

MODERN FIZIKAI MÓDSZEREK (EPR, NMR)* A MEMBRÁNOK SZERKEZETÉNEK VIZSGÁLATÁNÁL

BELÁGYI JÓZSEF

POTE Központi Laboratórium, Pécs

A fizikai és kémiai tudományok rohamos fejlődése, a biológiai és orvostudományoknál a kvantitatív megfogalmazásra való törekvés szükségesszerűvé tette az egyes tudományágak széles felületen történő kapcsolódását. A kvantitatív megfogalmazás elengedhetetlen feltétele a sok körülményre kiterjedő informatív mérés és az egzakt természettudományok törvényszerűségeinek alkalmazása. A biológiai rendszerek bonyolultságát tekintve a mérési módszerek rendkívül széles skálájára van szükség az elektron- és molekuláris biológiától a biológiai automatizmusok szabályozáselméleti tárgyalásáig. A jelen referátum keretei között a sok egyenértékű és hasznos módszer közül két, viszonylag rövid múltra visszatekintő módszert emelünk ki, az elektron paramágneses rezonancia (epr) és mágneses magrezonancia (nmr) módszert, első sorban a jelenleg igen elterjedten alkalmazott spin-label módszert.

1. *Az elektron paramágneses rezonancia alapjai*

Az elektron paramágneses rezonancia vagy elektronspin rezonancia spektroszkópia a mágneses rezonancia módszerével vizsgálja a paramágneses jelenségeket. A paramágnesség elektronoktól származó hatás, amely kompenzálatlan spinű atomok, szabad gyökök (a valenciaelektron-rendszer egy és csakis egy pár nélküli elektront tartalmaz), egyes molekulák és makromolekulák, valamint részlegesen betöltött belső héjú fémionok (pl. átmeneti fémek esetén 3d héj) esetében nyilvánul meg. Az epr spektroszkópia e rendszerek mágneses térben észlelhető energianívóit tanulmányozza alkalmasan választott frekvenciájú elektromágneses tér (rendszerint mikrohullámú tartomány) jelenlétében (ABRAGAM 1961, BLUMENFELD és mts. 1966, CARRIGTON, MC LACHLAN 1967, PAKE 1962, POOLE 1967, ZAVOISKI 1945). A módszer előnye a nagy érzékenység mellett arra vezethető vissza, hogy a vizsgált rendszer energianívói a paramágneses centrum környezetében levő elektromos és mágneses terek perturbáló hatása folytán többé-kevésbé specifikusan változnak

* epr, elektron paramágneses rezonancia
nmr, mágneses magrezonancia

meg és így lehetőség nyílik a molekulaszervezet finomabb részleteinek tanulmányozására, másrészt maguknak a kölcsönhatásoknak mélyebb megértésére (ALTSCHULER, KOZYREV 1963, AYSCOUGH 1967, EHRENBERG és mts. 1967, INGRAM 1958, 1970, SCHEFFLER, STEGMANN 1970, SCHLÄFER, GLIMANN 1967), valamint különböző biológiai problémák tanulmányozására (BELÁGYI 1967, ISENBERG 1964, SCHOFFA 1964).

Az epr spektroszkópia, más spektroszkópiai módszerekhez hasonlóan, a nettó energiaabszorpciót méri a jelenlevő sugárzási térből, ha a molekulák energiaállapotukat megváltoztatják. Az energiaabszorpció megvalósulásához két feltételnek kell teljesülnie:

a) a sugárzási kvantum energiájának ($h\nu$) egyenlőnek kell lennie a molekula energiaszintjei közötti távolsággal (ΔE), azaz

$$h\nu = \Delta E$$

Ez az ún. rezonancia-feltétel.

b) a sugárzás elektromos vagy mágneses komponensének képesnek kell lennie arra, hogy gerjesszen a molekulában egy oszcilláló elektromos vagy mágneses dipólust; ha ez teljesül, azt mondjuk, az átmenet megengedett. (Pl. a sugárzási tér a mikrohullámú tartományban csak olyan molekulákkal lép kölcsönhatásba, amelyek permanens elektromos dipólus momentummal rendelkeznek, mint a HCl, amelynél a molekula rotációja hozza létre a megkívánt oszcilláló elektromos teret, az N_2 -nél azonban, vagy a szimmetrikusan helyettesített acetilénél [$RC \equiv CR$], jöllehet, van molekuláris rotáció és ennek megfelelően rotációs energiaszintek, még sincs energiaabszorpció, mivel nincs dipólusmomentum.)

Ha a molekula mágneses dipólusmomentummal rendelkezik (az említett paramágneses tulajdonságú molekulák), energiaabszorpciót csak akkor figyelhetünk meg, ha egyidejűleg statikus mágneses tér is jelen van. Az elektron mágneses dipólusmomentuma abból származik, hogy a töltéssel bíró elektron az atomi modellek értelmében a mag körül meghatározott pályán kering, amely így mágneses teret gerjeszt. Két mágneses momentum lehetséges; az egyik az elektron pályamozgásából származik, ez az ún. *pályamágnesség*, a másik az elektron saját mechanikai impulzusmomentumától, a spintől, ez az ún. *spinmágnesség*. Az esetek döntő többségében a teljes mágneses momentum (a két mágneses momentum vektori összege) 99%-a spinmágnesség, így a pályamágnességet perturbációnak tekinthetjük. A spinmágnességtől származó mágneses momentum nagysága:

$$\mu_s = \frac{e}{mc} N_s,$$

ahol e az elektron töltése, m a tömege, c a fény terjedési sebessége, N_s pedig az elektron saját impulzus momentuma. Mivel

$$N_s = \frac{h}{2\pi} M_s,$$

ahol h a Planck-féle állandó, M_s pedig a spinkvantumszám, amely a $+\frac{1}{2}$ és $-\frac{1}{2}$ értékeket veheti fel, így

$$\mu_s = \frac{eh}{4\pi mc} M_s = 2\beta M_s,$$

ahol β az ún. Bohr-magneton, a mágneses momentum elemi egysége. Ez az összefüggés szigorúan csak „szabad” elektronokra érvényes (nincs pályamomentum), ezért molekulához kapcsolt elektron esetén az összefüggés:

$$\mu_s = g\beta M_s,$$

ahol g kettőhöz közelálló számérték

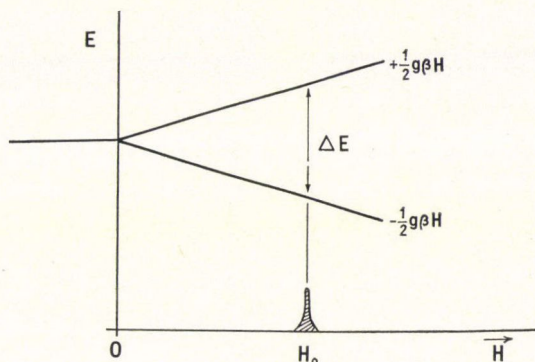
Statikus mágneses térben a mágneses dipólusok meghatározott irányt vesznek fel, mint az iránytű a földi mágneses térben. Hogy a mágneses dipólust az adott helyzetéből kitérítsük, munkát kell végeznünk, melynek nagysága

$$E = \mu H \cos \varphi,$$

ahol H a statikus mágneses tér térerőssége, φ pedig a μ és H által bezárt szög. Mivel az elektronspin külső mágneses térben csak a térrel paralel vagy antiparalel állhat be, ezért az elektronspin mágneses momentumainak energiái:

$$E = g\beta H M_s = \pm \frac{1}{2} g\beta H$$

lehetnek. Ezt mutatja szemléletesen az 1. ábra.



1. ábra. Energiaszintek mágneses térben. Energiaelnyelés csak a rezonancia-feltétel teljesülése esetén lehetséges

A megadott összefüggések szerint az energiaszintek ún. felhasadása az alkalmazott mágneses tér nagyságától függ. Egy adott H_0 mágneses térerősségnél az energiafelhasadás nagysága, azaz az energianívók távolsága:

$$E = E_1 - E_2 = g\beta H_0.$$

A Bohr-féle frekvenciatétel értelmében külső elektromágneses tér jelenlétében átmenetek indukálhatók az alsó energianívóról a felsőre (abszorpció) és megfordítva a felső energiaszintről az alsóra (emisszió). Az átmenetek létrehozásának feltétele tehát:

$$\Delta E = h\nu, \text{ azaz}$$

$$h\nu = g\beta H_0.$$

Az utóbbi összefüggés az elektronspin-rezonancia teljesülésének feltétele. Ha H_0 a gyakorlatban alkalmazott 3.300 Oe, akkor

$$\nu = \frac{g\beta H_0}{h} = 9,5 \cdot 10^9 \text{ Hz, ill.}$$

$$\lambda = \frac{c}{\nu} = 3,2 \text{ cm,}$$

azaz a mérés az elektromágneses hullámok mikrohullámú tartományában (30 cm—1 mm) valósítható meg.

Az atomi rendszer esetében (a gyakorlatban mindig sokaságot vizsgálunk) az elektronok spinjei az energianívókon való megoszlást illetően *Boltzmann*-eloszlást követnek:

$$N_1 = A \cdot \exp(-E_1/kT) \text{ és}$$

$$N_2 = A \cdot \exp(-E_2/kT),$$

ahol A állandó, $k = 1,38 \cdot 10^{-16}$ erg/fok az ún. Boltzmann állandó, N_1 , ill. N_2 ($N_2 > N_1$) pedig az E_1 , ill. E_2 energiájú nívókon levő elektronspinek száma. Egyszerű számítás után:

$$\frac{N_2}{N_1} = 1 + \frac{E_1 - E_2}{kT}.$$

Ha $N = N_1 + N_2$, $\Delta N = N_2 - N_1$ ($\Delta N > 0$), akkor

$$\Delta N = N \frac{g\beta H_0}{2kT},$$

ami azt jelenti, hogy a rezonanciafeltétel teljesülése esetén a nívókhoz tartozó betöltési számok különbözősége miatt nettó energiaabszorpcióval kell számolni. Mivel az energiaabszorpcióért a spinrendszer felelős, továbbá ez az abszorpció csupán a rezonanciafeltétel teljesülése esetén jelentős, a jelenséget *elektron-spin-rezonancia abszorpciónak* vagy *elektron paramágneses rezonancia abszorpciónak* nevezzük. A kémiai kötésben nem levő párosítatlan spinek száma N -nel arányos, így az utolsó összefüggés fontos fizikai tartalmat takar: az energiaabszorpcióból a párosítatlan spinek számára lehet következtetni.

A spektroszkópia alapját képező jelenség tehát akkor következik be, ha a H_0 külső mágneses térben levő paramágneses centrumokat egyidejűleg

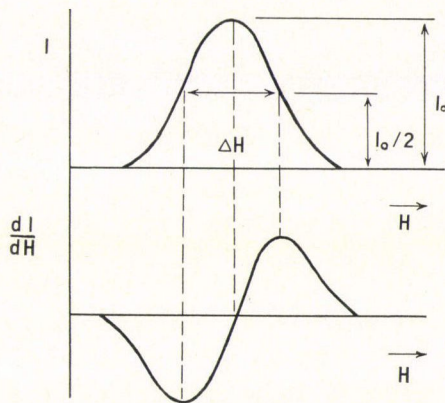
$$\nu = \frac{g\beta H_0}{h}$$

frekvenciájú elektromágneses sugárzási térbe helyezzük. A tér által előidézett indukált emisszió és abszorpció, amely a nívók populációjában levő csekély különbség miatt a sugárzási térből való energiaelnyerésre vezet, adott H_0 és ν esetén rezonancia-szerűen következik be.

A mérés feladata tehát az abszorbeált energia pontos regisztrálásában nyilvánul meg. Az alapösszefüggésből következik, hogy az energiaabszorpció észlelése elvileg két különböző úton mehet végbe:

1. a sugárzási tér frekvenciájának változtatásával rögzített H_0 -nál,
2. a mágneses térerősség (H) változtatásával rögzített frekvenciánál.

Az epr berendezés részleteinek ismertetésétől itt eltekintünk, csupán annyit jegyzünk meg, hogy technikai okokból az abszorpciós görbe első differenciálhányadosát regisztrálják (2. ábra). A technikai részleteket kitűnő monográfiák és összefoglaló cikkek tárgyalják, amelyek közül néhányat az irodalomjegyzékben idézünk (BLUMENFELD és mts. 1966, FEHER 1957, INGRAM 1955, POOLE 1967, STOODLEY 1963).



2. ábra. Epr abszorpciós görbe [$I = I(H)$] és első differenciálhányadosa [$dI/dH = f(H)$]

Az epr spektrumból szerezhető információk az alábbiakban foglalhatók össze:

1. *Integrált intenzitás*: az abszorpciós görbe alatti terület a mintában jelenlevő lepárosítatlan elektronok számával arányos. Modern spektrométerekkel 10^{10} lepárosítatlan elektron mutatható ki egy mintában 1 gauss vonalszélesség mellett. Vonalszélesség alatt az abszorpciós görbe félértékszélességét értjük (lásd 2. ábra ΔH).

2. *A spektrumvonal szélessége és alakja*: a spektrumvonalak szélességét és alakját a lepárosítatlan elektronnak a környezetével való kölcsönhatás szabja meg. A mikrohullámú térből a részecskék által elnyelt energia hatására megváltozik a betöltési számok kialakult stacionárius egyensúlya. Szükséges, hogy a részecskék az energiafeleslegüket valamilyen módon leadják; ellenkező esetben az energiafelvétel miatt a betöltési számokban kezdetben fennálló különbség kiegyenlítődne és ez az abszorpció megszűnését eredményezné (telítési effektus; a különbség a két nívó között alig több, mint 0,1% szoba-hőmérsékleten).

A paramágneses mintában végbemenő folyamatokat, amelyek az egyensúlyi részecske-eloszlást biztosítják és egyidejűleg stacionáriussá teszik az energiaelnyelési folyamatot, *relaxációs folyamatoknak* nevezzük. A lepárosítatlan elektronok rendszere a sugárzási térből felvett energiát átadhatja az anyag többi molekulájának és ez mint hőenergia jelenik meg. Az eredeti mágneses energia a spin-pálya csatoláson keresztül jut a minta molekuláiból álló rendszerhez, az ún. rácshoz. Ennek az energiaátadási folyamatnak a jellemzője a *spin-rács relaxációs idő* (T_1), amely szabad gyököknél hosszú, alacsony hőmérsékleten néhány másodperc is lehet, míg paramágneses fémionoknál az erős spin-pálya csatolás következtében 10^{-7} – 10^{-8} sec. A relaxációs folyamat másik, az előbbivel egyidejűleg végbemenő folyamata a spin-spin kölcsönhatás, amely lepárosítatlan elektronnak más elektronspinekkel vagy mag-spinekkel való klasszikus mágneses dipól-dipól kölcsönhatására vezethető vissza. Szilárd fázisban egykristályok esetén a relaxációs folyamatra jellemző *spin-spin relaxációs idő* (T_2) $\sim 10^{-8}$ sec szabad gyököknél, amely 3–5 gauss vonalszélességet eredményez, míg amorf vagy polikristályos anyagban a vonalszélesség 20–30 gauss is lehet. Kisviszkózitású folyadékfázisban ez az irányfüggő dipól-dipól kölcsönhatás a molekulák gyors Brown-mozgása révén kiátlagolódik, és így 10^{-3} – 10^{-4} mol/l hígítású oldatban 50–100 mgauss szélességű vonalak figyelhetők meg, amely $\sim 10^{-6}$ sec spin-spin relaxációs időnek felel meg. Részletes tárgyalás található CARRINGTON, McLACHLAN (1967) és FREED (1972) munkáiban.

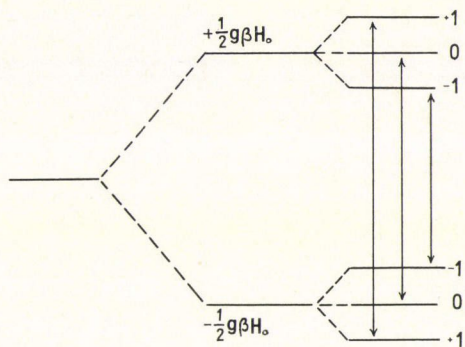
3. *g-faktor*: Teljesen szabad elektron esetén a g-faktor értéke $g = 2$, de a relativisztikus effektusok figyelembevételével $g = 2,0023$. Az atommag körül vagy molekulapályán mozgó elektronok azonban nem tekintethetők szabadnak (szabadnak abban az értelemben, hogy nincs pálya-

impulzus-momentum) a spin-pálya kölcsönhatás miatt. Az elektronspinre nemcsak az alkalmazott mágneses tér hat, hanem a környező ionok elektromos tere is befolyásolja az elektron pályamozgását és a *spin-pálya csatoláson* keresztül megváltoztatja a mágneses energiákat. Ennek következtében kristályos anyagban a g-faktor függ az alkalmazott H mágneses tér és a kristálytani tengelyek által bezárt szögtől, a g-faktor tehát anizotróp. A g-faktor mérése fontos felvilágosítással szolgál — főleg egykristályok mérése esetén — a lepárosítatlan elektron, ill. szabad gyök térbeli szerkezetére és szimmetriaviszonyaira.

4. *Az esr spektrumok hiperfinom szerkezete*: Az epr spektrumok hiperfinom szerkezete szolgáltatja a kémikus és biológus számára a legfontosabb információkat. A hiperfinom szerkezet a lepárosítatlan elektron mágneses momentumának és a környezetében levő zérustól különböző mágneses momentumú mag (H^1 , N^{14} , Mn^{55}) kölcsönhatásának eredményeként jön létre. A hiperfinom szerkezetet létrehozó kölcsönhatás egy *izotróp* és egy *anizotróp* hiperfinom kölcsönhatásból áll. Az anizotróp vagy dipoláris hiperfinom kölcsönhatás a klasszikus dipol-dipol kölcsönhatásra vezethető vissza, míg a kölcsönhatás másik formája klasszikusan nem értelmezhető és abból adódik, hogy a lepárosítatlan elektron-sűrűség a kérdéses mag helyen zérustól különböző. A kölcsönhatás ezen formája független attól, hogy a paramágneses centrum szilárd anyagban vagy folyadékközegben helyezkedik el, ellentétben az anizotróp hiperfinom kölcsönhatással, amely alacsony viszkozitású folyadékban kiátlagolódhat a gyors forgás következtében.

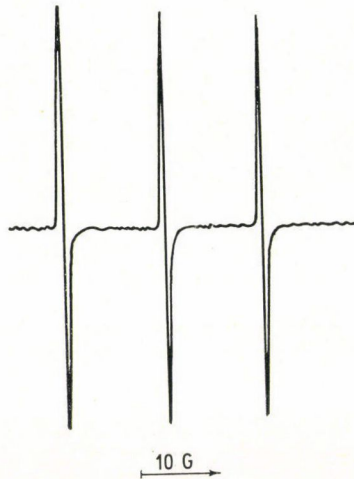
Egy lepárosítatlan elektron és egy kölcsönható mag esetén a hiperfinom szerkezet keletkezését a 3. ábra vázolja.

A N^{14} magspinje $I = 1$ $h/2\pi$ egységekben, így az iránykvantálásnak megfelelően külső mágneses térben három lehetséges beállással rendelkezik az $m = = 1, 0, -1$ mágneses kvantumszámoknak megfelelően. A hat energianívó között



3. ábra. Hiperfinom szerkezet keletkezésének sémája a nitrogénoxid szabad gyök esetében ($I = 1$)

három megengedett energiaátmenet lehetséges (a mágneses kvantumszámok az átmenetnél nem változhatnak). A kapott spektrumot a 4. ábra mutatja peroxilamin diszulfonát ionradikál $(\text{SO}_3)_2\text{NO}^{2-}$ esetében vizes oldatban 10^{-4} M koncentráció esetén.



4. ábra. Peroxilamin diszulfonát ionradikál híg oldatának epr spektruma

A legkisebb mágneses térnél bekövetkező energiaabszorpció az $m = +1$ magspin-beállásnak felel meg (részleteket illetően lásd AYS COUGH 1967, BLUMENFELD és mts. 1966, HUDSON, LUCKHURST 1969, KIVELSON 1960, KNEUBÜHL 1960 munkáit). A két szomszédos null-átmenet közötti távolság gaussban mérve az izotróp hiperfinom kölcsönhatási állandó (a) értékét adja. A 4. ábrán bemutatott peroxilamin diszulfonát ionradikál esetén $a = 13,02$ G.

2. Spin-label epr módszer

A biológiai struktúra és funkció jobb megértése és a jelenségek kielégítő értelmezése érdekében több jelzési technika terjedt el, mint pl. az izotóp jelzési módszer (^{14}C) vagy a fluoreszcens jelzési technika (ALFIMOVA, LICHTENSTEIN 1972, STEINER, EDELHOCH 1962, WEBER 1953). Ezen utóbbi technikánál a beeső fény lineárisan polarizált, amelyet a biomolekulához kapcsolt kromofor abszorbeál, és a reemitált fluoreszcens sugárzás polarizációs fokát mérik. Ha a molekula az abszorpció és emisszió folyamat közben megváltoztatta konformációját (a változás időbeli nagyságrendje 10^{-8} – 10^{-9} sec), fluoreszcencia depolarizáció következik be. A fluoreszcencia idejéből és az emitált fény polarizáció fokából a konformációra jellemző τ_c rotációs korrelációs idő kiszámítható.

A biológiai rendszerek természetes állapotukban tartalmazznak paramágneses centrumokat (COMMONER és mts. 1954, ISENBERG 1964), azonban ezen rendszerek száma egyrészt csekély, másrészt a paramágneses centrumok adta spinkoncentráció kevés, sok esetben nem éri el a detektálhatóság alsó határát, vagy eléri ugyan, de a mérés körülményei olyanok, hogy a spektrumból részletes információkat nem kaphatunk (BOLTON és mts. 1972, MALLARD, KENT 1969). Nagyszámú biológiai rendszer viselkedése tanulmányozható azzal a módszerrel, ha alkalmas módon paramágnesessé tesszük őket stabil szabad gyökökkel az ún. spin labellel. A módszer sikerére mi sem jellemzőbb, mint az, hogy a McCONNELL és munkatársai által kifejlesztett módszer ma már az epr spektroszkópia biológiai alkalmazásának döntő hányadát teszi ki (FEHER 1970, GRIFFITH, WAGGONER 1969, HAMILTON, McCONNELL 1968, McCONNELL, McFARLAND 1970).

A spin label alatt olyan organikus szabad gyököt értünk, amely kovalens kötéssel vagy hidrofob kölcsönhatással a biomolekula specifikus helyéhez kapcsolható. A spin labeltől megköveteljük, hogy stabil legyen a tanulmányozandó feltételek mellett, tehát vizes oldatban, alacsony és nagy sókoncentráció mellett, 2–10 pH intervallumban és 20–70° C hőfoktartományban. A spin labelnek érzékenynek kell lennie a környezetben végbemenő változásokra, azaz térbeli gátlás, fluiditás, az oldat polaritása, és ezenkívül nem perturbálhatja a biomolekuláris struktúrát és a biomolekula funkcióját. Ez utóbbi két követelmény természetesen lehetetlen, azonban a kérdés, milyen mértékben változtatja meg a label a rendszert, és az általa kiváltott zavar mennyiben kontrollálható és mennyiben vehető számításba az értékelésnél, szem előtt tartandó. Mindebből az következik, hogy a spin-label molekulával jelzett biológiai rendszer nem identikus a biológiai rendszer naturális állapotával (ELEK és mts. 1972), de a perturbációk különböző mérési körülmények és különböző spin-labellek felhasználásával minimalizálhatók.

A kutatómunkában használt spin-label molekulák kizárólag nitrogén-oxid stabil szabad gyökök a következő általános struktúrával (KEANA, KEANA 1967, ROZANTZEV 1970):



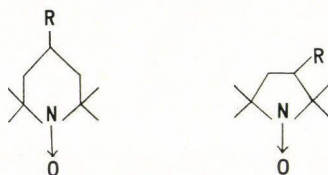
Az információkat, amelyeket a nitrogén-oxid spin-labellek segítségével kaphatunk, az alábbiakban összegezhethetjük (HAMILTON, McCONNELL 1968, OHNISHI 1968):

1. A spin-label epr spektruma igen érzékeny a mobilitás fokára, amelyet a környezet a label számára lehetővé tesz, s ez így a biológiai makromolekula konformációjával vagy konformáció-változásával összekapcsolható.

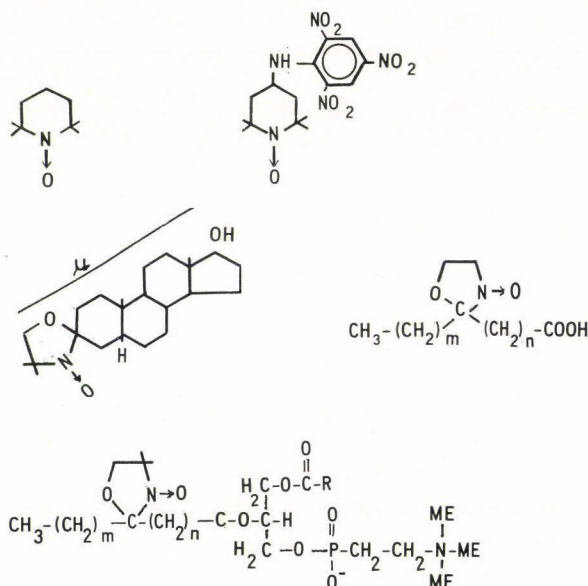
2. A spin label g faktora és a hiperfinom csatolási állandó változik az oldószer polaritásával, és így a label hidrophil vagy hidrofob természete vizsgálható (DODD és mts. 1970, LASSMANN és mts. 1973).

3. A biradikál spin-label lehetővé teszi bizonyos intermolekuláris kölcsönhatások vizsgálatát (CALVIN és mts. 1969).

A spin-label anyagok, amelyeket ma csaknem kizárólag használnak, a 2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oxil (TEMPO), ill. 2,2,5,5-tetrametilpirrolidin-1-oxil származékai (McCONNELL, McFARLAND 1970, ROZANTZEV 1970; STONE és mts. 1965):

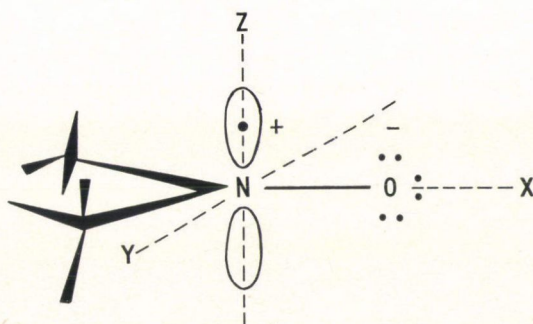


ahol R reprezentálja a különböző kémiai csoportokat, amelyek a vizsgálandó probléma természetétől függenek (ionos csoport, hosszú hidrophil lánc, szteroid, stb.). Az R csoporton keresztül kapcsolódik a spin-label a biomolekulához. Néhány a membránok vizsgálatához használt labelt az 5. ábra demonstrálja (HUBBELL, McCONNELL 1971).



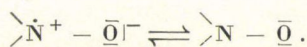
5. ábra. 1. TEMPO 2. Spin-label 2,4-dinitrofenol 3. Szteroid spin-label 4. Zsírsav spin-label 5. Foszfolipid spin-label

A következőkben a nitroxid szabad gyök epr spektrumának néhány jellegzetességét tárgyaljuk. A 6. ábra a nitroxid szabad gyök térszerkezetét mutatja a molekulához rögzített koordináta-rendszerben (McCONNELL, McFARLAND 1970, OHISHI és mts. 1966):



6. ábra. Az $N \rightarrow O$ radikál három-elektronos π kötése

A lepárosítatlan elektron a tartózkodási idejének 80–90%-át az N atom és O atom $2p\pi$ molekulapályáján tölti, az N, az O és a két C atom által meghatározott síkra merőlegesen. Mivel a lepárosítatlan elektron a $2p\pi$ pályán tartózkodik, nagy anizotróp hiperfinom kölcsönhatással kell számolni, és közel axiális szimmetriával. Ha tekintetbe vesszük az NO csoport



mezomér egyensúlyát, ill. az egyensúly megváltozásának lehetőségét a környezettől függően, érthetővé válik, hogy pl. hidrofob környezet esetén a mezomér egyensúly a nem töltéssel rendelkező forma felé tolódik el, ami az izotróp csatolási állandó csökkenésével jár együtt (LEVINE 1972).

A 7. ábrán a tetrametil-1,3-ciklobutándion egykristály epr spektrumát mutatjuk be, amelyben kis mennyiségű (1 : 100) spin-labelt inkorporáltak (GRIFFITH, WAGGONER 1969).

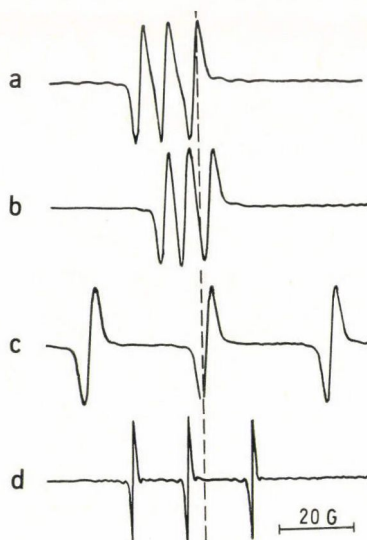
A mérések alapján kapott paramétereket egy táblázatban tüntettük fel (GRIFFITH és mts. 1965).

A biomolekulához kapcsolt spin-label természetesen távol áll attól a rendezettségűtől, amely egykristályban valósul meg. Random orientáció esetén két határesetet különböztetünk meg:

a) a spin label szabad és olyan gyorsan forog, hogy az anizotropia kiátlagolódik, és ekkor három éles spektrumvonal figyelhető meg (lásd 4. ábra):

$$g_0 = \frac{1}{3}(g_{xx} + g_{yy} + g_{zz})$$

$$a_0 = \frac{1}{3}(A_{xx} + A_{yy} + A_{zz})$$



7. ábra. Diamágnesesen hígított spin-label egykristály epr spektruma a gyök három főten-gelyének irányában. A negyedik spektrum di-t-butil ketonban oldott 10^{-5} M/l spin-label epr spektrumát mutatja. A szaggatott vonal a DPPH (difenil-pikril-hidrazil, hitelesítéshez gyakran használt stabil szabad gyök) $g = 2,0036$ abszorpciós maximumának megfelelő rezonanciaátmenetet tünteti fel

paraméterekkel. Az A_x , A_y , A_z , ill. A_{xx} , A_{yy} és A_{zz} a hiperfinom csatolási tenzor komponenseit jelentik. Az egyes g értékek a g tenzor megfelelő komponensei. Az A és g értékek a térkalibráció és hitelesítő jel g értékének felhasználásával egyszerű számolással adódnak a 7. ábrán bemutatott spektrumból.

A forgás frekvenciájának olyan nagyra kell lennie, hogy

$$\nu \gg |A_{zz} - A_{xx}| \sim 73 \text{ MHz}$$

reláció teljesüljön.

b) A molekula mozgása be van „fagyasztva”, azaz az orientációja random, de időfüggetlen. A spektrum ebben az esetben a 7. ábrán látható spektrumok

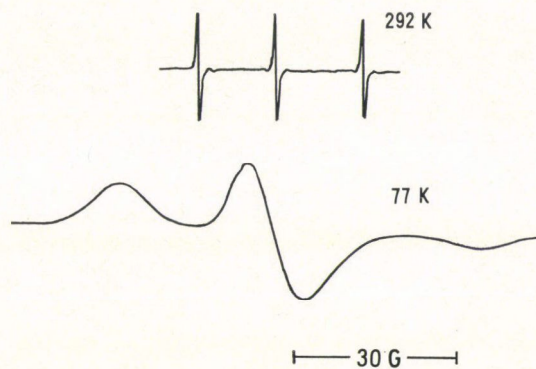
I. táblázat

Egykristályba beépített spin-label epr spektrumának paraméterei

g_x	g_y	g_z	A_x	A_y	A_z	g_0	a_0
2,0089	2,0061	2,0027	$7,1 \pm 0,5$	$5,6 \pm 0,5$	$32,0 \pm 1,5$	$2,0060 \pm 0,002$	$15,1 \pm 0,5$
a kísérleti hiba: $\pm 0,0003$							

A_x , A_y , A_z és a_0 értéke gaussban értendő.

szuperpozíciója, azaz a sok részspektrum átfedése 6–30 G-ú minden előforduló felhasadással (8. ábra). Ebben az esetben a H_z^z felhasadás kiátlagolódik, míg a két extrémum érték lehetővé teszi az A_{zz} becslését (HUBBELL, MCCONNELL 1971, MCCONNELL, MCFARLAND 1970). A spektrum aszimmetriája a g-faktor anizotrópia következménye. Mivel a spin-label molekulák mozgása mély hőmérsékleten erősen gátolt, ezért az ilyen spektrumot mutató spin-label molekulát MCCONNELL nyomán erősen immobilisnek nevezzük. Ilyen spektrumot két módon is megkaphatunk: egyrészt az egykristály pulverizálásával, másrészt az oldat „befagyasztásával”. Ez utóbbit a 9. ábra



8. ábra. Erősen immobilis spin-label epr spektruma (lent), felül a gyengén immobilis spin-label epr spektruma

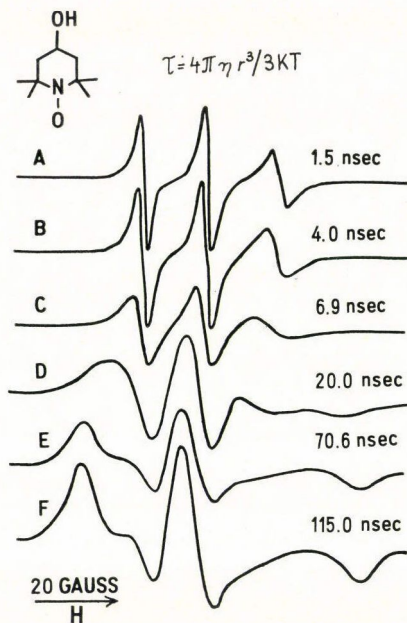
mutatja, ahol a TEMPOL spin-label epr spektrumai vannak feltüntetve különböző viszkozitás mellett (BOLTON és mts. 1972, HSIA, PIETTE 1969).

Az ábrán látható időadatok a rotációs korrelációs idők, amelyeket a klasszikus Stokes-törvény alapján számoltak ki. A korrelációs idő alatt azt az időt értjük, amely szükséges ahhoz, hogy a molekulák a megelőző térbeli állapotukat „elfelejtsék”. Pontosabb definíciót adnak CARRINGTON, McLACHLAN (1967) és SCHEFFLER, STEGMANN (1970).

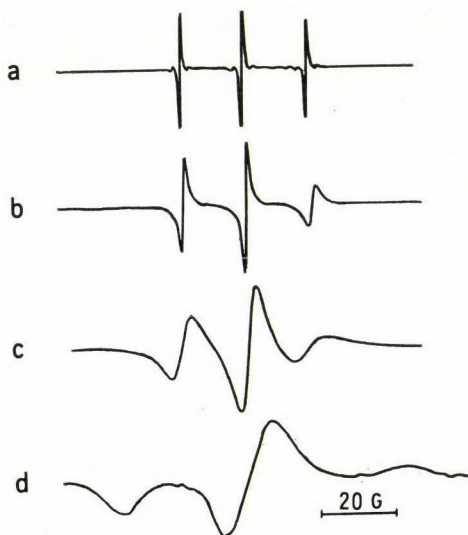
A hőmérséklet csökkentésével nyert epr spektrumokat a 10. ábra mutatja (GRIFFITH, WAGGONER 1969).

A harántcsíkolt békaizom vízterében oldott amin spin-label epr spektrumát a 11. ábra mutatja alacsony (néhány százalék) víztartalom mellett. Ez az eset a pulverizálás esetének felel meg (BELÁGYI 1973).

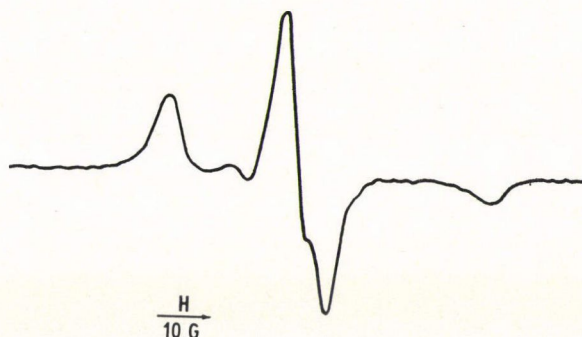
A korrelációs idők kiszámítása bonyolultabb esetekben már nem történhet a klasszikus Stokes-összefüggés alapján, mivel a spin-label molekulák nem rendelkeznek a szükséges szférikus szimmetriával, másrészt az esetek nagy részében a spin-label molekulák kovalens kötéssel vannak kapcsolva ugyan a biomolekulához, de ez a kapcsolódás nem jelent szükségszerűen merev



9. ábra. A TEMPOL spin-label epr spektruma különböző viszkozitású víz—glicerín keverékben. A spektrumokon feltüntetett számérték a klasszikus Stokes-törvény alapján kiszámított rotációs korrelációs időt jelenti



10. ábra. Etilén-glikolban oldott nitrogén-oxid szabad gyök epr spektruma: a) 25 °C, b) -25 °C, c) -80 °C, d) -150 °C hőmérsékleten



11. ábra. Béka *m.sartorius* vízterében oldott amin spin-label epr spektrum néhány százalék víztartalom mellett. Az immobilizált gyökspektrumot az izomrost-köteg dehidrálása után nyerték.

kapcsolódást, és így a korrelációs idő nem annyira a vizsgált biomolekula mozgását méri, hanem a label makromolekulához viszonyított relatív mozgását. A korrelációs idő kiszámítására empirikus eljárásokat dolgoztak ki (HAMILTON, McCONNELL 1968, KEITH és mts. 1970). A gyengén immobilis komponensre érvényes összefüggés (KUZNETSOV és mts. 1971.) ($\tau_c < 10^{-9}$ sec):

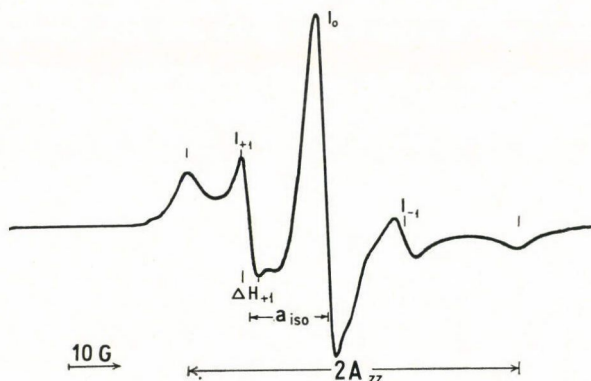
$$\tau_c = 8,4 \cdot 10^{-10} \Delta H_{+1} (\sqrt{|I_{+1}/I_{-1}|} - 1) \text{ sec ,}$$

míg az erősen immobilis komponens esetén megfelelő diagramok felhasználásával kalkulálják a rotációs korrelációs időt (McCALLEY és mts. 1972, SHIMSHICK, McCONNELL 1972). Ennek lényege az a megfigyelés, hogy a high-field ($m = -1$) és low-field ($m = +1$) extrémumok távolsága a centrális komponens nullátmenetétől a viszkozitás növekedésével növekednek. A spektrumból a

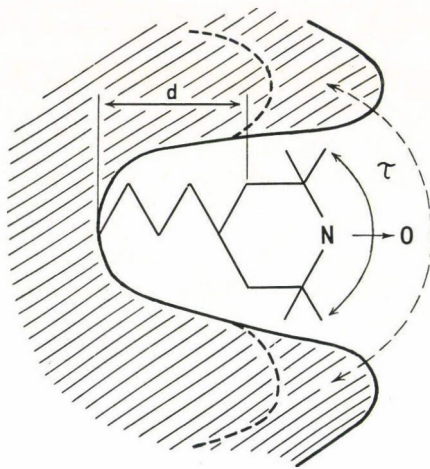
$$\alpha = \frac{H(\tau) - H(\tau \rightarrow 0)}{H(\tau \rightarrow \infty) - H(\tau \rightarrow 0)} \cdot 100$$

empirikus számadat képezhető, amely direkt összefüggésbe hozható a rotációs korrelációs idővel. A formulában $H(\tau)$ jelenti az $m = +1$ átmenethez tartozó abszorpciós görbe első differenciálhányadosa maximumának pozícióját. Ez a közelítő formula $\tau_c < 10^{-8}$ sec értékig érvényes (KUZNETSOV és mts. 1971). A korrelációs idő a spektrumok szimulációjával gépi úton is kiszámítható (ALEXANDROV és mts. 1970, LAZAREV, STRUKOV 1971).

A vizsgált kísérleti problémáknál az esetek nagy részében az aktív helyek olyan térszerkezeti elrendezésben vannak, hogy egyrészt a spin-label immobilitását okozzák, másrészt pedig a spin-label csupán gyengén immobilis. Így a spektrum a kétféle elrendeződés szuperpozícióját tükrözi. Ezt mutatja a 12. ábra, amelyen N-etil-maleimid spin-labellel jelzett glicerinezett m.psoas rostköteg epr spektrumát mutatjuk be azon paraméterek feltüntetésével,



12. ábra. Pyrrolidin-maleimid spin-labellal jelzett glicerinezett m.psoas rostköteg epr spektruma. A spektrum a gyengén és erősen immobilizált gyökspektrumok szuperpozíciója. I_{+1} és I_{-1} a gyengén immobilizált gyökspektrum low-, ill. high-field komponensének amplitúdója, ΔH_{+1} a low-field komponens csúcs—csúcs közötti távolságát jelenti a mágneses térerősség egységeiben kifejezve. a_{iso} az isotróp csatolási állandó, amely I_{+1} és I_{-1} komponenseinek null-átmenete között mérhető távolság felével egyenlő a mágneses térerősség egységeiben kifejezve; $2A_{zz}$ a csatolási állandó értéke kb. 63 G. A kísérletben 1,5 M spin-labelt reagáltattak 10^5 g fehérjére 0°C hőmérsékleten 1 órán keresztül, majd a rostkötegeket 16 órán át mosták sóoldatban, hogy a nem reagált labellt eltávolítsák.



13. ábra. Spin-label a biomolekula hidrofob zsákjában. A d távolság változtatásával változik a rotációs korrelációs idő és így a hidrofob zsák mérete meghatározható

amelyek a spektrumból közvetlenül mérhetők (BELÁGYI 1973). Mint említettük, az a_{iso} segítségével a környezet polaritására is következtethetünk.

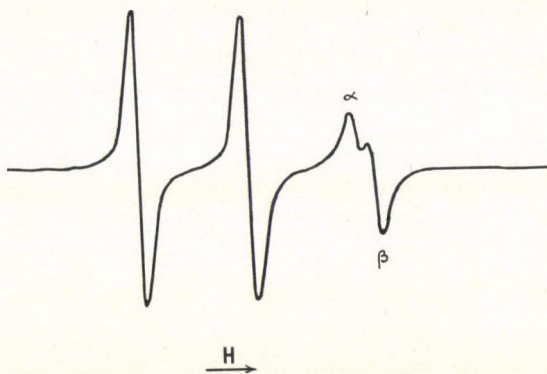
Ha a spektrum csupán az erősen immobilis spin-labelltől származik, akkor is lehetőség van a környezet polaritásának vizsgálatára a következő összefüggés segítségével (LASSMANN és mts. 1973):

$$h = \frac{A_{zz}(\text{H}_2\text{O}) - A_{zz}}{A_{zz}(\text{H}_2\text{O}) - A_{zz}(\text{dekalin})},$$

ahol A_{zz} az aktuális anizotróp felhasadás tenzorkomponense, A_{zz} (dekalin) pedig a dekalinban mért érték, melyről közismert, hogy egyike a legjobban hidrofobos oldószereknek. Ha a hidrofob erők nagyobbak, mint dekalinban, a h értéke az egységénél nagyobb. A hidrofob környezet modelljét a 13. ábra mutatja (FEHER 1970):

3. A spin-label epr alkalmazása biológiai membránok vizsgálatára

A spin-label epr módszer első biológiai alkalmazását HUBBELL és MC CONNELL (1968) publikálta a TEMPO spin-label alkalmazásával a *Homarus americanus* lábidegén. Az általuk kapott spektrummal megegyező típusú



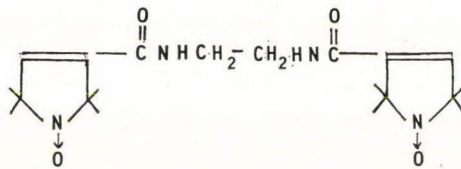
14. ábra. Perineuriumtól megfosztott spin jelzet béka n-ichiadicus epr spektruma. A béka-ideget 10^{-4} M/l koncentráció bromacetamid spin-labelt tartalmazó n-Ringer oldatban inkubálták 16 órán keresztül 4°C hőmérsékleten. A high-field komponens dublett, amelynek α -val jelzett része a membrán hidrofob régiójában oldott spin-labeltől, míg β -val jelzett része a vizes fázisban oldott spin-labeltől származik

spektrumot mutat a 14. ábra, amely perineuriumtól fosztott béka n. ichiadicuson készült bromacetamid spin-label segítségével. A spektrum α komponense származik a hidrofobos régiótól, β pedig a vizes oldattól (BELÁGYI 1972). Mivel erősen immobilis spektrum nem figyelhető meg, következik, hogy a label a membrán alacsony viszkozitású hidrofobos régiójában foglal helyet és alá van vetve gyors és isotróp mozgásnak 10^{-10} nagyságrendű korrelációs idővel. Ez azt jelenti, hogy ezen membránok hidrofobos régiókat tartalmaznak, amelyek lokálisan folyékonyak. Koleszterin, lecitin, lokális érzéstelenítők — általunk vizsgált esetben tetrakain — megváltoztatják a TEMPO, ill. bromacetamid spin-label oldhatóságát, amely arra utal, hogy az oldhatóság a feltehetően foszfolipid kettősréteg konformációváltozásaival összefüggésben áll.

Megemlítésre érdemesek azok a kísérletek, amelyeket emberi vörösvértest membránokon végeztek. Míg a TEMPO nem mutat kötést, addig N-etil maleimid labellel jelzett eritrocita ghostok komplex spektrumot adnak, azaz

legalább két különböző típusú aktív hely jelölhető (SANDBERG, PIETTE 1968). A blokkoló kísérletek egyértelműen mutatták, hogy az aktív helyek a -SH csoportok (SANDBERG és mts. 1969). Bizonyos drogok, mint pl. a klórpromazin redukálja a spin-label mozgékonyságát, azaz a drog a membrán proteinben konformációváltozást indukál. A jódetamid spin-label esetén csupán gyengén immobilis jel tapasztalható és ezzel a drog-hatás kvantitatíve is mérhető (HOLMES, PIETTE 1970). A vizsgálatok kimutatták, hogy a jelzett helyek 50%-a befolyásolható fenotiazin típusú droggal. Az is kimutatható, hogy bizonyos ágenssek, mint pl. piridin vagy az alacsony pH-jú közeg, irreverzibilis strukturális változásokat hoz létre.

Érdeklődésre tarthat számot az a kísérletsorozat, amelyet CALVIN (CALVIN és mts. 1969.) végzett el ingerelhető idegmembránon biradikál spin-label segítségével:

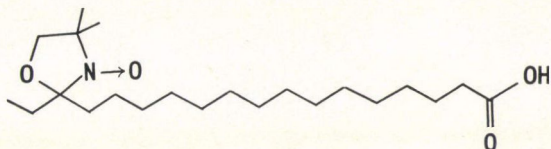


amelynél az N atomok távolsága $6,4\text{Å} \leq r \leq 12,8\text{Å}$. A mágneses kölcsönhatás a két lepárosítatlan elektron távolságától függ, ha a távolság 10 Å-nél kisebb, a kölcsönhatás erős, de elhanyagolható, ha az r értéke a 14 Å-öt meghaladja.* Ha a nitrogénoxid csoportok térbeli távolsága csekély, a mágneses csatolás miatt ún. elektronkicszerélődés következik be, amelynek eredménye határesetben egy ötkomponensű spektrum 1:2:3:2:1 intenzitásvisszonnyal és a $iso/2$ hiperfinom csatolási állandóval. Ez az eset valósul meg az említett biradikál esetén is vizes oldatban. Igen meglepőnek bizonyult az a tény, hogy az idegmembránban a biradikál spektruma drasztikusan megváltozott, a kicszerélődési kölcsönhatás a két gyökcentrum között élesen lecsökkent. Ez azzal interpretálható, hogy a spin-label a membrán olyan régiójában kötődik (valószínűleg lipid), amely mintegy merevvé teszi a spin-labelt, eltávolítván egymástól a két gyökcentrumot. A tapasztalt vonalszélesség azonban gyors forgásról tanúskodik, ami azt jelenti, a biradikál feltehetően a membránlipid folyadékszerű hidrofob régiójában van lokalizálva. Az epr spektrum nem változott az ingerlés hatására kiváltott akciós potenciál alatt, amiből az következik, hogy a biradikál olyan helyekhez kötődik, ahol nem történik konformációváltozás a membránban az ingerület alatt. Ez az eredmény konzisztens azzal, hogy a biradikál a hidrofob régióban található.

McCONNELL és HUBBELL (HUBBELL, McCONNELL 1969 a, 1969 b) a membránok szerkezetének további vizsgálata érdekében a szteroid és zsírsav spin-

* Paramágneses centrumok kölcsönhatásának vizsgálatára figyelemre méltó módszert dolgozott ki LICHTENSHEIN (LICHTENSHEIN és mts. 1970), valamint KOKORIN (KOKORIN és mts. 1972).

labelt alkalmazták. Megállapították, hogy mindkét spin-label a hossz tengelyével a membrán felületére merőlegesen helyezkedik el. A szteroid molekula az 5. ábrán vázolt μ tengely körül gyors anizotróp mozgást mutat a membrán hidrofob régiójában. A molekula geometriája miatt ez érthető, bár ugyanilyen anizotróp mozgás nem tapasztalható különböző viszkozitású víz – glicerin keverékben. A zsírsav (12,3), zsírsav (17,3) és zsírsav (5,10) spin-label vizsgálatok a membrán és foszfolipid kettős rétegek igen érdekes tulajdonságaira mutattak rá (HUBBELL, McCONNELL 1971). A spektrumok szerint a paramágneses NODO (N-oxiloxazolidin)-gyűrű mozgékonyasága a zsírsav (5,10) label esetén sokkal nagyobb, mint a zsírsav (12,3) vagy zsírsav (17,3) spin-label esetén, ami arra a következtetésre jogosít fel, hogy a membránok valóban tartalmaznak lipid kettősréteget (HSIA és mts. 1972) és ezen lipid kettős rétegnek a centrális régiója lényegesen folyékonyabb, mint a hidrofob régió a polá-



15. ábra. 16-doxil-sztearin sav spin-label kémiai szerkezete

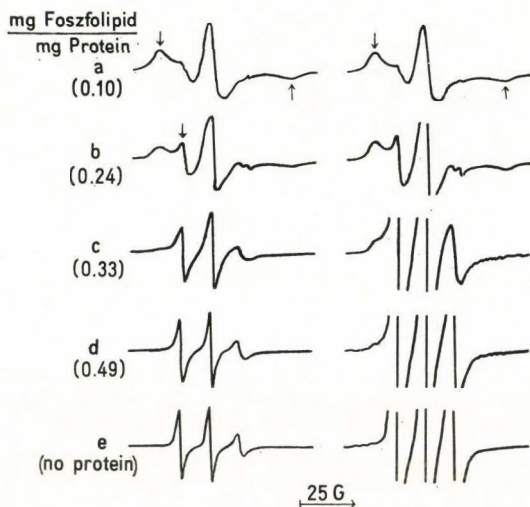
ris csoportok közelében. A modellkísérletek azt is kimutatták, hogy az idegrost-membrán polimetilén láncai hasonló mozgási karakterisztikát mutatnak, mint a 2:1 tojás lecitin-koleszterin rendszer. Érdekes adatokat szolgáltatnak a membránok szerkezetéhez és funkciójához SEELIG (1970) és HASSELBACH (SEELIG, HASSELBACH 1971), valamint KOLTOVER (1973, KOLTOVER és mts. 1968). Lecitin multilamelláris rendszert vizsgáltak JOST és munkatársai (1971).

JOST és GRIFFITH (1973) marhaszív mitokondriumokból izolált citokrom oxidázén végeztek kísérleteket a lipid-protein kölcsönhatás vizsgálata céljából. A citokrom oxidáz 0,3–0,7 foszfolipid-protein súlyarányánál spontán membránjellegű vezikulákat képez. Ez a vezikuláris struktúra egy mesterseges membrán modell, azonban fel lehet tételezni, hogy a citokromoxidáz protein komplex és foszfolipid kölcsönhatása hasonló az intakt mitokondriális membránéhoz. A vizsgálatokat a 16-doxyl sztearin sav spin-label segítségével végezték (15. ábra).

A vizsgált minták 0,33–0,49 mg foszfolipidet tartalmaztak mg proteinnel. További lipid mennyiséget a Fleischer-módszerrel inkorporáltak, a nem inkorporálódott lipidet gradiens centrifugálással távolították el. A maximális foszfolipid/protein arányt 0,73-nak találták.

A foszfolipid tartalmat hideg acetonos extrakcióval csökkentették. Ezzel a módszerrel 0,10 mg foszfolipid/mg protein arányt értek el. A különböző foszfolipid koncentráció mellett felvett epr spektrumokat a 16. ábra mutatja.

Mint az ábrából látható, alacsony lipid koncentrációnál az epr spektrum az erősen immobilis (lásd nyilak) spin-labelre jellemző spektrumot mutat. Amint a membrán lipid komponense növekedik, egy második sokkal mobilsabb komponens is megfigyelhető, amely a lipid mennyiség növekedésével annyira megnövekedik, hogy elfedi az erősen immobilis komponenst.



16. ábra. Spin-labeled citokromoxidáz epr spektruma különböző foszfolipid koncentráció mellett pufferelt vizes oldatban. A bal oldali spektrumok a középső görbe amplitúdójára vannak normalizálva. A nyilak az immobilis spin-label epr spektrumot mutatják

A spektrumok alapján levonható következtetések az alábbiak:

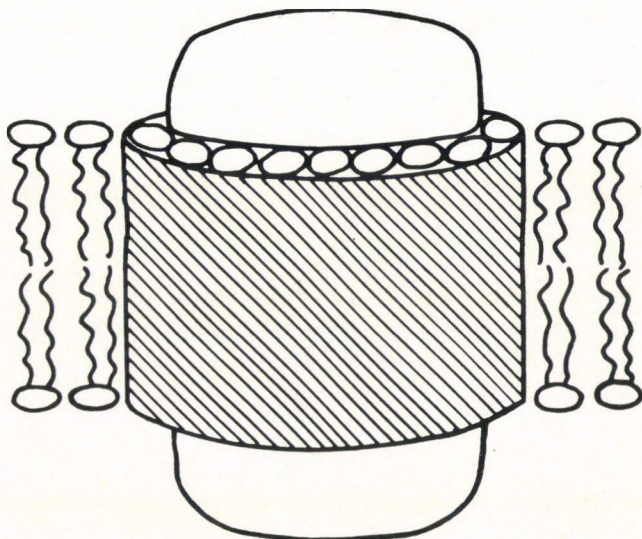
1. 77 K^o-on, tehát teljes immobilizáció esetén a két szélső extrémum távolsága 69 G; a spektrumoknál 64 G, ami azt jelenti, hogy a spin-label a citokromoxidázban alacsony lipid tartalomnál csaknem tökéletesen immobilis.

2. Az isotróp hiperfinom csatolási állandó értéke a gyengén immobilis jel esetén 14,2 G, míg a foszfát pufferben 15,5 G, ami arra utal, hogy a spin-label hidrokarbon környezetben helyezkedik el. A jel alakjából viszont az következik, hogy a spin-label környezetének fluiditása meglehetősen nagy, azaz nagyobb foszfolipid/protein aránynál a citokromoxidáz membrán folyékony foszfolipid réteget alkot.

3. A kettő együtt azt jelenti, hogy a citokromoxidáz membránban két egymástól elhatárolható lipid környezet létezik.

Computer felhasználásával — digitalizálás, kétszeres integrálás és spektrum-szimuláció segítségével — megállapították, hogy a proteinhez kötött foszfolipid mennyisége független a folyékony lipidréteg mennyiségétől. A kötött foszfolipid mennyisége kb. 0,2 mg/mg protein. A kötött foszfolipid mennyiségét geometriai megfontolással is megkísérelték alátámasztani. Az eredmény

szerint az első foszfolipid rétegben a protein-komplex körül 0,17 mg foszfolipid van 1 mg proteinre. Az epr mérések alapján a 17. ábrán látható modellt konstruálták.



17. ábra. Citokromoxidáz sematikus ábrázolása a foszfolipid komponensekkel

Az ábrán az első foszfolipid réteget kell mint kötött lipid réteget tekintenünk. Természetesen ez a modell a valódi struktúra nagyon leegyszerűsített változata, mivel bizonyos, hogy a protein-komplex lipidkötő helyei — a hidrofob helyek — teljesen szabálytalanul helyezkednek el a molekula felületén, és a modell nem képes számot adni a lipid-protein kölcsönhatásról sem. A vázolt modellrendszer további vizsgálatait JOST és mts. későbbi közleményében találhatók (JOST és mts. 1973).

4. Az nmr spektroszkópia alapjai

Rádiófrekvenciás sugárzás abszorpcióját az atomi és molekuláris rendszerek atommagjai által erős külső mágneses tér jelenlétében mágneses magrezonancia-abszorpciónak (*nuclear magnetic resonance, nmr*) nevezzük (ABRAGAM 1961, EMSLEY és mts. 1966, POPLE és mts. 1959).

Az nmr rezonancia alapelveinél lényegében véve megismételhetnénk mindazon megfontolást, amit az epr spektroszkópiánál tettünk. Ha protonrezonancia esetére gondolunk, amely leggyakoribbnak tekinthető jelenleg a kémiai és biológiai vizsgálatoknál,* csupán azt kell tekintetbe vennünk, hogy a proton mágneses momentumában szereplő

* Újabban sikerrel alkalmazzák a mágneses magrezonancia spektroszkópiát P^{31} , C^{13} , Na^{23} és K^{39} magok esetében is biológiai problémáknál.

$$\frac{eh}{4\pi m_M c}$$

kifejezésben, az ún. magmagnetonban, a proton m_M tömege szerepel, amely kb. 2000-szer kisebb az elektron tömegénél, így ennek megfelelően az energia-különbség az egyes nívók között statikus mágneses térben kisebb. Ha a mágneses tér a szokásos 14,092 G, a besugárzáshoz szükséges frekvencia 60 MHz. Szokás ezen kívül 100 MHz, 220 MHz, sőt legújában 300 MHz-es készülék építése is.

A mágneses magrezonancia jelenségének felismerése után elég gyorsan kiderült, hogy a különböző környezetben (kémiai szerkezetet illetően) levő H^1 magok rezonanciaabszorpciójának helye kissé különböző, azaz állandó frekvencia mellett a rezonanciafeltételben szereplő H mágneses térerősség a különböző kémiai vegyületekben eltérő. Ennek a jelenségnek tulajdonítható az nmr spektroszkópia széles körű elterjedése, biológiai és kémiai alkalmazása a különböző vegyületek és biológiai anyagok szerkezetkutatásában.

A magokat körülvevő elektronok a külső tér hatására indukált diamágneses momentumot hoznak létre, amely a Lenz-törvény értelmében a külső gerjesztő térrel ellenkező irányú és az egyes funkciók csoportokra specifikus, és ennek megfelelően a mag helyén (proton) a lokális mágneses térerősség (H) kisebb, mint a külső alkalmazott mágneses térerősség (H_0):

$$H = H_0 (1 - \sigma_1),$$

ahol σ_1 a vizsgált magra jellemző *árnyékolási együttható*. A H^1 atomok kémiai vegyületben elfoglalt helyzetétől függően az indukált mágneses térerősség a H^1 atom helyén megnövelheti a teret (pl. aromás rendszerekben a gyűrű síkjában fekvő H^1 atom esetén), és így a rezonancia helye az alacsonyabb mágneses térerősség irányában tolódik el.

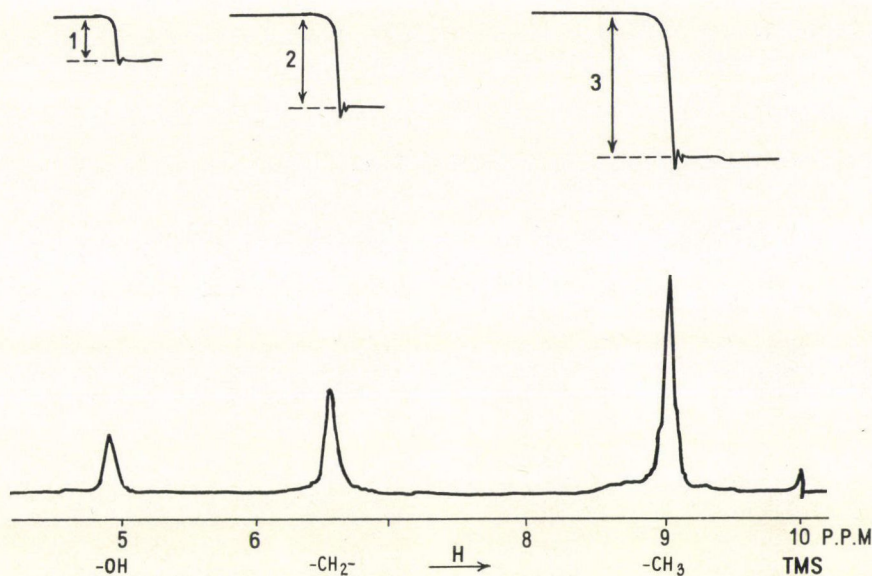
Mivel a mágneses tér és vele együtt a rezonancia-feltétel alapján kiszámítható frekvencia kellő pontossággal nem határozható meg, a gyakorlatban nem az árnyékolási együtthatót, hanem valamely a vizsgált mintához adott referens anyaghoz viszonyított *kémiai eltolódást* adják meg, amely mágneses térerősség vagy frekvenciaegységekben fejezhető ki, de leginkább elterjedt megadási módja egy viszonyszámon alapuló skála, ún. *δ -skála*:

$$\delta = \frac{\nu - \nu_{\text{ref.}}}{\nu_0} \cdot 10^6 = \frac{H - H_{\text{ref.}}}{H_0} \cdot 10^6,$$

ahol ν_0 a mérési frekvencia, a számlálóban pedig a vizsgált és referenciaanyag rezonanciája közötti eltérés szerepel frekvenciaegységben vagy térerősség-egységben kifejezve. A tapasztalt kis eltérések használatának elkerülése miatt a 10^6 -án szorzó és a ppm (parts per million) skála használatos. A gyakorlatban elterjedt még az ún. *τ -skála*:

$$\tau = 10 - \delta,$$

amelyet szintén ppm egységekben fejeznek ki. Ennek az a magyarázata, hogy a protonrezonancia spektroszkópiában leggyakrabban használt referenciaanyag a tetrametil-szilán $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$ — rövidítése TMS — árnyékolási együtthatója igen nagy, keskeny a rezonanciagörbéje és kémiailag elég közömbös, így, ha megállapodunk abban, hogy $\delta_{\text{TMS}} = 0$, akkor csaknem minden anyag esetében τ pozitív. A mérés feltételeként megemlítjük, hogy a kémiai és biológiai vizsgálatoknál a mérésnek valódi oldatban kell megtörténnie.

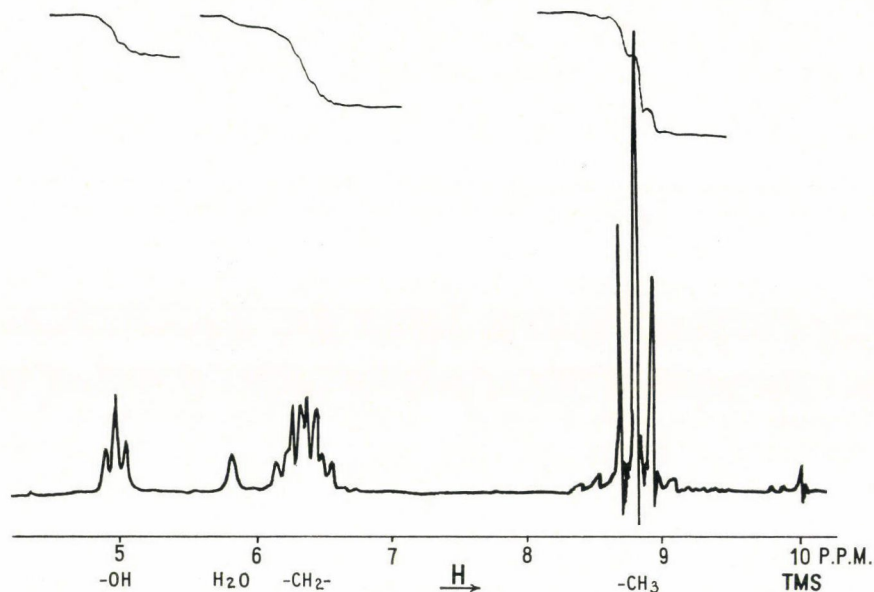


18. ábra. Etanol kifelbontású nmr spektruma. A különböző kémiai környezetben levő H^1 atomok különböző mágneses térerősségnél mutatnak rezonancia abszorpciót (alsó görbe). Az abszorpciós görbék felett az integrált görbék láthatók. A kémiai eltolódás a vízszintes tengelyről olvasható le τ skálában, a használt referencia-anyag tetrametil-szilán (TMS)

Az etanol $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$ szerkezetét tekintetbe véve várhatjuk, hogy a háromféle kémiai környezetben levő H^1 atomok három protonrezonancia jelet adnak. Ilyen spektrumfelvételt mutat a 18. ábra, amelyet 60 MHz-es spektrométerrel vettek fel; a használt referenciaanyag TMS. Hogy az oldószerben levő H^1 magoktól származó magrezonanciát elkerüljék, ill. a rezonanciaabszorpciót csökkentsék, a gyakorlatban az anyagok oldására és hígítására deuterizált oldószereket használnak (pl. CDCl_3 , C_6D_6 , $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, D_2O , D_2SO_4 , NaOD stb.)

Mint látható, három abszorpciós csúcs keletkezik, legnagyobb árnyékolási együtthatóval a -CH_3 metil csoport protonjai rendelkeznek ($\tau \sim 9$ ppm). Az abszorpciós görbék felett található az integrált görbék, amelyek az abszorpciós görbe alatti területtel arányosak, és segítségével a magrezonanciában részt vevő protonok relatív száma meghatározható. A relatív intenzitás 1 : 2 : 3 az etanol szerkezeti képletének megfelelően.

Ha az etanolt vagy más kémiai vegyületet nagyfelbontású nmr spektrométerrel vizsgáljuk (szilárd testek esetén szélessávú nmr használatos), akkor további érdekes jelenséget figyelhetünk meg. A különböző kémiai eltolódásnak megfelelően rendeződve megkapjuk az egyes csoportok rezonanciagörbéit, de a rezonanciagörbék több egymáshoz közel fekvő vonalból állnak, az abszorpciós görbéknek finomszerkezete van (multipliett szerkezet). Mint a 19. ábrából látható, amely az etanol nagyfelbontású 60 MHz-es spektrométeren készült spektrumát mutatja, hogy az -OH és -CH₃ csoportoknak megfelelő helyen az



19. ábra. Etanol (96%-os) nmr spektruma 60 MHz-es spektrométerrel. A felső görbék az integrált spektrumot mutatják, amelyből az egyes funkciós csoportokban levő protonok relatív száma meghatározható. A vízszintes tengely a kémiai eltolódást mutatja τ -skálában

abszorpciós görbe triplettre, a -CH₂- csoportnak megfelelő helyen pedig egy nyolc vonalból álló csoportra hasad fel. A spektrumok ilyen *multipliett szerkezete* a magokat körülvevő elektronburok közvetítésével a különböző kémiai csoportok magjainak *spin-spin kölcsönhatására* vezethető vissza. A spin-spin kölcsönhatásra jellemző mennyiség a *csatolási állandó*, amely a kémiai eltolódás mellett az nmr spektrumok legfontosabb jellemzője, döntő információforrás a kémiai szerkezet felderítésében, és a kémiai eltolódással szemben nem függ az alkalmazott mágneses tér nagyságától. A csatolási állandó értékét, amely vegyértékszögtől, hibridizációs állapottól, konjugációs effektustól, valamint induktív és mezomér hatásoktól függ, az azonos multipliettbe tartozó rezonanciaabszorpciós görbék egymástól való távolságával adhatjuk meg frekvenciaegységben kifejezve. A csatolási állandókat a kvantummechanika

módszereivel kiszámíthatjuk (ARNOLD, T^EWS 1966, CORIO 1966, ROBERTS 1962, WAUGH 1965).

A -CH₃ metil csoportnál keletkező multiplettet az alábbiak szerint értelmezhetjük: a szomszédos -CH₂- metilén csoport két protonjának spinje a külső mágneses térben a következő relatív spin-orientációkkal rendelkezik:

	A -CH ₂ - csoport protonjainak orientációja	lokális tér a -CH ₃ csoport helyén
↑ H ₀	↑ ↑	nagyobb, mint H ₀
	↑ ↓ ↓ ↑	H ₀ a két spin mágneses hatása egymást kompenzálja
	↓ ↓	kisebb, mint H ₀

A vázolt három állapot a -CH₃ csoport helyén kissé megváltoztatja a mágneses teret és ennek megfelelően a metil csoport abszorpciós görbéje három vonalra hasad fel. Mivel a második állapot kétszeres súllyal rendelkezik, a középső vonal intenzitása kétszer akkora lesz, a relatív intenzitásarány 1:2:1. Ugyanez az eredmény adódik az -OH csoport esetére is, de a metil csoportban levő protonok nagyobb száma miatt a csoportok közötti intenzitásviszony 1:3.

Hasonló megfontolással értelmezhető a metilén-csoport felhasadása. A metil csoport protonjainak relatív spin-orientációi:

	A -CH ₃ - csoport protonjainak orientációja	lokális tér a -CH ₂ - csoport helyén
↑ H ₀	↑ ↑ ↑	nagyobb, mint H ₀
	↑ ↑ ↓ ↑ ↓ ↑ ↓ ↑ ↑	nagyobb, mint H ₀
	↑ ↓ ↓ ↓ ↑ ↓ ↓ ↑ ↓	kisebb, mint H ₀
	↓ ↓ ↓	kisebb, mint H ₀

A vázolt összeállítás alapján négy lehetséges állapot van, amelyek közül a második és harmadik állapot háromszoros súllyal rendelkezik. A kölcsönhatás következtében a metilénsoport elsődlegesen 1:3:3:1 relatív intenzitású kvartettre hasad fel, de ha megfontoljuk, hogy a szomszédos -OH csoport egy protonjának $+1/2$ és $-1/2$ állapota lehetséges és ez utóbbi szintén kölcsönhat a metilénsoport két protonjával, akkor a kvartett minden egyes vonala ezen kölcsönhatás következtében két vonalra hasad fel. A két kölcsönhatás együttes eredményeként $4 \times 2 = 8$ abszorpciós görbét kapunk. Ha az etanol vizes közegben oldott, az -OH csoport H^1 magjai a víz H^1 magjaival való kicserélődése miatt a spektrum egyszerűsödik. Az -OH csoport helyén szinglettet, míg a $-CH_2-$ csoport helyén quartettet figyelhetünk meg.

5. A mágneses magrezonancia alkalmazása biológiai rendszereknél

Az nmr spektroszkópiánál az elsődleges információforrás egy adott vegyületnél az egyes csoportok kémiai eltolódása és a spin-spin kölcsönhatás következtében keletkezett multipliett szerkezet. A spektrum kvantitatív kiértékeléséből fontos következtetések vonhatók le a molekula szerkezetére. A szerkezet analízise kis molekulású anyagok esetében még viszonylag könnyen keresztülvihető, mivel az azonos kémiai környezetben levő protonok száma csekély és így az egyes abszorpciós görbékhez a megfelelő protonok vagy csoportok hozzárendelhetők. Lényegesen változik a helyzet, ha nagyobb molekulású anyag, mint pl. biopolimér, vagy a biokémiában fontos szerepet játszó szteroid szerkezeti meghatározása a kitűzött feladat (BRUSKOV 1966). Az azonos vagy közel azonos helyzetben levő protonok meglehetősen bonyolult, egymást átfedő vonalrendszert alkotnak a protonok nagy száma miatt, másrészt a molekulák szobahőmérsékleten is gátolt forgása a spektrumvonalak kiszélesedését okozza (relaxációs folyamatok, ALTSHULER 1967). A nehézségek biopolimérek esetében még azzal fokozódnak, hogy a paraméterek, mint a hőmérséklet, koncentráció, pH-érték, oldószer vagy a puffer ionkoncentrációja csak szűk tartományon belül változtatható, ellenkező esetben a natív struktúra jelentős károsodást szenved. Szerencsésnek mondható körülmény annak felismerése a biológiailag aktív molekulák szerkezetvizsgálatánál, hogy egyes csoportok a molekulához lazábban vannak kapcsolva és így ezek az összefolyó vonalrendszertől elkülönülten jelentkeznek és ezek helyzetének változásából a spektrumban, amelyet valamilyen helyettesítő csoport mágneses árnyékolása hoz létre, az azonosítás vagy a szerkezetre vonatkozó változás megállapítása elvégezhető. Új perspektívákat nyit biológiai rendszerek vizsgálatára a C^{13} -rezonancia és a magasabb frekvencián végzett nmr vizsgálat (FERGUSON, PHILLIPS 1967), valamint a Fourier-spektroszkópia eljárásának bevezetése (ERNST, ANDERSON 1965).

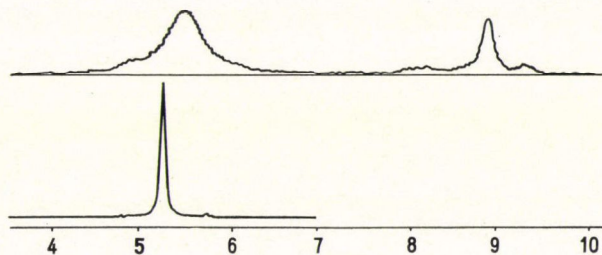
A jelenlegi műszerezettség szintjét alapul véve a biológiai területen sikerrel dolgozhatnánk olyan problémákon, amelyek a víz állapotával kapcsolatosak mind élő rendszerekben, mind pedig jól definiált modellrendszerekben. A biológiai közleményekben szereplő „kötött”, „jégszerű” és „gyorsan kicserélődő” víz meghatározása fogalmilag nem elég világos, az nmr rezonancia-spektroszkópia fogalmaival, mint a rotációs korrelációs idő, öndiffúziós együtttható, bizonyos mértékig precizírozható. A rotációs korrelációs idő a spin-rács (T_1) és spin-spin (T_2) relaxációs idők segítségével mérhető, ill. számítható (BLOEMBERGEN és mts. 1948). Folyadékban a gyors forgás következtében a molekulák közötti dipoláris kölcsönhatások kiátlagolódnak, így a vonalak szélessége milligauss nagyságrendű, Szilárd fázisban a dipoláris kölcsönhatás miatt néhány gauss szélességű vonalakhoz jutunk. A széles vonalak igen gyakran nem detektálhatók és az eredmény ebben az esetben az integrált rezonancia-intenzitásban egy csökkenés, amelyet „terület deficit”-nek szokás nevezni.

Már a korai nmr vizsgálatoknál megállapították makromolekuláris oldatokban, hogy a víz jel terület deficitet mutat, amelyet annak tulajdonítottak, hogy a víz mintegy 20–25%-a „jégszerű” struktúrában található, anélkül azonban, hogy jellemezték volna a mozgási gátoltság fokát. Eltekintve attól, hogy lokális diamágneses anizotrópia vagy paramágneses ionok jelenléte is okozhat hasonló effektust, sokkal valószínűbb az alábbi magyarázat:

1. teljes csökkenés a vízmolekulák mobilitásában,
2. a víz molekulák gyors kicserélődése a „szabad víz” és több molekuláris mozgásban gátolt „kötött” víz frakció között,
3. a vízmolekulák öndiffúziós együttthatójának, D-nek (cm^2/sec) csökkenése, amelyet a hidratált makromolekulák jelenléte vált ki.

A protonoktól származó nmr spektrumot a 20. ábra mutatja, amely tojássárgájából vett mintán készült (SZALAY, ARADI 1973).

Az nmr vizsgálatok szép példája mutatható be FRITZ és SWIFT (1967) mérései alapján, akik béka idegen két nmr abszorpciós görbét tudtak észlelni, ha az ideget olyan Ringer-oldatba helyezték, amely 0,04 M CoCl_2 vagy 0,01 M MnCl_2 -t tartalmazott. Kezelés előtt csupán egy nmr jel figyelhető meg 2,7 Hz szélességgel és a kezelés után megjelenő két nmr jel együttes integrális



20. ábra. Tojássárgájából vett minta 60 MHz-es spektruma (fent), alul a tiszta $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ minta spektruma

intenzitása megegyezik a kiinduló állapot intenzitásával, ami arra utal, hogy a vonalak valamennyi vizet a mintában reprezentálják. CoCl_2 kezelés után az egyik vonal eltolódása független a CoCl_2 koncentrációjától, ami azt jelenti, hogy a vonal reprezentálja az intracelluláris vizet, amelyben a Co^{2+} ion nem képes bediffundálni.

A két vonal relatív területe észrevehetően változott az ideg elektromos vagy kémiai depolarizálására. Mn^{2+} ionok esetén csupán a nem eltolódó vonal (intracelluláris víz) volt megfigyelhető*, és depolarizáció esetén az integrális intenzitása a teljes víz 65%-áról 43%-ra csökkent. Ez azt jelenti, hogy a depolarizáció folyamán az intracelluláris térfogat tetemes változásával kell számolni. A kísérletek alapján az extracelluláris-intracelluláris vízkicserélődés sebessége (k_{AB}) a W vonalszélesség hőmérséklet-függéséből kiszámítható [$\pi W = 1(T_2 + k_{fB})$]. 10^{-3} cm/s átlagpermeabilitást feltételezve a víz számára, az axon átmérőjére 11,3 μm -t kaptak, amely jó egyezésben van az optikai kettőtörés mérésekkel.

Hasonló technikával megvizsgálták depolarizáló (cevadin, acetilkolin) és blokkoló ágensek (prokain, tubokurarin) hatását. A depolarizáló ágensek olyan effektust hoztak létre, mint az elektromos depolarizáció, kivéve az acetilkolint, amelynek hatására nem csökkent az intracelluláris víz mennyisége. Ezzel szemben a blokkoló ágensek megnövelik az intracelluláris és extracelluláris víz között a kicserélődés sebességét.

IRODALOM

- ABRAGAM, A.: The Principles of Nuclear Magnetism. Oxford University Press, Oxford (1961).
 ALEXANDROV, I. V., IVANOVA, A. N., KORST, N. N., LAZAREV, A. V., PRIKHOZHENKO, A. I., STRYUKOV, V. B.: Mol. Phys. **18**, 681 (1970).
 ALFIMOVA, E. Ya., LICHTENSTEIN, G. I.: Biofizika **17**, 49 (1972).
 ALTSCHULER, S. A.: Magnetic Resonance and Relaxation. p. 588 (1967). Ed. by R. Blinc, North Holland Publ. Comp., Amsterdam (1967).
 ALTSCHULER, S. A., KOSYREW, B. M.: Paramagnetische Elektronenresonanz. Teubner Verlag, Leipzig (1963).
 ARNOLD, K., TEWS, G.: Ann. Phys. **18**, 138 (1966).
 AYSCOUGH, P.: Electron Spin Resonance in Chemistry. Methuen and Co. London (1967).
 BELÁGYI J.: MTA Biol. Oszt. Közl. **10**, 355 (1967).
 BELÁGYI J.: nem közölt adat (1972).
 BELÁGYI J.: MÉT XXXIX. Vándorgyűlés, Pécs (1973).
 BELÁGYI, J., DAMERAU, W.: Acta Biochem. Biophys. Acad. Sci. Hung. **8**, (1974) 367
 BLOEMBERGEN, N., PURCELL, E. M., POUND, R. V.: Phys. Rev. **73**, 679 (1948).
 BLUMENFELD, L. A., WOJEWODSKI, W. W., SEMJONOV, A. G.: Die Anwendung der paramagnetischen Elektronenresonanz in der Chemie. Gesst und Portig K.-G. Leipzig (1966).
 BRUSKOV, V. I.: Biofizika **11**, 195 (1966).
 CALVIN, M., WANG, H. H., ENTINE, G., GILL, D., FERRUTI, P., HARPOLD, M. A., KLEIN, M. P.: Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. **63**, 1 (1969).
 CARRINGTON, A., MCLACHLAN, A. D.: Introduction to Magnetic Resonance. Harper and Row, New York (1967).
 COHN, M.: Quart. Rev. Biophys. **3**, 61 (1970).

* Paramágneses szondák alkalmazásával további információk nyerhetők a biológiai rendszer struktúrájáról és funkciójáról (COHN, 1970; WIEN és mts. 1972).

- COMMONER, B., TOWNSEND, J., PAKE, G. E.: *Nature* **174**, 689 (1954).
- CORIO, P. L.: *Structure of High-Resolution NMR Spectra*. Academic Press, New York—London (1966).
- DODD, G. H., BARRATT, M. D., RAYNER, L.: *FEBS Lett*, **8**, 286 (1970).
- EHRENBERG, D., MALMSTRÖM, B. G., VANNGÅRD, T.: *Magnetic Resonance in Biological Systems*. Pergamon (1967).
- ELEK, G., SAJGÓ, M., GRIGORIAN, G. L., CHIBRIKIN, V. M., KELETI, T.: *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.* **7**, 119 (1972).
- EMSLEY, J. W., FEENEY, J., SUTCLIFFE, L. H.: *High resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy Vol. 1*, és **2**. Pergamon Press, Oxford (1966).
- ERNST, R. R., ANDERSON, W. A.: *Rev. Sci. Instr.* **36**, 1696 (1965).
- FEHER, G.: *Bell. Syst. Techn. J.* **36**, 449 (1957).
- FEHER, G.: *Electron Paramagnetic Resonance with Application to Selected Problems in Biology* Gordon and Breach, New York (1970).
- FERGUSON, R. C., PHILLIPS, W. D.: *Science* **157**, 257 (1967).
- FREED, J. H.: *Ann. Rev. Phys. Chem.* **23**, 265 (1972).
- GRIFFITH, H. O., CORNELL, D. W., MCCONNELL, H. M.: *J. Chem. Phys.* **43**, 2909 (1965).
- GRIFFITH, O., WAGGONER, A.: *Acc. Chem. Res.* **2**, 17 (1969).
- HAMILTON, C. L., MCCONNELL, H. M.: *Spin Labels in Structural Chemistry and Molecular Biology* Ed. A. Rick and N. Davidson p. 115 W H. Freeman and Co. San Francisco. (1968).
- HOLMES, D., PIETTE, L.: *J. Pharmacol. Exp. Therap.* **173**, 78 (1970).
- HSIA, J. C., CHEN, W. L., LONG, R. A., WONG, L. T., KALOW, W.: *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **69**, 3412 (1972).
- HSIA, J., PIETTE, L.: *Arch. Biochim. Biophys.* **129**, 296 (1969).
- HUBBELL, W. L., MCCONNELL, H. M.: *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **61**, 12 (1968).
- HUBBELL, W. L., MCCONNELL, H. M.: *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **63**, 16 (1969a).
- HUBBELL, W. L., MCCONNELL, H. M.: *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **64**, 20 (1969b).
- HUBBELL, W. L., MCCONNELL, H. M.: *J. Am. Chem. Soc.* **93**, 314 (1971).
- HUDSON, A., LUCKHURST, G. R.: *Chem. Rev.* **69**, 191 (1969).
- INGRAM, D. J. E.: *Spectroscopy at Radio and Microwave Frequencies* Butterworths Scientific Publications, London (1955).
- INGRAM, D. J. E.: *Free Radicals as Studied by Electron Spin Resonance* Butterworths Scientific Publications, London (1958).
- INGRAM, D. J. E.: *Biological and Biochemical Application of Electron Spin Resonance* Adams Hilger Ltd. London (1970).
- ISENBERG, I.: *Physiol. Rev.* **44**, 487 (1964).
- JOST, P., GRIFFITH, O. H., CAPALDI, R. A., VANDERKOOI, G.: *Biochim. Biophys. Acta* **311**, 141 (1973).
- JOST, P. C., GRIFFITH, O. H., CAPALDI, R. A., VANDERKOOI, G.: *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **70**, 480 (1973).
- JOST, P., LIBERTINI, L. J., HEBERT, V. C., GRIFFITH, O. H.: *J. Mol. Biol.* **59**, 77 (1971).
- KEANA, J. F. W., KEANA, J. B., BEETHOM, D.: *J. Am. Chem. Soc.* **89**, 3055 (1967).
- KEITH, A., BULFIELD, G., SNIPER, W.: *Biophys. J.* **10**, 618 (1970).
- KIVELSON, D.: *J. Chem. Phys.* **33**, 1094 (1960).
- KNEUBÜHL, F. K.: *J. Chem. Phys.* **33**, 1074 (1960).
- KOKORIN, A. I., ZAMARAEV, K. I., GRIGORIAN, G. L., IVANOV, V. P., ROZANTZEV, E. G.: *Biofizika* **17**, 34 (1972).
- KOLTOVER, V. K.: *Biofizika* **18**, 661 (1973).
- KOLTOVER, V. K., GOLDFIELD, M. G., HENDEL, L. Ya., ROZANTZEV, E. G.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **32**, 421 (1968).
- KUZNETSOV, A. N., WASSERMAN, A. M., VOLKOV, A. U., KORST, N. N.: *Chem. Phys. Letters* **12**, 103 (1971).
- LASSMANN, G., EBERT, B., KUZNETSOV, A. N., DAMERAU, W.: *Biochim. Biophys. Acta* **310**, 298 (1973).
- LAZAREV, A. V., STRUKOV, V. B.: *Dokl. Akad. Nauk. SSSR.* **197**, 627 (1971).
- LEVINE, Y. K.: *Physical Studies of Membrane Structure*. Progress in Biophysics Vol. 24. Ed. J. A. V. Butler, D. Noble Pergamon, Oxford (1972).
- LICHTENSTEIN, G. I., GREBENSCHIKOV, U. B., BOBODJANOV, P. H., KOHAROV, Yu. V.: *Molekularnaja Biol.* **4**, 682 (1970).
- MALLARD, J. R., KENT, M.: *Phys. Med. Biol.* **14**, 373 (1969).
- MCCALLEY, R. C., SHIMSHICK, E. J., MCCONNELL, H. M.: *Chem. Phys. Letters* **13**, 115 (1972).
- OHNISHI, S.: *Seibutsu Butsuri* **8**, 118 (1968).

- OHNISHI, S., BOEYENS, J. C. A., McCONNELL, H. M.: Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. **56**, 809 (1966).
- PAKE, G. E.: Paramagnetic Resonance. Benjamin, Inc. New York (1962).
- POOLE, C. P.: Electron Spin Resonance, A Comprehensive Treatise on Experimental Techniques, John Wiley and Sons, New York (1967).
- POPLE, J. A., SCHNEIDER, W. G., BERNSTEIN, H. J.: High resolution nuclear magnetic resonance. McGraw-Hill, New York (1959).
- ROBERTS, J. D.: An Introduction to the Analysis of Spin-Spin Splitting in High-Resolution Nuclear Magnetic Resonance Spectra. W. A. Benjamin, Inc., New York (1962).
- ROZANTZEV, E. G.: Svobodnue Iminoksilnue Radikali Himija, Moskva (1970).
- SANDBERG, H., PIETTE, L.: Agressologie **9**, 59 (1968).
- SANDBERG, H., BRYANT, R., PIETTE, L.: Arch. Biochem. Biophys. **133**, 144 (1969).
- SCHEFFLER, K., STEGMANN, H. B.: Elektronenspinresonanz. Springer Verlag, Berlin (1970).
- SCHOFFA, G.: Elektronenspinrezonanz in der Biologie. Verlag G. Braun, Karlsruhe (1964).
- SEELIG, J.: J. Am. Chem. Soc. **92**, 13 (1970).
- SEELIG, J., HASSELBACH, W.: Eur. J. Biochem. **21**, 17 (1971).
- SHIMSHICK, E. J., McCONNELL, H. M.: Biochem. Biophys. Res. Comm. **46**, 321 (1972).
- STEINER, R. F., EDELHOCH, H.: Chem. Rev. **62**, 457 (1962).
- STONE, T. J., BUCKMAN, T., NORDIO, P. L., McCONNELL, H. M.: Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. **54**, 1010 (1965).
- STOODLEY, L. G.: J. Electronics. Control **14**, 531 (1963).
- SZALAY L., ARADI F.: Nem publikált mérési eredmény (1973).
- WAUGH, J. S.: Advances in Magnetic Resonance. Academic Press, New York (1965).
- WEBER, G.: Disc. Farad. Soc. **13**, 33 (1953).
- WIEN, R. W., MORRISETT, J. D., McCONNELL, H. M.: Biochemistry **11**, 3707 (1972).
- ZAVOISKI, J. K.: J. Phys. USSR. **9**, 221 (1945).