

Электронный парамагнитный резонанс (ЭПР)

$$P_s = \frac{h}{2\pi} \sqrt{S(S+1)}, \mu_s = -P_s \frac{e}{m}$$

Для свободного электрона ($S = 1/2$) отношение магнитного момента к механическому называется гиромагнитным отношением (γ), которое для спинового движения составляет

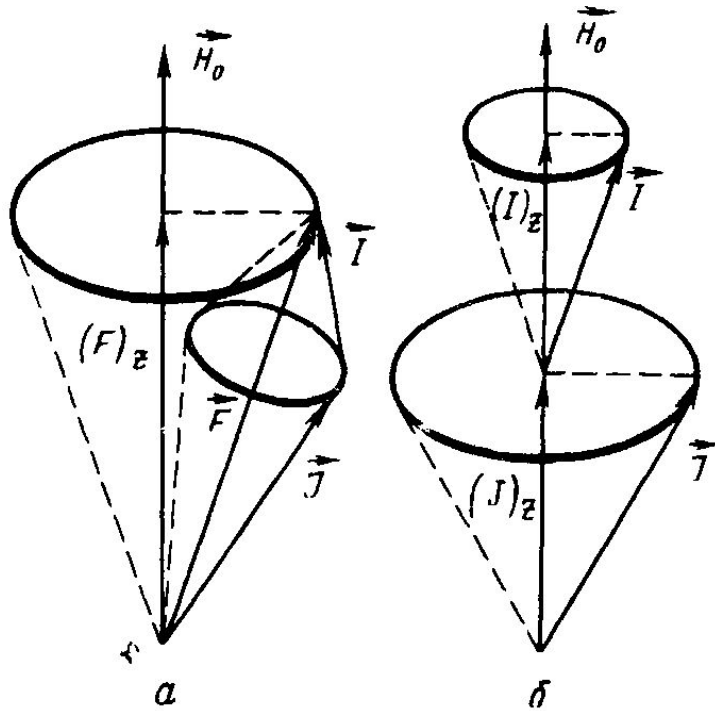


Рис.1 Прецессия магнитного момента в а) слабом поле, б) сильном внешнем поле

Для гиромагнитного отношения электронной оболочки, имеющей различный вклад орбитального и спинового движения, вводят коэффициент пропорциональности g :

Данный коэффициент называется g -фактором. Для свободного электрона $g=2$. При наличии одновременно спинового и орбитального магнетизма выражение для g -фактора дается формулой Ланде:

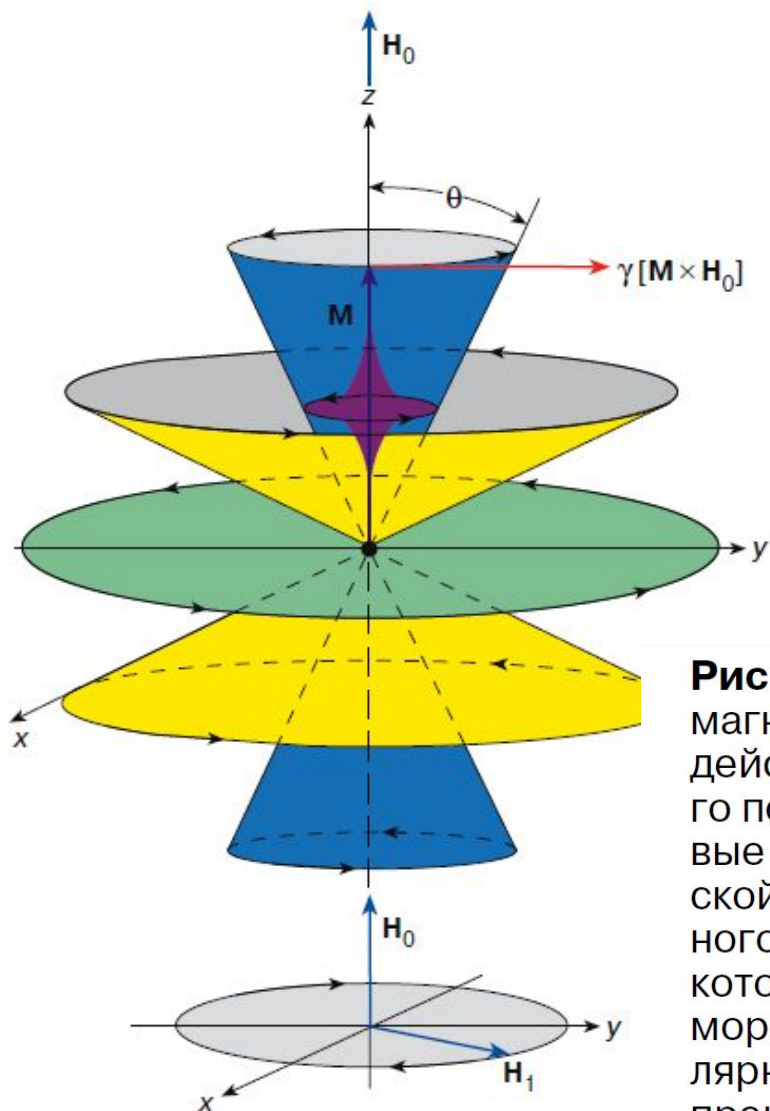
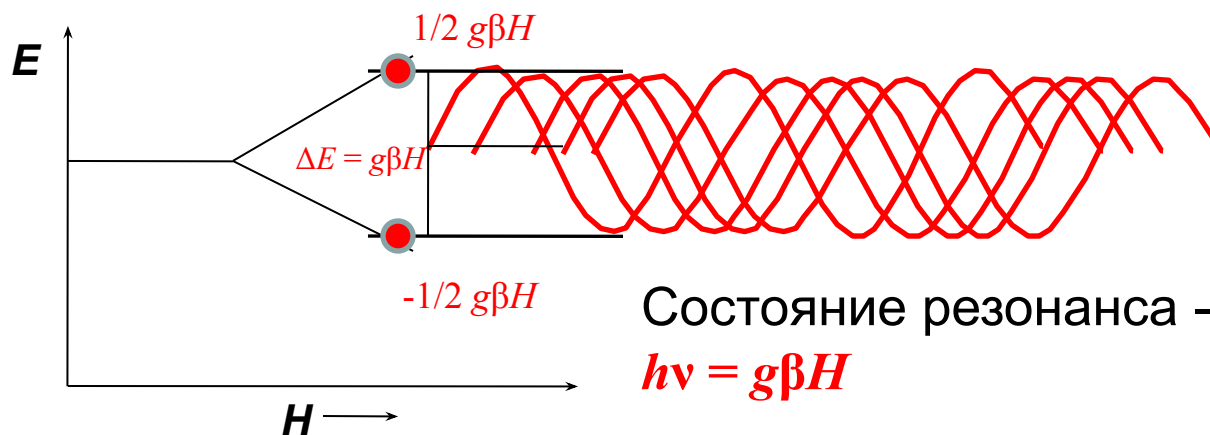


Рис. 2. Прецессия магнитного момента $\mathbf{M}$ парамагнетика в постоянном магнитном поле $\mathbf{H}_0$. Под действием вращательного момента, создаваемого полем $\mathbf{H}_0$, магнитный момент совершает круговые вращения по образующей конуса с ларморовской частотой $\omega_L = \gamma H_0$. При наложении переменного магнитного поля, вектор напряженности которого $\mathbf{H}_1$ совершает круговое движение с ларморовской частотой в плоскости, перпендикулярной вектору $\mathbf{H}_0$, происходит изменение угла прецессии, приводящее к опрокидыванию магнитного момента $\mathbf{M}$. Увеличение угла прецессии θ сопровождается поглощением энергии электромагнитного поля, уменьшение θ – излучением с частотой ω_L .

Явление ЭПР было открыто Е.К. Завойским в 1944 г.

Принцип метода ЭПР

Парамагнитным резонансом называется явление резонансного поглощения энергии переменного электро-магнитного поля системой, включающей в себя частицы (атомы, молекулы, ионы), обладающие магнитным моментом.



Это поглощение индуцирует переходы между энергетическими уровнями, обусловленными различными ориентациями моментов частиц в пространстве. Если поглощение индуцирует переходы между уровнями, обусловленными различной пространственной ориентацией магнитного момента электрона, говорят об электронном парамагнитном резонансе (ЭПР). Когда наблюдаются переходы между энергетическими уровнями, связанными с наличием магнитного момента у атомных ядер, резонансное поглощение называется ядерным магнитным резонансом (ЯМР).

Электрон, находящийся на верхнем уровне, теряет свою избыточную энергию посредством самопроизвольного и индуцированного испускания, а так же посредством различных релаксационных механизмов:

Спин-решеточная релаксация — это процесс, в результате которого избыток энергии спинов передается другим степеням свободы молекул жидкости или твердого тела («решетке»). Основным механизмом передачи энергии спинов является спин-орбитальная связь, благодаря которой по цепочке спиновый магнитный момент — орбитальный магнитный момент — орбита — заряженное ядро осуществляется взаимодействие спина с решеткой. Этот процесс описывается экспоненциальной зависимостью и характеризуется временем спин-решеточной релаксации T_1 , за которое разность инверсной заселенности уровней уменьшается в e раз.

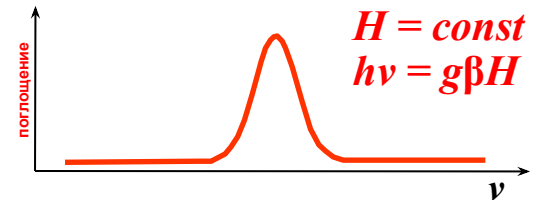
С ростом температуры спин-решеточное взаимодействие увеличивается, а T_1 падает.

Спин-спиновая релаксация — это процесс, при котором энергия выделяющаяся при переходе спина с верхнего уровня на нижний, безизлучательно передается другому спину, находящемуся на нижнем уровне. Спин, получающий энергию, переходит на верхний уровень. Вследствие этого процесса происходит перераспределение энергии по всей спиновой системе. В основе спин-спинового взаимодействия лежит тот факт, что в любой реальной системе парамагнитная частица находится не только во внешнем магнитном поле, но подвергается воздействию локальных магнитных полей, создаваемых соседними парамагнитными центрами. Спин-спиновая релаксация характеризуется временем спин-спиновой релаксации T_2 — *среднее время жизни спина на верхнем уровне*, обусловленное спин-спиновой релаксацией. Спин-спиновое взаимодействие практически не зависит от температуры, однако очень быстро уменьшается с увеличением среднего расстояния между спинами. Таким образом, на величину этого взаимодействия изменяя концентрацию парамагнитных центров.

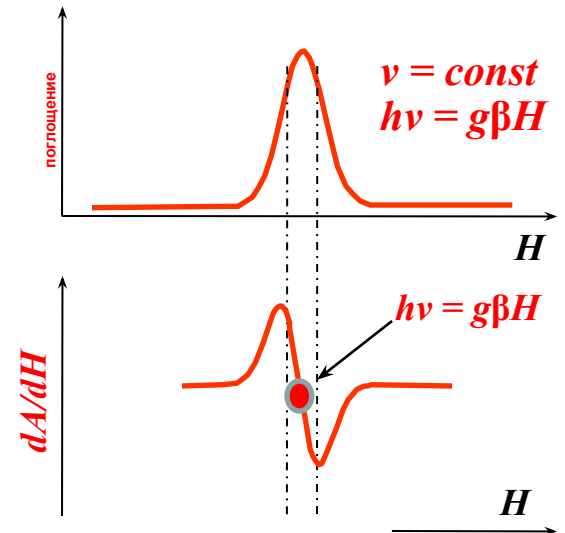
Что такое спектр ЭПР?

Поглощение электромагнитных волн методом ЭПР можно наблюдать двумя способами:

1 – В постоянном магнитном поле **изменяя частоту** перпендикулярно направленного **переменного поля**. Максимальное поглощение будет наблюдаться при резонансе.



2 - Используя микроволновое излучение постоянной частоты, **изменяя** при этом **магнитное поле** посредством модуляции электрического тока в электромагнитной катушке. При этом регистрируется не поглощение, а **первая производная** поглощения по полю.



ШИРИНА СПЕКТРАЛЬНОЙ ЛИНИИ

Взаимодействие неспаренных электронов с другими парамагнитными частицами и решеткой приводит к размытию уровней. При этом условия резонанса реализуются в некотором интервале полей H_0 .

$$\Delta H \sim T_1^{-1}, T_2^{-1}$$

Времена релаксации T_1 и T_2 зависят от природы парамагнитных центров, окружения, молекулярной подвижности. T_1 и от температуры.

1,1,4,4 - тетраметилпиперидиноксил

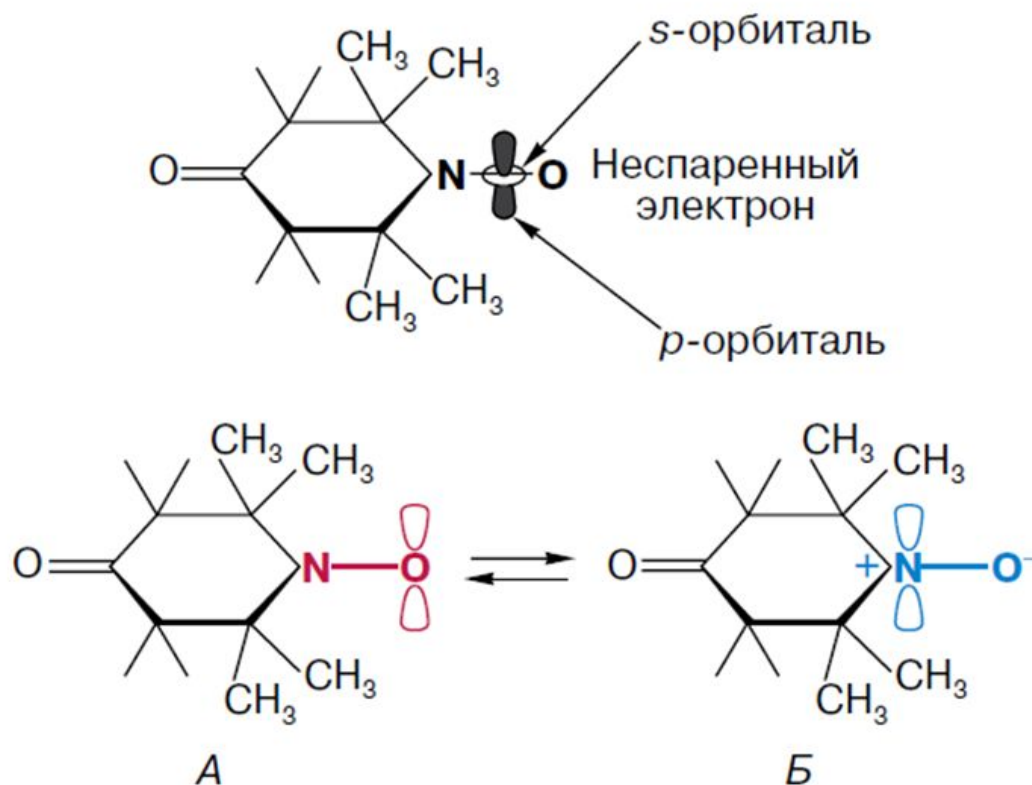


Рис.4. Химическое строение спиновой метки: А и Б – две валентные структуры нитроксильного радикала.

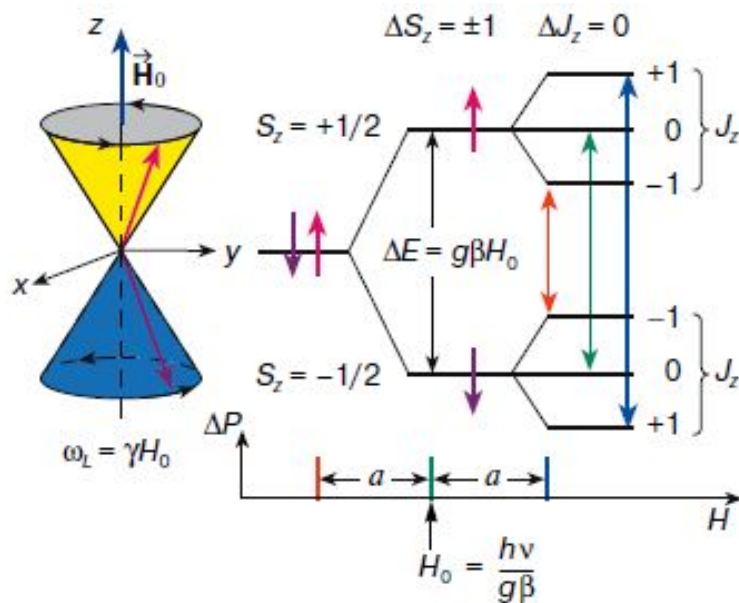
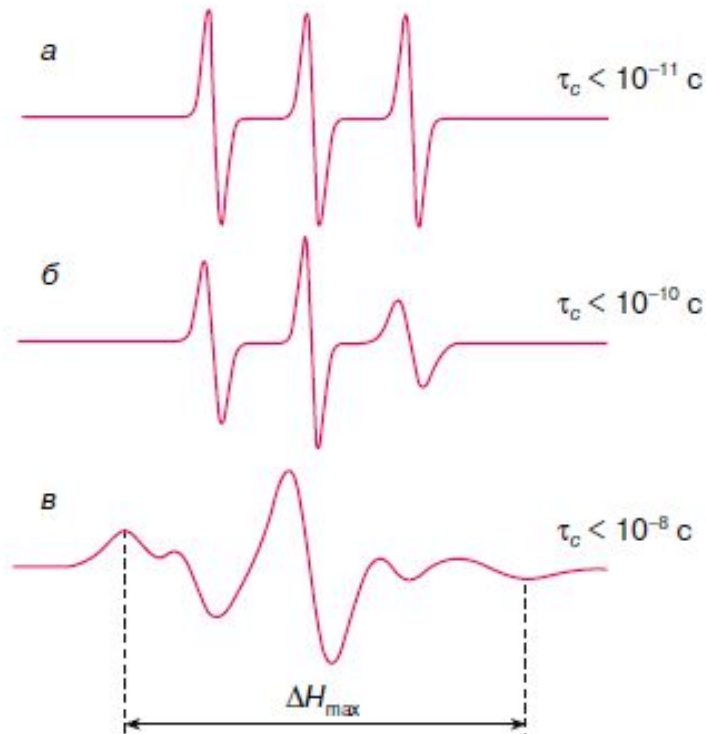


Рис.5 Схема энергетических уровней, иллюстрирующая возникновение сверхтонкой структуры спектра ЭПР парамагнитной молекулы NO^*

Спектр ЭПР – суперпозиция спектров парамагнитных молекул с различной пространственной ориентацией p-орбитали.

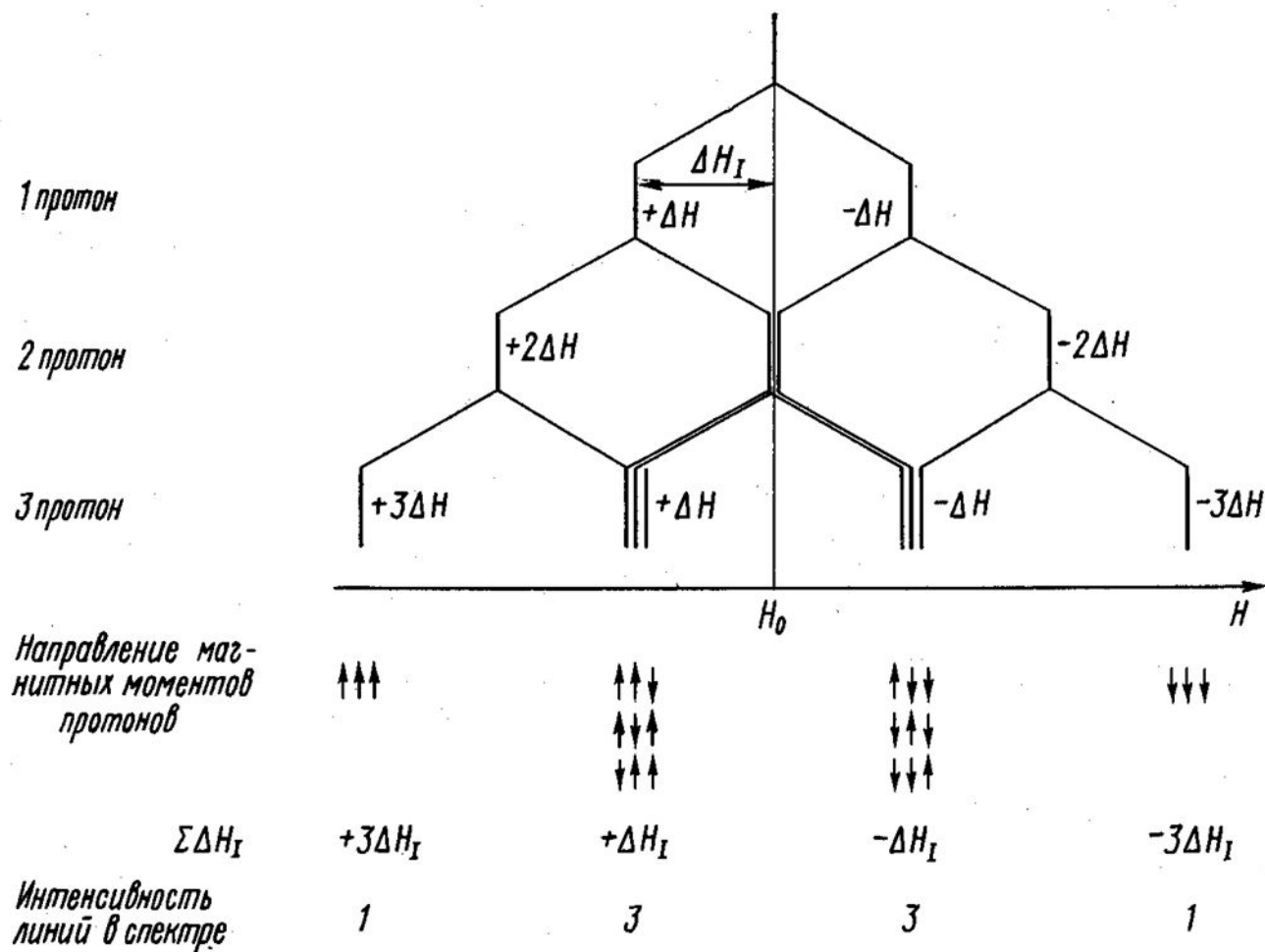


ФОРМА СПЕКТРА ЭПР

Почему форма спектра ЭПР зависит от ориентации радикала? Связано это с тем, что расстояние между электронными подуровнями зависит от угла θ между направлениями постоянного магнитного поля $\vec{H}_0$ и p -орбитали неспаренного электрона. Взаимодействие p -орбитали неспаренного электрона с ядром азота можно рассматривать как взаимодействие двух магнитных диполей. Эффективность диполь-дипольного взаимодействия, как известно, зависит от расстояния r между магнитными моментами неспаренного электрона ($\vec{\mu}_e$) и ядра азота ($\vec{\mu}_N$), а также от угла θ между ними:

$$\Delta E_{eN} = -(\vec{\mu}_e \cdot \vec{\mu}_N) \propto \frac{1}{r^3}(1 - 3\cos^2\theta).$$

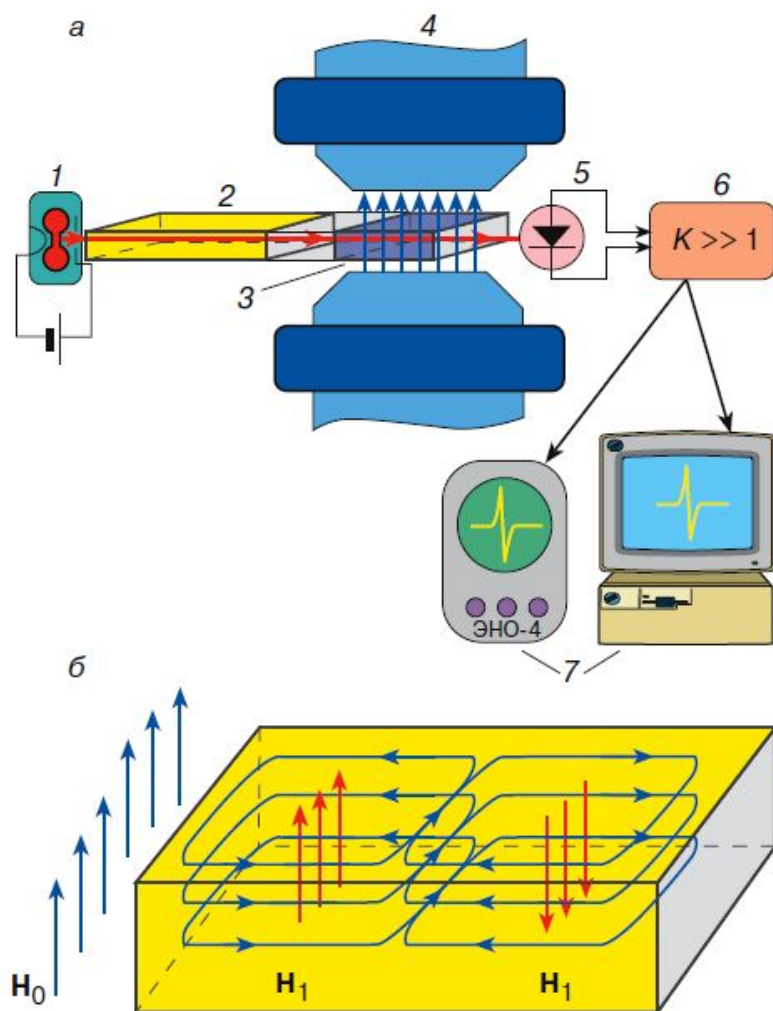
Рис.6. СТС, возникающая при взаимодействии неспаренного электрона с тремя эквивалентными протонами



Как определить величину магнитного момента ядра?

Порядковый номер (Число протонов)	Массовое число (Число протонов + число нейтронов)	Число нейтронов (массовое число – число протонов)	Магнитный момент	Пример
четный	четное	четное	$I = 0$	$^{12}_6\text{C}$ $^{16}_8\text{O}$
четный	нечетное	нечетное	$I = 1/2$	$^{13}_6\text{C}$
нечетный	нечетное	четное	$I = 1/2$	^1_1H $^{15}_7\text{N}$
нечетный	четное	нечетное	$I = 1$	$^{14}_7\text{N}$ ^2_1D

ЭПР-спектрометр



1. Генератор электромагнитного излучения (обычно для этой цели используют устройства, называемые клистроны). В современных спектрометрах ЭПР чаще всего используется излучение трехсантиметрового диапазона СВЧ ($\lambda \approx 3$ см), которое соответствует частоте $\nu \approx 10^{10}$ Гц.

2. Волноводы — полые металлические трубы, имеющие в сечении прямоугольную форму. Волноводы предназначены для передачи электромагнитного СВЧ-излучения от генератора к образцу и от образца к детектору мощности СВЧ.

3. Объемные резонаторы, внутри которых концентрируется энергия электромагнитного излучения. Схема расположения силовых линий магнитного и электрического полей в резонаторе показана на рис. 3. В центральной части резонатора, где имеется пучность переменного магнитного поля, помещается исследуемый образец.

4. Электромагнит, в зазоре которого находится резонатор. Меняя ток, протекающий через обмотку электромагнита, можно регулировать напряженность магнитного поля в зазоре электромагнита. Для создания сильных магнитных полей ($H \approx 50$ кЭ), которые необходимы для создания условий резонанса при использовании коротковолнового излучения СВЧ ($\lambda \approx 2$ мм), в настоящее время используют магниты со сверхпроводящим соленоидом.

5. Детектор электромагнитного излучения.

Нарушения нормальных процессов жизнедеятельности приводят к увеличению концентрации «комплексов 2,03». Впоследствии было доказано, что NO-радикалы играют ключевую роль в регуляции многих биологических процессов.

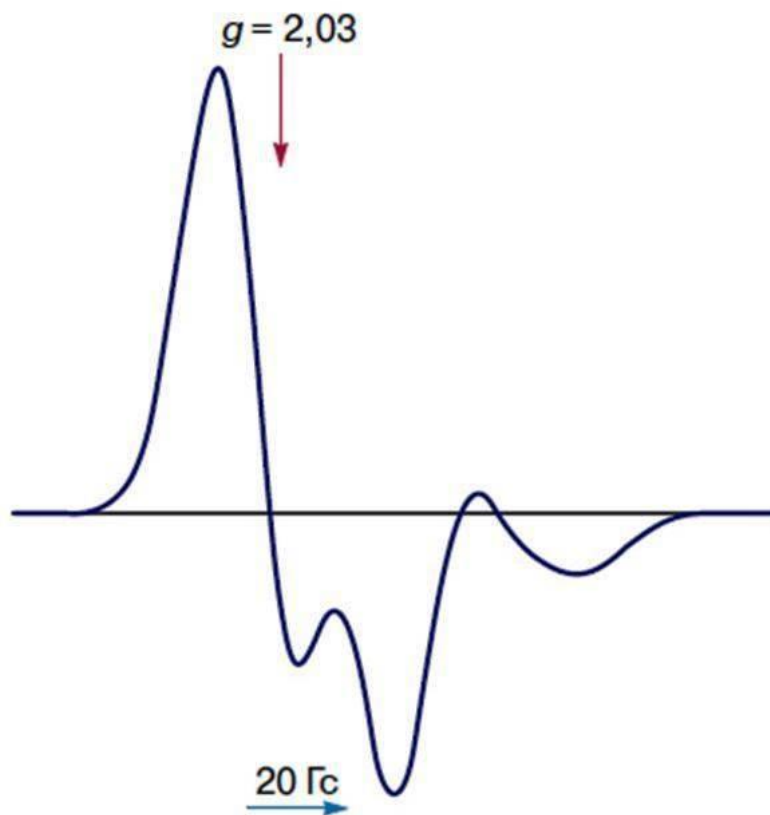


Рис.8. Спектр ЭПР нитроксильного комплекса в печени кролика.

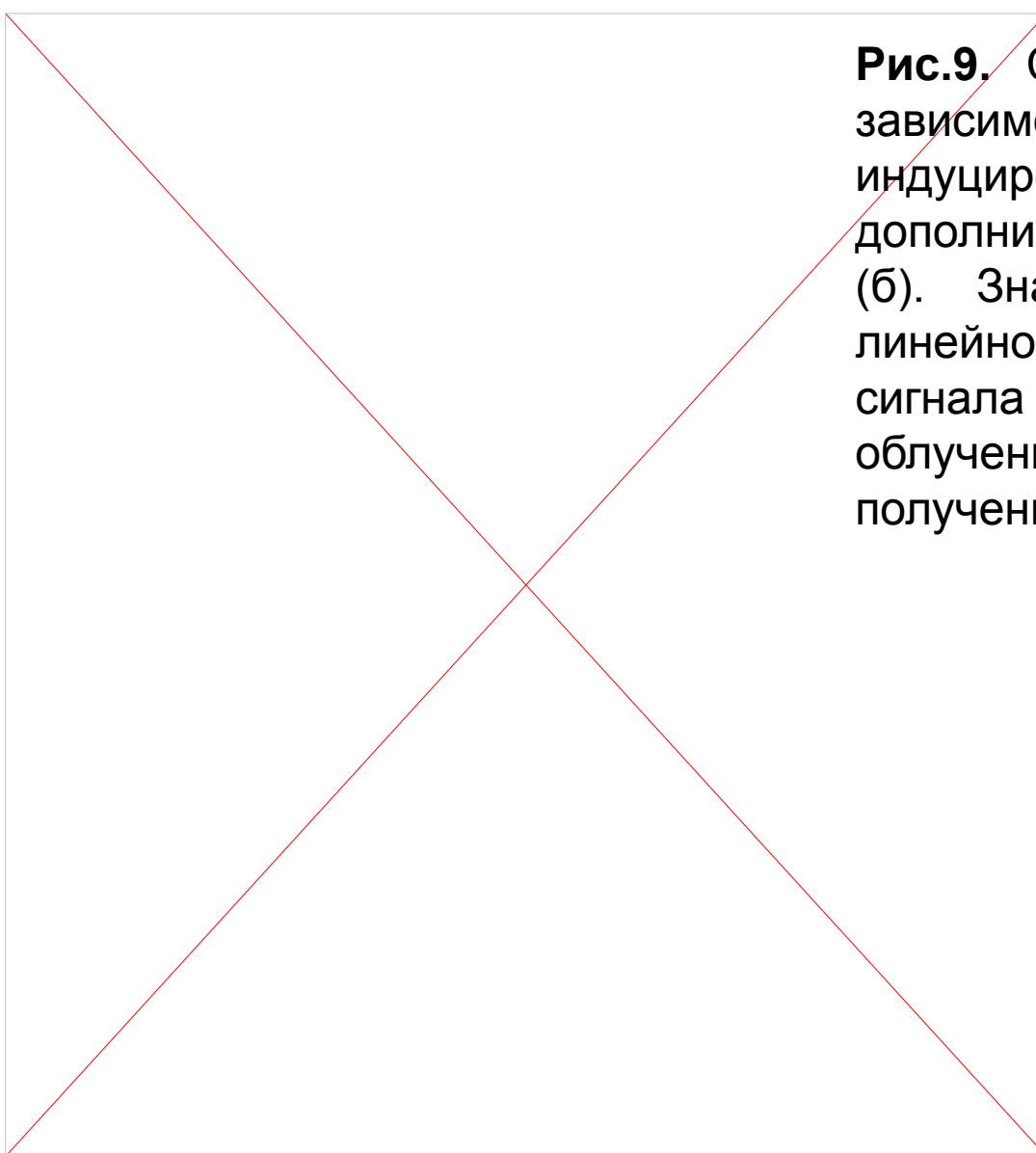
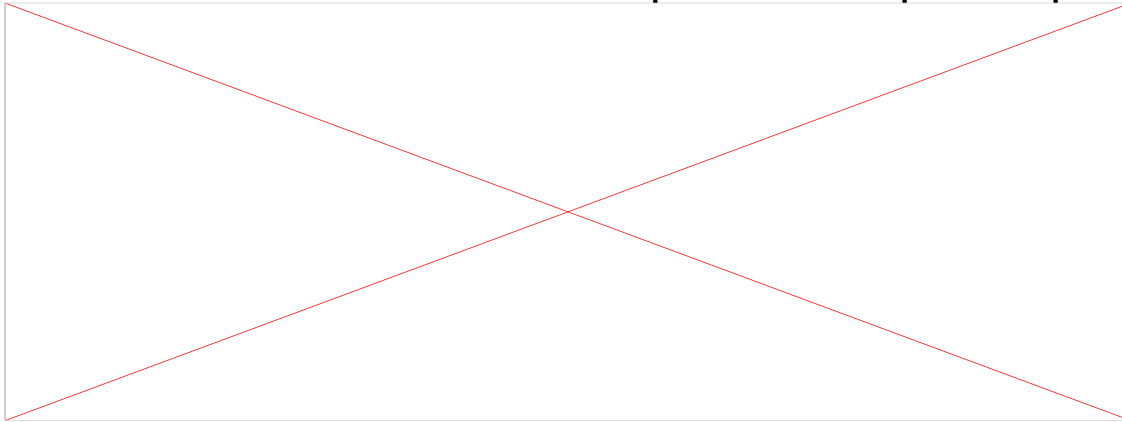


Рис.9. Спектр ЭПР эмали зубов (а) и зависимость интенсивности радиационно - индуцированного сигнала 2 от дозы дополнительно ионизирующего облучения (б). Значение D_0 , полученное путем линейной экстраполяции зависимости сигнала 2 от от дозы дополнительного облучения образца, соответствует дозе, полученной организмом

Рис.10 Типичный спектр ЭПР для раствора альбумина.



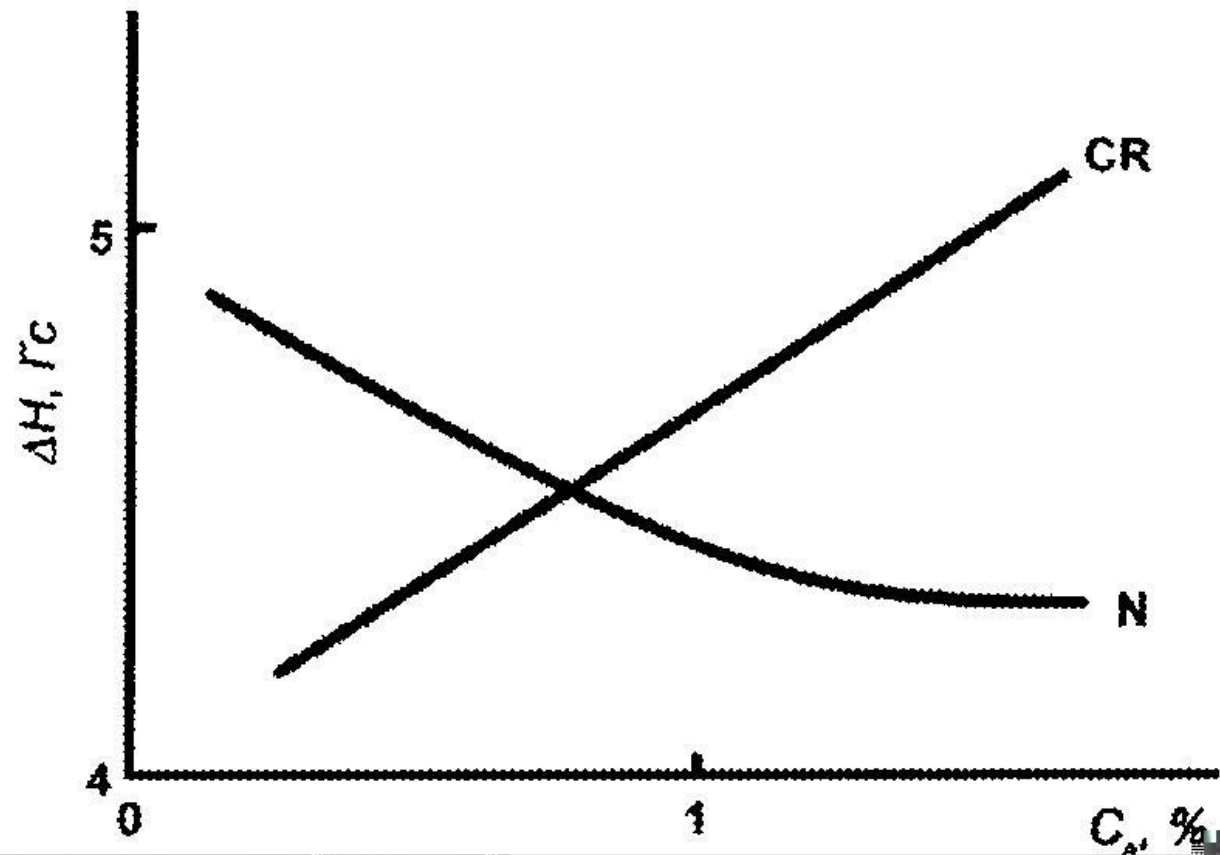
$$\beta = \frac{I_A}{I_B}$$

Основным параметром является коэффициент β , который характеризует сорбционные свойства нитроксильных радикалов в липидной фазе альбумина. Он рассчитывается как отношение амплитуды левой линии спектра ЭПР, характеризующую связывание радикала с белком (величина I_A), к амплитуде узкой правой линии (величина I_B), которая показывает концентрацию несвязанного зонда в растворе.

При онкопроцессах происходит свободнорадикальное окисление липидов и парамагнитный зонд выталкивается на поверхность. При этом величина сигнала I_B заметно возрастает, а коэффициент β - уменьшается. Можно сказать, что липидный иминоксильный радикал работает как «молекулярный ареометр», количественно определяющий степень окисления липидов.

В случае онкозаболеваний, когда образуются белковые кластеры, подвижность белка альбумина уменьшается, а линия ЭПР уширяется. Это второй важный параметр, который мы используем для диагностики рака.

Метод ЭПР



ЭПР-спектр альбумина

$$\tau = \frac{V\eta}{kT} = \frac{M\eta}{\rho kT},$$

$$\tau = a(1 - S)^b$$

$$S = A'_Z/A_Z$$

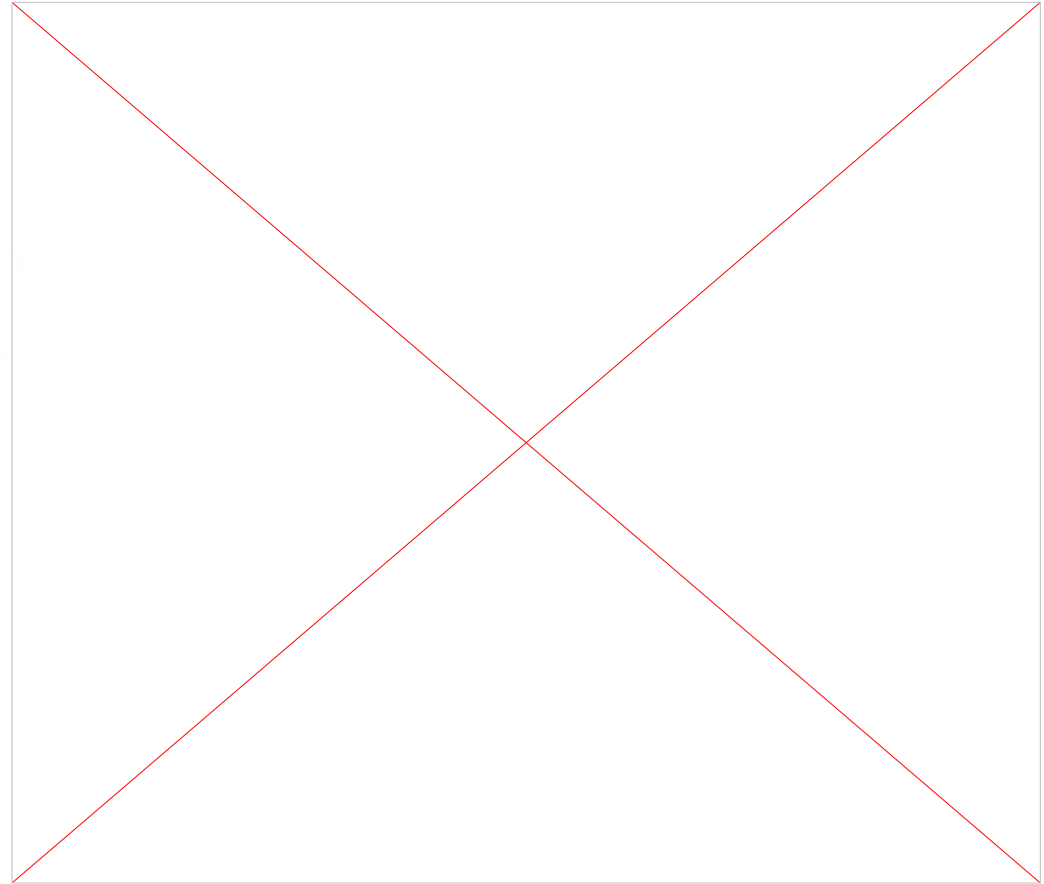


Рис.12. ЭПР-спектр белка: (а) в водном растворе; (б) в глицерине, при изменении постоянного поля спектрометра, выраженного в Гс.

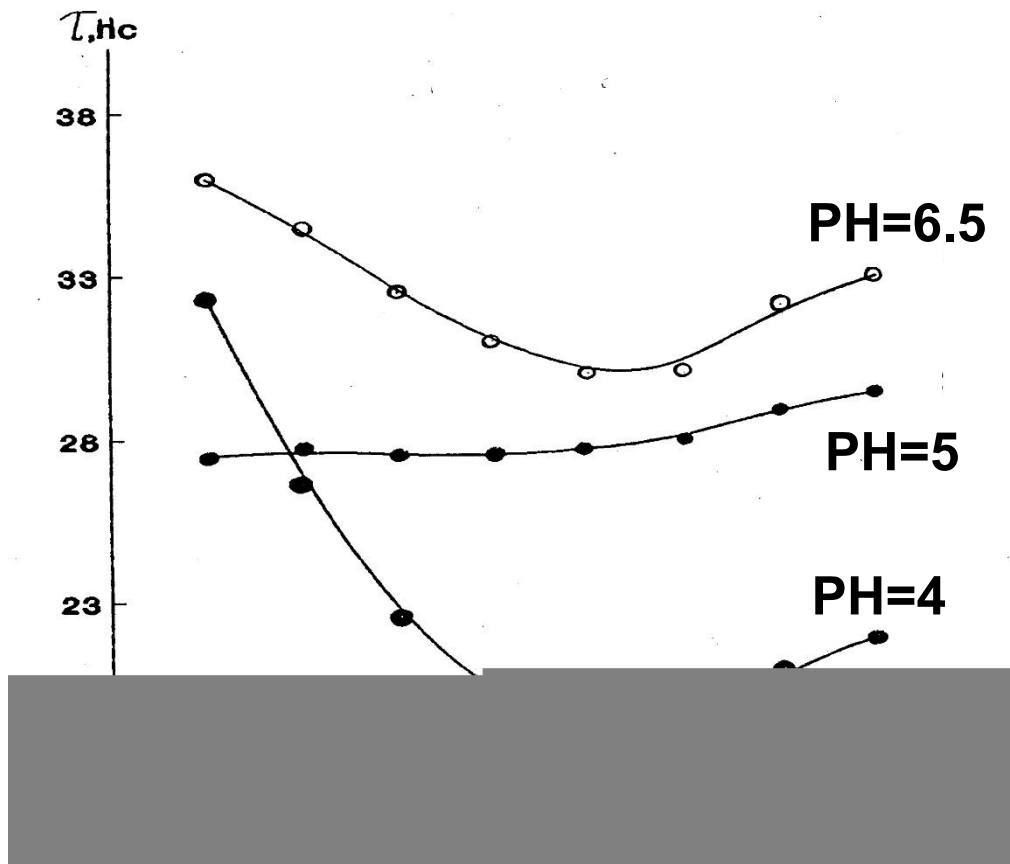


Рис.13. Время вращательной корреляции альбумина в зависимости от его концентрации для различных РН.

$$\tau = \frac{\xi_g + \xi_{el}}{6kT} = \tau_g^0(1 + \alpha c) + \tau_{el}^0(1 - \beta c)$$

$$\beta = \frac{0,16 p^4}{12 \varepsilon^2 (kT)^2 r^6} + \frac{1,04 p^2 q^2}{6 \varepsilon^2 (kT)^2 r^4}$$

где

Применение первого соотношения для растворов белков показывает, что при малых их концентрациях (менее 4%) в водных растворах действительно возрастает, а время корреляции падает с увеличением концентрации протеина.

Это явление было названо аномалией вращательной подвижности заряженных макромолекул.

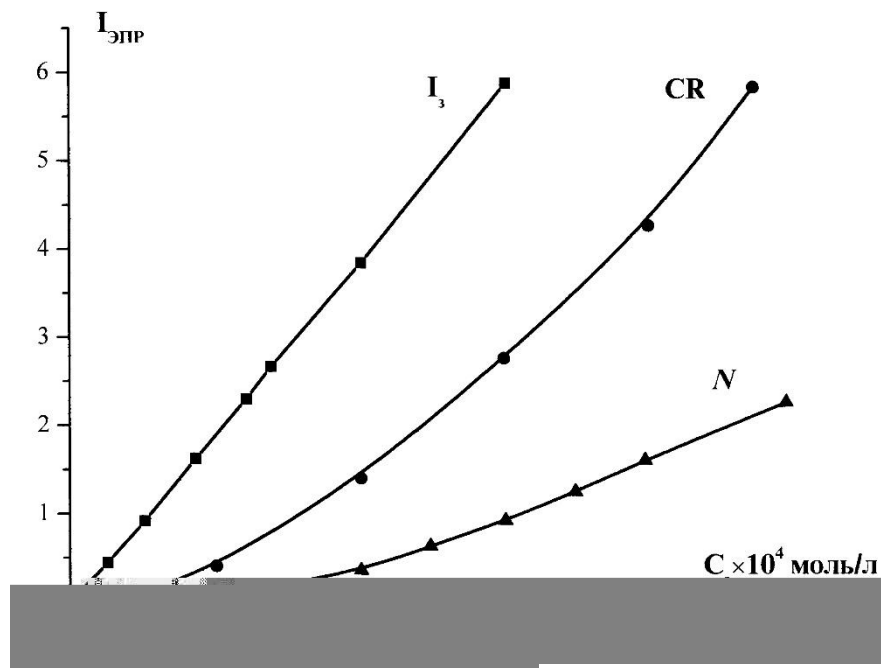
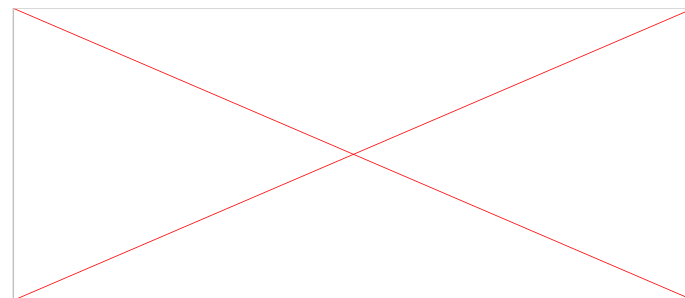
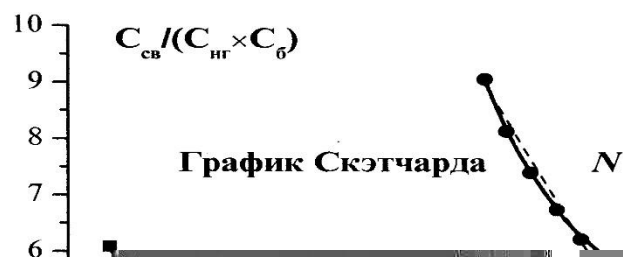


Рис.14

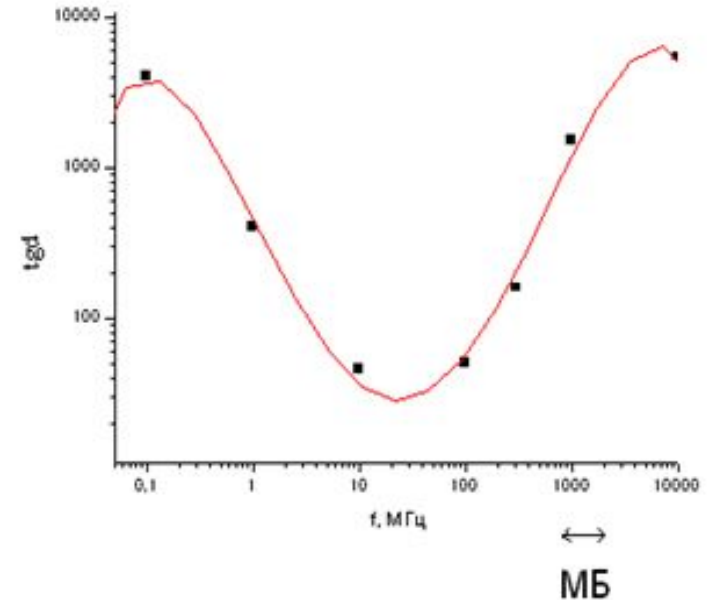


$$k_a = 1/v \exp(-E_a / kT)$$



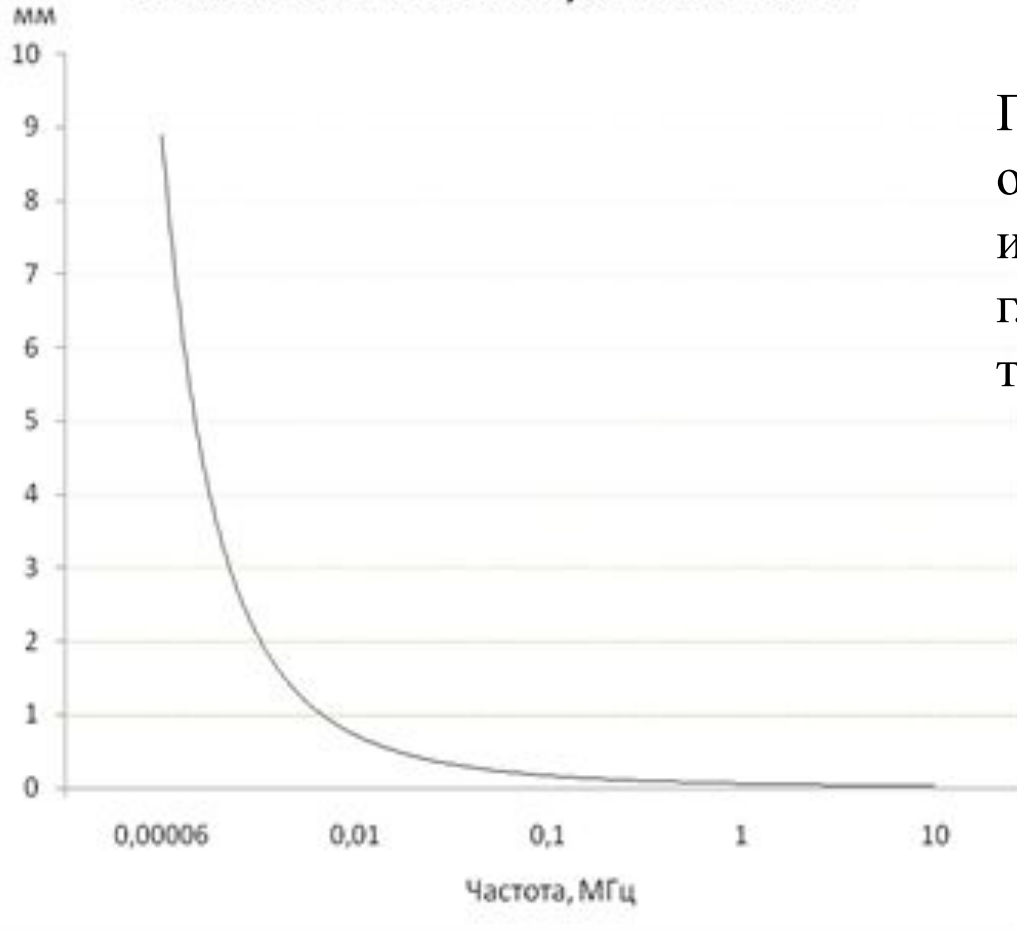
ЭПР томография

Для получения 2-х или 3-х мерной картины распределения концентрации парамагнитных молекул, например O_2 и $\cdot N=O$, необходимо создание градиентов магнитного поля в 2х или 3х направлениях.



Обычные ЭПР спектрометры работают на высоких частотах в области нескольких ГГц и выше, и используют СВЧ технику (резонаторы, волноводы и специальные генераторы, такие как клистроны и туннельные диоды). Для целей томографии используют приборы, работающие в области нескольких десятков МГц (для минимизации поглощения водой и водосодержащими тканями). Поглощаемая мощность зависит от параметра, известного как тангенс угла потерь $\tan \delta$, соответствующая зависимость представлена на рисунке 15.

Частотная зависимость глубины скин-слоя

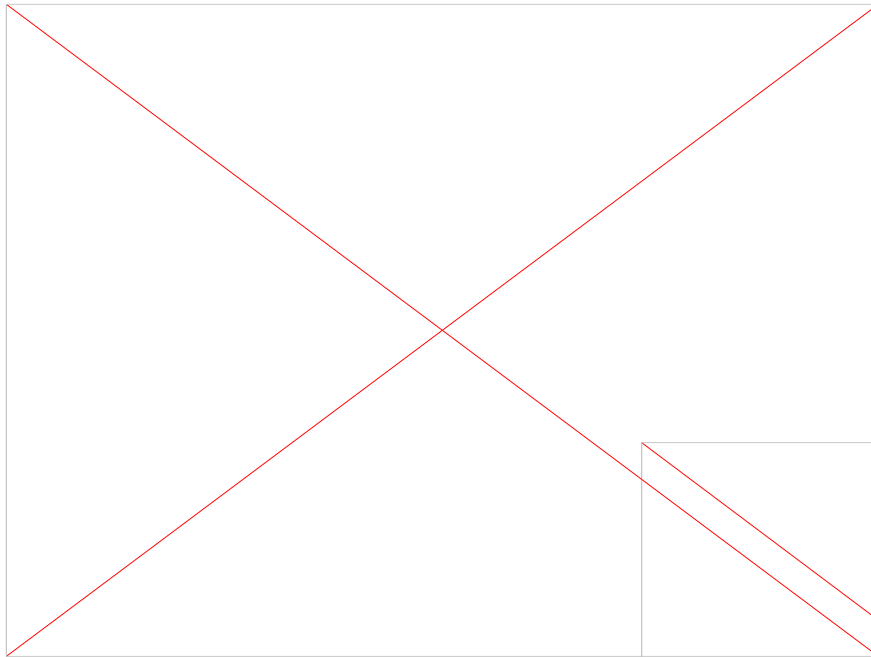


При работе с большими объектами: малыми животными или в перспективе с человеком, главным параметром является толщина скин-слоя d :

здесь μ_m - относительная магнитная проницаемость

ЭПР изображение распределения по образцу NO-радикала

Медицинский ЭПР томограф



С помощью ЭПР томографов можно исследовать концентрацию кислорода, как в сосудах, так и в работающем сердце. Согласно теории Смолуховского:

$$\omega = 4pRp(D_{SL} + D_{O_2}) [O_2]$$

приводит к уширению линии

$$\Delta\omega = k D_{O_2} [O_2]$$

Количественные различия между ЭПР и ЯМР

	$\frac{m_N}{m_e} = 1833$	$\frac{\beta_e}{\beta_N} = 1833$
$h\nu = g\beta H$	ЭПР: $\nu = 10^{10} \text{ Гц}$ $\lambda = 3 \text{ см}$	ЯМР: $\nu = 8 \cdot 10^8 \text{ Гц}$ $\lambda = 40 \text{ см}$
	ЭПР: $\frac{N_{-\mu} - N_{+\mu}}{N_{-\mu} + N_{+\mu}} = 10^{-3}$	ЯМР: $\frac{N_{-\mu} - N_{+\mu}}{N_{-\mu} + N_{+\mu}} = 10^{-6}$
$T = \frac{T_1 + 2T_2}{2T_1T_2}$	ЭПР: $T \approx 10^{-8} \div 10^{-5} \text{ с}$	ЯМР: $T \approx 10^{-1} \div 10 \text{ с}$

ЛИТЕРАТУРА

1. *Блюменфельд Л.А., Тихонов А.Н.* Электронный парамагнитный резонанс // Соросовский Образовательный Журнал. 1997. № 9. С. 91–99.
2. *Тихонов А.Н.* Трансформация энергии в хлоропластах — энергопреобразующих органеллах растительной клетки // Там же. 1996. № 4. С. 24–32.
3. *Климов В.В.* Окисление воды и выделение молекулярного кислорода при фотосинтезе // Там же. № 11. С. 9–12.
4. *Koshland D.E., Jr.* The Molecule of the Year // Science. 1992. Vol. 258. P. 1861.
5. *Ванин А.Ф., Налбандян Р.М.* Свободные радикалы нового типа в дрожжевых клетках // Биофизика. 1966. Т. 10. С. 167.