

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего образования
«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

ИНСТИТУТ ФИЗИКИ

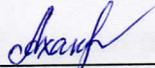
КАФЕДРА МЕДИЦИНСКОЙ ФИЗИКИ

Направление: 03.03.02 Физика
Профиль. Физика живых систем

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА
ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ИОННОЙ ЖИДКОСТИ С
ЛИПИДНОЙ СИСТЕМОЙ МЕТОДОМ ЯДЕРНОГО МАГНИТНОГО
РЕЗОНАНСА

Студент 4 курса группы 06-911

«20» июня 2023 г


(Хакимянова А.Р.)

Научный руководитель

к.ф.-м.н., доцент

«20» июня 2023 г.


(Халиуллина А.В.)

Научный консультант

д.ф.-м.н., профессор

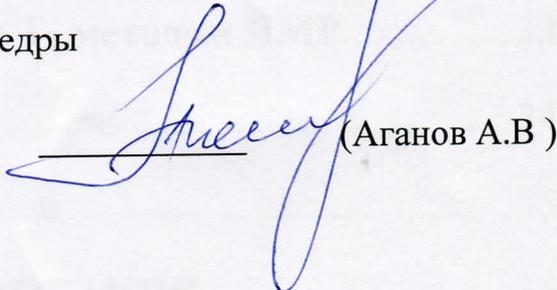
«20» июня 2023 г


(Филиппов А.В.)

Заведующий кафедрой наименование кафедры

д.х.н., профессор

«20» июня 2023 г


(Аганов А.В.)

Казань-2023

Оглавление

Список сокращений	4
Введение	5
ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	7
1.1 Общие понятия об ионной жидкости.....	7
1.1.1 Классификация и свойства ионных жидкостей	9
1.2 Области применения ионных жидкостей	12
1.3 Токсичность и экологические эффекты ИЖ	16
1.4 Формирование везикул в ионных жидкостях.....	19
1.5 Общие сведения о модельных липидных мембранах	21
ГЛАВА 2. МЕТОДЫ И ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	25
2.1 Основы ядерного магнитного резонанса (ЯМР)	25
2.1.2 Понятие химического сдвига. Анизотропия химического сдвига.....	28
2.2 Метод ^{31}P ЯМР спектроскопии	30
2.3 Метод ЯМР с импульсным градиентом магнитного поля... 33	33
2.3.1 Понятие самодиффузии.....	36
2.4 Основные принципы измерения T_2 методом ЯМР.....	38
2.5 Объекты исследования	39
2.6 Методика приготовления образцов	40
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	41

3.1	Исследование фазового поведения фосфолипидов в системе лецитин - смесь растворителей D₂O/EAN методом ³¹P спектроскопии	41
3.2	Исследование особенностей трансляционной подвижности структур в системе лецитин-смесь растворителей D₂O/EAN методом ¹H ЯМР диффузометрии	44
3.2.1	Анализ линий ЯМР спектров ¹ H системы лецитин (2% по весу) в смеси - D ₂ O/EAN	49
3.3	Исследование поперечной ЯМР релаксации на ядрах ¹H в системе лецитин в системе лецитин - смесь растворителей D₂O/EAN	54
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ	56
	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	57

Список сокращений

ЯМР - ядерный магнитный резонанс

ИЖ - ионная жидкость

ДЗ - диффузионное затухание

КСД - коэффициент самодиффузии

ИГМП – импульсный градиент магнитного поля

АХС- анизотропия химического сдвига

ВВЕДЕНИЕ

Ионные жидкости (ИЖ), известные как «зеленые растворители», могут представлять собой более экологичные альтернативы молекулярным растворителям во многих химических реакциях и процессах. [1]. Они являются «дизайнерскими растворителями», благодаря свойствам, которые можно изменять комбинируя катионы и анионы. Ионные жидкости стабильны, широко используются в органическом синтезе и химическом разделении из-за их высокой сольватирующей способности и настраиваемой природы [2]. Они также применимы при растворении неорганических, металлоорганических соединений, могут быть регенерированы и использованы повторно.

Известно, что ИЖ обеспечивают самосборку широкого спектра липидов, составляющие основных компонент клеточных мембран [3–6]. Клеточные мембраны участвуют в клеточной защите, контроле и переносе питательных веществ. Однако, за последнее время многие исследования показали токсичное воздействие ИЖ к ферментам, бактериям, микроорганизмам [7], водорослям, высшим растениям, животным и рыбам [8]. Важно изучить влияние ионной жидкости на клеточную систему, таким образом появится больше информации для прогноза их поведения в химико-биологических системах. А одним из наиболее прямых и информативных методов изучения поступательной динамики ИЖ является ядерный магнитный резонанс с градиентом импульсного поля.

Цель данной работы: исследование методом ЯМР особенностей фазового поведения и молекулярной подвижности системы, состоящей из лецитина при концентрации 2% по весу в смеси растворителей этиламмония нитрата (EAN) с дейтерированной водой (D_2O).

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

- Исследование фазовых структур системы лецитин - смесь растворителей D_2O / EAN методом ^{31}P ЯМР спектроскопии;

- Анализ линий ЯМР спектров ^1H системы лецитин (2% по весу) в смеси - $\text{D}_2\text{O}/\text{EAN}$
- Исследование особенностей трансляционной подвижности структур в системе лецитин-смесь растворителей $\text{D}_2\text{O}/\text{EAN}$ методом ^1H ЯМР диффузометрии
- Исследование молекулярной подвижности компонент системы на основе лецитина в смеси растворителей $\text{D}_2\text{O}/\text{EAN}$ методом ^1H ЯМР релаксометрии

ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1 Общие понятия об ионной жидкости

Ионные жидкости представляют собой органические соли, класс растворителей, полностью состоящие из ионов, которые имеют жидкое фазовое состояние при температурах ниже 100 °С. Как правило, ионы ИЖ комбинируют из органического катиона и органического или неорганического аниона. Ионы в ИЖ обычно содержат объемные органические химические группы, которые благодаря разным типам взаимодействий между ионами, помимо электростатического, способствуют предотвращению затвердевания ИЖ [9]. К таким взаимодействиям между ионами относятся:

- ван-дер-ваальсовы взаимодействия;
- водородные связи;
- $\pi - \pi$ укладка и т.д., в зависимости от конкретной химической структуры ионов.

Все эти взаимодействия в сочетании могут привести к образованию специфических микроструктур в ИЖ, которые могут изменяться в зависимости от температуры, вызванной изменением тепловой энергии вращения и поступательного движения ионов. Ионы в этих микроструктурах могут иметь преимущественную ориентацию относительно друг друга, сохраняя анизотропные свойства. Следовательно, динамика ИЖ также может зависеть от их микроструктуры [9].

Основу самых известных классов растворителей составляют имидазолий или пиридиний, с алкильным цепным заместителем, который изменяет гидрофобность молекулы и анион, а именно галогенид (X^-) и тетрафторборат (BF_4^-).

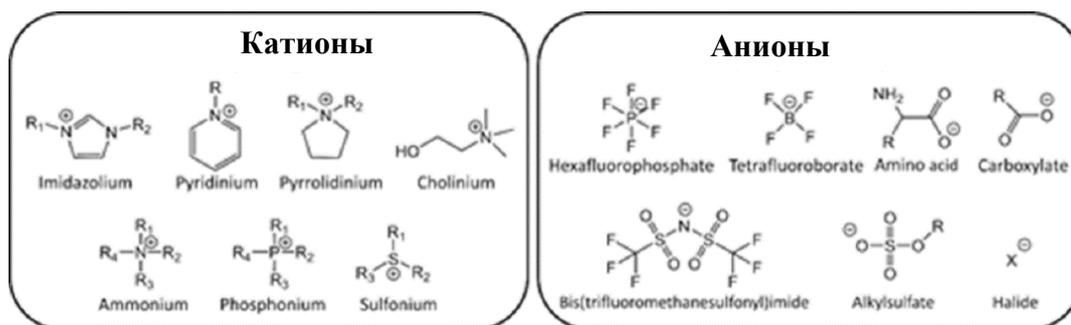


Рисунок 1 - Типы ионов в ИЖ[10]

Ионные жидкость в широком смысле понятия представляет собой расплавленную соль, однако между ними есть ряд отличий. Известно, что ионные жидкости имеют относительно низкие температуры плавления. Они содержат органические катионы и имеют ассиметричные молекулы. Также размер ионов ИЖ является показателем различия «классических» органических солей от ионных жидкостей. Ионы неорганических солей чаще имеют сферическую форму, тогда как объемные ионы обладают более сложным строением, которое влияет на локальную структуру ИЖ, в особенности на объем катиона. В ионной жидкости заряд распределен по всему объему, в следствие чего плотность заряда ионов ИЖ ниже, чем у малых ионов неорганических солей [11].

Количество возможных комбинаций известных катионов и анионов на сегодняшний день составляет порядка 10^{16} - 10^{18} , что приводит к уникальным физико-химическим, биологическим свойствам. Простые ионные жидкости состоят из одного катиона и одного аниона. Более сложные примеры образуются путем объединения большего числа катионов и / или анионов.

1.1.1 Классификация и свойства ионных жидкостей

Ионные жидкости имеют обширный класс веществ, из-за чего задача классификации становится непростой. Однако, различают несколько известных классов:

- Протонные или апротонные ионные жидкости (ПИЖ и АИЖ) [12]. Протонные ионные жидкости, как и все другие протонные растворители, могут отдавать протоны и, что более важно, могут образовывать водородные связи. Их легче перегонять, чем апротонные ионные жидкости. У протонных ИЖ низкая электропроводность. EAN является типичным примером ПИЖ. Примером АИЖ является 1-н-бутил-3- метилимидазолия гексафторборат (bmimPF₆). АИЖ труднее синтезировать, анионы, такие как PF₆⁻ подвержены гидролизу при контакте с воздухом, но проявляют большую ионность, чем ПИЖ[11].

- Ионные жидкости с различными несимметричными катионами. Наиболее важными классами являются ИЖ, имеющие в качестве катиона либо аполярный катион, либо поверхностно-активное вещество. Даже два производных имидазолия или четвертичные ионы аммония; производные на основе пирролидиния, пиперидиния или морфолиния; или четвертичные ионы фосфония. В качестве противоионов возможны простые галогениды или более гидрофобные ионы, такие как PF₆⁻ или бис((трифторметил)сульфонил)амид (N(SO₂CF₃)₂)⁻ [11].

- Ионные жидкости с простыми катионами, но особыми анионами. Примером может служить класс алкилолигоэфиркарбоксилатов с такими простыми противоионами, как натрий: три компонента могут быть ионными жидкостями. Возможные преимущества заключаются в широком диапазоне температур, в котором такие системы проявляют достаточную стабильность, и низком давлении паров. Другими преимуществами являются пониженная вязкость по сравнению с чистыми ионными жидкостями (в случаях, когда

ИЖ являются внутренней фазой) и возможность работы в безводных системах [11].

Ионные жидкости обладают рядом важных свойств, как высокая термическая стабильность, низкое давление пара, полярность, гидрофильность, вязкость, низкая испаряемость, низкая воспламеняемость, высокая способность к растворению материала. Изменяя характер ионов, присутствующих в ИЖ, можно изменить результирующие свойства ИЖ. Недавно было выявлена важная особенность - можно рассматривать ионные жидкости как наногетерогенные среды. В жидкой фазе ионы начинают самоорганизоваться и образуют амфифильные наноструктуры. Данный процесс подразумевает слипание ИЖ с помощью алкильных хвостов, которые в конечном счете образуют «наноструктурированные домены» [13]. Таким образом, наномасштабное и микромасштабное упорядочение и возможность комбинировать доступные ионы популяризируют ИЖ как объекты для широкого применения.



Рисунок 2 – Общие свойства ионных жидкостей [16]

Некоторые из выше приведенных свойств связаны с повышенной безопасностью, поскольку они не вызывают прямого загрязнения атмосферы и токсичности при вдыхании у людей или животных [14, 15], что привлекает исследователей для изучения ИЖ в качестве зеленых растворителей. Однако, утверждение о том, что ИЖ являются зелеными растворителями, следует тщательно рассмотреть с экологической точки зрения.

1.2 Области применения ионных жидкостей

Ранее говорилось о множестве интересных свойств ИЖ, благодаря которым ИЖ нашли применение в электрохимии, нанотехнологии, аналитической химии, процессах экстракции. Изучения ионных жидкостей на этом не останавливаются, возрастающее количество различных комбинаций катионов и анионов дает возможность применения ИЖ всё больше и в разных сферах промышленности.



Рисунок 3 – Применение ИЖ в электрохимии [16]

Применение ионных жидкостей в производстве сократило выработку вредных и токсичных химических веществ, что привело к разработке гораздо более эффективных, улучшенных и экологически чистых процессов и продуктов. Их необычные свойства позволяют им заменять обычные органические растворители, обычно используемые во многих процессах, благодаря их лучшей эффективности, производительности и менее опасному характеру.

Энергонезависимая природа, высокая электропроводность, широкие электрохимические окна, а также невоспламеняющаяся природа, которой

обладают многие ИЖ, способствуют их использованию в качестве электролитов для разработки гораздо более эффективных и безопасных батарей. Их жидкая природа в широком диапазоне температур и незначительное давление пара способствуют их использованию в качестве растворителей в различных областях, таких как органический синтез, синтез наночастиц, а также различные процессы экстракции промышленного значения. Их способность взаимодействовать с биологическими системами наряду с их антибактериальными свойствами привела к передовым исследованиям по их использованию в различных биокаталитических процессах, доставке лекарств и фармацевтической промышленности [16].

ИЖ также могут обладать свойством поверхностной активности путем присоединения алкильной цепи большей длины к любой из ее структурных частей, поэтому их называют поверхностно-активными ионными жидкостями. Поверхностно-активная природа наряду с другими важными характеристиками ИЖ способствует их эффективному использованию вместо обычных поверхностно-активных веществ в различных областях, таких как повышение нефтеотдачи пластов, краски, моющие средства, смазочные материалы и т.д.



Рисунок 4 – ИЖ в качестве добавок [16]

Ионные жидкости могут использоваться в качестве растворителей и катализаторов в различных процессах химического синтеза, способствуя их эффективному использованию в различных химических отраслях промышленности.

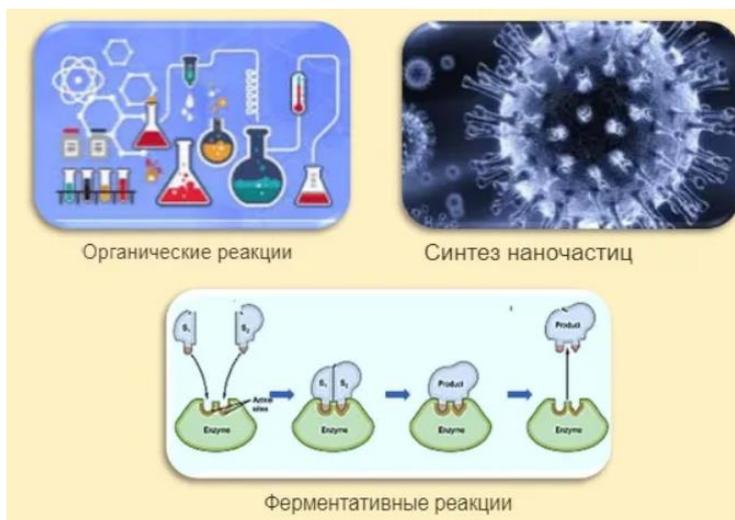


Рисунок 5 – Применение ИЖ в электрохимии [16]

Ионные жидкости могут действовать как эффективные катализаторы в различных органических реакциях, заменяя обычные катализаторы, имеющие много ограничений в отношении выхода, селективности и условий реакции. Также они использовались в качестве растворителей, стабилизаторов для эффективного синтеза различных видов наночастиц. Эффективно применяются для ферментативного превращения субстратов, которые в противном случае нерастворимы в органических растворителях, с высокой степенью превращения, селективностью и улучшенной стабильностью ферментов.

Отрасли промышленности всегда находятся в поиске лучших, эффективных и экономичных путей производства различных продуктов с улучшенным качеством продукции. Ионные жидкости благодаря своим удивительным свойствам находят применение в различных отраслях промышленности, такие как пищевая промышленность и производство

биопродуктов, производство биодизеля, фармацевтическая промышленность, в области современных материалов, благодаря их значительному использованию для улучшения характеристик искусственных мышц, жидких кристаллов, а также в устройствах хранения тепловой энергии.

Ионные жидкости используются несколькими способами, которые приводят к защите окружающей среды от нескольких опасных газов, снижению загрязнения воздуха, а также глобального потепления. В целях защиты окружающей среды ИЖ эффективно используются в процессах улавливания углерода, обработки ядерных отходов, а также очистки топлива.

Все вышеперечисленное указывает на уникальность ионной жидкости, однако учеными обнаружено ряд недостатков ИЖ такие как : вязкость, химическая нестабильность, биodeградация, биоаккумуляция и токсичность. Последние свойства мало изучены и с биологической точки зрения это может привести к серьезным проблемам. Поэтому приоритетность в изучении токсичности ИЖ и их настройка для различных биотехнологических процессов является одной из главных задач в науке.

1.3 Токсичность и экологические эффекты ИЖ

Многие ученые изучали вопрос экологичности ИЖ с помощью исследований водной и почвенной среды, а также ферментов, фитопланктона, растений, бактерий и клеток млекопитающих в различных экспериментальных условиях [18, 19]. Однако, широкое применение ионных жидкостей в разных областях науки приводит к загрязнению воды [20], влияет на различные уровни жизни, начиная от отдельных белков до многоклеточных организмов.

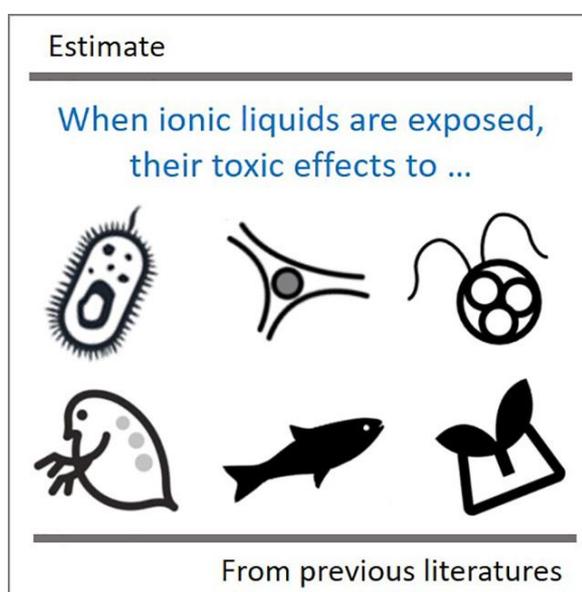


Рисунок 6 – Ионные жидкости активны по отношению ко всем уровням жизни [18]

В целом, результаты показали, что ИЖ могут действовать как токсичные вещества при попадании в окружающую среду.

Токсические эффекты зависят от структуры ИЖ и организмов, а именно:

- зависимость токсичности от липофильности ИЖ, которая может варьироваться либо путем изменения гидрофобной части катиона, либо природы аниона;

- корреляция между токсичностью и длиной алкильной цепи ИЖ;

- возрастание эффективности бактериального ингибирования с увеличением концентрации ИЖ;

и условий тестирования токсичности [17, 18]. В свете этих результатов, исследователи начали задаваться вопросом, какие ионные жидкости можно считать более экологичными.

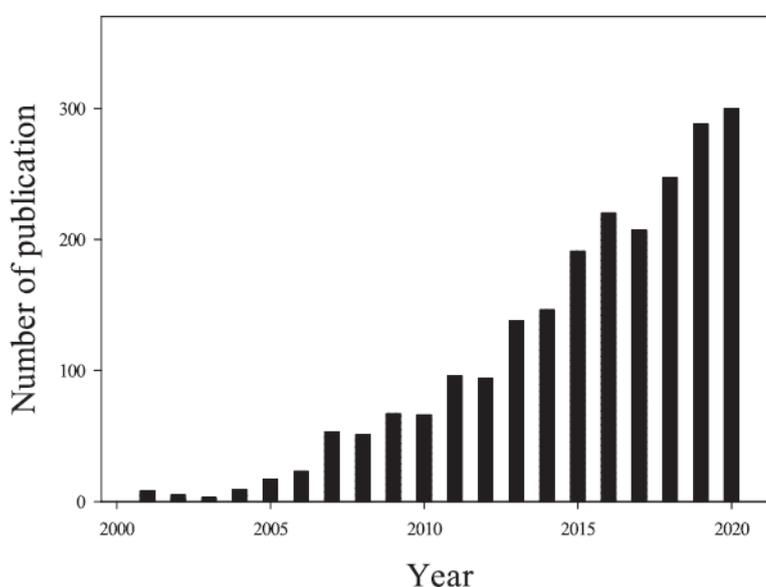


Рисунок 7 – Количество публикаций, посвященных токсичности ионной жидкости. Это было рассчитано Web of Science в январе 2021 года с использованием ключевых слов «токсичность» и «ионная жидкость»

В большинстве случаев механизм, лежащий в основе токсичности ИЖ, недостаточно изучен, однако сделано такое заключение, что любые чужеродные молекулы сначала сталкиваются с плазмой мембрана перед входом в живую клетку. Таким образом, появляется все больше свидетельств взаимодействия ИЖ с клеточными мембранами.

По данным из нескольких статей [17, 18] выдвинуто предположение, что гидрофобные части ИЖ проникают в мембрану посредством гидрофобных взаимодействий и в основном ответственны за токсичность ИЖ. Все эти исследования указывают на то, что ИЖ глубоко взаимодействуют с липидным бислоем и модулируют структуру, микроскопическую динамику и фазовое поведение мембраны, что может быть основной причиной наблюдаемой токсичности ИЖ. Следовательно, чтобы понять основной механизм токсичности ИЖ, физические взаимодействия между клеточной мембраной и ИЖ должны быть детально изучены.

1.4 Формирование везикул в ионных жидкостях

Ионные жидкости в настоящее время широко используются в органическом синтезе и химическом разделении из-за их высокой сольватирующей способности и перестраиваемой природы. Организация поверхностно-активных веществ в ИЖ может открыть новые направления исследований в области мицеллярного катализа в средах ИЖ, улучшения сольватации неполярных образований и лиотропных свойств [2]. В последнее время различные агрегаты, такие как мицеллы, неводные микроэмульсии, и лиотропные фазы были получены в ИЖ.

Было показано, что в чистых ионных жидкостях наблюдаются образование сферических структур диаметром 200-400 нм [2].

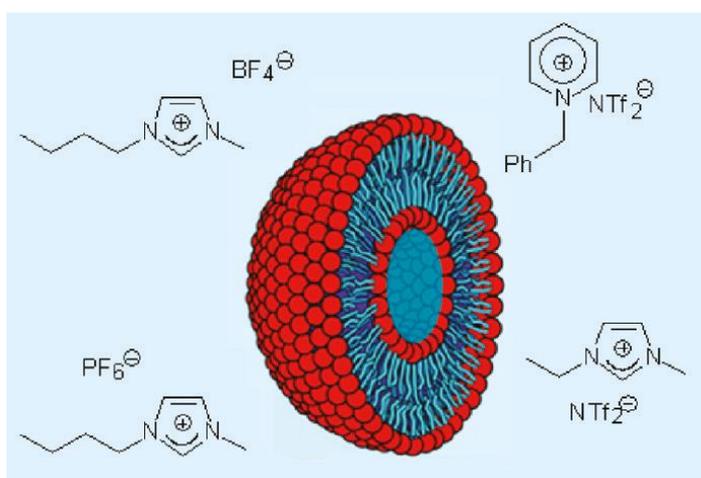


Рисунок 8 – схематическое представление взаимодействия везикулы с разными ионными жидкостями [2]

Формирование везикул изучалось и в смесях воды и ионной жидкости - BmimBF_4 в нескольких соотношениях.

При добавлении небольших количеств ИЖ стабильность бислоистой структуры значительно повышалась. Полученные результаты свидетельствуют об увеличении плотности упаковки молекул ДПФХ в бислое. Ученые объясняют это некоторой модификацией структуры воды

вокруг головных групп ДПФХ. ИЖ вызывают экранирующий эффект полярных головных групп и тем самым уменьшают электростатическое отталкивание между ними.

Также при увеличении доли ионной жидкости ДПФХ частично растворялся в бислойной структуре. Как увеличение толщины бислоя, так и снижение термостойкости бислойной структуры предположительно связано с ослаблением ван-дер-ваальсово взаимодействия между молекулами ДПФХ за счет присутствия молекул ИЖ [2].

1.5 Общие сведения о модельных липидных мембранах

Липидный матрикс составляет основу мембраны клетки, образуется высокоорганизованными ансамблями липидов. Липиды – это соединения, которые состоят из полярной головки и неполярной углеводородной цепи. Они являются амфифильными соединениями, обладают гидрофобными и гидрофильными свойствами одновременно [21].

Фосфолипид – это липид, содержащий остаток фосфорной кислоты в полярной головке. Примером является фосфатидилхолин (рисунок 9).

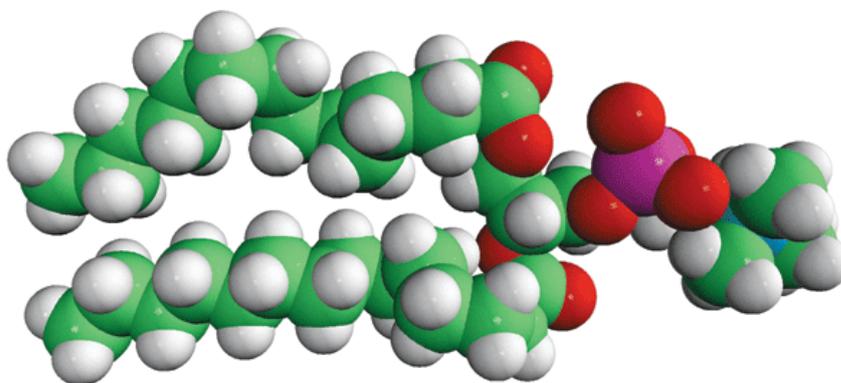


Рисунок 9 – Молекулярная модель липида 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолина (ДМФХ)

Гидрофобные части молекул (неполярные цепи) фосфолипидов стремятся избежать контакта с водой. Это приводит к тому, что в воде они способны к самоорганизации. Например, могут образоваться такие структуры как монослой, мицеллы, бислой и другие структуры (рисунок 10).

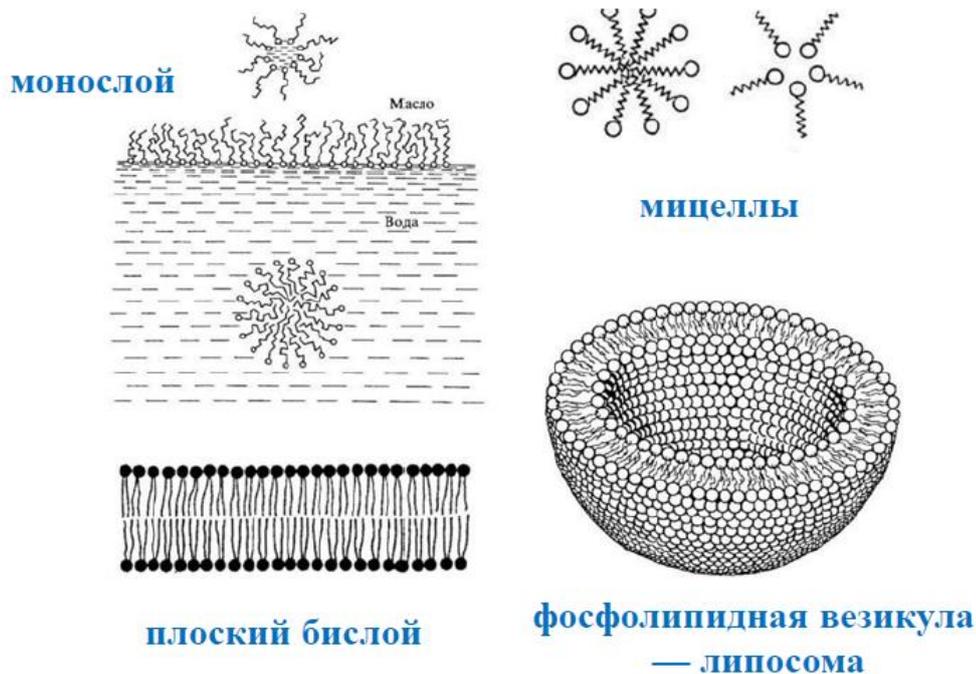


Рисунок 10 – Модель мембраны

Монослои формируются липидными молекулами на границе раздела между водой и воздухом или водой и маслом [21]. Простым способом получения монослоев считается использование раствора липида в летучем растворителе, капля которой помещается на поверхность воды. Так как раствор летучий, при его испарении образуется тонкий слой пленки из одинарных молекул, в котором полярные (гидрофильные) группировки молекул направлены в сторону воды, а углеводородные цепи (гидрофобные группы) — в сторону воздуха.

Мицеллы — это более простые агрегаты, которые образуются липидными молекулами в объемной фазе растворителя. В зависимости от природы растворителя липиды могут формировать либо мицеллы обычного типа, либо «обращенные» мицеллы (Рисунок 11) [21].



Рисунок 11 – Липидные мицеллы в воде и неполярных растворителях

Полярные головки липидных молекул взаимодействуют с водой благодаря свойству гидрофильности, в то время как гидрофобные углеводородные неполярные хвосты избегают подобного контакта. От характера поведения зависит ориентация мицеллы – обычная или «обращенная» (Рисунок 11) [21].

Липидные бислои могут образовать *везикулы*, которых еще называют *липосомами* (от греческого *lipos* – жир и *soma* – тело). Бислои разделяются слоями воды, так что полярные группы липидов располагаются на поверхности бислоя и взаимодействуют с водой, а углеводородные цепи ориентированы вдоль нормали к бислою. Фосфолипиды и гликолипиды служат основными липидами для получения липосом [22].

Классификация липосом осуществляется по размеру (рисунок 12), по количеству липидных бислоев (одно- и многослойные), по составу и механизму доставки лекарственных веществ в клетку.

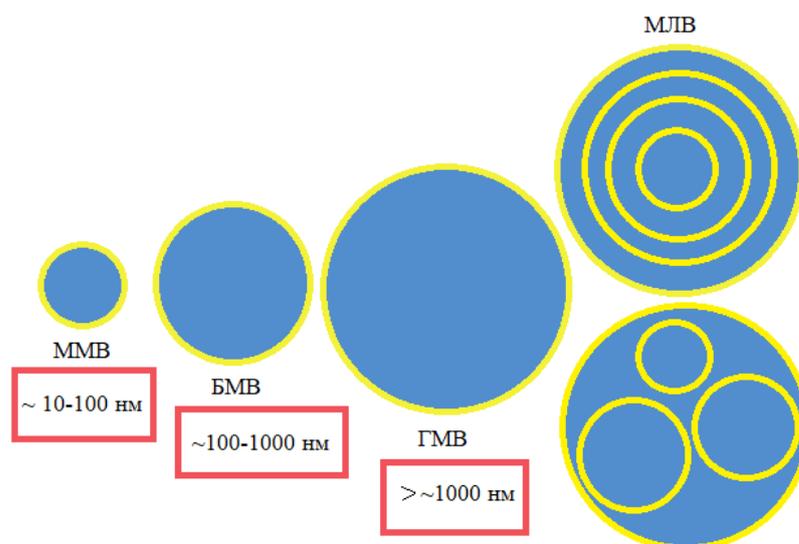


Рисунок 12 – Виды липидных везикул: ММВ маленькие моноламелярные везикулы (10-100 нм), БМВ большие моноламелярные везикулы (100-1000 нм), ГМВ гигантские моноламелярные везикулы (>1 мкм), МЛВ мультислойные везикулы [23]

Существует 3 основных типа липосом:

- многослойные или мультислойные везикулы (МЛВ). Такие липосомы имеют диаметр 5-10 мкм и насчитывают до нескольких сотен липидных бислоев;
- малые моноламелярные везикулы (ММВ). Образование данного типа липосом происходит в виде одинарного липидного бислоя с диаметром в пределах 10-100 нм;
- крупные моноламелярные везикулы (БМВ), также образованные одиночным бислоем, с диаметром от 50 до 200 нм и больше.

ГЛАВА 2. МЕТОДЫ И ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Основы ядерного магнитного резонанса (ЯМР)

Ядерный магнитный резонанс (ЯМР) – это физическое явление, заключающееся в резонансном поглощении электромагнитной энергии системой спинов при воздействии на них сильного внешнего магнитного поля. Спин – это собственный момент импульса элементарной частицы. Явление ЯМР удобно описать с помощью классической модели, где магнитный момент ядра μ имеет спин $I = 1/2$ в постоянном магнитном поле B_0 .

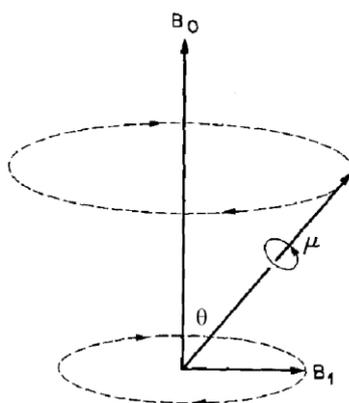


Рисунок 13 – Лабораторная система координат: постоянное магнитное поле B_0 направлено вдоль оси Z ; радиочастотное поле B_1 перпендикулярно постоянному полю B_0

Магнитный момент μ прецессирует вокруг направления магнитного поля B_0 , составляя с ним некоторый угол θ [24]. Такое явление принято называть Ларморовской прецессией. Магнитное поле действует на общую систему спинов, тогда каждый спин примет одну из двух возможных ориентаций: с высокой энергией (μ антипараллелен B_0) и низкой энергией (μ

ориентирован по полю B_0). Таким образом, во внешнем магнитном поле B_0 происходит квантование – расщепление уровней энергии.

Разность энергий между соседними уровнями определяется соотношением $\Delta E = \mu B_0 I$, где I - значение спина ядра.

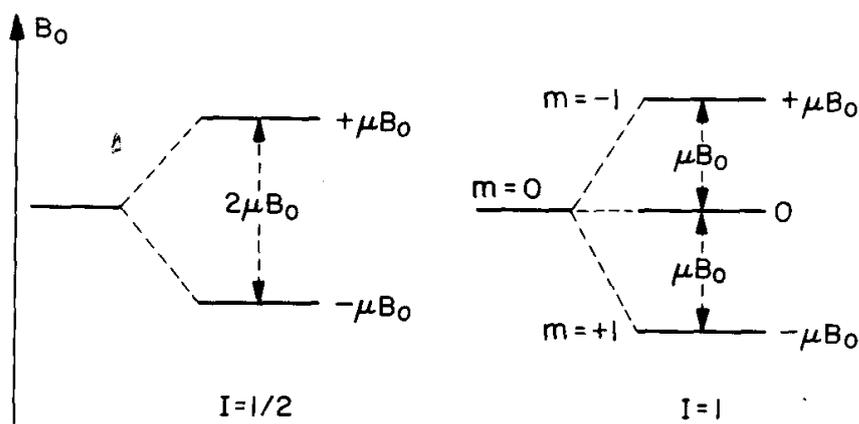


Рисунок 14 – Диаграмма уровней энергии для ядер со спинами $I=1/2$ и $I=1$ в поле B_0

Рассмотрим систему с дискретными энергетическими уровнями. Если подействовать на такую систему радиочастотным полем V_1 с энергией кванта $h\nu_0 = \Delta E$, начнутся переходы между уровнями. Происходит поглощение кванта при переходе из нижнего состояния на более высокое и его можно зарегистрировать. Регистрация таких переходов и составляет основу спектроскопии ЯМР [24].

Энергетические уровни ядра в магнитном поле расположены близко друг к другу, из-за чего значение разности заселенностей верхнего и нижнего уровней минимальна. При равных заселенных уровнях, поглощение энергии прекращается [24]. Для того, чтобы система вернулась к равновесному состоянию, магнитное ядро должно потерять квант энергии, которое оно поглотило. Данный процесс называется релаксацией.

Существует два вида релаксации: спин-решеточная релаксация и спин-спиновая релаксация. Первая характеризуется временем T_1 (продольная релаксация) и описывает взаимодействия между спинами и их окружением (решеткой). Соответственно, вторая - поперечная релаксация, с характерным временем T_2 , вызвана взаимодействиями спинов между собой.

Фурье-преобразование является главным инструментом для записи сигналов в ЯМР-спектрометрах. После подачи радиочастотного импульса, сигнал от свободно прецессирующих магнитных моментов ядер начинает спадать. Тогда следующим этапом является Фурье преобразование, эта математическая процедура раскладывает сигнал на частотные гармоники.

2.1.2 Понятие химического сдвига. Анизотропия химического сдвига

Электронные оболочки ядер при экранировании внешнего магнитного поля \vec{B}_0 вызывают сдвиг резонансной частоты (химический сдвиг) исследуемого вещества. Химический сдвиг каждого вещества индивидуальны, в зависимости от состава. [25].

Локализованное поле описывается так:

$$\vec{B}_{loc} = \vec{B}_0 (1 - \sigma) \quad (3)$$

где σ – константа экранирования.

Гамильтониан химического сдвига: $\hat{H}_{cs} = -\gamma \vec{B}_0 \vec{\sigma} \hat{I}$, где \hat{I} – спиновый оператор, γ – гиромагнитное отношение ядра, $\vec{\sigma}$ – тензор анизотропии химического сдвига (АХС).

Рассмотрим понятие тензора анизотропии химического сдвига $\vec{\sigma}$. В декартовой системе координат является тензором второго ранга и выглядит так:

$$\vec{\sigma} = \begin{pmatrix} \sigma_{xx} & \sigma_{xy} & \sigma_{xz} \\ \sigma_{yx} & \sigma_{yy} & \sigma_{yz} \\ \sigma_{zx} & \sigma_{zy} & \sigma_{zz} \end{pmatrix} \quad (4)$$

где x, y, z – некоторый неопределенный осевой базис.

Он описывает экранирующее свойство, связанное с ядром, когда величина экранирования σ и величина электронного тока вокруг поля \vec{B}_0 зависят от ориентации молекулы в поле. А значит, распределение электронов вокруг ядра в молекуле не сферически симметрично [25]. Гамильтониан экранирующего взаимодействия, если приложенное магнитное поле \vec{B}_0 направлено вдоль оси z преобразуется к виду:

$$\hat{H}_{cs} = -\gamma \vec{B}_0 \sigma_{zz}^{lab} \hat{I}_z \quad (5)$$

где z – ось лабораторной системы координат.

Тензор химического сдвига удобно диагонализировать. Например, в системе координат главных осей (PAS от «Principle Axis System»), тензор АХС $\vec{\sigma}$ принимает вид:

$$\vec{\sigma}_{PAS} = \begin{pmatrix} \sigma_{xx} & 0 & 0 \\ 0 & \sigma_{yy} & 0 \\ 0 & 0 & \sigma_{zz} \end{pmatrix}, \quad (6)$$

где , $\sigma_{xx}, \sigma_{yy}, \sigma_{zz}$ – главные компоненты тензора АХС. Так как для оператора углового момента не существенно преобразование координат, то получаем химический сдвиг ларморовской частоты определенного спина ядра:

$$\omega_{cs} = \gamma B_0 \sigma_{zz}^{lab} = -\omega_0 \sigma_{zz}^{lab}, \quad (7)$$

где ω_0 – ларморовская частота ядра в магнитном поля В . Элемент zz тензора экранирования записывается в PAS так:

$$\sigma_{zz}^{lab} = \vec{b}_0^{PAS} \sigma_{zz}^{PAS} \vec{b}_0^{PAS} \quad (8)$$

Вектор \vec{b}_0^{PAS} удобно выражать через полярные координаты (θ, φ) и собственные значения экранирующего тензора $\sigma_{xx}^{PAS}, \sigma_{yy}^{PAS}, \sigma_{zz}^{PAS}$. И уравнение (8) можно записать в следующем виде:

$$\omega_{cs} = \omega_0 (\sigma_{xx}^{PAS} (\cos\phi \sin\theta)^2 + \sigma_{yy}^{PAS} (\sin\phi \sin\theta)^2 + \sigma_{zz}^{PAS} (\cos\theta)^2). \quad (9)$$

Химический сдвиг ларморовской частоты ω_{cs} представляет собой сумму двух вкладов: изотропная часть и анизотропная часть (зависят от ориентации) [14]:

$$\omega(\theta, \varphi)_{cs} = -\sigma_{iso} \omega_0 + \frac{\delta}{2} (3 \cos^2 \theta - 1 - \eta \sin^2 \theta \cos(2\phi)), \quad (10)$$

где $\delta = -\omega_0 \sigma_z$, σ_{iso} – изотропное значение химического сдвига, η – параметр асимметрии тензора АХС

$$\sigma_{iso} = 1/3(\sigma_{xx}^{PAS} + \sigma_{yy}^{PAS} + \sigma_{zz}^{PAS}), \quad (11)$$

$$\eta = (\sigma_{xx}^{PAS} - \sigma_{yy}^{PAS}) / \sigma_{zz}^{PAS}$$

Принято спектр АХС выражать с помощью таких параметров как:

$$\Delta = \sigma_{zz}^{PAS} - \sigma_{iso} \quad (12)$$

$$\Omega = \sigma_{zz}^{PAS} - \sigma_{xx}^{PAS}$$

где – Δ параметр анизотропии и Ω – полная анизотропия тензора АХС.

2.2 Метод ^{31}P ЯМР спектроскопии

Ядро фосфора занимает второе место по чувствительности после водорода и также активно применяется в изучении биологических молекул методом ЯМР. ^{31}P ЯМР спектроскопия удобна при анализе поведения фосфолипида в различных условиях, так как в составе фосфатной группы его полярной головы содержится, как правило, один атом фосфора.

Зависимость химического сдвига от полярной части молекулы липида основывается также на способности кислородных атомов фосфатной группы участвовать в образовании водородных связей. Высокое естественное содержание, большое гиромагнитное отношение и слабое диполь - дипольное взаимодействие атома фосфора с соседними протонами позволяет получить достаточно высокое отношение сигнал/шум, а наличие при физиологических условиях отрицательного заряда на фосфатной группе делает ^{31}P - ЯМР чувствительным к взаимодействию с ионами[22].

Как сказано выше, ^{31}P - ЯМР спектроскопия чувствительна к движению полярных головок фосфолипидов, об этом свидетельствуют различные формы спектральных линий, анализ которых дает информацию о динамике поведения системы. Характерные ^{31}P ЯМР спектры для различных организаций фосфолипидов представлены на рисунке 16 [26].

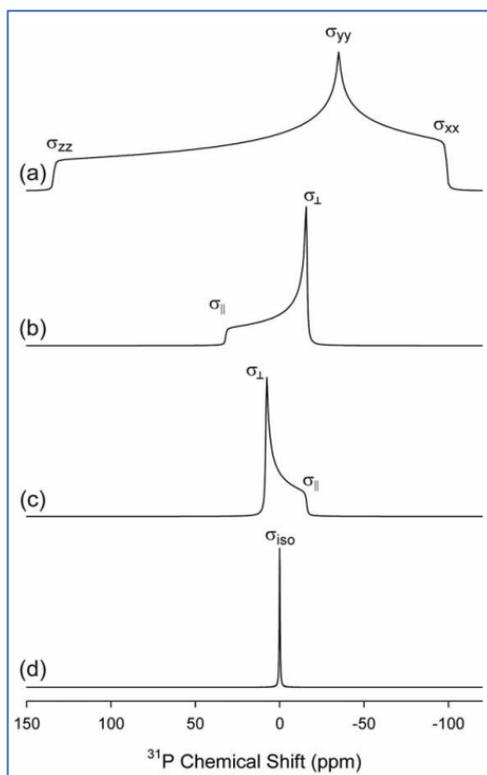


Рисунок 16 – Примеры возможных форм ^{31}P спектров

Липиды обладают свойством амфифильности, благодаря которому в воде самопроизвольно образуют бислои в виде мультиламеллярных липосом. Форма линии ^{31}P для мультиламеллярных липосом фосфолипида определяется фазой, в которой находятся молекулы фосфолипида. Ламеллярная жидкокристаллическая фаза (рисунок 16 b) характеризует быстрое анизотропное движение молекул, что приводит к частичному усреднению тензора экранирования $\sigma_{xx} = \sigma_{yy} = \sigma_{\perp}$ и $\sigma_{zz} = \sigma_{\parallel}$. Липидные молекулы ориентированы аксиально-симметрично относительно оси Z. Ширину тензора экранирования 45-50 м.д. обуславливают дополнительные усреднения движения головной группы фосфолипидов [26]. Ламеллярная фаза неустойчива, ее стабильность зависит от природы жирнокислотных остатков [22].

Изотропный ^{31}P сигнал (рисунок 16 d) наблюдается при полном усреднении анизотропной части тензора экранирования. Этому способствует

быстрое движение молекулы вокруг одной оси[22]. Такие изотропные движения наблюдаются для молекул фосфолипида в мицеллах органического растворителя.

Не менее важную информацию предоставляет и гексагональная фаза (рисунок 16 с) . В этом состоянии молекулы фосфолипидов располагаются в цилиндрах так, что головная группа обращена внутрь цилиндра, где находится вода. Здесь кроме аксиально-симметричного вращения молекул вокруг их длинной оси происходит и дополнительное быстрое закручивание фосфолипида вокруг оси цилиндра. Образуется осевая симметрия как относительно нормали к поверхности цилиндра, так и относительно длинной оси цилиндра.

2.3 Метод ЯМР с импульсным градиентом магнитного поля

Спин эхо или эхо Хана подразумевает трехимпульсную последовательность стимулированного эха. (Рисунок8). В данном методе после подачи первого р.ч. импульса, поворачивающего вектор намагниченности M системы на 90° , подается первый импульс градиента магнитного поля g , который расфазировывает намагниченность в образце. После третьего импульса подается второй фазирующий градиентный импульс [27].

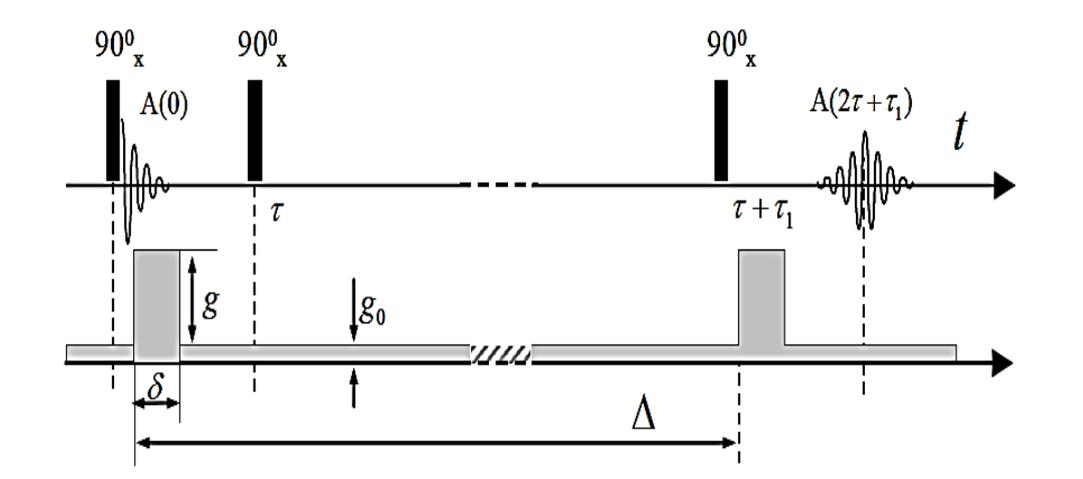


Рисунок 17 - Импульсная последовательность стимулированного спинового эха с импульсным градиентом магнитного поля (ИГМП) для измерения коэффициента самодиффузии

Данный метод позволяет измерить коэффициенты самодиффузии молекул из зависимости сигнала спинового эха от величины постоянного (или импульсного) градиента магнитного поля.

Амплитуда сигнала стимулированного эха определяется выражением:

$$A(2\tau, \tau_1, g^2) = A(2\tau, \tau_1, 0) \exp[-\gamma^2 g^2 \delta^2 D t_d] \quad (18)$$

Для случая экспоненциальной релаксации:

$$A(2\tau, \tau_1, 0) = \frac{A(0)}{2} \exp\left(-\frac{2\tau}{T_2} - \frac{\tau_1}{T_1}\right) \quad (19)$$

где $A(2\tau, \tau_1, 0)$ – амплитуда сигнала стимулированного спинового эха при $g = 0$, $A(0)$ – начальная амплитуда сигнала свободной индукции после первого 90° р.ч. импульса, τ и τ_1 – временные интервалы между первым и вторым,

вторым и третьим 90° р.ч. импульсами, T_2 – время спин-спиновой релаксации; T_1 – время спин-решеточной релаксации; δ и g – длительность и амплитуда ИГМП, соответственно; время t_d – время диффузии, при котором происходит спад спинового эха [27].

Для характеристики затухания амплитуды стимулированного эха в многофазных системах с различными КСД D_i и временами релаксации T_{1i} и T_{2i} , используется выражение:

$$A(2\tau, \tau_1, g^2) = \frac{A(0)}{2} \sum_{i=1}^N p_i \exp[-\gamma^2 g^2 \delta^2 D_i t_d], \quad (20)$$

$$p_i = \frac{p_i \exp(-\frac{2\tau}{T_{2i}} - \frac{\tau_1}{T_{1i}})}{\sum_{i=1}^N p_i \exp(-\frac{2\tau}{T_{2i}} - \frac{\tau_1}{T_{1i}})} \quad (21)$$

Здесь N - число фаз в системе, p_i - вес компоненты, характеризующейся КСД D_i и временами релаксации T_{1i} и T_{2i} [27].

Характеристики аппаратуры для измерения коэффициентов самодиффузии методом ЯМР с импульсным градиентом магнитного поля.

Измерения и регистрация ЯМР-спектров на ядрах ^{31}P проводились на спектрометре Bruker Avance III 400 МГц при постоянной температуре 308 К.

Для изучения ^1H самодиффузии компонент системы состоящей из яичного лецитина в смеси ионной жидкости и воды использовалась последовательность стимулированного спинового эхо с импульсным градиентом магнитного поля (ИГМП).

Измерения самодиффузии на ядрах ^1H проводились на частоте резонанса 400 МГц с максимальным градиентом $g=24$ Тл/м. Время $t_d=\Delta-\delta/3$, за которое формируется «диффузионный вклад» в затухание сигнала спинового эха, составляла от 70 до 100 мс. Длительность δ ИГМП была равной 3 мс. Все измерения проводились при температуре 308 К.

Результаты ЯМР экспериментов обрабатывались с помощью программ *TopSpin* и *dmfit*.

2.3.1 Понятие самодиффузии

Самодиффузия возникает в термодинамически равновесных системах за счет теплового хаотического пространственного перемещения молекул. Также различают взаимодиффузию, которая происходит в неравновесной среде из-за наличия градиента химического потенциала.

Самодиффузия описывается с помощью плотности условной вероятности $P(\bar{r} - \bar{r}_0, t)$ (или функцией Грина) нахождения центра тяжести рассматриваемой молекулы в точке пространства с радиус-вектором в момент времени t , если в начальный момент времени $t=0$ он находился в точке \bar{r}_0 . При временах наблюдения (диффузионный режим), где является наибольшим из времен корреляции, связанных с пространственными степенями свободы рассматриваемой молекулы, описывается параметром D – коэффициентом самодиффузии (КСД) и имеет вид [27]:

$$P(\bar{r} - \bar{r}_0) = \frac{1}{(4\pi Dt)^{3/2}} \exp\left(-\frac{(\bar{r}-\bar{r}_0)^2}{4Dt}\right), \quad (13)$$

со среднеквадратичным смещением молекулы $\langle(\bar{r} - \bar{r}_0)^2\rangle = 6Dt$ за время t (соотношение Эйнштейна).

Коэффициент самодиффузии D из общих принципов статистической физики определяется так:

$$D = \frac{1}{3} \int_0^\infty \langle \bar{v}(t) \times \bar{v}(0) \rangle dt, \quad (14)$$

где \bar{v} – вектор скорости центра масс молекулы, следующим образом:

Есть и другое определение КСД, которое часто применяется на практике. Оно исходит из решения уравнения Ланжевена в классической теории броуновского движения [28]:

$$D = \frac{kT}{f}, \quad (15)$$

где k – константа Больцмана, T – температура, f – коэффициент трения.

Для броуновской частицы сферической формы, движущейся в жидкости, коэффициент трения равен:

$$f = 6\pi\eta R \quad (16)$$

где R – гидродинамический радиус частицы, η – коэффициент вязкости растворителя.

Таким образом, коэффициент самодиффузии (15) приобретает вид :

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R} \quad (17)$$

Полученное уравнение носит название уравнения Стокса-Эйнштейна. С помощью данного уравнения можно рассчитать гидродинамический радиус R молекулы белка и, тем самым, оценить его размер.

2.4 Основные принципы измерения T_2 методом ЯМР

Для измерения времен поперечной релаксации или другими словами, время спин-спинового взаимодействия принято использовать метод Карра-Парселла-Мейбума-Гилла (КПМГ). Он удобен тем, что устраняет шумы, которые часто возникают из-за неоднородности постоянного магнитного поля. Последовательность КПМГ выглядит так: $90_x^0 - \tau - (180_y^0 - 2\tau(\text{эхо}))_n$, n – количество эхо, где τ – время между первыми 90^0 и 180^0 р.ч. импульсами. [29]. Величина $2n\tau$ – характеризуется как время эволюции системы ядерных спинов. Между подачами 180^0 -ых импульсов образуются сигналы спинового эха.

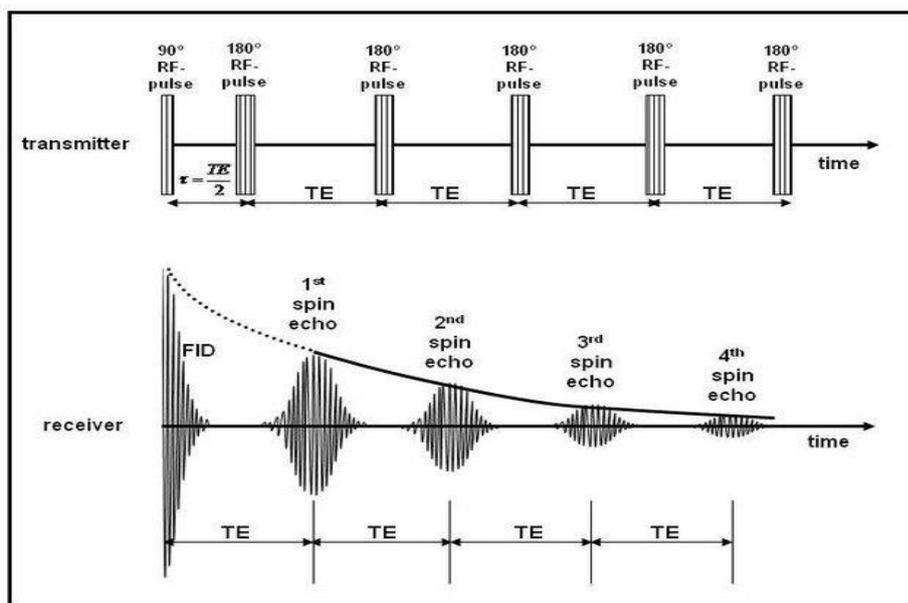


Рисунок 4 – Последовательность Карра-Парселла-Мейбума-Гила (КПМГ) для измерения времени спин - спиновой релаксации T_2

Амплитуда сигнала спинового эха, которая затухает со временем за счет спин-спиновой релаксации, в простейшем случае выглядит так:

$$A(t) = A(0)\exp\left(-\frac{t}{T_2}\right)$$

2.5 Объекты исследования

Объектами исследования являются система липидов, состоящая из лецитина при концентрации 2% по весу в смеси растворителей этиламмония нитрата (EAN) с дейтерированной водой (D_2O).

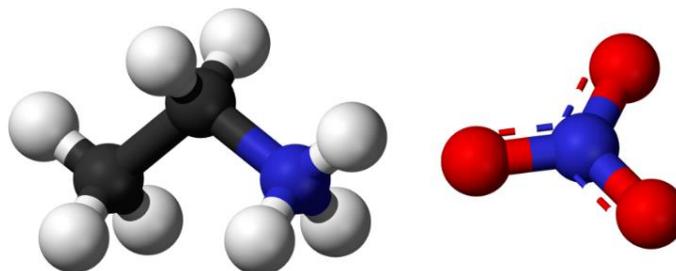


Рисунок 18 – Структура нитрата этиламмония

Нитрат этиламмония представляет собой соль с формулой $C_2H_8N_2O_3$. Это бесцветная или слегка желтоватая жидкость без запаха с температурой плавления $12\text{ }^{\circ}C$. Молярная масса 108 г/моль .

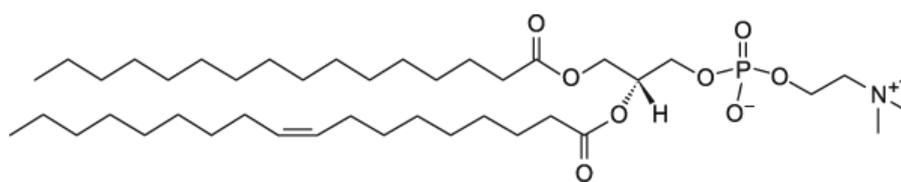


Рисунок 19 - Структура яичного лецитина

Яичный лецитин или фосфатидилхолин. Молярная масса 770 г/моль .

2.6 Методика приготовления образцов

Образцы были приготовлены с помощью метода гидратации тонкой пленки. Вначале в пластиковую пробирку добавляли необходимое количество лецитина и растворяли в этаноле, затем, аккуратно выдували растворитель потоком воздуха. Для полного удаления растворителя образцы подвергались лиофилизации под вакуумом 24 часа. Приготовленная липидная пленка растворялась добавлением необходимого количества смеси растворителей дейтерированная вода (D_2O) / этиламмоний нитрат (EAN).

В результате были приготовлены суспензий из лецитина при концентрации 2% по весу в смеси растворителей дейтерированная вода (D_2O) / этиламмоний нитрат (EAN) в соотношениях: 100/0, 80/20, 60/40, 40/60, 20/80, 0/100.

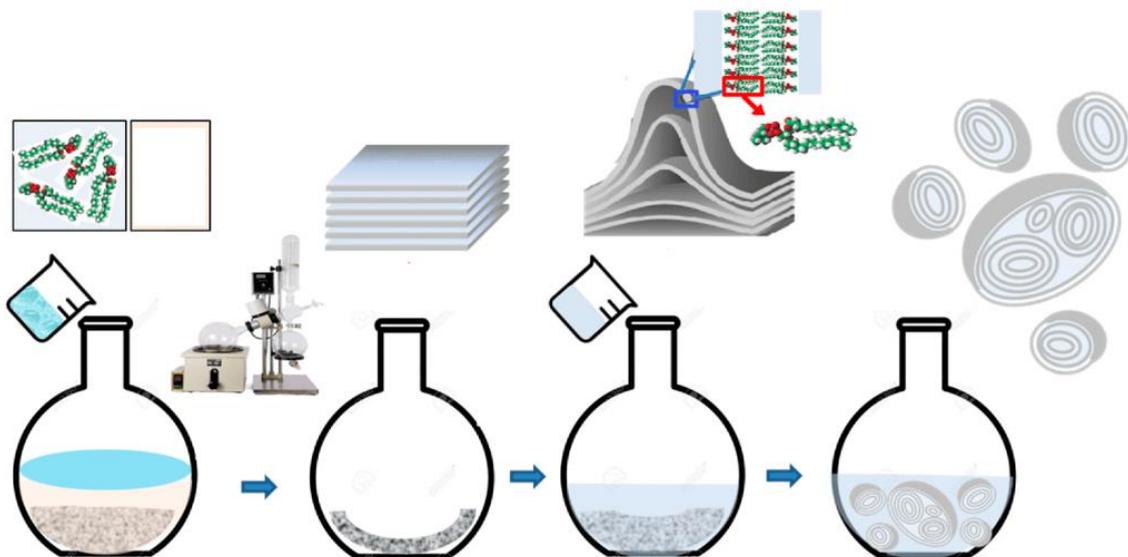


Рисунок 20 – Схематическое представление методики приготовления образцов: а – растворение в этаноле, выпаривание растворителя потоком воздуха и лиофелизация; б – Образование тонкой пленки (гидратирование), в – растворение в смеси D_2O /EAN, г – этап образования мультиламеллярных везикул

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1 Исследование фазового поведения фосфолипидов в системе лецитин - смесь растворителей D₂O/EAN методом ³¹P спектроскопии

Метод ³¹P ЯМР спектроскопии применяется при исследовании структурной организации и фазового поведения липидных систем, позволяет определять фазовое состояние фосфолипидов.

Для образца лецитин – D₂O (рисунок 21), форму линии ³¹P ЯМР спектра определяет аксиально-симметричный тензор экранирования, опираясь на литературные данные, можно сказать, что в данной системе возникает быстрое вращение вокруг собственной оси молекул липидов. Спектр характеризуется наличием высокого пика в области -10 – -20 м.д., широкого «плеча» в области 30–10 м.д. Наблюдаемая полная анизотропия химического сдвига – составляет величину 30 м.д.

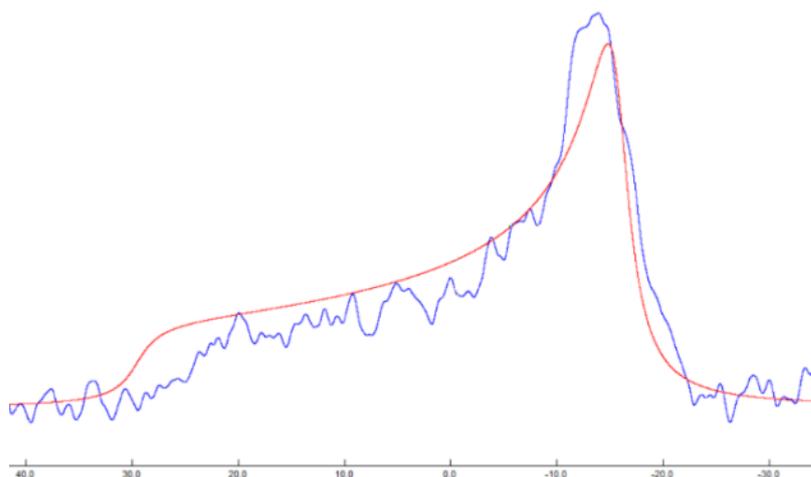


Рисунок 21 – ³¹P ЯМР спектр для лецитина в 100 % D₂O

Полученная аксиально-симметричная форма линии спектра указывает на нахождение липидов в D₂O в ламеллярной жидкокристаллической фазе, характерной для везикул [22].

На рисунке 21 представлены ^{31}P ЯМР спектры смеси лецитина при разных соотношениях растворителей $\text{D}_2\text{O}/\text{EAN}$.

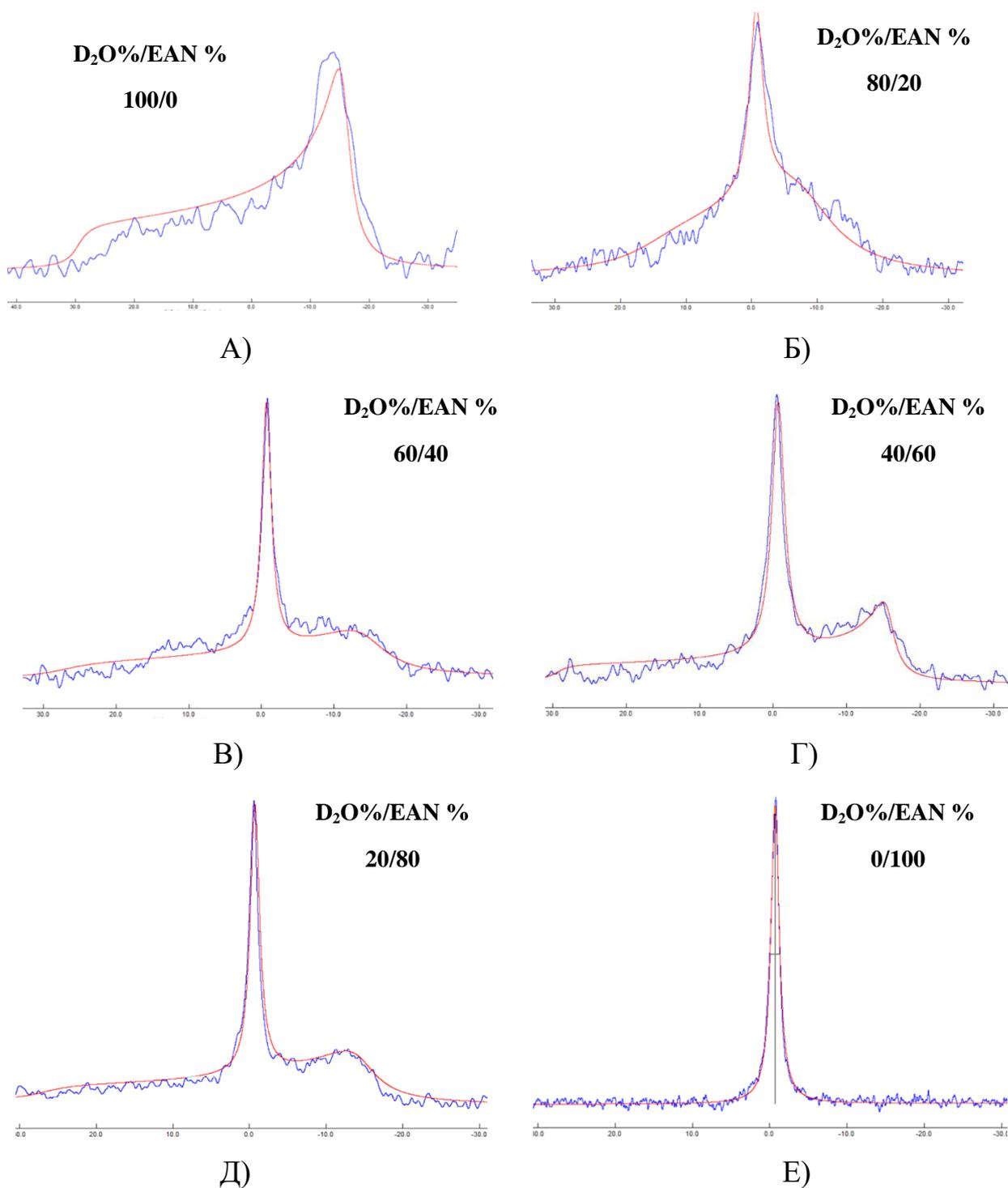


Рисунок 22 – ^{31}P ЯМР спектры для смеси из лецитина и растворителей D_2O и EAN при разных соотношениях

Рассмотрим рисунок 22, видно, что при добавлении ионной жидкости в исследуемую систему, на спектрах появляется характерный изотропный сигнал, доля которого растет по мере увеличения содержания ИЖ в растворе. Это означает, что в присутствии ионной жидкости в системе с лецитином наряду с ламеллярной жидкокристаллической фазой образуется еще изотропная фаза, обусловленная быстрым изотропным вращением липидных структур, возможно мицелл.

Для наглядности в таблицу №1 занесены данные по двум компонентам обработанного спектра. По мере увеличения доли EAN в смеси растворителей D₂O-EAN анизотропная доля сигнала уменьшается, а изотропная увеличивается (см. таблицу №1). Так в 100% EAN наблюдается узкий симметричный сигнал, соответствующий быстрому изотропному движению, характерный при формировании мицелл.

Таблица №1 –

<i>D₂O/EAN</i>	<i>0/100</i>	<i>20/80</i>	<i>40/60</i>	<i>60/40</i>	<i>80/20</i>	<i>100/0</i>
<i>Изотропная компонента(%)</i>	<i>100</i>	<i>80</i>	<i>65</i>	<i>30</i>	<i>30</i>	<i>0</i>
<i>Анизотропная компонента(%)</i>	<i>0</i>	<i>20</i>	<i>35</i>	<i>70</i>	<i>70</i>	<i>100</i>

Таким образом, в системе лецитин – D₂O наблюдается ламеллярная жидкокристаллическая фаза, характерная для липосом, а в системе лецитин – EAN изотропная фаза. В смеси D₂O – EAN наблюдается корреляция соотношения этих двух фаз с долями растворителей D₂O и EAN.

3.2 Исследование особенностей трансляционной подвижности структур в системе лецитин-смесь растворителей D₂O/EAN методом ¹H ЯМР диффузометрии

На рисунке 22 представлен график диффузионного затухания смеси лецитина с дейтерированной водой и ионной жидкостью при разных соотношениях растворителей при температуре 308 К. Система трехкомпонентная: характеризуется коэффициентами самодиффузий лецитина, ионной жидкости, дейтерированной воды. При увеличении доли воды в смеси, наблюдаются изменения всех трех компонент. Вязкость ионной жидкости высокая, но уменьшается при добавлении воды.

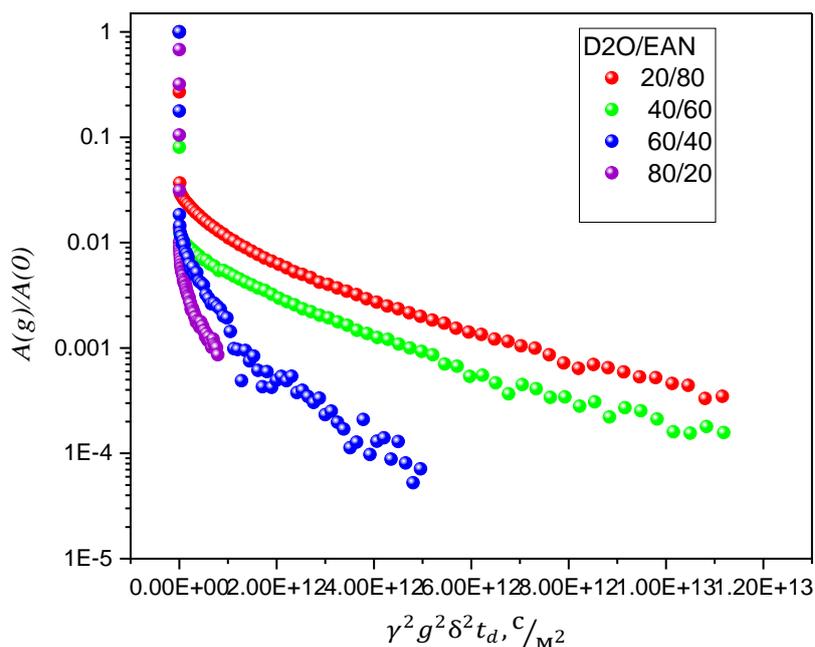


Рисунок 22 – Диффузионное затухание лецитина (2% по весу) при разных соотношениях D₂O/EAN

У ионных жидкостей амфифильная природа: катионы – гидрофобны, анионы – гидрофильны. Хотя вода и взаимодействует в большей степени с анионом, но роль катионов также значительная, благодаря способности

установливать прочные водородные связи, что приводит к увеличению молекулярной подвижности системы. Полученные данные свидетельствуют об этом: КСД ионной жидкости и липидов растут (рисунок 23). Исходя из формулы Эйнштейна – Стокса, которая показывает обратную пропорциональность между величинами КСД и вязкости, можно сказать, изменение коэффициента самодиффузии каждой компоненты системы связано с изменением вязкости среды.

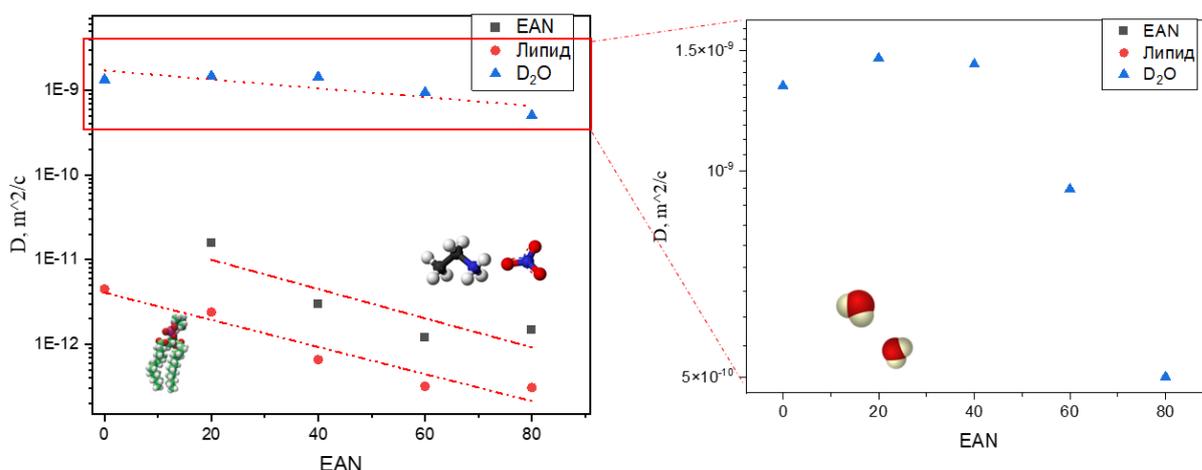


Рисунок 23 – Зависимость коэффициентов самодиффузии ионной жидкости EAN, фосфолипидов яичного лецитина от изменения соотношения растворителей в смеси D_2O/EAN

Все экспериментальные значения КСД компонент диффузионного затухания системы, состоящей из лецитина при разных соотношениях растворителей D_2O/EAN занесены в таблицу. КСД лецитина, воды и ионной жидкости получились порядка 10^{-13} - 10^{-12} m^2/c , 10^{-9} m^2/c , 10^{-11} m^2/c соответственно.

Таблица 2 –

D_2O/EAN (w/w)	100/0	80/20	60/40	40/60	20/80	0/100
$D_{лец}, м^2/с$	$4,5*10^{-12}$	$2,4*10^{-12}$	$6,6*10^{-13}$	$3,2*10^{-13}$	$3,1*10^{-13}$	$9,3*10^{-13}$
$D_{ион.жид},$ $м^2/с$	-	$1,56*10^{-11}$	$0,3*10^{-11}$	$0,12*10^{-11}$	$0,15*10^{-11}$	$5*10^{-11}$
$D_{вода},$ $м^2/с$	$1,33*10^{-9}$	$1,46*10^{-9}$	$1,43*10^{-9}$	$0,94*10^{-9}$	$0,5*10^{-9}$	-

Далее представлены результаты наблюдения диффузионного затухания лецитина в чистых растворителях. На рисунке 23 показан график диффузионного затухания (ДЗ) лецитина (2% по весу) в 100 % D_2O . ДЗ имеет двухэкспоненциальный вид и характеризуется коэффициентами самодиффузии (КСД) воды $D_{вода}=1,33*10^{-9} м^2/с$ и липида $D_{лецитин}=3,6*10^{-12} м^2/с$. Используя формулу Эйнштейна – Стокса (см. формулу 15) рассчитали размеры липидных частиц: $R_{липид} = \approx 4,94 \times 10^{-8} м$ (диаметр $d \approx 98 нм$). Полученные результаты согласуются с литературными значениями размера липида: [22].

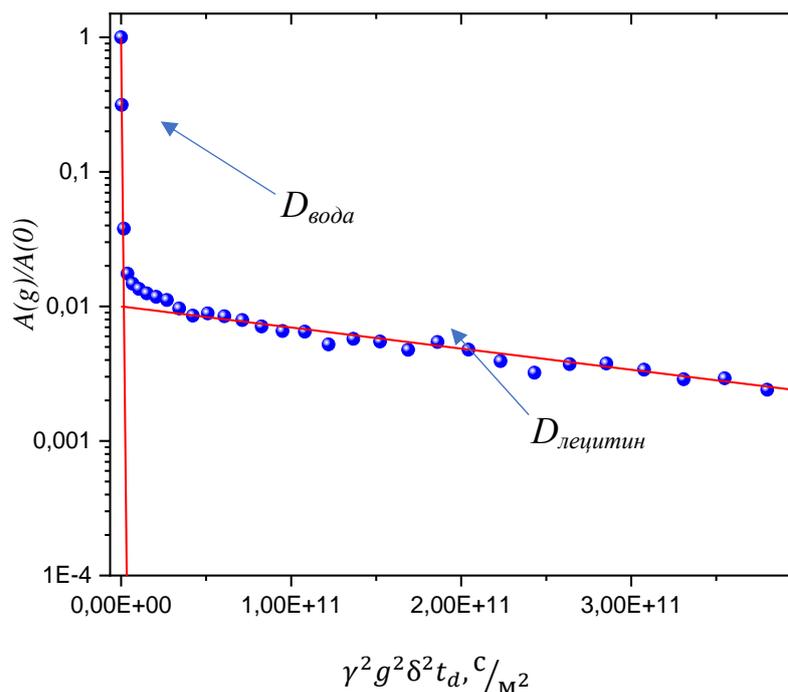


Рисунок 23 – Диффузионное затухание лецитина

(2% по весу) в D_2O , $T=308$ К; $\eta=1,25 \cdot 10^{-3}$ Па*с

$$D_{\text{вода}}=1,33 \cdot 10^{-9} \text{ м}^2/\text{с}, D_{\text{лецитин}}=3,6 \cdot 10^{-12} \text{ м}^2/\text{с}$$

Опираясь на полученные результаты ^{31}P спектра, можем предположить, что компонента ДЗ, относящаяся к липиду, связана со свободно диффундирующими липидными частицами – везикулами.

На рисунке 24 представлено диффузионное затухание (ДЗ) лецитина (2% по весу) в EAN. ДЗ имеет двухэкспоненциальный вид и характеризуется коэффициентами самодиффузии (КСД) ионной жидкости $D_{\text{ион.жид.}}=5 \cdot 10^{-11} \text{ м}^2/\text{с}$ и липида $D_{\text{лецитин}}=9,2 \cdot 10^{-13} \text{ м}^2/\text{с}$. КСД ионной жидкости согласуется с литературными данными ИЖ EAN [9]. Размер липидной частицы в 100% EAN составляет: $R_{\text{липид}} = \approx 8,63 \times 10^{-9} \text{ м}$ (диаметр $d \approx 17 \text{ нм}$). Полученные результаты согласуются с литературными значениями размера липида [22].

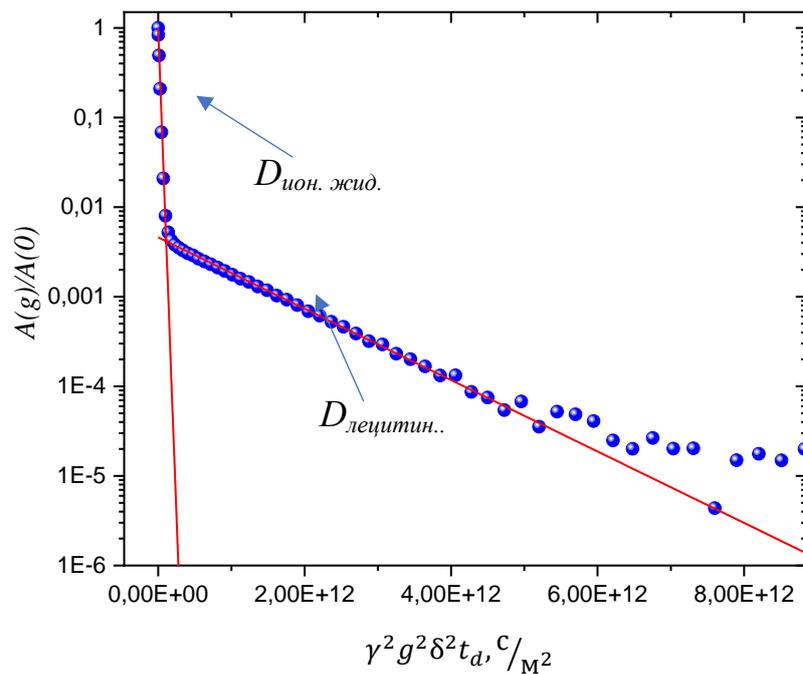


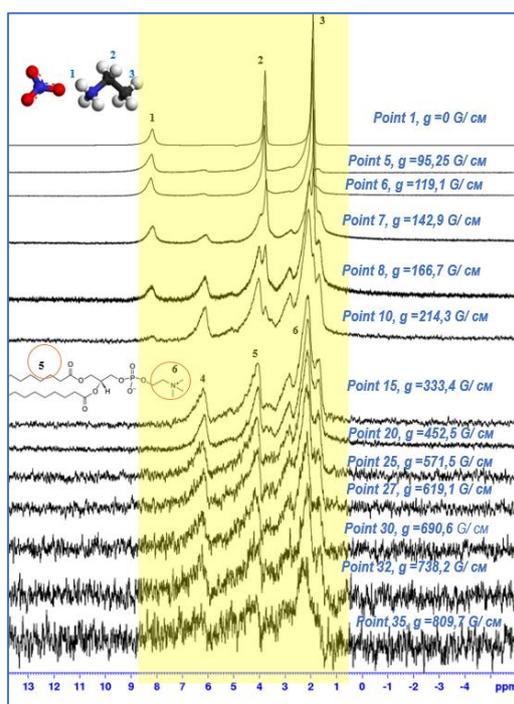
Рисунок 24 – Диффузионное затухание лецитина

(2% по весу) в EAN, $T=308$ К; $\eta= 28 \cdot 10^{-3}$ Па*с

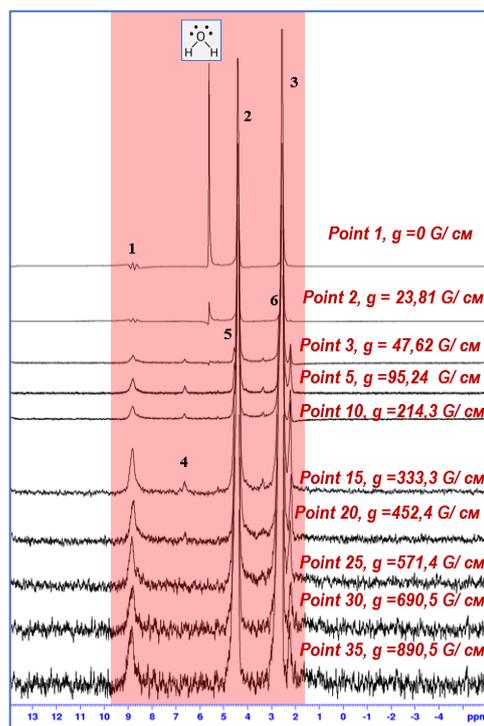
$$D_{\text{ион.жид.}}=5 \cdot 10^{-11} \text{ м}^2/\text{с}, D_{\text{лецитин}}=9,2 \cdot 10^{-13} \text{ м}^2/\text{с}$$

В ^{31}P спектрах мы наблюдали изотропный пик, исходя из этого, можем предположить, что липидная компонента связана с движением диффундирующих мицелл.

3.2.1 Анализ линий ЯМР спектров ^1H системы лецитин (2% по весу) в смеси - $\text{D}_2\text{O}/\text{EAN}$

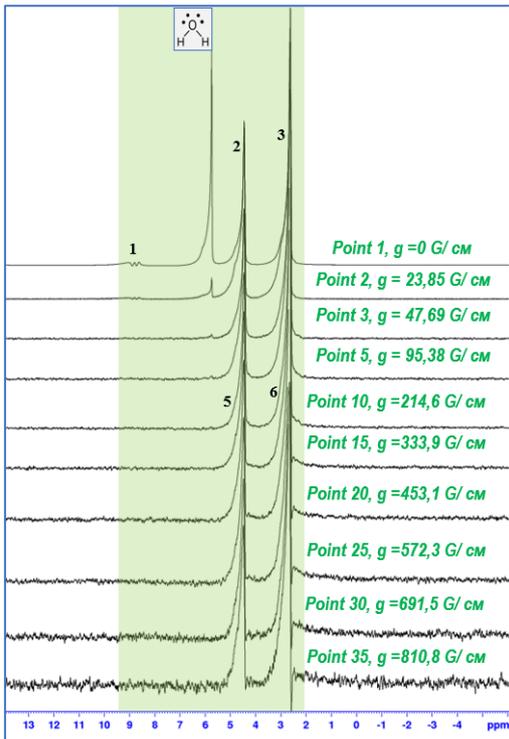


A)

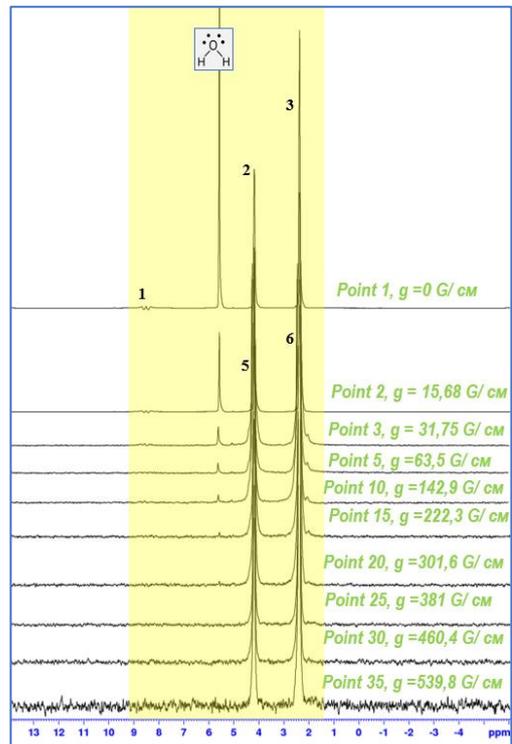


Б)

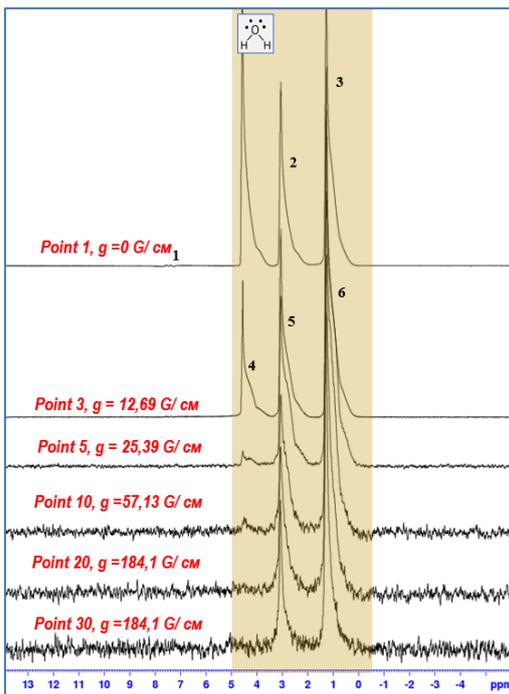
Рисунок 25 – спектральные линии системы лецитина в зависимости от градиента магнитного поля при разных соотношениях долей растворителей $\text{D}_2\text{O}/\text{EAN}$: А – 100% EAN, Б – 20/80, В – 40/60, Г – 60/40, Д – 80/20, Е – 100 % D_2O



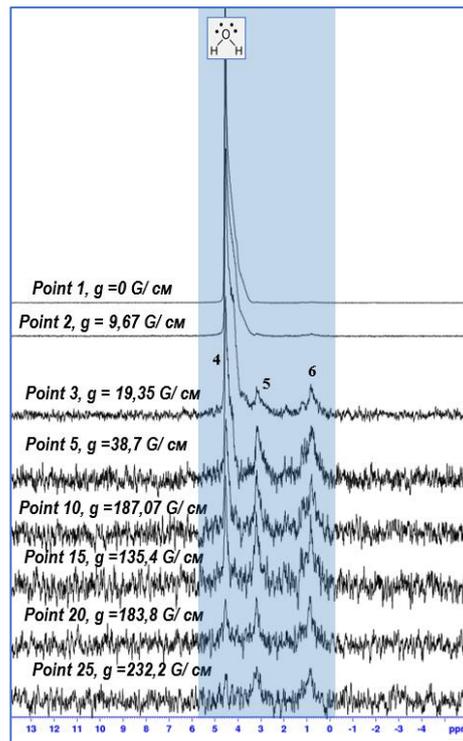
В)



Г)



Д)



Е)

Продолжение рисунка 25 – спектральные линии системы лецитина при разных соотношениях долей растворителей D_2O/EAN : В – 40/60, Г – 60/40, Д – 80/20, Е – 100 % D_2O

Был проведен анализ линий системы лецитина в смеси растворителей D_2O/EAN – рисунок 25. Для начала обратим внимание на результаты полученные в чистой ионной жидкости – EAN. Обнаружилось, что при высоких градиентах начинают проявляться пики относящиеся к протонам фосфолипида. Опираясь на рассчитанные КСД каждой компоненты системы при анализе всех линий отдельно, предположили соотношение наблюдаемого пика с компонентами исследуемой системы. Результаты занесены в таблицу №3. Таким образом, наблюдая систему лецитина в чистом EAN, заметили, что компонента липида, относящаяся к холиновой группе – $N^+(CH_3)_3$, проявляется отдельным пиком и не перекрывается с другими спектральными линиями (в области 5,5 – 6,5 м.д). Так же ведет себя протоны ионной жидкости относящиеся к - NH_3 (в области 7,5 – 8,5 м.д). При добавлении воды в систему спектральная линия этой компоненты менее заметна, что возможно, связано с образованием более крупных частиц. Водороды группы NH_3 свободно строят связи, в то время как протоны CH – группы липида и ионной жидкости внешне никак не взаимодействуют. Полученные значения КСД представлены в виде графика – рисунок 26.

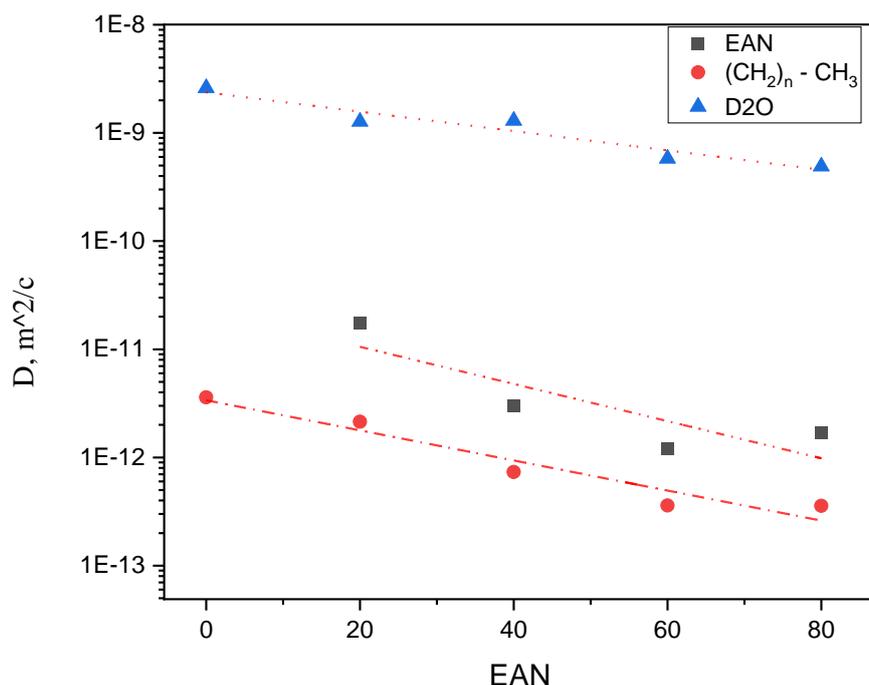
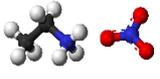
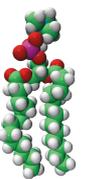


Рисунок 26 – Зависимость коэффициентов самодиффузии компонент, относящихся СН – группам ионной жидкости EAN, фосфолипида яичного лецитина от изменения соотношения растворителей в смеси D₂O/EAN

Как и при анализе КСД сплошного спектра системы, наблюдается корреляция коэффициентов самодиффузий отдельных компонент: СН₂ - СН₃ компонент ИЖ, также (СН₂)_n - СН₃ фосфолипида увеличиваются, по мере добавления в систему воды. Все значения занесены в таблицу №3.

Таблица №3

D_2O/EAN	D	100/0	80/20	60/40	40/60	20/80	0/100
Нитрат этиламмония 	H_3N	-	-	-	-	$9,05 \cdot 10^{-11} m^2/c$	$5,61 \cdot 10^{-11} m^2/c$
	CH_2 - CH_3	-	-	$1,75 \cdot 10^{-11} m^2/c$	$0,3 \cdot 10^{-11} m^2/c$	$0,12 \cdot 10^{-11} m^2/c$	$0,17 \cdot 10^{-11} m^2/c$
Липид 	$N^+(CH_3)_3$	$7,14 \cdot 10^{-12} m^2/c$	-	-	-	$1,32 \cdot 10^{-12} m^2/c$	$6,62 \cdot 10^{-13} m^2/c$
	$(CH_2)_n$ - CH_3	-	$3,6 \cdot 10^{-12} m^2/c$	$2,14 \cdot 10^{-12} m^2/c$	$7,34 \cdot 10^{-13} m^2/c$	$3,6 \cdot 10^{-13} m^2/c$	$3,57 \cdot 10^{-13} m^2/c$
Дейтерированная вода	D_2O	$2,6 \cdot 10^{-9} m^2/c$	$1,27 \cdot 10^{-9} m^2/c$	$1,31 \cdot 10^{-9} m^2/c$	$0,58 \cdot 10^{-9} m^2/c$	$0,49 \cdot 10^{-9} m^2/c$	-

3.3 Исследование поперечной ЯМР релаксации на ядрах ^1H в системе лецитин в системе лецитин - смесь растворителей $\text{D}_2\text{O}/\text{EAN}$

На рисунке 27 изображен график спада поперечной намагниченности системы лецитина в смеси растворителей $\text{D}_2\text{O}/\text{EAN}$. Короткие времена релаксации характеризуют «медленные» движения, длинные времена относятся к быстрым движениям в системе.

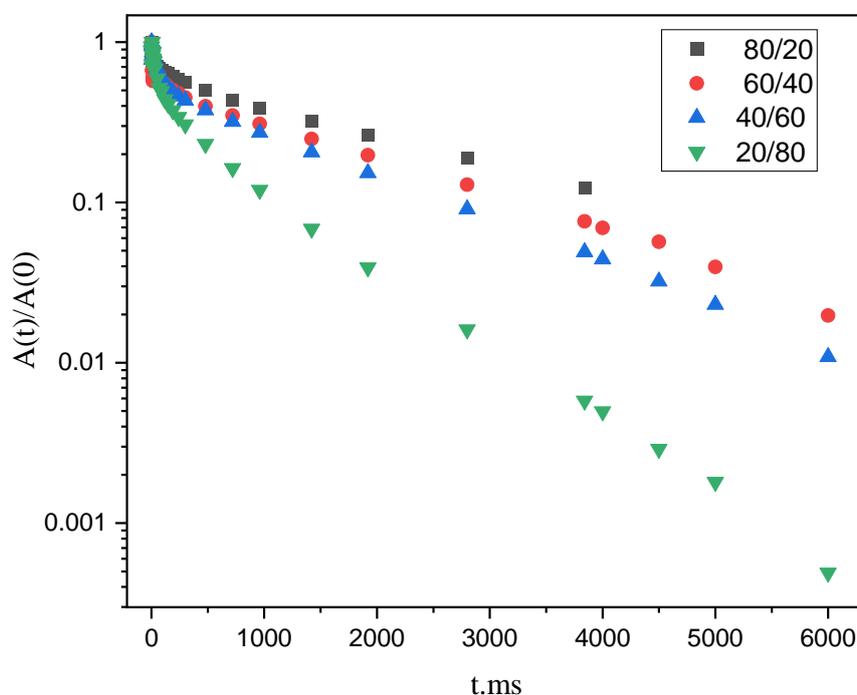


Рисунок 29 – Спады поперечной намагниченности лецитина (2% по весу) при разных соотношениях $\text{D}_2\text{O}/\text{EAN}$ при температуре 308 К

Исходя из данных таблицы № 4 можно предположить, что в системе длинная компонента T_2 относится к подвижным структурам, таким как мицеллы, а средняя и короткая T_2 , возможно описывает поведение мультислойных везикул – малоподвижные структуры. Добавление ИЖ в систему приводит к уменьшению времен спин-спиновой

релаксации для трех компонент. Сравнивая с результатами с предыдущих экспериментов, где подразумевалось изменение фазового состояния, а также вязкости, можно предположить образование мелких частиц – мицелл.

Таблица № 4

<i>D₂O/EAN</i>	<i>p_{дл}</i>	<i>Длин. - T₂, мс</i>	<i>p_{ср}</i>	<i>Сред. - T₂, мс</i>	<i>p_{кор}</i>	<i>Кор. - T₂, мс</i>
80/20	0,6	4948	0,14	412	0,15	23
60/40	0,51	4050	0,236	143	0,25	18
40/60	0,51	3160	0,35	173	0,2	23
20/80	0,4	1850	0,45	170	-	-

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

- Исследование спектров методом ^{31}P ЯМР выявило в системе две фазы: лецитин – D_2O ламеллярная жидкокристаллическая (липосома), а в системе лецитин – EAN изотропная фаза. В смеси D_2O – EAN наблюдается корреляция соотношения этих двух фаз с долями растворителей D_2O и EAN.
- Диффузионные эксперименты позволяют сделать предположение что, компонента диффузионного затухания со значением коэффициента самодиффузии (КСД), относящимся к липидам в 100% EAN, может быть связана с движением диффундирующих мицелл, регистрируемых в ^{31}P спектре в виде изотропного сигнала с размером ~ 20 нм; КСД относящимся к липидам в 100 % D_2O , может быть связана с движением диффундирующих везикул с размером ~ 100 нм.
- По мере увеличения доли D_2O в смеси растворителей D_2O – EAN коэффициенты самодиффузии, относящиеся к ионной жидкости и липидам увеличиваются, т.е. система становится более подвижной, что может быть связано с уменьшением вязкости.
- По данным ЯМР релаксометрии спады поперечной намагниченности для липидной системы в смеси растворителей D_2O – EAN, при варьировании соотношений от 80/20 до 20/80, обусловлены суммой вкладов от трех компонент, что свидетельствует о наличие в системе компонент с различающейся молекулярной подвижностью: «жидкофазной» и компонент, связанных с движением диффундирующих мицелл и везикул, наблюдаемых в ^{31}P спектрах.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ionic Liquids: Green Solvents for Chemical Processing. / A. P. De los Ríos, A. Irabien, F. Hollmann, F. J. H. Fernández // *Journal of Chemistry*. – 2013. – P. 1-2.
2. Vesicles in ionic liquids. / F Gayet, J. D. Marty, A. Brulet, Lauth-de Viguerie // *Langmuir*. – 2011. V. 27. –P. 9706-9710
3. Catanionic Surfactant Self-Assembly in Protic Ionic Liquids. / S. J. Bryant, R. Atkin, M. Gradzielski, G. G.Warr / *The Journal of Physical Chemistry Letters*. – 2020. –V. 11 (15) , –P. 5926-5931
4. Catanionic and chain-packing effects on surfactant self-assembly in the ionic liquid ethylammonium nitrate / S. J. Bryant, C. J. Jafta, R. Atkin, [et al] // *Journal of Colloid and Interface Science*. –2019. – P. 515–523
5. Micelle formation in ethylammonium nitrate, a low-melting fused salt. [Text] / D. F. Evans, A. Yamauchi, R. Roman, E. Z. Casassa // *Journal of Colloid and Interface Science*, –1982. – V. 88(1). – P. 89–96.
6. Evans, D. F. Micelle size in ethylammonium nitrate as determined by classical and quasi-elastic light scattering Evans [Text]/ D. F. Evans, A. Yamauchi, G. J. Wei, V. A. Bloomfield // *The Journal of Physical Chemistry*, – 1987. – V. 87(18), – P. 3537–3541.
7. Acute toxicity of ionic liquids to the zebrafish (*Danio rerio*) / C. Pretti, C. Chiappe, D. Pieraccini, M. Gregori // *Green Chemistry*. – 2006. – V. 8. – P. 238-240.
8. Acute and chronic toxicity of imidazolium-based ionic liquids on *Daphnia magna* / R. J. Bernot, M. A. Brueseke, M. A. Evans-White, G. A. Lamberti // *Environmental Toxicology and Chemistry*. – 2005. –V. 24(1). – P. 87-92
9. Filippov, A. V., Self-Diffusion and Microstructure of Some Ionic Liquids in Bulk and in Confinement / A. V. Filippov. // Doctorial thesis // *Chemistry of Interfaces*. – 2016. – P. 282.
10. Ionic Liquid Structure-Property Relationship: A Critical Analysis / Wagner Silva , Marcileia Zanatta , Ana Sofia Ferreira , [et al]// *International Journal of Molecular Sciences* // *Int. J. Mol. Sci.* – 2020, – .V. 21,– 7745
11. Ludwig, R., *Ionic Liquids in Synthesis* / R. Ludwig // *Chemsuschem*. – 2008. – P. 863-864.
12. Angell, C. A. Parallel Developments in Aprotic and Protic Ionic Liquids / C. A. Angell, N. Byrne, J.-P Belieres,. // *Physical Chemistry and Applications. Accounts of Chemical Research*, – 2007. –V. 40(11), – P. 1228–1236.

13. Saedtler, M. Amorphous Ionic Liquid Strategies for Pharmaceutical Application / M. Saedtler, L. Meinel // Encyclopedia of Ionic Liquids. – 2019. – P. 1-11.
14. Плечкова Н.В., Седдон К.С. Ионные жидкости: «дизайнерские» растворители для зеленой химии / Тундо П., Пероса А., Зеккини Ф. (ред.) – Текст : непосредственный // Методы и реагенты для зеленой химии: введение. – 2007. – стр. 105-130.
15. Deetlefs, M Ionic liquids: fact and fiction / M. Deetlefs, K. R. Seddon // Chim Oggi-Chem Today . – 2006. – V. 24, – P. 16–23.
16. Kaur, G. Diverse applications of ionic liquids: A comprehensive review / G. Kaur, H. Kumar, M. Singla // Journal of Molecular Liquids. – V. 351. – 2022, – 118556.
17. Sharma, V. K. Deciphering interactions of ionic liquids with biomembrane / V. K. Sharm, R. Mukhopadhyay // Biophysical Reviews. –V. 10. – 2018. –P. 721-734
18. Review of the toxic effects of ionic liquids / C. W. Cho, T. T Pham, Y. Zhao, S. Stolte, Y. S. Yun // Science of the Total Environment. – 2021. – V. 786, – 147309.
19. Rutala, A. Disinfection, Sterilization, and Control of Hospital Waste / A. Rutala, J. David Weber // Principles and Practice of Infectious Diseases. – 2015. – P. 3294-3309.
20. Huang, K. X. Applications of ionic liquids in whole-cell biocatalysis [Text] / K. X. Huang , J. G. Zhang, X. Song // Modern Chemical Industry. – 2012. – P. 13-18.
21. Овчинников, Ю. А. Биоорганическая химия : учебник / Ю. А. Овчинников. – М. : Просвещение, 1987. – 816 с. – Текст : непосредственный.
22. Ивков, В. Г. Липидный бислой биологических мембран: Теоретическая и прикладная биофизика : учебник / В. Г. Ивков, Г. Н. Берестовский. – М.: Наука, 1982. – 224 с. – Текст : непосредственный.
23. Kulkarni, C. V. Lipid crystallization: from self-assembly to hierarchical and biological // C. V. Kulkarni // The Royal Society of Chemistry. – 2012, – V. 4, – P. 5779-5791.
24. Спектроскопия ядерного магнитного резонанса – Текст : электронный // ChemNet Россия : [сайт] – Москва, 2003 – URL: <http://www.chem.msu.ru/rus/teaching/ustyniuk-nmr-lectures/welcome.html>.
25. Хеберлен, У. ЯМР высокого разрешения в твердых телах : учебник / У. Хеберлен, М. Меринг. – Москва : Мир, 1980. – 504 с. – Текст : непосредственный.

26. ^{31}P NMR Spectroscopy of Phospholipids: From Micelles to Membranes / J. Schiller, M. Muller, B. Fuchs, [et al] // Current Analytical Chemistry. – 2007. – V. 3 (4) – P. 283-301.
27. Халиуллина А. В. Исследование самодиффузии белков в растворе методом ЯМР : учеб.-метод. пособие / А. В. Халиуллина, А. В. Филиппов. – Казань : КФУ, 2019. – 54 с. – Текст : непосредственный.
28. Маклаков, А.И. Самодиффузия в растворах и расплавах полимеров : учебник / А. И. Маклаков, В. Д. Скирда, Н. Ф. Фаткуллин. – К.: Изд-во КГУ, 1987. – 224 с. – Текст : непосредственный.
29. Фаррар, Т. Импульсная и Фурье-спектроскопия ЯМР : учебник / Т. Фаррар, Э. Беккер. – Москва : Мир, 1973. – 164 с. – Текст : непосредственный.