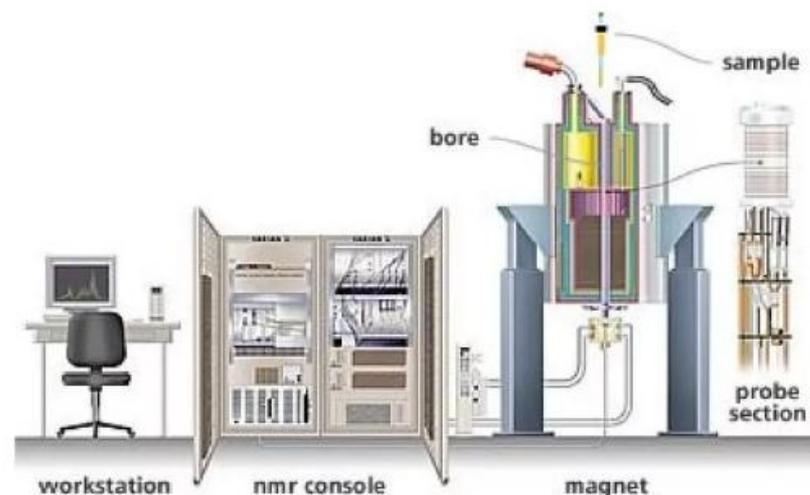


Министерство здравоохранения Республики Беларусь
Учреждение образования
«Гомельский государственный медицинский университет»

Лекция 5.1 (СУРС) Спектроскопия ЯМР и ЭПР



• Какую информацию о системе дают ЯМР и ЭПР?

$$M = \chi H$$

Диамагнетик: Ослабляет приложенное поле.
(He, H₂O, Au, CH₄, Ag, Bi).

$$\chi < 0 \quad (10^{-4} - 10^{-6})$$

$$\mu = 0 \quad M = 0$$

Парамагнетик: Усиливает приложенное поле.
(Pt, Al, O₂, NO, CuCl, UF₆).

$$\chi > 0 \quad (10^{-2} - 10^{-4})$$

$$\mu \neq 0 \quad M \neq 0$$

$$\chi = C/T$$

Ферромагнетик: Усиливает приложенное поле.
(Fe, Co, Ni).

$$\chi \gg 0 \quad (10^4 - 10^5)$$

$$\mu \neq 0 \quad M \neq 0$$

История магнитного резонанса

1896 — П.Зееман: расщепления уровней в магнитном поле

1939 - И.Раби: резонансное измерение магнитных моментов ядер в молекулярном пучке

1944 — Е.К. Завойский: экспериментальное наблюдение ЭПР

1946- Ф.Блох, Э.Персел: экспериментальное наблюдение ЯМР

1966 —Р.Эрнст: импульсный ЯМР с Фурье преобразованием

1971— Дж Джинер: двумерный ЯМР

1972 - П.Лаутербур, П.Мэнсфилд: ЯМР-томография

1977 — Дж.Вауф, Е.Стейскал, Дж.Шефер: ЯМР высокого разрешения в твердом теле

1980 — Дж.Джэксон: односторонний ЯМР



Нобелевские премии

Some Nobel Prizes for NMR



Kurt Wüthrich,
1938.
Nobel Prize in
Chemistry 2002



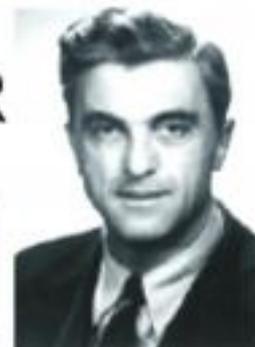
Sir Peter
Mansfield, 1933.
Nobel Prize in
Medicine 2003



ENC Boston 1995

Richard R. Ernst,
1933.
Nobel Prize in
Chemistry 1991

Edward Mills
Purcell,
1912 - 1997.
Nobel Prize in
Physics 1952



Felix Bloch,
1905 - 1983.
Nobel Prize in
Physics 1952



Paul Lauterbur,
1929.
Nobel Prize in
Medicine 2003

1952 –физика
Блох, Парсел
-явление ЯМР

1991 –химия
Эрнст
-импульсный
ЯМР

2002 –химия
Вютрих
-2D - ЯМР

2003 –медицина
Мэнсфилд,
Лаутербур
-томография

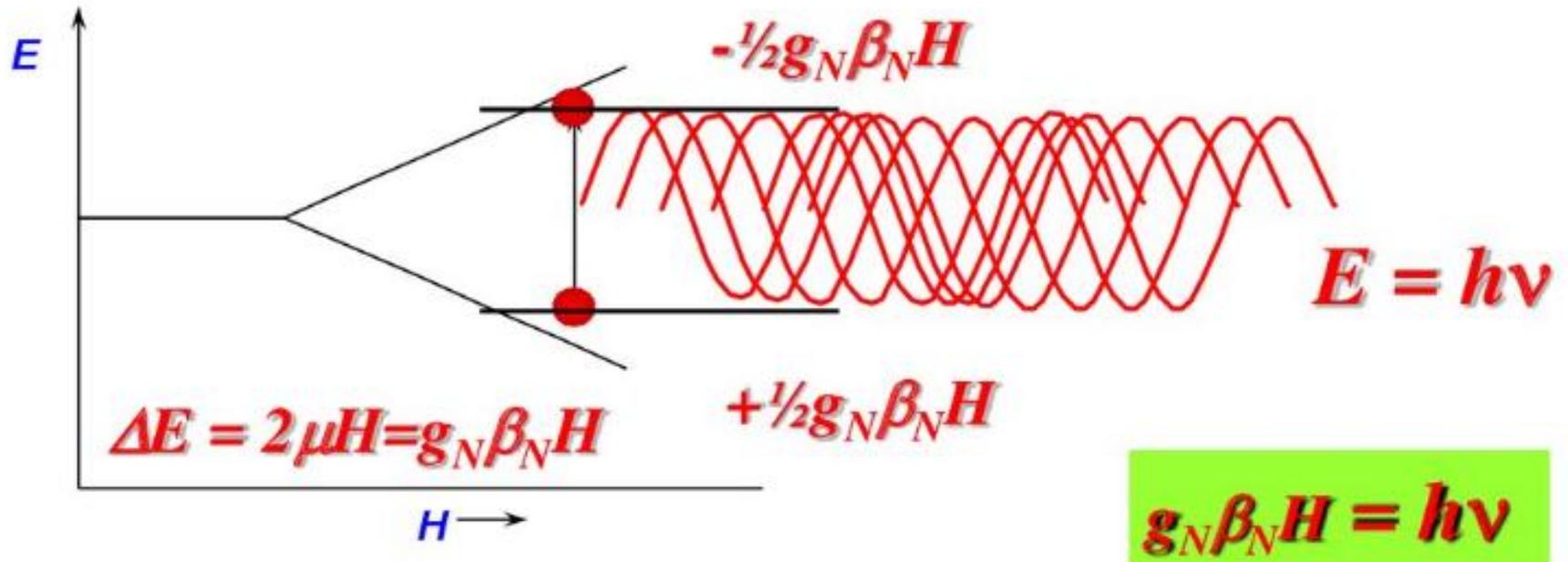
История магнитного резонанса: Казань 1944

Евгений Константинович Завойский



Принцип метода ЯМР

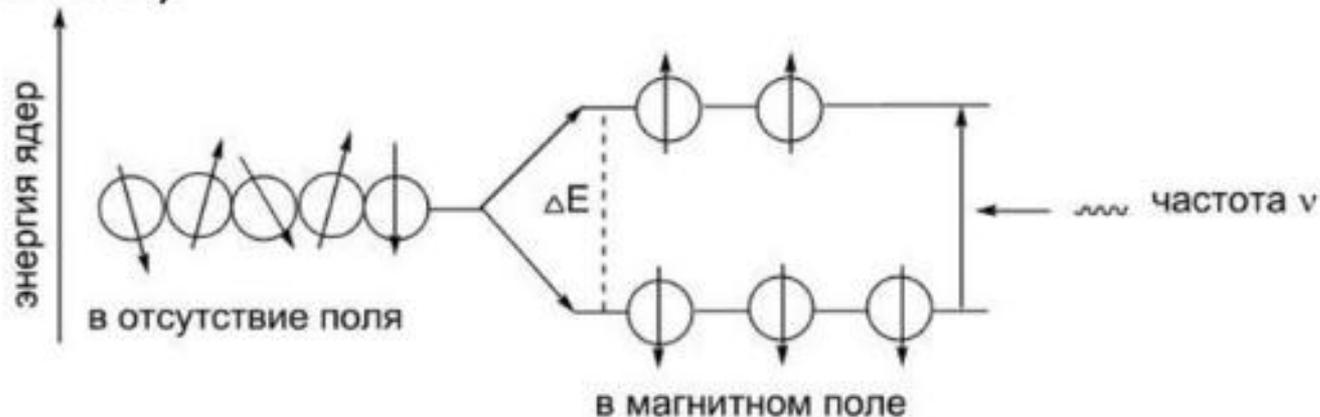
Во многом аналогичен принципу метода ЭПР. Заключается в поглощении электромагнитного излучения **ядрами** атомов, имеющими ненулевой магнитный момент, при их помещении в магнитное поле.



Явление ЯМР открыто Блохом в 1945 году. В 1952 г. это открытие отмечено Нобелевской премией.

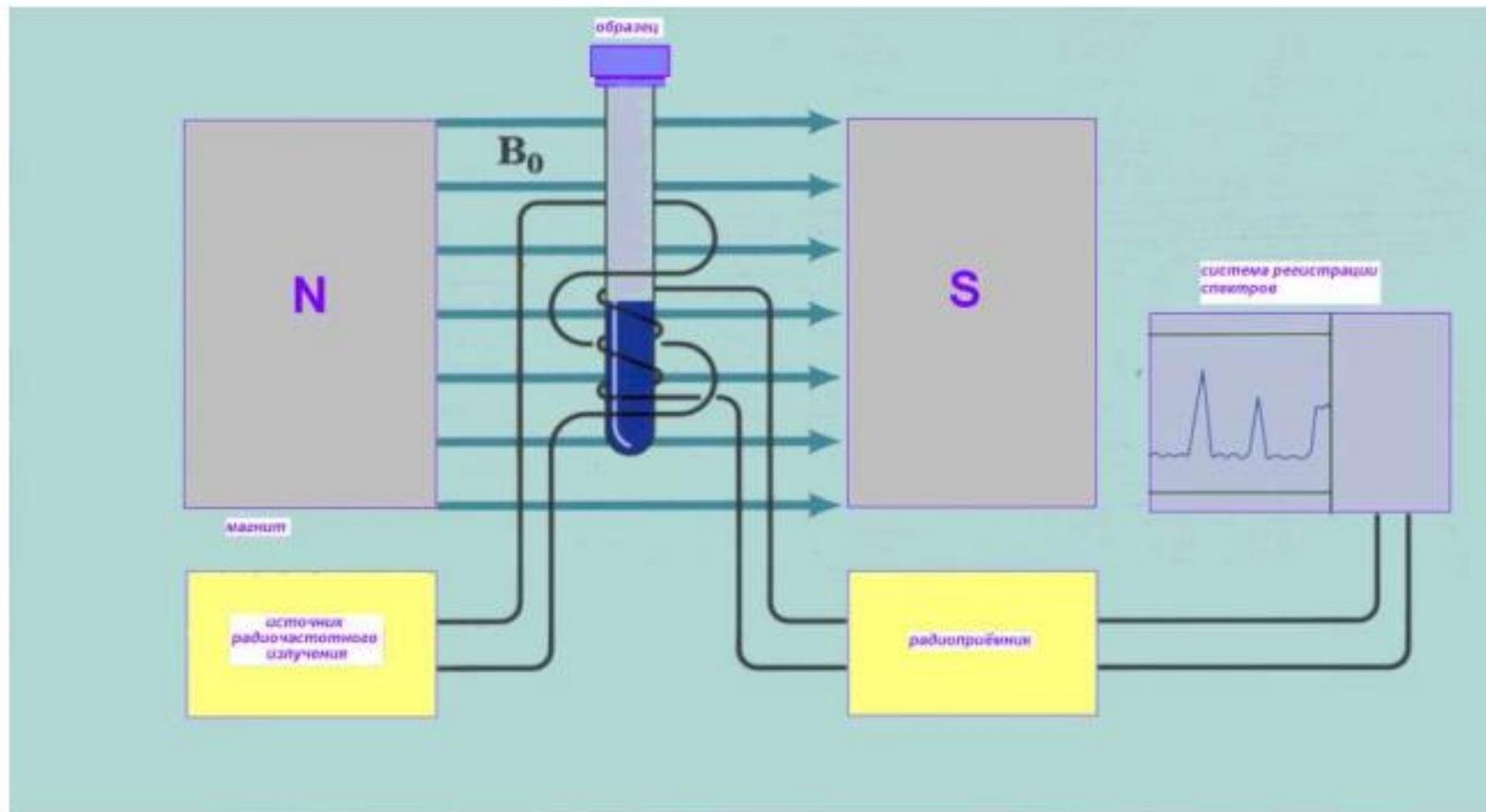
Методические основы

- Для исследования с помощью ЯМР спектроскопии, как правило, вещество растворяют в подходящем растворителе (однако ЯМР-анализ можно проводить и в твердой фазе). Для анализа необходимо ~ 10 - 20 мг образца. Приготовленный раствор помещают в ампулу объемом ~ 0.5 мл и диаметром 5 мм.
- Ампулу с образцом помещают между полюсами сильного магнита. В магнитном поле протоны мгновенно ориентируются в направлении поля H_0 (подобно маленьким стержневым магнитам). В первый момент после внесения образца число ядер, ориентированных вдоль поля и против поля, одинаково (50% на 50%).



Основы спектроскопии ЯМР

Схема простейшего стационарного спектрометра с непрерывной разверткой.



Радиоспектроскопия: ЯМР и ЭПР

ЭПР – парамагнитные частицы, магнитный момент электрона

ЯМР – диамагнитные молекулы, магнитные моменты ядер

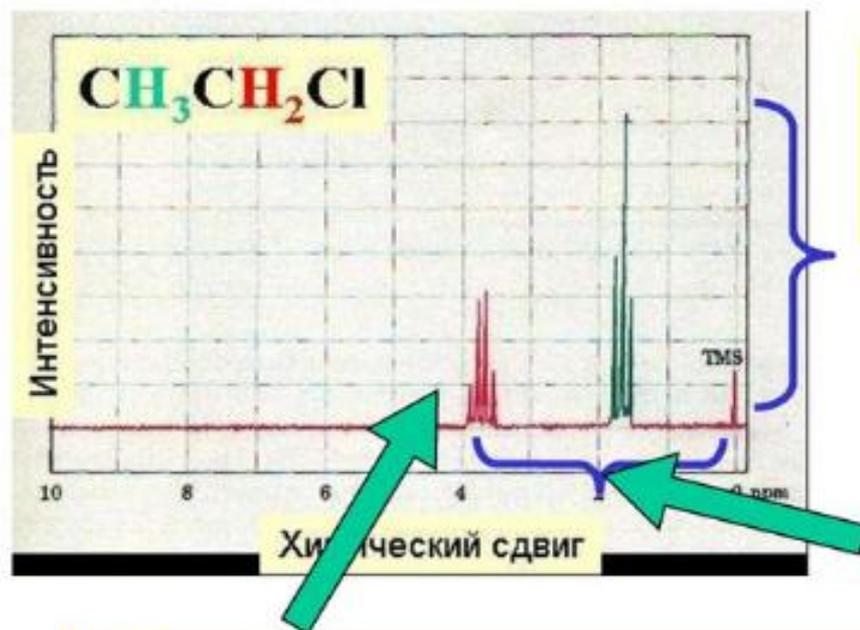
Высокое разрешение

Низкое разрешение
(измерение T_1 и T_2)

Градиентные методы
(томография, измерение D)

Односторонний ЯМР

Свойства спектров ЯМР



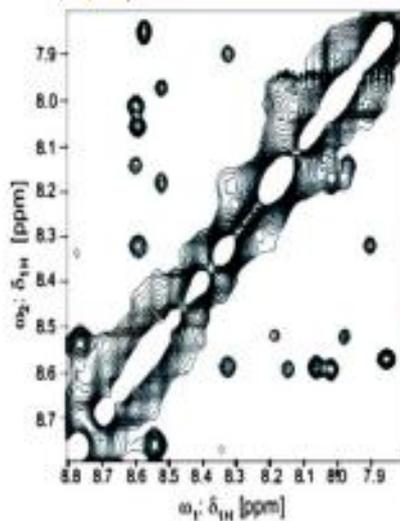
1. Интенсивность сигнала. Пропорциональна концентрации магнитных ядер в образце.

2. Химический сдвиг. Зависит от степени экранировки ядер электронами. Измеряется в миллионных долях (м.д.).

3. Спин-спиновое расщепление линий. Зависит от количества магнитных ядер в непосредственной близости от поглощающего ядра. Это свойство спектра в некоторой степени аналогично сверхтонкой структуре в спектрах ЭПР.

4. Ширина линии. Как и в ЭПР спектроскопии определяется временем релаксации ядер, которое в свою очередь зависит от взаимосвязей ядер и электронов.

ЯМР – высокое разрешение



example: ubiquitin, a linear protein from 76 amino acids in eukariotic organisms

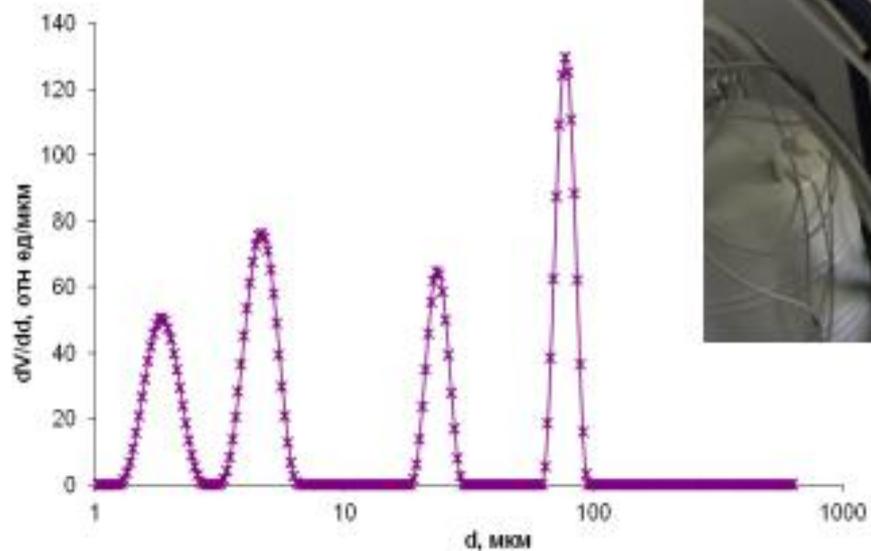


<http://bouman.chem.georgetown.edu/nmr/protein.htm>

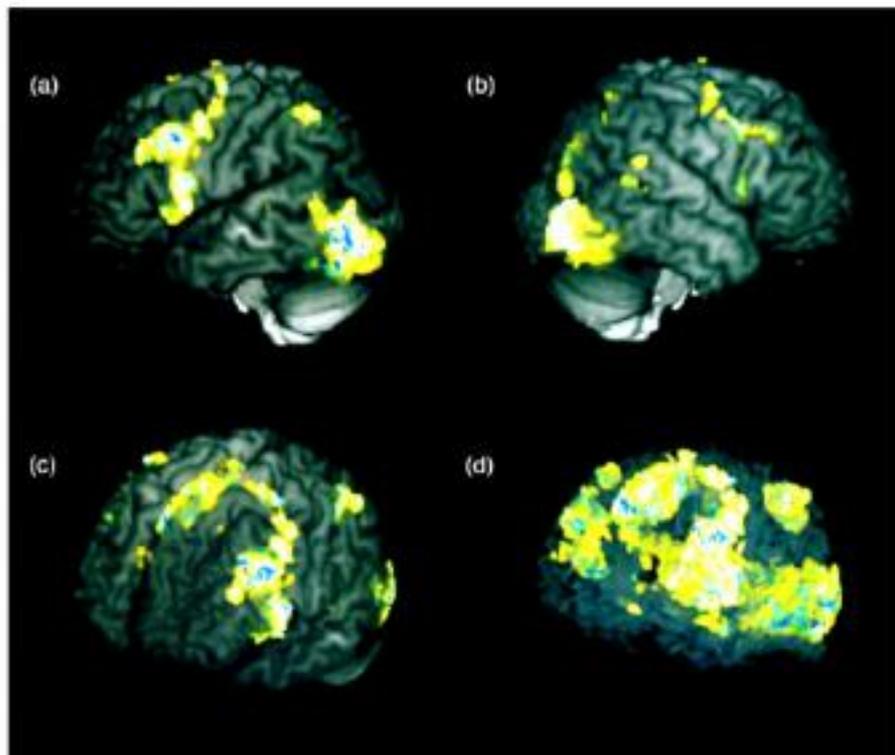
MET-ROU-ILE-
PHE-VAL-LYS-
THR-LEU-THR-
GLY-LYS-THR-
LE-THR-LEU-
GLU-VAL-GLU-
PRO-SER-ASP-
THR-ILE-GLU-
ASN-VAL-LYS-
ALA-LYS-ILE-
GLN-ASP-LYS-
GLU-GLY-ILE-
PRO-PRO-
ASP-GLN-GLN-
ARG-LEU-ILE-
PHE-ALA-GLY-
LYS-GLN-LEU-
GLU-ASP-GLY-
ARG-THR-LEU-
SER-ASP-TYR-
ASN-ILE-GLN-
LYS-GLU-SER-
THR-LEU-HIS-
LEU-VAL-LEU-
ARG-LEU-ARG-
GLY-GLY



ЯМР: релаксометрия



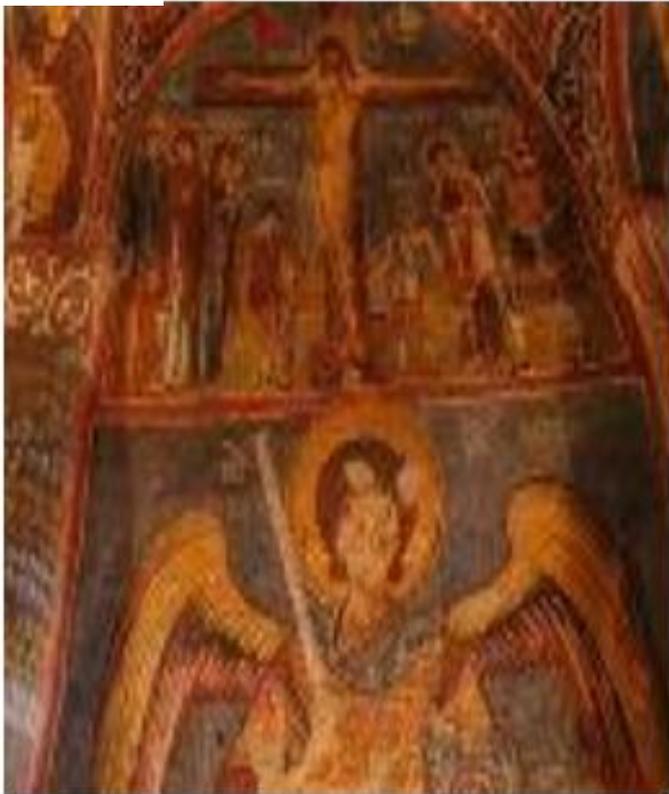
Градиентный ЯМР: томография



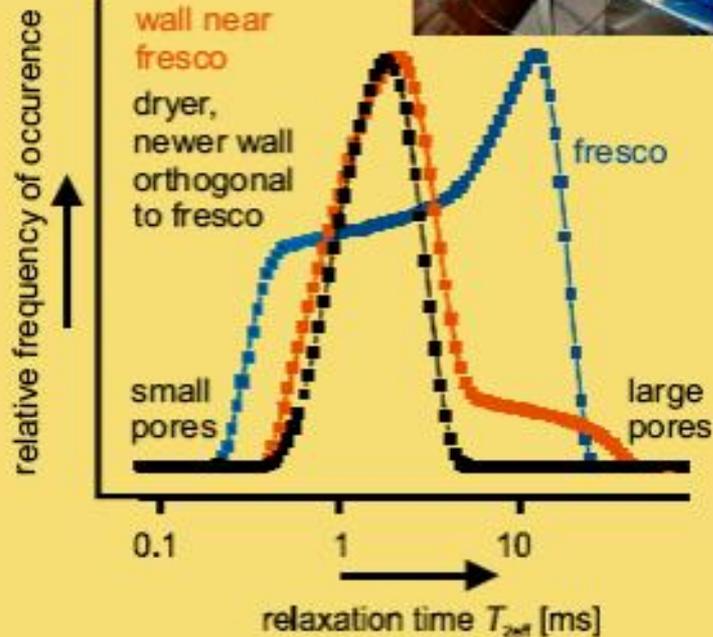
ЯМР - томограмма головного мозга:
контроль речевой активности



Односторонний ЯМР

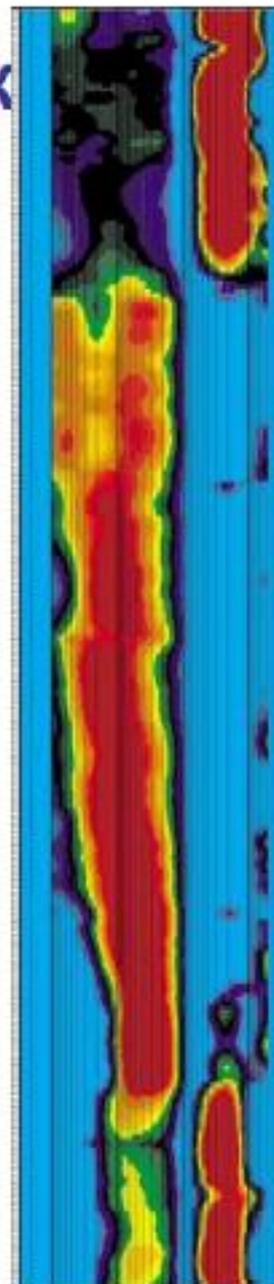
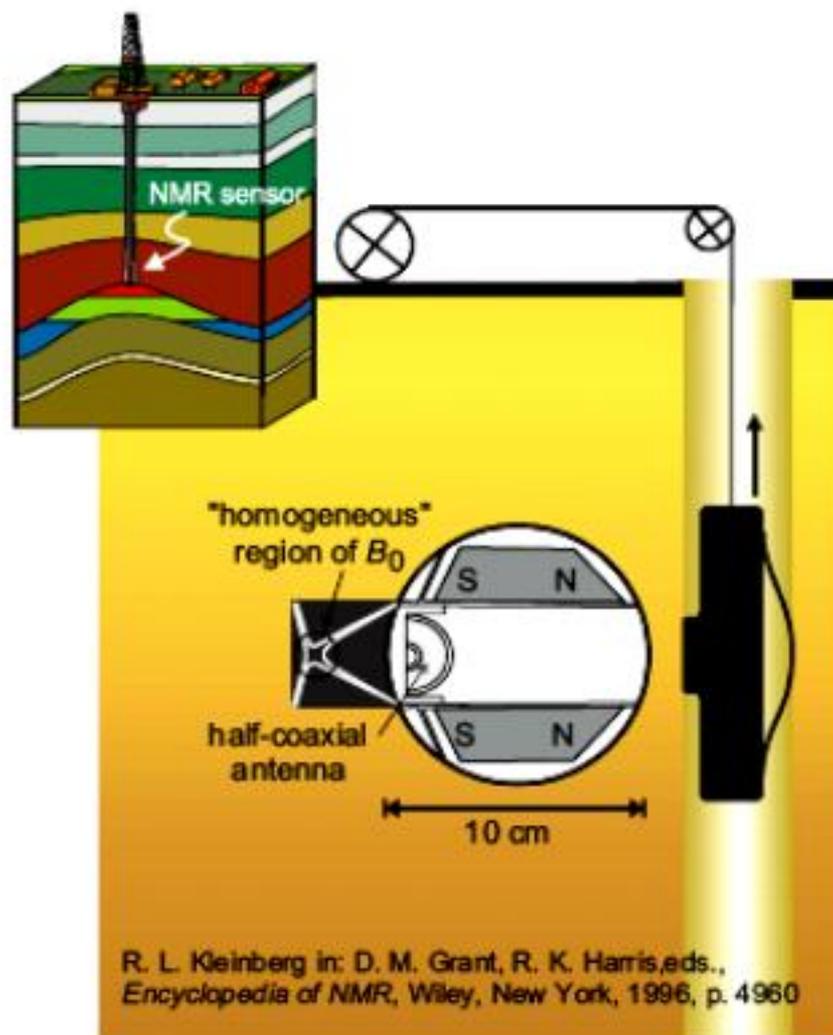


wet ancient fresco
near Colle Oppio in
Rome



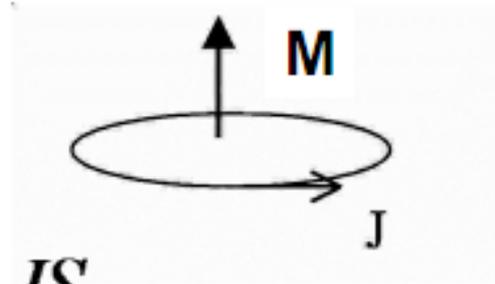
**Mobile Unilateral
Surface Explorer**

Односторонний ЯМР: каротаж



Магнитный момент и гиромагнитное отношение

$$M = \frac{1}{2c} \int_V [r \times j(r)] dV$$



$$M = \frac{JS}{c}$$

$$M = \gamma L$$

$$\gamma = \frac{q}{2cm}$$

$$L = \hbar n$$

$$M = \gamma L = \gamma \hbar n = \frac{e\hbar}{2mc} n$$

Магнетон Бора, ядерный магнетон

$$M = \gamma L$$

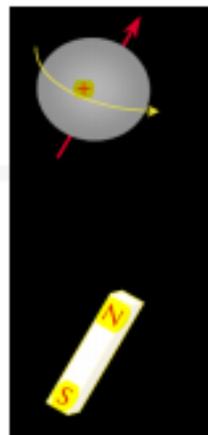
$$M = \frac{e\hbar}{2mc} n$$

$$\beta_e = \frac{e\hbar}{2cm_e} = 0.9274 \cdot 10^{-20} \frac{\text{эрг}}{\text{Гс}} = 9.3 \cdot 10^{-24} \frac{\text{Дж}}{\text{Тл}}$$

$$1 \text{ Тл} = 10^4 \text{ Гс}$$

$$\beta_N = \frac{e\hbar}{2cM_p} = 5.0508 \cdot 10^{-24} \frac{\text{эрг}}{\text{Гс}} = 5.05 \cdot 10^{-27} \frac{\text{Дж}}{\text{Тл}}$$

Магнитный момент: g-фактор



$$M = \gamma L = \gamma \hbar n = g \beta n$$

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

$$g = 1$$

L орбитальный момент

$$g \approx 2 (= 2,0023) \quad L \rightarrow S \text{ спин электрона}$$

$$g \neq 1; \neq 2$$

$L \rightarrow I$ спин ядра

$$g_N = ??? \rightarrow \text{эксперимент}$$

Свойства некоторых ядер, используемых в ЯМР

Изотоп	Спин ядра	g	$\gamma/2\pi$ (МГц/Тл)	% содержания
^1H	1/2	5.585	42.575	99.985
^2H	1	0.857	6.53	0.015
^{13}C	1/2	1.405	10.71	1.108
^{14}N	1	0.404	3.078	99.63
^{15}N	1/2	-0.56	4.32	0.37
^{17}O	5/2	-0.76	5.77	0.037
^{19}F	1/2	5.257	40.08	100
^{23}Na	3/2	1.478	11.27	100
^{31}P	1/2	2.263	17.25	100

ЯМР: наблюдаемые ядра

I

Спин ядер изотопов с **четным** числом протонов Z и **четным** числом нейтронов N_N всегда равен нулю. На таких ядрах (^{12}C , ^{16}O и др.) наблюдать ЯМР **невозможно**.

II

Ядра с **четным** Z и **нечетным** N_N (или, наоборот, с **нечетным** Z при **четном** N_N) составляют группу ядер с полуцелым спином: ^1H , ^{19}F ($J=1/2$); ^7Li , ^{23}Na ($I=3/2$).

III

Третью группу составляют ядра с **нечетным** числом протонов Z и **нечетным** числом нейтронов N_N . Они имеют целый спин: ^2H , ^{14}N ($I=1$); ^{10}B , ^{22}Na ($I=3$).

Для всех ядер второй и третьей групп возможно наблюдение ЯМР

Магнитный момент в магнитном поле

$$E = -(\vec{M}, \vec{B}) = -MB \cos \theta$$

$$E = -g\beta_N BI \cos \theta = -g\beta_N B m_z$$

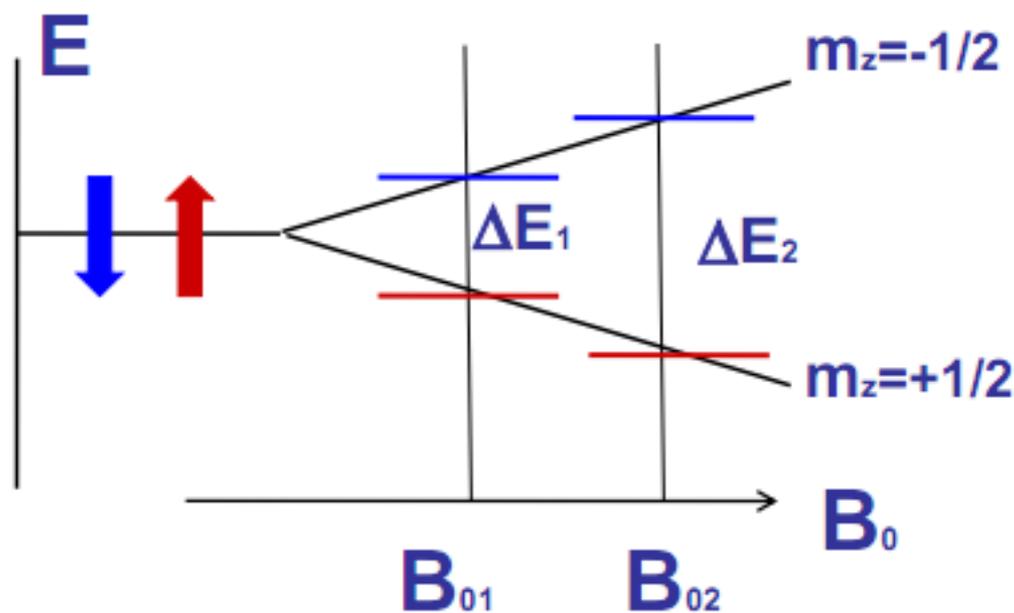
$$I = 1/2$$

$^1\text{H},$

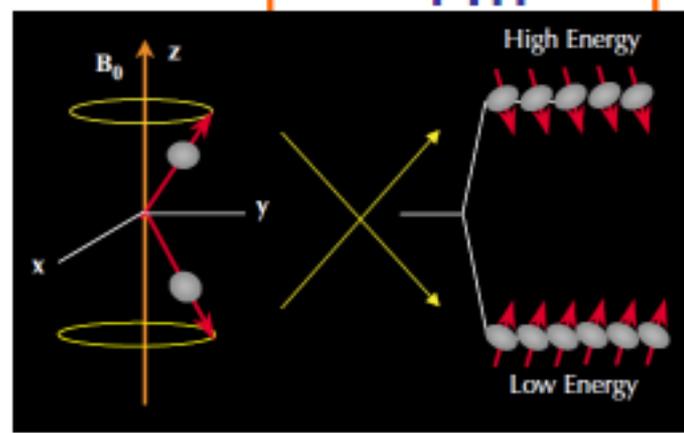
$^{13}\text{C},$

$^{19}\text{F},$

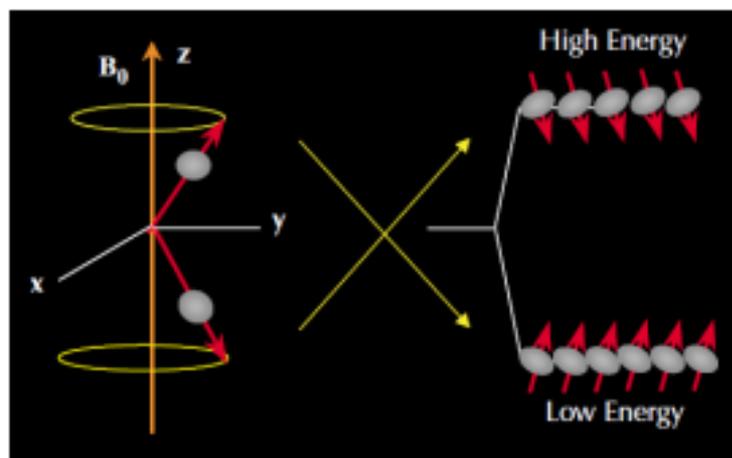
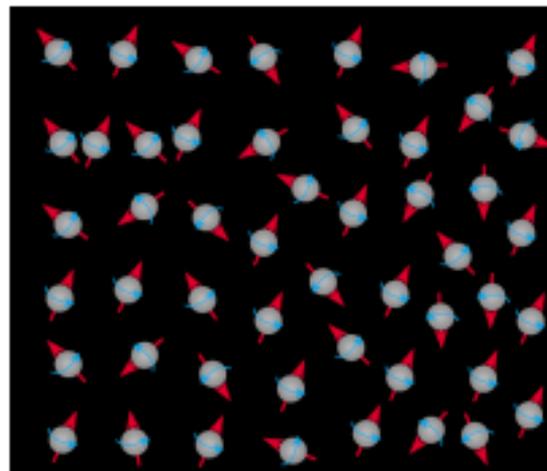
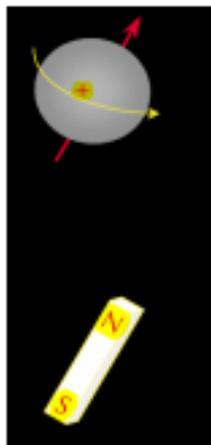
$^{31}\text{P} \dots$



$$\Delta E = g\beta_N B_0 = \gamma \hbar B_0 \longrightarrow \nu_0 = \frac{\gamma}{2\pi} B_0$$



Магнитный момент в магнитном поле



Свойства некоторых ядер, используемых в ЯМР

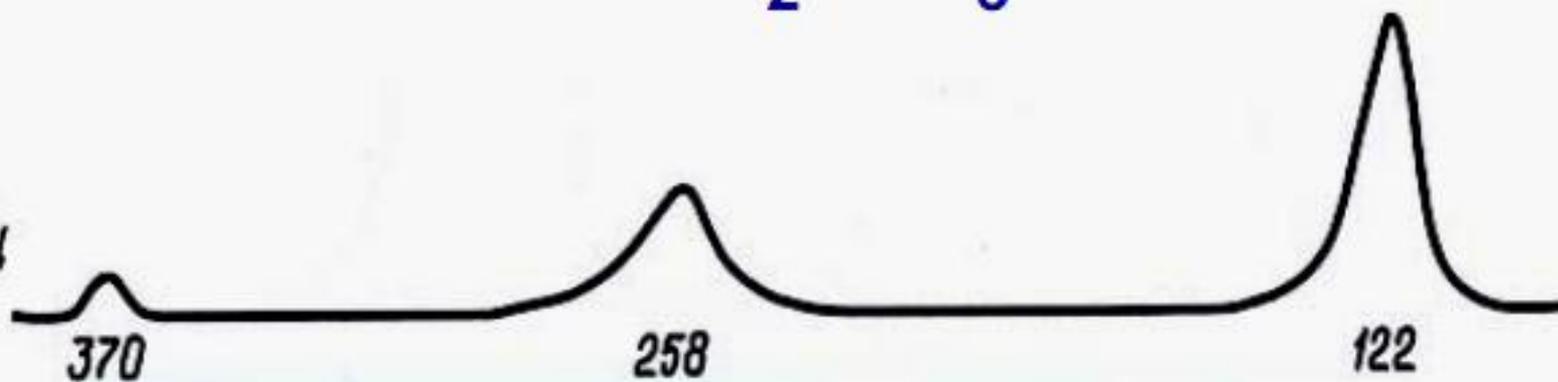
Изотоп	Спин ядра	g	$\gamma/2\pi$ (MHz/T)	% содержания
^1H	1/2	5.585	42.575	99.985
^2H	1	0.857	6.53	0.015
^{13}C	1/2	1.405	10.71	1.108
^{14}N	1	0.404	3.078	99.63
^{15}N	1/2	-0.56	4.32	0.37
^{17}O	5/2	-0.76	5.77	0.037
^{19}F	1/2	5.257	40.08	100
^{23}Na	3/2	1.478	11.27	100
^{31}P	1/2	2.263	17.25	100

Спектроскопия ЯМР: химический сдвиг

1951 Arnold J.T., Yu F.C.

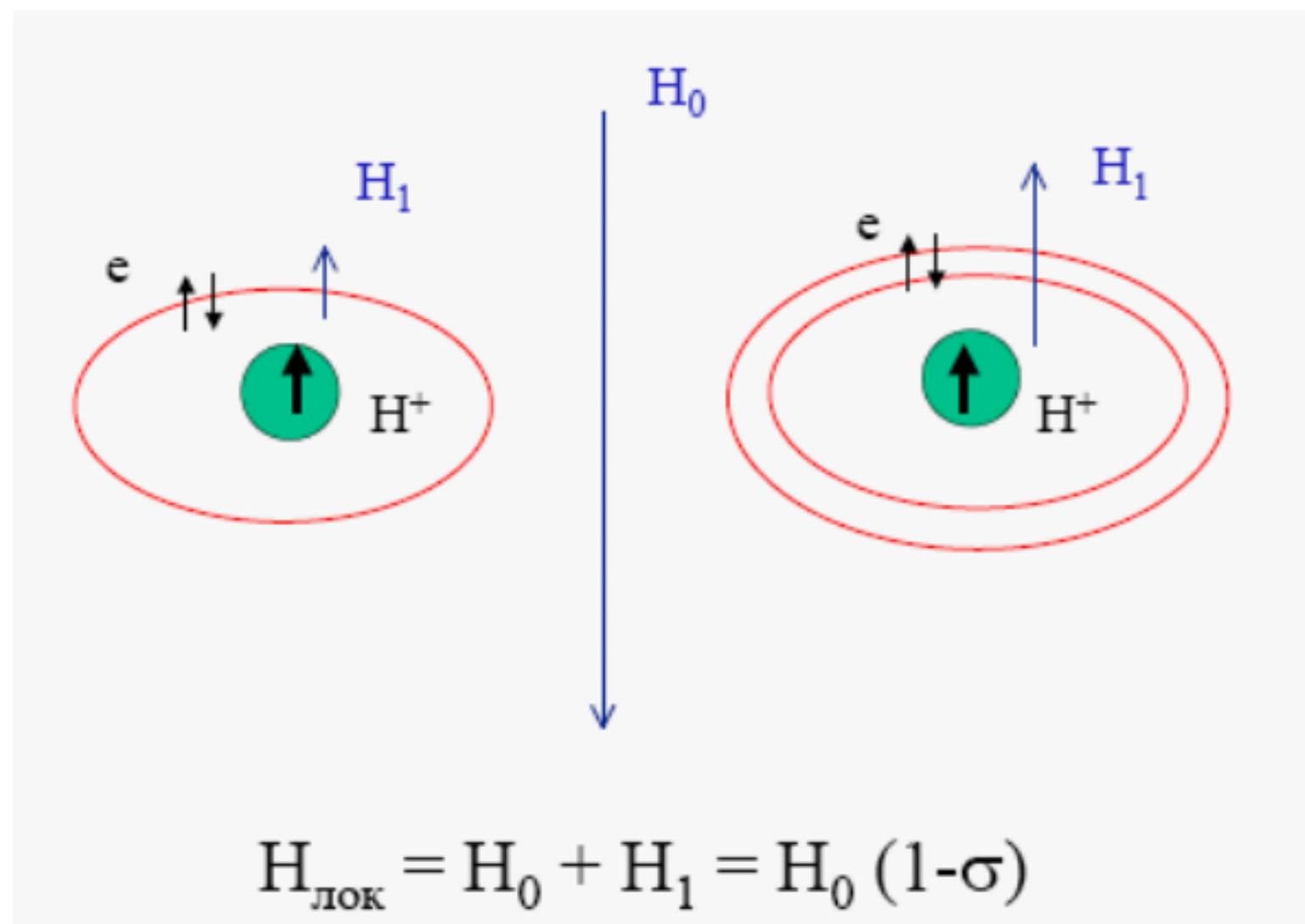


100 МГц

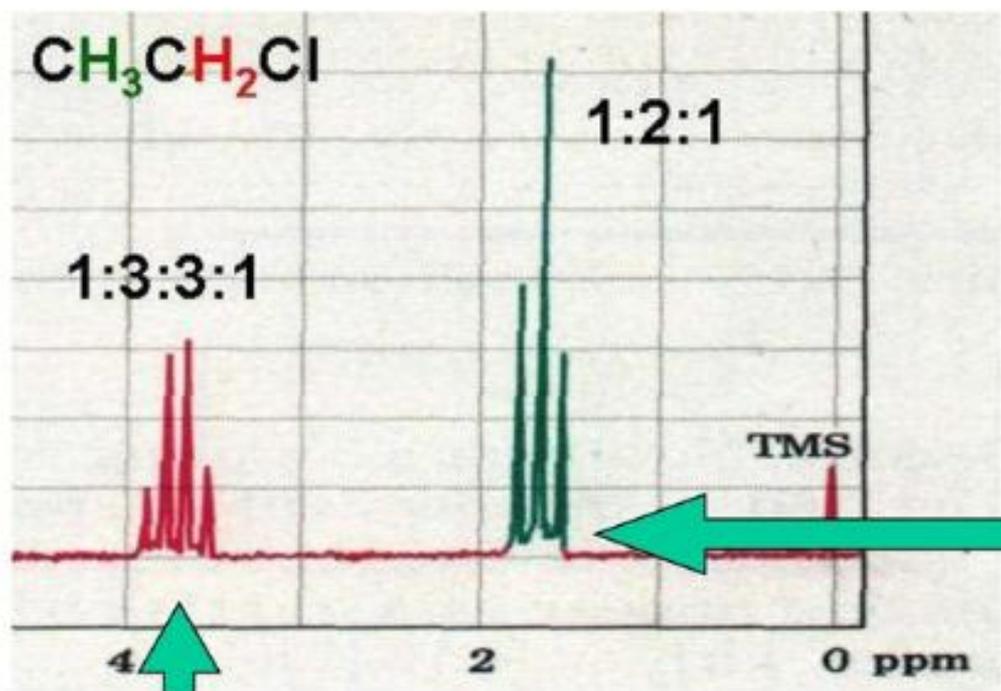


Δ , Гц (Рост напряженности поля \rightarrow)

Химический сдвиг - природа



Спин-спиновое расщепление линий

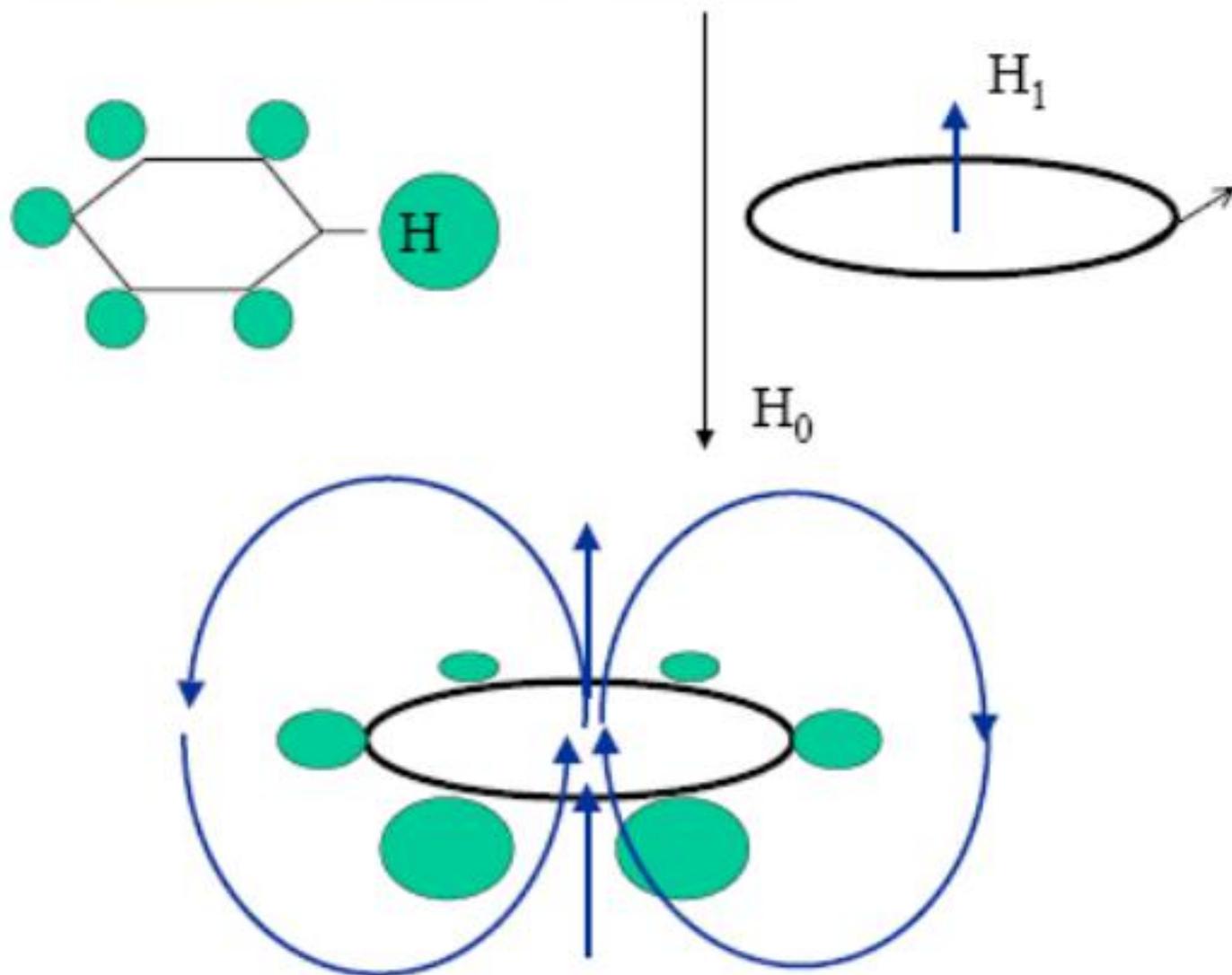


Взаимодействие магнитных ядер друг с другом приводит к расщеплению линий. Расстояние между линиями характеризуется константой спин-спинового взаимодействия J .

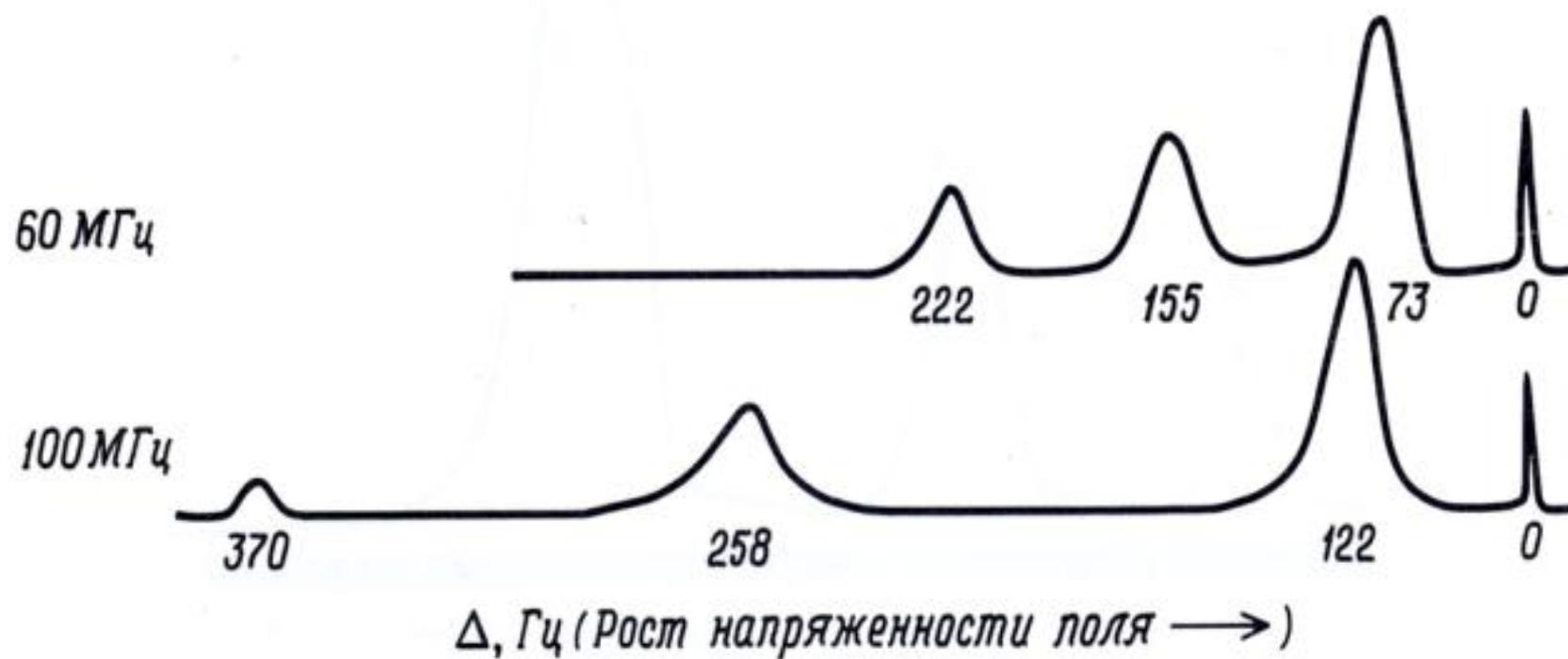
Сигнал метильных протонов (CH_3) расщеплен на 3 пика (1:2:1), т.к. в соседней метиленовой группе есть 2 эквивалентных протона.

Сигнал метиленовых протонов (CH_2) расщеплен на 4 пика (1:3:3:1), т.к. в соседней метильной группе есть 3 эквивалентных протона.

Химический сдвиг: ароматические циклы



Абсолютный химический сдвиг



Безразмерная величина \rightarrow δ -шкала

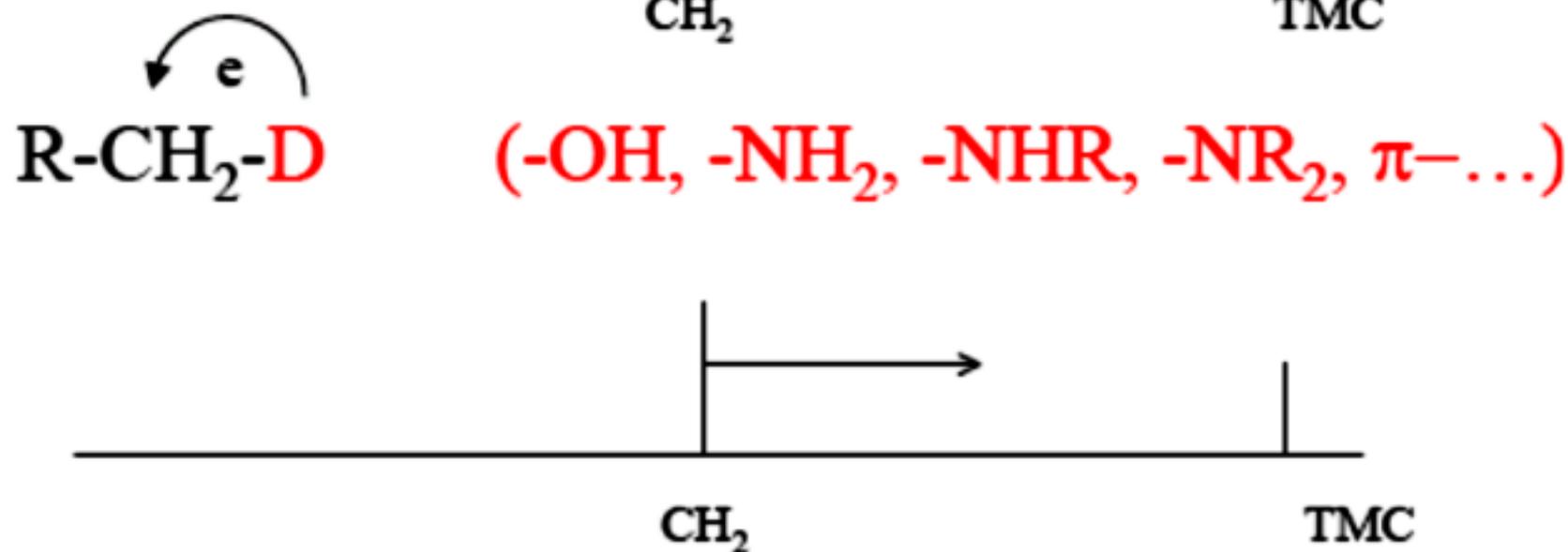
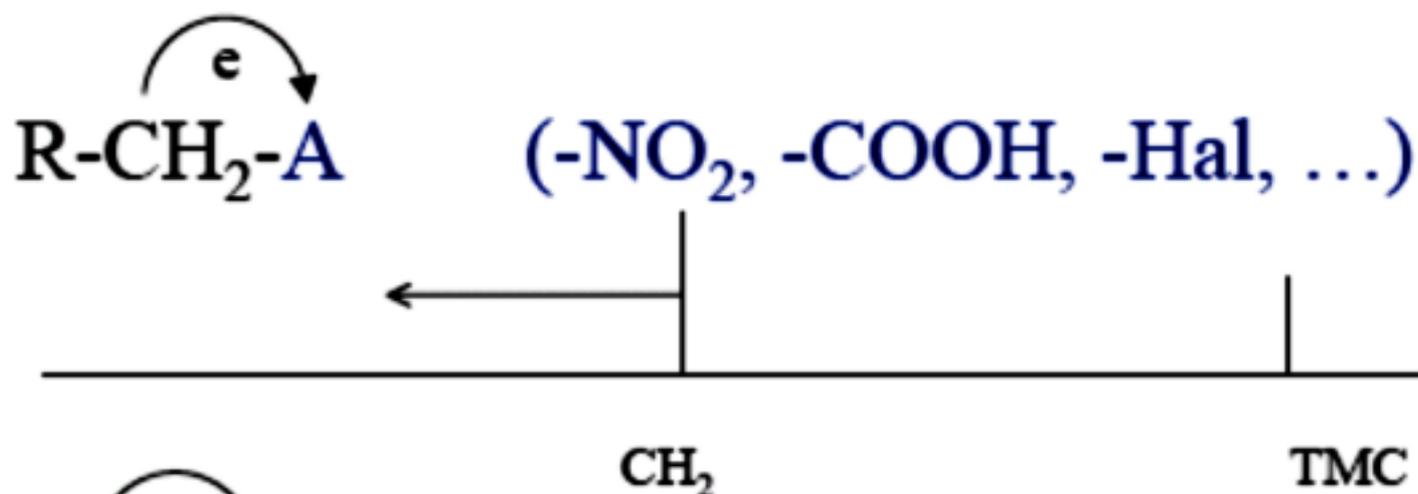
Химический сдвиг в ЯМР

- Шкала химических сдвигов называется шкалой δ .
- Сдвиг резонансной частоты $\Delta\nu$ (в герцах) зависит от напряженности приложенного поля H_0 , но если его отнести к рабочей частоте прибора ν_0 , то он становится константой, измеряемой в миллионных долях (м.д.) от частоты радиоизлучения

- $$\delta = 10^6 \Delta\nu / \nu_0$$

Обычно все сигналы расположены в области 0 -10 м.д.

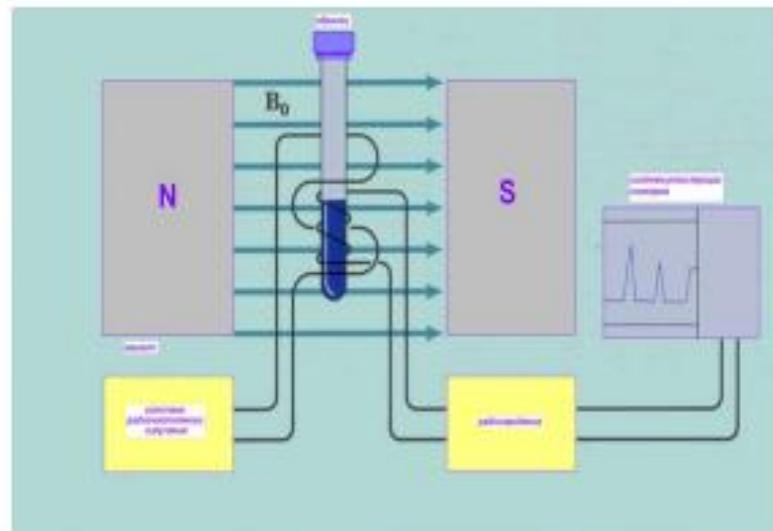
Химический сдвиг: доноры и акцепторы



Основы спектроскопии ЯМР

Схема простейшего спектрометра с непрерывной разверткой.

- Можно записать спектр, медленно меняя напряженность поля магнита H_0 при **постоянной частоте** генератора (*развертка поля*), или изменяя частоту при **постоянной напряженности поля** (*частотная развертка*). На первых этапах развития ЯМР чаще пользовались разверткой поля. При этом в стандартных экспериментах напряженность поля увеличивалась при движении каретки самописца вправо. Поэтому в обиход вошли выражения «сдвиг сигнала в сторону сильного поля» - т.е. вправо по стандартному спектру. Для получения спектра высокого качества развертку осуществляли с малой скоростью, поэтому запись обычно занимала десятки минут.



$$\nu = \frac{\gamma H_0}{2\pi}$$

Современные спектрометры ЯМР



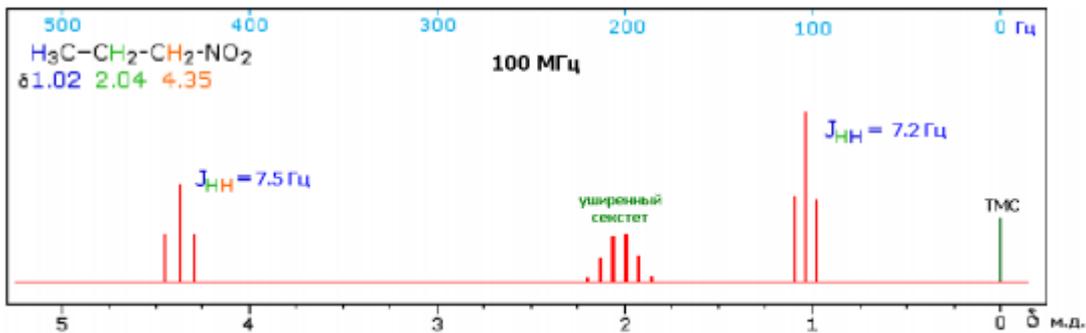
Магнит спектрометра Bruker AVANCE 600
МГц в Центре магнитной томографии и
спектроскопии МГУ



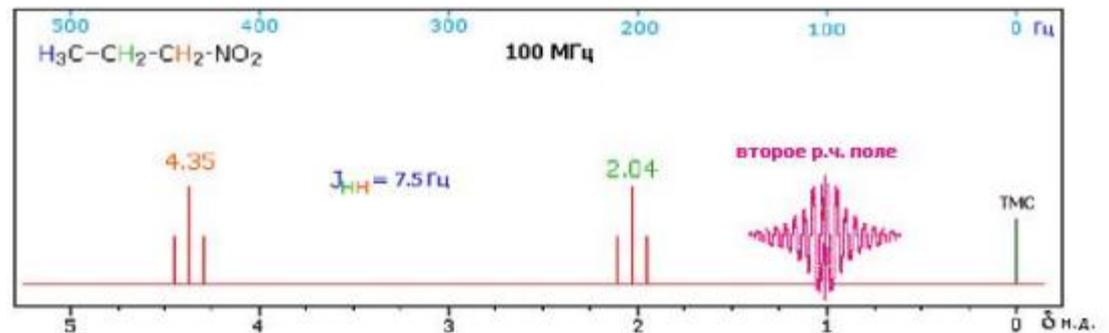
Магнит спектрометра Varian 900
МГц

Двойной резонанс

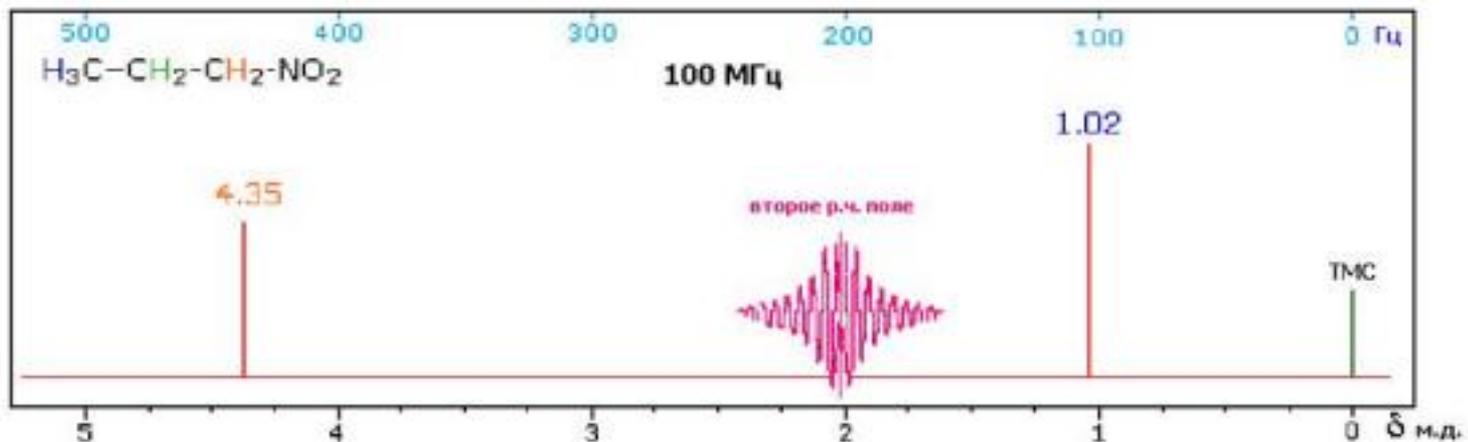
Чем больше магнитных ядер содержит соединение, тем больше структурной информации можно извлечь из его спектров ЯМР. Однако спектры спиновых систем, содержащих пять и более неэквивалентных ядер, даже при выполнении условий первого порядка бывают настолько сложными, что в них трудно разобраться. В этом случае на помощь приходит *двойной резонанс*.



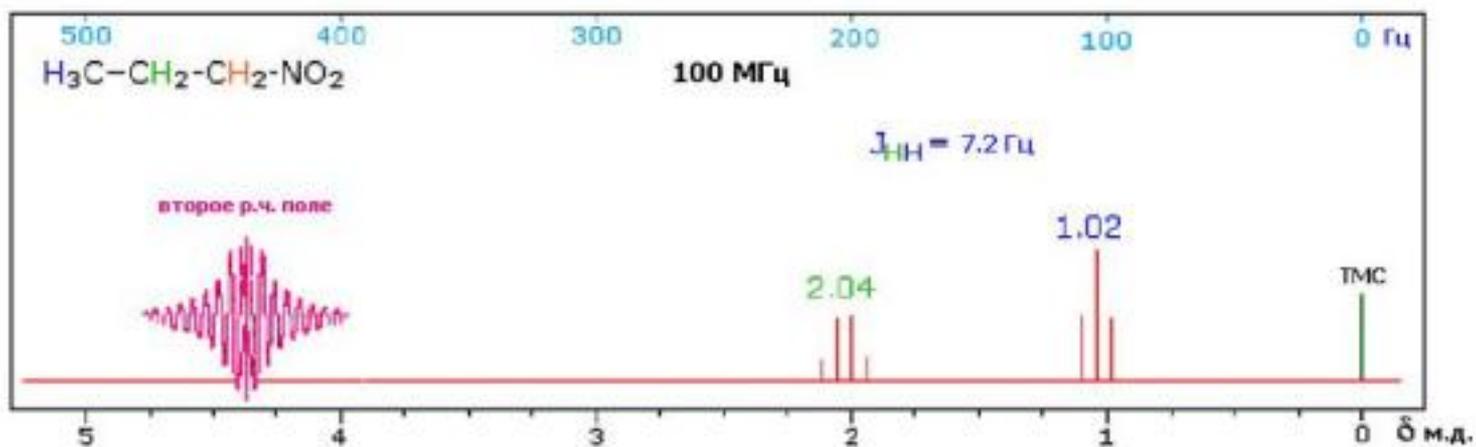
(a)



(б)



(в)



(г)

Рис. 5.4. Спектр ^1H -ЯМР 1-нитропропана (а) и спектры его двойного резонанса (б, в и г). Объяснение дано в тексте.

Идея метода очень проста. Продемонстрируем ее на примере спектра ^1H -ЯМР 1-нитропропана на частоте 100 МГц, который схематически представлен на рис. 5.4а. В этом спектре три мультиплета. Триплет в сильном поле принадлежит протонам метильной группы, а триплет в слабом поле – протонам группы CH_2 , соседней с электроноакцепторным заместителем – группой NO_2 . Между ними расположен сигнал группы CH_2 во втором положении, имеющий вид уширенного секстета. Протоны этой группы связаны спин-спиновым взаимодействием со всеми пятью соседними протонами, но две вицинальные КССВ $^3J_{\text{HH}}$ оказываются близкими по величине, но не равными (7,2 Гц и 7,5 Гц), что и вызывает уширение. Используем при записи спектра в нашем эксперименте дополнительный радиочастотный генератор, и настроим его частоту точно в резонанс с протонами метильной группы. Как нам уже известно, радиочастотное поле стимулирует переходы ядерных спинов как с нижнего уровня на верхний, так и обратные переходы. Протоны метильной группы при этом очень быстро меняют ориентацию ядерных спинов за счет таких «перескоков». По существу, мы резко сократили время спин-спиновой релаксации T_2 для них. А с последствиями этого мы уже знакомы. Мы уже рассматривали их на примере квадрупольной релаксации. Расщепления в спектре,

которые обусловлены спин-спиновым взаимодействием с метильными протонами, исчезают, и мы получаем типичный спектр A_2X_2 – два триплета (рис. 5.4б). Можно настроить второй генератор на частоту CH_2 при 2,04 м.д. Тогда исчезнут дополнительные расщепления в обоих мультиплетах, которые коллапсируют в синглеты (рис. 5.4в). Наконец, при облучении триплета в слабом поле мы получим спектр типа A_3X_2 – триплет и квадруплет (рис. 5.4г).

А вот пример реального эксперимента по двойному резонансу. На рис. 5.5 представлен спектр 1H -ЯМР этилового эфира *транс*-котоновой кислоты. Отнесение сигналов в нем не вызывает трудностей. Отчетливо идентифицируются сигналы этильной группы – триплет (1,2 м.д.) и квадруплет (4,1 м.д.). Протоны при двойной связи (АВ-часть ABX_3 -спектра) представлены двумя достаточно сложными мультиплетами в слабом поле. На врезке (а) они показаны в более крупном масштабе. Сигнал метила при двойной связи (1,8 м.д.) имеет вид дублета дублетов.

При облучении вторым радиочастотным полем сигнала метила при 1,8 м.д. слабополярная часть спектра резко упрощается. Мы видим простой спектр АВ.

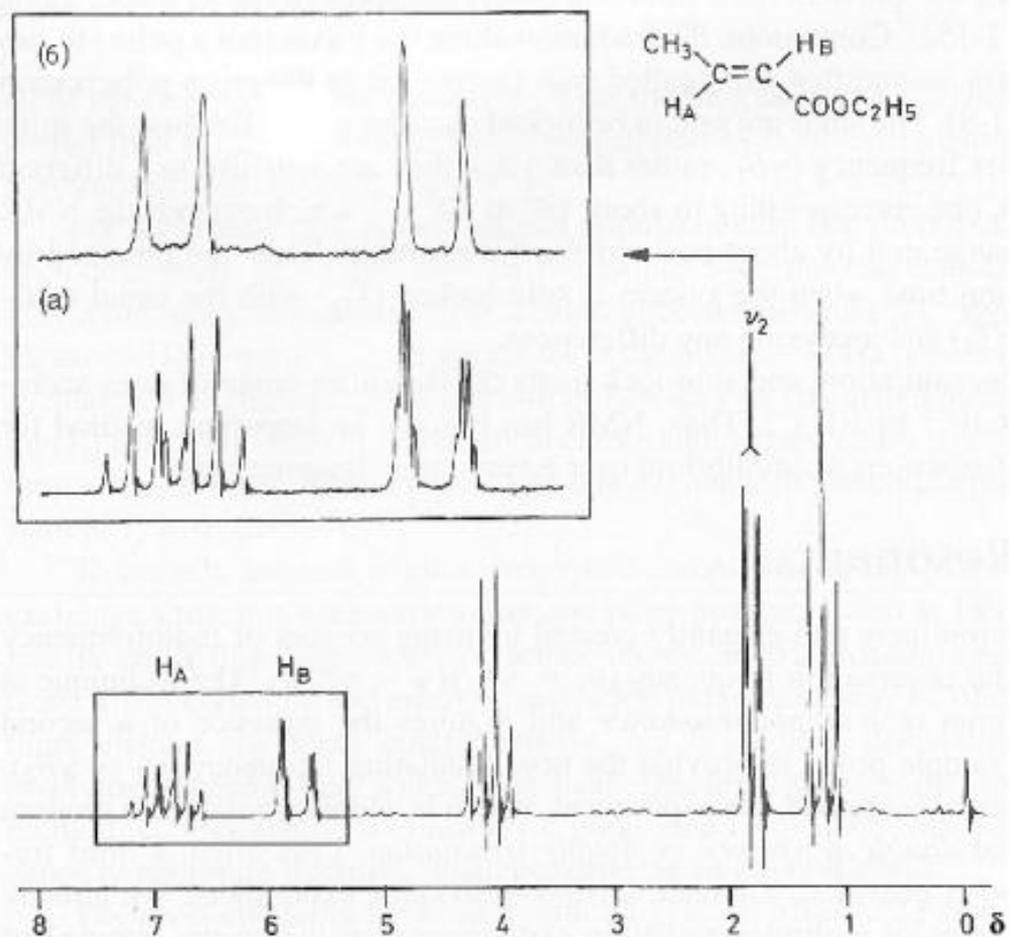


Рис. 5.5. Спектр $^1\text{H-NMR}$ этилового эфира *транс*-котоновой кислоты, детальная запись мультиплета олефиновых протонов (а) и спектр двойного резонанса при облучении сигнала метильной группы при 1,8 м.д. (б).

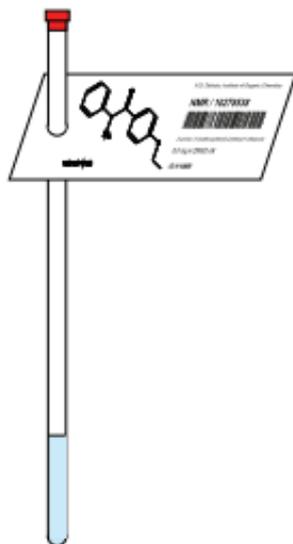
Эти изящные эксперименты называют *полным (тотальным) двойным резонансом* или *спиновой развязкой*. В англоязычной литературе он обозначается термином «*spin decoupling*». В этом случае мы проводили облучение протонов при наблюдении протонного спектра. Такой двойной резонанс называют *гомоядерным двойным резонансом*. Его обозначают как $^1\text{H}\{-^1\text{H}\}$ - ЯМР. В отличие от этого существует большое число разных экспериментов по *гетероядерному двойному резонансу*. Один пример такого эксперимента мы уже рассмотрели (рис. 4.12 в предыдущей лекции), а с другими познакомимся чуть позже.

На самом деле не так просто проводить эксперименты по двойному резонансу. Они требуют высокой квалификации оператора. Результат двойного резонанса в существенной степени зависит от амплитуды (мощности) второго радиочастотного поля. В экспериментах по *спиновой развязке* она должна быть достаточно большой, чтобы полностью «насытить» облучаемый сигнал, но с другой стороны, столь малой, чтобы при этом не затрагивались другие сигналы спектра. В экспериментах по *гетероядерному двойному резонансу* мощность радиочастотного поля обычно выбирают очень большой.

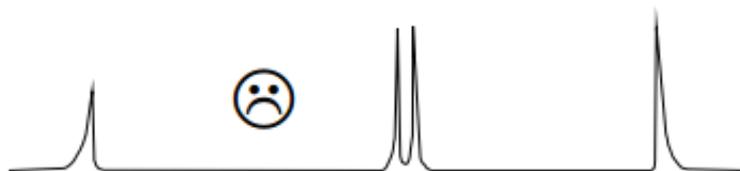
Но в некоторых экспериментах по двойному резонансу, напротив, используются очень слабые радиочастотные поля. Например, при *селективном двойном резонансе* можно так выбрать мощность второго радиочастотного поля, чтобы затрагивалась лишь часть линий мультиплета или даже только одна из линий. Такие эксперименты позволяют определять знаки КССВ в слабо связанных системах.

Эксперименты по двойному резонансу очень широко используются при анализе спектров ЯМР высокого разрешения для того, чтобы в спектрах многоспиновых систем установить всю цепочку спин-спиновых связей. В настоящее время для этой цели существует еще более мощный метод – двумерные спектры ЯМР, которые рассматриваются в курсе ЯМР следующего уровня.

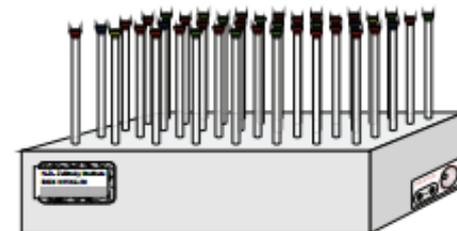
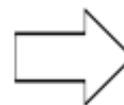
Приготовление образца



- Ø 10 мм - чувствительность ↑, однородность поля ↓
- Ø 5 мм - стандарт, рабочая область ≥20 мм (=0.4 мл)
- Шигеми - вставка из спецматериала (для конкретного растворителя)



Непрогретые образцы и образцы с твердыми частицами имеют градиент концентрации



печка

Выбор растворителя

- положение сигналов остаточных протонов
- наличие примесей, в первую очередь воды
- способность к химическому обмену с $-OH$, $-NH_2$
- температуры кипения и замерзания, температурные изменения растворимости
- способность к образованию водородных связей и «утягиванию» сигналов
- массовая доля дейтерия (качество LOCK)
- вязкость (разрешение)
- цена (стандарт – DMSO- d_6 , ~2000 \$/кг)

Растворители, используемые в ЯМР (в порядке распространенности)

растворитель	t _{пл.} , С°	t _{кип.} , С°	химический сдвиг, м.д.		~цена, \$/ грамм	примечания
			¹ H (остаточные)	¹³ C		
диметилсульфоксид- <i>d6</i>	18.5	189.0	2.50	39.5	1.8	вязкий, очень гигроскопичный
ацетон- <i>d6</i>	-94.7	56.3	2.05	206.0; 29.8	1.8	«хороший» сигнал ² D
хлороформ- <i>d1</i>	-63.5	61.1	7.27	77.0	0.4	слабый сигнал ² D
вода- <i>d2</i>	0	100.0	4.63	---	0.6 (99.8%)	содержит подвижный протон, гигроскопична
метанол- <i>d4</i>	-97.7	64.7	3.31	49.0	5.5	содержит подвижный протон
этанол- <i>d6</i>	-114.1	78.3	3.7; 1.2	57.3; 17.9	8.0	содержит подвижный протон
бензол- <i>d6</i>	5.5	80.1	7.16	128.0	2.4	вязкий, изменяет химические сдвиги
уксусная кислота- <i>d4</i>	16.7	117.9	11.53; 2.03	178.4; 20.0	2.8	
толуол- <i>d8</i>	-94.9	110.6	7.09; 7.00; 6.98; 2.09	137.5; 128.9; 128.0; 125.2; 20.4	3.0	изменяет химические сдвиги
пиридин- <i>d5</i>	-109	66	8.74, 7.58, 7.22	150.3, 135.9, 123.9	6.2	изменяет химические сдвиги
метиленхлорид- <i>d2</i>	-97.0	40.0	5.32	53.8	6.0	
ацетонитрил- <i>d3</i>	-44.0	81.6	1.95	118.2; 1.3	3.0	
тетрагидрофуран- <i>d4</i>	-66.0	66.0	3.58; 1.73	67.4; 25.2	20	
циклогексан- <i>d12</i>	6.6	80.7	1.38	26.4	17	
диметилформаид- <i>d7</i>	-60.4	153.0	8.01; 2.91	167.7; 35.2	12	вязкий

DSS (стандарт ЯМР)

DSS (4,4-диметил-4-silapentane-1-сульфоноый кислота) представляет собой химическое соединение используется в протон- и углерод-связанные ЯМР - спектроскопии в качестве калибровочного стандарта, аналогичен тетраметилсиланом (TMS), но с гораздо более высокой водной растворимостью . В то время как TMS является наиболее распространенным стандарт ЯМРА используется в органических растворителях , такие как хлороформ или бензол , DSS или его натриевой соль чаще используются для белковых экспериментов в воде.

С низкой электроотрицательностью из кремния экранирует девять идентичных метильные протонов. Результат является сигналом протона высокой интенсивности дополнительно Аффилда (при более низком химическом сдвиге) по сравнению с почти все пиков , найденных в природе органических молекул. В результате стандартный пик легко идентифицированы как таковые и установлен в химическом сдвиге 0.0.

Протонный спектр DSS также имеет небольшие пики при 2,91 частей на миллион (м), 1,75 частей на миллион (м) и 0,63 частей на миллион (м) при интенсивности 22% от контрольного пика при 0 м.д..

Применение в медико-биологических исследованиях

1. Исследование структуры белков с помощью ^1H -ЯМР высокого разрешения и Фурье-преобразований.
2. Изучение свойств свободной и связанной воды помощью импульсного ^1H -ЯМР.
3. ^{13}C -ЯМР спектроскопия применяется для изучения белков, нуклеиновых кислот и других биологически важных соединений. Обладает большей чувствительностью, чем ^1H -ЯМР.
4. ^{31}P -ЯМР спектроскопия часто применяется для исследования структуры и функций фосфолипидов.

Основные достоинства метода ЯМР

- **Высокая разрешающая способность**
- **Возможность вести количественный учет (подсчет) резонирующих ядер. Это открывает возможности для количественного анализа вещества.**
- **Высочайшая точность и прецизионность**
- **Простота пробоподготовки**
- **Экспрессность**

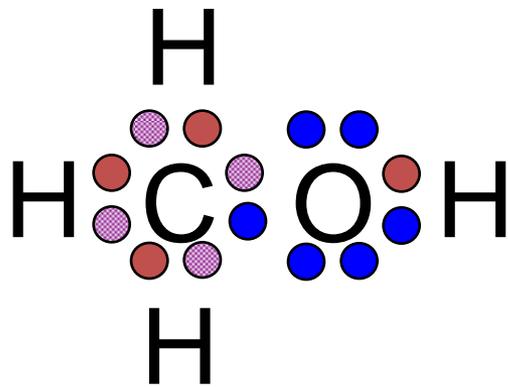
Электронный Парамагнитный Резонанс:

ЭПР (EPR, ESR) - один из основных прямых методов исследования (обнаружения и идентификации) парамагнитных частиц: **свободных радикалов** и комплексов **металлов переменной валентности**, т.е. частиц, имеющих **неспаренный электрон** на одной из орбиталей.

В основе метода ЭПР лежит резонансное поглощение электромагнитного излучения неспаренными электронами, помещенными в магнитное поле.

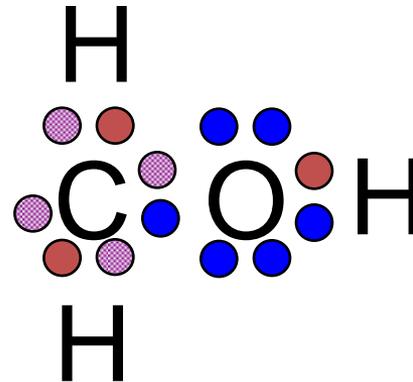
Что такое свободный радикал ?

Свободный радикал - это молекулярная частица, у которой на внешней оболочке имеется хотя бы один *неспаренный электрон*.



метанол

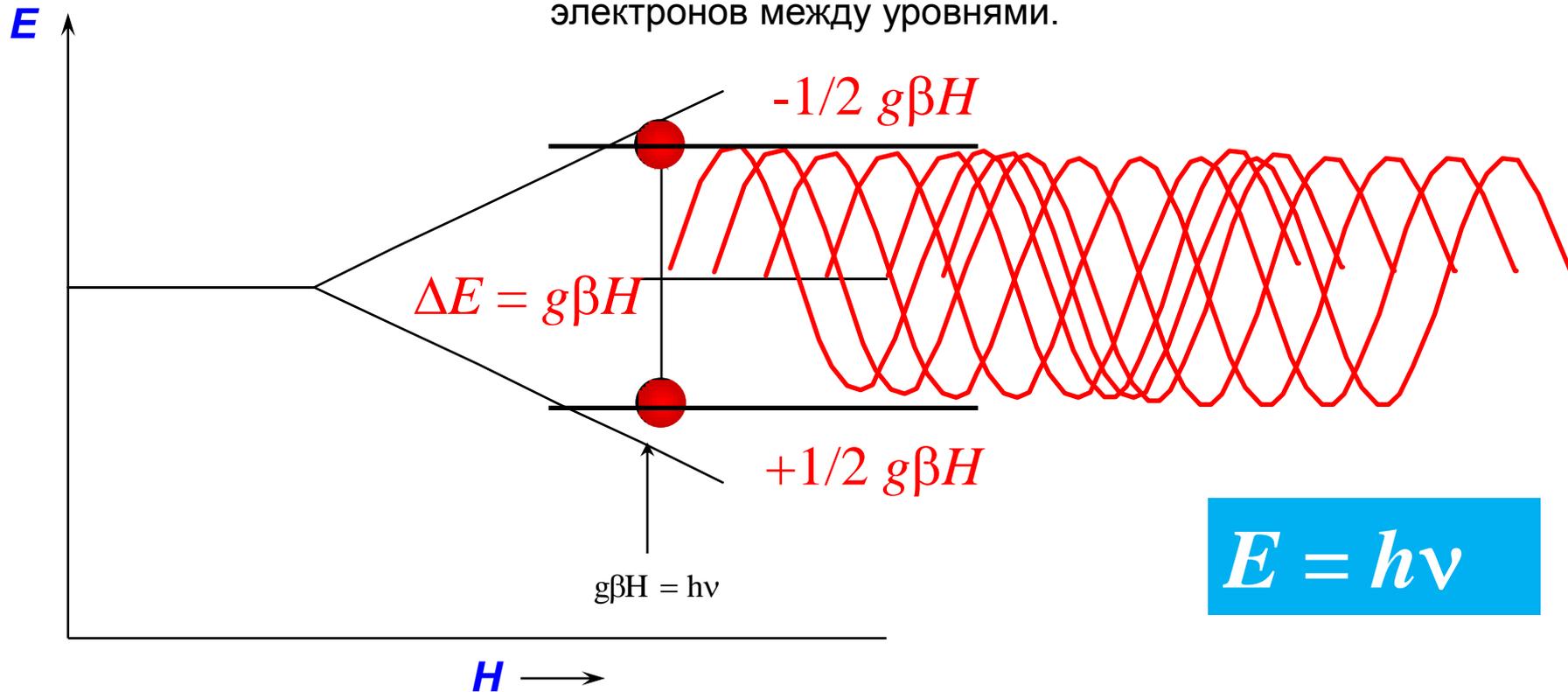
Радикал может образоваться из молекулы при ее окислении, например, при отрыве атома водорода (т.е. электрона и протона)



радикал
метанола

Поглощение электромагнитных волн (явление ЭТР)

Система, где электроны распределены между двумя энергетическими уровнями, может **поглощать электромагнитное излучение**. При определенных значениях величины энергии падающего кванта ($h\nu$), будут происходить переходы электронов между уровнями.

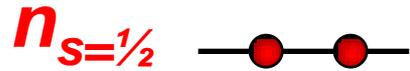


Поглощение будет происходить при условии равенства энергий поглощаемого кванта и энергии перехода между уровнями, т.е. когда

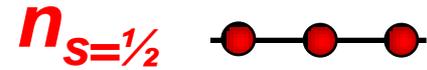
$$h\nu = g\beta H$$

Это выражение называется – основным уравнением резонанса

Почему сигнал ЭПР можно наблюдать только у парамагнетиков?



$n_{S=1/2}$ - число электронов с $S=1/2$.



$n_{S=-1/2}$ - число электронов с $S=-1/2$.



парамагнетик

диамагнетик

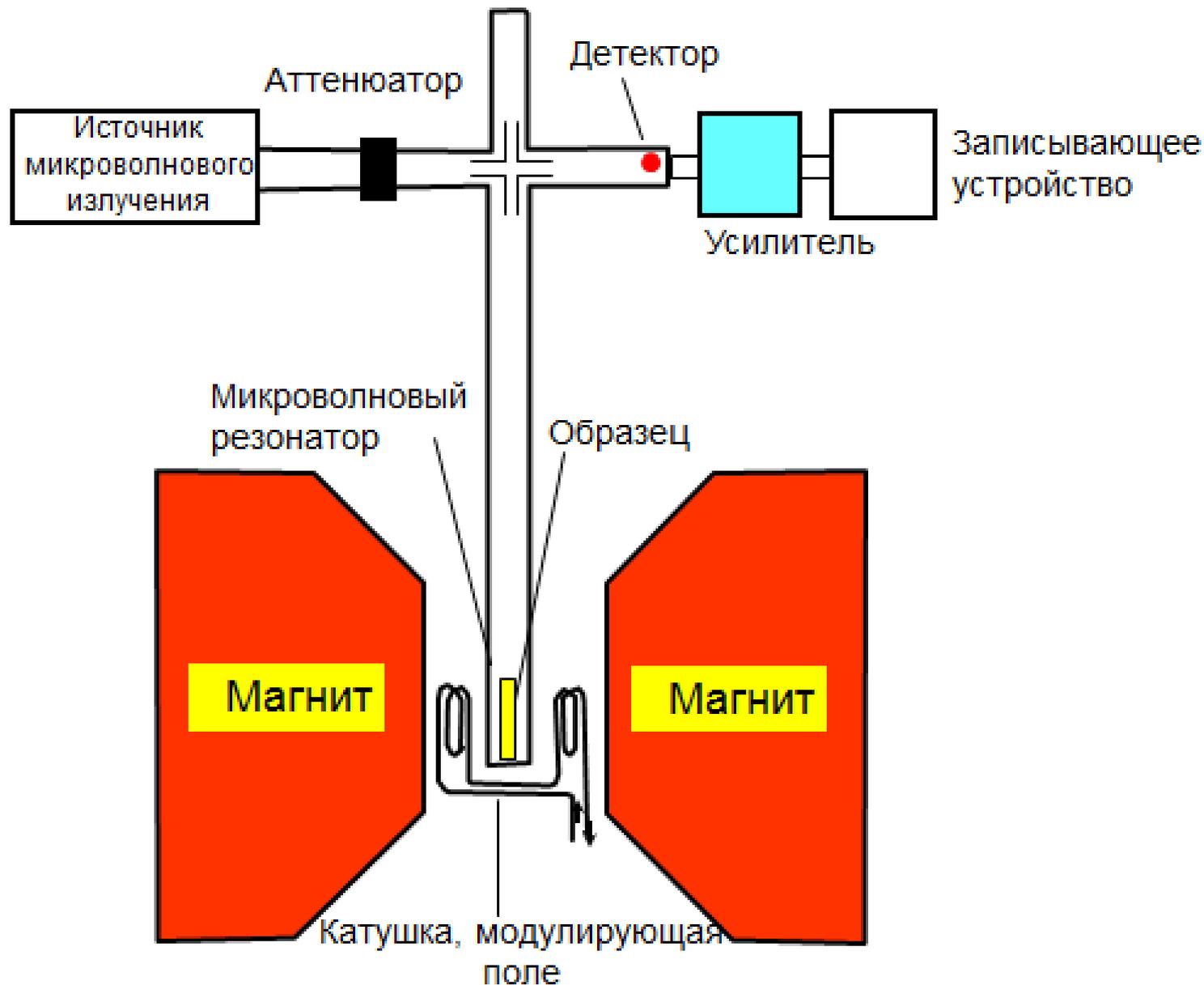
Отношение числа электронов (*заселенность*) на двух разных энергетических уровнях в парамагнетиках определяется уравнением Больцмана:

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

$$\frac{n_{s=1/2} - n_{s=-1/2}}{n_{s=1/2} + n_{s=-1/2}} \Big|_{H=0.3T} = 0.002; \Big|_{H=1T} = 0.05$$

$$\frac{n_{s=1/2} - n_{s=-1/2}}{n_{s=1/2} + n_{s=-1/2}} \Big|_{T=300K} = 0.002; \Big|_{T=4K} = 0.2$$

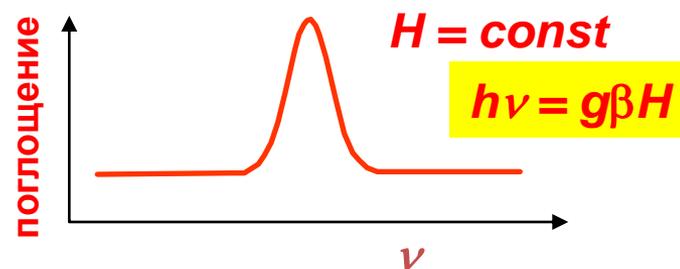
Радиоспектрометр ЭПР



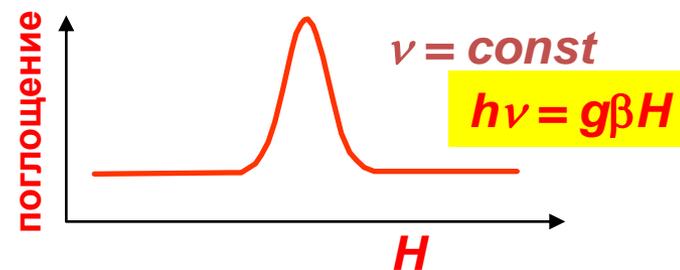
Как получить сигнал ЭПР ?

Поглощение электромагнитных волн в радиоспектрометре ЭПР можно определять двумя способами:

1 - При постоянном магнитном поле, мы можем **изменять частоту излучения**. Максимальное поглощение будет наблюдаться при резонансе, когда $h\nu = g\beta H$. При этом ожидаемый спектр будет таким:

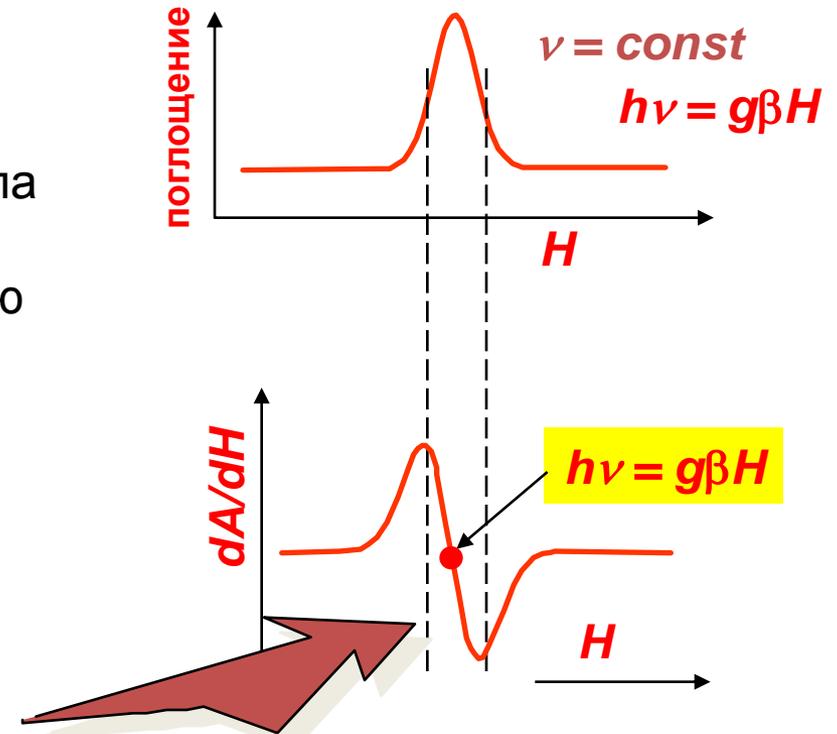


2 - По техническим причинам мы поступаем по другому: мы используем микроволновое излучение при постоянной частоте волн и **изменяем магнитное поле**.



Что такое сигнал ЭПР ?

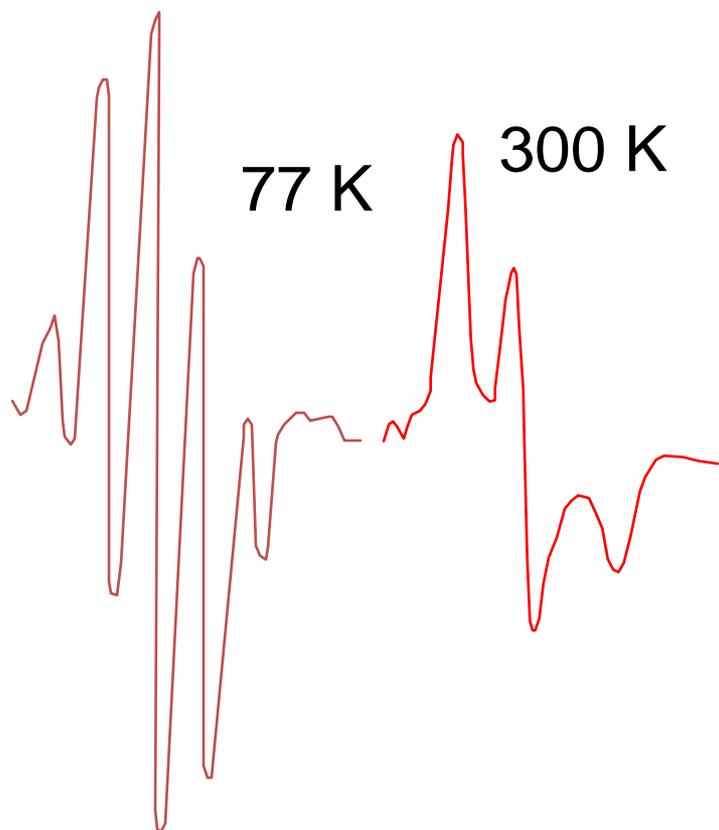
Кроме того, в результате усиления сигнала ЭПР (путем его модуляции) мы получаем не поглощение A , а - первую производную поглощения по полю dA/dH .



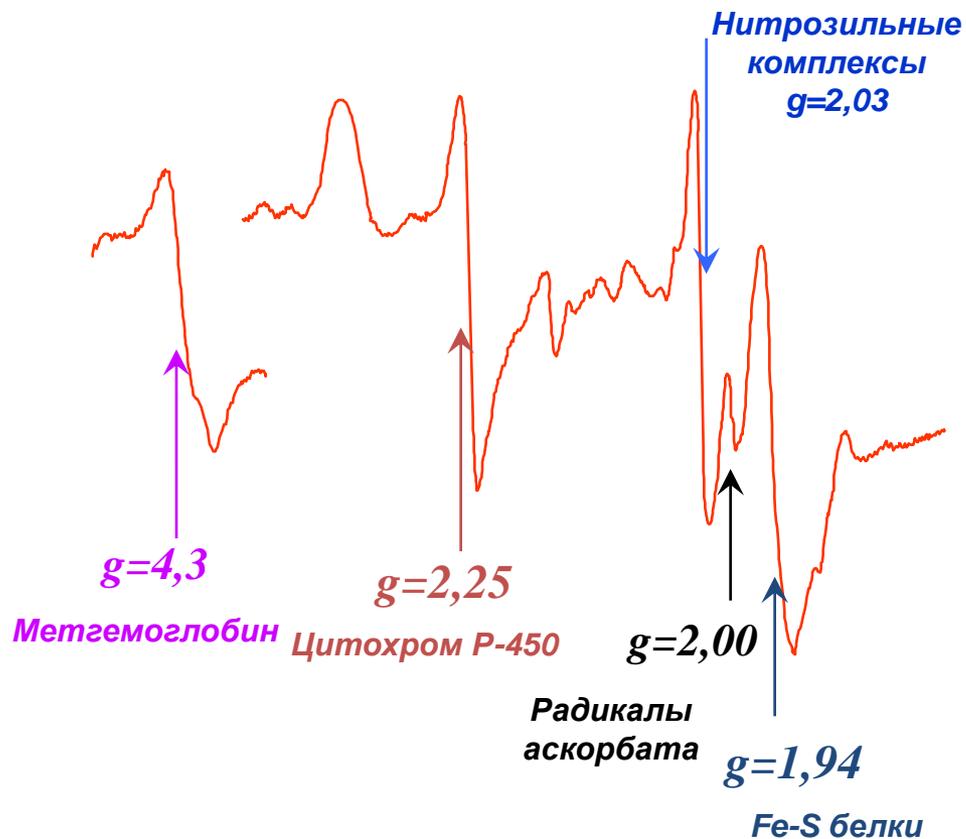
Вот это мы называем сигналом ЭПР

Примеры сигналов ЭПР

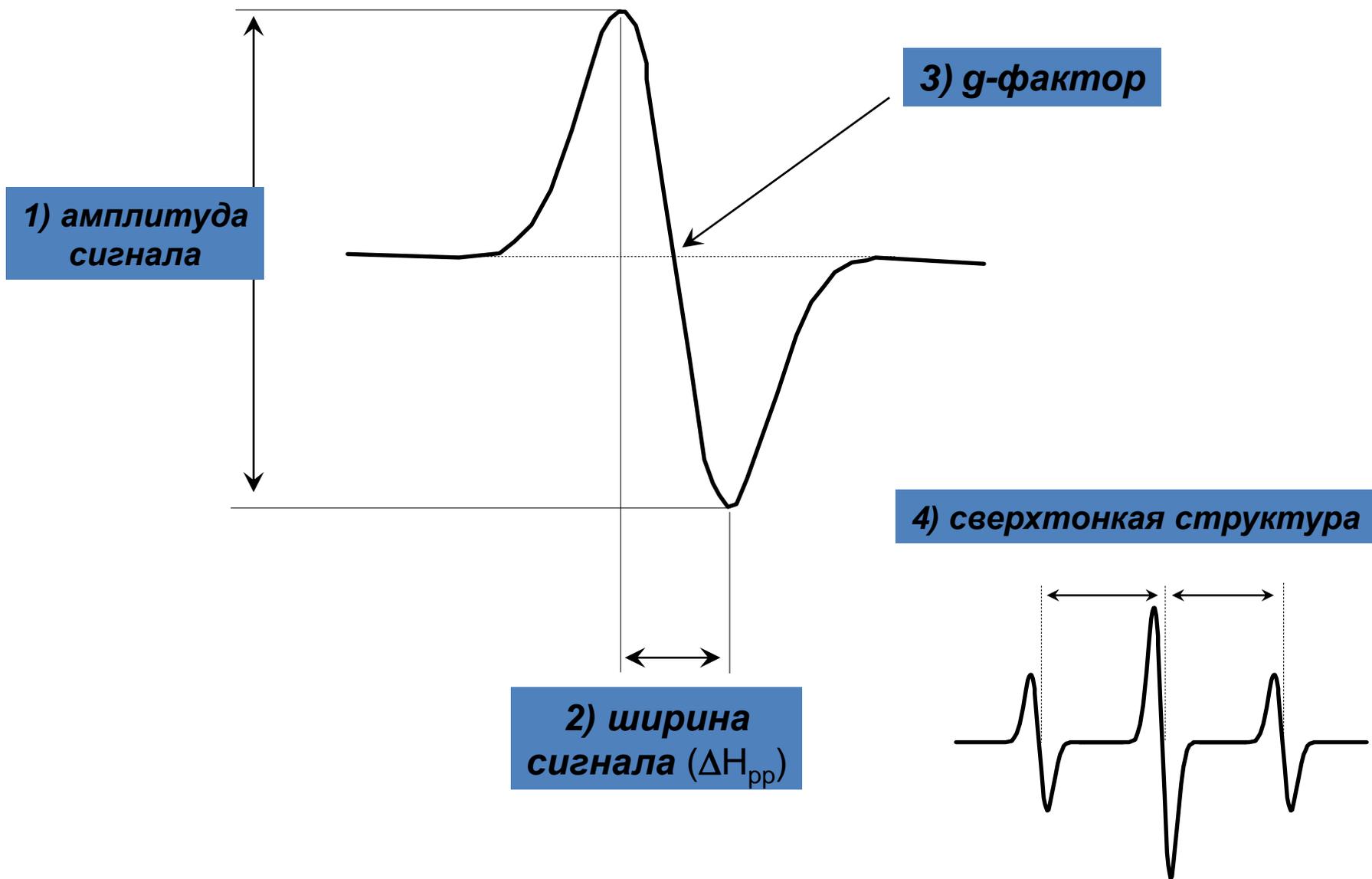
УФ облученный цистеин



Печень крысы при 77 K



Основные характеристики сигнала ЭПР



Амплитуда сигнала ЭПР

Амплитуда сигнала ЭПР зависит от количества поглощающих частиц и пропорциональна площади под кривой поглощения, т.е. второму интегралу от сигнала ЭПР.

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

где **k** - коэффициент зависящий от условий измерения.

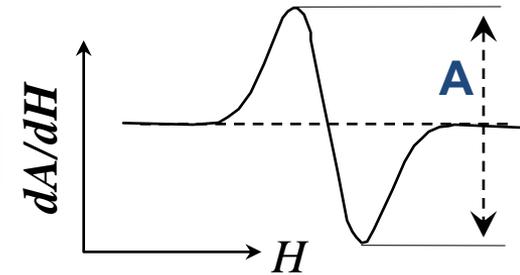
Площадь **S** под линией поглощения **прямо пропорциональна** концентрации парамагнитных частиц в измеряемом образце (**C**).

$$C = k * S$$

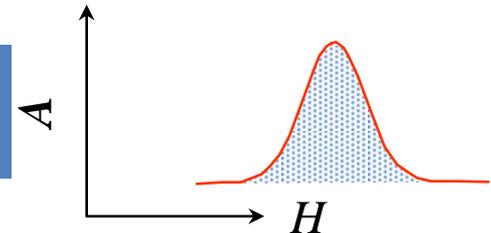
Практически получить значения **S** нетрудно. Существенно труднее найти величину **k**. Поэтому на практике при вычислении **C** обычно пользуются сравнением площади измеряемого образца **S** (концентрацию которого надо найти) с площадью эталонного образца **S_e** (концентрация **C_e** которого известна).

$$C = C_s (S / S_s)$$

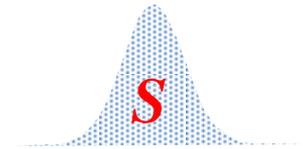
сигнал ЭПР



кривая поглощения



площадь под кривой поглощения



Второй интеграл-это площадь (**S**) под кривой поглощения (т.е. это число)

Ширина сигнала ЭПР

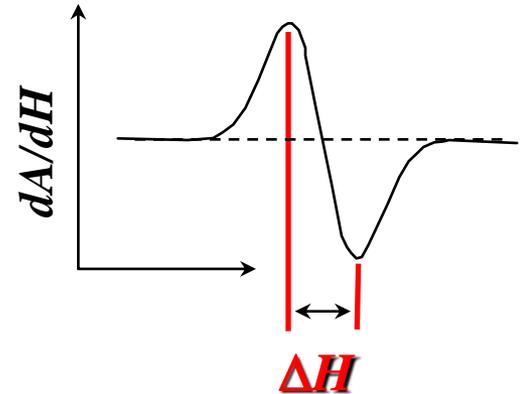
Ширина сигнала ЭПР определяется взаимодействием магнитных моментов электрона с окружением. Теоретически минимальная ширина линии следует из соотношения неопределенностей Гейзенберга:

$$\Delta E \geq \frac{h}{2\pi} * \frac{1}{\Delta t}$$

где Δt - время измерения и ΔE - неопределенность энергии системы.

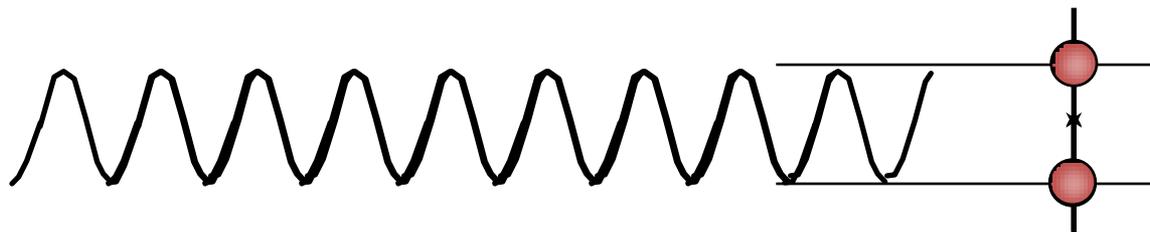
Рассматриваемый процесс - это поглощение электромагнитного кванта, такое, что Δt может быть интерпретировано как время нахождения электрона на верхнем энергетическом уровне (время релаксации T), а ΔE как энергия системы в нашем случае $= g\beta H$, отсюда

$$\Delta H \geq \frac{h}{2\pi g\beta} * \frac{1}{T}$$



Время релаксации

Релаксация - процесс восстановления заселенности энергетических уровней после поглощения кванта электромагнитного излучения.

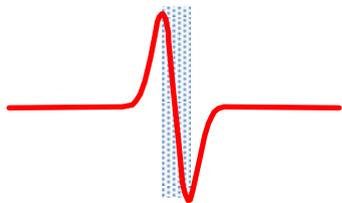


Процесс релаксации характеризуется временем релаксации. Время релаксации (т.е. время нахождения электрона в состоянии с большей энергией) зависит от двух процессов: *спин-решеточной* и *спин-спиновой релаксации*.

Спин-решеточная релаксация

(T_1) обусловлена взаимодействием магнитного момента электрона с решеткой (т.е. средой в которой находятся парамагнитные частицы).

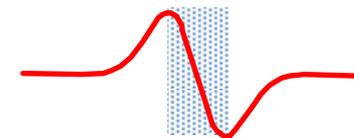
Спин-спиновая релаксация (T_2) Обусловлена взаимодействием— с другими парамагнитными частицами (т.е. спинами)



Большое T
Малое ΔH



$$\Delta H \geq \frac{h}{2\pi g\beta} * \frac{1}{T}$$



Малое T
Большое ΔH

Зависимость суммарного времени релаксации (T) от T_1 и T_2 выражается формулой:

$$\frac{1}{T} = \frac{1}{2T_1} + \frac{1}{T_2} = \frac{2T_1 + T_2}{2T_1T_2}$$

Тогда выражение для ширины сигнала ЭПР будет выглядеть так:

$$\Delta H \geq \frac{h}{2\pi g\beta} * \frac{2T_1 + T_2}{2T_1T_2}$$

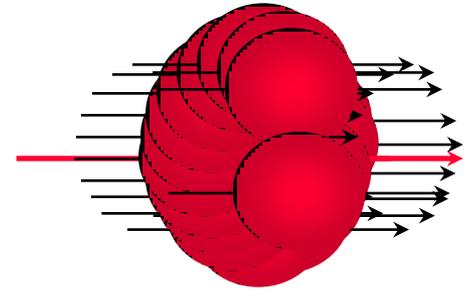
Комплексы металлов - $T_1=1$ нс $\Delta H=10$ мТ
Свободные радикалы - $T_1=0,1$ мс $\Delta H=100$ мкТ

Механизмы уширения сигнала ЭПР :

1. Взаимодействие магнитных моментов двух парамагнитных частиц (радикалов или ионов) приводит к уширению по диполь-дипольному механизму

$$\Delta H = \frac{\mu}{R^3} (3 \cos^2 \theta - 1)$$

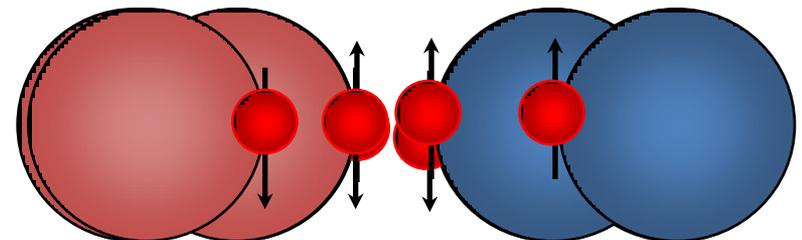
2. Взаимодействие спинового магнитного момента электрона с орбитальным магнитным моментом электрона приводит к уширению сигнала в результате анизотропии g-фактора



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



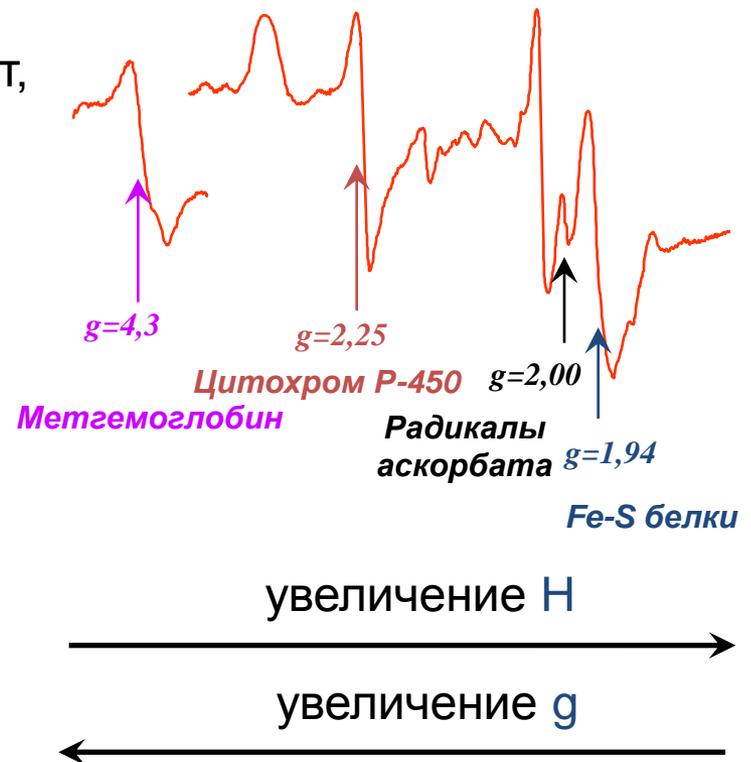
g-фактор

g-фактор сигнала ЭПР - это не только параметр, отражающий *вклад орбитального и спинового моментов* в суммарный магнитный момент, но и характеристика, показывающая *положение сигнала ЭПР во всем диапазоне магнитного поля*.

Из основного уравнения резонанса следует, что

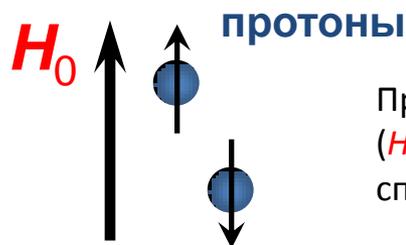
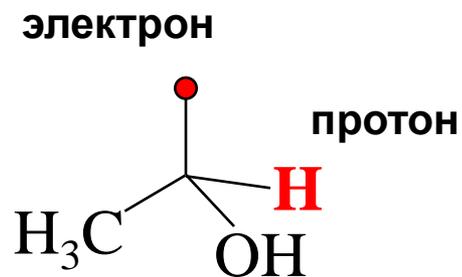
$$g * H = \frac{h\nu}{\beta} = const \quad \text{при } \nu = const$$

Следовательно, при увеличении H происходит снижение g , и наоборот. Однако, величину H нельзя считать характеристикой сигнала ЭПР, т.к. при изменении ν резонанс будет происходить уже при других значениях H . Величина g не изменяется при изменении H (т.е. она инвариантна от метода измерения), и поэтому **g-фактор** - характеристика сигнала ЭПР.



Сверхтонкое взаимодействие

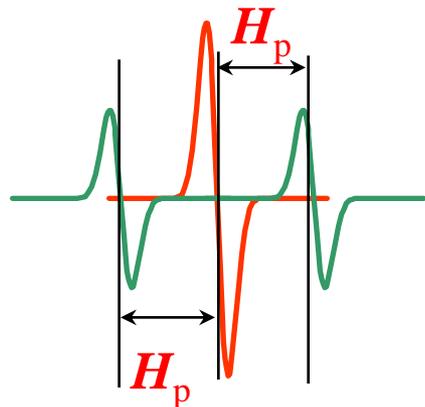
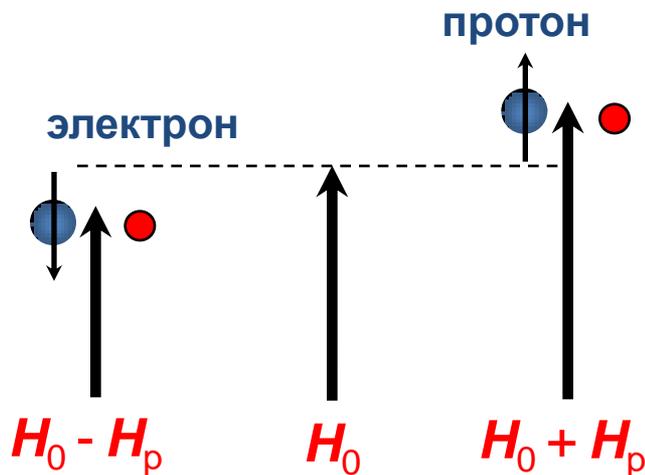
Взаимодействие магнитного момента неспаренного электрона с магнитным моментом ядра соседнего атома (например, H или N) называется **сверхтонким взаимодействием** и приводит к появлению сверхтонкой структуры сигнала ЭПР



Протон имеет магнитный момент который ориентирован во внешнем магнитном поле (H_0) в двух направлениях (вдоль и поперек поля) т.к. подобно электрону, имеет спиновое число $S = \pm 1/2$.

Магнитный момент протона создает магнитное поле ($+H_p$ или $-H_p$, зависящее от ориентации протона), которое складывается с внешним магнитным полем (H_0).

Отсюда следует, что суммарная величина поля, приложенного к неспаренному, электрону будет немного больше ($H_0 + H_p$) (если спин протона = $1/2$) или немного меньше ($H_0 - H_p$), чем в отсутствие протона (H_0) (если спин протона = $-1/2$).



В результате такого взаимодействия, сигнал ЭПР (который бы в отсутствие протона состоял из одной линии) будет состоять из двух линий

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

$$H = \frac{\mu}{R^3} (3 \cos^2 \theta - 1)$$

Сверхтонкая структура

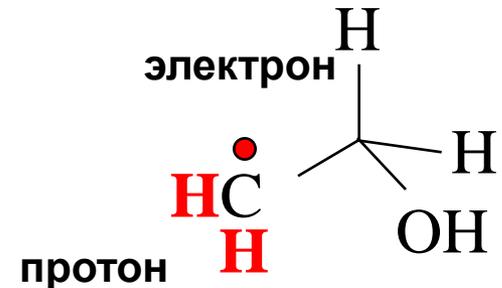
Неспаренный электрон в радикале может быть расположен близко к **двум** протонам, как в радикале этанола ($\cdot\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$)

Магнитное поле вокруг неспаренного электрона теперь может иметь следующие значения:

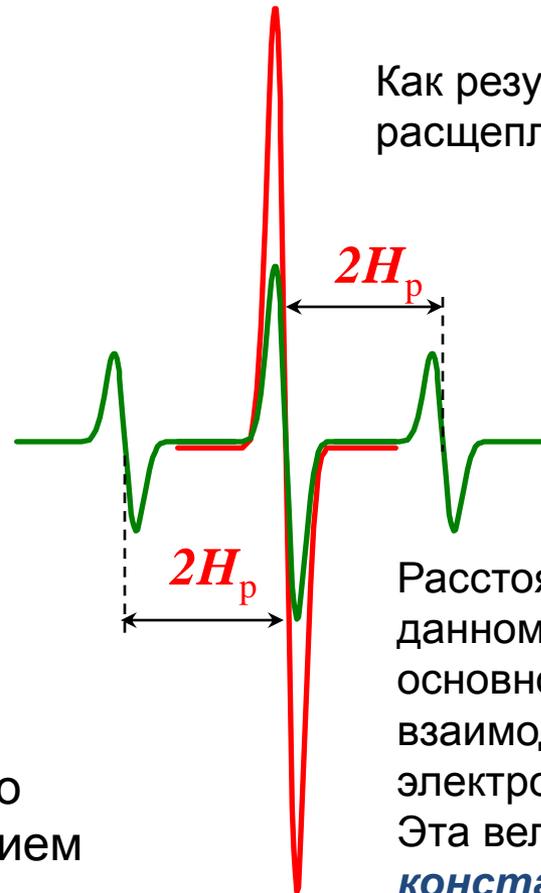
$$\left. \begin{aligned} H_0 + H_{p1} + H_{p2} &= H_0 + 2H_p \\ H_0 + H_{p1} - H_{p2} &= H_0 \\ H_0 - H_{p1} + H_{p2} &= H_0 \\ H_0 - H_{p1} - H_{p2} &= H_0 - 2H_p \end{aligned} \right\}$$

Состояние $H=H_0$ реализуется **двумя способами** (а $H=H_0+2H_p$ или $H=H_0-2H_p$ только одним), следовательно вероятность этого состояния (и интенсивность сигнала) будут вдвое больше.

В конечном итоге вместо одного сигнала будет три с соотношением интенсивностей **1:2:1**

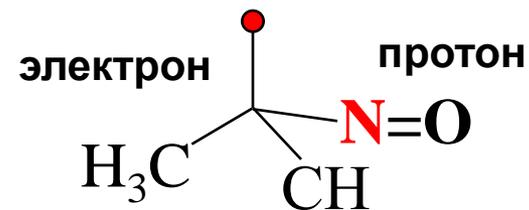
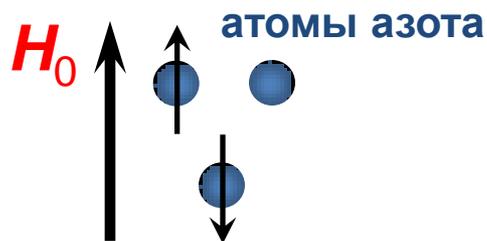


Как результат, сигнал ЭПР радикала расщепляется на **3** линии



Расстояние между линиями (в данном случае $2H_p$) является основной характеристикой взаимодействия неспаренного электрона с магнитным ядром. Эта величина называется, также, **константой сверхтонкого взаимодействия**.

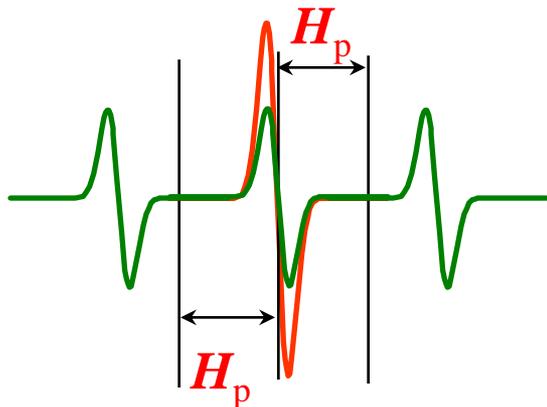
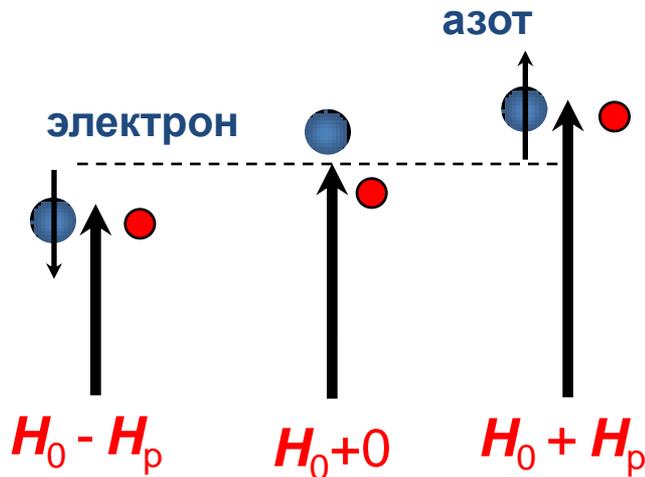
Сверхтонкое взаимодействие



Атом азота имеет магнитный момент который ориентирован во внешнем магнитном поле (H_0) в трех направлениях (вдоль поля, против поля и «поперек» поля) имеет спиновое число $S = \pm 1$ и 0 .

Магнитный момент азота создает магнитное поле ($+H_p$ или $-H_p$, и $H=0$), которое складывается с внешним магнитным полем (H_0).

Отсюда следует, что суммарная величина поля, приложенного к неспаренному, электрону будет немного больше ($H_0 + H_p$) (если спин азота=1) или немного меньше ($H_0 - H_p$), чем в отсутствии азота (H_0) (если спин азота=-1), либо не изменяется, если спин =0.



В результате такого взаимодействия, сигнал ЭПР (который бы в отсутствии протона состоял из одной линии) будет состоять из трех линий

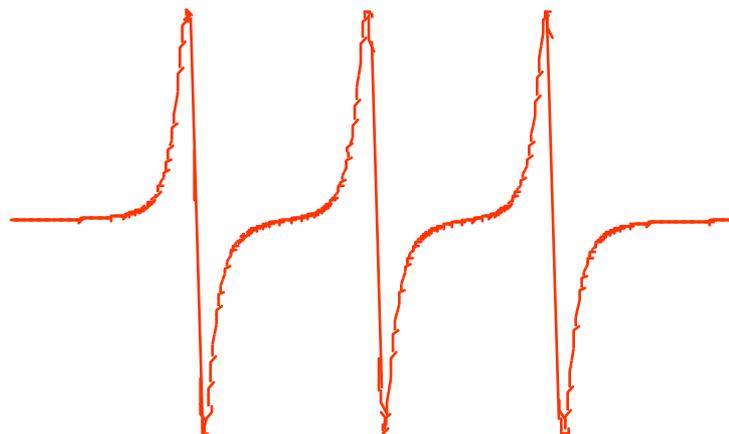
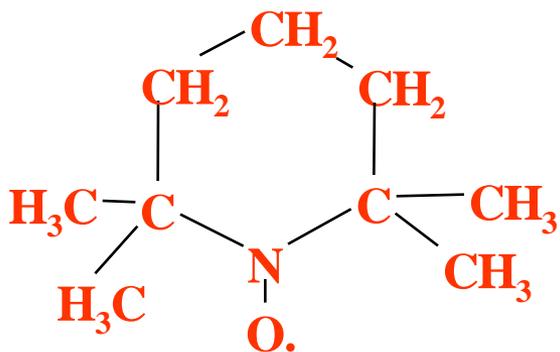
$$H = \frac{\mu}{R^3} (3 \cos^2 \theta - 1)$$

Применение ЭПР в медико-биологических исследованиях:

- 1. естественные сигналы ЭПР**
- 2. метод спиновых меток и зондов**
- 3. метод спиновых ловушек**

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 .

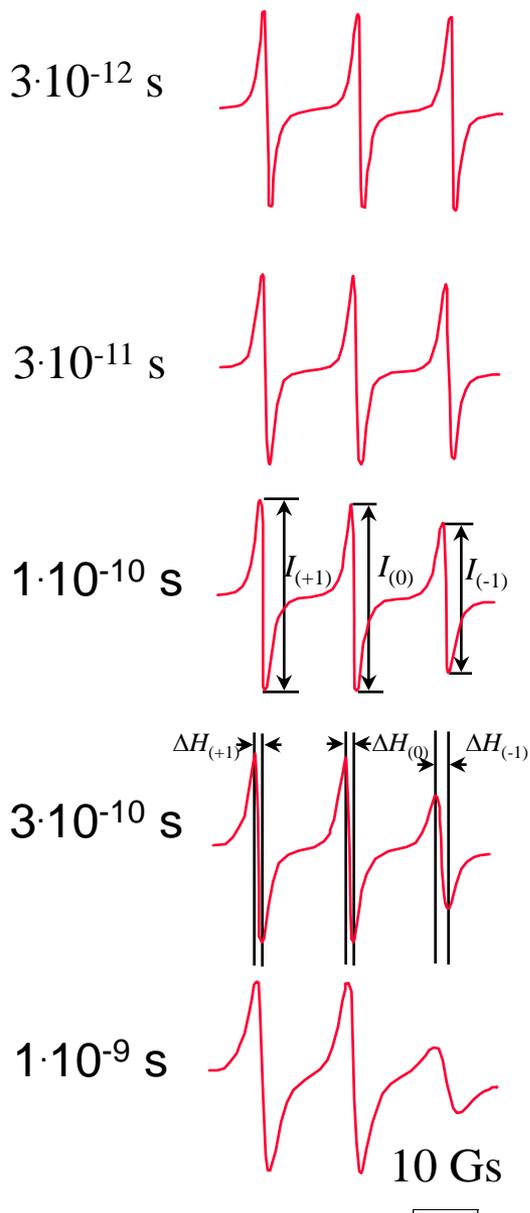


Формула и спектр ЭПР нитроксильного радикала 2,2,6,6-тетраметил-пиперидин-1-оксил (ТЕМПО).

Спектр ЭПР ТЕМПО при разных τ_c

Время

корреляции 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.

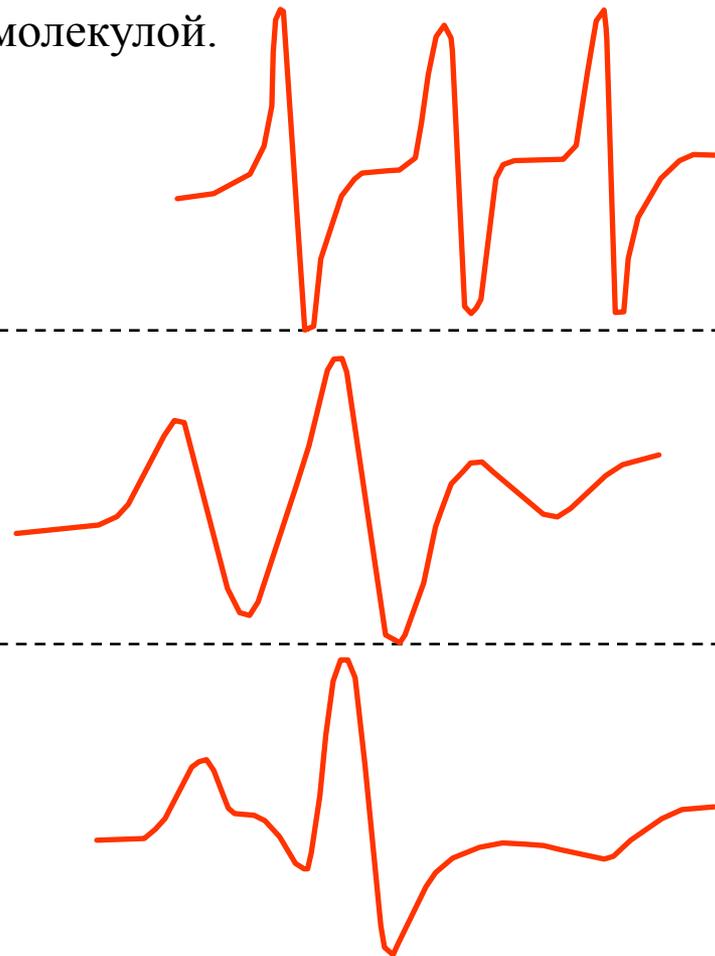
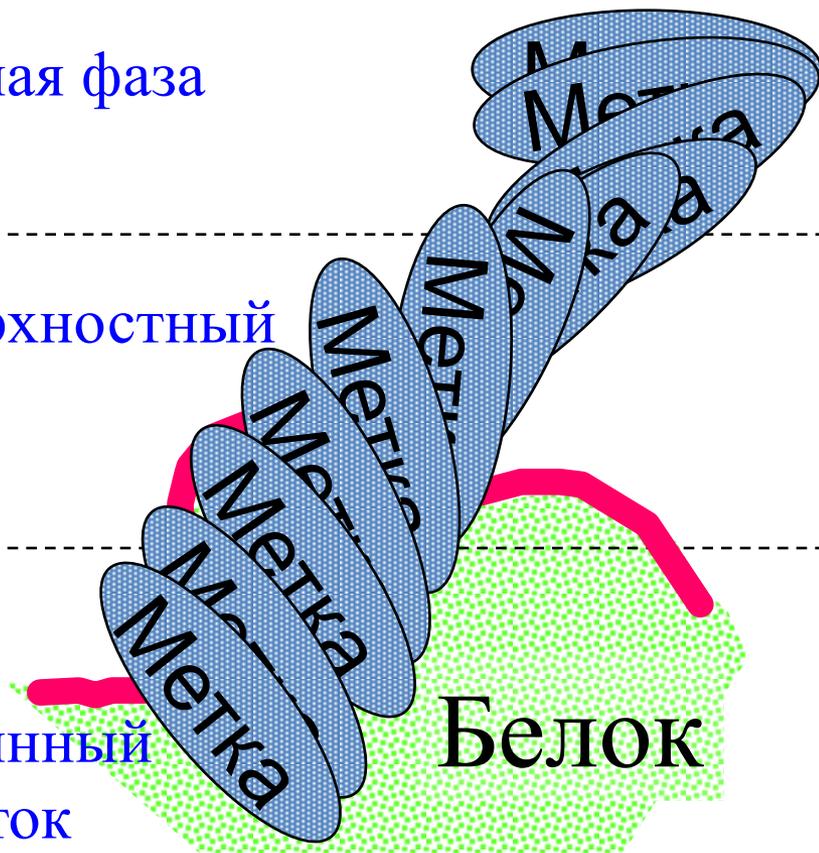
Спектры ЭПР спиновой метки при взаимодействии с SH-группами белка

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



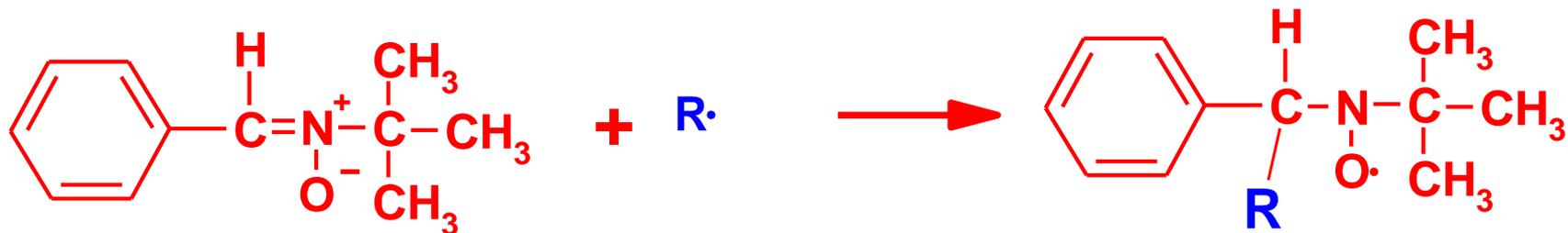
Основы метода спиновых ловушек (spin trapping)

- Концентрация свободных радикалов в клетках и тканях не превышает **10 нМ**.
- Минимальная концентрация свободных радикалов, которую можно обнаружить методом ЭПР **100 нМ**



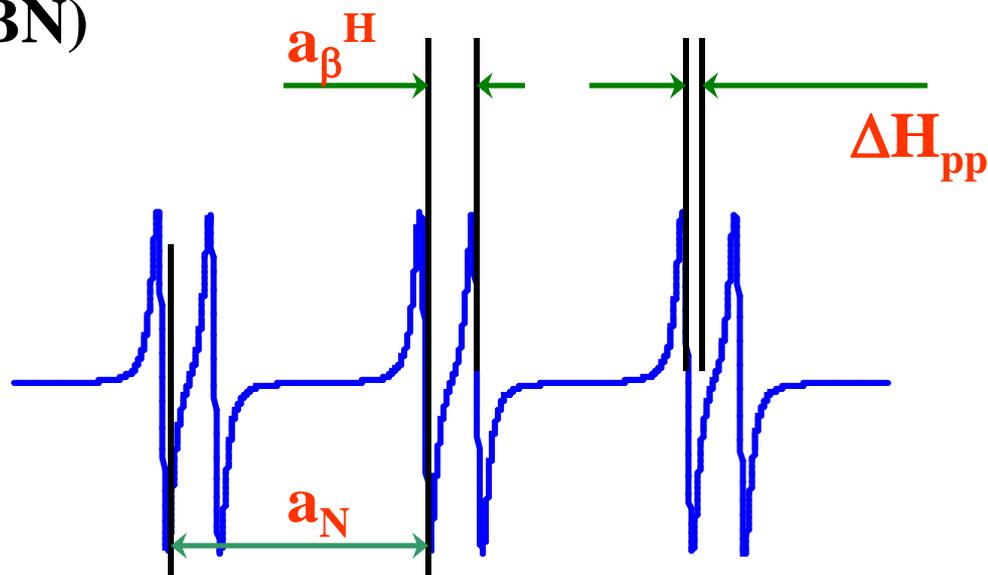
Предложен в 1965-67 независимо Кокака Т. (Япония), R. Lagercranz (Швеция) и E. Janzen (Канада).

Характеристики спектра ЭПР спиновых аддуктов



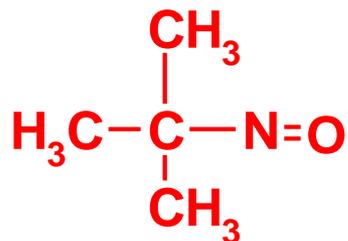
**α -фенил-N-трет-бутил
нитрон (PBN)**

PBN спиновый аддукт

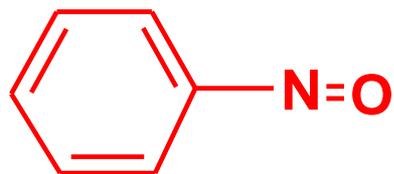


Основные виды спиновых ловушек

нитрозосоединения

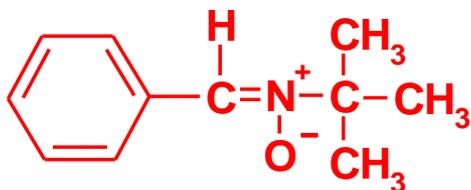


трет-нитрозобутан

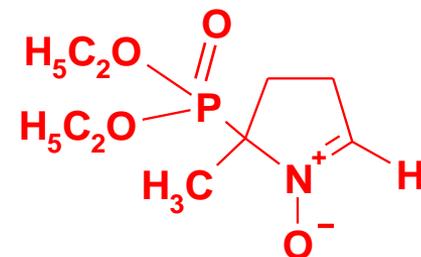


нитробензол

нитроны

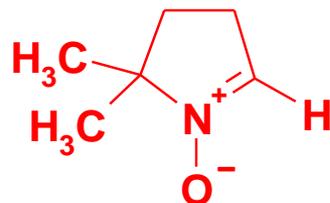


PBN

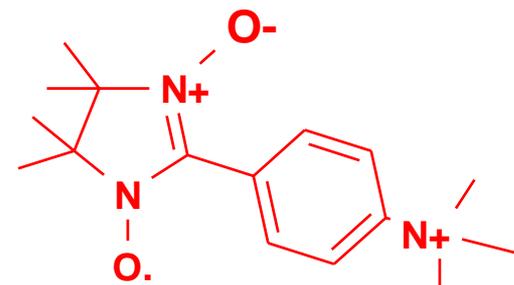


DEPMPO

Нитронил-нитроксилы



DMPO

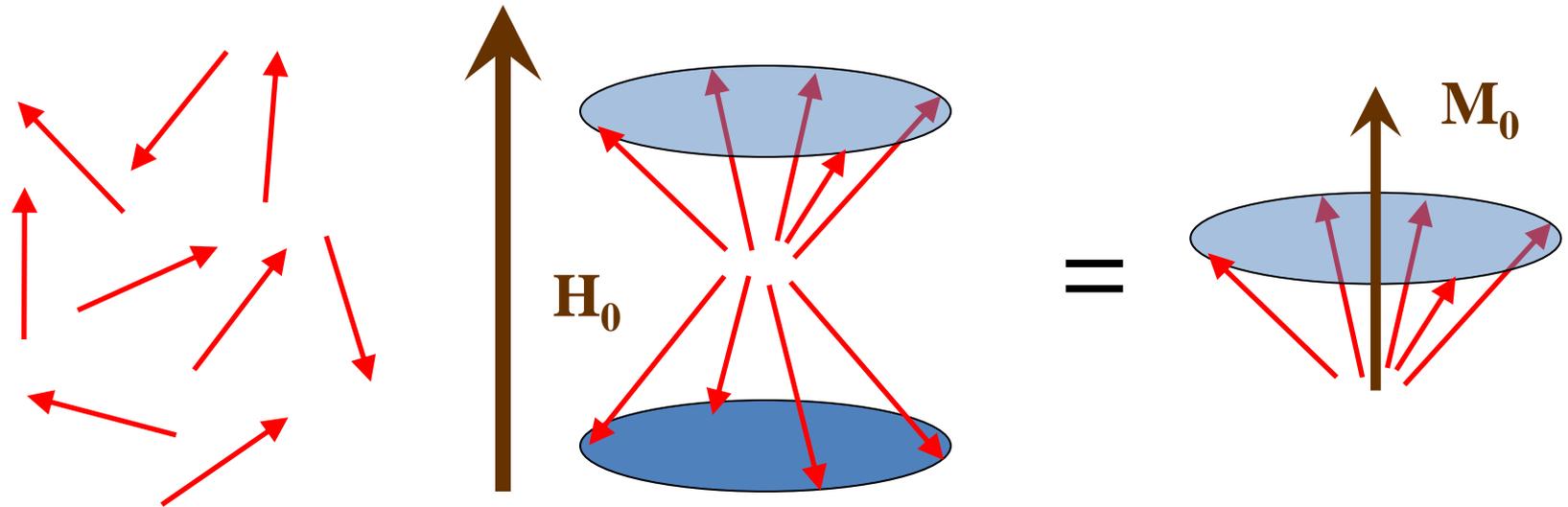


NNR

Основные требования к спиновым ловушкам

- Быстрые реакции с радикалами
- Отсутствие побочных реакций
- Образование стабильных аддуктов
- Отличие в параметрах спектра ЭПР спиновых аддуктов у разных радикалов

Физические основы МРТ

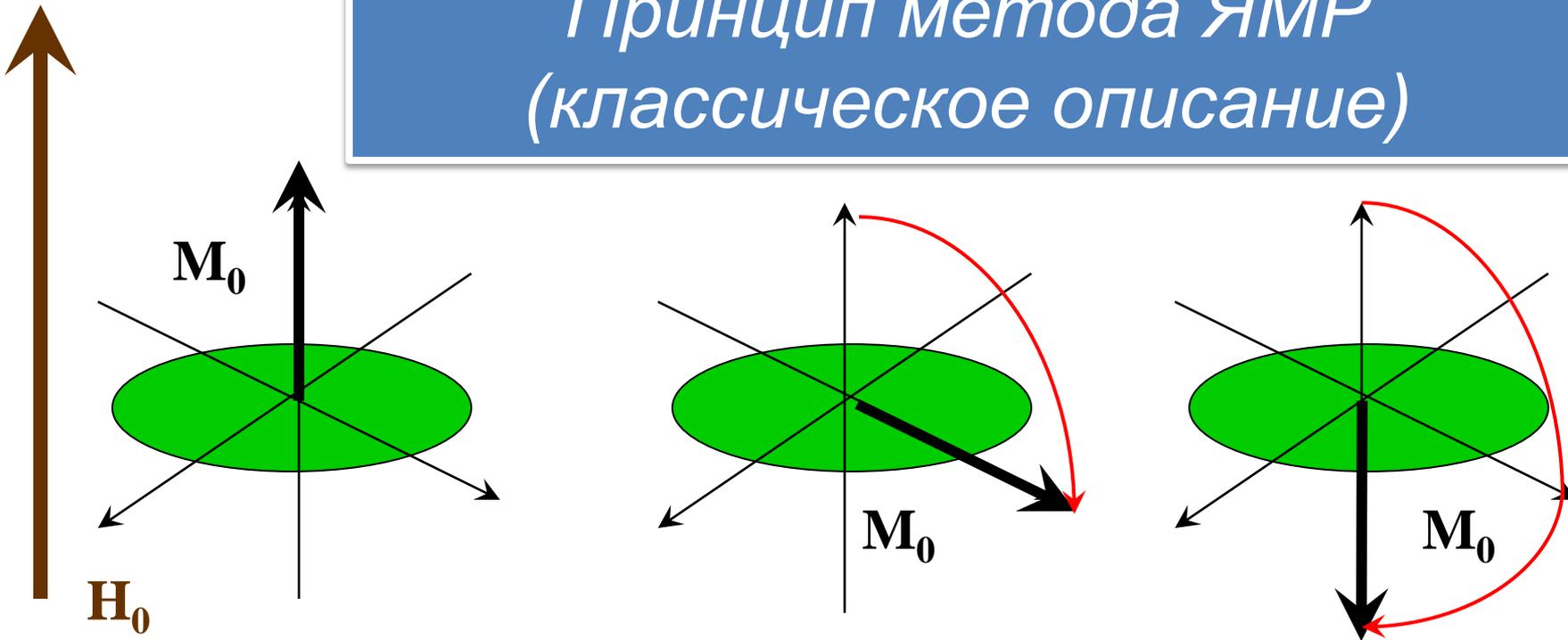


В отсутствие поля

Внешнее магнитное поле приводит к разделению ядер на 2 группы в соответствии с распределением Больцмана

Результирующий ядерный магнитный момент является причиной появления макроскопической намагниченности

Принцип метода ЯМР (классическое описание)



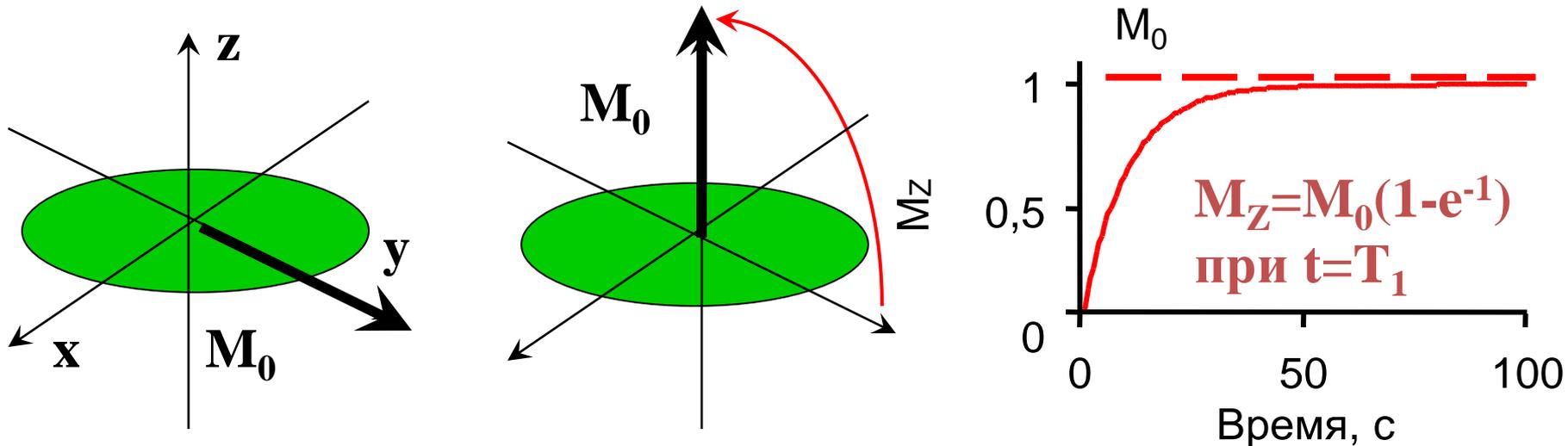
В отсутствие внешнего
электромагнитного поля

90°
электромагнитный
импульс (H_1)

180°
электромагнитный
импульс (H_1)

В результате воздействия электромагнитного импульса вектор намагниченности отклоняется от равновесного состояния

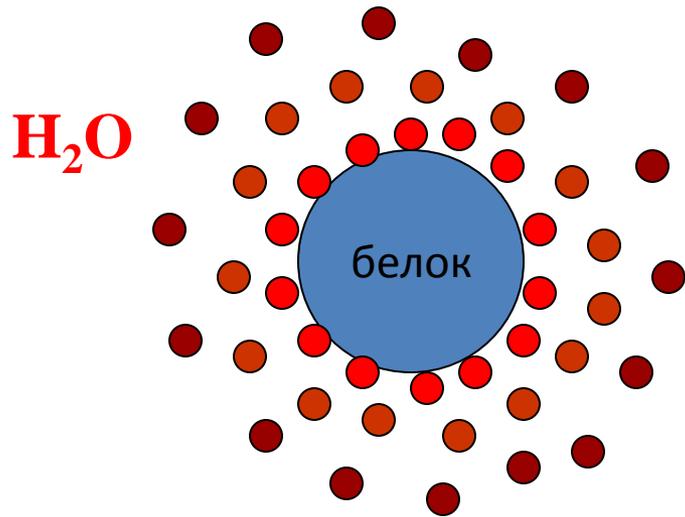
T_1 -релаксация (продольная)



Интервал времени за который вектор M_z возвращается в исходное состояние называется временем **спин-решеточной** релаксации (T_1). Уравнение, описывающее зависимость вектора M_z от времени выглядит следующим образом:

$$M_z = M_0 (1 - e^{-t/T_1})$$

Значения времени T_1 для некоторых биологических тканей

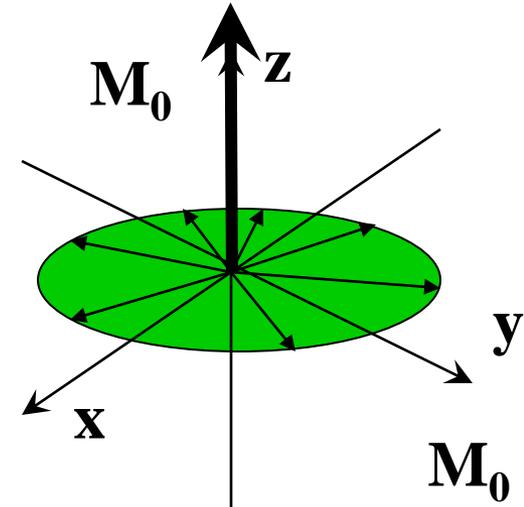
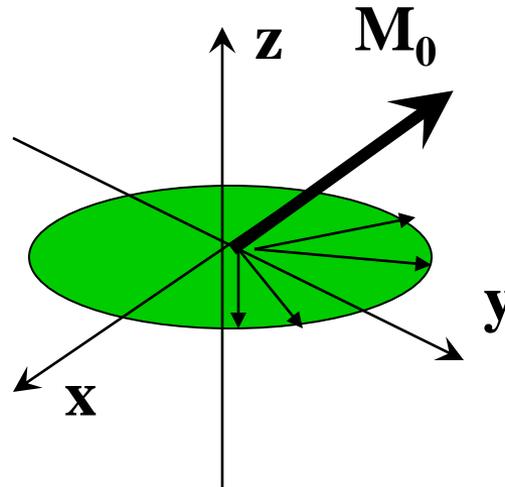
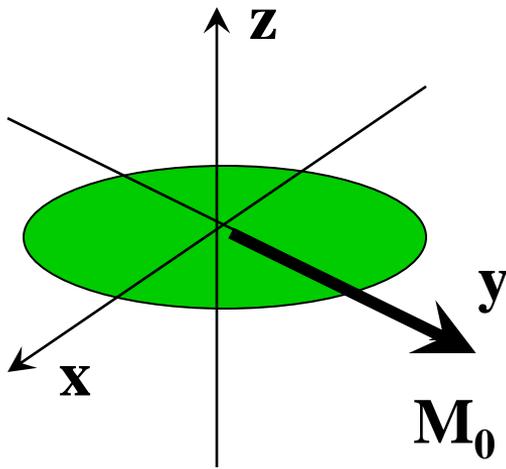


T_1 (мс)

Серое в-во	450	Почка (Мозг.)	680
Белое в-во	350	Почка (Корк.)	570
СМЖ	1500	Мышцы	500
Миокард	380	Жировая тк.	230
Печень	377	Костный мозг	490
Подж. Железа	463	Кожа	320
Селезенка	646	Кишечник	300

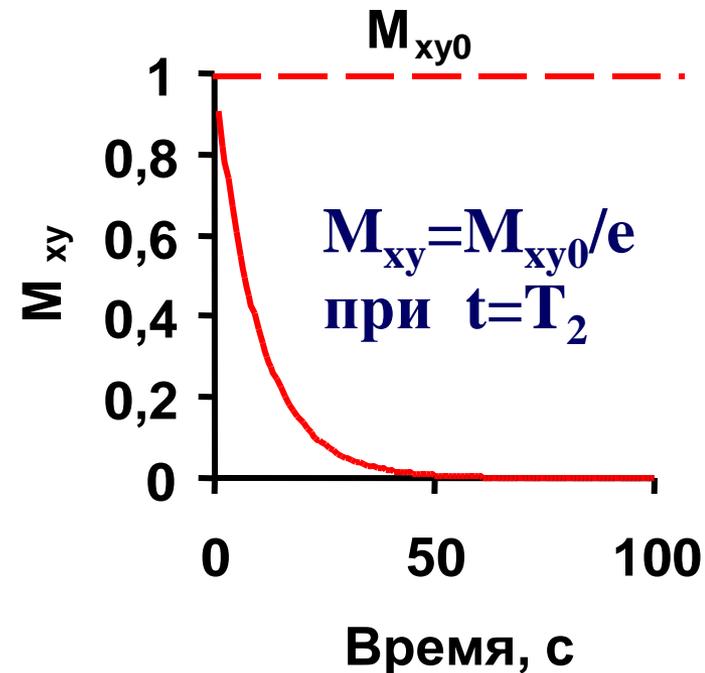
Молекулы воды вдали от макромолекул движутся значительно быстрее, чем в непосредственной близости от молекул белка или мембран. Чем медленнее движение, тем короче время релаксации T_1 .

T_2 -релаксация (поперечная)



Интервал времени за который величина намагниченности M_{xy} возвращается в равновесное состояние называется временем **спин-спиновой** релаксации T_2 .

$$M_{xy} = M_{xy0} * e^{-t/T_2}$$



Время T_2 для нормальных и патологически измененных тканей мозга человека

Нормальные - T_2 (мс)

Серое в-во	101
White matter	96
СМЖ	510
Мозолистое тело	120
Мост	110
Жировая ткань	160

Патологические - T_2 (мс)

Астроцитома	180
Глиобластома	170
Олигодендроглиома	200
Глиома	260
Инфаркт	170
Множеств. склероз	190

Время спин-спиновой релаксации T_2 в нормальных и патологически изменённых тканях мозга

нормальные - T_2 (мс)

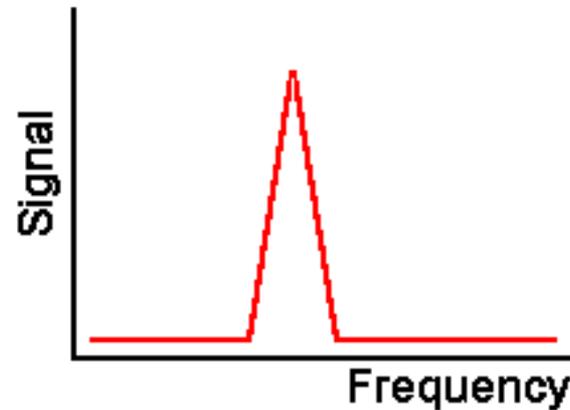
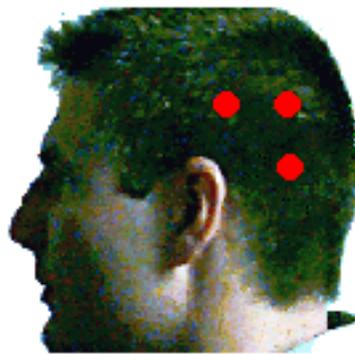
Серое в-во	101
Белое в-во	96
СМЖ	510
Мозолистое тело	120
Мост	110
Жировая ткань	160

патологические - T_2 (мс)

Астроцитома	180
Глиобластома	170
Олигодендроглиома	200
Глиома	260
Некроз	170
Множ. склероз	190

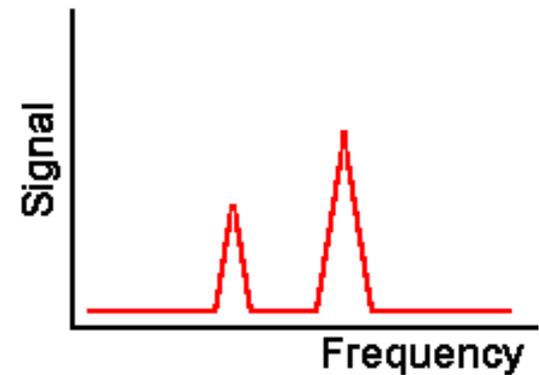
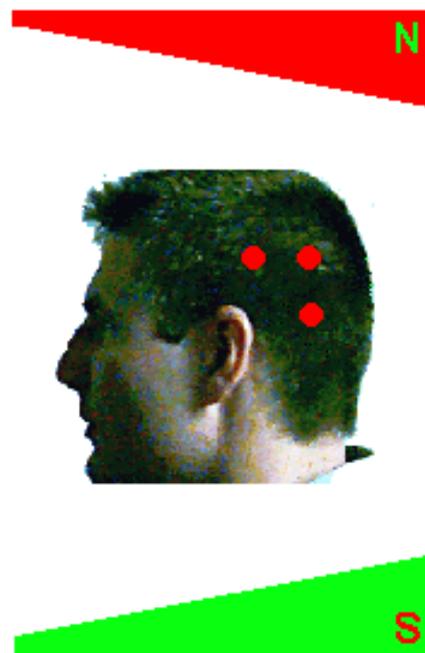
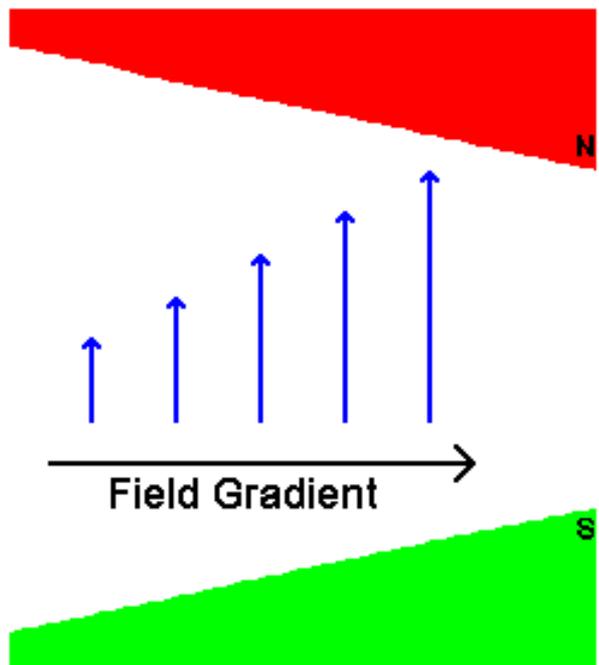
Магнитная Резонансная Томография: получение изображения

Измерение пространственного распределения сигнала ЯМР

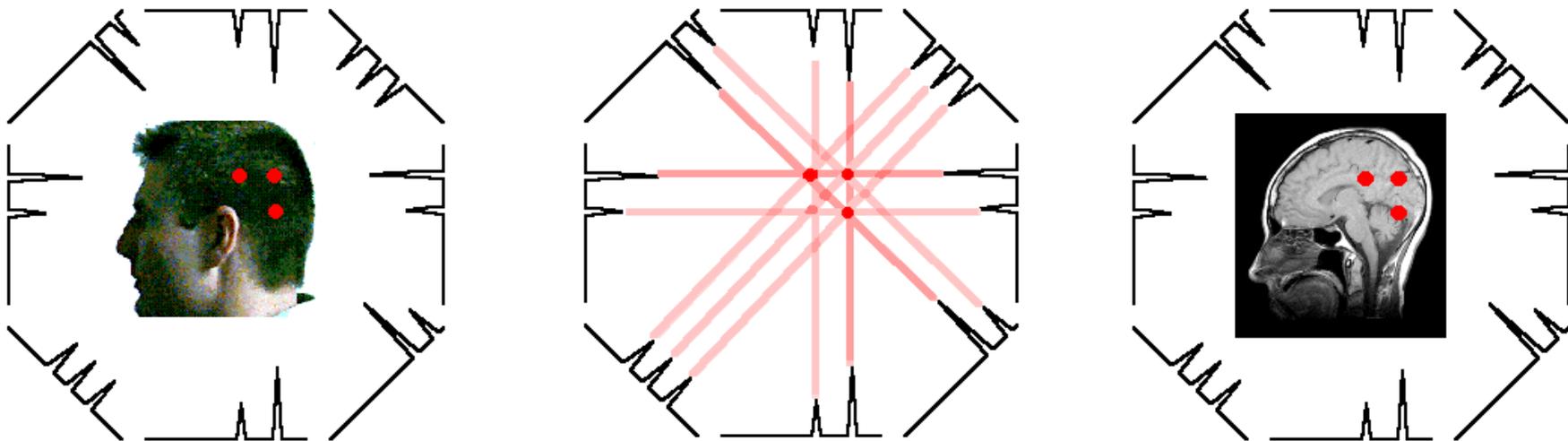


Объект с несколькими центрами в однородном магнитном поле дает одиночный сигнал ЯМР

Обнаружение сигнала ЯМР в градиенте магнитного поля

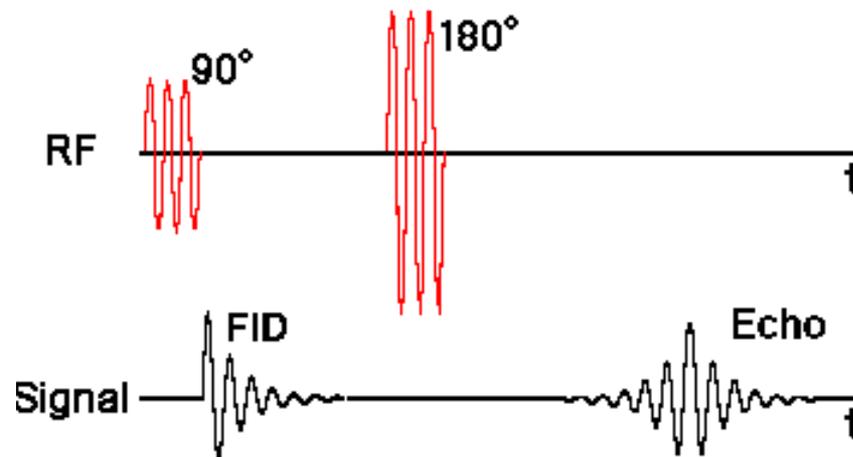
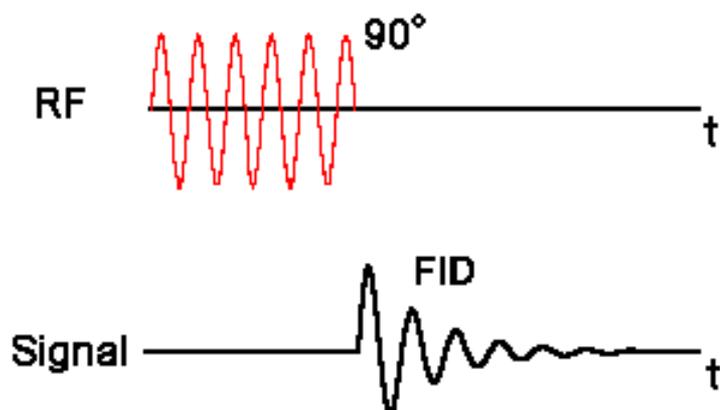


Круговые проекции градиента магнитного поля



Круговая проекция магнитного поля дает 2х-мерное изображение изучаемых объектов

Спад Свободной Индукции

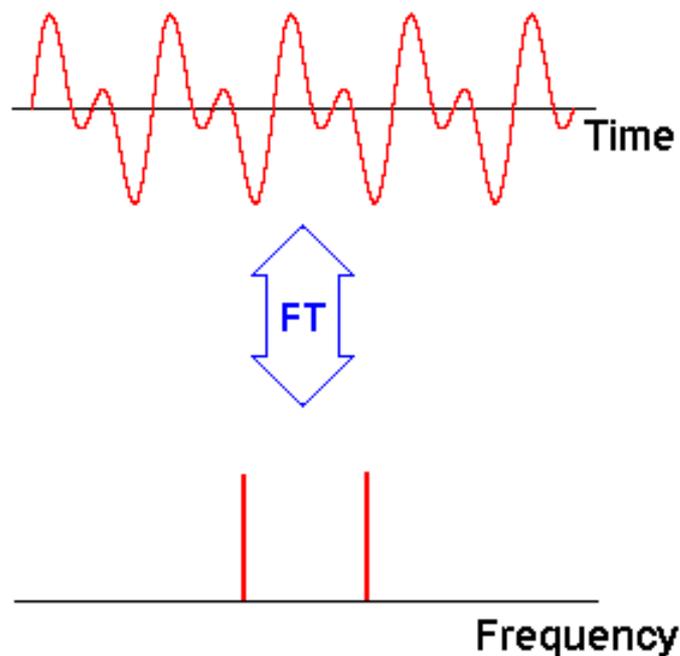


Электромагнитный импульс (RF) вызывает появление сигнала свободной индукции, который затем исчезает в результате процессов релаксации (free induction decay или FID).

Принцип преобразования Фурье

Преобразование Фурье - операция, в результате которой зависимость сигнала от времени превращается в его зависимость от частоты.

$$f(\omega) = \text{const} * \int_0^{\infty} f(t) \cos(\omega t) dt$$



Магнитная Резонансная Томография: свойства изображений

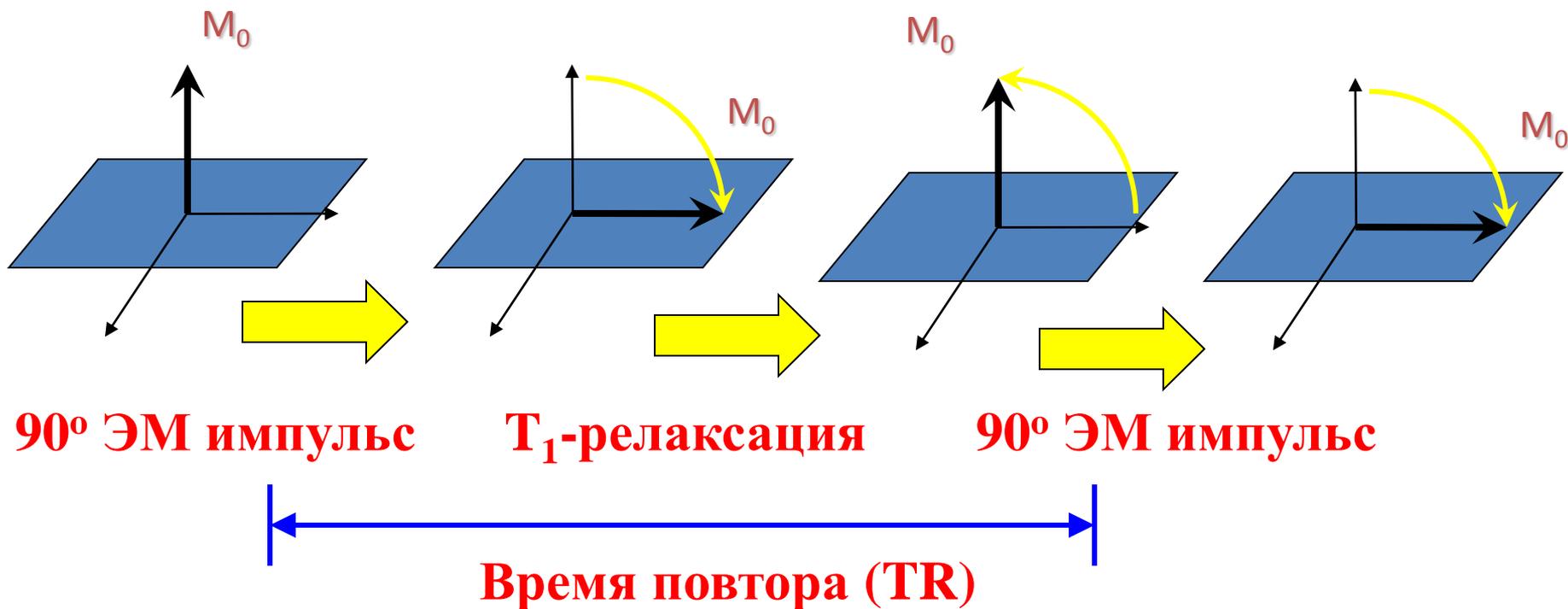
Типы МРТ изображений

ρ (ρ_0) - взвешенное по протонной плотности

T_1 – взвешенное по времени T_1

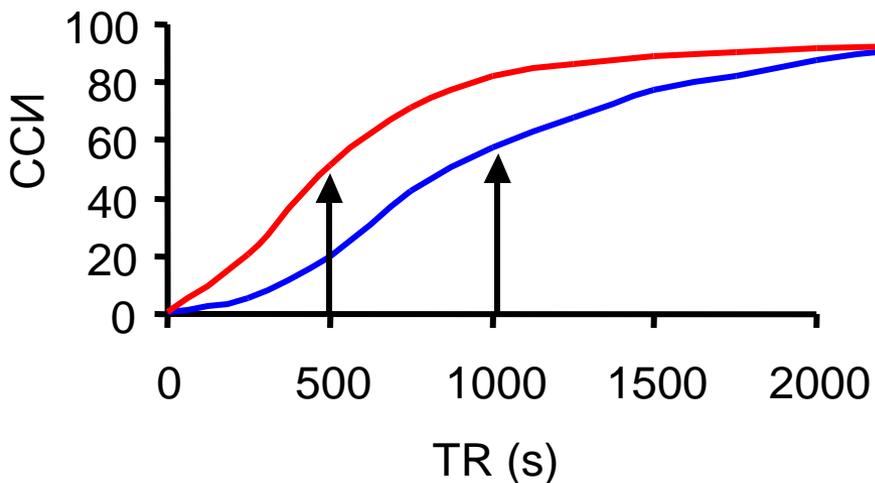
T_2 – взвешенное по времени T_2

Метод восстановления насыщения

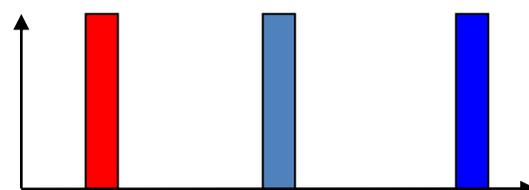


Вектор намагниченности M_0 может быть отклонен на 90° с помощью ЭМ импульса. За время повтора (TR) система релаксирует и вектор M_0 возвращается в равновесное состояние.

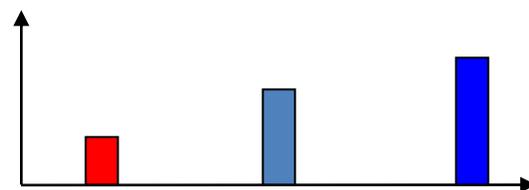
Применение метода восстановления насыщения для измерения времени T_1



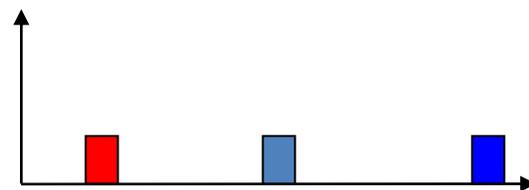
TR=2000



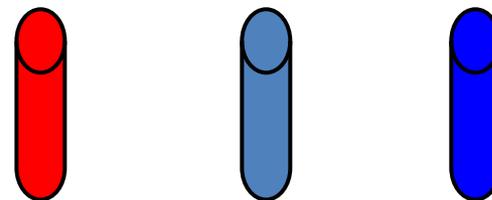
TR=500



TR=100



Измерение сигнала свободной индукции (ССИ) у тканей с различными значениями времени T_1

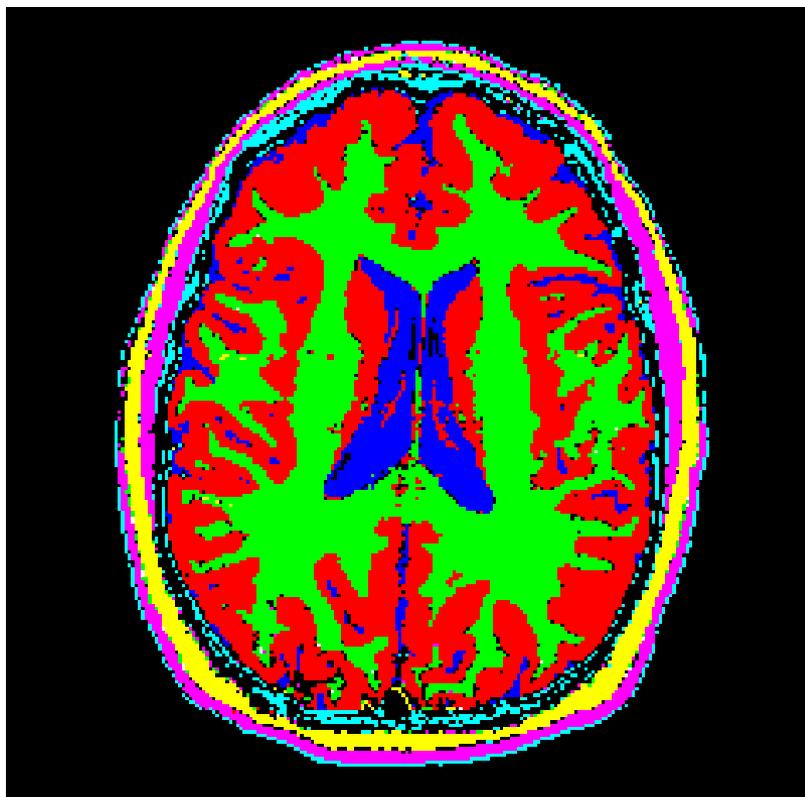


кровь

мышцы

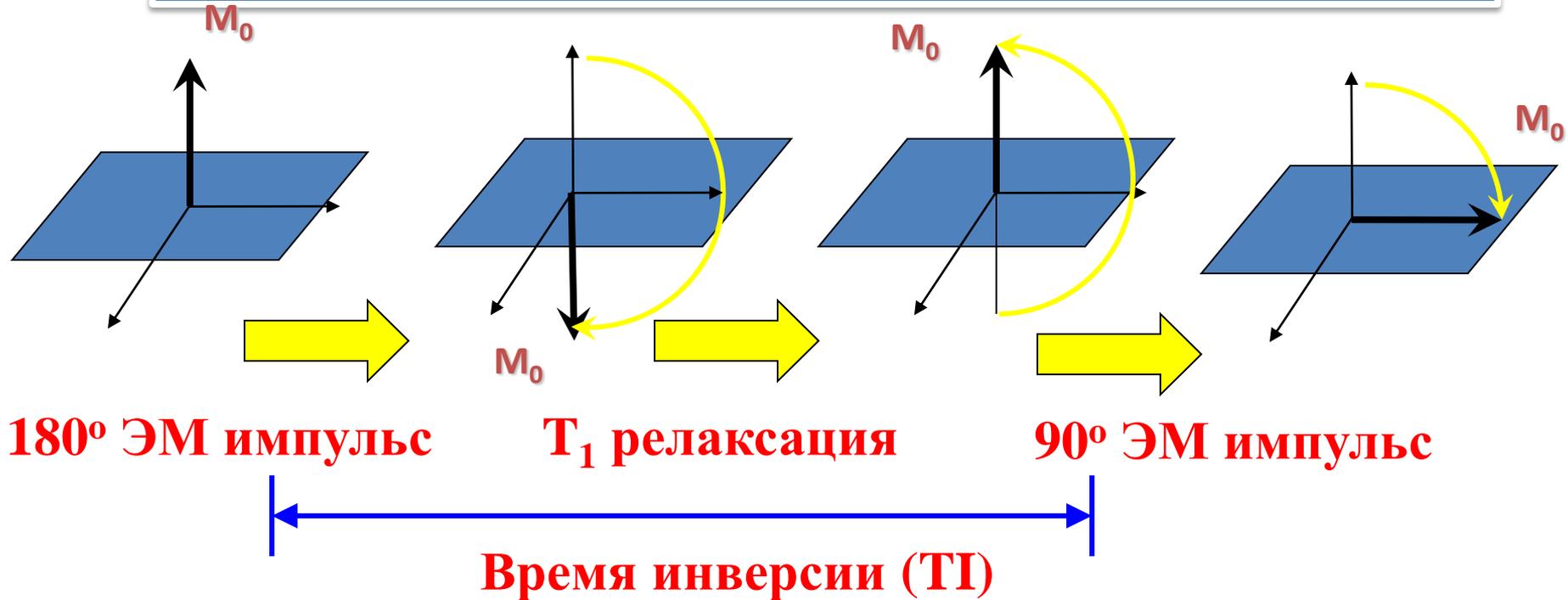
жир

МРТ изображение тканей головного мозга, полученное методом восстановления насыщения



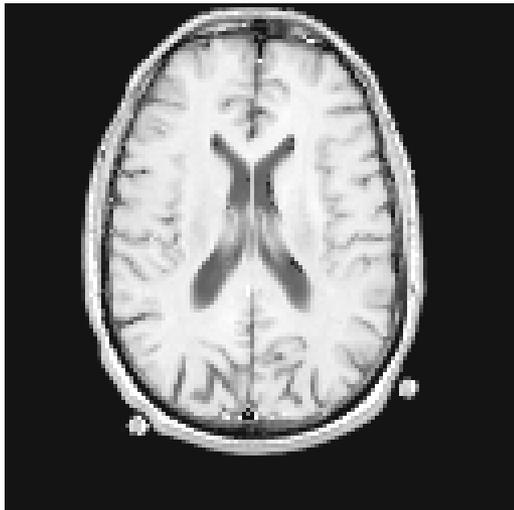
-  Серое вещество
-  Белое вещество
-  СМЖ
-  Адипозная ткань
-  Мышцы
-  Менингеальная об.

Метод восстановления инвертированного сигнала

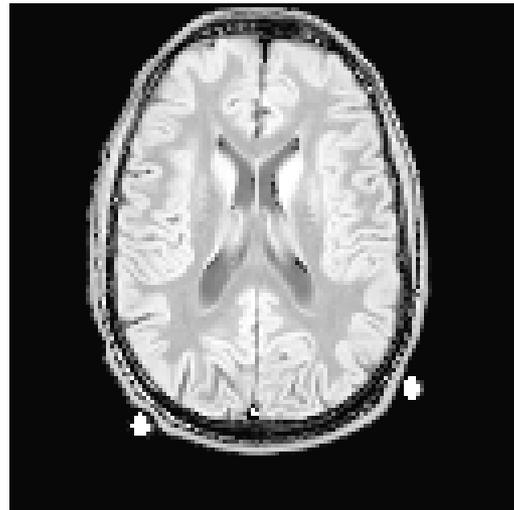


Вектор намагниченности M_0 может быть отклонен на 180° с помощью ЭМ импульса. За время инверсии (TI) система релаксирует и вектор M_0 возвращается в равновесное состояние. Чтобы измерить величину вектора прикладывают второй 90° импульс.

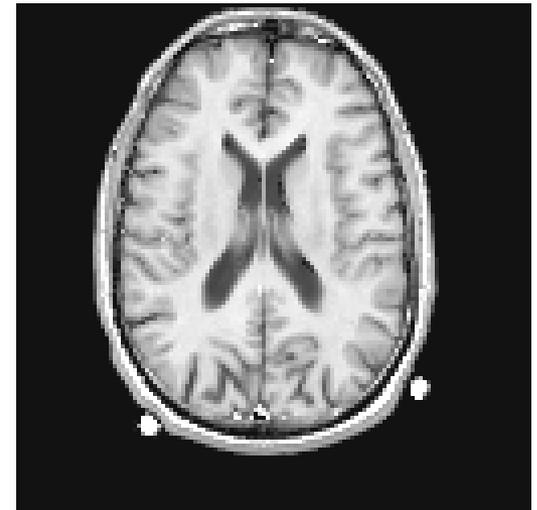
Изображения, полученные методом восстановления инвертированного сигнала



TR = 1000 ms
TI = 50 ms

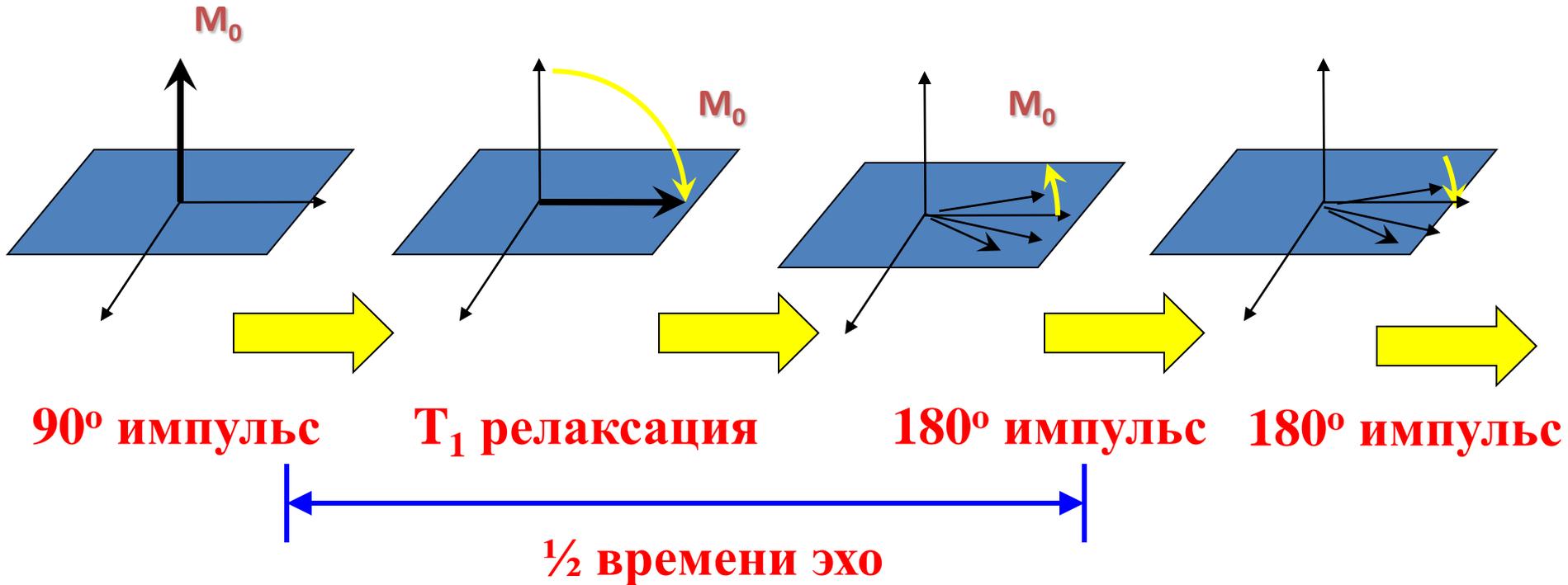


TR = 1000 ms
TI = 250 ms



TR = 1000 ms
TI = 750 ms

Метод Спинового Эха



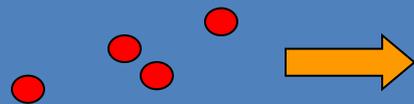
Система подвергается воздействию 90° импульса. После чего через некоторый интервал времени следует 180° импульс. Это приводит к появлению эха. Затем следует второй 180° импульс, который создает дополнительное эхо.

Принцип метода Спинового Эха

90° импульс

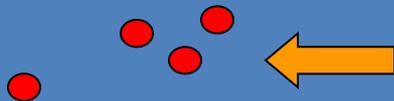


Расфазировка

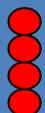


180° импульс

Восстановление фазы



Эхо



90°

180°

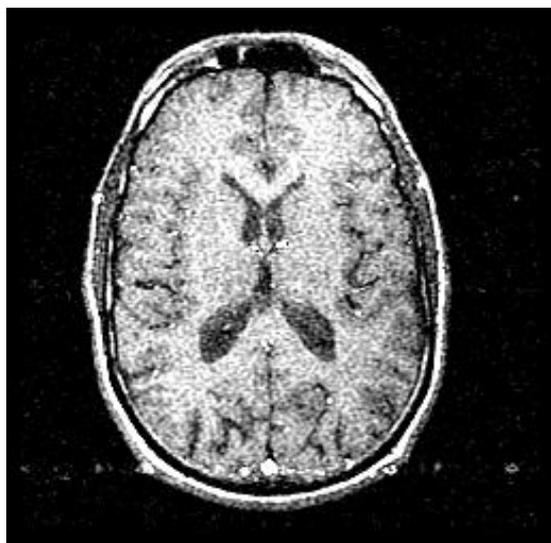
180°

T_2

За 90° импульсом следует процесс релаксации, вызывающий расфазировку системы. Воздействие 180° импульса изменяет направление процесса расфазировки, что приводит к восстановлению исходной фазы у всех элементов системы (время эхо).

Из амплитуды сигнала спинового эха может быть получена величина T_2

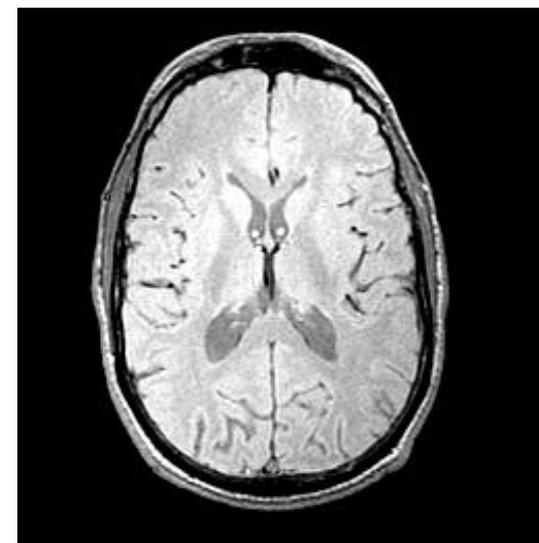
Изображения, полученные методом СПИНОВОГО ЭХА



TR = 250 ms
TE = 20 ms

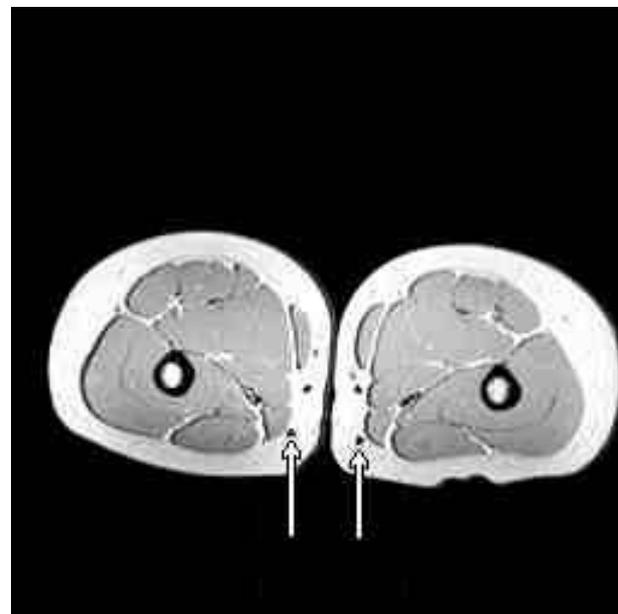


TR = 750 ms
TE = 20 ms



TR = 2000 ms
TE = 20 ms

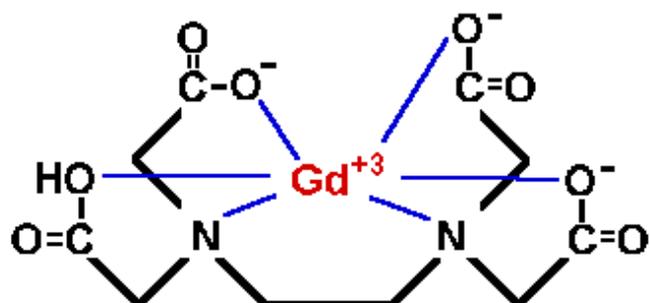
Изображения позвоночника и нижних конечностей



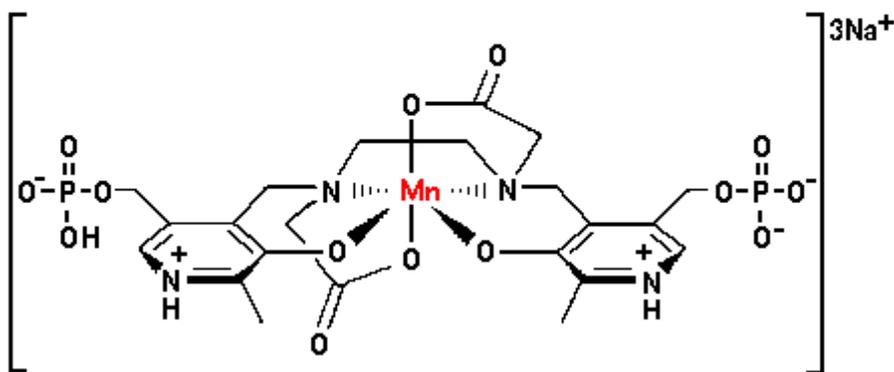
Магнитная Резонансная Томография: контрастирование

Формулы контрастирующих веществ

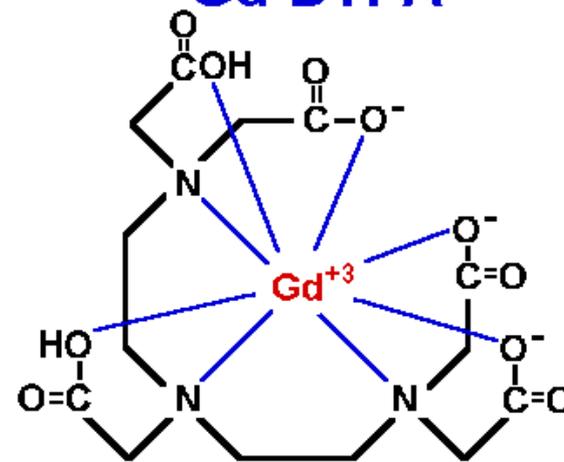
Gd-EDTA



mangafodipir trisodium

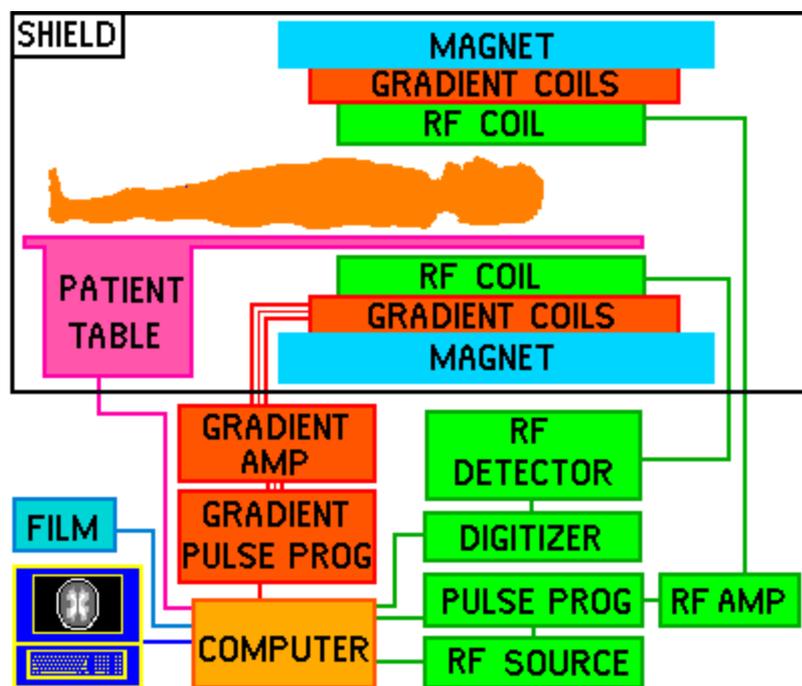


Gd-DTPA

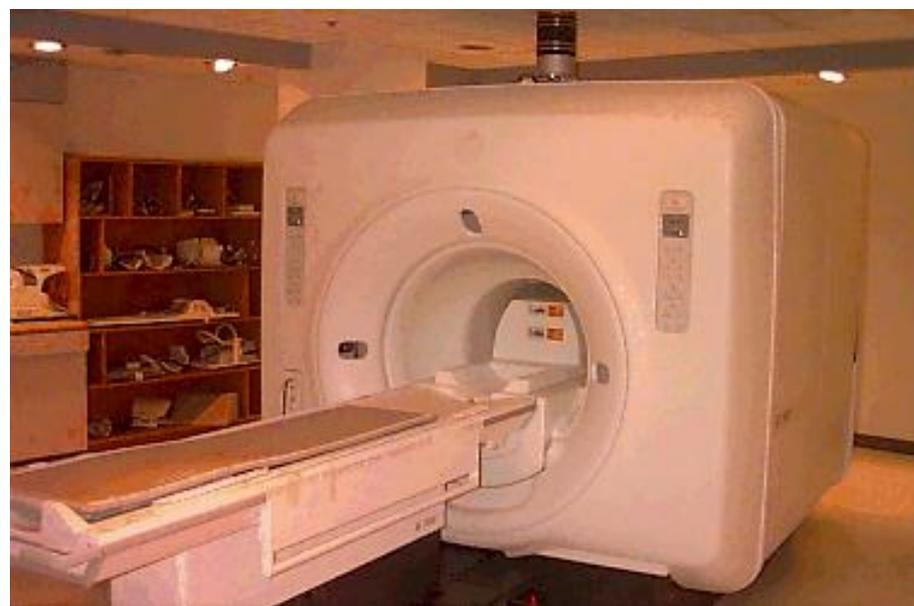


Магнитная Резонансная Томография: аппаратура

Магнитно-Резонансный Томограф



Общая схема томографа



Внешний вид томографа

Катушки для МРТ исследования головы и кисти

