных примесей;

Допускается использование иных средств измерений, вспомогательного оборудования и реактивов с техническими характеристиками, не уступающими, указанным выше.

#### 4 МЕТОД ИЗМЕРЕНИЙ

Настоящая Инструкция применительно к макроскопически ориентированным липидным системам устанавливает следующий метод измерения:

– определение проницаемости липидных бислоев для молекул воды.

Методика оценки проницаемости для воды ориентированных липидных бислоев основана на соотношении, устанавливающем взаимосвязь между коэффициентом проницаемости липидного бислоя и коэффициентами самодиффузии водной компоненты вдоль и поперек липидных бислоев, экспериментально измеряемых методом ЯМР с ИГМП, и геометрических параметров системы.

#### 5 ТРЕБОВАНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ, ОХРАНЫ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

При выполнении оценки проницаемости для воды ориентированных липидных бислоев соблюдают следующие требования:

– требования безопасности, указанные в эксплуатационной документации на средства измерений;

– требования предприятия (организации) по технике безопасности при выполнении работ на объекте контроля и/или на месте его размещения (в случае измерений *in situ*);

– содержание вредных веществ в воздухе рабочей зоны не должно превышать предельно допустимых концентраций (ПДК), установленных в ГОСТ 12.1.005-88.

Проведение измерений по настоящей Инструкции не оказывает вредного воздействия на окружающую среду.

#### 6 ТРЕБОВАНИЯ К КВАЛИФИКАЦИИ ЛИЦ, РАБОТАЮЩИХ НА СПЕКТРОМЕТРЕ

К выполнению измерений и обработке их результатов допускают лиц с квалификацией не ниже техника или лаборанта, изучивших настоящую Инструкцию и эксплуатационную документацию на средства измерений, а также прошедших обучение и инструктаж по технике безопасности в соответствии с ГОСТ 12.0.004-90.

#### 7 ОТБОР ПРОБ

Перед проведением оценки проницаемости для воды ориентированных липидных бислоев выполняют следующие подготовительные работы: отбор пробы, приготовление ориентированных образцов и их гидратация, контроль

содержания воды и образования упорядоченного жидкокристаллического бислоя в образцах.

#### 7.1 Отбор пробы, приготовление образцов

7.1.1 Тонкая пленка липида формируется на стеклянной пластинке следующим образом:

7.1.1.1 Требуемое количество липида растворяется в этиловом спирте в концентрации 15 мг/мл.

7.1.1.2 На каждое стекло наносится по 25 микролитров раствора.

7.1.1.3 Растворитель удаляется сначала при комнатной температуре и атмосферном давлении, а затем при повышении температуры до 40 °С и под вакуумом в течении суток.

7.1.2 Пластины укладываются стопкой в количестве по 30-45 пластин в ампулу и определяется начальная масса образца ( $m_o$ ). Полученное значение массы заносится в журнал регистрации (Приложение Б).

7.1.3 Образец помещается во влажную атмосферу таким образом, чтобы имелась возможность насыщаться только из водяных паров, не имея “прямого контакта” с жидкой водной фазой.

7.1.4 Для достижения большей степени гидратации вода добавлялась до заданной концентрации непосредственно перед измерениями.

7.1.5 Верхнее отверстие пробирки с исследуемым образцом запаивают на газовой или бензиновой горелке так, чтобы образцы не нагревались выше +30°С, для этого нижняя часть пробирки во время пайки должна находиться в резервуаре воды со льдом.

7.2 Контроль содержания воды и образования упорядоченного жидкокристаллического бислоя в образцах

7.2.1 Контроль содержания воды/степени гидратации ( $\xi$ , г) осуществляется взвешиванием образца ( $m_k$ ) и сравнением с начальной массой 7.1.2.

$$\xi = m_k - m_o \quad (1)$$

Значения  $m_k$ , г вносятся журнал регистрации (Приложение Б).

7.2.2 Образование жидкокристаллической фазы при гидратации липида и упорядочение бислоя регистрировались при помощи поляризационного микроскопа.

## 8 УСЛОВИЯ ВЫПОЛНЕНИЯ ИЗМЕРЕНИЙ

Пробы (образцы) в датчике спектрометра ЯМР с ИГМП ориентируются таким образом, чтобы угол между нормалью к поверхности стеклянных пластинок образца (преимущественно совпадающей с нормалью к липидному бислою) и магнитным полем и импульсным градиентом магнитного поля составлял 90° или 180° с погрешностью не более чем 3°.

Температура в датчике при проведении ЯМР эксперимента должна поддерживаться постоянной с точностью 0.5°С во всем температурном диапазоне.

## 9 ПОДГОТОВКА К ПРОВЕДЕНИЮ ИЗМЕРЕНИЙ

Перед проведением оценки проницаемости ориентированных липидных бислоев выполняют следующие подготовительные работы: подготовка приборов к измерениям, установка в датчик пробирки с образцом.

9.1 Подготовка приборов к измерениям выполняется в соответствии с эксплуатационными документами

9.1.1 Подготовка весов к измерению.

Расположить весы на устойчивой гладкой поверхности.

Включить питание электронных весов.

Установить горизонтальное положение весов с помощью индикатора уровня.

Выполнить автоматическую градуировку шкалы электронных весов, так чтобы нулевое значение соответствовало пустой чаше весов.

9.1.2 Подготовка ЯМР-диффузометра к измерению.

Включить питание установки и запустить измерительную программу.

При помощи термоблока установить требуемую температуру в датчике.

Поместить в датчик пробирку с исследуемым образцом.

Ориентировать образец в датчике.

Включить питание электромагнита, включить блок ИГМП.

Ждать 40 минут до выхода электромагнита в рабочий режим.

Выставить резонансные условия для наблюдения сигнала ЯМР.

9.2 Внешний осмотр

При проведении внешнего осмотра пробирок с исследуемыми образцами необходимо убедиться в том, чтобы образец выглядел прозрачным и оптически анизотропным при наблюдении в поляризованном свете, что свидетельствует об образовании упорядоченного жидкокристаллического бислоя.

9.3 Установка пробирки в датчик ЯМР-диффузометра.

Пробирка с исследуемым образцом помещается в датчик ЯМР-диффузометра, таким образом, чтобы образец находился в максимально однородном постоянном магнитном поле. Контроль нахождения образца в максимально однородном постоянном магнитном поле осуществляется путем выставления максимальной продолжительности сигнала спада свободной индукции (ССИ) после возбуждения  $90^\circ$  радиочастотным импульсом.

9.4 Пробирка с исследуемым образцом перед непосредственным измерением выдерживается в датчике ЯМР-диффузометра при заданной температуре в течении не менее 15 минут.

## 10 ВЫПОЛНЕНИЕ ИЗМЕРЕНИЙ

При проведении измерений выполняют следующие операции, следуя указаниям руководства пользователя – образец помещается в датчик ЯМР-диффузометра таким образом, чтобы угол между нормалью к поверхности стеклянных пластинок образца (преимущественно совпадающей с нормалью

к липидному бислою) и магнитным полем и импульсным градиентом магнитного поля составлял последовательно значения  $90^\circ$  и  $180^\circ$ . С помощью импульсной последовательности стимулированное эхо автоматически регистрируются диффузионные затухания сигнала ЯМР исследуемого образца при фиксированном значении времени диффузии. Из анализа диффузионных затуханий определяются значения коэффициентов самодиффузии воды «вдоль» и «поперек» липидного бислоя, на основании которых с учетом особенностей геометрии системы производится коэффициент проницаемости.

## 11 ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ ИЗМЕРЕНИЙ

### Обработка результатов диффузионных измерений

Вычисляют зависимость амплитуды стимулированного эхо от величины импульсного градиента магнитного поля  $g$ , в Тл/м, и времени диффузии  $t_d$ , в с, по формуле:

$$A(g^2)/A(0) = \sum_i^N p_i' \exp(-\gamma^2 \delta^2 g^2 D_i t_d) \quad (2)$$

где  $\tau$ ,  $\tau_1$  – временные интервалы между первым и вторым, и вторым и третьим  $90^\circ$  радиочастотными импульсами, в с;

$\gamma$  – гиромагнитное отношение резонирующих ядер;

$\delta$ ,  $g$  – длительность, в с, и амплитуда импульсного градиента магнитного поля (ИГМП), в Тл/м;

$A(0)$  – амплитуда стимулированного эха в условных единицах при  $g = 0$  Тл/м;

$\Delta$  – время между импульсами градиента магнитного поля, в с;

$D_i$ ,  $T_{1i}$ ,  $T_{2i}$  – коэффициент самодиффузии, в  $\text{м}^2/\text{с}$ , время спин-спиновой и спин-решеточной релаксации, в с,  $i$ -ой компоненты системы;

$N$  – число фаз в системе;

$p_i$  – кажущаяся населенность  $i$ -ой компоненты системы, в %, вычисляемая по формуле:

$$p_i' = p_i \exp(-2\tau/T_{2i} - \tau_1/T_{1i}) / \sum_i p_i \exp(-2\tau/T_{2i} - \tau_1/T_{1i}) \quad (3)$$

$$\sum_i p_i' = 1,$$

где  $p_i$  – истинная населенность  $i$ -ой компоненты системы, в %;  $t_d$  – время диффузии, в с.

$$t_d = \Delta - \delta/3, \quad (4)$$

Необходимо учитывать, что при ориентации образца «под углом  $180^\circ$ » диффузионное затухание не является моноэкспоненциальным и в данном случае коэффициент самодиффузии воды поперек липидных бислоев есть самый медленный КСД из набора КСД системы.

Оценка проницаемости производится на основании выражения 5



$$D_{\perp} = \frac{k \cdot l}{\frac{k \cdot l}{D_{\parallel}} + 1} \quad (5)$$

где  $D_{\parallel}$ ,  $D_{\perp}$  – КСД для среднеквадратичных смещений молекул «поперек» и «вдоль» бислоя меньших, чем расстояние между мембранами  $l$ ,  $k$  – коэффициент проницаемости.

## 12 КОНТРОЛЬ ПОГРЕШНОСТИ РЕЗУЛЬТАТОВ ИЗМЕРЕНИЙ

12.1 Контроль погрешности результатов измерения осуществляется в следующем порядке:

- Контроль точности поддержания температуры образца в пределах заданной температуры  $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ ;
- Периодическая поверка используемых средств измерений ЯМР-диффузометра;
- Проверка соответствия погрешности средств измерений при измерении коэффициентов самодиффузии  $D_i$  требованиям ГОСТ Р ИСО 5725-1-2002 – ГОСТ Р ИСО 5725-4-2002.

Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях повторяемости по ГОСТ Р ИСО 5725-6-2002. Периодичность контроля один раз в год.

## 13 ОФОРМЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИЗМЕРЕНИЙ

Результаты измерений, вносят в журнал регистрации (по форме, приведенной в приложении Б).

## Приложение А

### Технические характеристики

ЯМР-диффузометр обладает следующими техническими и метрологическими характеристиками:

• частота ЯМР на протонах	7.5 - 60 МГц
• длительность 90° РЧ импульса	3 мкс
• время «парализации» приемного тракта	8 мкс
• чувствительность приемного тракта	0.1 мкВ
• линейный диапазон приемного тракта	60 дБ
• временное разрешение АЦП	1 мкс
• диапазон рабочих температур	123 – 473 К
• точность поддержания температур	1 К
• число измеряемых точек	до 256
• число накоплений	произвольное
• определяемый размер капель не менее	0.25 мкм;
• допускаемая относительная погрешность при измерении размера капель	±5 %;

ЯМР-диффузометр, оснащен блоком градиента магнитного поля, со следующими техническими характеристиками:

• максимальная величина ИГМП	30 Тл/м
• максимальная длительность ИГМП	2.5 мс
• сопротивление квадрупольной градиентной катушки	0.5 Ом
• линейность градиента магнитного поля, создаваемого градиентной катушкой в образце диаметром 7 мм	не хуже 5%
• относительная разница интегральных значений ИГМП при максимальном градиенте МП	не более 10–6
• время нарастания и спада ИГМП	~30мкс

Приложение Б  
(обязательное)

Форма журнала регистрации результатов измерений

Наименование образца	Состав образца	m <sub>0</sub> , Г (нач. масса образца)	ξ = m <sub>k</sub> - m <sub>0</sub> , m <sub>i</sub> , Г (ξ - содержание воды в образце, m <sub>i</sub> - текущая, масса образца)				Т, °С – температура	D <sub>⊥</sub> , м <sup>2</sup> /с	D <sub>∥</sub> , м <sup>2</sup> /с	k, м/с	C <sub>w</sub> , %
			i=1	i=2	...	i=n					

Исполнитель: \_\_\_\_\_  
(Ф.И.О.)
(должность)
(подпись)