

*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 гиромангнитным отношением ( $\gamma$ ), которое для спинового движения составляет

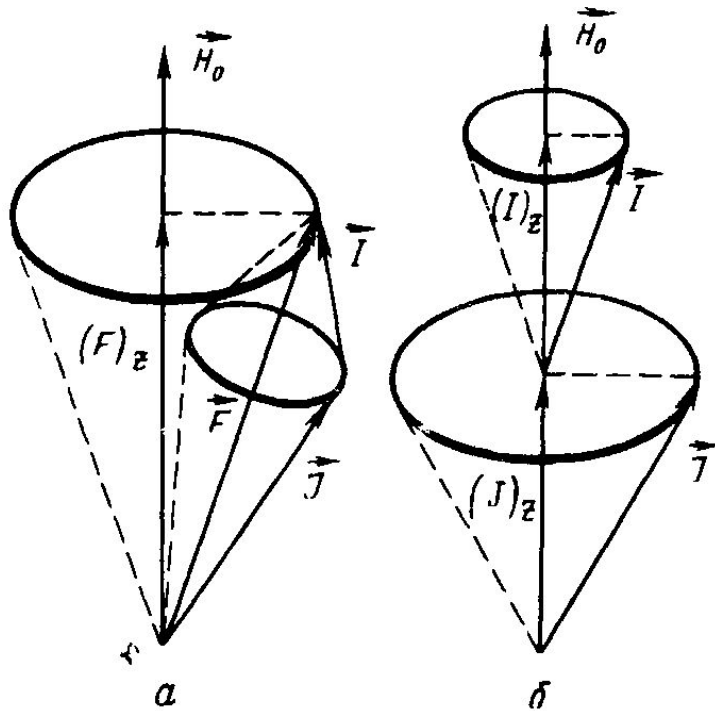
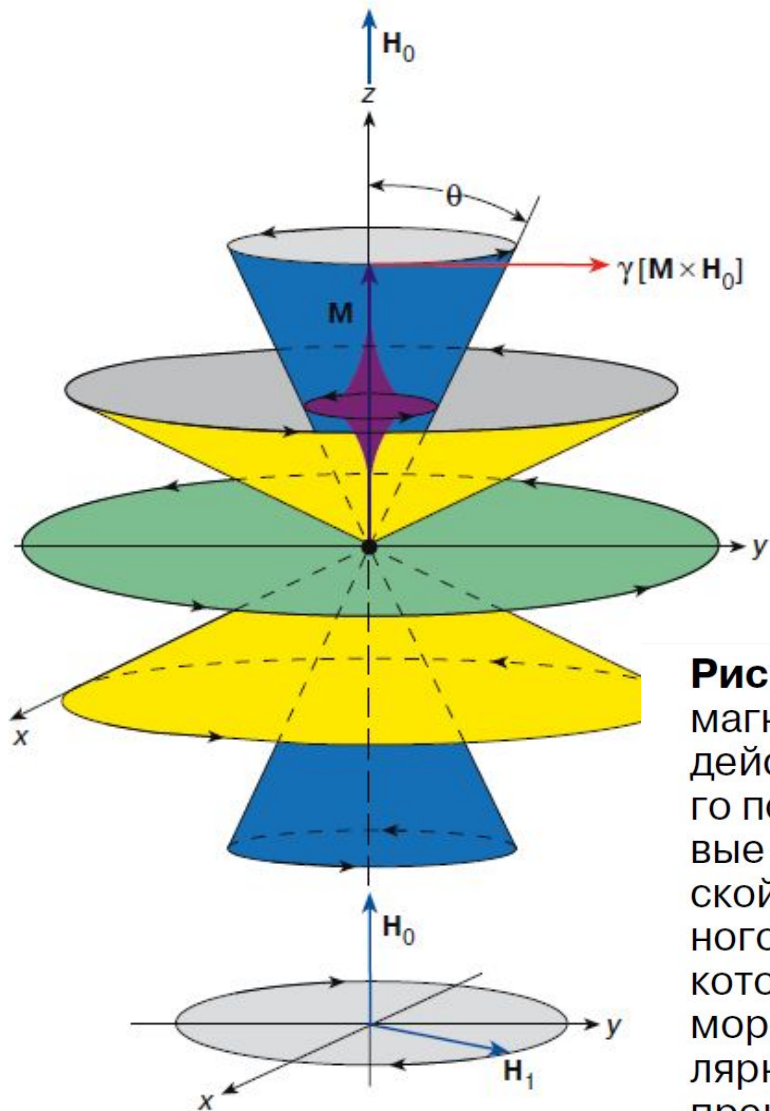


Рис.1 Прецессия магнитного момента в а) слабом поле, б) сильном внешнем поле

Для гиромангнитного 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:

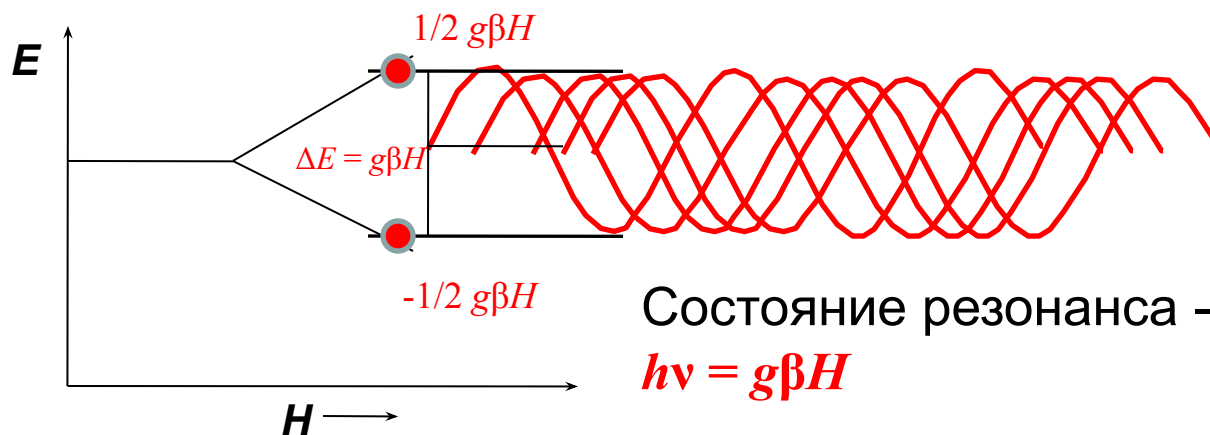


**Рис. 2.** Прецессия магнитного момента  $\mathbf{M}$  парамагнетика в постоянном магнитном поле  $\mathbf{H}_0$ . Под действием вращательного момента, создаваемого полем  $\mathbf{H}_0$ , магнитный момент совершает круговые вращения по образующей конуса с ларморовской частотой  $\omega_L = \gamma H_0$ . 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  $\theta$  сопровождается поглощением энергии электромагнитного поля, уменьшение  $\theta$  – излучением с частотой  $\omega$ .

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.

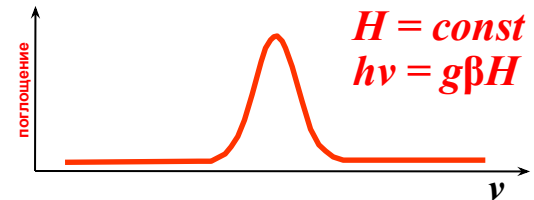
С ростом температуры спин-решеточное взаимодействие увеличивается, а  $T_1$  падает.

**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.

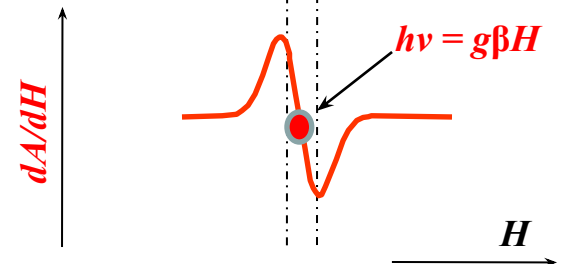
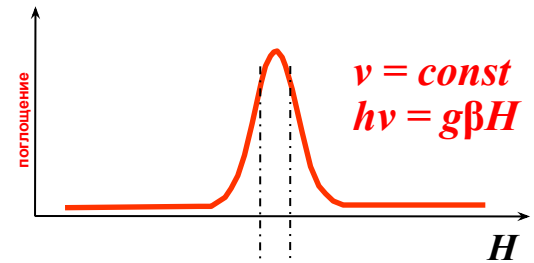
# Что такое спектр ЭПР?

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.



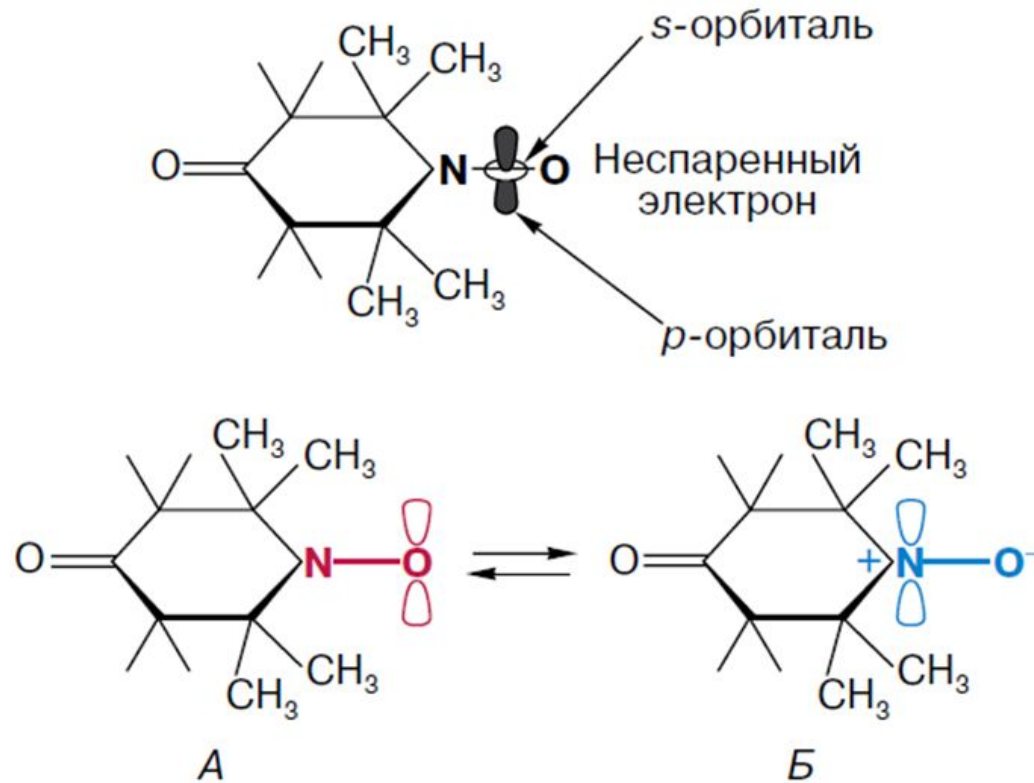
# ШИРИНА СПЕКТРАЛЬНОЙ ЛИНИИ

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

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

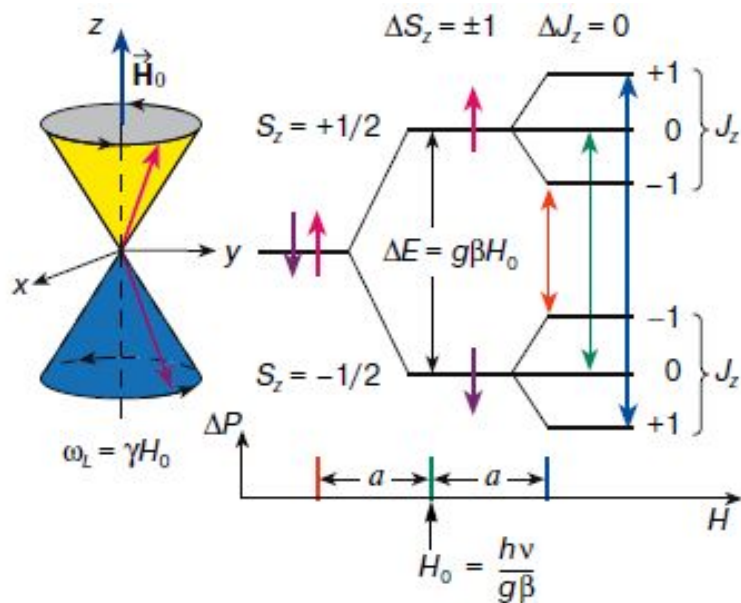
Времена релаксации  $T_1$  и  $T_2$  зависят от природы парамагнитных центров, окружения, молекулярной подвижности.  $T_1$  и от температуры.

# 1,1,4,4 - тетраметилпиперидиноксил



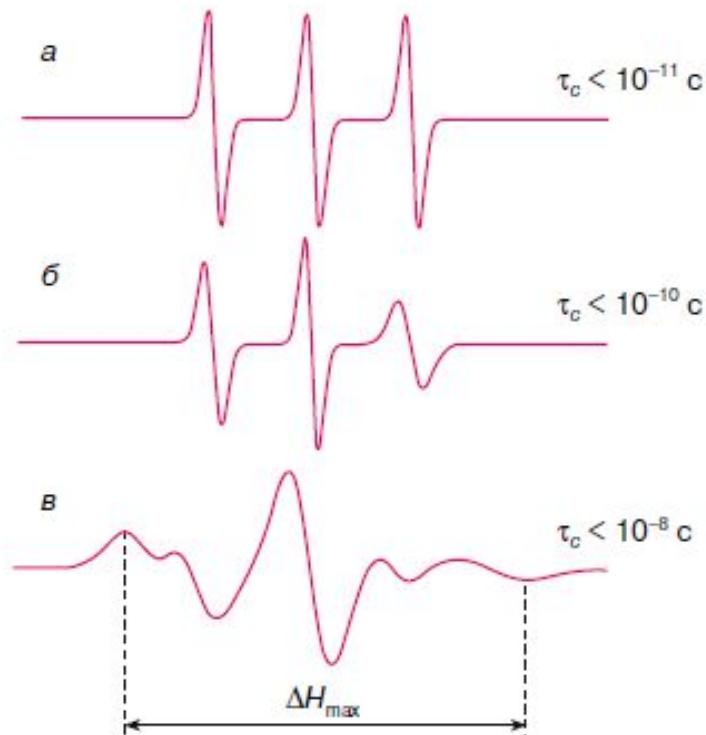
**Рис.4.** Химическое строение спиновой метки: А и Б – две валентные структуры нитроксильного радикала.





**Рис.5** Схема энергетических уровней, иллюстрирующая возникновение сверхтонкой структуры спектра ЭПР парамагнитной молекулы  $\text{NO}^*$

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

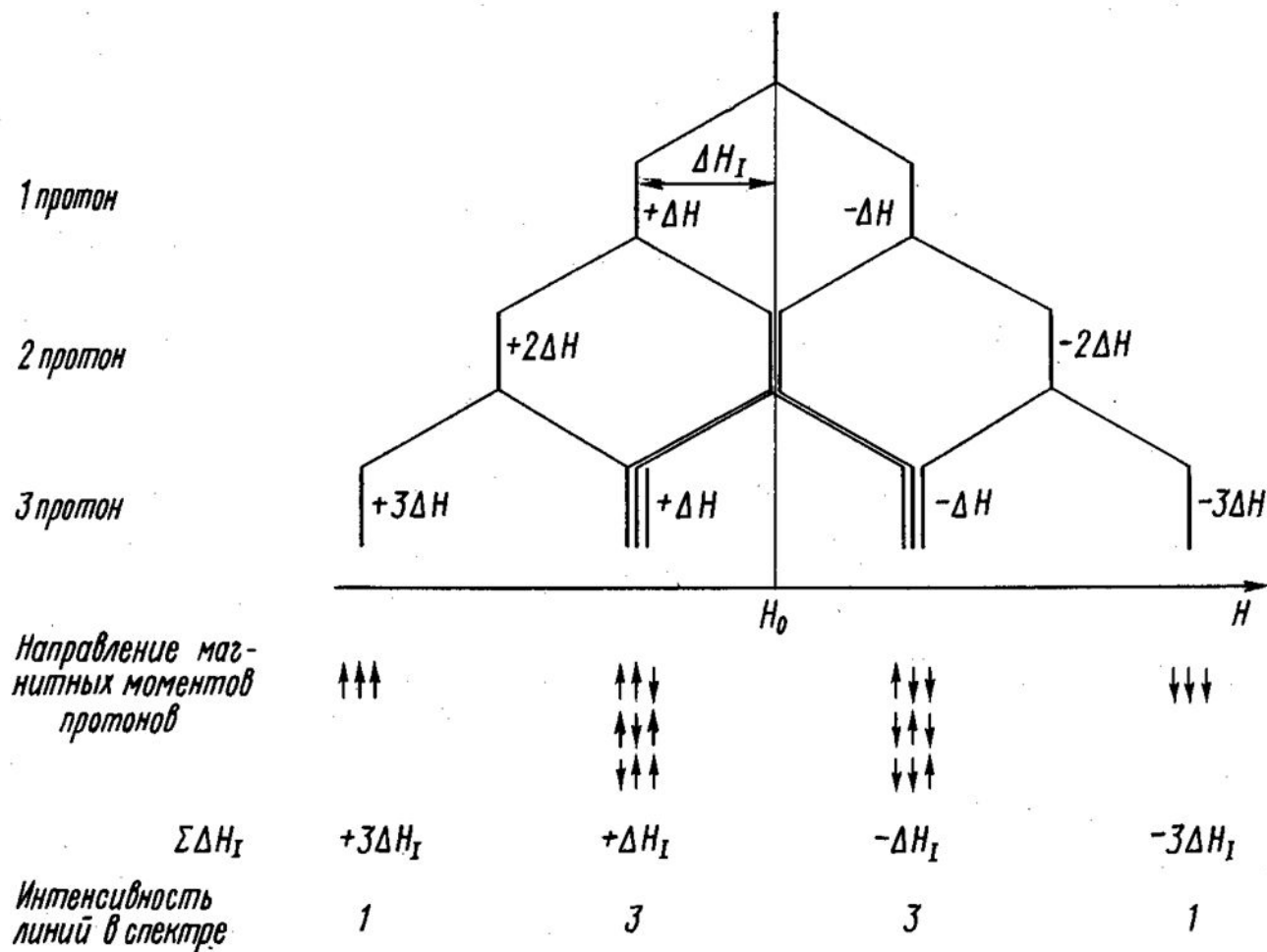


# ФОРМА СПЕКТРА ЭПР

Почему форма спектра ЭПР зависит от ориентации радикала? Связано это с тем, что расстояние между электронными подуровнями зависит от угла  $\theta$  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  $\theta$  между ними:

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

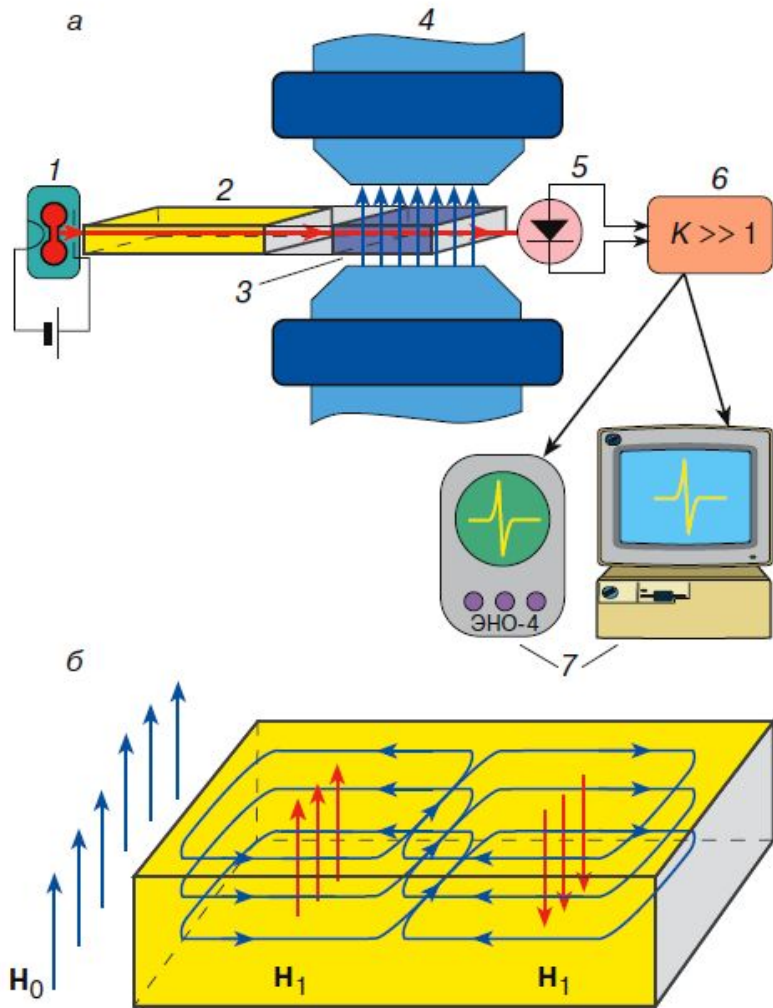
**Рис.6.** СТС, возникающая при взаимодействии неспаренного электрона с тремя эквивалентными протонами



# 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	$I = 1/2$	$^1_1\text{H}$ $^{15}_7\text{N}$
нечетный	четное	нечетное	$I = 1$	$^{14}_7\text{N}$ $^2_1\text{D}$

# 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.

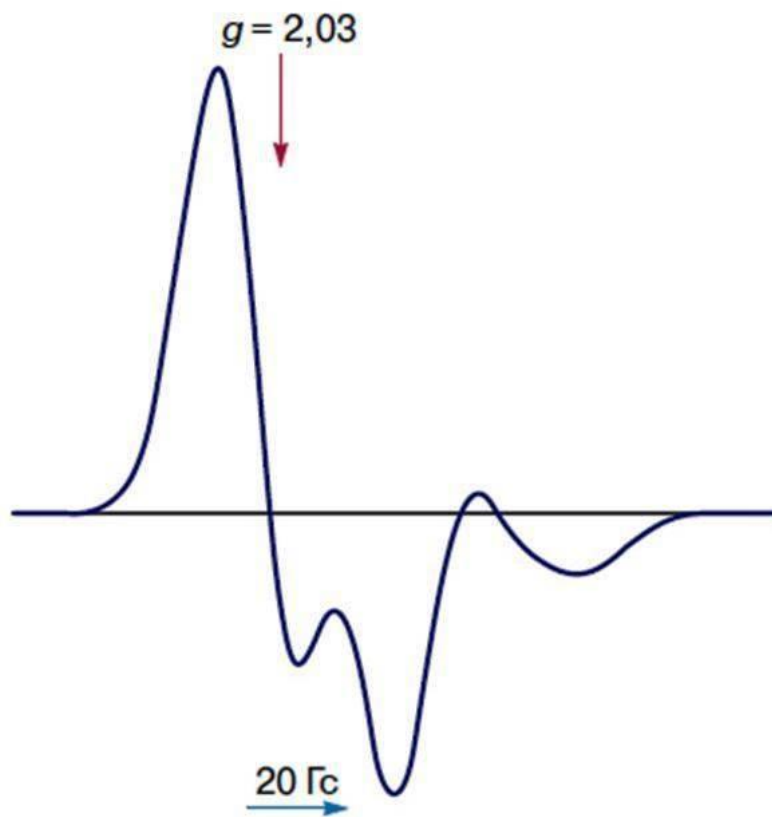
2. Волноводы – полые металлические трубы, имеющие в сечении прямоугольную форму. Волноводы предназначены для передачи электромагнитного СВЧ-излучения от генератора к образцу и от образца к детектору мощности СВЧ.

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  $I$  от дозы дополнительно ионизирующего облучения (б). Значение  $D_0$ , полученное путем линейной экстраполяции зависимости сигнала  $I$  от от дозы дополнительного облучения образца, соответствует дозе, полученной организмом

**Рис.10** Типичный спектр ЭПР для раствора альбумина.

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

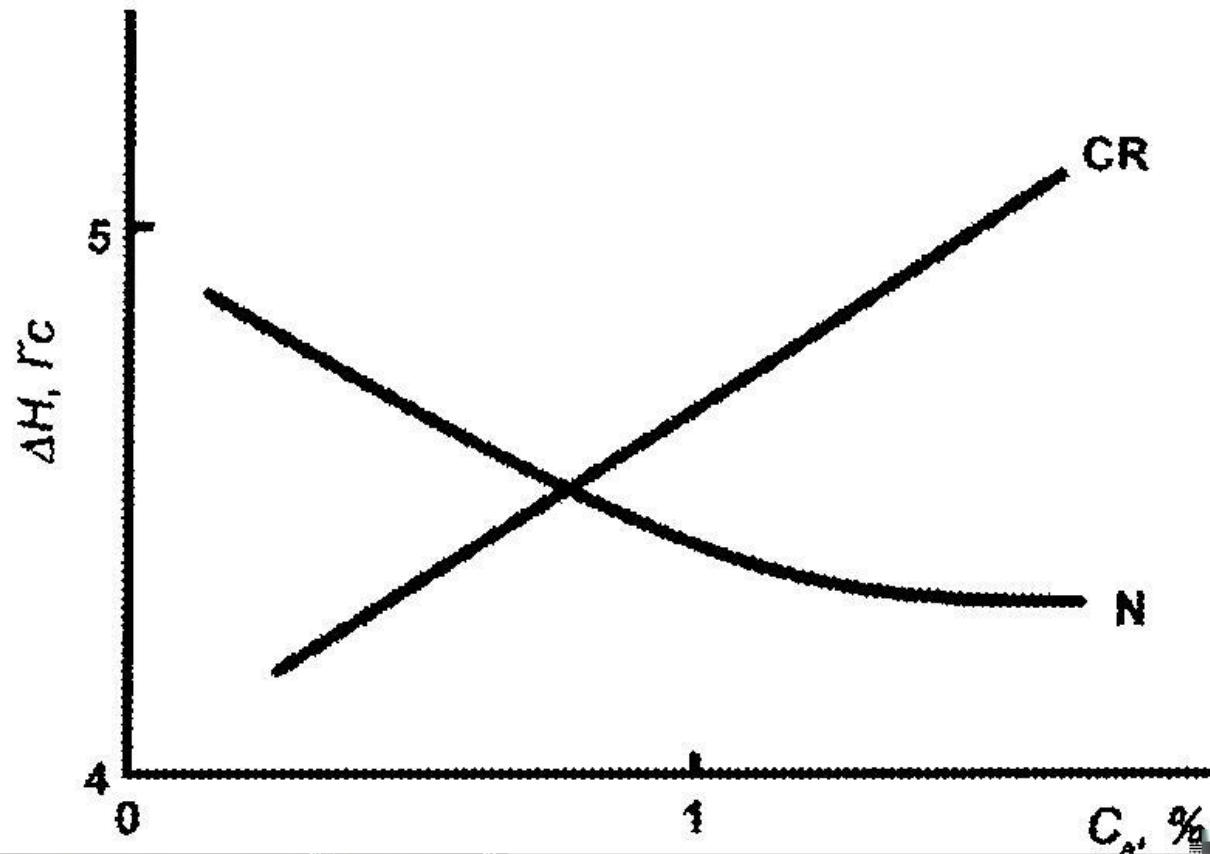
Основным параметром является коэффициент  $\beta$ , который характеризует сорбционные свойства нитроксильных радикалов в липидной фазе альбумина. Он рассчитывается как отношение амплитуды левой линии спектра ЭПР, характеризующую связывание радикала с белком (величина  $I_A$ ), к амплитуде узкой правой 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  $\beta$  - 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



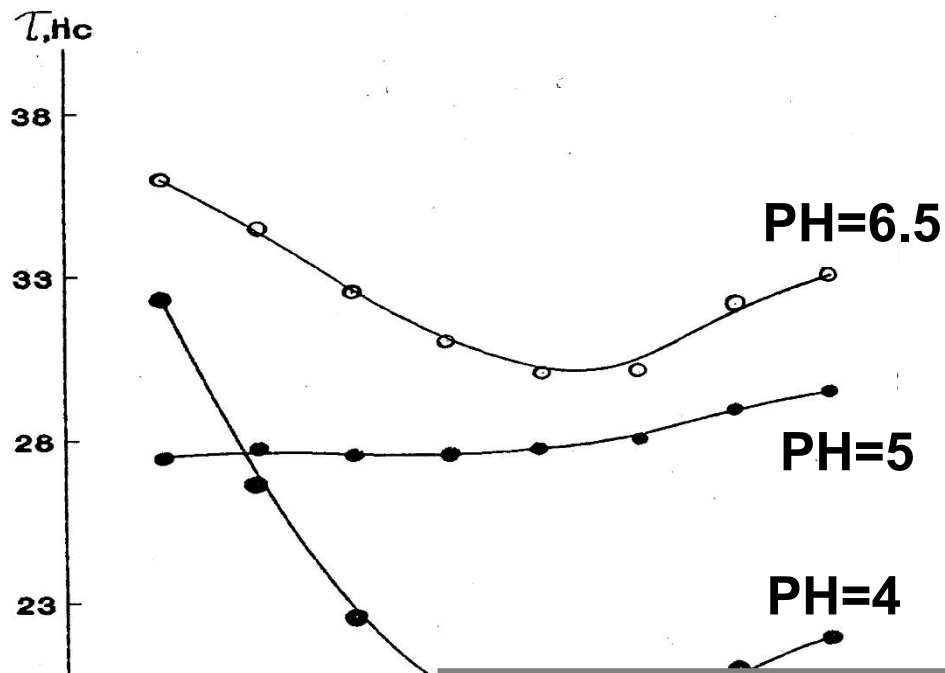
# ЭПР-спектр альбумина

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

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

$$S = A'_z/A_z$$

**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.

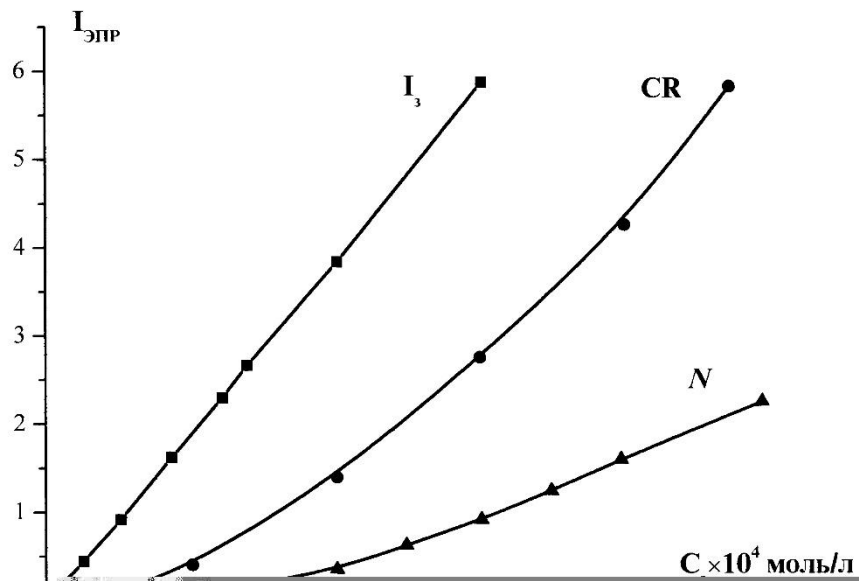
$$\tau = \frac{\xi_g + \xi_{el}}{6kT} = \tau_g^0 (1 + \alpha c) + \tau_{el}^0 (1 - \beta c)$$

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

где

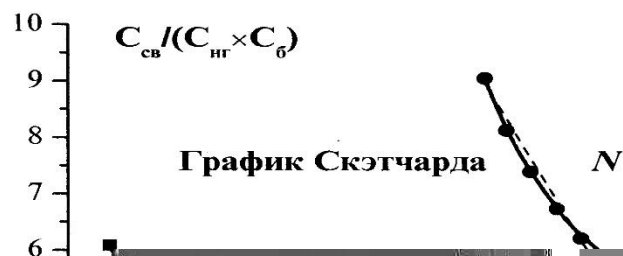
Применение первого соотношения для растворов белков показывает, что при малых их концентрациях (менее 4%) в водных растворах действительно возрастает, а время корреляции падает с увеличением концентрации протеина.

Это явление было названо аномалией вращательной подвижности заряженных макромолекул.



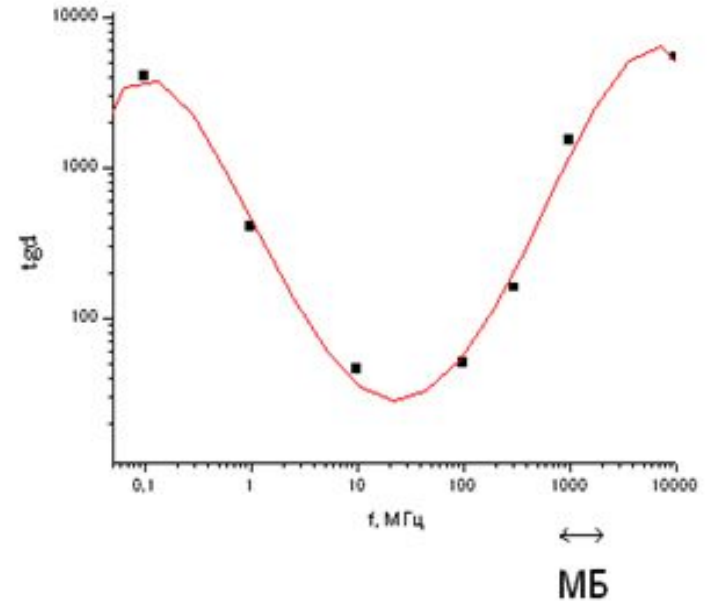
$$k_a = 1/v \exp(-E_a / kT)$$

Рис.14



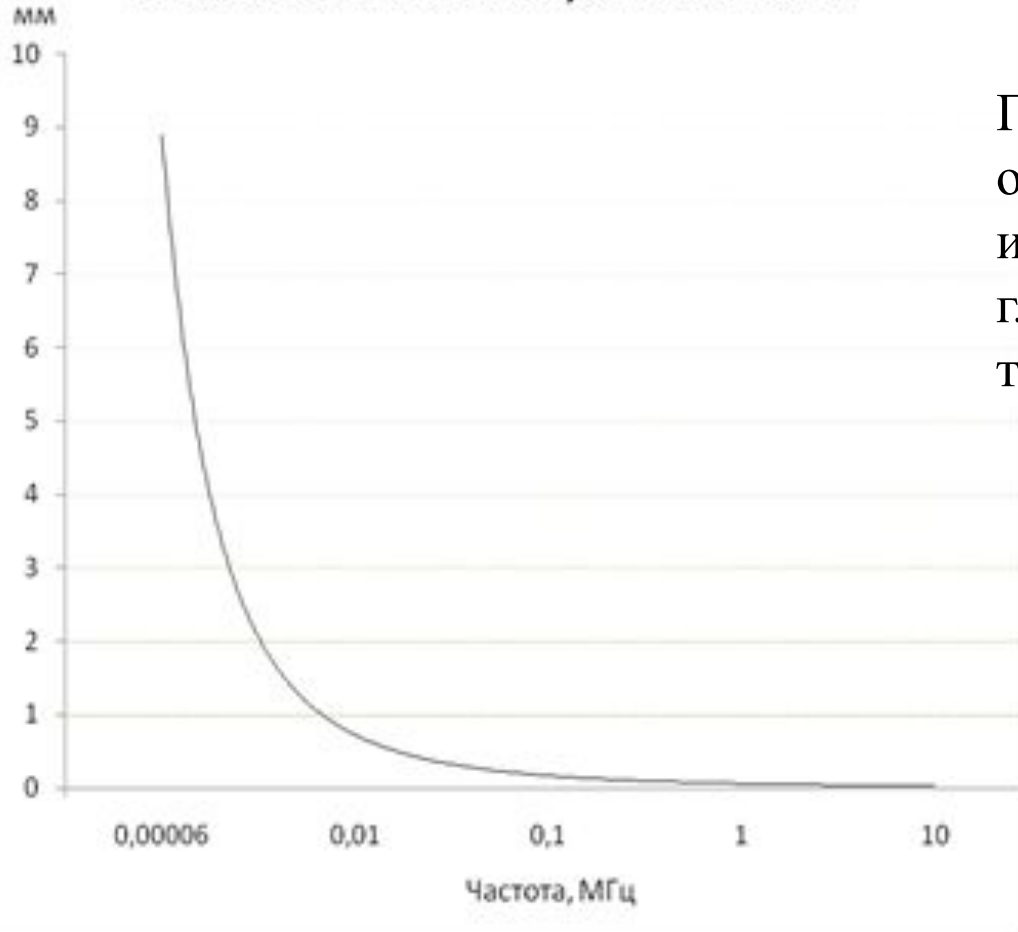
# ЭПР томография

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  $\text{tg} \delta$ , 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  $\mu_m$  - 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:

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

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.