

# Метод электронного парамагнитного резонанса

## А. Н. Осипов

План лекции:

- 1) Принцип метода ЭПР.
  - а) история открытия метода ЭПР,
  - б) механический и магнитный моменты электрона,
  - в) эффект Зеемана,
  - г) основное уравнение резонанса,
- 2) Характеристики спектров ЭПР.
  - а) амплитуда,
  - б) форма линии,
  - в) ширина линии,
  - г) сверхтонкая структура,
- 3) Устройство радиоспектрометра ЭПР.
- 4) Применение ЭПР в медико-биологических исследованиях.
  - а) естественные сигналы ЭПР, наблюдаемые в биологических системах,
  - б) метод спиновых меток и зондов, метод спиновых ловушек.
  - в) метод спиновых ловушек.

### Принцип метода ЭПР

#### *История открытия метода ЭПР*

Метод ЭПР является основным методом для изучения парамагнитных частиц присутствующих в биологических системах. К парамагнитным частицам имеющим важное биологическое значение относятся два главных типа соединений - это свободные радикалы и металлы переменной валентности (такие как Fe, Cu, Co, Ni, Mn) или их комплексы. Кроме свободнорадикальных состояний методом ЭПР исследуют триплетные состояния, возникающие в ходе фотобиологических процессов.

Метод электронного парамагнитного резонанса был открыт сравнительно недавно - в 1944 г. в Казанском Университете Евгением Константиновичем ЗАВОЙСКИМ при исследовании поглощения электромагнитной энергии парамагнитными солями металлов. Он заметил, что монокристалл  $\text{CuCl}_2$ , помещенный в постоянное магнитное поле 40 Гаусс (4 мТл) начинает поглощать микроволновое излучение с частотой около 133 Мгц. Пионерами применения ЭПР в биологических исследованиях в СССР были Л.А. Блюменфельд и А.Э. Калмансон, которые опубликовали в 1958 г. в журнале Биофизика статью об изучении свободных радикалов, полученных под действием ионизирующего излучения на белки.

#### *Механический и магнитный моменты электрона*

Орбитальное и спиновое движение электронов лежат в основе их орбитального и спинового механических моментов. Орбитальный момент количества движения электрона  $P$  по орбите радиуса  $R$  равен

$$P = m \times v \times R, \quad (5.1)$$

где  $m$ - масса электрона,  $v$  - его скорость. Орбитальному механическому моменту соответствует орбитальный магнитный момент

$$\mu_m = IS, \quad (5.2)$$

где  $I$  - сила тока в контуре, а  $S$  - площадь контура (в данном случае круговой орбиты равна  $\pi R^2$ ). Подставляя в формулу (5.2) выражение для площади и учитывая, что

$$I = \frac{v}{2\pi R} e, \quad (5.3)$$

где  $e$  - заряд электрона, получим

$$\mu_m = -\frac{vRe}{2}. \quad (5.4)$$

Сопоставляя выражения для механического и магнитного моментов электрона (5.1) и (5.4), можно написать, что

$$\mu_m = \frac{e}{2m} P. \quad (5.5)$$

С другой стороны, из атомной физики известно, что орбитальный механический момент выражается через орбитальное квантовое число следующим образом

$$P = n \frac{h}{2\pi}, \quad (5.6)$$

где  $n$  - орбитальное квантовое число, принимающее значения 0, 1, 2 и т.д. В этом случае с учетом (5.6), выражение для магнитного орбитального момента будет выглядеть

$$\mu_m = -\frac{eh}{4\pi m} n. \quad (5.7)$$

Для  $n=1$  величина  $m_m$  называется магнетоном Бора и является единичным магнитным моментом. Эта величина обозначается буквой  $\beta$  и равна  $9,27 \cdot 10^{-21}$  Дж/м\*Тл. Таким образом

$$\beta = -\frac{eh}{4\pi m} \quad (5.8)$$

Спиновый магнитный момент электрона связан со спиновым движением электрона, которое можно представить, как движение вокруг собственной оси. Спиновый механический момент электрона равен

$$P_s = \frac{h}{2\pi} \sqrt{S(S+1)}, \quad (5.9)$$

где  $S$  - спиновое квантовое число, равное 1/2.

Магнитный и механический спиновые моменты связаны соотношением

$$m_s = -P_s \frac{e}{m} = M_s \frac{eh}{2\pi m}, \quad (5.10)$$

где  $M_s$  - магнитное квантовое число, равное  $\pm 1/2$ . Отношение магнитного момента к механическому называется гиромагнитным отношением ( $g$ ). Можно видеть, что для орбитального движения

$$g = -\frac{e}{2m}, \text{ а для спинового } g = -\frac{e}{m}.$$

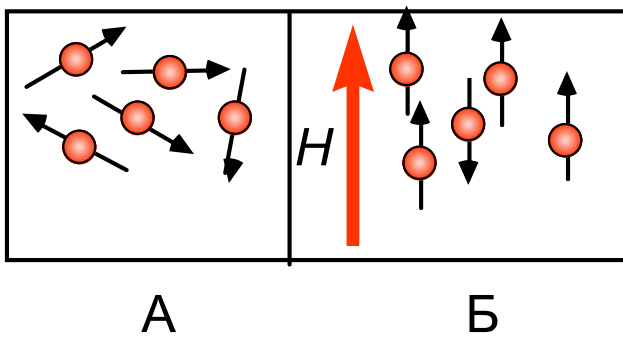
Для гиромангнитного отношения электронов, имеющих различный вклад орбитального и спинового движения, вводят коэффициент пропорциональности  $g$ , такой, что

$$g = -g \frac{e}{2m}. \quad (5.11)$$

Этот коэффициент пропорциональности называется  $g$ -фактором.  $g=1$ , при  $S=0$ , т.е. когда отсутствует спиновое движение электрона и существует только орбитальное, и  $g=2$ , если отсутствует орбитальное движение и существует только спиновое (например, для свободного электрона).

Магнитный момент электрона складывается в общем случае из спинового и орбитального магнитных моментов. Однако, в большинстве случаев, орбитальный магнитный момент равен нулю. Поэтому при обсуждении принципа метода ЭПР будет рассматриваться только спиновый магнитный момент.

### Эффект Зеемана

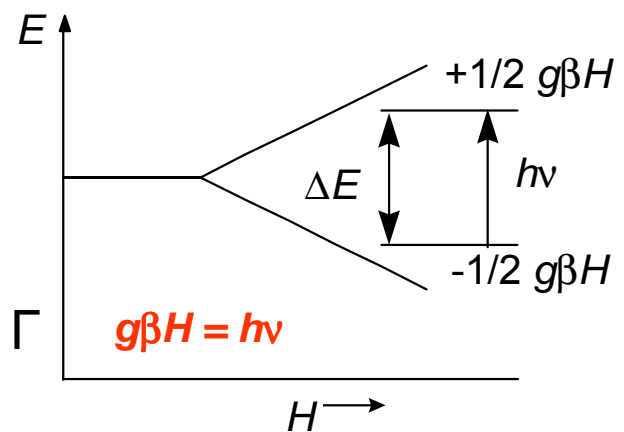


В отсутствие внешнего магнитного поля магнитные моменты электронов ориентированы случайным образом (рис. 1 А), и их энергия практически не отличается друг от друга ( $E_0$ ). При наложении внешнего магнитного поля магнитные моменты электронов ориентируются в поле в зависимости от величины спинового магнитного момента (рис. 1 Б), и их энергетический уровень расщепляется на два (рис. 2)

Рис. 2. Расщепление энергетических уровней одиночных электронов в магнитном поле (эффект Зеемана).

Энергия взаимодействия магнитного момента электрона с магнитным полем выражается уравнением

$$E = -\vec{\mu} \vec{H} = -\mu H \cos(\vec{\mu} \vec{H}), \quad (5.12)$$



где  $\mu$  - магнитный момент электрона,  $H$  - напряженность магнитного поля,  $\cos(\mu H)$  - косинус угла между  $\mu$  и  $H$ .

**Эффект Зеемана (Рис. 1)** ( $ES=+1/2$  и  $ES=-1/2$ )

Из уравнения (5.11) следует, что

$$\mu_s = -gP_s \frac{e}{2m} = -gS \frac{he}{4\pi m} = \pm \frac{1}{2} gb, \quad (5.13)$$

а энергия взаимодействия электрона с внешним магнитным полем составит

$$E = \mu_s H = \pm \frac{1}{2} g\beta H, \quad (5.14)$$

В этом случае разница в энергии между двумя уровнями составит

$$\Delta E = g\beta H \quad (5.15)$$

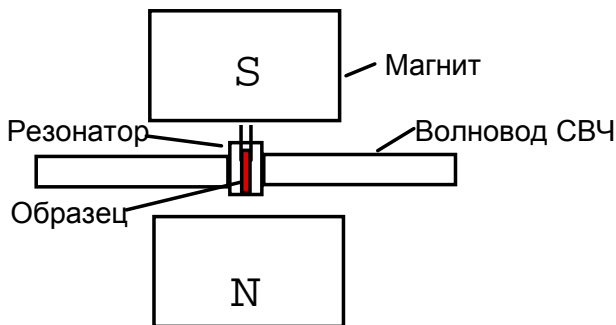
Уравнение (5.14) описывает эффект Зеемана, который можно выразить следующим словами: энергетические уровни электронов, помещенных в магнитное поле, расщепляются в этом поле в зависимости от величины спинового магнитного момента и интенсивности магнитного поля.

*Основное уравнение резонанса.*

Количество электронов, имеющих ту или иную энергию, будет определяться в соответствии с распределением Больцмана, а именно

$$\frac{n_{1/2}}{n_{-1/2}} = e^{-\frac{\Delta E}{kT}} = e^{-\frac{g\beta H}{kT}}, \quad (5.16)$$

где  $n_1$  и  $n_2$  количество электронов на более высоком или более низком энергетическом уровне, соответствующем магнитному моменту электрона со спином  $+1/2$  или  $-1/2$ .



Если теперь на систему электронов, находящуюся в магнитном поле, подать электромагнитную энергию, то при определенных значениях величины энергии падающего кванта будут происходить переходы электронов между уровнями. Необходимым условием переходов является равенство энергии падающего кванта ( $h\nu$ ) разности энергий между уровнями электронов с различными спинами ( $g\beta H$ ).

$$\Delta E = h\nu = g\beta H \quad (5.17)$$

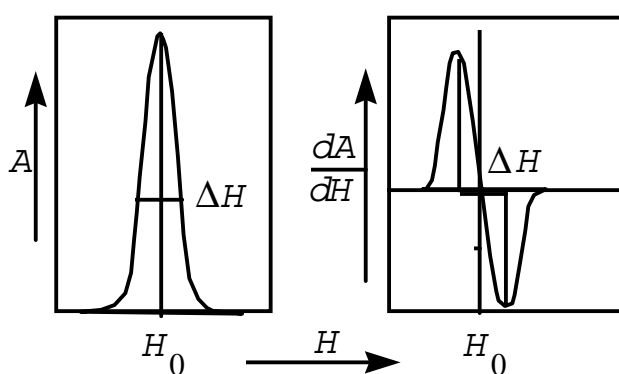
Уравнение (5.17) выражает основное условие поглощения энергии электронами. Под влиянием излучения электроны, находящиеся на более высоком энергетическом уровне, будут испускать энергию и возвращаться на нижний уровень, это явление называется индуцированной эмиссией. Электроны же, находящиеся на нижнем уровне, будут поглощать энергию и переходить на более высокий энергетический уровень, это явление называется резонансным поглощением. Поскольку вероятности одиночных переходов между энергетическими уровнями равны, а общая вероятность переходов пропорциональна количеству электронов, находящихся на данном энергетическом уровне, то поглощение энергии будет преобладать над ее излучением. Это связано с тем, что как следует из уравнения (5.16) заселенность нижнего уровня выше заселенности верхнего энергетического уровня.

В этом месте следует отметить особое положение свободных радикалов, т.е. молекул, имеющих неспаренные электроны на внешней электронной орбитали, в распределении электронов по уровням энергии. Если на орбитали имеется парное количество электронов, то естественно, заселенность энергетических уровней будет одинакова и количество поглощенной энергии электронами будет равно количеству излученной энергии. Поглощение энергии веществом, помещенным в магнитное поле, будет заметно только в том случае, когда на орбитали будет находиться только один электрон, тогда можно будет говорить о Больцмановском распределении электронов между энергетическими уровнями.

### Характеристики спектров ЭПР

#### Амплитуда сигнала

Сигнал ЭПР представляет собой первую производную от лин. Площадь под линией поглощения пропорциональна концентрации парамагнитных частиц в образце. Таким образом, концентрация парамагнитных центров пропорциональна первому интегралу под линией поглощения или второму интегралу от спектра ЭПР. Если два сигнала имеют одинаковую ширину, то концентрации парамагнитных центров соотносятся как амплитуды сигналов. ии поглощения.



Для определения концентрации измеряют площади под кривой поглощения у эталона с известной концентрацией парамагнитных центров и у измеряемого образца и неизвестную концентрацию находят из пропорции, при условии, что оба образца имеют одинаковую форму и объем:

$$C_{изм.} = C_{эт.} \frac{S_{изм.}}{S_{эт.}}, \quad (5.18)$$

где  $C_{изм.}$  и  $C_{эт.}$  - концентрации измеряемого образца и эталона соответственно, а  $S_{изм.}$  и  $S_{эт.}$  - площади под линиями поглощения измеряемого сигнала и эталона.

Для определения площади под линией поглощения неизвестного сигнала можно воспользоваться приемом численного интегрирования

$$S = \int \int_{-\infty}^{\infty} f'(H) dH = \int_{-\infty}^{\infty} F(H) dH,$$

где  $f'(H)$  - первая производная линии поглощения (спектр ЭПР),  $F(H)$  - функция линии поглощения, а  $H$  - напряженность магнитного поля.

$$S = \int_{-\infty}^{\infty} F(H) dH = F(H)H \Big|_{-\infty}^{\infty} - \int_{-\infty}^{\infty} H dF(H), \quad (5.19)$$

Учитывая, что  $F(H) \cdot H$  в точках  $-\infty$  и  $\infty$  равно нулю и  $dF(H)$  равно  $f'(H)dH$ , получим

$$S = \int_{-\infty}^{\infty} H f'(H) dH, \quad (5.20)$$

где  $f'(H)$  - первая производная от линии поглощения, или спектр ЭПР. От интеграла легко перейти к интеральной сумме, учитывая, что  $H = n \cdot \Delta H$ , получим

$$S = \sum_{i=1}^{\infty} n_i \Delta H_i^2 f'_i(H) = \Delta H^2 \sum_{i=1}^{\infty} f'_i(H) \cdot n_i, \quad (5.21)$$

где  $\Delta H$  - шаг изменения магнитного поля, а  $n_i$  - номер шага. Таким образом площадь под кривой поглощения будет равна произведению квадрата величины шага магнитного поля на сумму произведений амплитуды спектра ЭПР на номер шага. Из выражения (5.21) легко видеть, что при больших  $n$  (т.е. вдали от центра сигнала) вклад удаленных частей спектра может быть достаточно большим даже при малых значениях амплитуды сигнала.

### Форма линии

Хотя согласно основному уравнению резонанса поглощение происходит только при равенстве энергии падающего кванта разности энергии между уровнями неспаренных электронов спектр ЭПР является не линейчатым, а непрерывным в некоторой окрестности точки резонанса. Функция, описывающая сигнал ЭПР называется функцией формы линии. В разбавленных растворах, когда можно пренебречь взаимодействием между парамагнитными частицами, кривая поглощения описывается функцией Лоренца:

$$F_L(H) = F_{L0} \left(1 + \frac{(H - H_0)^2}{\Delta H_{1/2}^2}\right)^{-1}, \quad (5.22)$$

где  $F_{L0}$  - 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.

$$F_G(H) = F_{G0} * e^{-\frac{(H-H_0)^2}{\Delta H_{1/2}^2}}. \quad (5.23)$$

Функция Гаусса является огибающей спектра ЭПР если между парамагнитными частицами существует взаимодействие. Учитывать форму линии особенно важно при определении площади под кривой поглощения. Как видно из формул (5.22) и (5.23) у функции Лоренца более медленное убывание и соответственно более широкие крылья, что может давать значительную ошибку при интегрировании спектра.

### *Ширина линии*

Ширина спектра ЭПР зависит от взаимодействия магнитного момента электрона с магнитными моментами окружающих ядер (решетки) и электронов. Рассмотрим механизм поглощения энергии неспаренными электронами подробнее. Если в низкоэнергетическом состоянии находитесь  $N_1$  электронов, а в высокоэнергетическом  $N_2$  и  $N_1 > N_2$ , то при подаче электромагнитной энергии на образец разность заселенности уровней будет уменьшаться пока не станет равной нулю. Это происходит потому, что вероятности одиночного перехода под действием излучения из низкоэнергетического состояния в высокоэнергетическое и наоборот ( $W_{12}$  и  $W_{21}$ ) равны между собой, а заселенность нижнего уровня выше. Введем переменную  $n = N_1 - N_2$ . Тогда изменение разности заселенности уровней во времени можно записать

$$\begin{aligned} \frac{dN_1}{dt} &= N_2 W_{21} - N_1 W_{12} \quad \text{и} \quad \frac{dN_2}{dt} = N_1 W_{12} - N_2 W_{21}; \quad \text{откуда} \\ \frac{dn}{dt} &= \frac{dN_1}{dt} - \frac{dN_2}{dt} = -2W(N_1 - N_2) = -2Wn \end{aligned} \quad (5.24).$$

Однако, в эксперименте изменения разности заселенности уровней не наблюдается благодаря тому, что существуют процессы релаксации, поддерживающие постоянной эту разность. Механизм релаксации заключается в передаче кванта электромагнитной энергии решетке или окружающим электронам и возвращении электрона на низкоэнергетический уровень. Если обозначить вероятности переходов индуцируемых решеткой через  $P_{12}$  и  $P_{21}$ , причем  $P_{12} < P_{21}$ , то изменение разности заселенности уровней будет

$$\frac{dn}{dt} = -2(N_1 P_{12} - N_2 P_{21}), \quad (5.25)$$

или если заменить  $N_1 + N_2$  на  $N$ , то

$$\frac{dn}{dt} = N(P_{21} - P_{12}) - n(P_{12} + P_{21}). \quad (5.26)$$

В стационарном состоянии, когда изменение разности заселенности равно нулю, начальная разность заселенности уровней ( $n_0$ ) остается постоянной и равной

$$n_0 = N\left(\frac{P_{21} - P_{12}}{P_{12} + P_{21}}\right). \quad (5.27)$$

В этом случае уравнение (5.26) будет выглядеть

$$\frac{dn}{dt} = (n_0 - n)(P_{12} + P_{21}), \quad (5.28)$$

или заменив  $P_{12}+P_{21}$  на  $1/T_1$ , получим

$$\frac{dn}{dt} = \frac{n_0 - n}{T_1}. \quad (5.29)$$

Величина  $T_1$  называется временем спин-решеточной релаксации и характеризует среднее время жизни спинового состояния. В итоге, изменение разности заселенности уровней системы неспаренных электронов, находящейся под воздействием электромагнитного излучения и взаимодействующей с решеткой, будет определяться уравнением

$$\frac{dn}{dt} = -2Wn + \frac{n_0 - n}{T_1}. \quad (5.30)$$

Отсюда следует, что в стационарном состоянии

$$n = \frac{n_0}{1 + 2WT_1} \quad (5.31)$$

и при  $2WT_1 \ll 1$ ,  $n = n_0$ , т.е. при относительно небольших мощностях разность заселенности уровней остается практически постоянной.

Из соотношения неопределенностей Гейзенберга следует, что

$$\Delta E \geq \frac{\hbar}{2\pi} * \frac{1}{\Delta t} \quad (5.32)$$

Если принять, что  $\Delta t$  равно  $T_1$ , а  $\Delta E$  соответствует  $g\beta\Delta H$ , то уравнение (5.32) можно переписать в виде

$$\Delta H \geq \frac{\hbar}{2\pi g\beta} * \frac{1}{T_1}, \quad (5.33)$$

т.е. неопределенность в ширине линии обратно пропорциональна времени спин-решеточной релаксации.

Кроме взаимодействия магнитного момента неспаренного электрона с решеткой возможно, также его взаимодействие с магнитными моментами других электронов. Это взаимодействие приводит к уменьшению времени релаксации и тем самым к уширению линии спектра ЭПР. В этом случае вводят понятие времени спин-спиновой релаксации ( $T_2$ ).



Наблюдаемое время релаксации считают суммой времени спин-решеточной и спин-спиновой релаксации.

$$\Delta H \geq \frac{h}{2\pi g\beta} * \frac{1}{T_{эфф.}} = \frac{h}{2\pi g\beta} * \frac{2T_1 + T_2}{2T_1T_2}.$$

Для свободных радикалов в растворах  $T_1 \gg T_2$ , следовательно ширина линии будет определяться  $T_2$ . Среди механизмов уширения линий следует упомянуть следующие: диполь-дипольное взаимодействие; анизотропия g-фактора; динамическое уширение линии и спиновый обмен.

В основе *диполь-дипольного взаимодействия* лежит взаимодействие магнитного момента неспаренного электрона с локальным магнитным полем, создаваемым соседними электронами и ядрами. Напряженность магнитного поля в какой-либо точке зависит от расстояния до этой точки и взаимной ориентации магнитных моментов неспаренного электрона и другого взаимодействующего электрона или ядра. Изменение энергии неспаренного электрона будет определяться

$$\Delta E = h\Delta\nu = g\beta\Delta H = g\beta \frac{\mu}{R^3} (3 \cos^2 \theta - 1), \quad (5.34)$$

где  $\mu$  - магнитный момент электрона,  $R$  - расстояние, до источника локального магнитного поля,  $\theta$  - угол между взаимодействующими магнитными моментами.

Вклад *анизотропии g-фактора* в уширение линии ЭПР связан с тем, что орбитальное движение электрона создает переменное магнитное поле с которым взаимодействует спиновый магнитный момент. Это взаимодействие приводит к отклонению g-фактора от значения 2,0023, соответствующего свободному электрону. Для кристаллических образцов величины g-фактора, соответствующие ориентации кристалла обозначают  $g_{xx}$ ,  $g_{yy}$  и  $g_{zz}$  соответственно. При быстром движении молекул, например в растворах, анизотропия g-фактора может усредняться.

Уширение сигнала ЭПР может быть связано с взаимным превращением двух форм радикала. Так, если каждая из форм радикала имеет свой спектр ЭПР, то увеличение скорости взаимного превращения этих форм друг в друга будет приводить к уширению линий, т.к. при этом уменьшается время жизни радикала в каждом состоянии. Такое изменение ширины сигнала называется *динамическим уширением* сигнала.

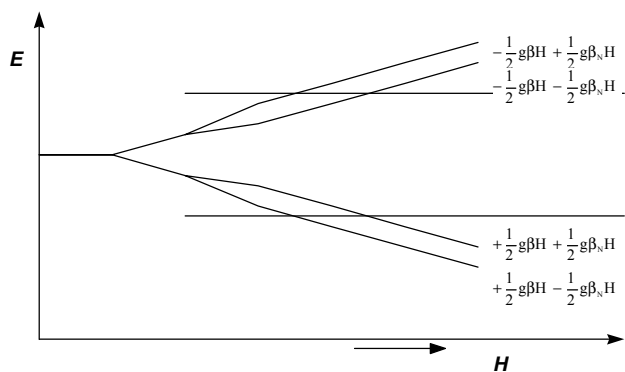
*Спиновый обмен* является еще одним способом уширения сигнала ЭПР. Механизм уширения сигнала при спиновом обмене заключается в изменении направления спинового магнитного момента электрона на противоположное при соударении с другим неспаренным электроном или иным парамагнетиком. Поскольку при таком соударении уменьшается время жизни электрона в данном состоянии, то сигнал ЭПР уширяется. Наиболее частым случаем

уширения линии ЭПР по механизму спинового обмена является уширение сигнала в присутствии кислорода или парамагнитных ионов металлов.

### Сверхтонкая структура

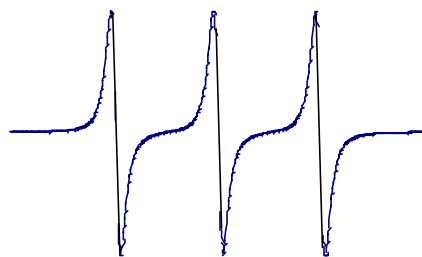
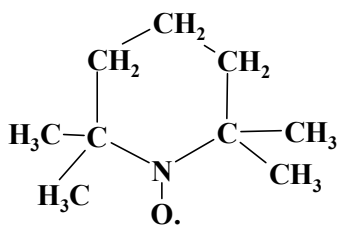
В основе расщепления линии ЭПР на несколько лежит явление *сверхтонкого взаимодействия*, т. е. взаимодействия магнитных моментов неспаренных электронов ( $M_S$ ) с магнитными моментами ядер ( $M_N$ ).

Поскольку в присутствии магнитного момента ядра суммарный магнитный момент равен  $M_S + M_N$ , где  $M_S$  - магнитный момент электрона, а  $M_N$  - магнитный момент ядра, то суммарное магнитное поле  $H_{\text{сумм.}} = H_0 \pm H_{\text{лок.}}$ , где  $H_{\text{лок.}}$  - локальное магнитное поле, создаваемое магнитным моментом ядра. В данном случае вместо одного резонансного значения поля будут два -  $H_0 + H_{\text{лок.}}$  и  $H_0 - H_{\text{лок.}}$ , которым будут соответствовать две линии. Таким образом, вместо одной линии при  $H_0$  мы получаем две линии при  $H_0 + H_{\text{лок.}}$  и  $H_0 - H_{\text{лок.}}$ .



Важной особенностью сверхтонкого взаимодействия являются правила отбора для переходов между уровнями. Разрешенными переходами являются переходы при которых изменение спинового магнитного момента неспаренного электрона ( $\Delta M_S$ ) равно 1, а спинового магнитного момента ядра ( $\Delta M_N$ ) равно 0.

В рассмотренном нами примере спин ядра, взаимодействующего с неспаренным электроном, был полуцелочисленным и был равен  $\pm 1/2$ , что в конечном итоге дало нам расщепление на две линии. Такая величина спина характерна для протонов. У ядер атомов азота ( $N^{14}$ ) спин *целочисленный*. Он может принимать значения  $\pm 1$  и 0. В этом случае при взаимодействии неспаренного электрона с ядром атома азота будет наблюдаться расщепление на три одинаковых линии, соответствующих величине спина +1, -1 и 0. В общем случае число линий в спектре ЭПР равно  $2M_N + 1$ .



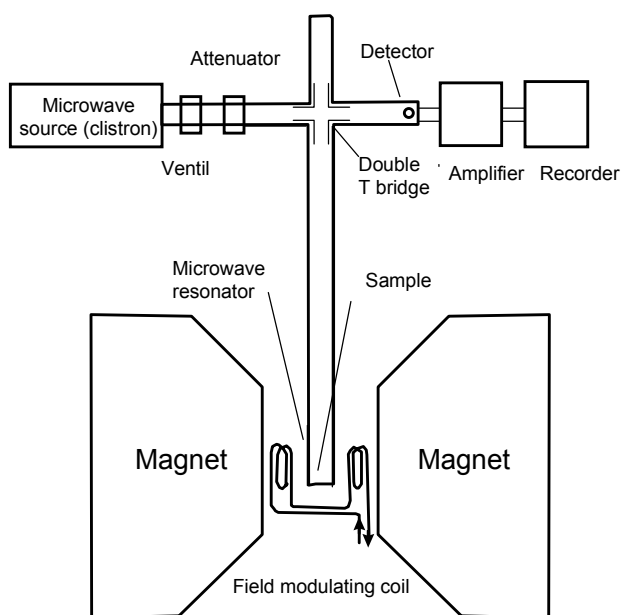
Формула спинового зонда ТЕМПО и его спектр ЭПР. В этом радикале неспаренный электрон локализован около ядра азота, магнитное поле которого накладывается на внешнее магнитное поле.

Естественно, что количество неспаренных электронов и соответственно площадь под кривой поглощения ЭПР не зависят от величины спина ядра и являются постоянными величинами. Следовательно, при расщеплении одиночного сигнала ЭПР на два или три, интенсивность каждой компоненты будет соответственно в 2 или 3 раза ниже.

Очень похожая картина возникает, если неспаренный электрон взаимодействует не с одним, а с несколькими эквивалентными (с одинаковой константой сверхтонкого взаимодействия) ядрами, имеющими магнитный момент отличный от нуля, например двумя протонами. В этом случае возникает три состояния, соответствующие ориентации спинов протонов - а) оба по полю, б) оба против поля и в) один по полю и один против поля. Вариант в) имеет вдвое большую вероятность, чем а) или б), т.к. может быть осуществлен двумя способами. В результате такого распределения неспаренных электронов одиночная линия расщепится на три с соотношением интенсивностей 1:2:1. В общем случае, для  $n$  эквивалентных ядер со спином  $M_N$  число линий равно  $2nM_N+1$ .

### Устройство радиоспектрометра ЭПР

Устройство радиоспектрометра ЭПР во многом напоминает устройство спектрофотометра для измерения оптического поглощения в видимой и ультрафиолетовой частях спектра.



Источником излучения в радиоспектрометре является клитрон, представляющий из себя радиолампу, дающую монохроматическое излучение в диапазоне сантиметровых волн. Диафрагме спектрофотометра в радиоспектрометре соответствует аттенюатор, позволяющий дозировать мощность, падающую на образец. Кювета с образцом в радиоспектрометре находится в специальном блоке, называемом *резонатором*. Резонатор представляет собой параллелепипед, имеющий цилиндрическую или прямоугольную полость в которой находится поглощающий образец. Размеры резонатора таковы, что в нем образуется стоячая волна. Элементом отсутствующем в оптическом спектрометре является электромагнит, создающий постоянное магнитное поле, необходимое для расщепления энергетических уровней электронов.

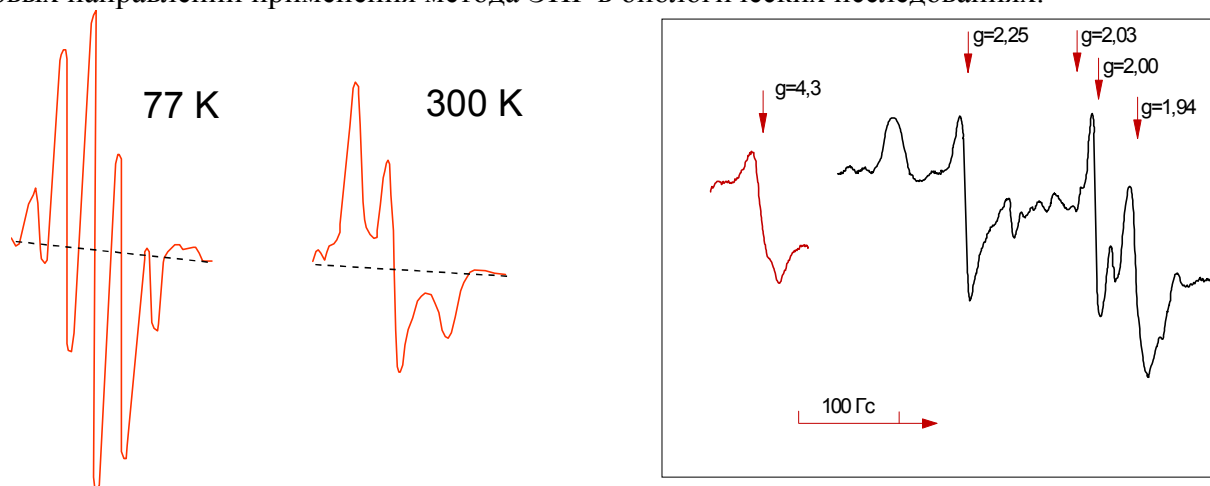
Излучение, прошедшее измеряемый образец, в радиоспектрометре и в спектрофотометре, попадает на детектор, затем сигнал детектора усиливается и регистрируется на самописце или компьютере. Следует отметить еще одно отличие радиоспектрометра. Оно заключается в том, что излучение радиодиапазона передается от источника к образцу и далее к детектору с помощью специальных трубок прямоугольного сечения, называемых волноводами. Размеры сечения волноводов определяются длиной волны передаваемого излучения. Эта особенность передачи радиоизлучения по волноводам и определяет тот факт, что для регистрации спектра ЭПР в радиоспектрометре используется постоянная частота излучения, а условие резонанса достигается изменением величины магнитного поля.

Еще одной важной особенностью радиоспектрометра является усиление сигнала посредством его модуляции высокочастотным переменным полем. В результате модуляции сигнала происходит его дифференцирование и превращение линии поглощения в свою первую производную, являющуюся сигналом ЭПР.

#### *Сигналы ЭПР, наблюдаемые в биологических системах*

Применение метода ЭПР в биологических исследованиях связано с изучением двух основных видов парамагнитных центров - свободных радикалов и ионов металлов

переменной валентности. Изучение свободных радикалов в биологических системах связано с трудностью, заключающейся в низкой концентрации свободных радикалов, образующихся при жизнедеятельности клеток. Концентрация радикалов в нормально метаболизирующих клетках составляет по разным источникам примерно  $10^{-8}$  -  $10^{-10}$  М, в то время как современные радиоспектрометры позволяют измерять концентрации радикалов  $10^{-6}$  -  $10^{-7}$  М. Повысить концентрацию свободных радикалов можно затормозив их гибель и повысив скорость их образования. Это можно сделать путем облучения (УФ или ионизирующей радиацией) биологических объектов находящихся при низкой температуре. Изучение структуры радикалов более или менее сложных биологически важных молекул и было одним из первых направлений применения метода ЭПР в биологических исследованиях.



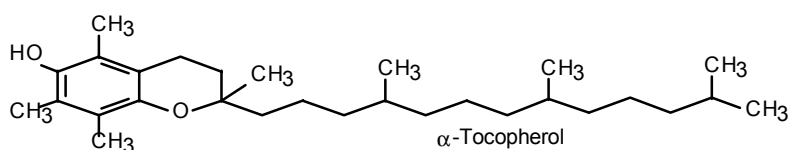
Спектр ЭПР печени крысы

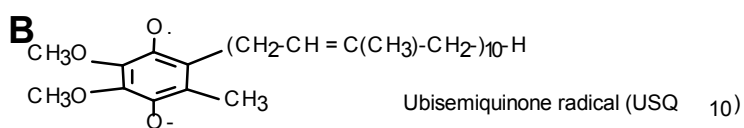
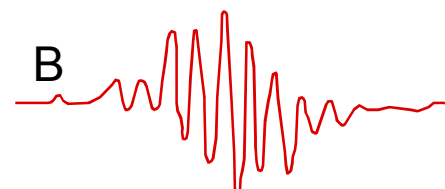
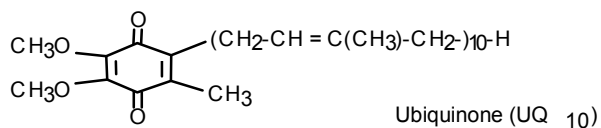
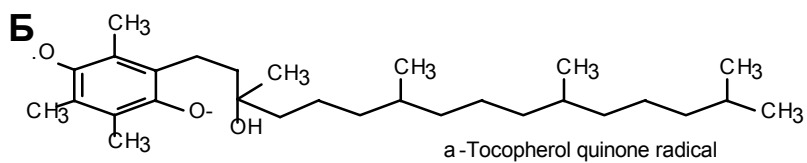
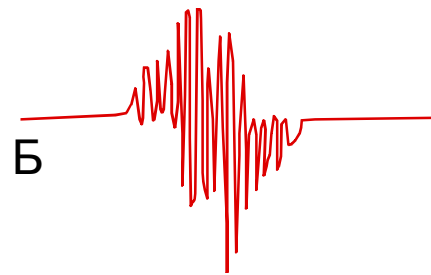
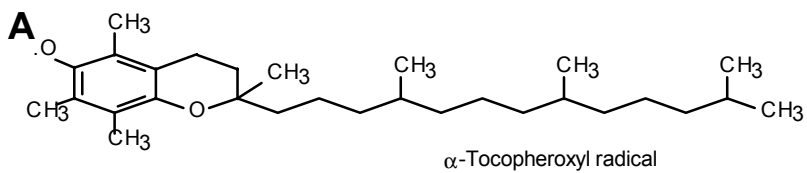
Спектры ЭПР УФ-облученного цистеина

Другим важным направлением применения метода ЭПР в биологических исследованиях было изучение металлов переменной валентности и/или их комплексов, существующих *in vivo*.

Если взглянуть на спектр 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. Благодаря коротким временам релаксации сигналы ЭПР металлопротеинов можно наблюдать только при низкой температуре, например, температуре жидкого азота.

Однако, сигналы ЭПР некоторых радикалов можно наблюдать и при комнатной температуре. К таким сигналам относятся сигналы ЭПР многих семихинонных или феноксильных радикалов, таких как семихинонный радикал убихинона, феноксильный и семихинонный радикал  $\alpha$ -токоферола (витамина Е), витамина D, и многие другие.





**Контрольные вопросы по теме "Применение электронного парамагнитного резонанса в медико-биологических исследованиях".**

1. Механические и магнитные моменты электрона. Магнетон Бора.
2. Эффект Зеемана
3. Основное уравнение резонанса.
4. Характеристики спектра ЭПР: амплитуда, ширина и форма линии.
5. Характеристики спектра ЭПР: сверхтонкая структура.