

Электронный парамагнитный резонанс

Физические основы метода

Лекция 1

Явление ЭПР

Суть явления электронного парамагнитного резонанса заключается в резонансном поглощении слабого электромагнитного поля парамагнитным образцом, находящимся в постоянном магнитном поле.

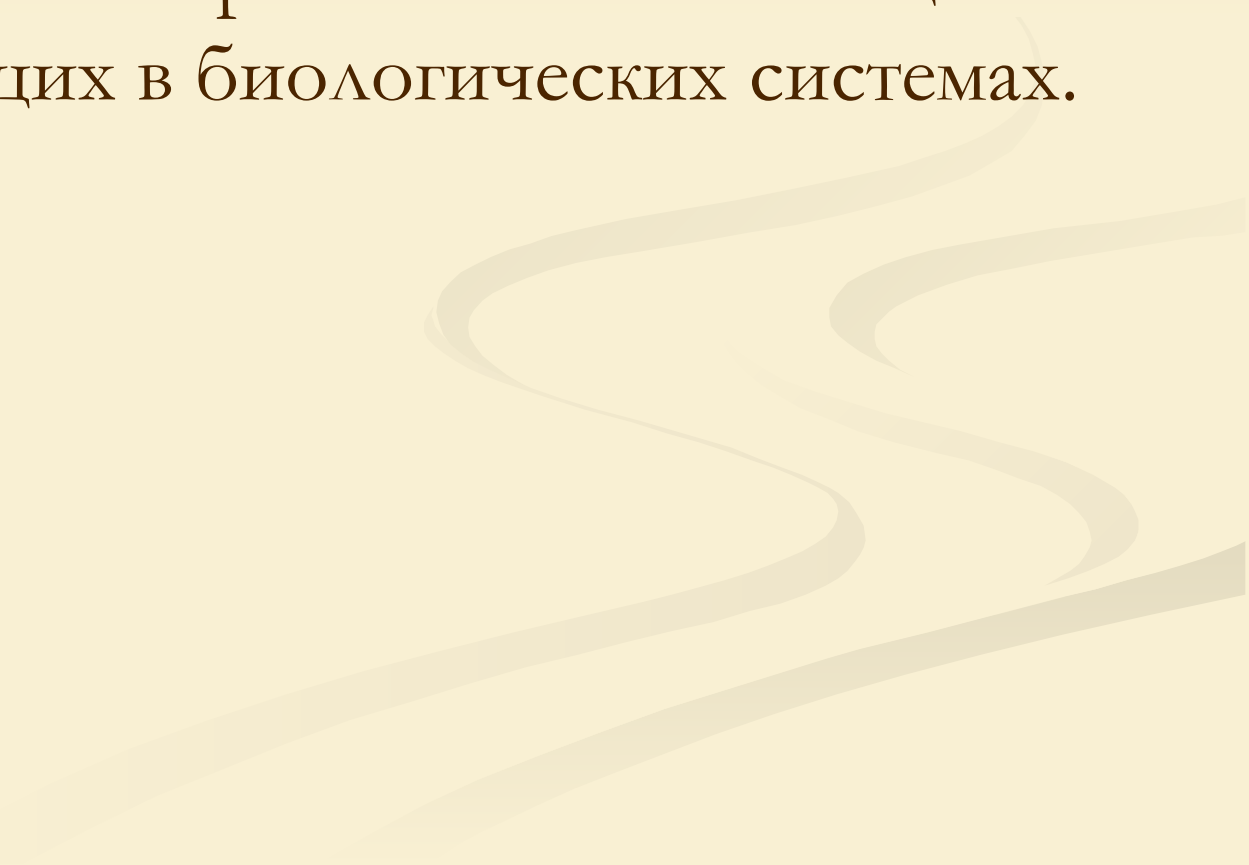
Явление открыто в **1944** г. в Казанском Университете **Е. К. ЗАВОЙСКИМ** при исследовании поглощения электромагнитной энергии парамагнитными солями металлов.

Монокристалл **CuCl_2** , помещенный в постоянное магнитное поле 40 гаусс (**$B=4$ мТл**) начинает поглощать микроволновое излучение с частотой около **$\nu=133$ МГц**.

В СССР в 1958 году впервые
Л.А. Блюменфельд и А.Э. Калмансон
применили метод ЭПР в биологических
исследованиях

при изучении свободных радикалов,
полученных под действием ионизирующего
излучения на белки.

Метод , основанный на явлении ЭПР, является
ОСНОВНЫМ МЕТОДОМ
для изучения парамагнитных частиц
присутствующих в биологических системах.



Парамагнитные частицы имеющим важное биологическое значение и состояния исследуемые методом ЭПР

- свободные радикалы
- металлы переменной валентности или их комплексы (Fe, Cu, Co, Ni, Mn)

а также

- триплетные состояния, возникающие, например, в ходе фотобиологических процессов

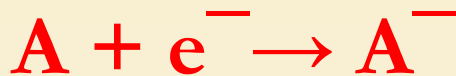
Свободные радикалы— частицы (как правило, неустойчивые), содержащие один или несколько неспаренных электронов на внешней электронной оболочке.

молекулы O_2 (в основном, триплетном состоянии), NO , NO_2 , ClO_2

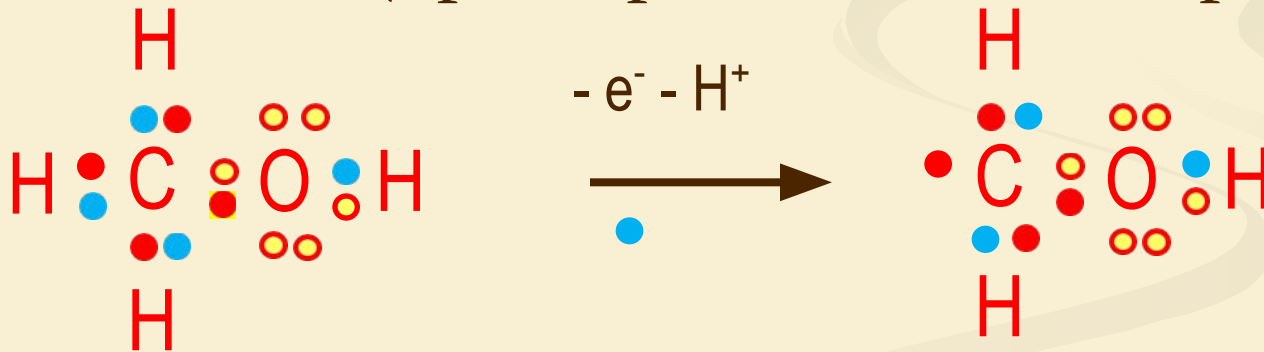
- Радикал может образоваться в результате *потери* одного электрона нерадикальной молекулой:



- или при *получении* одного электрона нерадикальной молекулой:



- органические радикалы образуются, например, при окислении (при отрыве атома водорода) :

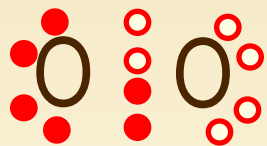


метанол

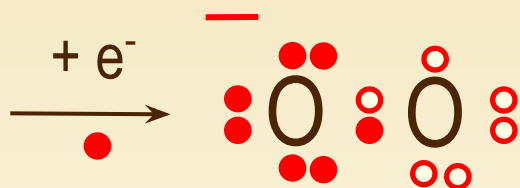
радикал метанола

Свободные радикалы

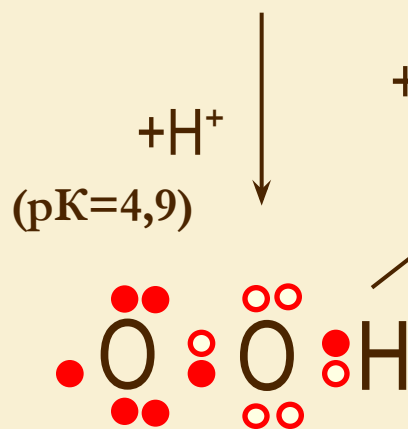
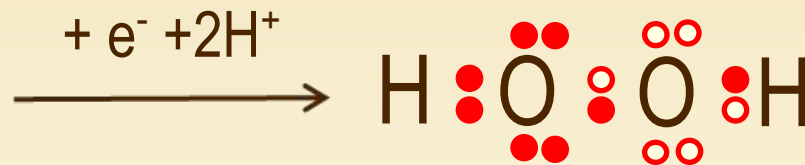
Кислород



Супероксидный радикал



Перекись водорода



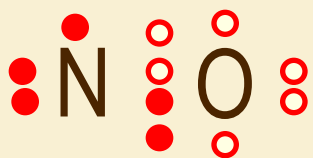
+ e⁻ + H⁺

+ e⁻ + H⁺



Гидроперексный радикал

Гидроксильный радикал

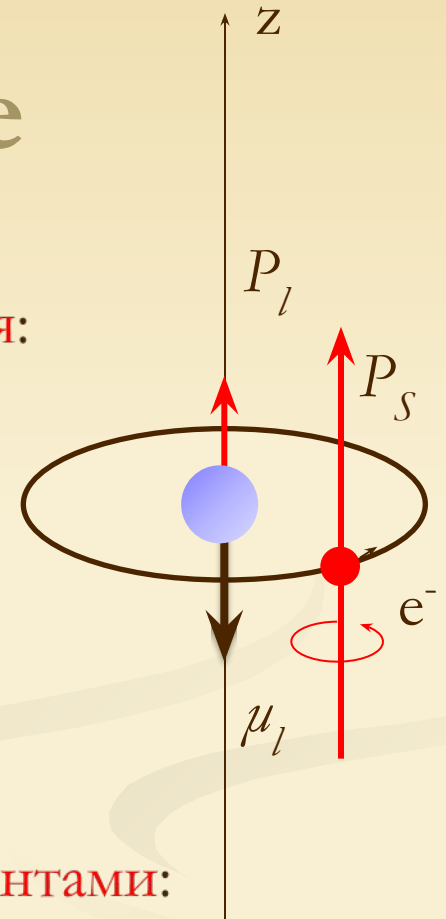


Нитроксильный радикал

Электрон в атоме

■ Электрон в атоме участвует в **двух видах движения**:

- 1) Орбитальном (n, l, m)
- 2) Спиновом (s)



Каждый вид движения характеризуют **два момента**:

- 1) Механическим (P)
- 2) Магнитным (μ)

Квантовые числа

Состояние каждого электрона в атоме обычно описывают с помощью **четырёх квантовых чисел**: n , l , m (характеризуют движение электрона в пространстве) и s - вокруг собственной оси.

1. Главное квантовое число n : $n=1, 2, \dots$

определяет полную энергию электрона в любом квантовом состоянии

2. Орбитальное квантовое число l : $l=0, 1, 2, \dots, (n-1)$

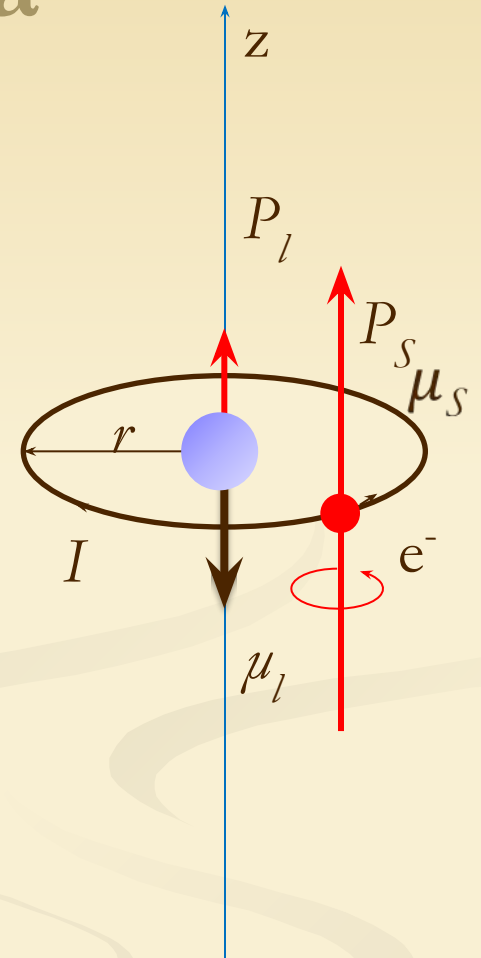
характеризует форму орбиталей, определяет квантование орбитального момента импульса электрона и орбитального магнитного момента в сферически симметричном кулоновском поле ядра.

3. Магнитное квантовое число m : $m=0, \pm 1, \pm 2, \dots, \pm l$

характеризует пространственное расположение орбитали, определяет квантование проекции орбитального, спинового и суммарного моментов на выделенное в пространстве направление

4. Спиновое квантовое число s : $s=\pm 1/2$

характеризует магнитный момент, возникающий при вращении электрона вокруг своей оси, s — собственный момент импульса элементарных частиц.



Орбитальные механический и магнитный моменты электрона

Орбитальный механический момент

классический

$$P_l = mvr$$

из квантовой физики

$$P_l = \hbar n$$

Орбитальный магнитный момент

$$\mu_l = IS$$

$$S = \pi r^2$$

$$I = \frac{ve}{2\pi r}$$

$$\Rightarrow \mu_l = \frac{vre}{2}$$

$$\Rightarrow \mu_l = \frac{e}{2m} P_l$$

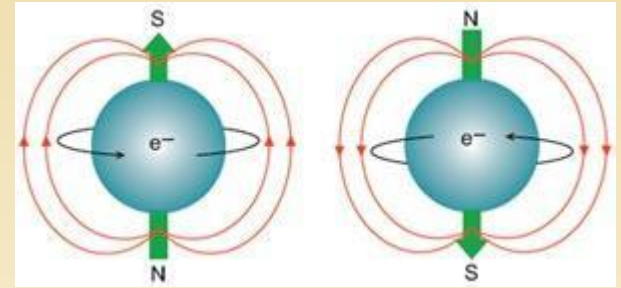
$$\mu_l = \frac{e}{2m} \hbar n$$

$$\mu_l = \beta n$$

$$\beta = \frac{e\hbar}{2m} \text{ - магнетон Бора}$$

m - масса, v - скорость, e - заряд, r - радиус орбиты электрона, I - сила тока в контуре, а S - площадь контура, $\hbar = h/2\pi = 1,055 \cdot 10^{-34} \text{ Дж}\cdot\text{с}$ - постоянная Дирака - единица измерения механического момента импульса, $h = 6,626 \cdot 10^{-34} \text{ Дж}\cdot\text{с}$ - постоянная Планка, $\beta = 9,27 \cdot 10^{-21} \text{ Дж/м}\cdot\text{Тл}$ - единица измерения магнитного момента электронов и атомов

Спин



Спин — собственный момент импульса элементарных частиц.

Спин измеряется в единицах \hbar (приведённая постоянная Планка) и равен $\hbar J$, где J — характерное для каждого сорта частиц целое (в т.ч. нулевое) или полуцелое положительное число — **спиновое квантовое число**, или спин.

Все элементарные частицы **по величине спина** делятся на два класса:

бозоны — частицы с целым спином (например, фотон) - \hbar .

фермионы — частицы с полуцелым спином (например, электрон, протон, нейтрон, нейтрино) - $\hbar/2$;

Спин J ядра наряду с его массой M является **механической характеристикой системы нуклонов**. Спин ядра J складывается из спиновых $s_1 - s_A$ и орбитальных $l_1 - l_A$ моментов отдельных нуклонов: нуклоны обладают собственным механическим моментом, или спином, равным $\hbar/2$, орбитальные моменты принимают только целочисленные значения \hbar

$$S = \sum_i s_i$$

$$L = \sum_i l_i$$

$$J = \sum_i j_i$$

$$j_i = s_i + l_i$$

Для спинов атомных ядер экспериментально установлены следующие закономерности:
если A – чётное, то $J = n$ ($n = 0, 1, 2, 3, \dots$), т.е. спин ядра имеет **целочисленное** значение;

если A – нечётное, то $J = n + 1/2$, т.е. спин ядра имеет **полуцелое** значение;

чётно-чётные ядра в основном состоянии имеют значение спина **$J = 0$** , что указывает на взаимную компенсацию моментов нуклонов в основном состоянии ядра – особое свойство межнуклонного взаимодействия.

Спиновые механический и магнитный моменты электрона

$$P_s = \hbar s$$

$$\mu_s = \frac{e}{m} P_s$$

$$\mu_s = \frac{e}{m} \hbar s$$



$$\mu_s = 2\beta s = \beta$$

μ_s – спиновый магнитный момент, P_s – спиновый механический момент,
 s – спиновое квантовое число. $s=1/2$

Полные механический и магнитный моменты электрона

Полный механический момент

$$\underline{p}_j = \underline{p}_l + \underline{p}_s$$

Полный магнитный момент

$$\underline{\mu}_j = \underline{\mu}_l + \underline{\mu}_s$$

Во многих случаях, орбитальный магнитный момент равен нулю. Поэтому при обсуждении принципа метода ЭПР рассматривается только спиновый магнитный момент.

g-фактор

(магнитомеханическое отношение)

$$\mu_s = \frac{e}{m} P_s$$

$$\mu_l = \frac{e}{2m} P_l$$

$$\mu_j = g \frac{e}{2m} P_j$$

$g=2$ - для
свободного
электрона ($l=0$)

$g=1$ - в случае
магнетизма,
обусловленного
орбитальным
движением
электрона

g-фактор используют для удобства учета вклада орбитального и спинового магнитных моментов в суммарный магнитный момент электрона

Орбитальные и спиновые моменты атомов с несколькими электронами

магнитные свойства атома определяются значениями квантовых чисел S, L, J

$$S = \sum_i s_i, L = \sum_i l_i, J = \sum_i j_i$$

g -фактор может быть выражен через полные квантовые числа S, L, J

$$g = 1 + \frac{J(J+1) - L(L+1) + S(S+1)}{2J(J+1)}$$

Явление ЭПР

Физическая картина явления

Явление магнитного резонанса можно объяснить в рамках классической и квантовой физики.

Квантовомеханическая интерпретация ЭПР

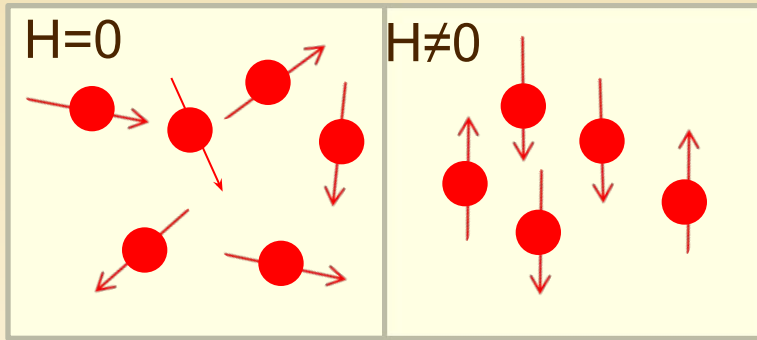
Для выяснения физической картины явления ЭПР рассмотрим, каким образом постоянное магнитное поле H_0 и переменное магнитное поле $H_1(t)$ влияют на энергетические уровни изолированного парамагнитного атома.

Магнитные свойства атома характеризуются значением квантового числа J — результирующего магнитного момента.

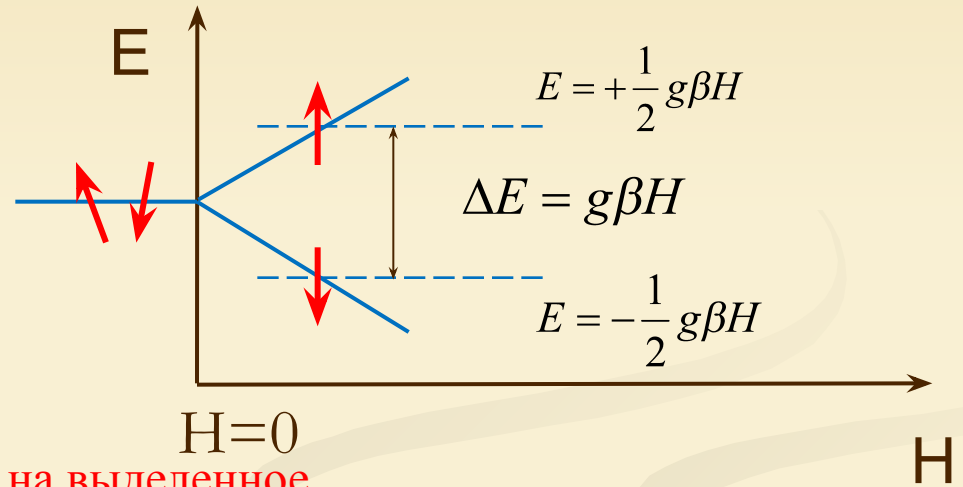
В большинстве химических и биологических систем, исследуемых методом ЭПР, орбитальные магнитные моменты L парамагнитных центров, как правило, либо равны нулю, либо практически не дают вклада в регистрируемые сигналы ЭПР, тогда будем считать, что парамагнитные свойства определяются суммарным спином атома S .

При отсутствии внешнего магнитного поля энергия свободного атома не зависит от ориентации спина. При включении внешнего магнитного поля H_0 происходит расщепление уровня энергии на $2S + 1$ подуровней, соответствующих различным проекциям суммарного спина S в направлении вектора H_0 .

Эффект Зеемана



Расщепление энергетических уровней электронов в магнитном поле



Энергия взаимодействия магнитного момента электрона с магнитным полем

$$E = -\underline{\mu} \underline{H} = -\mu H \cos(\underline{\mu} \underline{H})$$

Полный магнитный момент в проекции на выделенное направление, определяемое внешним магнитным полем

$$\mu_j = g \frac{e}{2m} P_j$$

$$\left. \begin{matrix} P_j = \hbar m_j \\ P_l \ll P_s \end{matrix} \right\} P_j = \hbar m_s$$

В большинстве случаев электронные орбитали сильно отличаются от сферических, поэтому орбитальный магнитный момент дает относительно небольшой вклад в полный магнитный момент. Для упрощения вычислений этим вкладом можно пренебречь.

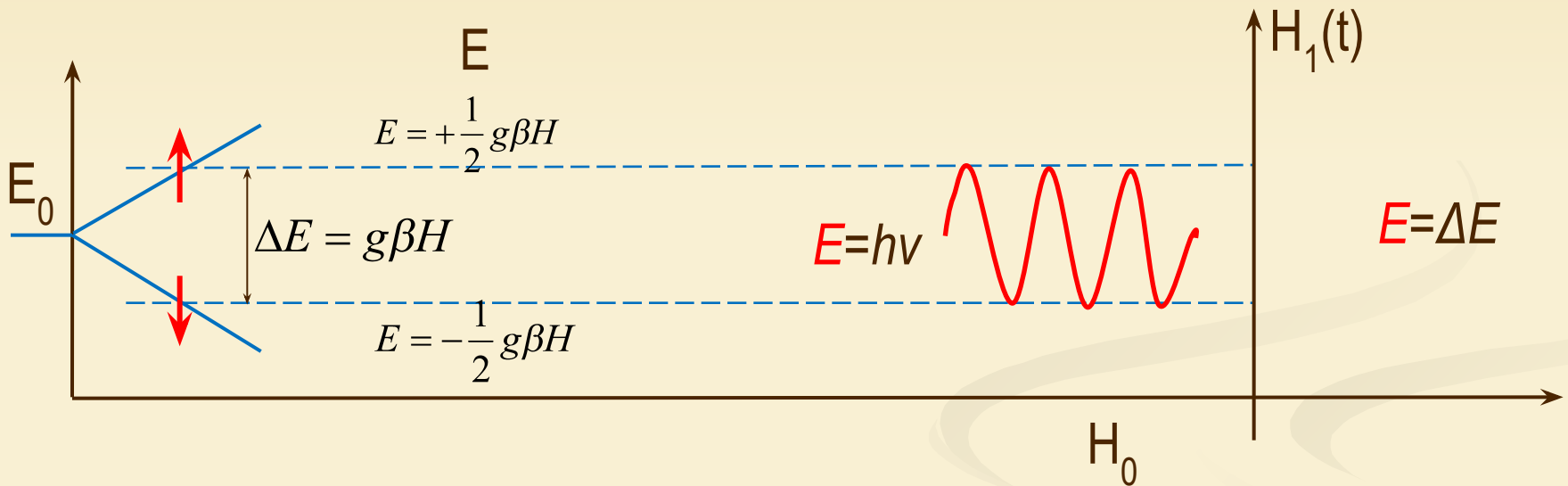
$$\mu_j = g \frac{e \hbar}{2m} m_s = \pm \frac{1}{2} g \beta \quad \implies \quad E = \mu_s H = \pm \frac{1}{2} g \beta H$$

В общем случае $E(m_s) = m_s g \beta H_0$

m_s – магнитное спиновое квантовое число $m_s = -s, \dots, s$, m_l – магнитное орбитальное квантовое число, $m_l = -l, \dots, 0, \dots, l$

Явление ЭПР

Поглощение электромагнитного излучения
неспаренными электронами, находящимися в магнитном поле



Основное уравнение резонанса

$$h\nu = g\beta H$$

Условием наблюдения этого эффекта является перпендикулярная ориентация магнитного вектора переменного поля $H_1(t)$ по отношению к направлению статического поля H_0 .

Принцип метода ЭПР

В основе метода ЭПР лежит явление ЭПР

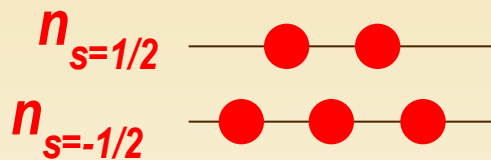
Если энергия квантов электромагнитного излучения, действующего на систему спинов во внешнем магнитном поле, равна разности энергий между соседними уровнями, то такое излучение будет вызывать переходы между энергетическими уровнями. $\Delta E = h\nu$

Если $H_1(t) \perp H_0$, вероятности индуцированных переходов как снизу вверх, так и сверху вниз одинаковы. Такие индуцированные переходы сопровождаются изменением ориентации спинов.

Согласно квантово-механическим правилам отбора, возможны лишь такие переходы (разрешенные), при которых значение магнитного квантового числа изменяется на величину $\Delta m_s = \pm 1$.

Переход с нижнего уровня на верхний сопровождается поглощением кванта электромагнитного излучения. Переход с верхнего уровня на нижний приводит к излучению кванта с энергией $h\nu$.

Согласно распределению Больцмана у парамагнетиков в состоянии термодинамического равновесия **заселенности** нижнего и верхнего энергетических **уровней различаются**.



$$\frac{n_{s=1/2}}{n_{s=-1/2}} = e^{-\frac{\Delta E}{kT}} = e^{-\frac{g\beta H}{kT}}$$

Т.к. $n_{s=1/2} / n_{s=-1/2} < 1$, электромагнитное излучение будет чаще индуцировать переходы снизу вверх (поглощение энергии), чем переходы сверху вниз (излучение энергии). Поэтому **в целом будет наблюдаться поглощение энергии** электромагнитного поля парамагнитным образцом.

Разность энергий соседних зеемановских уровней: $\Delta E = h\nu \ll kT$, частота излучения ν соответствует микроволновому или радиочастотному диапазону ($X \sim 3 \text{ см} (\sim 10^{10} \text{ Гц})$ при $H_0 \sim 3300 \text{ Гс}$).

$h = 6,62 * 10^{-34} \text{ Дж} * \text{с}$ – постоянная Планка, $k = 1,38 * 10^{-23} \text{ Дж/К}$ — постоянная Больцмана, T — абсолютная температура, $n_{s=-1/2}$ – число электронов с $s=-1/2$, $n_{s=1/2}$ – число электронов с $s=1/2$

Явление магнитной релаксации

Суть явления магнитной релаксации:

- парамагнитные частицы могут обмениваться энергией друг с другом;
- парамагнитные частицы могут взаимодействовать с окружающими их атомами и молекулами.

Благодаря быстрой безызлучательной релаксации спинов в системе восстанавливается практически равновесное соотношение заселенностей зеемановских подуровней, при котором заселенность нижнего уровня выше заселенности верхнего уровня ($n_{s=1/2} / n_{s=-1/2} < 1$).



Число индуцированных переходов снизу вверх, отвечающих поглощению энергии, будет всегда превышать число индуцированных переходов сверху вниз, то есть резонансное поглощение энергии электромагнитного излучения будет превалировать над излучением.

Классическая интерпретация ЭПР

Допустим, парамагнитные свойства образца определяются магнитными моментами μ_i , входящих в него частиц, например, магнитных моментов неспаренных электронов ($\gamma < 0$) парамагнитных атомов ИЛИ молекул

$$\vec{M} = \gamma \vec{P}$$

Если $H_0 = 0$, M ориентированы хаотически

Если $H_0 \neq 0$, уравнение движения M имеет вид:

$$\frac{dM(t)}{dt} = \gamma [M(t) \times H_0]$$

M совершает круговые вращения по образующей конуса с ларморовской частотой

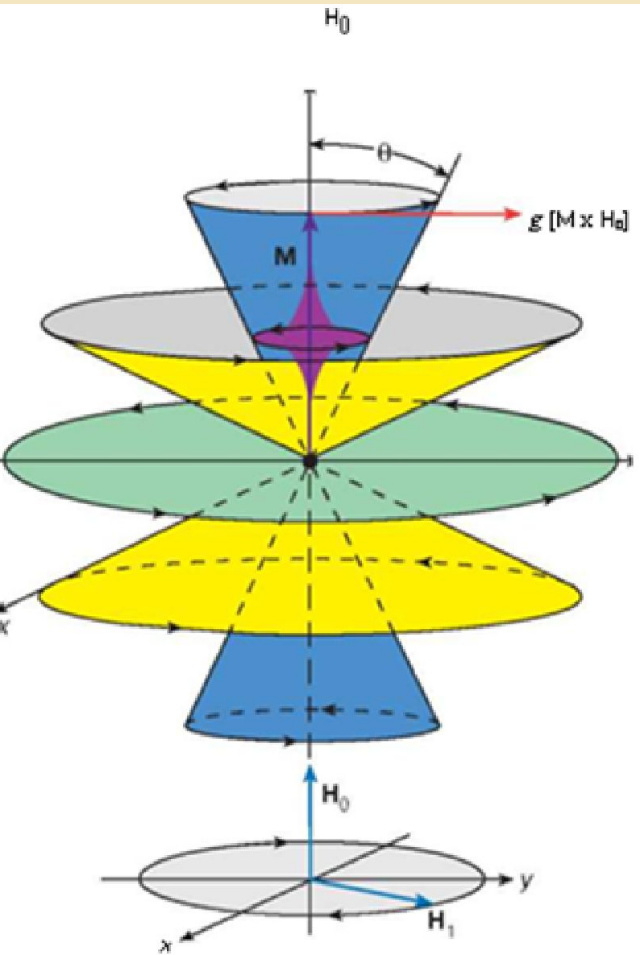
$$\omega_L = \gamma H_0.$$

Если $H_1(t) \perp H_0$, $H_1 \ll H_0$, $\omega_1 = 2\pi\nu_1$, возникает дополнительный момент

$$[M(t) \times H_1(t)]$$

Если $\omega_1 \neq \omega_L$, суммарный дополнительный момент = 0

Если $\omega_1 = \omega_L$ (резонанс), то векторы $M(t)$ и $H(t)$ будут вращаться синхронно ω_1 , и абсолютная величина дополнительного момента $\neq 0$. Под действием переменного поля угол прецессии станет периодически изменяться: вектор намагниченности $M(t)$ будет то приближаться к плоскости (xy), то удаляться от нее.



Прецессия магнитного момента M парамагнетика в постоянном магнитном поле H_0

Энергия магнитного момента M

во внешнем магнитном поле

$$E = - (\mathbf{M} \times \mathbf{H}) = - |\mathbf{M}| \times |\mathbf{H}| \times \cos \theta.$$

Если не учитывать процессы магнитной релаксации, то оказывается, что в течение полупериода, когда вектор $\mathbf{M}(t)$ приближается по направлению к вектору внешнего магнитного поля \mathbf{H}_0 (угол прецессии θ уменьшается), *энергия парамагнетика уменьшается и излучается образцом*, а во время следующего полупериода (угол прецессии θ увеличивается) *энергия парамагнетика увеличивается за счет поглощения энергии переменного магнитного поля $\mathbf{H}_1(t)$.*

Казалось бы, в целом парамагнитный образец не должен поглощать энергию электромагнитного излучения. Однако спины могут безызлучательно (в виде тепла) отдавать поглощаемую ими энергию решетке, в результате чего резонансное поглощение энергии будет преобладать над излучением.

Условием резонансного поглощения энергии электромагнитного излучения является не только равенство частот ω_1 и $c \omega_L$, но и совпадение направления круговой поляризации переменного поля $H_1(t)$ с направлением прецессии вектора намагниченности $M(t)$ в поле H_0 .

На практике пользуются линейно поляризованным электромагнитным излучением, которое всегда можно представить в виде суперпозиции двух излучений одинаковой частоты, поляризованных по кругу, но вращающихся в разные стороны. Спектрометры ЭПР устроены так, что с образцом взаимодействует только правильно поляризованная компонента.

Так можно объяснить явление ЭПР в рамках классической физики

Устройство радиоспектрометра ЭПР

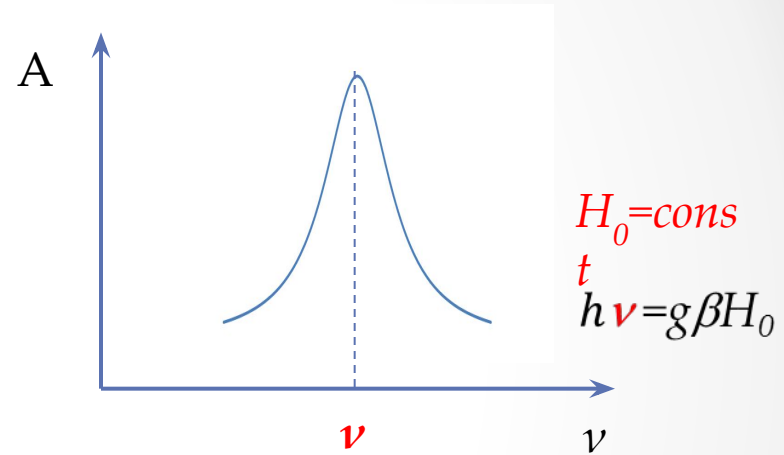
Экспериментально подобрать условия парамагнитного резонанса можно двумя способами:

1. образец помещают в постоянное магнитное поле H_0 , можно затем постепенно изменять частоту электромагнитного излучения. По достижении резонансной частоты образец начнет поглощать энергию.
2. при постоянном значении частоты ν переменного поля медленно изменяют магнитное поле, добиваясь выполнения условия резонанса $h\nu = g\beta H_{рез}$.

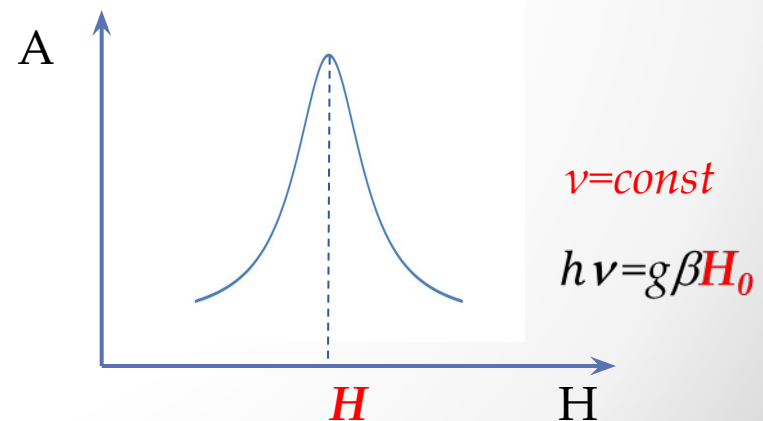
Регистрация поглощения электромагнитного излучения

Экспериментально подобрать условия парамагнитного резонанса можно двумя способами:

1. в постоянном магнитном поле H_0 постепенно изменяют частоту ν электромагнитного излучения, добиваясь выполнения условия резонанса

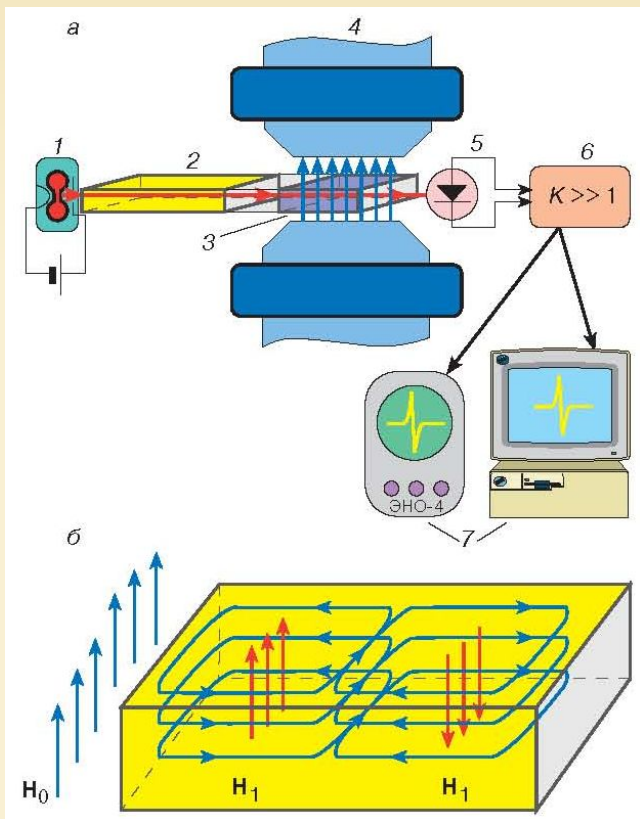


2. при постоянном значении частоты ν переменного поля медленно изменяют магнитное поле H , добиваясь выполнения условия резонанса



Из практических соображений выбирают второй вариант

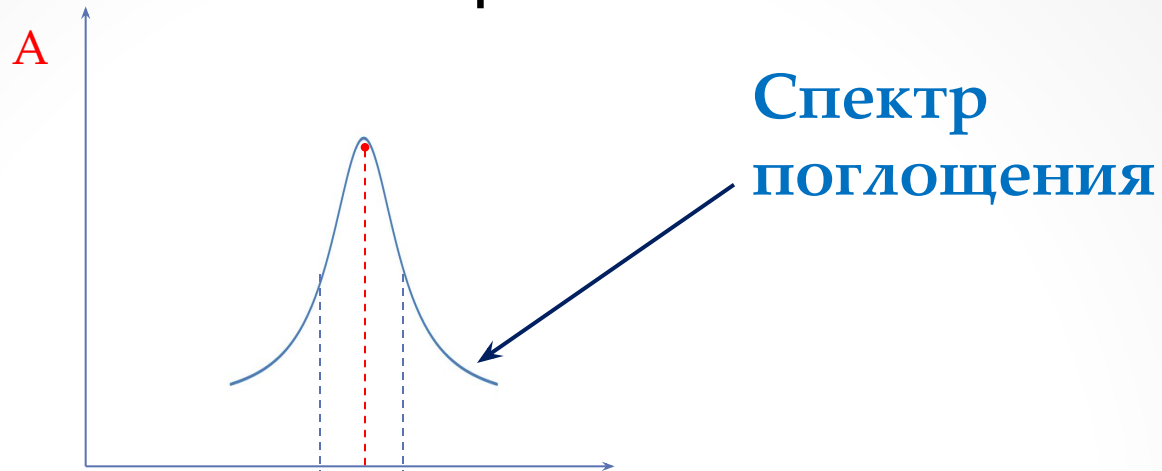
Схема простейшей установки для регистрации ЭПР



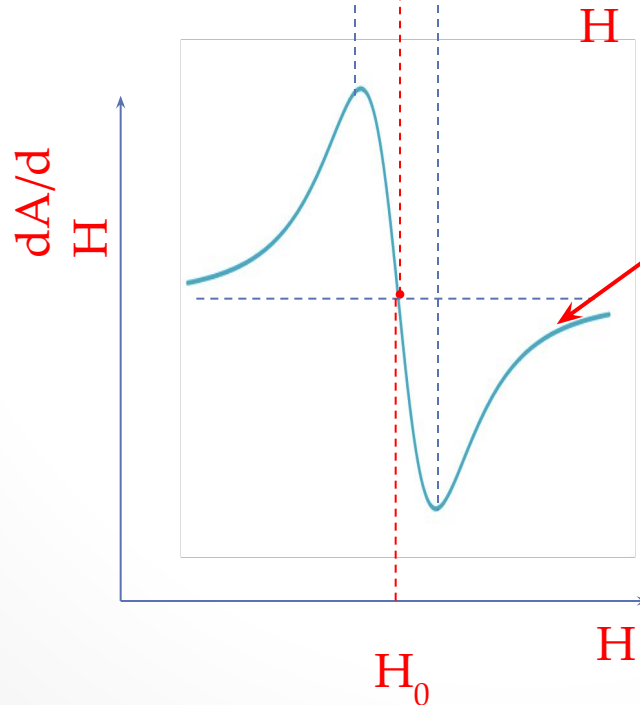
1. **Генератор электромагнитного излучения** (клистрон). В современных спектрометрах ЭПР чаще всего используется излучение трехсантиметрового диапазона СВЧ ($\lambda \sim 3$ см), частота $\nu \sim 10^{10}$ Гц.
2. **Волноводы** - полые металлические трубы, имеющие в сечении прямоугольную форму, предназначенные 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. В центральной части резонатора, где имеется пучность переменного магнитного поля, помещается исследуемый образец.
4. **Электромагнит**, в зазоре которого находится резонатор.
5. **Детектор** электромагнитного излучения
6. **Электронный усилитель** сигнала, выдаваемого детектором.
7. **Регистрирующее устройство** (осциллограф, самописец или ЭВМ), на которое подается сигнал ЭПР..

а - схема спектрометра ЭПР
б - распределение силовых линий магнитного (голубые линии) и электрического (красные линии) полей в резонаторе

Спектр ЭПР



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

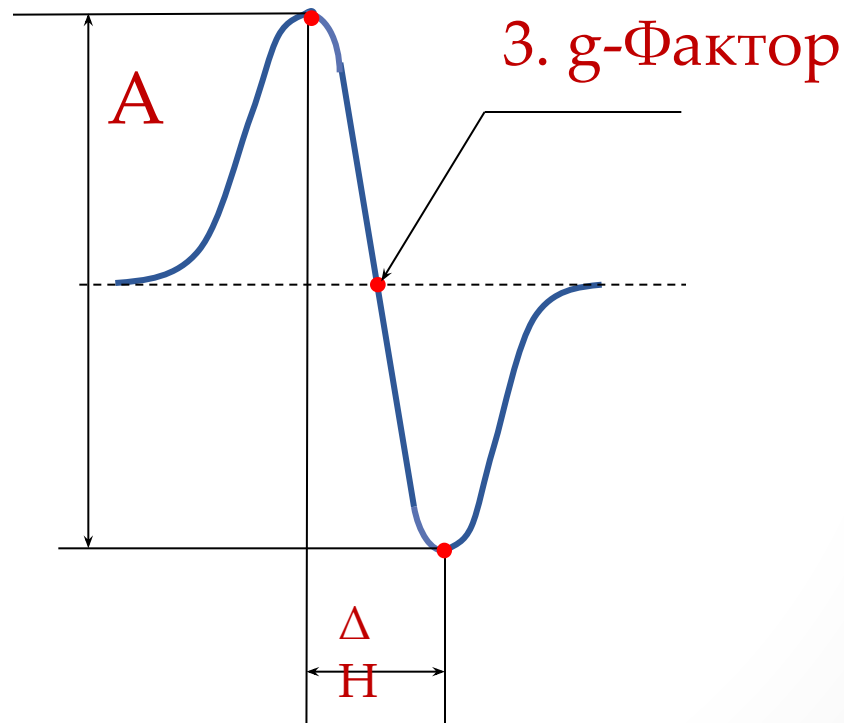


Спектр ЭПР

Сигнал ЭПР представляет собой первую производную от линии поглощения dA/dH

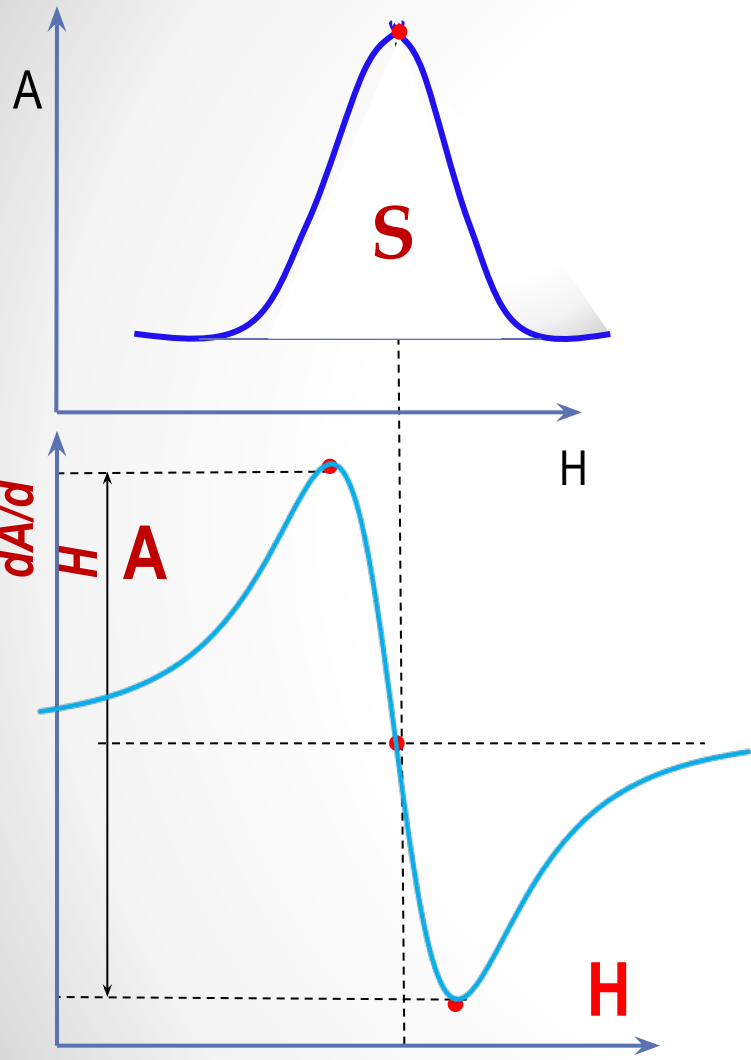
Основные характеристики спектров ЭПР

1. Амплитуда сигнала (A)



2. Ширина спектральной линии (ΔH)

1. Амплитуда сигнала



Амплитуда спектра ЭПР зависит от концентрации парамагнитных центров, концентрация парамагнитных центров пропорциональна площади под кривой поглощения, т.е. первому интегралу от линии поглощения или второму интегралу от спектра ЭПР

$$S = k \times \int_{-\infty}^{\infty} A \times H \times dH$$

Концентрация парамагнитных центров в образце

$$c_x = c_0 \frac{S_x}{S_0}$$

где c_x и c_0 - концентрации измеряемого образца и эталона соответственно, а S_x и S_0 - площади под линиями поглощения измеряемого сигнала и эталона, амплитуды сигналов линии поглощения A_x и A_0 , k - коэффициент зависящий от условий измерения

Расчет площади под линией поглощения неизвестного сигнала с использованием приема численного интегрирования

(концентрация парамагнитных центров пропорциональна первому интегралу под линией поглощения или второму интегралу от спектра ЭПР)

$$S = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} f'(H) dH = \int_{-\infty}^{\infty} F(H) dH = F(H) \times H \Big|_{-\infty}^{\infty} - \int_{-\infty}^{\infty} H dF(H)$$

$$\left. \begin{array}{l} F(H) \times H = 0 \\ \text{в точках } -\infty \text{ и} \\ d\tilde{F}(H) = f'(H) dH \end{array} \right\} \rightarrow S = \int_{-\infty}^{\infty} H f'(H) dH \left. \begin{array}{l} \text{т.к.} \\ H = n \Delta H \end{array} \right\} \rightarrow \text{Интегральная сумма}$$

$$S = \sum_{i=1}^{\infty} n_i \Delta H_i^2 f'_i = \Delta H_i^2 \sum_{i=1}^{\infty} f'_i(H) \times n$$

Очевидно, что при больших n (т.е. вдали от центра сигнала) вклад удаленных частей спектра может быть достаточно большим даже при малых значениях амплитуды сигнала.

где $f'(H)$ - первая производная линии поглощения (спектр ЭПР), $F(H)$ - функция линии поглощения, H - напряженность магнитного, ΔH_i - шаг изменения магнитного поля, а n_i - номер шага.

Форма линии

Спектр ЭПР является непрерывным в некоторой окрестности точки резонанса. Учитывать форму линии особенно важно при определении площади под кривой поглощения

Если **можно пренебречь взаимодействием между парамагнитными частицами** (в разбавленных растворах) кривая поглощения описывается **функцией Лоренца**:

$$F_L(H) = F_{L0} \left(1 + \frac{(H - H_0)^2}{\Delta H_{1/2}^2} \right)^{-1}$$

Если **между парамагнитными частицами существует взаимодействие** кривая поглощения описывается **функцией Гаусса**

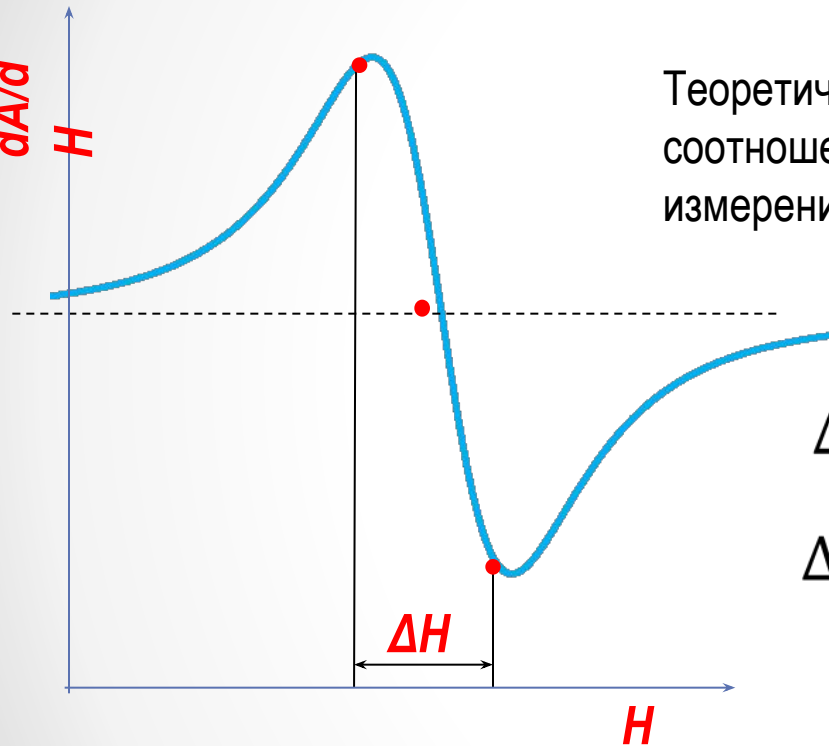
$$F_G(H) = F_{G0} \times e^{-\frac{(H - H_0)^2}{\Delta H_{1/2}^2}}$$

Функция Лоренца имеет более медленное убывание и более широкие крылья, что может давать значительную ошибку при интегрировании спектра.

F_{L0} - функция кривой поглощения в точке резонанса, H_0 - значение поля в точке резонанса, $\Delta H_{1/2}$ - ширина сигнала на половине высоты. Аналогичные обозначения используются для кривой поглощения, описываемой функцией Гаусса.

2. Ширина спектральной линии

Ширина спектральной линии ΔH определяется взаимодействием неспаренных электронов с другими парамагнитными частицами и решеткой.



Теоретически минимальная ширина линии следует из соотношения неопределенностей Гейзенберга (Δt – время измерения, ΔE – неопределенность энергии системы)

$$\left. \begin{aligned} \Delta E &\geq \frac{\hbar}{\Delta t} \\ \Delta E &= g\beta\Delta H \end{aligned} \right\} \Rightarrow \Delta H \geq \frac{\hbar}{g\beta} \times \frac{1}{T}$$

Т.к. явление ЭПР – процесс поглощения энергии, Δt может быть интерпретировано как время нахождения на верхнем уровне (или время релаксации T), $\Delta E = g\beta \Delta H$ – энергия системы

Время релаксации

Релаксация – процесс восстановления заселенности энергетических уровней после поглощения кванта электромагнитного излучения. Механизм релаксации заключается в передаче кванта электромагнитной энергии решетке или окружающим электронам и возвращении электрона на низкоэнергетический уровень

Время релаксации – время нахождения на более высоком энергетическом уровне – определяется двумя процессами: спин-решеточной релаксацией и спин-спиновой релаксацией

Спин-решеточная релаксация (T_1) обусловлена взаимодействием магнитного момента электрона с решеткой (средой)

Спин-спиновая релаксация (T_2) обусловлена взаимодействием между магнитными моментами электронов (между спинами)

Времена релаксации T_1 и T_2 зависят от

- природы парамагнитных центров
- окружения
- молекулярной подвижности
- температуры

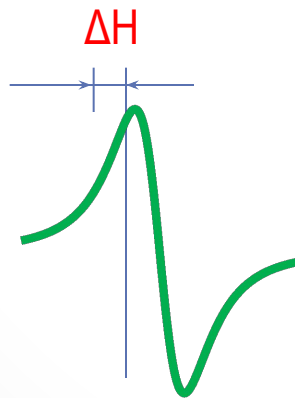
Ширина спектральной линии и время релаксации

Ширина одиночной линии ΔH обратно пропорциональна времени релаксации T :

$$\frac{1}{T} = \frac{1}{2T_1} + \frac{1}{T_2} = \frac{2T_1 + T_2}{2T_1T_2}$$
$$\Delta H \geq \frac{\hbar}{g\beta} \times \frac{1}{T}$$

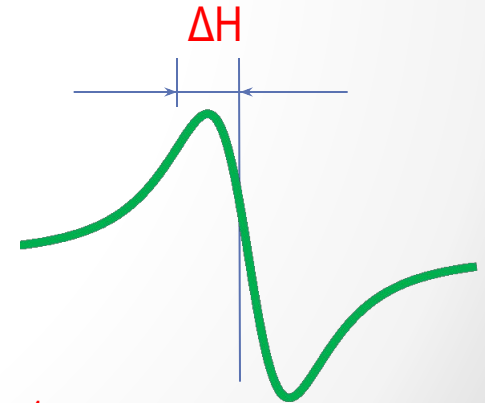


$$\Delta H \geq \frac{\hbar}{g\beta} \times \frac{2T_1 + T_2}{2T_1T_2}$$



$T_1 = 0,1$ мс
 $\Delta H = 100$ мкТ

Свободные радикалы



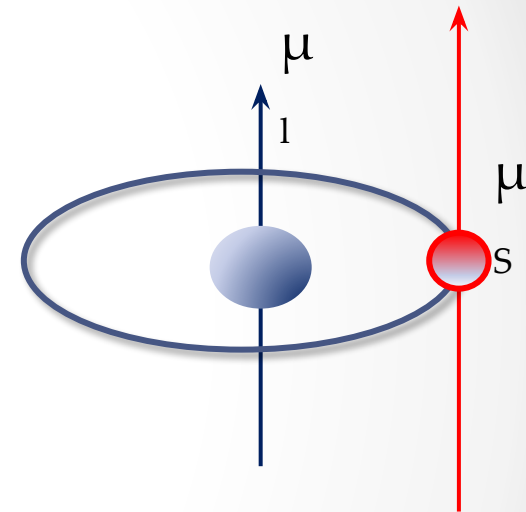
$T_1 = 1$ нс
 $\Delta H = 10$ мТ

Комплексы металлов

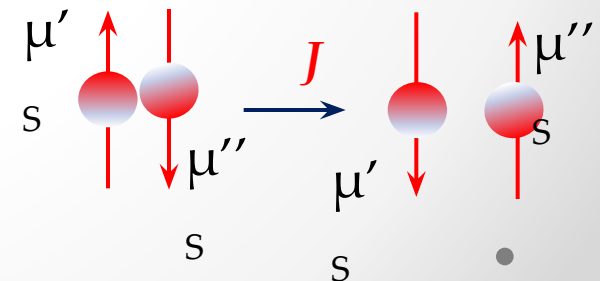
Механизмы уширения сигнала ЭПР

1. Взаимодействие магнитных моментов двух парамагнитных частиц (радикалов или ионов) приводит к уширению по диполь-дипольному механизму
2. Взаимодействие спинового магнитного момента электрона с орбитальным магнитным моментом электрона приводит к уширению сигнала в результате анизотропии g-фактора
3. Взаимное превращение форм радикала вызывает динамическое уширение сигнала
4. Соударение радикала с другим радикалом или парамагнитным ионом лежит в основе уширения за счет спинового обмена (J – обменный интеграл)

$$\Delta H = \frac{\mu}{R^3} (3 \cos \theta - 1)$$

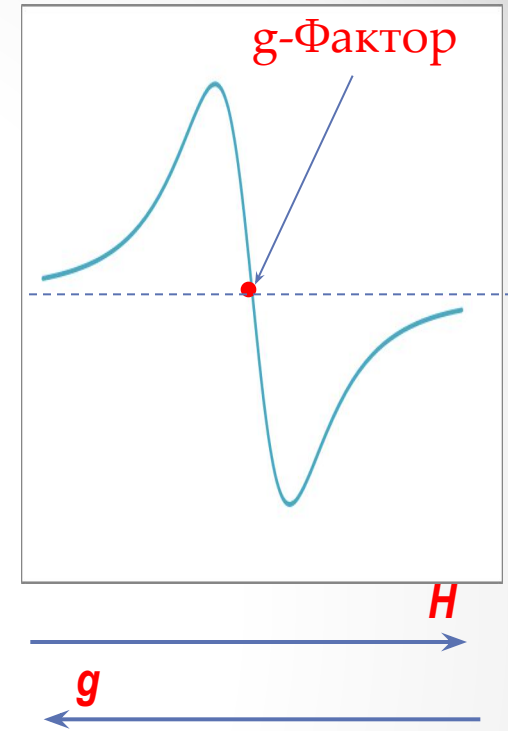


R1 ↔ R2



3. g-Фактор

- g-фактор - параметр, отражающий вклад орбитального и спинового моментов в суммарный магнитный момент
- Величина g-фактора характеризует положение линии в спектре ЭПР. Резонансное значение магнитного поля обратно пропорционально g-фактору, $H_{рез} = hv/(g\beta)$.
- Для свободного электрона $g = 2$. С учетом поправки, обусловленной взаимодействием электрона с виртуальными фотонами, эта величина составляет $g = 2,0023$.
- Для органических свободных радикалов, парамагнитных дефектов кристаллических решеток величины g-факторов отличаются от чисто спинового значения не более чем во втором знаке после запятой.



$$g \times H'_{рез} = \frac{hv'}{\beta}$$
$$g \times H''_{рез} = \frac{hv''}{\beta}$$

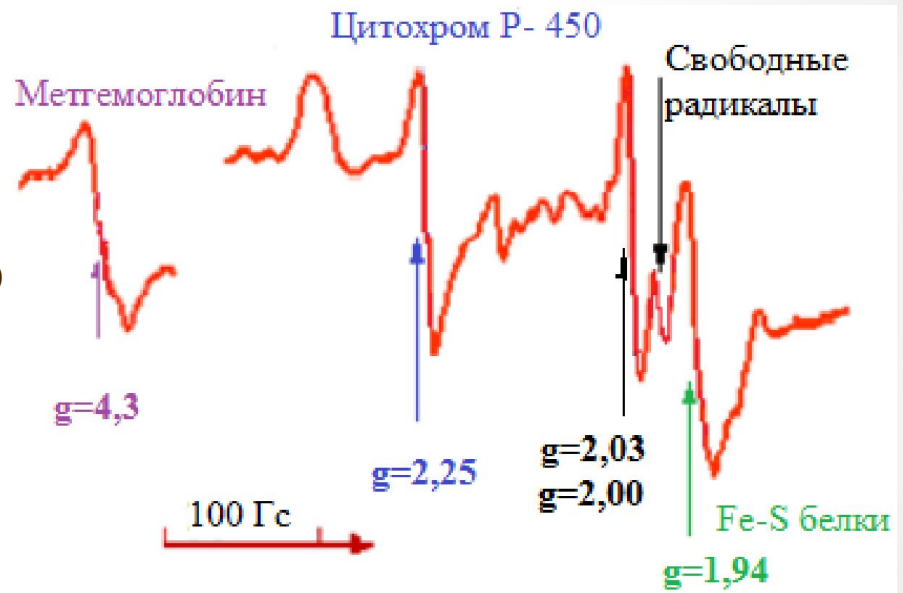
g-Фактор -
инвариантная
величина

g-Фактор -
характеристика
спектра ЭПР
(радикала)

g-Фактор

Причины значительного отклонения g-фактора от чисто спинового значения и его анизотропии (зависимости g-фактора от ориентации образца во внешнем магнитном поле).

1. Парамагнитные частицы, исследуемые методом ЭПР, как правило, не являются свободными атомами.
2. Воздействие анизотропных электрических полей, окружающих атомов
3. Расщепление зеемановских уровней в нулевом внешнем магнитном поле
4. Наличие достаточно сильного спин-орбитального взаимодействия.



Спектр ЭПР печени крысы

На спектре ЭПР, например, печени крысы, то можно увидеть сигналы цитохрома Р-450, имеющие g-фактор 1,94 и 2,25, сигнал метгемоглобина с g-фактором 4,3 и сигнал свободных радикалов, принадлежащий семихинонным радикалам аскорбиновой кислоты и флавинов с g-фактором 2,00.

Сверхтонкое взаимодействие

Если кроме неспаренных электронов исследуемый парамагнитный образец содержит атомные ядра, обладающие собственными магнитными моментами, то за счет взаимодействия электронных и ядерных магнитных моментов (сверхтонкое взаимодействие) возникает сверхтонкая структура (СТС) спектра ЭПР

Атомные ядра, у которых нечетно хотя бы одно из двух чисел — масса или порядковый номер, — обладают отличным от нуля моментом количества движения, т. е. ядерным спином.

Ненулевым ядерным магнитным моментом обладают ядра: ^1H , ^2H , ^{13}C , ^{14}N , ^{15}N , ^{19}F , ^{29}Si , ^{31}P и др.

Для веществ, у которых ядерный спин $J = 1/2$: ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F , ^{29}Si , ^{31}P , в поле возможны две ориентации магнитного момента ядра - "по полю" и "против поля"

Для веществ, у которых ядерный спин $J = 1$: ^2H , ^{14}N (число протонов и нейтронов нечетные) - в поле возможны три ориентации магнитного момента ядра - "по полю" и "против поля" и перпендикулярно полю

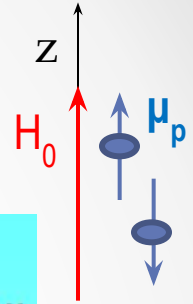
Спин и магнитный момент ядра

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

Ядро атома будет иметь ненулевой магнитный момент, в том случае, если число протонов или число нейтронов (или оба), будут нечетные.

Сверхтонкая структура спектров ЭПР

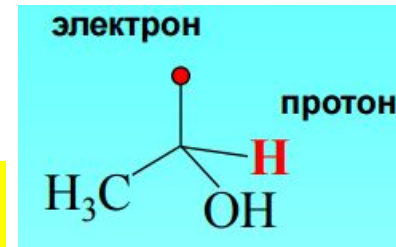
Протон имеет магнитный момент μ_p , который ориентирован во внешнем магнитном поле H_0 в двух направлениях (вдоль и против поля) т.к. подобно электрону, имеет спиновое число $J = 1/2$, проекция на выбранное направление $J_z = \pm 1/2$



Магнитный момент протона создает дополнительное магнитное поле $+H_p$ или $-H_p$ в области нахождения электрона:

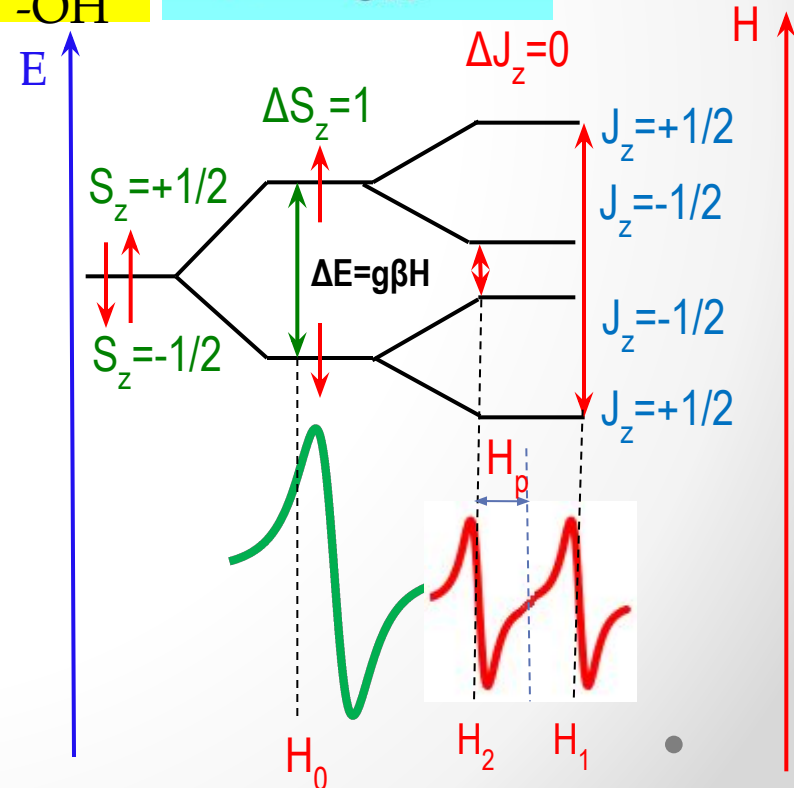
$$H_1 = H_0 + H_p$$

$$H_2 = H_0 - H_p$$



Расстояние между линиями H_p является основной характеристикой взаимодействия неспаренного электрона с магнитным ядром. Эта величина называется, также, **константой сверхтонкого взаимодействия СТС**.

Расстояние между линиями будет зависеть от величины магнитного поля создаваемого протоном в месте нахождения неспаренного электрона, которое в свою очередь зависит от расстояния между электроном и протоном.



Сверхтонкая структура спектров ЭПР

Неспаренный электрон в радикале может быть расположен близко к двум протонам, как в радикале этанола

Магнитное поле вокруг неспаренного электрона теперь может иметь следующие значения:

$$H1 = H_0 + H_{p1} + H_{p2} = H_0 + 2H_p$$

$$H2 = H_0 + H_{p1} - H_{p2} = H_0$$

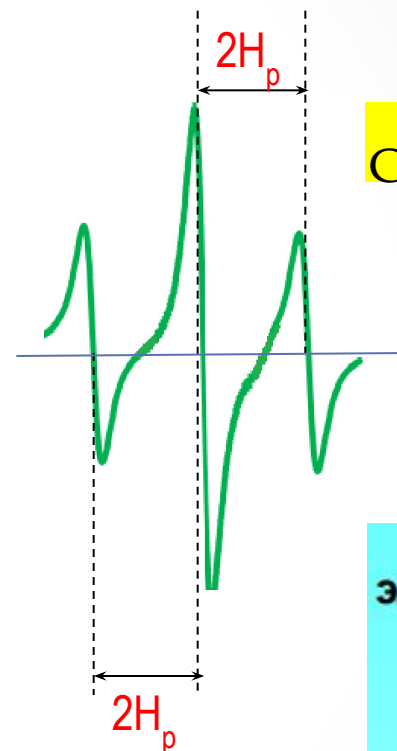
$$H2 = H_0 - H_{p1} + H_{p2} = H_0$$

$$H3 = H_0 - H_{p1} - H_{p2} = H_0 - 2H_p$$

Состояние $H2=H_0$ реализуется **двумя способами** следовательно вероятность этого состояния и интенсивность сигнала будут вдвое больше чем вероятность состояний $H1=H_0+2H_p$ или $H3=H_0-2H_p$, реализуемых **одним способом**.

Т.обр., вместо одного сигнала будет три с соотношением интенсивностей 1:2:1

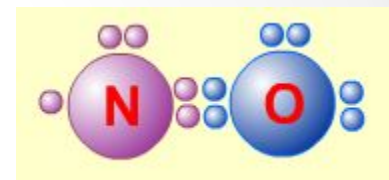
В данном случае **константа СТС** равна $2H_p$



Сверхтонкая структура спектров ЭПР

Схема энергетических уровней, иллюстрирующая возникновение сверхтонкой структуры **СТС** спектра ЭПР парамагнитной молекулы NO.

Атом азота имеет $J = 1$, возможны три проекции магнитного момента - вдоль поля, против поля и «поперек» поля, им соответствуют значения магнитного квантового числа $J = +1, -1$ и 0 .



Магнитный момент азота создает дополнительное магнитное поле $(+H_J, -H_J, H=0)$

Индукцируемые микроволновым излучением переходы между энергетическими уровнями должны удовлетворять квантовомеханическим **правилам отбора:**

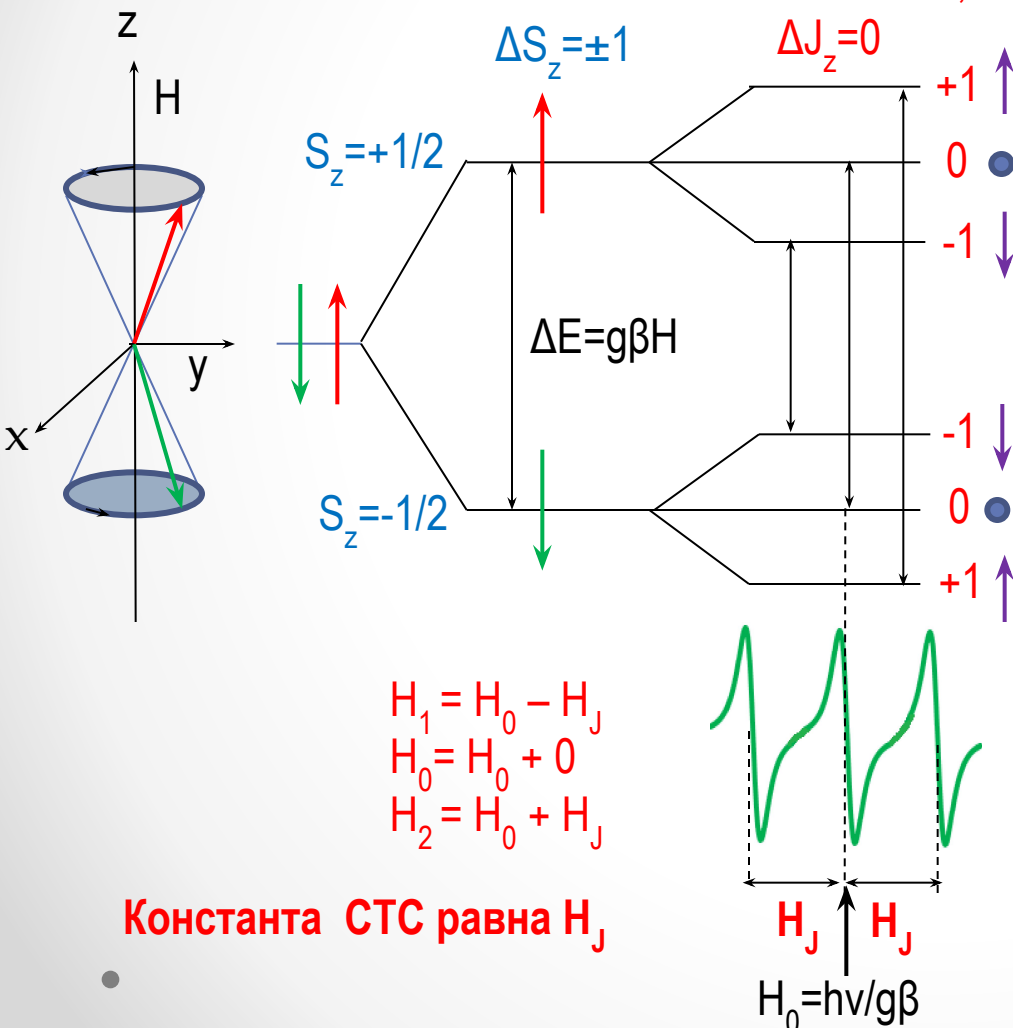
$$\Delta S_z = \pm 1$$

(ориентация спина электрона изменяется)

$$\Delta J_z = 0$$

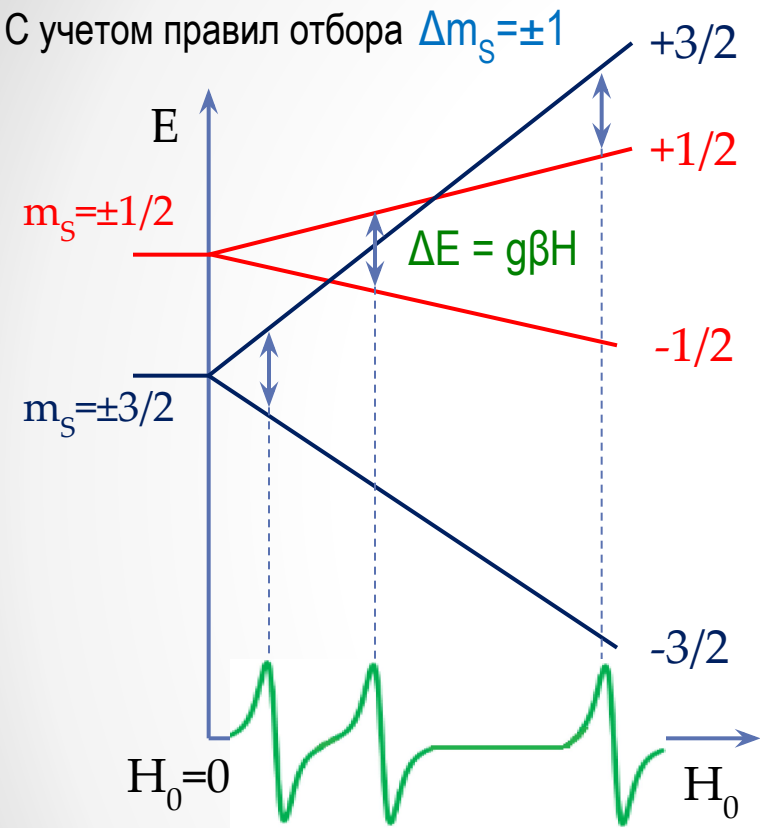
(ориентация ядерного спина сохраняется).

Таким образом, в результате сверхтонкого взаимодействия в спектре ЭПР нитроксильного радикала появятся **три линии**, соответствующие трем возможным ориентациям магнитного момента ядра азота $J_z = -1, 0, +1$



Тонкая структура спектров ЭПР

Схема энергетических уровней ионов Cr^{3+} иллюстрирующая возникновение тонкой структуры спектра ЭПР



Условие резонанса, $\Delta E = h\nu = g\beta H$, выполняется при трех разных значениях магнитного поля и в спектре ЭПР появляются три резонансные линии, то есть возникнет тонкая структура спектра ЭПР

Если спиновый и орбитальный моменты в атоме отличны от нуля $P_s \neq 0$, $P_l \neq 0$, $\mu_s \neq 0$, $\mu_l \neq 0$, то за счет спин-орбитального взаимодействия энергетические уровни могут дополнительно расщепиться. При наличии сильного спин-орбитального взаимодействия расщепление зеемановских уровней может наблюдаться даже при отсутствии внешнего магнитного поля.

В результате этого вид спектра ЭПР усложнится и вместо одной спектральной линии в спектре ЭПР появятся несколько линий: **спектр ЭПР имеет тонкую структуру.**

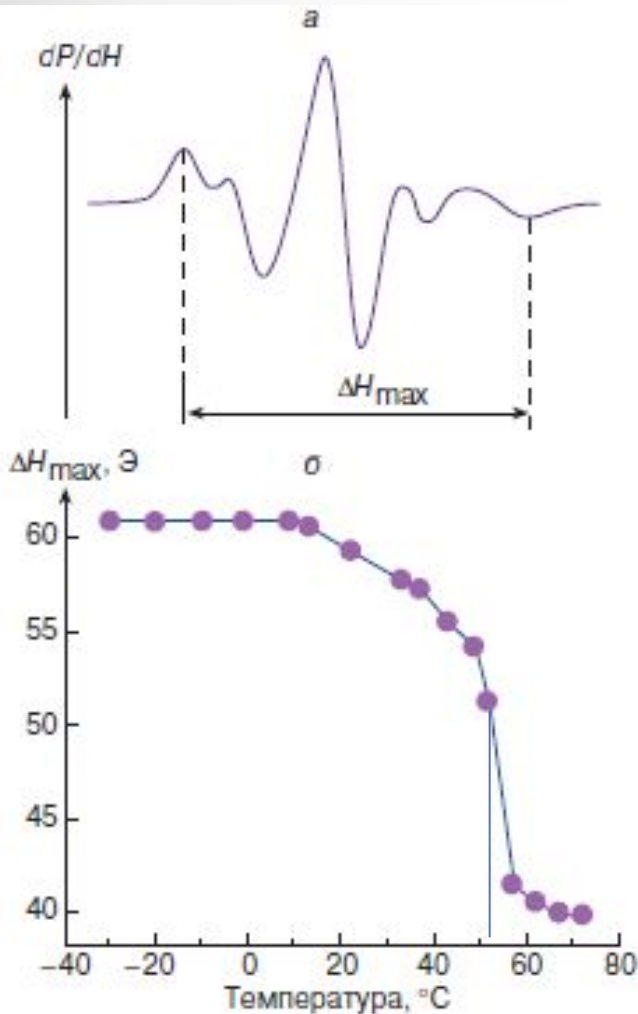
Пример: появление тонкой структуры спектра ЭПР хромовых квасцов:

Ион Cr^{3+} имеет суммарный спин $s=3/2$ (три неспаренных электрона), след. возможны 4 значения магнитного квантового числа $m_s = \pm 3/2 ; \pm 1/2$
сильная спин-орбитальная связь
электрическая анизотропия кристаллической решетки
 $P_s \neq 0$, $P_l \neq 0$, $\mu_s \neq 0$, $\mu_l \neq 0$

Ширина спектральной линии

Исследование формы спектра ЭПР в зависимости от различных физико-химических факторов является важным источником информации о природе и свойствах парамагнитных центров.

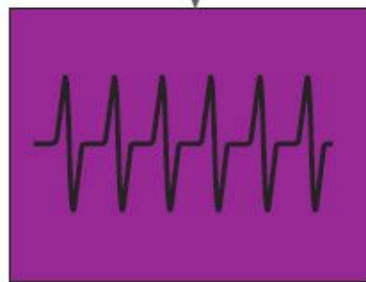
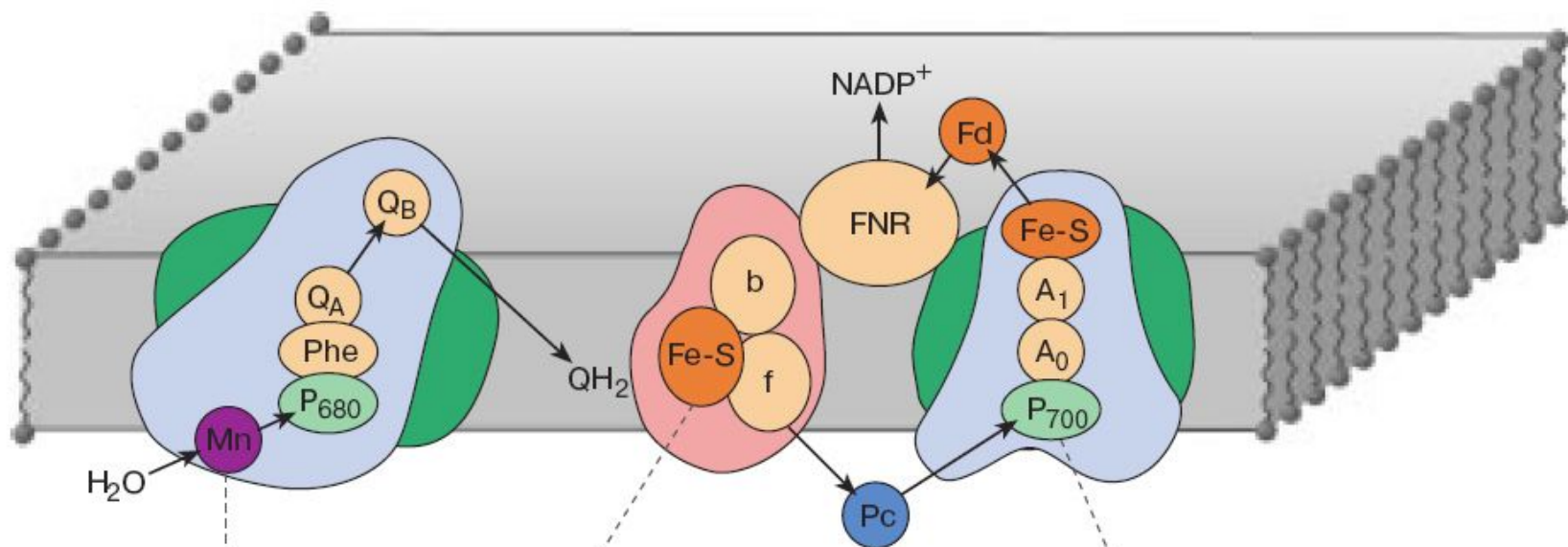
На рис. *a* показан типичный спектр ЭПР одного из стабильных азотокисных свободных радикалов, которые часто употребляются в химических и биофизических исследованиях. Форма спектров ЭПР таких радикалов чувствительна к изменениям их окружения и подвижности, поэтому они часто используются в качестве молекулярных зондов, с помощью которых изучают микровязкость и структурные изменения в различных системах: в растворах, полимерах, биологических мембранах и макромолекулярных комплексах.



На рис. *b* показана температурная зависимость одного из параметров спектра ЭПР (ΔH_{max} — расстояние между крайними компонентами СТС) для азотокисного радикала, растворенного в многослойной пленке жидкокристаллического типа, сформированной из молекул дистеарофосфатидилхолина. Подобные структуры составляют основу биологических мембран. Видно, что температурная зависимость параметра ΔH_{max} имеет характерный излом, по которому можно судить о том, что при температуре $53^{\circ}C$ в системе происходит фазовый переход, сопровождающийся увеличением подвижности молекул азотокисного радикала.

Перечисленные выше характеристики спектров ЭПР — **g-фактор, тонкая и сверхтонкая структура спектра ЭПР, ширины отдельных компонент спектра** — являются своего рода "паспортом" **парамагнитного образца**, по которому можно идентифицировать источник сигнала ЭПР и определить его физико-химические свойства.

Так, например, наблюдая за сигналами ЭПР биологических объектов, можно непосредственно следить за ходом внутриклеточных процессов в листьях растений, тканях и клетках животных, в бактериях.



Mn²⁺

$S=7/2$



(Fe-S)_n⁻



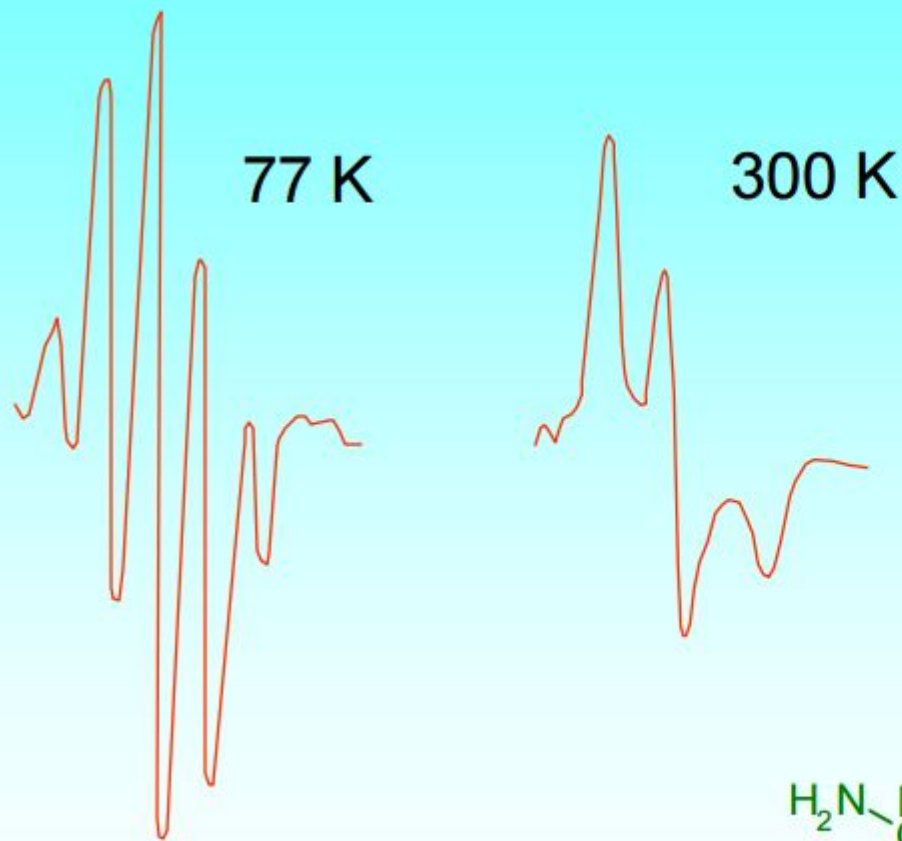
Cu²⁺



P₇₀₀⁺, P₆₈₀⁺

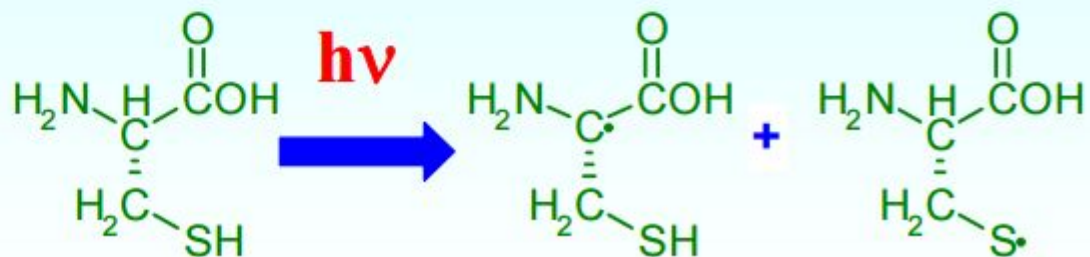
$S=1/2$

Естественные сигналы ЭПР, наблюдаемые в биологических системах

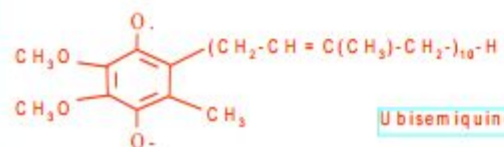
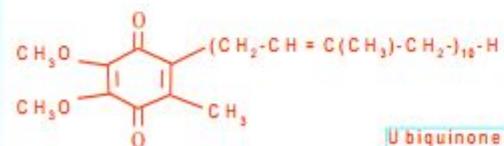
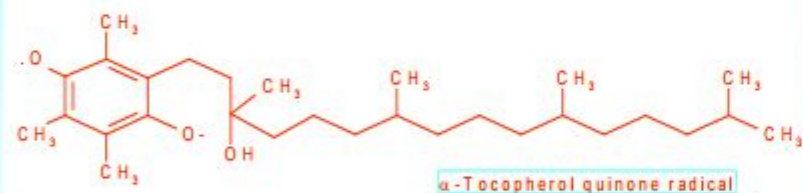
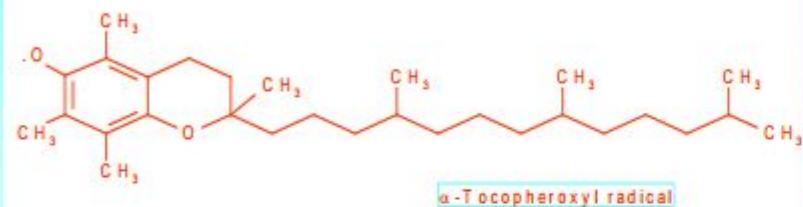
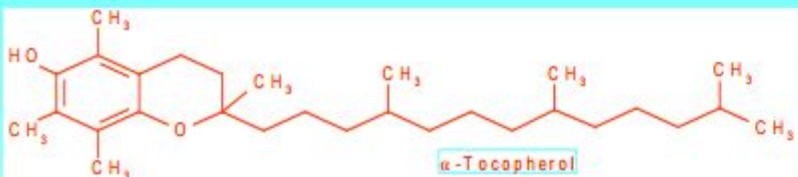


Спектр ЭПР облученного УФ
светом цистеина

Повысить концентрацию свободных радикалов, для избежания трудностей при их изучении, можно затормозив их гибель и повысив скорость их образования. Это можно сделать путем облучения (УФ или ионизирующей радиацией) биологических объектов находящихся при низкой температуре.



Сигналы ЭПР семихинонных или феноксильных радикалов



феноксильный радикал α -токоферола



семихинонный радикал α -токоферола

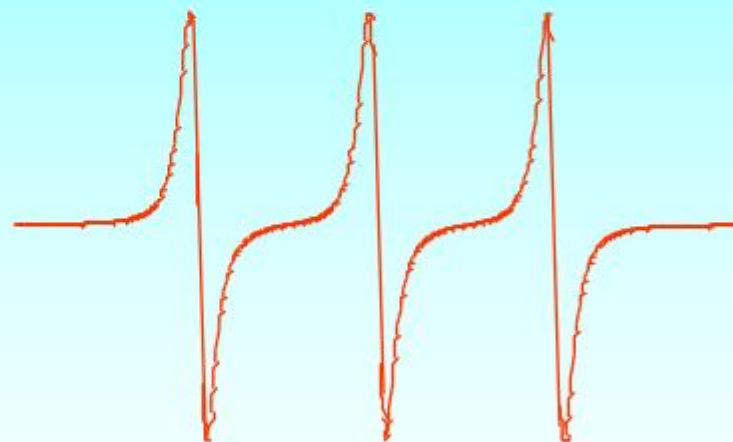
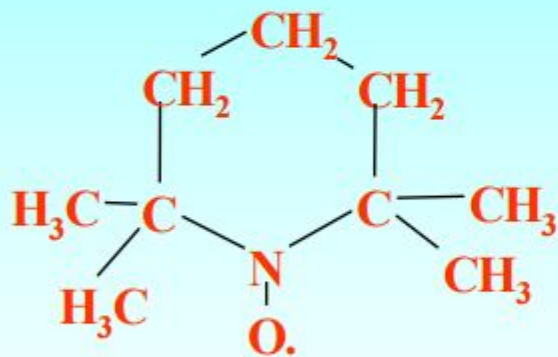


семихинонный радикал убихинона Q₁₀



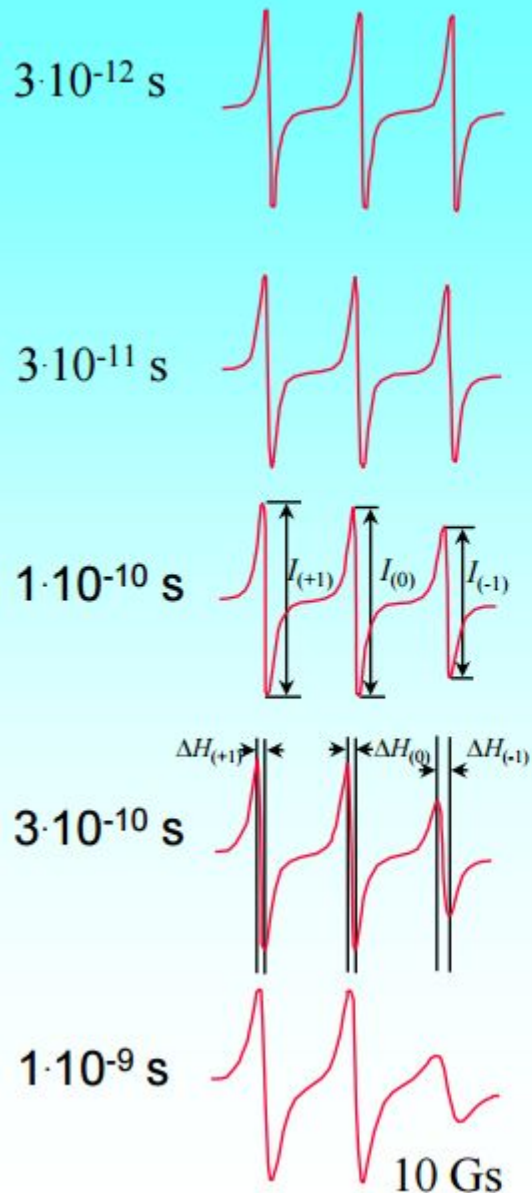
Метод спиновых зондов

Спектр ЭПР нитроксильных радикалов состоит, в простейшем случае, из трех линий равной интенсивности, благодаря взаимодействию неспаренного электрона с ядром атома азота, имеющим целочисленный спин, равный ± 1 или 0.



Формула и спектр ЭПР нитроксильного радикала 2,2,6,6-тетраметил-пиперидин-1-оксил (ТЕМПО).

Спектр ЭПР ТЕМПО при разных τ_c



Если нитроксильный радикал находится в водном растворе, то его вращение является изотропным и достаточно быстрым. Это движение можно охарактеризовать **временем корреляции (τ_c)**:

$$\tau_c = 6,65 * \Delta H_{+1} \left(\sqrt{\frac{I_{+1}}{I_{-1}}} - 1 \right) * 10^{-10} \text{ сек}$$

где ΔH_{+1} - ширина низкопольной компоненты
 I_{+1} - амплитуда низкопольной компоненты
 I_{-1} - амплитуда высокопольной компоненты

При уменьшении скорости вращения проявляются анизотропные взаимодействия, которые приводят к уширению линий и соответственно изменению амплитуд компонент спектра, а затем и к сдвигу крайних компонент.

Время корреляции нитроксильного радикала непосредственно связано с микровязкостью среды

Используя уравнение Стокса-Эйнштейна можно определить значение вязкости в соответствующей макроскопической системе

$$\eta = \tau \frac{3kT}{4\pi R^3}$$

где R - эффективный радиус нитроксильного радикала.

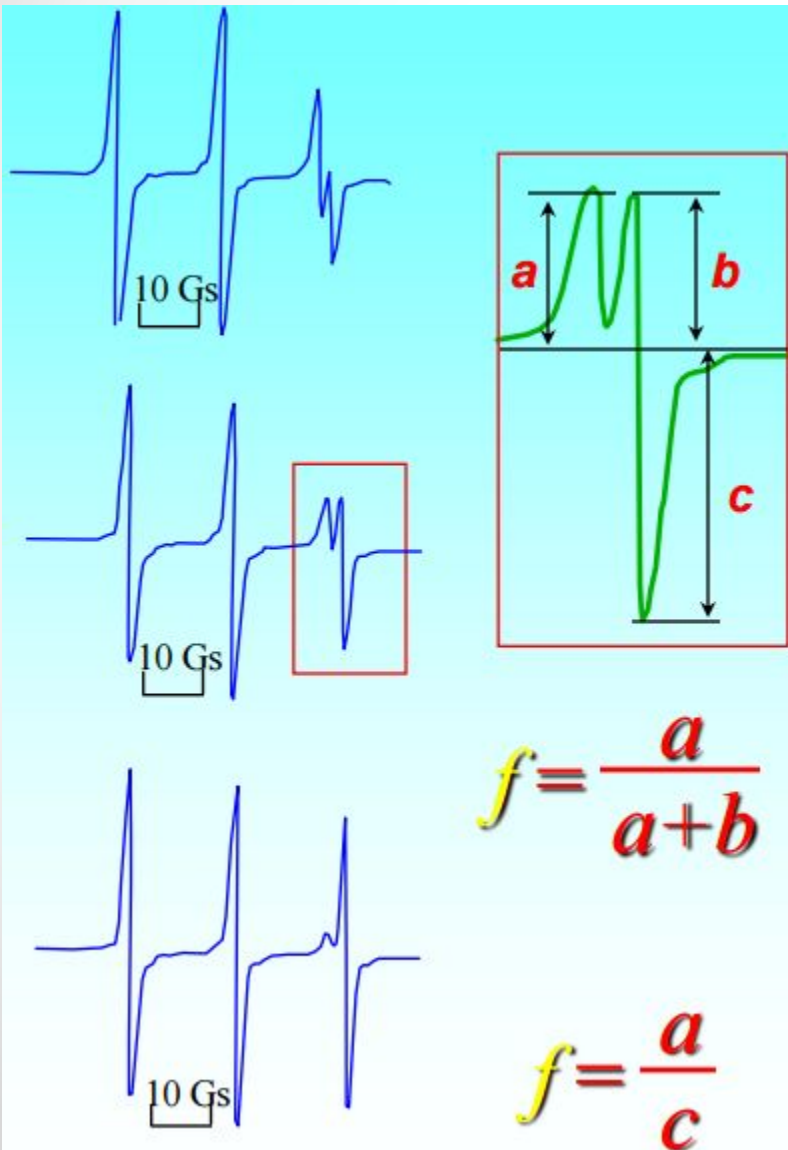
T – абсолютная температура

τ - время корреляции

η - вязкость

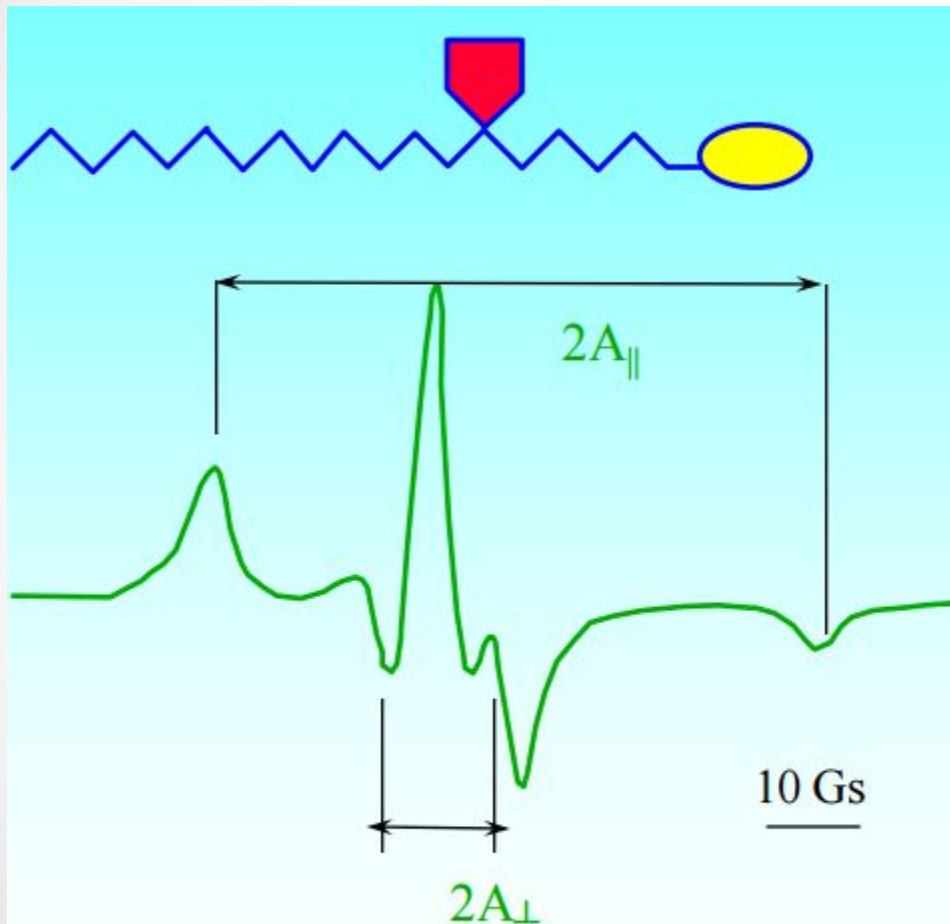
Из уравнения видно, что используя нитроксильный радикал в качестве зонда, можно определить микровязкость среды, в которой находится радикал. В биологических исследованиях этот прием широко используется для измерения микровязкости биологических мембран.

Параметр гидрофобности f



Представленные спектры ЭПР отражают поведение зонда ТЕМПО в средах с различной гидрофобностью. Определив отношения $a / (a + b)$ или (a / c) в этом спектре, можно посчитать параметр гидрофобности f , показывающий сколько и в какой фракции мембраны содержится зонда. Параметр f удобен при изучении процессов перекисного окисления в мембранах.

Спектр ЭПР спинового зонда 5-доксилстеарата в мембране эритроцита



При анизотропном вращении стеариновой кислоты вокруг длинной оси сигнал ЭПР будет сильно зависеть от степени анизотропии вращения, который количественно характеризуется так называемым **параметром упорядоченности (S)**

$$S = \frac{A_{\parallel} - A_{\perp}}{A_{\parallel} + 2A_{\perp}} * 1,66$$

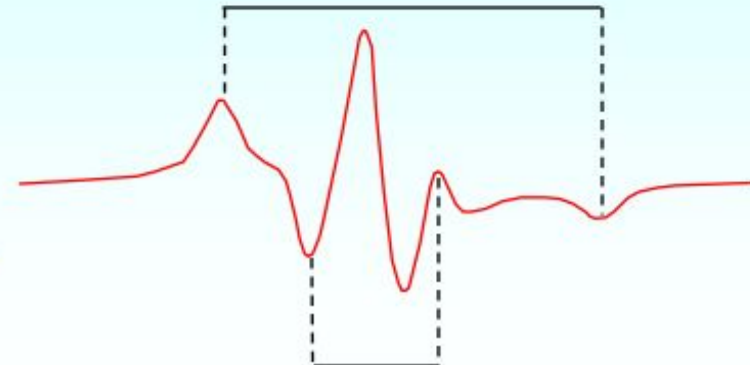
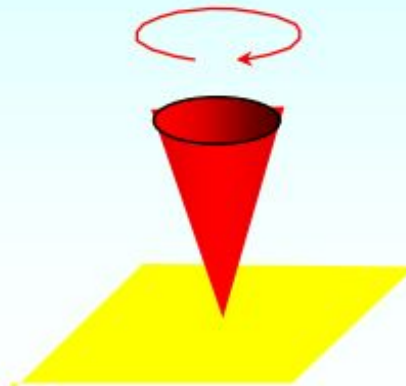
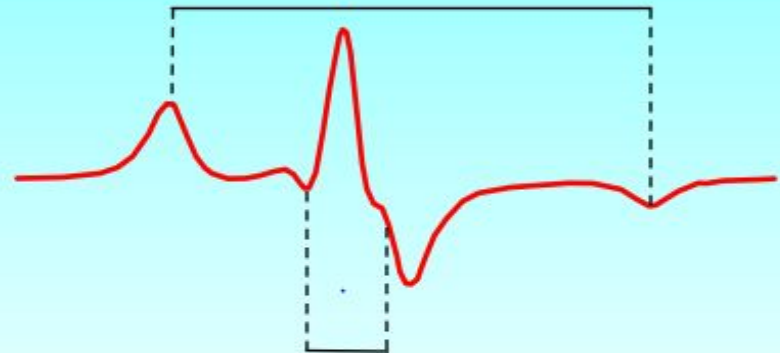
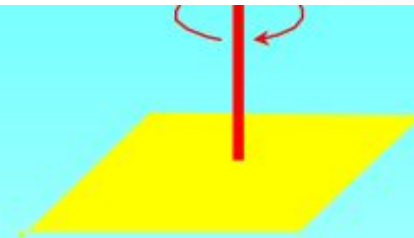
Определить параметр упорядоченности S , можно измерив константы сверхтонкого расщепления – A_{\parallel} и A_{\perp} и подставив их значения в формулу

Параметр упорядоченности и вязкость мембраны

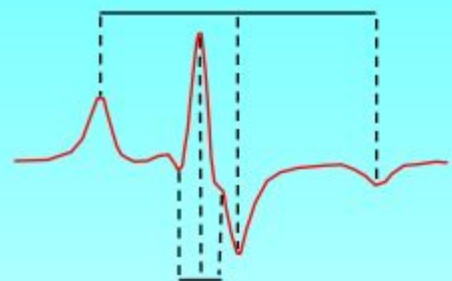
Параметр упорядоченности **S** равен 1, если вращение зонда происходит только вокруг нормали к плоскости мембраны.

В «замороженных» мембранах, где липиды находятся в кристаллическом состоянии параметр упорядоченности **S** близок к 1.

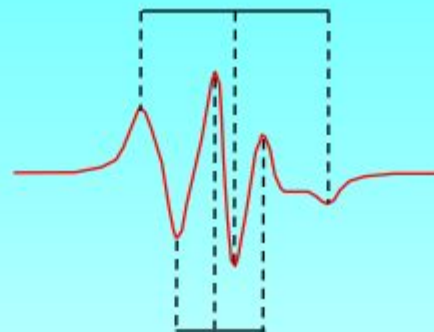
В «жидких» мембранах отклонение конуса вращения возрастает и **S** снижается, что вызывает изменения в спектре ЭПР.



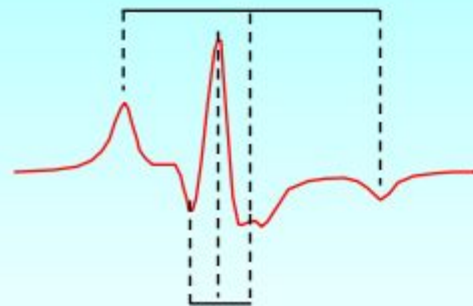
Изменения сигнала ЭПР при уменьшении S и возрастании угла отклонения конуса вращения γ



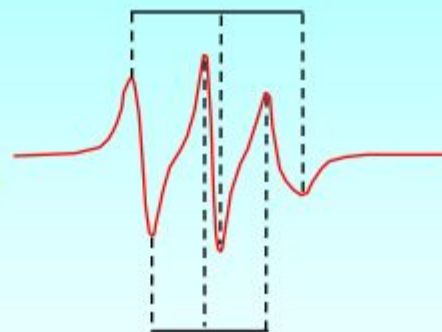
$S=1.0; \gamma=0^\circ$



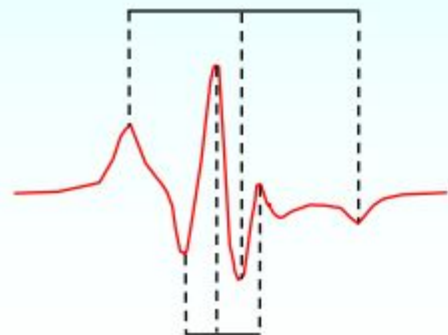
$S=0.4; \gamma=58.3^\circ$



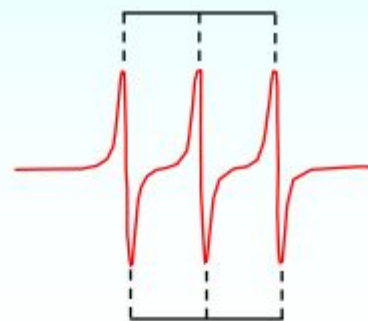
$S=0.8; \gamma=30.7^\circ$



$S=0.2; \gamma=72.2^\circ$

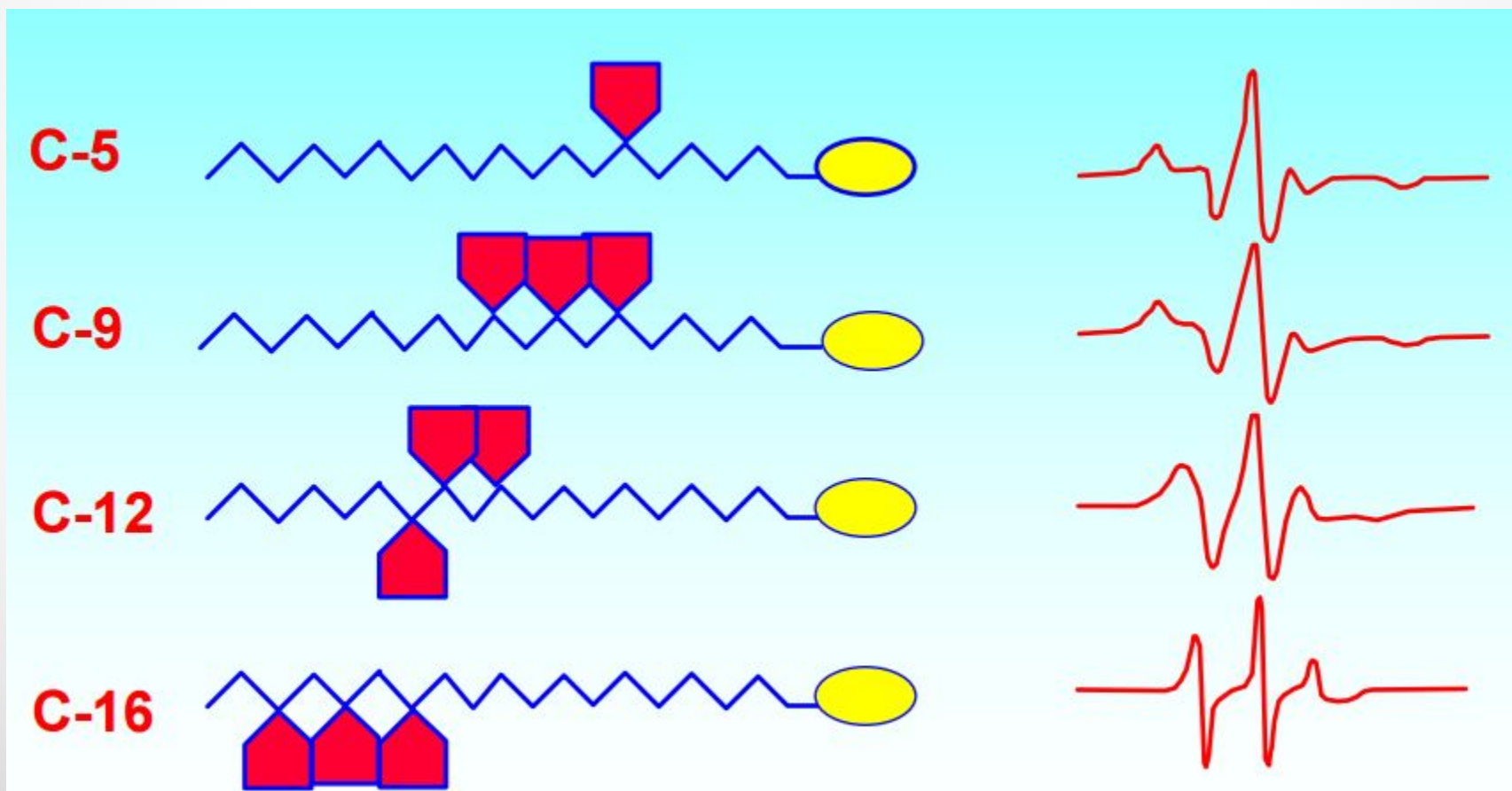


$S=0.6; \gamma=45.2^\circ$

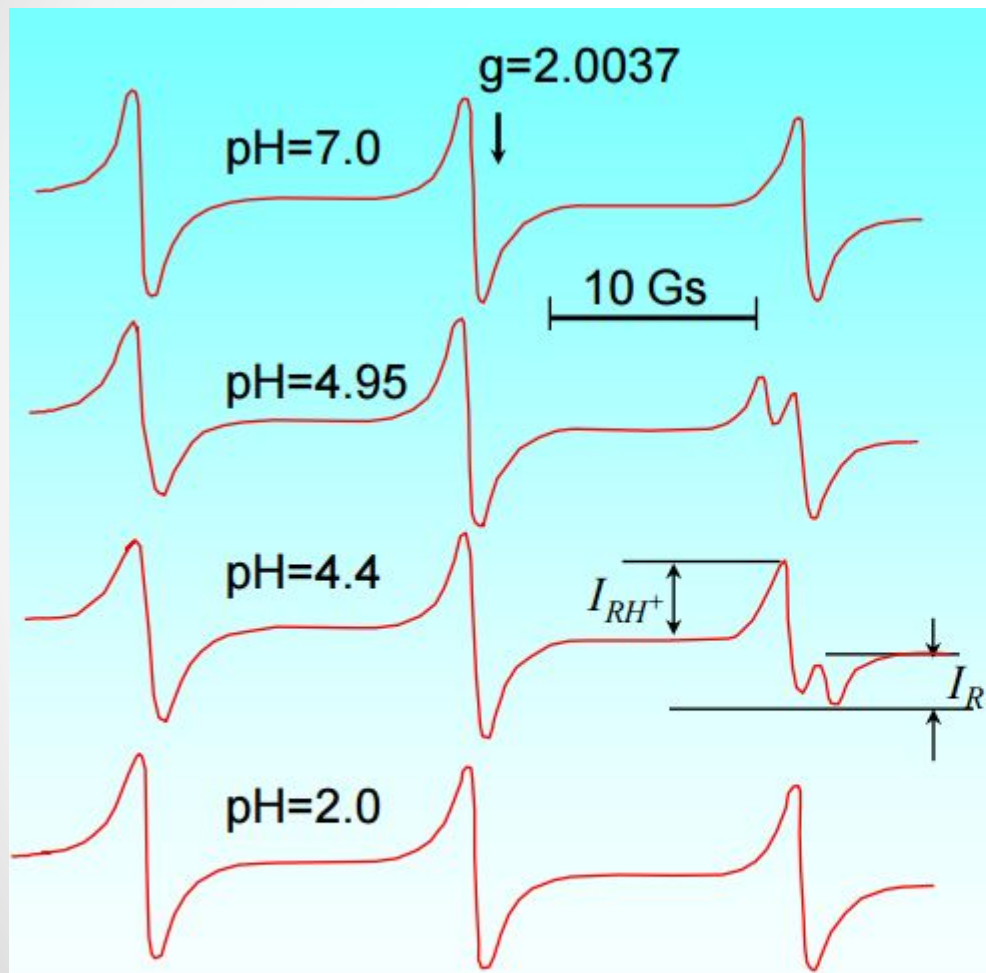


$S=0; \gamma=90^\circ$

Изменения сигнала ЭПР при удалении нитроксильного радикала от полярной карбоксильной группы жирной кислоты



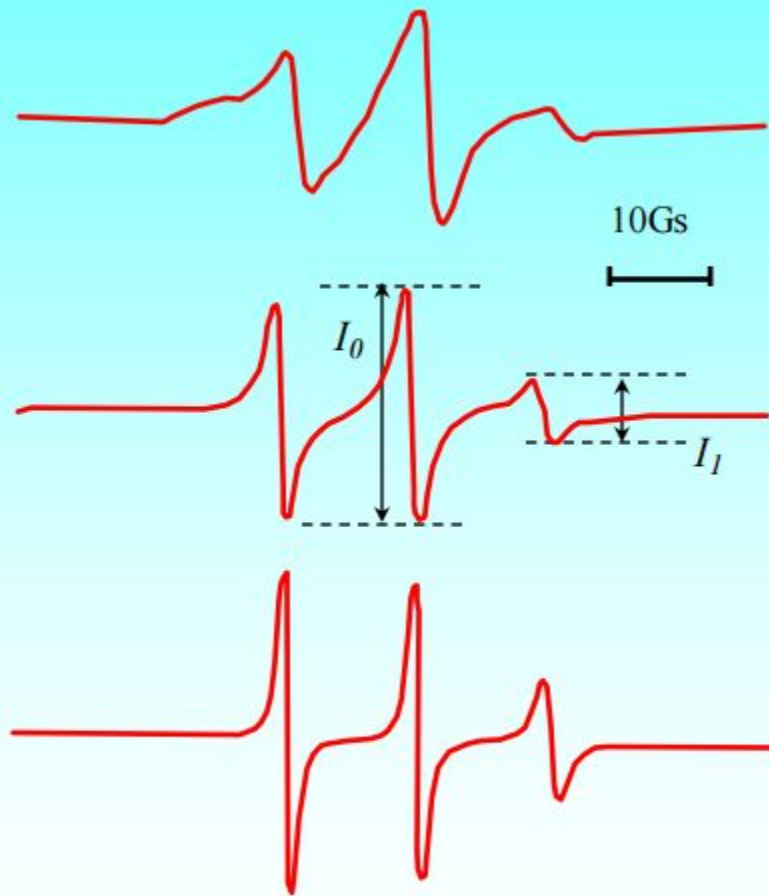
Спектр ЭПР рН чувствительного зонда (рК=4,7) при разных рН



Казалось бы, что измерение рН достаточно легко и точно можно проводить с помощью рН-электродов, однако очень трудно если не невозможно измерить рН внутри лизосомы или фагоцитирующего лейкоцита. Для этих целей и применяют рН-чувствительные спиновые зонды. В основе метода рН-чувствительных зондов лежит способность зонда давать отличные друг от друга спектры ЭПР в протонированной и депротонированной формах.

Таким образом, существует узкий диапазон рН в котором и происходит его протонирование и соответствующее изменение спектра ЭПР зонда.

Спектр ЭПР химотрипсина с присоединенной спиновой меткой



Спектр ЭПР нативного химотрипсина, помеченного спиновой меткой.

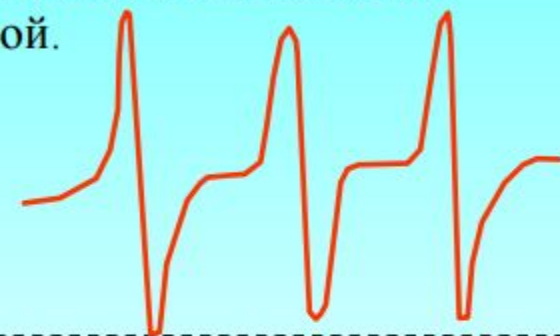
Соотношение величин I_0 и I_1 используется для количественной характеристики подвижности спиновой метки.

Денатурация белка приводит к увеличению подвижности полипептидных цепей и соответственно увеличению подвижности спиновой метки.

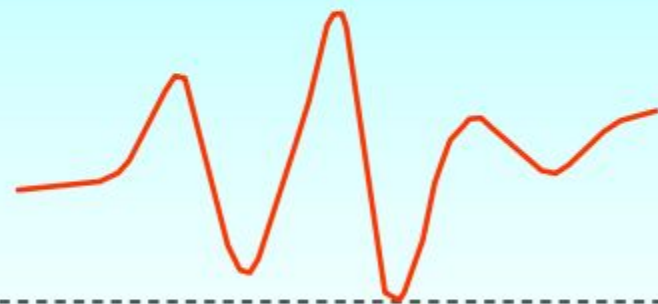
Спектры ЭПР спиновой метки при взаимодействии с SH-группами белка

В основе метода спиновых меток лежит тот же принцип изменения спектра ЭПР нитроксильного радикала в зависимости от скорости и изотропности его вращения. Отличием же метода является тот факт, что спиновая метка ковалентно связывается с другой более или менее крупной молекулой или макромолекулой.

1. Водная фаза



2. Поверхностный слой



3. Глубинный участок



Литература

1. Дж. Вертц и Дж. Болтон Теория и практические приложения метода ЭПР. Мир, Москва, 1975.
2. Современные методы биофизических исследований. Практикум по биофизике. Под редакцией А.Б. Рубина. Высшая школа, Москва, 1988.
3. Метод спиновых Меток. Теория и применение. Под редакцией Л. Берлинера. Мир, Москва, 1979.
4. Кузнецов А.Н. Метод спинового зонда. Наука, Москва, 1976.
5. Зубарев В.Е. Метод спиновых ловушек. Издательство МГУ, Москва, 1984.

Вопросы к зачету

1. Магнитные свойства веществ. Орбитальный и спиновый угловые моменты электрона.
2. Орбитальный и спиновый магнитный моменты электрона. Соотношение между угловыми и магнитными моментами.
3. Магнитный момент в магнитном поле. Зеемановское расщепление энергетических уровней. Взаимодействие магнитных моментов с электромагнитным излучением.
4. Принцип электронного парамагнитного резонанса.
5. Спин-решеточное и спин-спиновое взаимодействие. Времена спин-решеточной и спин-спиновой релаксации. Механизмы спин-решеточной и спин-спиновой релаксации.
6. Ширина линии поглощения. Связь ширины линии с временами спин-решеточной и спин-спиновой релаксации. Интенсивность линии. Определение концентрации парамагнитных частиц по интенсивности сигнала ЭПР.
7. Сверхтонкое взаимодействие электронов и ядер. Механизмы сверхтонкого взаимодействия. Сверхтонкая структура в спектрах ЭПР. Энергетические уровни неспаренных электронов при взаимодействии с ядрами с различными спинами. Эквивалентные и неэквивалентные ядра.
8. Изотропная и анизотропная сверхтонкая структура. Анализ сверхтонкой структуры. Проблемы регистрации разрешенных спектров ЭПР в биологических системах. Причины анизотропии спектров ЭПР: анизотропия сверхтонкого взаимодействия и g-фактора.
9. Применение ЭПР в биологии. Особенности биологических образцов.
10. Ранние эксперименты, проводившиеся на лиофильно высушенных и замороженных объектах, эксперименты на интактных объектах. Современные направления развития экспериментальной техники ЭПР.
11. Основные направления применения ЭПР в биологии. Примеры исследования радиобиологических, фотобиологических и ферментативных процессов.
Метод спиновых зондов и меток. Какие вещества применяются в качестве спиновых меток и зондов. Требования к их химическим свойствам. Особенности сигналов ЭПР зондов и меток. Применение зондов и меток в исследовании структурно-динамических свойств биомакромолекул и биомембран..
13. Принцип метода ядерного магнитного резонанса (ЯМР). Спины ядер.
14. Магнитный момент ядра. Поведение магнитного момента ядра в магнитном поле. Уравнение Лармора. Макроскопическая намагниченность.
15. Лабораторная и подвижная система координат. Эффективное магнитное поле. Спин-решеточная и спин-спиновая релаксация. Уравнения Блоха.
16. Стационарный и импульсный методы регистрации сигналов ЯМР. Импульсная Фурье - спектроскопия ЯМР. Импульсные методы регистрации времен спин-спиновой и спин-решеточной релаксации.
17. Ширина линии ЯМР. Связь ширины линии с временами спин-решеточной и спин-спиновой релаксации. Понятие о квадрупольной релаксации. Интенсивность сигналов ЯМР. Аппаратурные причины уширения линий.
18. Химический сдвиг. Природа химического сдвига. Составляющие химического сдвига. Примеры химических сдвигов различных ядер.
19. Спин-спиновое взаимодействие и его отражение в спектрах ЯМР.
20. Особенности сигналов ЯМР в жидкостях и твердых телах. Современные методы регистрации разрешенных спектров ЯМР в твердых телах. Двумерная спектроскопия ЯМР.
21. Основные направления использования ЯМР в биологии и медицине.
22. Применение ЯМР в изучении структурно-динамических свойств макромолекул и биомембран. ЯМР-томография.

Энергия ядра в магнитном поле

$$P_N = I \frac{h}{2\pi}$$

$$\frac{\mu_N}{P_N} = \gamma * \frac{e_N}{2m_N}$$

$$\mu_N = \gamma * I * \frac{e_N h}{4\pi m_N}$$

$$\beta_N = \frac{e_N h}{4\pi m_N}$$

$$\mu_N = \gamma * I * \beta_N$$

$$E = \mu_N * H$$

$$E = \gamma * I * \beta_N * H$$

μ_N – магнитный момент ядра
 P_N – механический момент ядра
 I – спиновое квантовое число ядра
 e_N – заряд протона
 m_N – масса протона
 γ – гиромагнитное отношение
 β_N – ядерный магнетон Бора

Количественные различия ЭПР и ЯМР

$\beta = \frac{eh}{4\pi m}$	$\frac{m_N}{m_e} = 1833$	$\frac{\beta_e}{\beta_N} = 1833$
$h\nu = g\beta H$	<p>ЭПР: $\nu = 10^{10}$ Гц $\lambda = 3$ см</p>	<p>ЯМР: $\nu = 8 \cdot 10^8$ Гц $\lambda = 40$ см</p>
$\frac{N_{+\mu}}{N_{-\mu}} = e^{-\frac{2\mu H}{kT}}$	<p>ЭПР: $\frac{N_{-\mu} - N_{+\mu}}{N_{-\mu} + N_{+\mu}} = 10^{-3}$</p>	<p>ЯМР: $\frac{N_{-\mu} - N_{+\mu}}{N_{-\mu} + N_{+\mu}} = 10^{-6}$</p>
$T = \frac{T_1 + 2T_2}{2T_1T_2}$	<p>ЭПР: $T \approx 10^{-8} \div 10^{-5}$ с</p>	<p>ЯМР: $T \approx 10^{-1} \div 10$ с</p>