

На правах рукописи

МАКУРЕНКОВ Александр Михайлович

**СПЕКТРАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ
ОСОБЕННОСТЕЙ ПРОЦЕССОВ СОРБЦИИ
В РАЗБАВЛЕННЫХ РАСТВОРАХ**

Специальность 01.04.05 – оптика

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Москва – 2012

Работа выполнена на кафедре медицинской физики Физического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова

Научный руководитель: доктор физико-математических наук
профессор Петрусеви́ч Ю́рий Миха́йлович

Научный консультант: доктор физико-математических наук
профессор Петрова Галина Петровна

Официальные оппоненты: Фадеев Виктор Владимирович,
доктор физико-математических наук
профессор кафедры квантовой электроники
физического факультета МГУ имени
М.В.Ломоносова, Москва

Васильевский Иван Сергеевич,
кандидат физико-математических наук
доцент Национального исследовательского
ядерного университета «МИФИ», Москва

Ведущая организация: Институт химической физики им. Н.Н.Семенова
Российской академии наук, Москва

Защита состоится 20 июня 2012 г. в 16.30 на заседании совета по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Д 501.001.45 на базе Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова по адресу: 119991, Россия, г. Москва, Ленинские горы, д.1, стр. 5 (19-й корпус Научно-исследовательского института ядерной физики имени Д.В.Скобельцына МГУ имени М.В.Ломоносова), аудитория 2-15.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Научно-исследовательского института ядерной физики имени Д.В.Скобельцына МГУ имени М.В.Ломоносова.

Автореферат разослан « 18 » мая 2012 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета Д 501.001.45 на базе Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова

кандидат физико-математических наук

О.М.Вохник

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Данная диссертационная работа посвящена оптическим и радиоспектроскопическим исследованиям процессов сорбции в растворах с малыми концентрациями растворенных веществ.

Сорбция лежит в основе многих физико-химических явлений. Это ключевое явление представляет собой динамический процесс, происходящий на границе раздела фаз. При этом конкретные параметры системы принято фиксировать при статистически равновесных состояниях, т.е. в конечных точках динамического процесса. Явление сорбции подробно исследовалось с конца XIX века и к настоящему времени существует ряд сложившихся теоретических подходов к его описанию. Наряду с этим в реальных системах процесс сорбции часто имеет особенности, вносимые сопутствующими динамическими явлениями. Непосредственное изучение процессов, происходящих в растворах, обычно является нетривиальной задачей из-за их сложной динамики. Однако случай разбавленных растворов, где содержание растворенных веществ мало, часто теоретически соотносится со случаем идеального газа. Такой подход открывает возможность интерпретации получаемых данных в рамках достаточно простых приближений. Прямое экспериментальное исследование процесса сорбции в растворах является сложной многопараметрической задачей. В связи с этим на практике применяют непрямые методы изучения этого явления. Среди таких косвенных методов следует выделить спектроскопический подход, который позволяет выявить значительное количество параметров процесса сорбции, соотнося их с регистрируемыми данными.

В настоящее время физические исследования функционирования биологических систем являются особенно актуальными. В частности, для медицинских целей важно изучение процессов, происходящих в физиологических жидкостях человека на молекулярном уровне, например, в крови или лимфе. Исследование особенностей динамики молекул в различных биологических структурах организма позволяет выявлять специфические характеристики различных заболеваний. В рамках изучения возможностей различных спектральных методов для диагностики онкологических заболеваний была подобрана методика, которая позволяет выявлять заболевание с высокой степенью достоверности [1].

Основой данного метода является специальная обработка разбавленного раствора сыворотки крови пациента солью тяжелого металла. Диагностическими параметрами могут служить либо коэффициенты межмолекулярного взаимодействия, либо коэффициенты трансляционной диффузии, определяемые оптическими спектральными методами, либо время спин-решеточной релакса-

ции, измеряемой по данным радиоспектроскопии. Для обеспечения высокой селективности данных используются вариации этих параметров до и после обработки солью. Для диагностики заболеваний учитывается различие эффектов воздействия солей тяжелых металлов на разбавленные растворы сыворотки крови онкологических больных и здоровых пациентов.

Биологические растворы являются многофазными системами, основным растворителем в которых является вода. Исследования по сорбции молекул воды выявляют селективное взаимодействие спиновых изомеров водяного пара с поверхностью твердотельных адсорбентов [2–4]. В рамках такого подхода в работе исследовано взаимодействие молекул воды с органическим растворителем, позволяющим сформировать тонкую пленку, т.е. тем самым смоделировать поверхность адсорбента в жидком разбавленном растворе.

Цель работы

Целью диссертационной работы является выявление особенностей динамических процессов сорбции в многофазных разбавленных растворах на основе данных фотонно-корреляционной спектроскопии, субмиллиметровой спектроскопии сверхвысокого разрешения и радиоспектроскопии.

Исходя из общей цели диссертации, ставился ряд **практических задач**:

1. изучение методом фотонно-корреляционной спектроскопии процессов сорбции ионов тяжелых металлов на поверхности белков сыворотки крови в разбавленных растворах, приводящей к кластеризации молекул;
2. определение параметров сорбции ионов металла на поверхности молекулы белка в модельных разбавленных растворах с помощью независимых методов спектроскопии ЯМР и ЭПР;
3. создание специализированного спектрального прибора, позволяющего регистрировать спин-изомерный состав воды в газовой фазе над поверхностью адсорбента с высокой разрешающей способностью;
4. исследование параметров сорбции спин-изомеров воды в жидком органическом растворителе (глицерине) при малых концентрациях воды.

Научная новизна

Методом фотонно-корреляционной спектроскопии впервые обнаружено явление агрегации молекул белка альбумина при малых концентрациях иона кобальта. Этот феномен связан с эффектом насыщения процесса сорбции ионов данного металла на поверхности белка, впервые установленным по данным радиоспектроскопических исследований.

В работе впервые исследовано сорбционное взаимодействие малых концентраций молекул воды с протонным растворителем в аспекте различия свойств ее ядерных спиновых изомеров. Метод абсорбционной субмиллиметровой ЛОВ-спектроскопии позволил с высокой степенью достоверности интерпретировать изменения спектральных параметров паров воды, что позволило впервые обнаружить селективное изменение параметров спектральных линий поглощения, принадлежащих разным спин-изомерам в парах воды при их сорбции в глицерине. Впервые установлена скорость процесса спин-конверсии молекул воды в протонной жидкости.

Научная ценность

Результаты исследования вносят вклад в понимание механизмов сорбции ионов тяжелых металлов на поверхности молекул белков в многокомпонентных разбавленных растворах, которые характерны для биологических объектов. На основании полученных данных выявлены качественно новые закономерности в процессах сорбции в разбавленных растворах, включая надмолекулярный структурный переход молекул альбумина в присутствии ионов кобальта, характеризующийся процессом агрегации молекул белка в кластерные образования. Также разработана новая экспериментальная методика, позволившая обнаружить селективное взаимодействие спиновых изомеров молекулы воды в протонном органическом растворителе, имеющее макроскопические масштабы проявления. В работе использован нетрадиционный подход к рассмотрению роли растворителя в разбавленных растворах и приведены оригинальные суждения по проблеме спин-конверсии, сопровождающей процесс селективного взаимодействия спин-изомеров молекул воды.

Практическая значимость

Обнаружена взаимосвязь процесса сорбции ионов кобальта на поверхности альбумина в разбавленных растворах с явлением агрегации молекул белка, влияющим на параметры спектров оптического рассеяния света в биологических жидкостях. Исследованное в работе электростатическое взаимодействие биополимерных молекул в водных растворах с ионами металлов позволяет установить молекулярный механизм патологических изменений в биологических объектах. Это указывает на возможность использования данного явления в медицинских целях, например при диагностике онкологических заболеваний.

Для изучения спектра нижних вращательных переходов в основном колебательном состоянии молекулы воды был впервые разработан спектрометр на базе усовершенствованной техники ламп обратной волны, позволяющий реги-

стрировать спектры поглощения в дальней инфракрасной области электромагнитных волн, в т.н. терагерцовом диапазоне.

Полученные данные о селективной адсорбции спин-изомеров воды в протонной жидкости могут быть использованы для контроля продуктов реакций спиновой химии и позволяют глубже понять процессы адсорбции, что приобретает неоспоримую значимость для развития современной фундаментальной науки. Собранный фактический материал и результаты исследования могут быть также использованы при чтении курсов по оптике, радиоспектроскопии, химической физике, биофизике, молекулярной физике и другим смежным областям науки.

Апробация работы

Результаты работы были апробированы в ходе дискуссий в рамках научных семинаров физического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, Института общей физики им. А.М. Прохорова РАН, химического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова, ИОНХ РАН, биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, выступлений на семинарах молодых ученых ИОФ РАН, а также на международных совещаниях в рамках Европейского сотрудничества по программе «Adventure with water spin-isomers». Различные аспекты диссертационной работы были представлены в докладах, сделанных на всероссийских и международных конференциях: «Волновые явления в неоднородных средах» (Москва, 2004), «ЯМР в гетерогенных структурах» (Санкт-Петербург, 2004), II Евразийском конгрессе по медицинской физике и инженерии (Москва, 2005), «Ars Separatoria Acta – 2005» (Польша, 2005), XXIII Съезде по спектроскопии (Москва, 2005), 31-ом Международном Конгрессе по ИК и миллиметровым волнам и ТГц электронике «IRMMV-THz – 2006» (Шанхай, 2006) и «ЯМР в науках о живом» (Санкт-Петербург, 2007). 50-ой Научной конференции МФТИ (Москва, 2007), 9-ом Общероссийском семинаре «ДЛС-9» им. А.М. Прохорова (Москва, 2008), VII Международной научной конференции «Лазерная физика и оптические технологии» (Минск, 2008), Всероссийском симпозиуме с участием иностранных ученых «Актуальные проблемы теории адсорбции, пористости и адсорбционной селективности» (Москва, 2009), 13-ом Европейском симпозиуме по газофазной дифракции (Германия, 2009), III Евразийском конгрессе по медицинской физике (Москва, 2010), 7-ой Международной конференции «ЯМР в гетерогенных структурах» (Санкт-Петербург, 2010), Ломоносовских чтениях к 300-летию М.В. Ломоносова (Москва, 2011).

Публикации. По результатам диссертационного исследования опубликовано 22 работы.

Защищаемые положения

На защиту выносятся следующие положения:

1. Впервые обнаружено существование надмолекулярного структурного перехода молекул альбумина, сопровождающего процесс сорбции ионов кобальта в разбавленных растворах при малых концентрациях на основе данных фотонно-корреляционной спектроскопии.
2. Впервые обнаружен эффект насыщения сорбции ионов кобальта и свинца на поверхности альбумина в разбавленных растворах при малых концентрациях по данным радиоспектроскопии.
3. Впервые с помощью метода газовой субмиллиметровой спектроскопии выявлено существование селективного взаимодействия спин-изомеров молекул воды с жидким протонным растворителем.
4. Впервые по данным субмиллиметровой спектроскопии определена скорость процесса спин-конверсии в разбавленном растворе воды в глицерине.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, семи глав, заключения и списка используемой научной литературы. Содержит 137 страниц текста, 46 рисунков, 7 таблиц. Библиография содержит 117 источников.

СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Во **введении** обоснована актуальность темы исследования, указана его научная новизна, теоретическая и практическая значимость, сформулированы цели работы, дана краткая характеристика полученных результатов.

В **первой главе** диссертации дается обзор теоретических описаний процессов адсорбции, включая случаи мономолекулярной сорбции Ленгмюра, характерной для идеальных газов, и полимолекулярной сорбции Брунауэра–Эммета–Теллера, учитывающей реальные системы. Отдельно описаны процессы сорбции, происходящие в разбавленных растворах, включая теорию Дебая для случая полиэлектролитов.

Далее в работе условно выделяются две части, объединяющие два различных экспериментальных исследования (со второй главы по четвертую, и с пятой по седьмую).

Во **второй главе** рассматриваются свойства макромолекул белков, в частности альбумина. Взаимодействие этих частиц в растворе зависит от многих

физических параметров, среди которых ионная сила раствора, водородный показатель pH, поверхностный заряд молекулы белка и т.д.

Третья глава содержит описание экспериментальных методов, использованных для изучения в работе разбавленных растворов альбумина, содержащих ионы металлов. Оптический метод фотонно-корреляционной спектроскопии (ФКС) позволяет определить коэффициент диффузии дисперсных частиц в жидкости путем анализа характерного времени флуктуаций интенсивности рассеянного света. Броуновское движение макромолекул в растворе приводит к флуктуациям их локальной концентрации, проявляющихся как локальные неоднородности показателя преломления и, соответственно, – флуктуации интенсивности рассеянного света при прохождении лазерного луча через такую среду. Коэффициент диффузии частиц обратно пропорционален характерному времени релаксации флуктуаций интенсивности рассеянного света, соответствующему времени затухания экспоненциальной временной корреляционной функции, которая измеряется с помощью цифрового коррелятора. Для исследований параметров сорбции ионов металлов на поверхности белка в разбавленном растворе в работе дополнительно применялись радиоспектроскопические методы ЯМР-релаксации и ЭПР-спектроскопии.

В **четвертой главе** представлены результаты экспериментальных исследований растворов альбумина в присутствии ионов кобальта и свинца.

В рамках метода фотонно-корреляционной спектроскопии для раствора макромолекул их броуновское движение описывается корреляционной функцией $c(t)$:

$$c(t) = a \langle E^*(0)E(t) \rangle. \quad (1)$$

В приближении трансляционного броуновского движения макромолекул, характерного для разбавленных растворов, корреляционная функция имеет экспоненциальный вид:

$$c(t) = c_0 \exp[-t/\tau], \quad (2)$$

и в случае полидисперсной среды является суммой функций для каждого типа частиц:

$$c(t) = \sum c_{0i} \exp[-t/\tau_i], \quad (3)$$

$$\text{где } \tau_i = 1/D_i q^2, \quad (4)$$

D – коэффициент трансляционной диффузии, $q=2\pi/\lambda$ – волновой вектор.

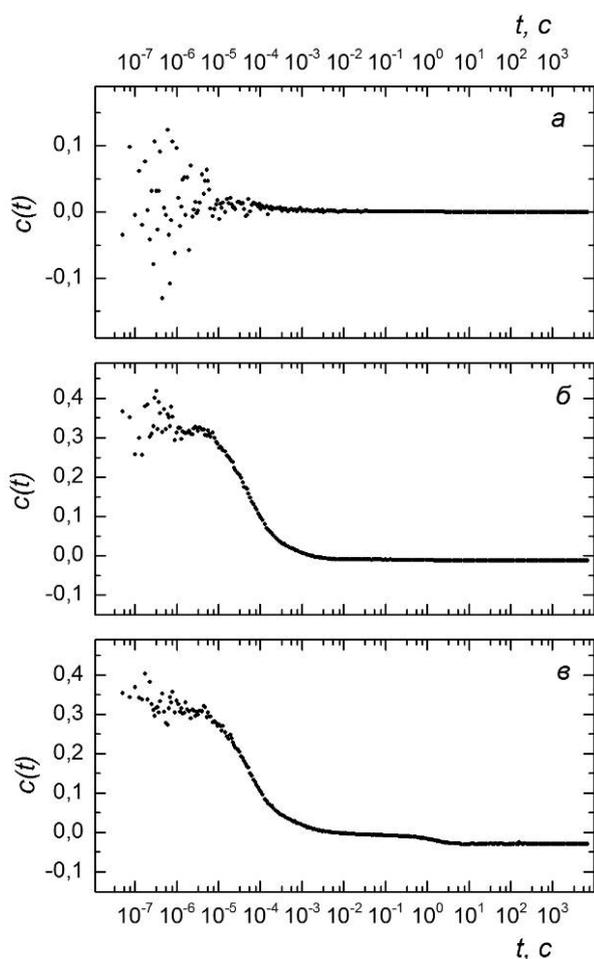


Рис. 1. Экспериментальные корреляционные функции для раствора CoCl_2 (а), раствора человеческого сывороточного альбумина (HSA) (б), раствора HSA и CoCl_2 ($c=1,5\%$) (в).

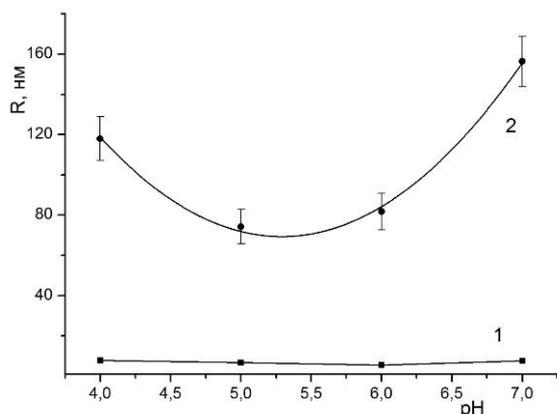


Рис. 2. Зависимость радиуса частиц в растворе альбумина в отсутствие (1) и присутствии в растворе соли CoCl_2 (2).

Размер частиц рассчитывается по уравнению Стокса-Эйнштейна, которое связывает их эффективный радиус R_i с коэффициентом трансляционной диффузии и вязкостью жидкости η .

$$D_i = kT / 6\pi\eta R_i, \quad (5)$$

Из уравнений (4) и (5) следует линейная связь между измеренным временем релаксации τ_i и эффективным радиусом частицы R_i

$$\tau_i = \frac{6\pi\eta R_i}{kTq^2} \quad (6)$$

На Рис. 1. представлены характерные экспериментальные временные корреляционные функции для водных растворов кобальта, белка, а также их сочетания. Сравнение двух последних графиков (Рис. 1,б,в) обнаруживает существование в случае раствора белка с металлом частиц в области долгих времен корреляции.

Обобщенные результаты экспериментов, проведенных при различных рН раствора, представлены на Рис. 2. Эти зависимости отражают изменение величины эффективного радиуса частиц белка при изменении поверхностного заряда макромолекулы. В присутствии ионов кобальта в растворе эффективный радиус частиц многократно увеличивается, что свидетельствует об агрегации молекул альбумина в надмолекулярные структуры. Характерный минимум размеров кластеров находится вблизи изоэлектрической точки альбумина (рН~5). Специфика

методики поэтапного изменения кислотности изучаемого раствора выявляет обратимость процесса агрегации молекул белка.

Параметры сорбции парамагнитного иона Co^{2+} на поверхности макромолекулы альбумина определялись в работе методом ЯМР-релаксации. Измеряемая величина скорости спин-решеточной релаксации R_1 может быть представлена в виде следующей суммы:

$$R_1 = (R_1)_0 + p(R_1)_1, \quad (7)$$

где $(R_1)_0$ – скорость спин-решеточной релаксации водного раствора в отсутствие ионов Co , а $(R_1)_1$ характеризует дополнительную релаксацию при наличии ионов кобальта. При этом p характеризует коэффициент сорбции парамагнитного иона на поверхности макромолекулы. Таким образом, из двух измерений можно определить величину $\Delta(R_1)$, по которой рассчитывается коэффициент сорбции:

$$\Delta(R_1) = (R_1)_1 - (R_1)_0 = p(R_1)_1, \quad (8)$$

$$p = c_m \frac{k_a n_{\text{ion}}}{1 + k_a c_{\text{ion}}}. \quad (9)$$

Величина параметра Скэтчарда записывается в виде:

$$r = \frac{p}{c_m} = \frac{k_a n_{\text{ion}}}{1 + k_a [A]}. \quad (10)$$

Экспериментальная кривая зависимости скорости продольной ЯМР релаксации представлена на Рис. 3 как функция концентрации ионов Co в растворе для двух значений концентрации макромолекул альбумина. На

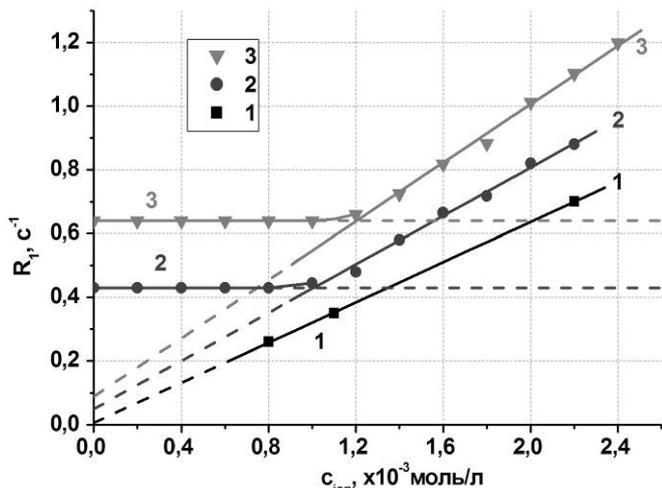


Рис. 3. Зависимости скорости релаксации R_1 парамагнитного иона Co^{2+} от его концентрации c_{ion} в растворе при $\text{pH}=7.0$ для различных концентраций альбумина $c_m=0\%$ (1), 5% (2) и 10% (3).

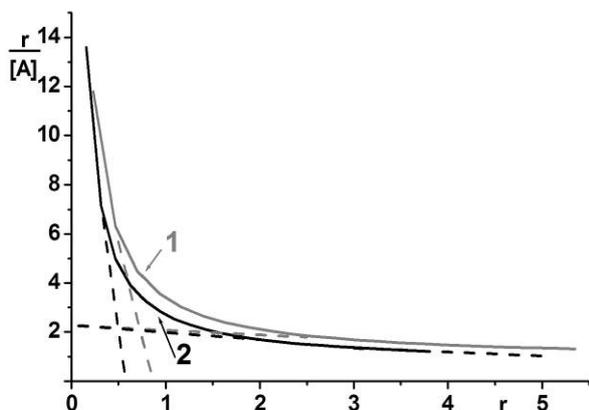


Рис. 4. График сорбции ионов кобальта на альбумине в координатах Скэтчарда. Концентрация макромолекул альбумина $c_m=5\%$ (1) и 10% (2).

обеих зависимостях (Рис. 3; 2, 3) видна начальная область основной сорбции парамагнитного иона кобальта. Рост скорости релаксации при появлении свободного иона в растворе подтверждается сравнением с зависимостью для скорости релаксации иона Co в отсутствие белка (Рис. 3; 1).

Последовательность графических расчетов по уравнениям (7)–(10) приводит к окончательному результату в координатах Скэтчарда, представленному на

Рис. 4. Из этого графика следует, что число центров сильной сорбции иона кобальта на поверхности альбумина составляет менее единицы. При этом основное число центров сорбции иона Со на порядок большей величины обнаруживается в области слабой сорбции. Эти два типа центров имеют различные значения констант адсорбции и, соответственно, различную энергии сорбции.

Выявленные экспериментальные зависимости, характеризующие насыщение процесса сорбции находят подтверждение в результатах независимых работ по исследованиям разбавленных растворов альбумина в присутствии ионов

свинца методом статического рассеяния света [5]. Указанные данные были проверены в нашей работе методом ЭПР-спектроскопии.

В спектрах ЭПР белков с присоединенными иминоксильными радикалами важными параметрами являются интенсивность линий, ее ширина и ее сдвиг по частоте или полю. Первая величина используется для расчета параметров сорбции, а остальные позволяют рассчитать молекулярную подвижность.

Важной характеристикой спектра

ЭПР альбумина со связанным иминоксильным радикалом типа $I_{1,14}$ является наличие двух хорошо разрешенных экстремумов, обусловленных сверхтонким электронно-ядерным взаимодействием. Для медленных движений макромолекул ЭПР спектр белка с адсорбированным иминоксильным радикалом имеет два четко разделенных пика (Рис. 5, а,б). Такой спектр можно интерпретировать, используя параметр $S = \frac{A'_z}{A_z}$, где A_z – постоянная сверхтонкого взаимодействия для раствора белка в воде (полуширина расстояния между высоким и низким пиками спектра альбумина), а A'_z – получена при измерении спектра белка в очень вязкой среде, например, глицерине. При наличии в растворе дополнительно соли свинца, наблюдается значительное уширение спектра ЭПР и изменение величины A'_z (Рис. 6.).

Для вычисления времени корреляции молекулы белка τ_{ep} в интервале времен 10^{-9} – 10^{-8} с по отношению $\frac{A'_z}{A_z}$ используется полуэмпирическое уравнение

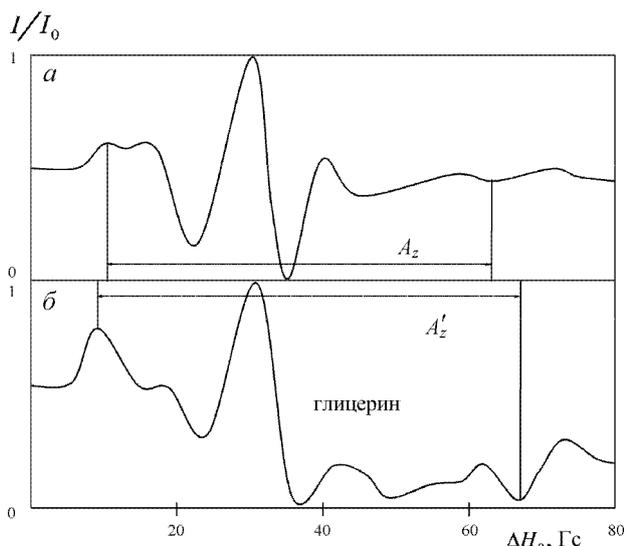


Рис. 5. ЭПР спектр белка: (а) в водном растворе; (б) в глицерине.

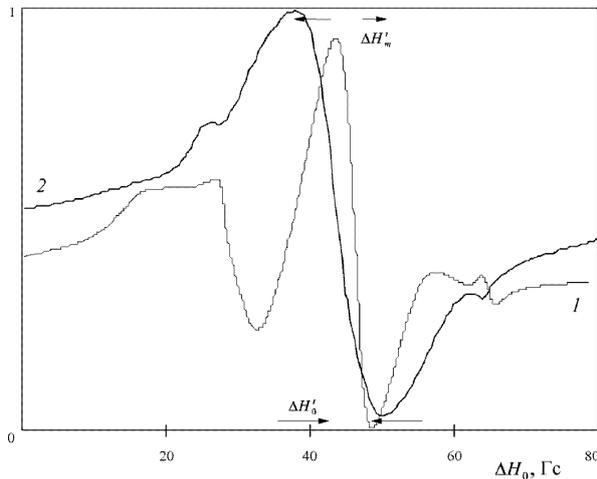


Рис. 6. ЭПР спектр альбумина с иминоксильным радикалом, адсорбированного на альбумине: (1) в чистом водном растворе, (2) в водном растворе с добавлением ацетата свинца

На Рис. 7 представлены кривые зависимости величины $\tau_{вр}$ альбумина в растворах, содержащих соль свинца в малой концентрации ($1,2 \cdot 10^{-3}$ моль/л) от величины рН раствора, характеризующей заряд белка. Видно, что $\tau_{вр}$ увеличивается в два раза при изменении рН от 3,8 до 4,6 и уменьшается обратно при дальнейшем изменении до рН=5,5.

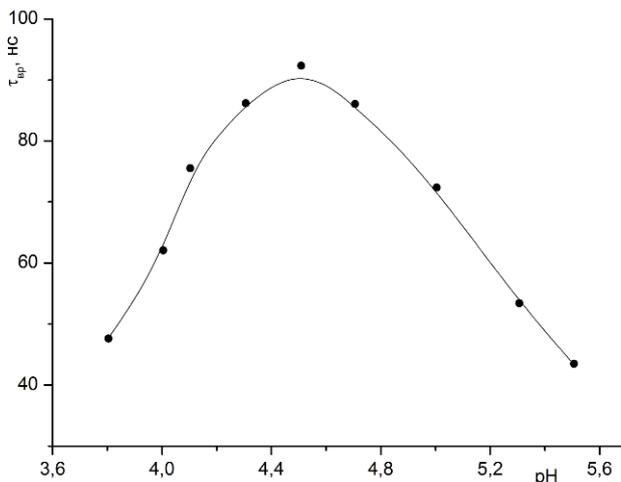


Рис. 7. Зависимость $\tau_{вр}$ от заряда на альбумине (рН) в присутствии соли тяжелого металла (Pb).

Результатом смены типа взаимодействия является агрегация молекул белка, приводящая к образованию белковых кластеров.

Для случая нулевого суммарного поверхностного заряда белка при условии его малой концентрации в растворе можно использовать для расчета массы белка классическую формулу из теории броуновской диффузии в виде:

$$\tau_{вр} = \frac{V\eta}{kT} = \frac{M\beta\eta}{kT} \quad (12)$$

$$\tau_{вр} = a(1-S)^b \quad (11)$$

с константами $a = 8,5 \cdot 10^{-10}$, $b = 1,16$.

В ходе эксперимента приготавливался спин-меченый раствор: взвешенная порция каждой спиновой метки растворялась в этаноле и добавлялась в раствор белка, при этом концентрация этанола составляла менее 1%. В эксперименте были использованы белки фирмы *Serva*. В качестве третьей компоненты раствора использовались ацетат свинца или нитрат свинца.

Наблюдаемый максимум (рН=4,5) соответствует изоэлектрической точке белка. При этом белок имеет минимальный поверхностный заряд, но обладает очень большим дипольным моментом (более 600 Дб). Ионы соли тяжелого металла удерживаются электростатическими силами заряженных групп белка, и кулоновское отталкивание макромолекул изменяется на их сильное диполь-дипольное притяжение.

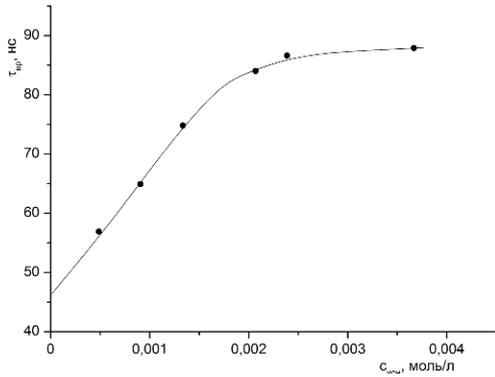


Рис. 8. Зависимость времени вращательной корреляции от концентрации ионов свинца в растворе при pH=4,5.

Независимое исследование этого процесса методами фотонно-корреляционной спектроскопии и статического светорассеяния также показало значительный рост массы рассеивающих частиц – белков при увеличении концентрации соли свинца. Стоит отметить, что метод светорассеяния является прямым методом определения массы рассеивающих частиц, а второй молекулярный параметр, определяемый этим методом, позволяет характеризовать силу и знак электрического взаимодействия между макромолекулами.

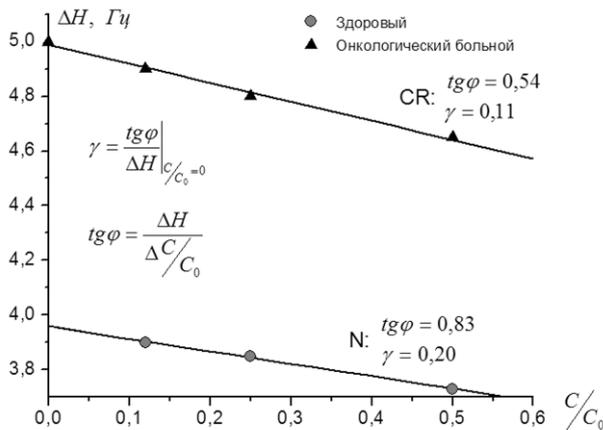


Рис. 9. Зависимость ширины центральной линии спектра ЭПР от относительной концентрации плазмы крови для здоровых пациентов (N) и онкологических больных (CR)

Из этой формулы следует, что увеличение τ_{er} вдвое соответствует также двойному увеличению массы. При этом рост концентрации соли свинца вызывает увеличение τ_{er} , (Рис. 8), что означает пропорциональный рост массы изучаемых объектов, т.е. образование надмолекулярных структур – дипольных белковых кластеров. Следует отметить, что данные на Рис. 7 свидетельствуют об обратимости этого процесса при изменении параметров, влияющих на поверхностный заряд белка.

Поскольку метод ЭПР, подобно методу ЯМР, позволяет определить сорбционные параметры белка, а также его вращательную молекулярную подвижность, были разработаны дополнительные методики для более подробного определения параметров сорбции ЭПР зондов на белках плазмы крови. В частности, ширина центральной линии спектра ЭПР белка заметно отличается в норме и при патологии, поскольку вращательная подвижность белков при онкологии уменьшается за счет

заметного снижения поверхностного заряда белков. Независимым параметром, используемым для диагностики, является величина $\gamma = \frac{tg\varphi}{\Delta H_0}$, которая определяется из графика зависимости ширины центральной линии ЭПР от концентрации плазмы крови (Рис. 9). Из этих графиков видно, что параметр γ почти в два раза отличается для образца плазмы в норме, по сравнению с онкологией.

Пятая глава посвящена постановке проблемы спиновых изомеров воды. Обосновывается квантово-механическая природа их существования и анализируется научная литература, в которой представлены результаты основных исследований в этом направлении. Рассматривается вопрос о природе спин-конверсии, отвечающей за времена стабильного существования изолированных спин-изомеров.

Проблема существования спиновых изомеров воды, связанная со спин-конверсией молекул воды, является многогранной областью исследования. Необходимо отметить, что само существование спиновых изомеров утверждается в рамках квантовой теории только для случаев свободной молекулы, т.е. состояния практически идеального газа. В реальности водяной пар представляет собой совокупность объектов, состоящих, помимо мономеров, из нескольких молекул воды, например, димеров, тримеров, тетрамеров и т.д., среди которых доля свободных молекул может быть небольшой. При взаимодействии молекул воды с поверхностью имеет место явление двумерной конденсации. С позиции квантовой механики изучение ядерно-спиновых состояний отдельных молекул в таких конфигурациях некорректно, поскольку они описываются смешанными волновыми функциями. Таким образом, нельзя утверждать, что получаемые исследователями результаты по селективным свойствам спин-изомеров воды в газовой фазе напрямую свидетельствуют о спиновых состояниях молекулы воды в адсорбированном состоянии, или в жидкой фазе.

Зарегистрированные ранее результаты селективного взаимодействия спиновых изомеров воды относятся к случаям природных адсорбентов, таких как различные угли, цеолиты, корунды и др. Дальнейшие эксперименты в этом направлении проводились с использованием синтетических полимеров, таких как сверхсшитый полистирол МН-200. Спецификой многих представленных исследователями результатов являются экспериментально подобранные оптимальные условия наблюдения свободных молекул воды в газовой фазе, например, так, чтобы доля водных конгломератов в паре была крайне незначительна.

Наиболее критичным параметром во многих экспериментах является характеристическое время спин-конверсии. Получаемые экспериментальные данные об этом процессе на много порядков превышают ожидаемые величины, составляя десятки минут для жидкой фазы. Сформировавшийся в современной физике взгляд на эту проблему основан на том, что в конденсированной фазе время существования конфигурации из двух конкретных молекул воды зависит от времени жизни водородной связи между ними. Необходимо отметить, что само понятие водородной связи с позиции квантовой химии означает не химическую связь, как таковую, а распределение электрического потенциала, приводящего к совместному нахождению двух объектов в определенной взаимной

конфигурации. Исследования последнего десятилетия оперируют временами стабильности таких состояний $\sim 10^{-15}$ с. Тем не менее вопрос о магнитном взаимодействии этих объектов остается открытым и специфика такого направления исследований относится к области спиновой химии.

В ходе данного диссертационного исследования эффект селективного изменения концентраций спиновых изомеров воды в газовой фазе при адсорбции был подтвержден в рамках совместной работы с исследователями Университета г. Турина (Италия) по международному проекту Европейской комиссии «Adventure with Water Spin-Isomers». Результатом анализа полученных данных явилось заключение о том, что эффект селективной адсорбции достоверно выявляется при парциальных давлениях водяного пара менее 50 мТорр, т.е. в области среднего вакуума, когда длина свободного пробега молекул становится соизмеримой с геометрическими размерами сосуда, при т.н. кнудсеновских условиях. Создание таких условий для более высоких давлений является возможным при дросселировании потока смеси водяного пара с инертным газом через слой адсорбента, т.н. метод газовой хроматографии. Здесь следует указать, что чем более развита поверхность адсорбента, т.е. чем больше отношение эффективной поверхности адсорбента к занимаемому им объему, тем больший фактический путь проходит каждая молекула.

В отличие от случая твердотельных адсорбентов, где основную роль в процессах сорбции играет их большая удельная поверхность, взаимодействие газа с жидкостью происходит на площади, соответствующей границе раздела этих фаз, но при этом осложнено процессом диффузии его молекул вглубь образца, т.е. абсорбцией. Примечательно, что исследование селективного взаимодействия спин-изомеров воды с другими жидкостями ранее не проводилось.

Шестая глава посвящена спектральной методике исследования спин-изомеров воды в газовой фазе. Описан и проанализирован процесс регистрации спектров спиновых изомеров воды на аппаратуре с использованием лампы обратной волны. Дано подробное описание использованных спектральных параметров.

Для проведения экспериментальных исследований была выбрана методика субмиллиметровой спектроскопии. Основанием для этого послужил ряд успешных исследований спектров нижних вращательных переходов молекулы воды в газовой фазе (Рис. 10).

При участии автора данной работы был впервые разработан специализированный прибор «АкваСпектр» для анализа *орто-пара* состава водяного пара (Рис. 11) на базе субмиллиметрового спектрометра «Эпсилон», используемого в ИОФ РАН для исследования твердотельных образцов.

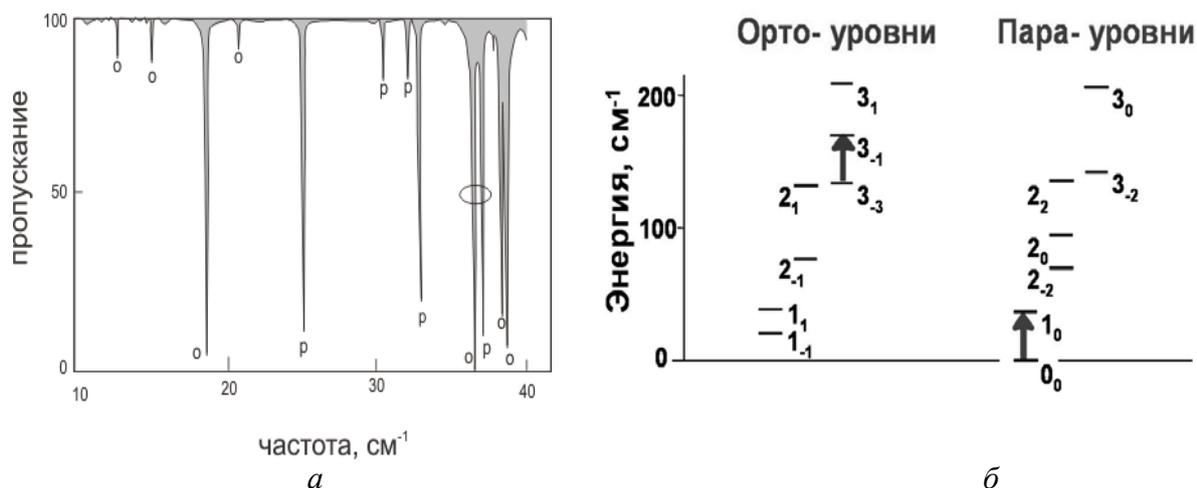


Рис. 10. Спектр пропускания насыщенных паров воды при атмосферном давлении в диапазоне генераций непакетированных ЛОВ (а). Спектр содержит ограниченное число сильных линий поглощения. Индексация линий позволяет определить орто/пара дублет. Ограничение накладывается на расстояние между линиями, которое должно перекрываться диапазоном генерации одной ЛОВ. Выделен дублет, используемый в данной работе. На схеме вращательных уровней обозначены соответствующие переходы (б). Следует обратить внимание, что поглощение в пара состоянии происходит из нулевого вращательного состояния.

С этой целью субмиллиметровый ЛОВ-спектрометр был аппаратно и программно модернизирован для проведения газоаналитических измерений *орто-пара* состава водяного пара на частотах вращательного спектра $36-37\text{ см}^{-1}$ (1 ТГц) (Рис.12). В связи с тем что процессы адсорбции в газовой фазе носят динамический характер, отдельной задачей ставилась возможность регистрации диапазона обеих линий в ходе одного сканирования по частоте с сохранением скорости регистрации. Особое внимание было обращено на воспроизводимость сигнала генерации ЛОВ в рабочем диапазоне при одинаковых рабочих параметрах системы, для которых были достигнуты отклонения не более 1 %.

Совокупность параметров регистрации спектра поглощения: 300 точек на *орто-пара* дублет за время 20 с при разрешении 10^{-4} см^{-1} и амплитудной точности несколько процентов позволяет рассматривать газовую ЛОВ-спектроскопию

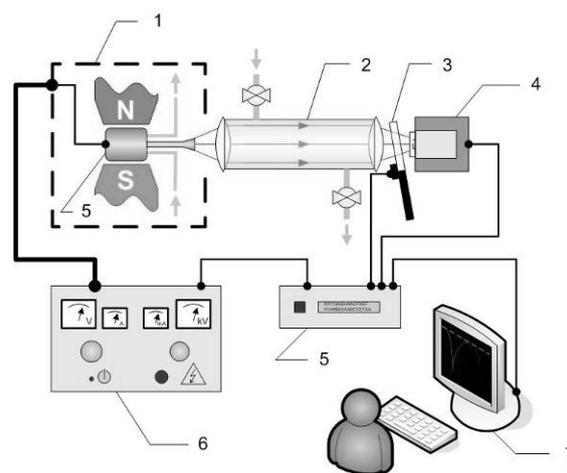


Рис. 11. Схема спектроскопической подсистемы установки «АкваСпектр». 1 – корпус магнита; 2 – измерительная кювета со встроенными линзами; 3 – модулятор излучения (чоппер); 4 – опто-акустический приемник (ОАП) излучения; 5 – цифровой блок управления; 6 – высоковольтный блок питания ЛОВ; 7 – компьютер с программным обеспечением «Epsilon-5» для управления спектрометром.

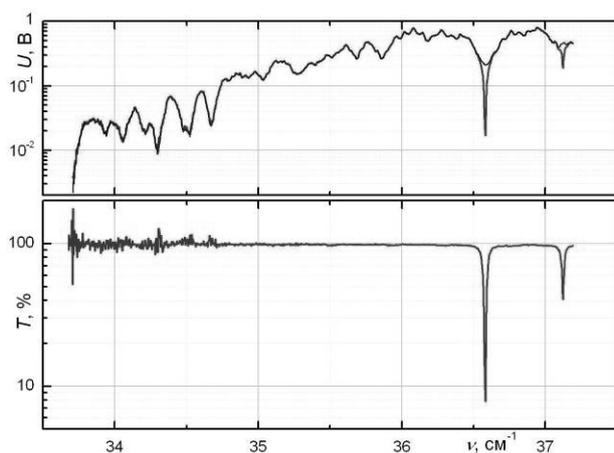


Рис. 12. Типичная зависимость сигнала с приемника $U(\nu)$ для ЛОВ *ОВ-45* в случаях без поглощения и с поглощением в парах воды (а); спектр пропускания $T(\nu)$ отчетливо выделяет две близко расположенные линии паров воды, наличие шума в области низких частот контрастирует с превосходной повторяемостью сигнала в остальном диапазоне и указывает на динамический диапазон спектрометра.

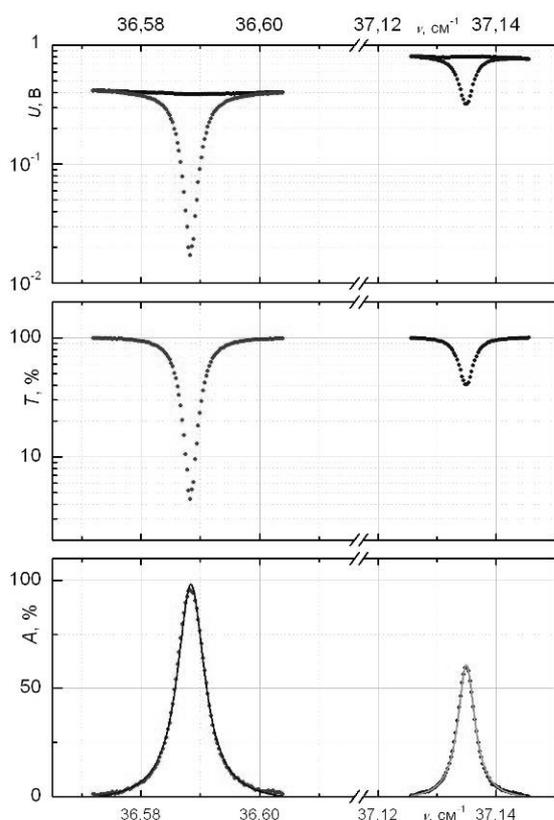


Рис. 13. Последовательная математическая обработка спектральных линий: *а* – исходные данные $U(f)$ – калибровочный сигнал и сигнал паров воды; *б* – полученный спектр пропускания $T(\nu)$; *в* – спектр поглощения $A(\nu)$, аппроксимированный лоренцевыми контурами.

как метод субмиллиметровой спектроскопии сверхвысокого разрешения, не имеющий аналогов на момент создания (2005 г.).

Для проведения математической обработки спектральных данных (Рис. 13) используется калибровочный спектр, регистрируемый перед каждым экспериментом для случая отсутствия паров воды в кювете, например при вакуумной откачке или для осушенного инертного газа. Последовательные преобразования позволяют трансформировать спектр пропускания в спектр поглощения. Полученные спектральные линии аппроксимируются по методу наименьших квадратов лоренцевскими контурами, параметры которых – амплитуда, полуширина, интегральная площадь – затем используются в качестве зарегистрированных данных. Также регистрируется погрешность аппроксимации контура, обычно составляющая менее 1%.

Характеристическими данными, используемыми для дальнейшего анализа результатов являются:

1. *Интегральное поглощение* – концентрация молекул;
2. *Ширина линии* – давление в кювете, включая буферный газ (необходимо отметить, что из-за большой интенсивности используемых

линий поглощения воды методика применяется для ограниченного диапазона давлений, где основной вклад в формирование ширины линии вносится столкновениями молекул);

3. *Амплитуда линии* – позволяет рассчитать парциальное давление паров воды в смеси газов по имеющимся калибровочным данным для чистых паров воды;
4. *Отношение интегральных поглощений двух линий* – орто/пара отношение изомеров паров воды.

Описанная в работе вакуумная система была спроектирована с учетом данных по эффективной сорбции воды на поверхности стандартных вакуумных материалов. Использование в конструкции стеклянных вакуумных компонентов с применением тефлона, таких как краны, вакуумные разъемы, шлифовые соединения, практически исключает присутствие органических смазочных материалов. Объем, непосредственно примыкающий к измерительной кювете, может быть герметично отключен от остальной части системы с возможностью поддержания достигнутых разрежений в течение нескольких дней.

Седьмая глава диссертации посвящена спектральным исследованиям взаимодействия спин-изомеров водяного пара с глицерином.

Сверхчистый глицерин имеет высокую вязкость при комнатной температуре, которая обуславливает низкую скорость диффузии молекул водяного пара вглубь жидкости при сорбции. Для разделения процессов адсорбции и абсорбции были проведены эксперименты с микропленочными и объемными образцами глицерин-водной смеси.

Обе специально сконструированные для этой цели кюветы имели площадь контакта газовой среды и адсорбента 50 см^2 и объем для водяного пара 500 см^3 . Толщина слоя исследуемой смеси составляла 40 мкм и 15 мм, соответственно. В обоих случаях объем с образцом был герметично соединен с измерительной кюветой. Термостатирование проводилось с точностью 0,5 К.

В случае микропленочных образцов сверхчистого глицерина измерялась зависимость парциальных давлений p_O и p_P молекул водяного пара от полного давления в кювете P (Рис. 14), т.е. от количеств N_O и N_P орто и пара молекул водяного пара в смеси с газом, напущенных в кювету. В соответствии со стандартной процедурой регистрации изотерм адсорбции, каждая точка соответствует индивидуальному измерению в изолированной кювете после подачи порции газовой смеси и приведения ее к равновесию с образцом в течение нескольких минут.

На Рис. 14,*a* приведены зависимости $p_O(P)$ и $p_P(P)$ для калибровочного измерения в пустой кювете (1), а также в присутствии микропленочного образца (2,3). Для наглядности эффекта данные приведены к одному масштабу путем

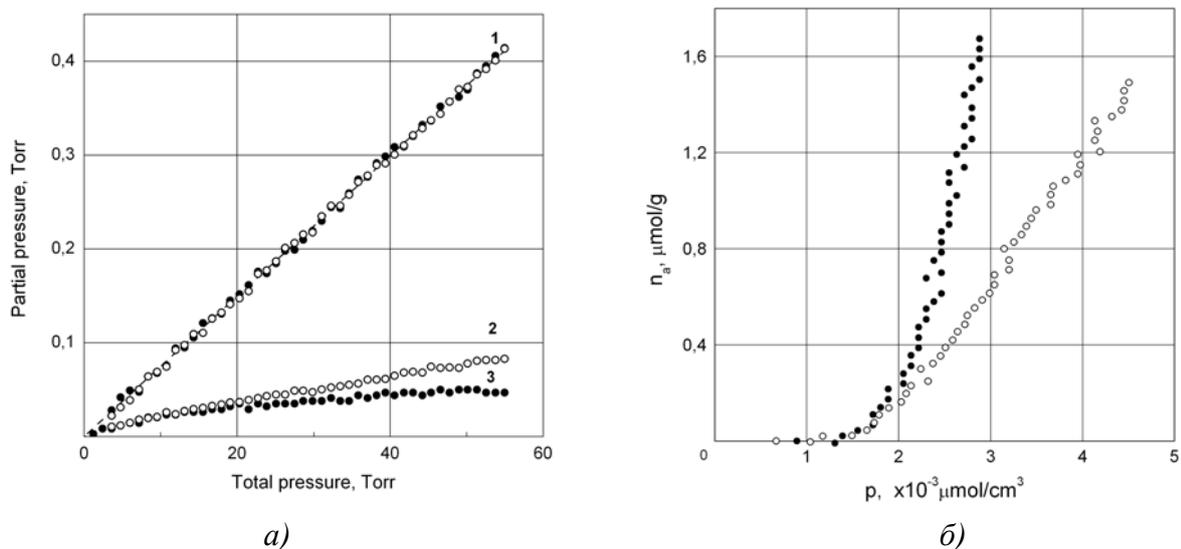


Рис. 14. Эксперимент с глицериновой пленкой (*орто* (\circ) и *пара* (\bullet) изомер; данные для *пара* воды умножены на 3 для наглядности):
 а) зависимости парциального давления спин-изомеров;
 б) изотермы адсорбции спин-изомеров воды.

нормировки калибровочных зависимостей. Разница между калибровочной зависимостью 1 и зависимостями 2 и 3 характеризует отсутствие в газе большей части напущенных в кювету молекул воды, т.е. их адсорбцию в глицериновой пленке. При этом, зависимости 2 и 3 выявляют почти полуторакратную разницу давлений насыщенных паров орто и пара молекул.

На Рис. 14,б экспериментальные данные представлены в координатах изотерм адсорбции. Наглядное отклонение от нормального О/П отношения 3:1 в газе в пользу орто молекул повторяет результаты аналогичных исследований для случаев твердотельных адсорбентов, соответствующих предположению, что отклонение орто/пара отношения в газе вызвано накоплением пара молекул на поверхности адсорбента.

В эксперименте с объемным образцом использовался 10% раствор воды в глицерине (Рис.15,а). В течение девяти дней образец проходил ежедневный цикл вакуумной откачки с разрежением до 10^{-3} Торр и дальнейшей релаксацией к термодинамическому равновесию между газом и жидкостью, т.е. находился в состоянии либо десорбции, либо сорбционного равновесия. Результатом процедуры стало обеднение образца до содержания 0,5% воды.

В течение последующих четырех недель ежедневный цикл был заменен на двухминутную откачку, необходимую для записи опорного спектра. Таким образом, образец постоянно находился в состоянии сорбционного равновесия.

Отображенное на Рис. 15,*а* долговременное изменение концентраций орто и пара молекул в газовом объеме показывает ярко выраженный спад общего количества регистрируемых молекул воды. Стоит отметить, что концентрация пара молекул по ходу эксперимента превышает концентрацию орто молекул, т.е. свидетельствует о пара-обогащении газовой среды, что отражает зависимость на Рис. 15,*б*. Обращает на себя внимание процесс восстановления орто/пара отношения к нормальному значению с временем релаксации порядка 14 дней.

После нескольких циклов откачки орто/пара отношение значительно ниже нормального, что в сочетании с явлением повышенной десорбируемости орто молекул указывает на снижение доли орто молекул в глицерине, т.е. на пара-обогащение образца. Это приводит к предположению о долгом времени спин-конверсии молекул воды в глицерине в форме разбавленного раствора, не смотря на процесс протонного обмена между молекулами воды и глицерина с характерным временем 10^{-3} с.

Проведенные исследования показывают, что основой проявления различия свойств спин-изомеров воды является их присутствие в многофазных системах, где орто/пара отношение отличается от нормального значения по разные стороны границы раздела этих фаз, поскольку для случая однофазной системы наблюдается нормальное орто/пара отношение.

В **Заключении** диссертации сформулированы основные результаты работы.

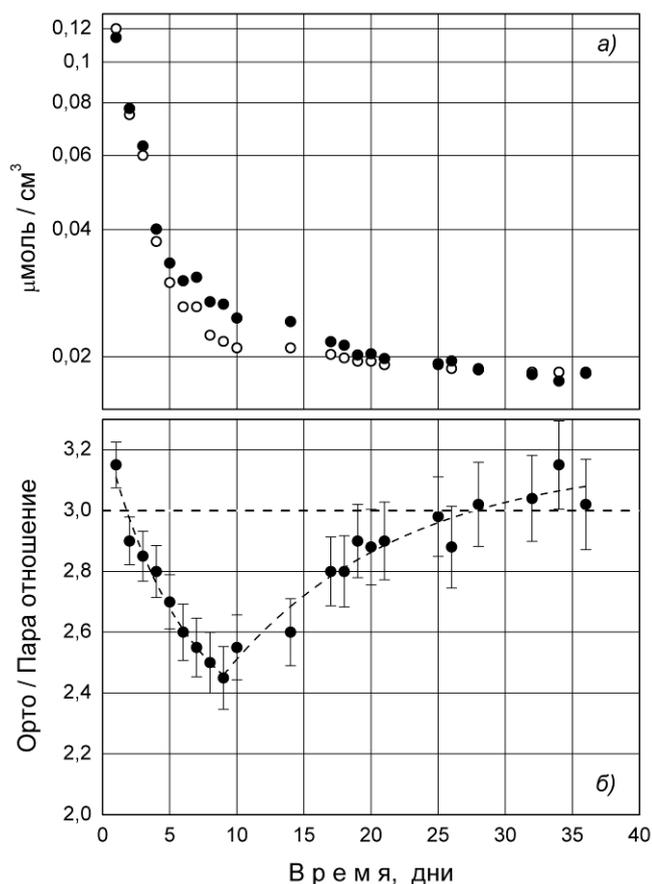


Рис. 15. Временная зависимость *а*) концентраций орто (○) и пара (●) изомеров в парах воды над поверхностью глицерина и *б*) О/П-отношения. Данные для пара воды умножены на 3 для наглядности. Пунктирная линия соответствует равновесному О/П-отношению 3:1.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

1. По данным фотонно-корреляционной спектроскопии выявлен процесс агрегации молекул альбумина, сопровождающий процесс сорбции ионов кобальта на белке.
2. По данным радиоспектроскопии обнаружен эффект насыщения процесса сорбции ионов кобальта и свинца на поверхности альбумина в разбавленных растворах при их малых концентрациях.
3. На основе данных ЭПР спектроскопии разработана методика определения молекулярных параметров процесса сорбции парамагнитных ионов свинца на поверхности макромолекулы белка с возможностью применения для медицинской диагностики онкологических заболеваний.
4. Разработан специализированный прибор «АкваСпектр» для анализа *орто-пара* состава водяного пара на частотах вращательного спектра $36\text{-}37\text{ см}^{-1}$ (1 ТГц), основанный на методе субмиллиметровой ЛОВ-спектроскопии сверхвысокого разрешения, с параметрами регистрации спектра поглощения 300 точек на *орто-пара* дублет за время 20 с при разрешении 10^{-4} см^{-1} и амплитудной точностью несколько процентов.
5. По данным субмиллиметровой спектроскопии выявлено существование селективного взаимодействия спин-изомеров молекул воды с жидким протонным растворителем (глицерином) в микропленочных и объемных образцах при малых концентрациях воды.
6. Впервые получены изотермы адсорбции воды в глицерине отдельно для орто и пара изомеров. При низких парциальных давлениях ($< 100\text{ мТорр}$) в условиях равновесия зарегистрировано полуторакратная разница давлений насыщенного пара для орто и пара молекул (в пользу первых), что интерпретировано как эффект предпочтительной адсорбции молекул пара изомера.
7. По данным субмиллиметровой спектроскопии определена скорость процесса спин-конверсии в разбавленном растворе воды в глицерине. Характеристическое время данного процесса более 10 дней, указывает на неявную связь спиновой *орто-пара* конверсии с процессом протонного обмена, через который она реализуется.

Список публикаций по теме диссертации

Основные результаты диссертационного исследования отражены в следующих публикациях:

Статьи

1. Петрусевич Ю.М., Петрова Г.П., Макуренок А.М., Бойко А.В. Исследование сорбции ионов кобальта в водных растворах сывороточного альбумина методами ЯМР и светорассеяния. Вестник МГУ. Серия 3. Физика. Астрономия. №1, 2006.

2. V.I. Tikhonov, A.M. Makurenkov, V.G. Artemov, O.E. Porodinkov, A.A. Volkov Sorption experiments on water spin-isomers in glycerol. *Physics of Wave Phenomena*, №2 (15), 2007, 106-110.
3. А.М. Макуренков, В.Г. Артемов, П.О. Капралов, В.И. Тихонов, А.А. Волков. ЛОВ-спектроскопия спин-модифицированной воды при десорбции из глицерина. «Известия ВУЗов. Радиофизика», т. L, №10-11, 2007, 918-923.
4. П.О. Капралов, В.Г. Артёмов, А.М. Макуренков, В.И. Тихонов, А.А. Волков Двуходно-лазерный спектрометр для измерения орто/пара-состава водяного пара. *Приборы и техника эксперимента*, №6, 2008. Сс. 123-126.
5. Капралов П.О., Артемов В.Г., Макуренков А.М., Тихонов В.К., Волков А.А. Нарушение нормального орто/пара-отношения (3:1) воды в паровой фазе при динамической сорбции. *Журнал физической химии*, том 83, № 4, 2009. Сс. 769-775.
6. Ю.М. Петрусевич, Г.П. Петрова, Е.Е. Берловская, А.М. Макуренков, И.А. Сергеева, К.В. Федорова. Диагностика онкологических заболеваний методами ЯМР, ЭПР и светорассеяния. *Медицинская физика*, № 4(44), 2009, 73-79.

Тезисы

7. Тихонов В.И., Волков А.А., Макуренков А.М., Полторац С.Г., Буздин В.В. Субмиллиметровая спектроскопия водяного пара. Конференция «Волновые явления в неоднородных средах». Тезисы IX всероссийской школы-семинара «Волновые явления в неоднородных средах». М., 24-29 мая 2004.
8. Y.M. Petrusevich, G.P. Petrova, A.M. Makurenkov, A.V. Boiko. NMR and light scattering in investigation of protein cluster formation. Тезисы международной конференции «ЯМР в гетерогенных структурах». СПб., 12-16 июля 2004.
9. V.K. Konyukhov, V.I. Tikhonov, A.A. Volkov, A.M. Makurenkov. NMR in gaz and condensed matter containing non-equilibrium ortho- and para-water. Тезисы 1-ой международной конференции «ЯМР в гетерогенных структурах». СПб., 12-16 июля 2004.
10. Ю.М. Петрусевич, Г.П. Петрова, А.М. Макуренков, А.В. Бойко Особенности сорбции ионов кобальта на альбумине плазмы крови. Тезисы II Евразийского конгресса по медицинской физике и инженерии «Медицинская физика – 2005». М., 21-24 июня 2005.
11. VS. Parbusin, E.B. Ivanov, A.M. Makurenkov, V.I. Tikhonov, A.A. Volkov Separation of Nuclear Spin Isomers of Polyatomic Molecules: New Challenge to the Separation Community. Proceedings of the XXth International Symposium on Physico-Chemical Methods of the Mixtures Separation «Ars Separatoria Acta 2005». Польша, Скларска Пороба, 20-23 июня 2005.
12. А.М. Макуренков, В.И. Тихонов, А.А. Волков, В.В. Буздин Субмиллиметровая спектроскопия паров воды при взаимодействии со стандартными адсорбентами. Тезисы XXIII Съезда по спектроскопии. Звенигород, 17-21 октября 2005.
13. А.М. Makurenkov, V.I. Tikhonov, A.A. Volkov BWO-spectroscopy of Ortho and Para Water. Proceedings of the Joint 31st International Conference on Infrared and Millimeter Waves and 14th International Conference on Terahertz Electronics IRMMV-THz 2006. Shanghai, September 18-22, 2006.
14. А.М. Makurenkov, P.O. Kapralov, V.G. Artemov, V.I. Tikhonov and A.A. Volkov. Water Nuclear Spin-isomers: Their Distinction Reveals in Glycerol. Тезисы международной конференции «ЯМР в науках о живом». СПб., 9- 13 июля 2007.

15. Artemov V.G., Kapralov P.O., Makurenkov A.M., Tikhonov V.I., Volkov A.A. TDL-Spectroscopy of the Water Spin-isomers in Presence of Liquid Adsorbents. Proceedings of the 50th Scientific MIPT Conference. Moscow, November 22-30, 2007.
16. Капралов П.О., Макуренков А.М., Артемов В.Г., Тихонов В.И., Волков А.А. ДЛ-спектрометр для диагностики орто/пара состава водяного пара. Девятый общероссийский семинар по диодной лазерной спектроскопии (ДЛС-9) им. А.М. Прохорова, Москва, 12 марта 2008.
17. П.О. Капралов, В.Г. Артёмов, А.М. Макуренков, В. И. Тихонов, А. А. Волков Диодно-лазерная спектроскопия спиновых изомеров водяного пара. Сборник научных трудов VII Международной научной конференции «Лазерная физика и оптические технологии». Том I, Сс. 144-147. Минск, 17-19 июня 2008.
18. В.С Парбузин, Е.Б. Иванов, В.П.Быстров, А.М. Макуренков 80 лет истории орто-, пара-Н₂ и орто-, пара-Н₂О. Фундаментальная роль адсорбции. XIII Всероссийский симпозиум с участием иностранных ученых «Актуальные проблемы теории адсорбции, пористости и адсорбционной селективности» (Приоритетная проблема – наноматериалы и нанотехнологии), Москва-Клязьма, 20-24 апреля 2009 г.
19. Makurenkov A.M. IR spectroscopy of water vapour nuclear spin-isomers: another key to the structures in liquid water. 13th European Symposium on Gas Electron Diffraction. Германия, Блауборейн, 24-28 июня 2009 г.
20. Ю.М. Петрусевич, Г.П. Петрова, А.М. Макуренков Радиоспектроскопические и оптические методы диагностики онкологических заболеваний. Тезисы III Евразийского конгресса по медицинской физике «Медицинская физика – 2010». М., 21-26 июня 2010.
21. Y.M. Petrusевич, G.P. Petrova, A.M. Makurenkov, H.E. Berlovskaya, Z. Xiaolei Formation of Protein and Enzyme Clusters in Solutions Induced by Small Concentrations of Heavy Metals Ions. Тезисы 7-ой международной конференции «ЯМР в гетерогенных структурах». СПб., 28 июня-2 июля 2010.
22. Макуренков А.М., Петрова Г.П., Берловская Е.Е., Федорова К.В., Папиш Е.А. Возможности оптических и радиоспектроскопических методов для диагностики онкологических заболеваний (*Памяти профессора Ю.М. Петрусевича*). Ломоносовские чтения к 300-летию М.В. Ломоносова, М., 14-18 ноября 2011.

Литература

1. Петрусевич Ю.М. Физика и биофизика рака.// Сб. «Медицинская физика», Изд. МГУ, 2002, Сс. 68-179.
2. Volkov A., Tikhonov V. Science, 2002. 293. P. 2363.
3. Grechko M., Maksyutenko P., Rizzo T., et al. J. Chem. Phys. 2010, 133.
4. Kravchuk T., Reznikov M., Avidor N. et al. Science, 2011. 331, P. 319-21.
5. Petrova G.P. Physical Mechanisms of “Poisoning” the Living Organisms with Heavy Metals. // In: Environmental Monitoring, Rijeka, 2011, P. 23-33.

Подписано в печать 15.05.2012 г. Формат 60x84/16
 Бум. офсетная. Гарнитура «Таймс».
 Усл. печ л. 1,4. Тираж 100 экз. Заказ № 9/2012

Отпечатано на ризографе в ОНТИ ГЕОХИ РАН
 Москва, 119991, ул. Косыгина, 19