

# 脈衝式電子自旋共振光譜儀 的設計、原理及在生物系統 上的應用

電子自旋共振對金屬酵素穩定態轉換的結構分析有很卓越的貢獻，也是不可或缺的工具之一。傅立業轉換電子自旋共振突破穩定態轉換量測的局限，可直接測量催化過程中不穩定間接物的結構及反應機制，而電子自旋回音波套調變的技術則可量測金屬蛋白內微弱的電子與原子核交互作用，皆為生物化學及醫學的研究領域開創了新的紀元。脈衝式電子自旋共振的儀器設計、理論及實驗方法均已趨成熟，並在世界各地的實驗室普及開來，值得推薦瞭解。

柯學初、陳長謙

## 一、前言

連續性電子自旋共振光譜儀 (continuous wave electron spin resonance, CW-ESR) 是在 1945 年由蘇俄的物理學家 Zavoisky 所發明<sup>(1)</sup>。ESR 之所以能成為一強有力的研究工具，不只因為它的應用範圍非常廣泛，更因從其實驗技術及理論分析所能得到的訊息 (譬如：金屬蛋白中金屬的氧化態、周圍鍵結的配位體、電子與原子核間距、及電子雲的分布

等) 非常的深入且仔細。ESR 主要的應用領域包括：半導體及雷射材料物理、生物金屬蛋白的催化反應與自由基的連鎖反應，以及輻射傷害等。脈衝式 ESR 則是由美國貝爾實驗室 (Bell Lab) 的研究員 W. B. Mims<sup>(2,3)</sup> 於 1971 年發展出的，但由於其構造複雜且建造經費昂貴 (約 20 萬美元)，在 1985 年前全世界約只有 25 台。1990 年德國的 Bruker 公司推出第一台商業化的脈衝式 ESR 儀器。現今，隨著微波零件的多元化及更新、快速數位字元編輯器 (digital word programmer) 的出現，以及電腦化控制的普及等，實驗室自行建造的多功能脈衝式 ESR 光譜儀才逐漸地普及開來，同時被廣泛地應用在生物系統的研究上<sup>(4-10)</sup>。

脈衝式 ESR 光譜儀主要包含 電子自旋回音

柯學初先生為美國阿拉巴馬大學伯明罕分校物理博士，現任國立東華大學物理系助理教授。

陳長謙先生為美國加州大學柏克萊分校化學博士，現任中央研究院副院長暨化學研究所特聘研究員。

ESR (electron spin echo ESR, ESE-ESR)、電子自旋回音波套調變 (electron spin echo envelope modulation, ESEEM)、傅立葉轉換 ESR (Fourier transform ESR, FT-ESR), 及 瞬時 ESR (transient ESR) 四項功能。其中 ESE-ESR 的技術是利用 ESE 來做傳統的 ESR 測量。當傳統的 ESR 只能測量順磁電子 (paramagnetic electron) 與其附近原子核間較強的交互作用時, 脈衝式 ESR 的 ESEEM 技術卻可用來測量順磁電子與其附近原子核間的微弱交互作用, 或甚至測量一些與遠距離原子核的交互作用。如此, 順磁電子周圍的環境、配位體或甚至分子的結構便能被更精確地推測出。同時, ESEEM 也可用來測量自旋與晶格及自旋與自旋間的鬆弛時間 ( $T_1$ 、 $T_2$  relaxation times)。FT-ESR 的技術則可用來測量隨時間變化的精細、超精細交互作用 (hyperfine interaction), 及原子核電四極交互作用

(nuclear quadrupole interaction)。分析此系列隨時間改變的交互作用及相對應之瞬間 ESR 譜線, 即可描繪出生物金屬蛋白催化過程的化學反應機制, 或是自由基在酵素裡引起的連鎖反應 (free radical chain reaction)。脈衝式 ESR 的時間解析度可達 20 ns。

在這篇專題論文, 筆者希望能簡潔地把一般實驗室自製之脈衝式 ESR 的設計及理論介紹給讀者, 同時, 舉維生素 B<sub>12</sub> 輔酵素相依酵素的催化系統為例來描述 ESEEM 的應用。

## 二、脈衝式 ESR 的設計及建造原則

脈衝式 ESR 的設計及建造原則須注重軟體與硬體的配合及彈性 (flexibility), 使其能適用於各種不同的應用。同時也必須確保系統未來擴展的簡易

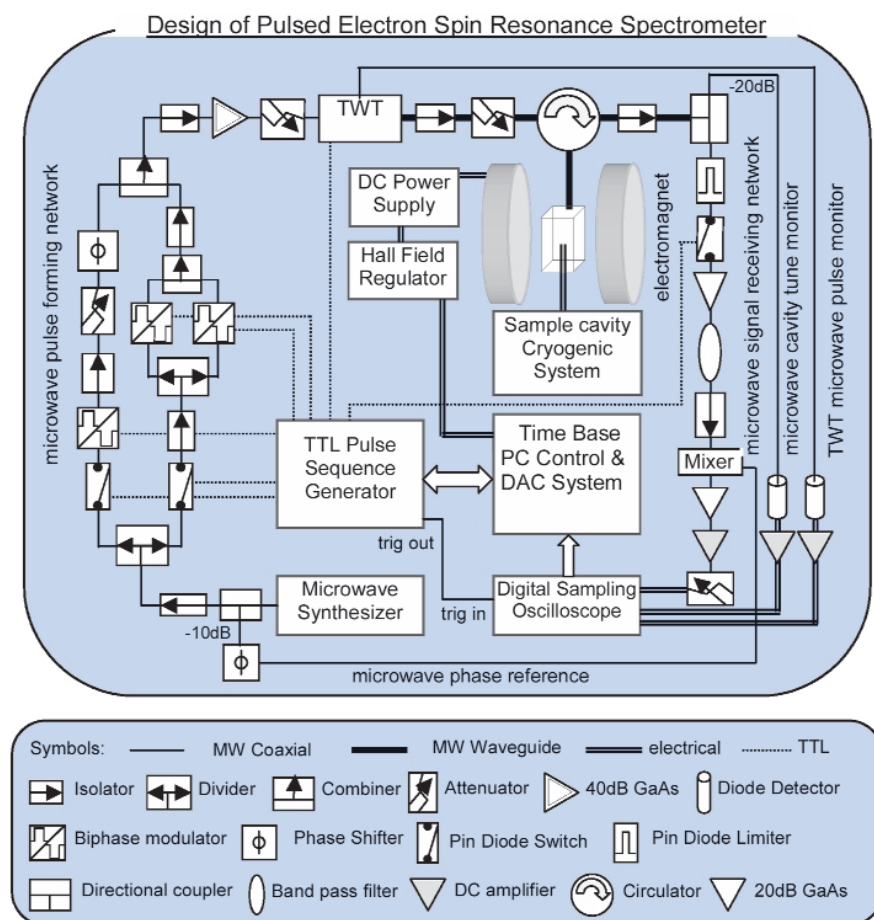


圖 1. 脈衝式 ESR 光譜儀的設計藍圖。

度，以配合此研究領域的迅速發展及更新。圖 1 是被廣泛接受之脈衝式 ESR 光譜儀的設計藍圖<sup>(11,12)</sup>。其硬體部分主要包含了四個子系統：脈衝微波形成網路 (microwave pulse forming network, MPFN)、微波訊號收集網路 (microwave signal receiving network, MSRN)、數位字元編輯、電腦控制及分析系統、電磁鐵、電源供應器、磁場掃描系統、微波共振腔 (microwave cavity or resonator) 及樣品溫控系統。參考圖 1 的流程，以下筆者對此四子系統做一簡介。

### 1. 脈衝微波形成網路 (MPFN)

因需要連續掃描不同的微波頻率以找出適合共振腔的共振頻率，所以經常使用的微波產生源為 HP 的微波合成器 (microwave synthesizer)，其微波的輸出功率約幾毫瓦 (milliwatts)，可掃描範圍為 0.01 到 20 GHz。依循圖 1 的微波行經路徑：微波經一  $-10$  dB 的定向耦合器 (directional coupler)，將  $-10$  dB 的微波作為相位的參考 (microwave phase reference)，其餘的微波經過一逆流阻絕器 (isolator) 後，進入 MPFN。逆流阻絕器的目的是阻止反射回來的微波或其他高能量的微波雜訊損壞在逆流阻絕器之前的零件。逆流阻絕器在此設計藍圖中被重複地使用，以減少零件的損壞。MPFN 分成了二支線，左支線執行 ESE-ESR 及 ESEEM 的實驗，右支線執行 FT-ESR 的實驗。沿著右支線，連續性的微波經過一導線二極體開關 (PIN diode switch)，而形成脈衝式的微波。導線二極體開關的起落時間 (rise and fall times) 可以短至 4 ns，也就是說最短的微波脈衝寬度可為 10 ns。接下來，脈衝經過一阻絕器至一微波分配器 (divider)，而分成二路傳送至一組平行的雙相位調變器 (biphase modulator)。此組雙相位調變器的功能是產生  $0^\circ$ 、 $90^\circ$ 、 $180^\circ$  及  $270^\circ$  不同相位的脈衝，以執行 cyclops 實驗的相位循環序列，來修正「訊號收集網路」內正交混波器 (quadrature mixer) 二個頻道的相位及振幅之不平衡輸入。經相位調變後的微波由微波合成器 (combiner) 結合傳送至阻絕器。沿著 MPFN 的左側支線，微波依序經過了導線二極體開關及雙相位調變器，以產生相差  $90^\circ$  的脈衝微波。利用相

位循環的技術<sup>(13,14)</sup> (phase cycling) 可清除 3-pulse ESEEM 實驗中產生的 2-pulse 電子自旋回音。阻絕器及衰減器 (attenuator) 以調整微波的振幅。相位移位器 (phase shifter) 以調整此脈衝微波與參考用微波之間的相位關係，此二微波在「訊號收集網路」內的混波器 (mixer) 結合。MPFN 左右二支線脈衝微波經混合耦合器結合，通過阻絕器，被導引至 20 dB 砷化鎵場效電晶體 (GaAs FET) 放大器及可調式衰減器 (variable attenuator) 後，輸入至一 1 kW 的行波管 (traveling wave tube) 放大器。此脈衝式的行波管可將輸入訊號放大 60 dB，也就是說可將 10 mW 脈衝微波放大至 1 kW 的微波脈衝輸出。在行波管之前的微波均以同軸電纜 (coaxial cable) 傳遞，而為有效的傳遞高能量的微波脈衝在行波管之後則使用  $1.2 \times 2.4$  cm 的矩型波導管 (rectangular waveguide)。此設計有一大優勢：HP 微波產生源的帶寬為 0 至 18 GHz，MPFN 及 MSRN 內亦可使用寬頻的微波零件 (如 8 至 18 GHz)，整個系統則為一寬頻的脈衝式 ESR 光譜儀，若欲在不同的頻率下操作實驗，則只需更換系統的矩型波導管部分。商業化的脈衝式 ESR 儀器為單頻操作，無此優勢。

隨順磁電子的電子組態及其周圍化學結構的不同，其自旋與晶格及自旋與自旋間的鬆弛時間也不同，故對微波強度的需求也不同。所以在行波管之後加上風葉旋轉式衰減器 (rotary vane attenuator)，以精準地改變輻射在樣品上的微波強度。若順磁電子對微波的吸收未超過飽合，其 ESR 訊號強度隨入射微波能量的平方根成正比。經過三向循環器 (3-port circulator)，微波被導引進入共振腔 (resonant cavity)。循環器是一種亞鐵鹽 (ferrite) 的裝置，其中鄰近二向的能量輸入損失 (insertion loss) 小於 1 dB，而在另一方向則大於 20 dB，如此能使入射進共振腔及反射出的微波依循一定的路徑傳遞。

### 2. 微波訊號收集網路 (MSRN)

訊號收集網路依序包含了定向耦合器，將共振腔反射回來訊號的  $-20$  dB 傳送至二極體檢測器 (detector diode)，並經由 DC 放大器傳送至數位取樣示波器 (digital sampling oscilloscope)，以顯示共

振腔的共振頻率及模式，其餘的訊號則經過導線二極體限制器 (PIN diode limiter) 過濾能量過高的反射訊號，以保護整個 MSRN 的零件，過濾後的訊號傳送至一導線二極體開關，此開關只有當電子自旋回音的訊號進來時才打開以利通行，至於開放時間的長短則取決於不同的實驗，電子自旋回音的訊號經 20 dB 的砷化鎵場效晶體放大，訊號經帶通濾波器 (band pass filter) 除去高頻率的雜訊，經過一阻絕器後，訊號傳至混波器 (mixer) 以偵測其訊號。偵測 FT-ESR 訊號使用的是正交混波器 (quadrature mixer)，偵測 ESE 訊號則使用雙平衡混波器 (double balanced mixer)。

混波器 (mixer) 的訊號經一 500 MHz 的影像放大器 (video amplifier) 放大後，輸入至一快速的數位取樣示波器 (digital sampling oscilloscope, DSO)，以進行訊號顯示及處理。示波器的帶寬約為 500 MHz，取樣率 (sampling rate) 約每秒 2.5 giga 樣本，並且須具有快速加乘器，以做訊號的平均及複數傅立葉轉換的功能，將自由感應衰減 (free induction decay, FID) 的訊號轉成 FT-ESR 的訊號。對 ESE-ESR 及 ESEEM 的實驗而言，DSO 須具有波型積分的功能，以將在不同的微波延遲間距所測得的電子自旋回音波型 (spin echo waveform) 數字化。同時，行波管的微波脈衝及共振腔的共振頻率及模式經過二極體檢測器的解讀之後，也是直接的顯示在 DSO 的螢幕上，以監控系統的操作。

### 3. 數位字元的編輯 (Digital Word Programmer) 及電腦控制

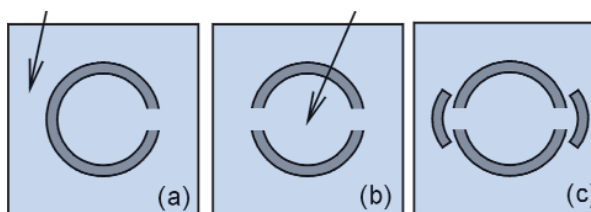


圖 2. 脈衝式 ESR 經常使用的共振腔依序為 (a) split ring resonators ; (b) loop-gap resonator 及 (c) bridged-loop-gap resonator。改變缺口的寬度即可改變共振頻率。

整個系統脈衝序列的形成，包括脈衝的持續時間 (pulse duration) 及脈衝間的延遲時間 (delay time)，均由此數位字元編輯器控制。由圖 1，編輯器控制 MPFN 內的兩個導線二極體開關、三個雙相位調變器、訊號收集網路內的導線二極體開關、行波管放大器及數位取樣示波器。透過 GPIB 或 RS-232，電腦可直接操控編輯器、數位取樣示波器、系統的操作，以及數據的收集與處理。程式的撰寫除須講求容易操作外，更應注重程式的擴展空間，以配合未來硬體部分的更新。

### 4. 電磁鐵、微波共振腔、及樣品溫控系統

所需之外加電磁鐵及控溫系統與傳統 CW-ESR 要求相同。通常脈衝式 ESR 使用的共振腔 (resonator) 需具有較高的填塞因子 (filling factor) 及可調式的共振腔共振頻率<sup>(15,16)</sup> (如圖 2)，但亦可使

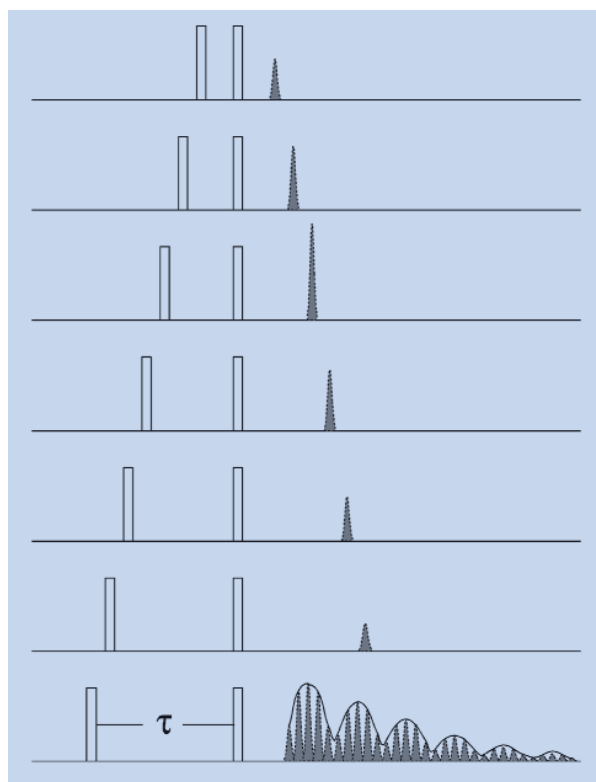


圖 3. 電子自旋回音的波套調節 (envelope modulation) 是一回音振幅隨著兩個脈衝的時間間距 ( $\tau$ ) 變化的函數。

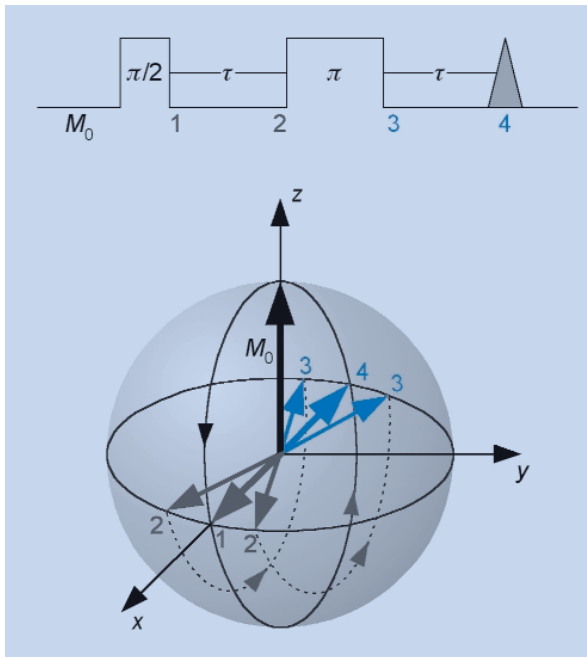


圖 4. 2-pulse 電子自旋回音的形成示意圖。

用改良過的 CW-ESR TE 共振腔。共振腔的 Q 值約需在 50 左右，以降低共振腔的沉寂時間 (resonator dead time)。最好能將沉寂時間降低至 50 ns 以下。

### 三、電子自旋回音波套調節 (ESEEM) 的原理及分析

脈衝式 ESR 中的 ESE-ESR 及 FT-ESR 的理論與傳統 CW-ESR 類似，以下我們從古典理論及量子理論的角度來解釋 2-pulse ESEEM (圖 3) 的形成與原理<sup>(2,4,17,18)</sup>。

#### 1. 古典理論

圖 4 為以電子拉莫爾頻率 (Larmor frequency) 旋轉的旋轉座標系，我們探討若施給此系統  $90^\circ$ - $\tau$ - $180^\circ$  脈衝序列，其系統磁化量 (magnetization,  $\mathbf{M}$ ) 隨時間的演化及產生 2-pulse 自旋回音的過程。一開始電子自旋束 (spin packets) 繞著外加日曼 (Zeeman) 磁場  $\mathbf{H}_0$  ( $z$  軸) 做進動 (precession)。此系統的總磁化量 ( $\mathbf{M}$ ) 是所有磁偶極矩 (magnetic dipole moment) 的向量和，因其橫向 (transverse) 磁偶極矩

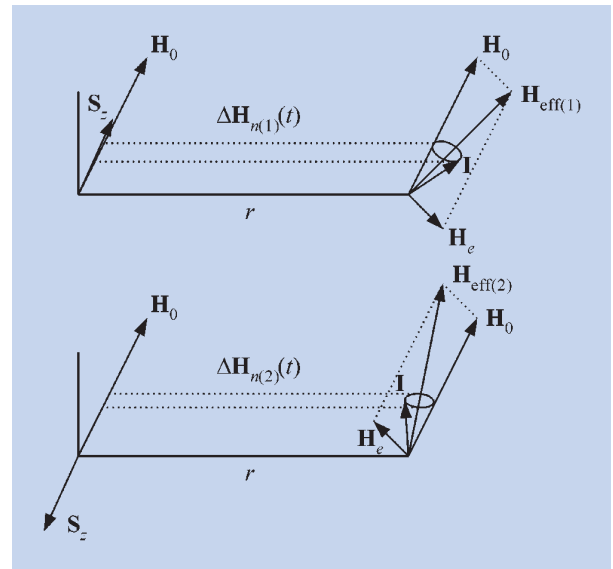


圖 5. 原子核自旋調節電子自旋 S 繞著  $\mathbf{H}_0$  的進動頻率之古典模型。

的平均為零，故其淨磁化  $\mathbf{M}_0$  是沿著  $z$  軸。在時間  $t = 0$  時，沿著  $x$  軸我們施予一強度為  $\mathbf{h}_1$ ，持續時間為  $\tau_1$  的脈衝微波，此脈衝所產生的力矩 ( $\mathbf{M} \times \mathbf{h}_1$ ) 將使  $\mathbf{M}_0$  在  $x$ - $y$  平面上旋轉，控制脈衝的持續時間  $\mathbf{h}_1$ ，使  $\mathbf{M}_0$  正好旋轉到  $x$  軸後 (相對於圖 4 中「1」的位置)，即將此  $\pi/2$  ( $90^\circ$ ) 的脈衝移去 (此時  $\gamma h_1 \tau_1 = \pi/2$ )。之後，所有沿著  $x$  軸的磁偶子將以其個別的拉莫爾頻率繞著  $z$  軸做進動，並在  $x$ - $y$  平面上散開來 (dephasing)，故  $\mathbf{M}_0$  在  $x$  軸上的投影量也漸減，此現象即稱為 FID。讓這群磁偶子在  $x$ - $y$  平面上自由的進動 (free precession)  $\tau$  的時間後 (相對於「2」的位置)，我們引入脈衝 II。此  $180^\circ$  脈衝的持續時間為脈衝 I 的兩倍，故其產生的力矩將每個磁偶子穿過  $y$ - $z$  平面旋轉  $180^\circ$  至反方向之後 (相對於「3」的位置)，再將脈衝 II 除去。這時，這群在  $x$ - $y$  平面上自由進動的磁偶子將開始往  $-x$  軸的方向會合。在  $\tau$  的時間後，它們將聚集在  $-x$  軸上 (rephasing)，而以一自旋回音出現，或者是說  $\mathbf{M}_0$  在  $x$  軸的投影量增加。ESEEM 偵測的即為  $\mathbf{M}$  在  $x$  軸上的投影量或是電子自旋回音的強度，而 FT-ESR 則直接的偵測脈衝 I 產生的 FID 訊號並加以傅立葉轉換之。

接下來，我們繼續利用古典力學的理论來解釋波套調節 (envelope modulation) 的原因。如圖 5 所示，我們假設有一電子自旋處於一外加磁場  $\mathbf{H}_0$  ( $z$  的方向)，其電子的  $g$  因子為各向同性 (isotropic)，其相對應的自旋角動量 (spin angular momentum) 向量為  $\mathbf{S}$ ， $S_z$  的方向則沿著  $\mathbf{H}_0$  的方向。若有一自旋為  $I$  的原子核處於距離  $\mathbf{S}$  為  $r$  處，此原子核將同時感受到外加磁場  $\mathbf{H}_0$  與電子自旋在原子核處產生的磁場  $\mathbf{H}_e$ ，故原子核自旋將繞著此二磁場的向量和  $\mathbf{H}_{\text{eff}(1)}$  進動。通常在外加磁場  $\mathbf{H}_0$  為 3000 高斯，若  $r$  為  $3 \text{ \AA}$ ，則  $H_e$  約為 350 高斯 ( $H_e \sim \mu_e/r^3$ ， $\mu_e$  為電子磁矩)，是一不可忽略的量。同時原子核也會在電子自旋處產生一  $\mathbf{H}_n$  的磁場，若為氫原子在  $r = 3 \text{ \AA}$  處，則  $H_n$  僅約為 0.5 高斯 ( $H_n \sim \mu_N/r^3$ ， $\mu_N$  為原子磁矩)。雖此  $H_n$  遠小於  $\mathbf{H}_0$ ，但  $\mathbf{H}_n$  仍將在  $\mathbf{S}$  沿著  $\mathbf{H}_0$  進動的方向引起一些微擾；也就是說，繞著  $\mathbf{H}_{\text{eff}(1)}$  進動的原子核自旋  $\mathbf{I}$  將在  $\mathbf{S}$  上產生一隨時間改變的  $\mathbf{H}_n$  (即圖 5 中的  $\Delta\mathbf{H}_{n(1)}(t)$ )，此  $\Delta\mathbf{H}_{n(1)}(t)$  反映出  $\mathbf{I}$  在  $\mathbf{H}_{\text{eff}(1)}$  上分量的大小，同時此  $\Delta\mathbf{H}_{n(1)}(t)$  的頻率相等於原子核的拉莫爾進動頻率  $\omega_{n(1)}$ ，也就是說， $\Delta\mathbf{H}_{n(1)}(t)$  會以  $\omega_{n(1)}$  的頻率來調節電子自旋  $\mathbf{S}$  繞著  $\mathbf{H}_0$  的拉莫爾進動頻率。

若施給此系統一脈衝微波，將電子自旋的方向  $S_z$  變為  $-S_z$ ，瞬間  $\mathbf{H}_e$  的方向也會跟著相反過來，而在原子核上形成一新的合向量  $\mathbf{H}_{\text{eff}(2)}$ ，如圖 5 下。若此脈衝的持續時間遠小於原子核自旋的拉莫爾進動週期 (如氫原子約為 100 ns)，那麼並非所有的原子核自旋均能絕熱地 (adiabatically) 跟隨新的  $\mathbf{H}_{\text{eff}(2)}$  做進動。見圖 5，只有那些原來正好進動到靠近  $\mathbf{H}_0$  的原子核自旋才能瞬間的改變方向而繞著  $\mathbf{H}_{\text{eff}(2)}$  做進動，這些改變進動方向的原子核自旋將在電子自旋處產生一頻率為  $\omega_{n(2)}$  的  $\Delta\mathbf{H}_{n(2)}(t)$ ，也就是說， $\Delta\mathbf{H}_{n(2)}(t)$  會以  $\omega_{n(2)}$  的頻率來調節電子自旋  $\mathbf{S}$  的拉莫爾進動頻率。

歸納而言，電子因為脈衝微波而改變自旋方向，在原子核進動的時間尺度裡，這是一種突發性的事件。因此原子核也感受到其區域磁場向量合的方向突變，而把原子核自旋進動的方向分成兩組。一組是維持原來的  $\mathbf{H}_{\text{eff}(1)}$  以  $\omega_{n(1)}$  的頻率進動。另一組則以  $\omega_{n(2)}$  的頻率繞著新的  $\mathbf{H}_{\text{eff}(2)}$  進動。相對的，

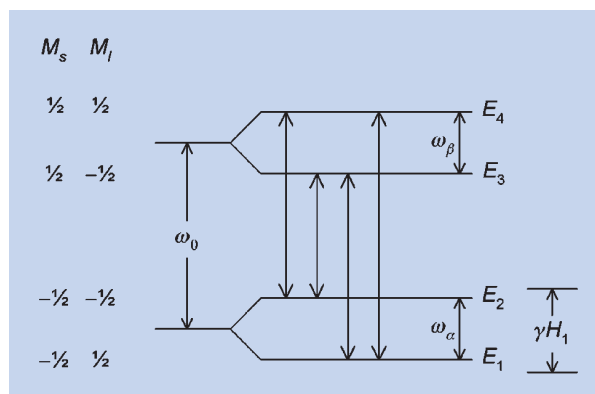


圖 6. 電子自旋  $s = 1/2$  與原子核自旋  $I = 1/2$  交互作用的能階分裂。實線為允許的躍遷，虛線為禁止的躍遷。

電子自旋的拉莫爾進動頻率會因此而受到頻率為  $\omega_{n(1)}$  及  $\omega_{n(2)}$  的調節，與  $\omega_{n(1)}$  及  $\omega_{n(2)}$  的合拍 (beat)  $\omega_{n(1)} \pm \omega_{n(2)}$  的調節，此現象即為電子自旋回音波套調節 (ESEEM)。

## 2. 量子力學的角度

從量子力學的角度來分析 ESEEM，可同時獲得定性的現象描述及定量的實驗譜線模擬，但其步驟稍微複雜。以下，我們舉一最簡單的組合為例：一電子自旋  $s = 1/2$  與一原子核自旋  $I = 1/2$  的交互作用。

如圖 6，電子與原子核的交互作用形成了四個能階的系統， $M_s$  為電子自旋的量子數， $\omega_0$  為電子自旋的日曼分裂， $\omega_\alpha$  及  $\omega_\beta$  為原子核引起的精細結構分裂。由於脈衝微波的影響使原子核進動的方向不具單一性而是二種原子核自旋態的混合 (mixed state)，也就是說  $M_I$  不再是一個好的量子數 (good quantum number)，因此在自旋躍遷的過程中  $M_I$  並不再需要守恆了。在自旋回音的實驗中，脈衝 I 可將電子自旋從低能態 ( $E_1$  及  $E_2$ ) 激發至高能量態 ( $E_3$  及  $E_4$ )。若脈衝的強度  $\gamma H_1$  大於  $E_2$  與  $E_1$  間的能量差，則此脈衝可將在  $E_1$  及  $E_2$  能階上的自旋同時激發到  $E_3$  及  $E_4$  的能階。從  $E_1$  來的電子與從  $E_2$  來的電子的進動頻率差正好為電子與原子核精細結構的分裂  $\omega_\alpha$ 。也就是說，脈衝 I 在  $E_3$  或  $E_4$  能階上各產生二組不同的自旋，彼此干擾對方的運動而對電子

磁化量產生  $\omega_\alpha$  的頻率調節。從  $E_3$  或  $E_4$  躍遷至  $E_1$  或  $E_2$  的自旋產生  $\omega_\beta$  的頻率調節，而脈衝 II 則引起了  $\omega_\beta \pm \omega_\alpha$  的頻率調節。

上述定性的描述指出，電子與原子核交互作用產生的能階分裂大小決定了電子自旋回音的調節頻率。此交互作用的強弱可以不隨時變的自旋 - 哈密頓 (spin-Hamiltonian) 描述之：

$$H = \beta_e \hat{S} g B + \hat{S} A \hat{I} - g_n \beta_n \hat{I} + \hat{I} Q \hat{I} \quad (1)$$

其中， $\beta_e$  和  $\beta_n$  分別為電子與原子核的波爾磁子 (Bohr magneton)， $g_n$  為原子核的  $g$  值， $B$  為外加磁場向量， $h$  為蒲朗克常數， $g_e$  為電子的  $g$  張量， $A$  為精細交互作用張量， $Q$  為原子核電四極交互作用張量， $\hat{S}$  及  $\hat{I}$  分別為電子與原子核的自旋運算子 (spin-operator)。  $A$  張量包含了電子雲在原子核上的費米接觸項 (Fermi contact) 及電子與原子核之間的距離等訊息， $Q$  張量包含了原子核電場梯度 (electrical field gradient, 以  $e^2 q Q$  表示之) 及不對稱參數 (asymmetric parameter, 以  $\eta$  表示之) 利用 Euler 角度的座標轉換，將  $A$ 、 $Q$  及  $g$  張量旋轉至相同的主軸系統後 (principal axis system)，我們便可對角化此 spin-Hamiltonian 而求得其本徵值 (eigenvalues) 及本徵函數 (eigenvectors)。本徵值代表不同能階的能量，進而給出  $\omega_\alpha$  及  $\omega_\beta$ ，而從本徵函數可求得自旋躍遷機率。

但能階上的自旋群數 (spin population) 隨著一序列脈衝引起的擾動 (nutation) 及兩脈衝間的自由進動 (free precession) 而演化，此對 ESEEM 調節頻率的振幅有顯著的影響。ESEEM 的創始人 Mims 利用運動方程 (eq. of motion)， $\frac{dp}{dt} = \frac{i}{h} [P \cdot H]$  其中  $P$  為密度矩陣 (density matrix)， $H$  為 spin-Hamiltonian，已推導出 2-pulse 及 3-pulse 的 ESEEM 公式分別如下：

$$E_{\text{mod}}(\tau) = \frac{1}{2(2I+1)} \text{Tr} [Q_i^+ M^+ P_i^+ M Q_i M_i^+ P_i M + \text{H.C.}] \quad (2)$$

$$E_{\text{mod}}(\tau, T) = \frac{1}{4(2I+1)} \text{Tr} [Q_i^+ M^+ (P_i^+ P_i^+) M Q_i M_i^+ (P_i P_i) M + (Q_i^+ Q_i) M^+ P_i^+ M (Q_i Q_i) M_i^+ P_i M + \text{H.C.}] \quad (3)$$

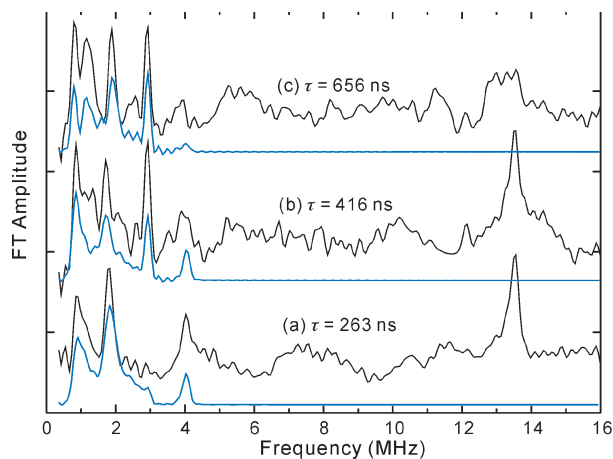


圖 7. 3-pulse ESEEM 在不同的脈衝 I 與 II 的時間間距 ( $\tau$ ) 的實驗譜線 (黑) 與理論模擬 (藍) 的比較。14 MHz 的訊號為氫原子的拉莫爾進動頻率在理論模擬時不予考慮。

其中 H.C. 為 Hermitian conjugate， $\tau$  及  $T$  分別為脈衝 I 與 II 及脈衝 II 與 III 的時間間距， $P$ 、 $Q$  矩陣分別描述在自由進動時其電子自旋向上及向下精細結構態的演化， $M$  矩陣描述脈衝引起的自旋向上態與向下態的耦合。公式推導的過程較為複雜，有興趣的讀者請參閱 W. B. Mims 的原始著作<sup>(2)</sup>。

我們已經將 Spin-Hamiltonian 及 Mims 密度矩陣公式的數值解程式化，圖 7 為 3-pulse ESEEM 理論模擬的實例。

3-pulse ( $90^\circ - \tau - 90^\circ - T - 90^\circ$ ) 的定性解釋較為複雜，但其原理與 2-pulse 相同。兩者比較，3-pulse 的優點為 (1) 只觀測到  $\omega_\alpha$  及  $\omega_\beta$  兩個調節頻率 (並無  $\omega_\alpha \pm \omega_\beta$ )，(2) 波套調節的振幅延續較長的時間。因此經傅立葉轉換後的 3-pulse ESEEM 譜線解析度較 2-pulse 好，所以在金屬蛋白的應用上經常選擇 3-pulse ESEEM 的技術。

#### 四、ESEEM 在維生素 B<sub>12</sub> 輔酵素相依酵素催化系統上的應用

傳統 CW-ESR 在金屬蛋白催化機制的研究領域有很卓越的貢獻，也是不可或缺的工具之一。但當金屬蛋白的順磁電子與鄰近的原子核有多重的交互作用，且其交互作用強弱相當時，常會導致

ESR 訊號的重疊，而形成譜線的不均勻延伸 (inhomogeneous broadening)，電子與原子核雙重共振 (ENDOR) 及 ESEEM 的技術均可用來解析此不均勻延伸的 ESR 訊號，進而獲得有關原子核的種類、個數、距離及電子雲分布等之訊息。但當順磁電子與鄰近或遠距的原子核有較微弱的交互作用，而 CW-ESR 及 ENDOR 均無法測得時，有時 ESEEM 尚可被用來解析此微弱交互作用。同時，利用外加磁場的強弱來調整原子核的日曼能階分裂，使此能階分裂的大小正好與電子 - 原子核的精細交互作用能階分裂相互抵消，因此僅剩下原子核電四極引起的能階分裂 (nuclear quadrupole interaction splitting, NQI)，此技術在 ESEEM 的領域被稱為「完全消去法」(exact cancellation)。而原子核電四極的能階分裂與磁場的方向及大小無關，故其 NQI 參數可直接被用來鑑定順磁電子或金屬原子周圍的配位體。ESEEM 在維生素 B<sub>12</sub> 輔酵素 (見圖 8) 相依酵素 - 乙醇胺脫胺 (ethanolamine deaminase, EDA) 催化反應的應用即為一例<sup>(6,7,19-22)</sup>。

EDA 的催化過程至少包含以下五步驟。第一：EDA 打斷鈷胺素 (cobalamin) 的鈷原子與 5'-去氧腺核<sup>††</sup> (5'-deoxyadenosine) 的碳原子之間的鍵結，而形成順磁性的鈷胺素自由基 ( $s = 1/2$ ) 及 5'-去氧腺核核<sup>‡‡</sup> 自由基 ( $s = 1/2$ )。第二：5'-去氧腺核核<sup>‡‡</sup> 經過型態上的改變 (conformational change) 很快從受質 (substrate) 奪取一 H 原子，而形成受質自由基及回復到非順磁性的 5'-去氧腺核<sup>‡‡</sup> ( $s = 0$ )。第三：受質自由基經過重組形成產物自由基 (product radical)。第四：產物自由基從 5'-去氧腺核核<sup>‡‡</sup> 取回一 H 原子而形成非磁性的產物及順磁性的 5'-去氧腺核<sup>‡‡</sup> 自由基。第五：5'-去氧腺核<sup>‡‡</sup> 自由基與鈷胺素自由基重新鍵結回到起始狀態，完成一催化週期。在此催化反應中，一個很值得探討的問題是「酵素如何有效地引導鈷原子與碳原子之間的斷鍵」。因為 B<sub>12</sub> 在 EDA 內的斷鍵比率遠比 B<sub>12</sub> 在緩衝溶液裡快了 10<sup>12</sup> 倍。研究人員均對此現象感到非常的好奇，同時也提出了各種不同的機制加以解釋。其中一論點為，當 B<sub>12</sub> 在甲硫胺基合成

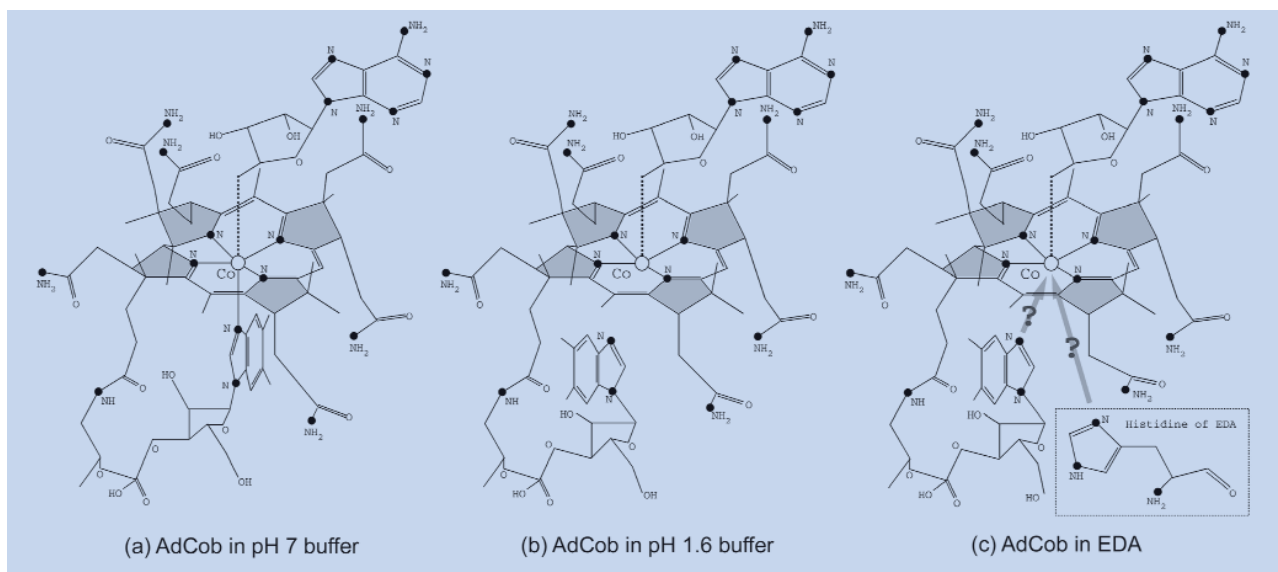


圖 8. 輔酵素維生素 B<sub>12</sub> 的衍生物腺核 鈷胺素 (adenosylcobalamin, AdCob) 的結構類似於紫質環 (porphyrin ring) 的複雜環狀結構 (咕淋環 (corrin ring))，其中有一鈷離子接於其中心，鈷原子的第五配位體為 5,6-二甲基苯 咪唑 (5,6-dimethylbenzimidazole, DMZ)，第六配位體為 5'-去氧腺核 (5'-deoxyadenosine)。(a) 在 pH = 7 的緩衝溶液 為 base-on 的結構；(b) 在 pH = 1.6 的緩衝溶液裡為 base-off 的結構；(c) 在酵素 EDA 中，其鈷原子的第五配位體 DMZ 可能被酵素 EDA 本身的組織胺基酸 (histidine) 所取代。

(methionine synthase) 酵素裡，X 光晶相學的數據顯示，鈷原子的第五配位體 DMZ 是為酵素本身的組織胺基酸 (histidine) 所取代，因此推論  $B_{12}$  在酵素內之所以能快速斷鍵，是因為酵素利用其組織胺基酸與鈷原子的鍵結，而將鈷原子從咕淋環的平面上往下拉，相對的減弱了鈷原子與碳原子的鍵結力。

利用 ESEEM 的技術，我們將證明  $B_{12}$  在甲硫胺基合成酵素裡的 X 光數據並不適合推廣成一廣義之輔酵素  $B_{12}$  相依酵素的催化原則，因為  $B_{12}$  在 EDA 酵素裡其鈷原子的第五配位體 DMZ 並未被酵素的組織胺基酸所取代。

在此實驗中，我們準備了三個樣品來做比較 (見圖 8)。第一為腺核 鈷胺素在中性的緩衝溶液裡，此為 base-on 的結構，第二為腺核  $\bar{}$  鈷胺素在酸性 (pH = 1.6) 溶液裡，此為 base-off 的結構。將第一及第二兩樣品照以綠色雷射光，打斷鈷與碳之間的鍵結，而形成鈷胺素的自由基。第三樣品為腺核 鈷胺在酵素 EDA 的催化下，形成了鈷胺素自由基與受質自由基。以上三個樣品的 CW-ESR 譜線依序顯示於圖 9 的上、中及下。

由於電子自旋與軌道的交互作用，圖 9 的 ESR 譜線均分成了  $g$  及  $g$  兩個區域。因第一及第三譜線的  $g$  共振磁場相同 (約在 2900 gauss)，

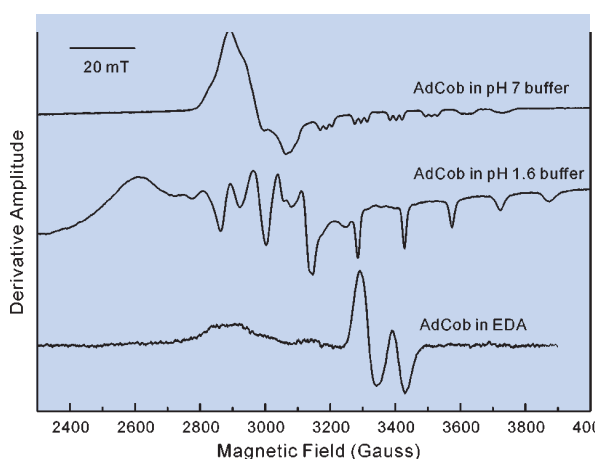


圖 9. 圖 8 中三個結構所對應之 CW-ESR 譜線。ESR 實驗參數：微波強度 4 mW，頻率 9.45 GHz，磁場調幅 10 gauss，磁場調頻 100 kHz，溫度 4 K。

意味  $B_{12}$  在酵素 EDA 裡是以 base-on 的形式存在，因為若為 base-off 態，其  $g$  的共振磁場約在 2620 gauss。圖 9 (上) 及 (中) 的  $g$  區域均分為八條間距相等 (約為 10.7 mT) 的吸收峰，此乃因順磁電子與其鈷原子核 (原子核自旋為 7/2) 精細交互作用的結果。在 base-on 的鈷原子精細結構譜線內更細分出三條間距相等 (約為 1.9 mT) 的吸收峰，此乃因鈷原子的順磁電子與第五配位體 DMZ 的氮原子核 ( $I = 1$ ) 產生超精細交互作用所致 (superhyperfine interaction)，相對地 base-off 的鈷原子精細結構譜線內就無此超精細分裂。在圖 9 (下) 的  $g$  區出現了一組成對的訊號 (doublet)，選擇性同位素取代 (selective isotope labeling) 的實驗，證明此訊號乃因受質自由基所引起，此組高強度的訊號模糊了順磁電子與鈷原子的精細譜線及與氮原子的超精細譜線。但關鍵是，若第三樣品的精細及超精細交互作用均能被 ESR 測出，我們仍無法區分鈷原子的第五配位體為原  $B_{12}$  的 DMZ 或為酵素的組織胺基酸所取代，其原因是因為二者與鈷原子的鍵結原子均為咪唑環 (imidazole) 的氮原子，故它們的電子組態非常類似。

圖 10 為 base-on  $B_{12}$  3-pulse 電子自旋回音強度

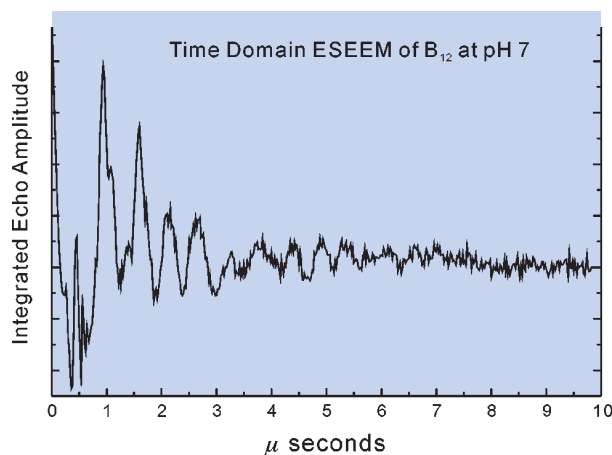


圖 10. 3-pulse ESEEM 實驗參數：脈衝微波強度 20 W，頻率 8.9 GHz，脈衝微波寬度 20 ns，重覆率 16 Hz， $\tau = 571$  ns，起始  $\tau + T = 200$  ns，取樣時間每 20 ns，日曼磁場 2896 高斯，溫度 4 K。

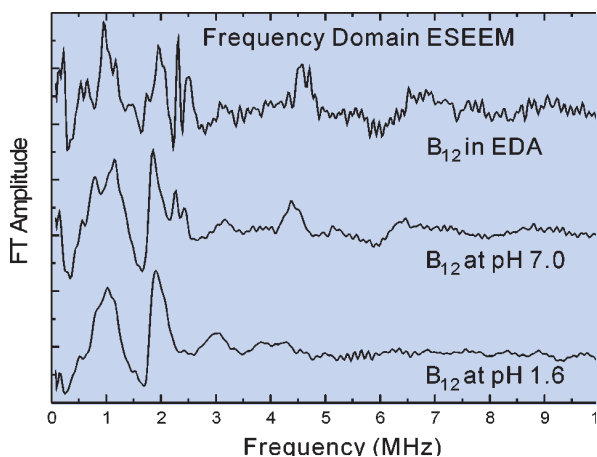


圖 11. 3-pulse ESEEM，實驗參數如圖 10。

在時間領域 (time domain) 的調變譜線，經傅立葉轉換則形成圖 11 (中) 的調頻譜線。圖 11 為先前三個樣品的 3-pulse ESEEM 的調頻譜線。三個樣品的譜線均出現的 0.5、1.0 及 1.8 MHz 調節頻率與鈷四苯紫質 ( $\text{Co}^{2+}$ -tetraphenylporphyrin) 錯合物的 0.5、1.1 及 1.7 MHz 非常接近，此組調節頻率來自處於鈷原子  $d_z$  型軌域的順磁電子與咕淋環上的四個咯 (pyrrole) 氮原子微弱交互作用所產生 (見圖 8)。根據 3-pulse ESEEM 實驗中使用的脈衝序列及配合量子力學的計算 (公式 1、2)，我們推算  $^{14}\text{N}$  原子核電四極交互作用 (NQI) 的電場梯度參數約為 1.8 MHz，不對稱參數  $\eta$  約為 0.85，鈷原子  $d_z$  型軌域的順磁電子雲在  $^{14}\text{N}$  原子核的分佈為 1.7 MHz，及順磁電子與  $^{14}\text{N}$  原子核的平均距離為 2.2 Å。此微弱交互作用在 CW-ESR 的實驗中並未被區分出，而在靈敏度高的 3-pulse ESEEM 實驗則展露無疑。

很有趣的是一組同時出現於  $\text{B}_{12}$  在 pH 7 緩衝溶液裡 (base-on) 及  $\text{B}_{12}$  在酵素 EDA 內的 0.2、2.3 與 2.5 MHz 調節頻率，此組頻率並未出現在 base-off 的譜線上，意味此組訊號是來自順磁電子與鈷原子之第五配位體內某一原子核交互作用所產生，且  $\text{B}_{12}$  在 pH 7 緩衝溶液裡與  $\text{B}_{12}$  在 EDA 內此交互作用強弱相等。此組譜線的特性為兩個低頻 (0.2 及 2.3 MHz) 的合等於第三個頻率 (2.5 MHz)，且訊號尖細，此模式的 ESEEM 訊號為典型的電子自旋與  $^{14}\text{N}$  原子核交互作用在「完全消去」時所產生。

表 1.  $^{14}\text{N}$  原子核電四極交互作用 (NQI) 參數。

3-pulse ESEEM 實驗結果			
樣品	Fermi Contact (MHz)	$e^2qQ$ (MHz)	$\eta$
$\text{B}_{12}$ in pH = 7 buffer	1.85	3.12	0.07
$\text{B}_{12}$ in EDA	2.15	3.20	0.12
已知 NQI 參數			
DMZ <sup>(23)</sup>	*	3.00	0.11
組織胺基酸 <sup>(24)</sup>	*	1.42	0.99

也就是說，在此日曼磁場下  $^{14}\text{N}$  原子核的日曼能階分裂與電子 - 原子核的精細交互作用能階分裂相互抵消，此時能階分裂僅取決於  $^{14}\text{N}$  原子核交互作用。根據 ESEEM 實驗中使用的脈衝序列及配合量子力學的計算 (公式 1、2)，其原子核電四極交互作用 (NQI) 的參數可被推算出。表 1 列出了這些參數，並與已知的 DMZ 及組織胺基酸的 略遠距氮原子的參數做比較。結果顯示，ESEEM 實驗結果得到的電場梯度參數 ( $e^2qQ = 3.1$  MHz) 及不對稱參數 ( $\eta = 0.1$ )，均類似於已知的 DMZ 參數 ( $e^2qQ = 3.0$  MHz,  $\eta = 0.11$ )。

由 ESEEM 譜線的特性及數據分析結果，我們可以結論  $\text{B}_{12}$  在 EDA 酵素的催化過程中，其鈷原子的第五配位體並未被酵素的組織胺酸所取代，而是維持原來的 DMZ 核  $\square$  鍵。

表 1 中的另一參數為費米接觸項 (Fermi contact term)，代表順磁電子雲與原子核重疊的多寡。由圖 11 中的雙量子躍遷 (double quantum transition,  $\Delta M_i = \pm 2$ ) 調節頻率 (約在 4.4 - 4.5 MHz)，我們可求出  $\text{B}_{12}$  在 pH 7 緩衝溶液裡及  $\text{B}_{12}$  在 EDA 內的費米接觸量分別為 1.85 及 2.15 MHz，此 0.3 MHz 的變實驗證了 ESEEM 在偵測微弱交互作用時的高靈敏度。從  $\text{B}_{12}$  在 EDA 酵素裡到  $\text{B}_{12}$  在 pH 7 緩衝溶液裡，費米接觸量增加了 14%，告訴我們  $\text{B}_{12}$  與酵素 EDA 的交互作用使鈷原子核相對於咕淋環平面的位置往下移，因此減弱了鈷原子與 5'-去氧腺核之間的鍵結力 (更易斷鍵)。同時順磁電子雲往第五配位體的區域化 (localization) 減少了鈷原子  $d_z$  軌域的不成對電子雲分佈，降低了鈷原子與 5'-

去氧腺核 重新鍵結的機率，有利於催化過程第二步的進行。

## 五、結論

ESR 不只在固態物理學及材料科學的研究歷史上扮演著很重要的角色，在金屬蛋白催化反應及氧化氮還原金屬酵素等的生化研究領域上，更提供了電子雲分布、分子鍵距、氧化數及周圍鍵結的配位體等結構數據，有很卓越的貢獻，也是不可或缺的工具之一。配合微波零件的多元化及更新，脈衝式 ESR 的儀器設計及實驗方法也趨成熟，並在世界各地的實驗室逐漸的普及開來，值得推薦瞭解。

脈衝式 ESR 除可執行傳統的結構分析外，因其奈秒級脈衝微波的本質允許我們直接測量化學反應的機制、自旋與自旋及自旋與晶格的鬆馳效應、電子與原子核交互作用在奈秒級的變化、以及探討催化過程中不穩定間接物的特性，此為分子生物、化學及醫學的研究領域開創了一個新的紀元。比如說，奈秒級脈衝式 ESR 在金屬蛋白催化機制及自由基連鎖反應的研究等，都是目前相當熱門的題材。本文概略地敘述了其理論、儀器建造所需之零件與須考量的因素，並舉 ESEEM 在維生素 B<sub>12</sub> 輔酵素相依酵素催化系統上的應用為例，期能對國內有興趣之人士有所助益。

## 誌謝

筆者感謝張耀仁先生的初稿繕打協助，使本文順利完成。筆者的 ESR 實驗室承國科會 (NSC 89-2113-M-259-019) 及國立東華大學的贊助，特此致謝。

## 參考文獻

1. E. Zavoisker, *J. Phys. USSR*, **9**, 211 (1945).
2. W. B. Mims, *Phys. Rev. B*, **5**, 2409 (1971).
3. W. E. Blumberg, W. B. Mims, and D. Zuckerman, *Rev. Sci. Instrum.*, **44**, 546 (1973).
4. W. B. Mims and J. Peisach, *Biological Applications of Magnetic Resonance*, R. G. Shulman, ed., 221 (1979).
5. W. B. Mims and J. Peisach, *Biol. Magn. Reson.*, **3**, 213 (1981).
6. S. C. Ke, M. Torrent, D. G. Musaev, K. Morokuma, and K. Warncke, *Biochemistry*, **38**, 12681 (1999).
7. S. C. Ke and K. Warncke, *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 9922 (1999).
8. S. J. Elliott, D. W. Randall, R. D. Britt, and S. I. Chan, *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 3247 (1998).
9. S. C. Hung, C. V. Grant, J. M. Peloquin, A. R. Waldeck, H. K. Lee, R. D. Britt, and S. I. Chan, *J. Phys. Chem. B*, **104**, 4402 (2000).
10. T. S. Lin, *Chem. Rev.*, **84**, 1 (1984).
11. B. E. Sturgeon and R. D. Brit, *Rev. Sci. Instrum.*, **63**, 2187 (1992).
12. *Modern Pulsed and Continuous-wave Electron Spin Resonance*, L. Kevan and M. K. Bowman, Eds., New York: John Wiley & Sons (1990).
13. J. M. Fauth, A. Schweiger, L. Braunschweiler, J. Forrer, and R. R. Ernst, *J. Magnetic Resonance*, **66**, 74 (1986).
14. C. Gemperle, G. Aebli, A. Schweiger, and R. R. Ernst, *J. Magnetic Resonance*, **88**, 241 (1990).
15. R. D. Britt and M. P. Klein, *J. Magnetic Resonance*, **74**, 535 (1987).
16. S. Pfenninger, J. Forrer, A. Schweiger, and T. Weiland, *Rev. Sci. Instrum.*, **59**, 752 (1988).
17. H. Thomann, L. R. Dalton, and L. A. Dalton, *Biol. Magn. Reson.*, **6**, 143 (1984).
18. *Time Domain Electron Spin Resonance*, L. Kevan and R. N. Schwartz, Eds., New York: John Wiley & Sons (1980).
19. J. Stubbe, *Science*, **266**, 1663 (1994).
20. P. A. Frey, *Chem. Rev.*, **90**, 1343 (1990).
21. K. Warncke, J. C. Schmidt, and S. C. Ke, *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 10522 (1999).
22. M. Torrent, D. G. Musaev, S. C. Ke, K. Warncke, and K. Morokuma, *J. Phys. Chem. B*, **103**, 8618 (1999).
23. J. McCracken and J. Peisach, *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 9033 (1990).
24. D. T. Edmonds, *Phys. Letters C*, **29**, 233 (1977).