

CZEŚĆ I

SPEKTROSKOPIA MOLEKULARNA

5. widma rezonansowe cz.IV

metody absorpcyjno-emisyjne

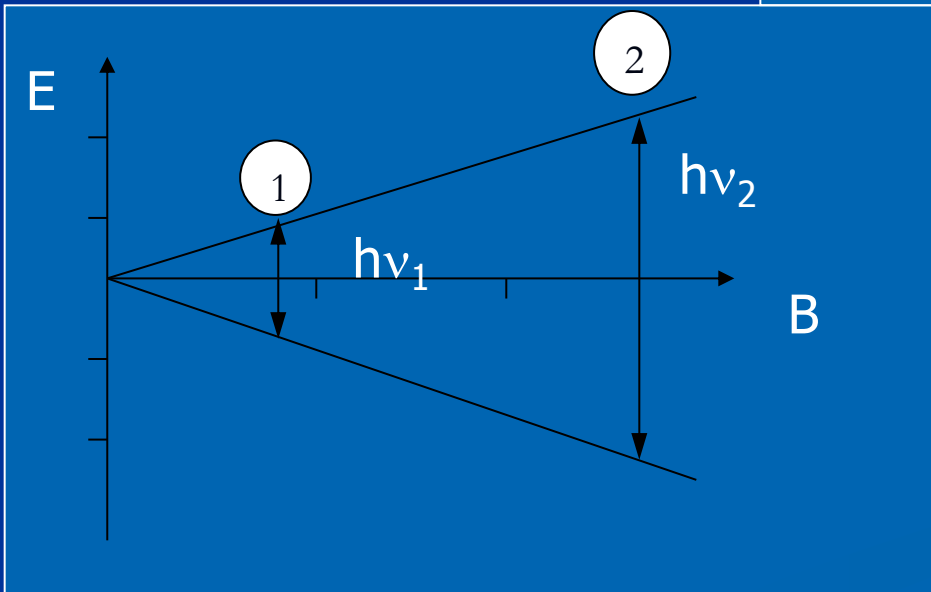
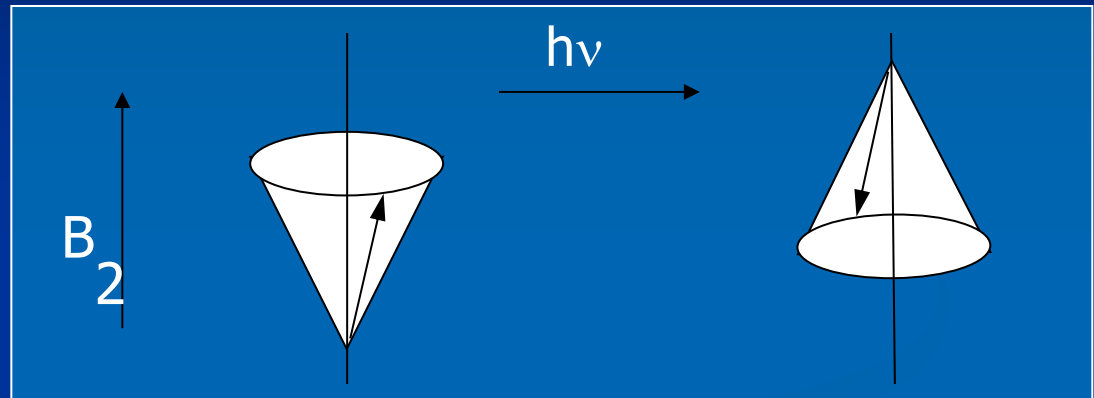
EPR

elektronowy rezonans paramagnetyczny

Podstawy fizyczne

EPR (elektronowy rezonans parametryczny) zwany jest czasami elektronowym rezonansem spinowym ESR wykorzystuje zjawisko rezonansu elektronu. Występuje dla cząsteczek paramagnetycznych – zawierających choć jeden niesparowany elektron

Zachowanie się elektronu w polu magnetycznym



Podstawowe równanie EPR:

$$h\nu = g\mu_{\beta}B$$

μ_{β} - magneton Bohra

ν - stała częstość promieniowania mikrofalowego;

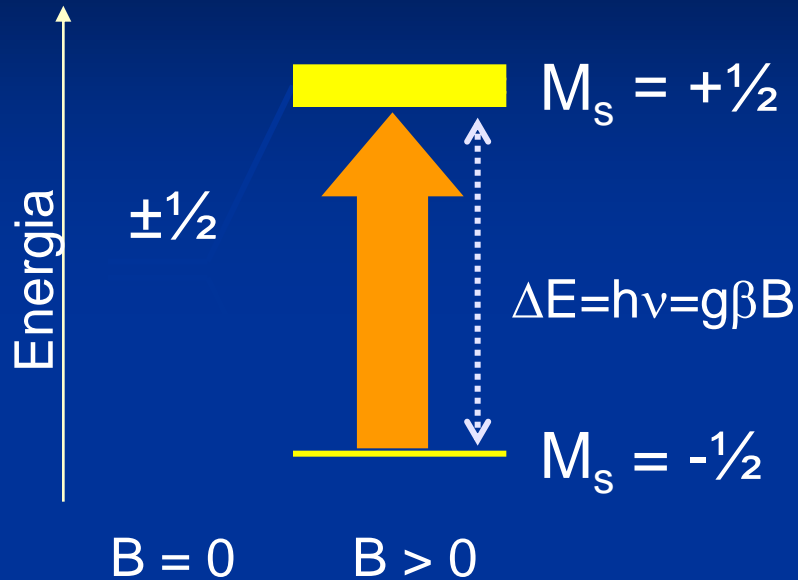
B - wartość indukcji magnetycznej, przy której wystąpił rezonans

g - czynnik rozpuszczenia spektroskopowego, wynika on wyłącznie z właściwości cząsteczki, jako całość można go mierzyć z dużą dokładnością; dla wolnego spinu

$g=2.0023$;

jest on anizotropowy i ma trzy główne wartości dla trzech prostopadłych osi;

EPR

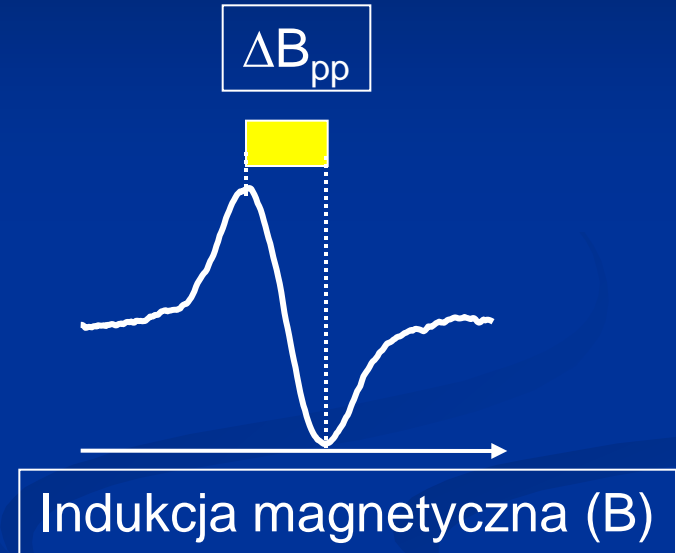


- h stała Plancka
- v częstotliwość (GHz or MHz)
- g współczynnik żyromagnetyczny (~ 2.0)
- β magneton Bohra
- B indukcja magnetyczna (Gauss lub mT)

EPR odpowiada absorpcji z zakresu mikrofal przez substancje o charakterze paramagnetycznym umieszczone w polu magnetycznym

Electron Paramagnetic Resonance (EPR)
Electron Spin Resonance (ESR)
Electron Magnetic Resonance (EMR)

EPR ~ ESR ~ EMR



$$hv = g\beta B$$

$$v = (g\beta/h)B = 2.8024 \times B \text{ MHz}$$

$$\text{dla } B = 3480 \text{ G}$$

$$v = 9.75 \text{ GHz}$$

$$\text{dla } B = 420 \text{ G}$$

$$v = 1.2 \text{ GHz}$$

$$\text{dla } B = 110 \text{ G}$$

$$v = 300 \text{ MHz}$$

(częstotliwość radiowa)

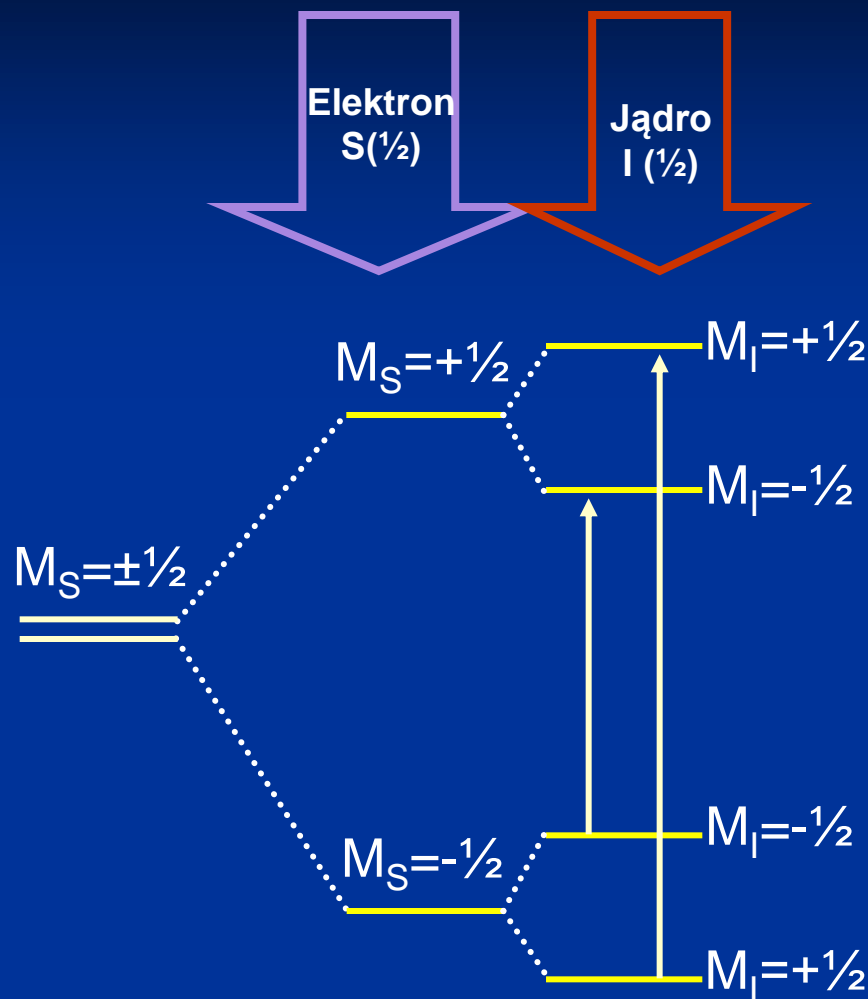
Charakterystyka ogólna EPR

- Przedmiotem analizy może być związek zawierający co najmniej jeden niesparowany elektron:
 - Stabilne związki: O_2 , NO , $[Fe(CN)_6]^{3-}$
 - Stany przejściowe: CH_3 , $C_6H_6^-$, $Ge[N\{Si(CH_3)_3\}_2]_3$ o czasach życia > 10 ns
- Promieniowanie mikrofalowe
- Pole magnetyczne rzędu: 0.35 Tesli (9.5 GHz)

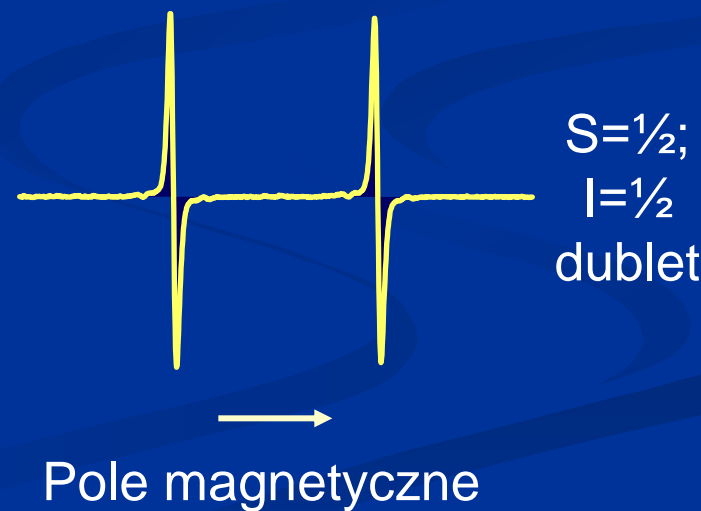
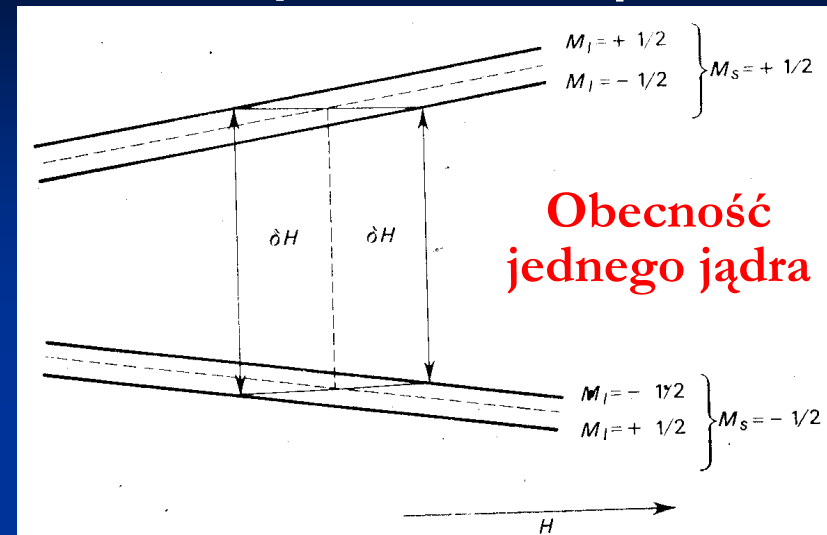
Czułość rzędu $1:10^{11}$

EPR

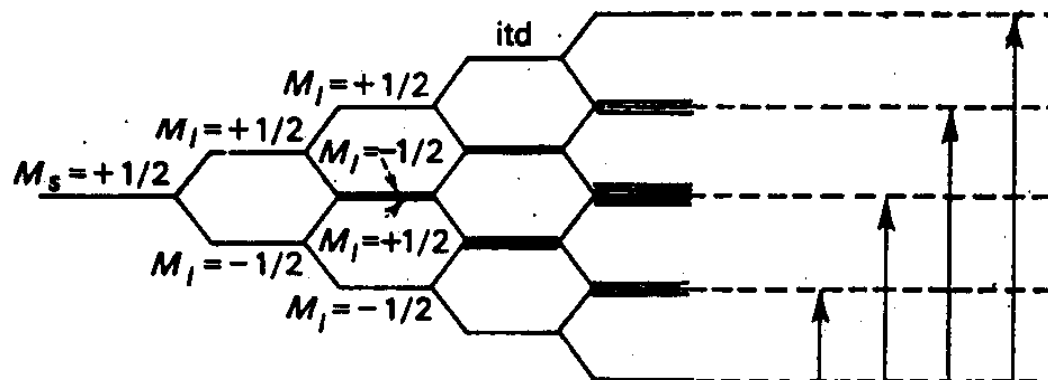
Sprzężenie spinowo-spinowe



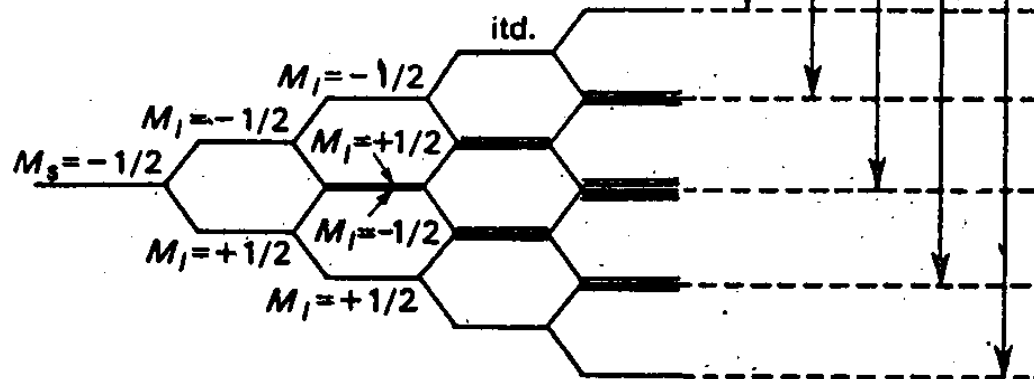
Reguły wyboru
 $\Delta M_S = \pm 1$; $\Delta M_I = 0$



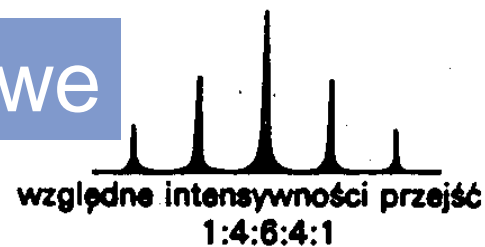
EPR



Obecność wielu jąder



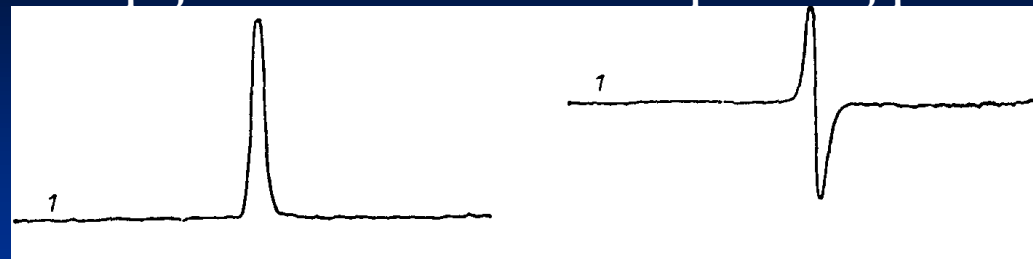
Sprzężenie spinowo-spinowe



Typowe widma zawierające jedną linię:

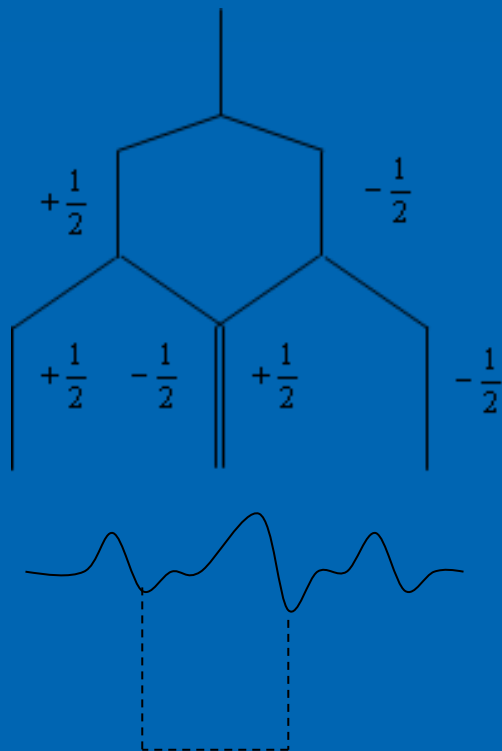
linia absorpcji

linia pierwszej pochodnej

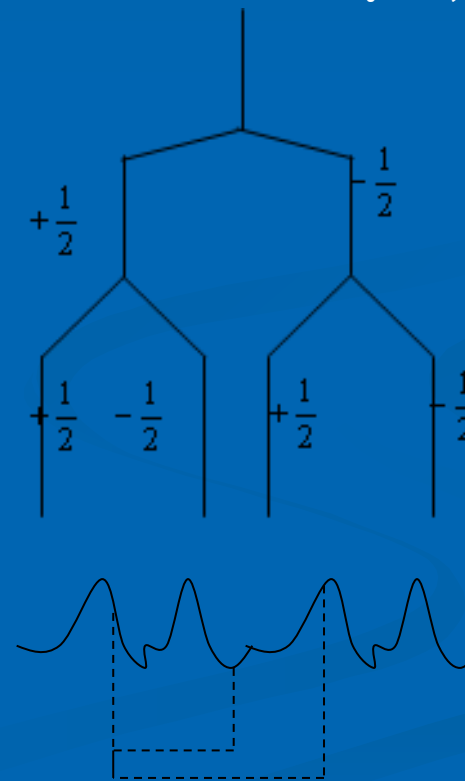


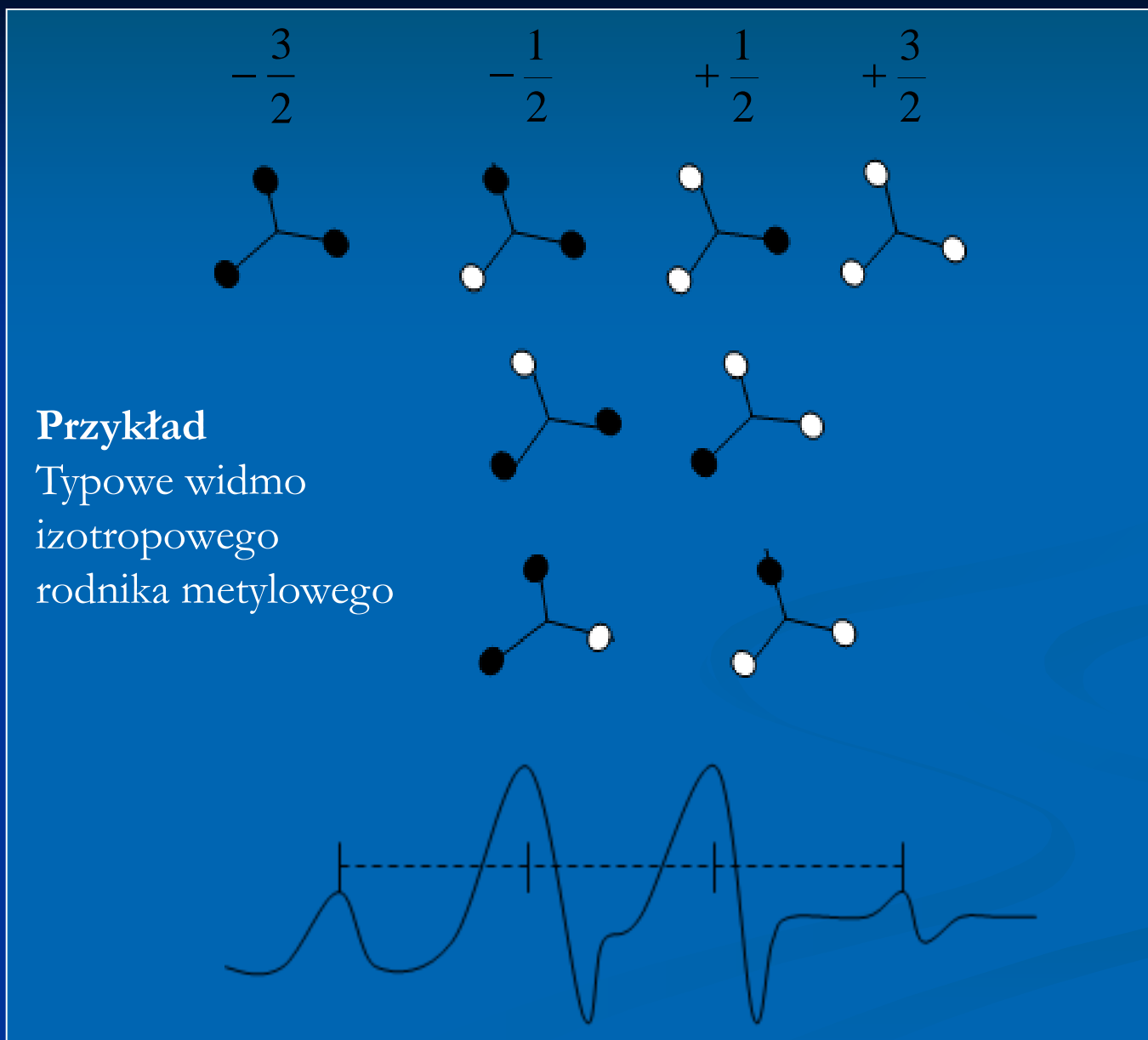
Widma EPR

Widma dla równocennych jąder



Widmo dla różnocennych jąder





- Rozszczepienie pojedynczej linii w polu sąsiadujących spinów na złożony sygnał o osi symetrii zlokalizowanej w miejscu sygnału nierozszczepionego
- Reguła: jeśli n jąder o spinie I oddziałuje z jednakowymi spinami niesparowanych elektronów, to wówczas otrzymuje się $2nI + 1$ linii.
- W przypadku większej liczby identycznych jąder liczba linii sumuje się multiplikatywnie

Przykłady:

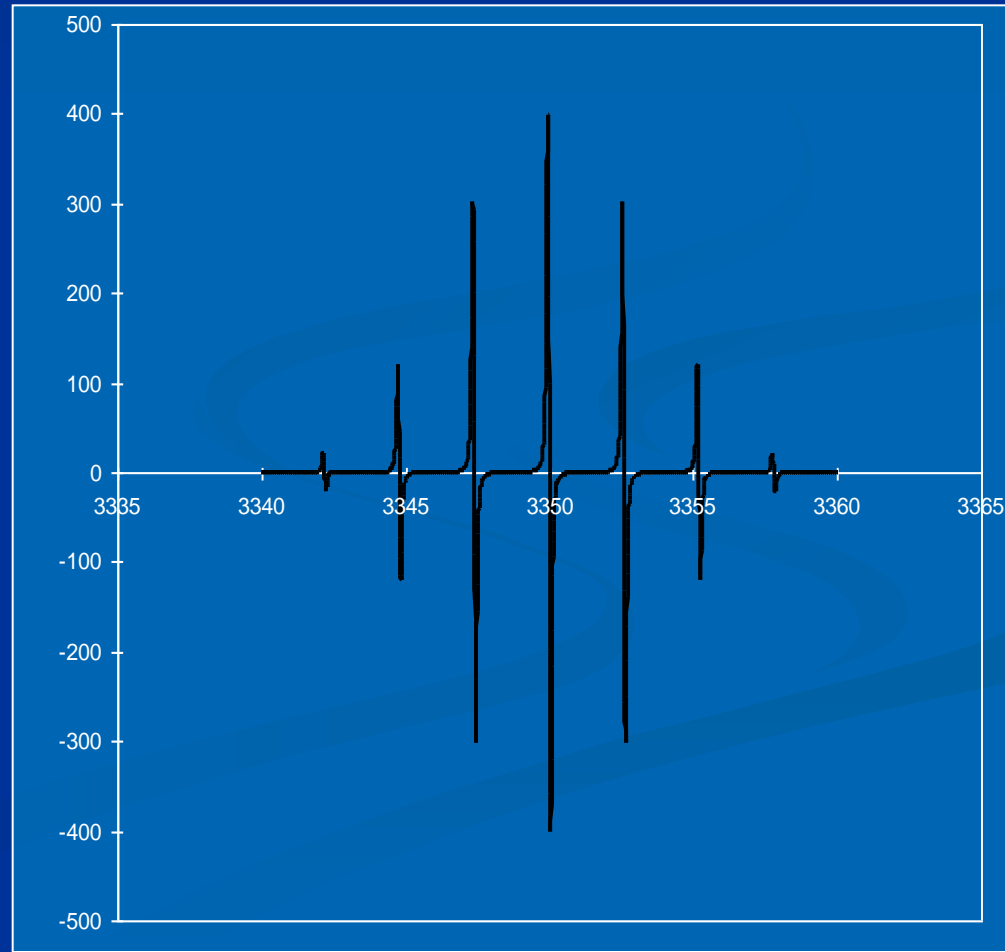
- H^\bullet $n=1$ $I=1/2$
 $[2 \times 1 \times (1/2) + 1] = 2$
- CH_3^\bullet $n=3$ $I=1/2$
 $[2 \times 3 \times (1/2) + 1] = 4$
- AlH_3^-
 - Al $n=1$ $I=5/2$
 - H $n=3$ $I=1/2$ $[2 \times 1 \times (5/2) + 1][2 \times 3 \times (1/2) + 1]$
 $= [6] \times [4] = 24$ linie

$$\text{Liczba linii} = \prod (2nI + 1)$$

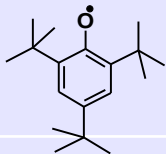
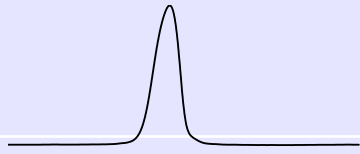
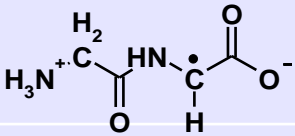
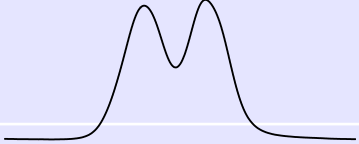
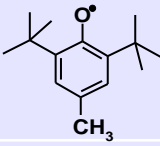
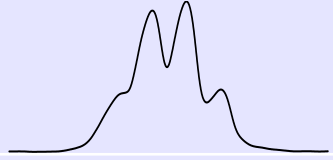
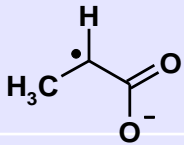

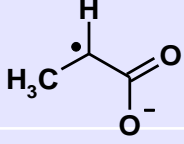

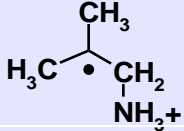
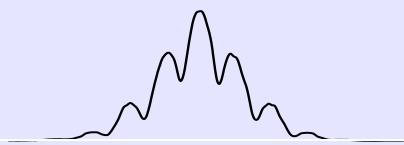
Intensywność linii – analiza jakościowa

- Np. H^\bullet daje 2 linie o intensywnościach: 1:1
- CH_3^\bullet daje 4 linie o intensywnościach: 1:3:3:1
- $\bullet\text{C}_6\text{H}_6^-$ daje 7 linii o intensywnościach 1:6:15:20:15:6:1 (jak pokazano na rycinie)

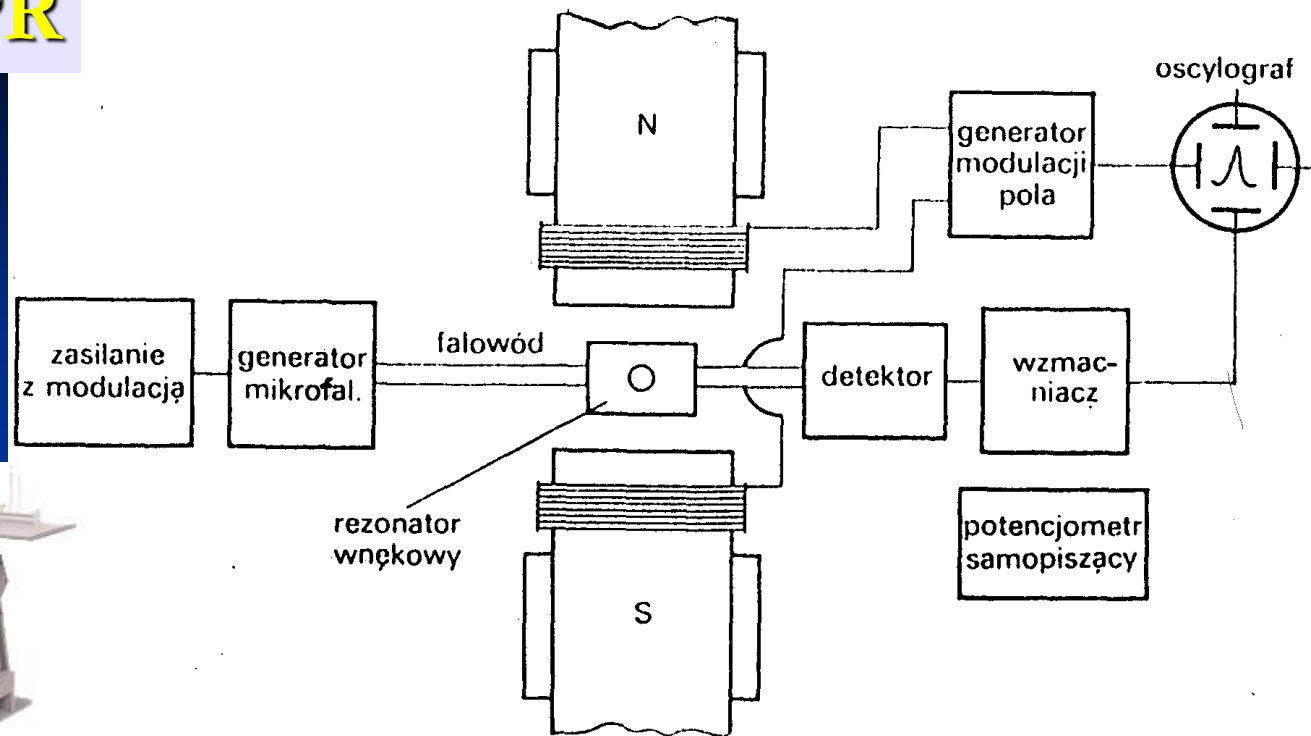
$$\text{Liczba linii} = \prod (2nI + 1)$$



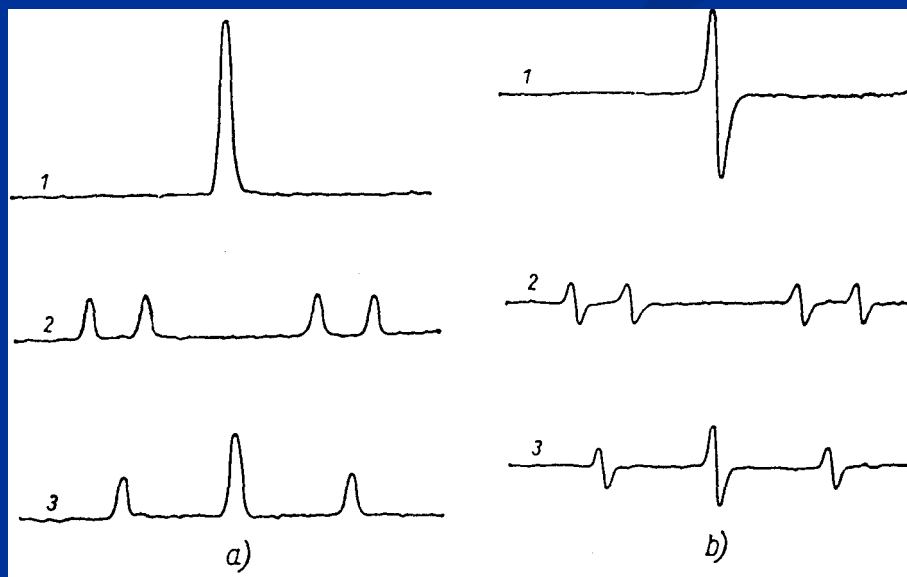
Widma EPR przykładowych rodników

rodnik	nazwa	Widmo EPR
	2,4,6-tri(t-butylo)-fenol	
	glycyloglicina	
	4-Me-2,6-di-(t-butylo) fenol	
	Kwas metylo malonowy	
	L-alanina	
	L-walina	

Spektrometr EPR

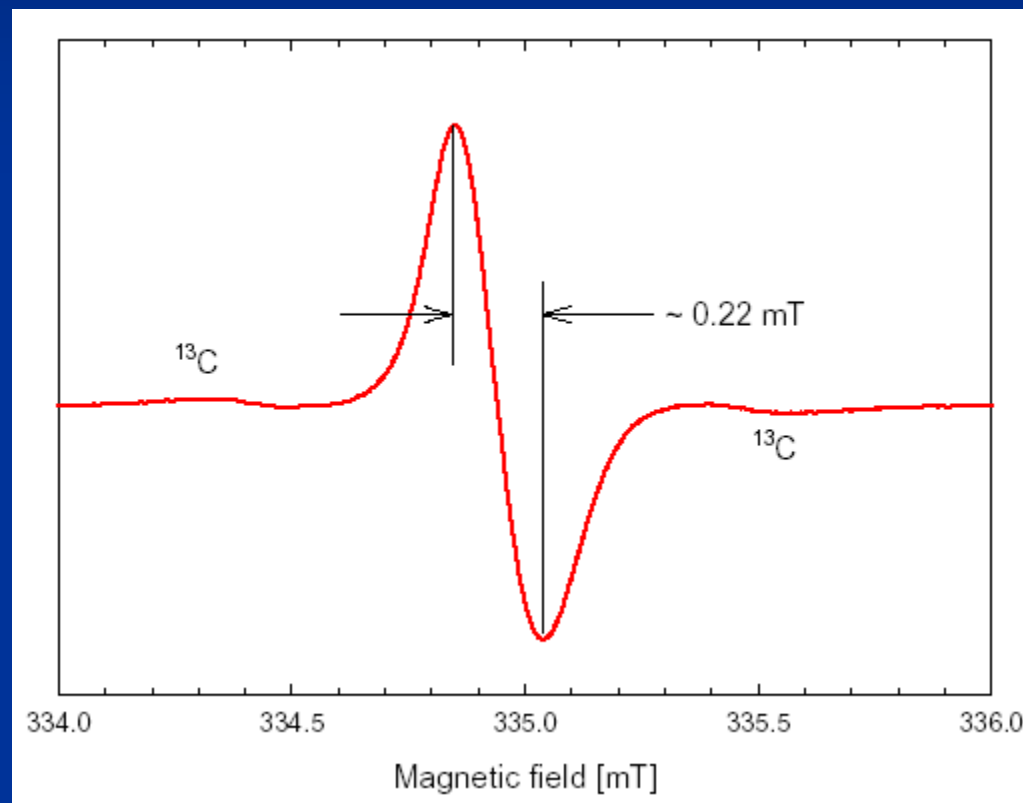
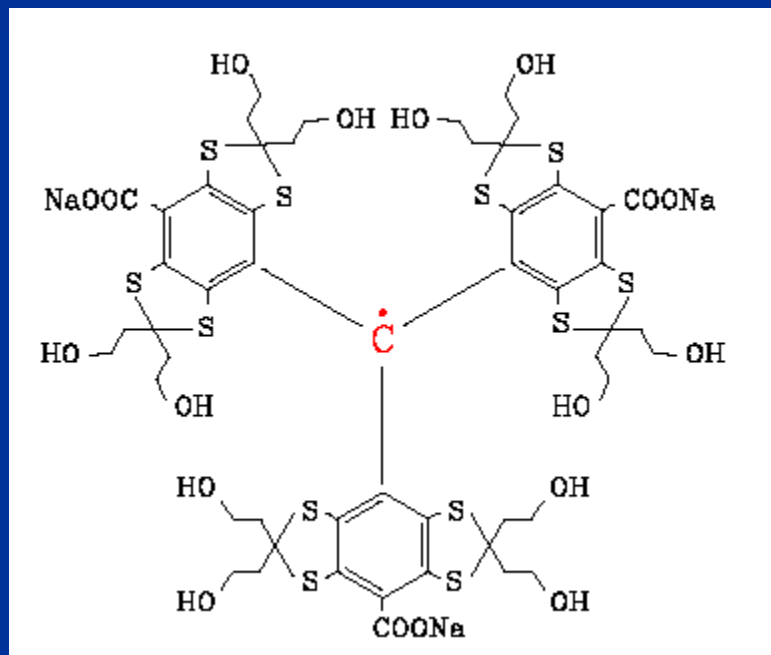
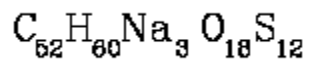


Widma EPR rejestrowane bezpośrednio (a) oraz w postaci pierwszej pochodnej (b).



Marzenie: chemicznie stabilny rodnik z bardzo wąską linią EPR

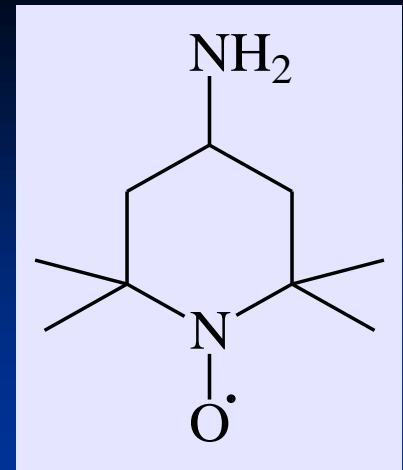
Rodnik trytylowy



Techniki pomiarowe EPR

Spin labels (znakowanie spinowe)

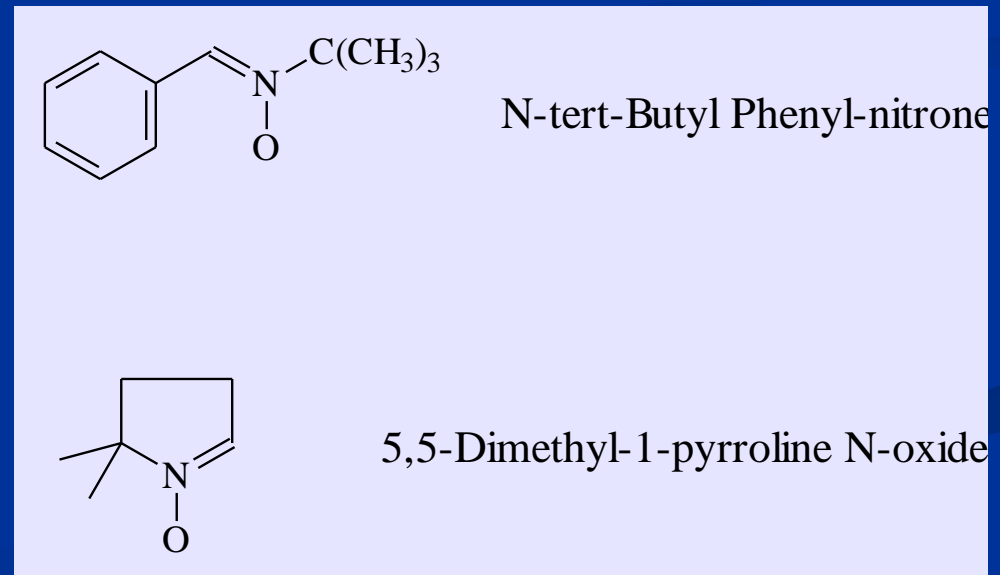
Jeśli związek nie ma niesparowanych elektronów nie jest widoczny w EPR. Jeśli jednak w wyniku reakcji połączony zostanie z innym związkiem, który posiada niesparowany elektron, może być oznaczany metodą EPR.



Przykład markera EPR

Spin traps (pułapki spinowe)

Jeśli związek ma co prawda niesparowany elektron, lecz czas życia jest na tyle krótki, że nie może zostać zarejestrowany sygnał w EPR, to można „uchwycić” ten rodnik za pomocą innego związku chemicznego przedłużając jego czas życia i oznaczać metodą EPR. Przykładowo nie można bezpośrednio oznaczyć poniższego rodnika:



5,5-Dimethyl-1-pyrroline N-oxide



Przykład pułapek EPR

Implikacje biochemiczne i medyczne

Przykłady zastosowań EPR

Pomiary EPR

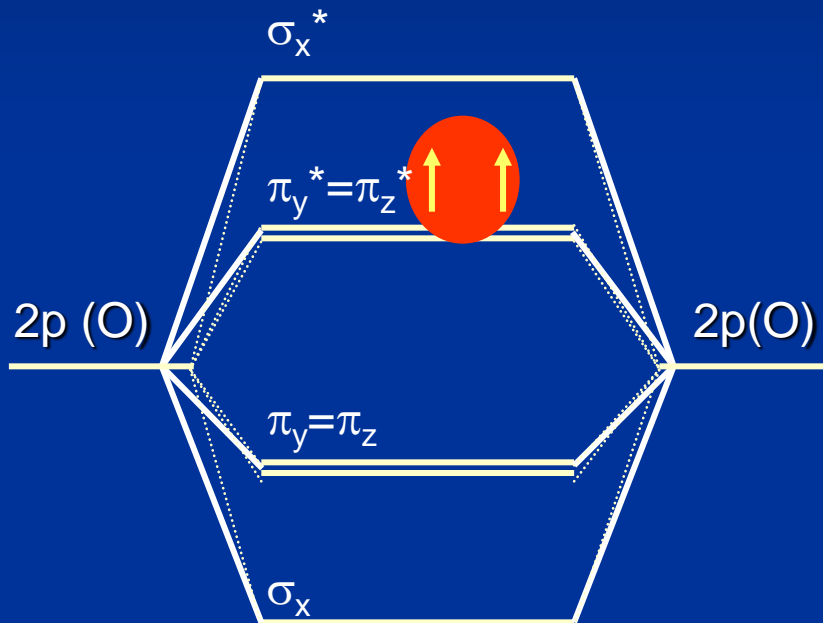
Możliwa jest detekcja (analiza jakościowa) oraz pomiar (analiza ilościowa) puli wolnych rodników oraz substancji o właściwościach paramagnetycznych

- Wysoka czułość (w nanomolach)
- Brak tła (szumów)
- Ilościowa i technicznie zaawansowana
- Umożliwia oznaczanie bezpośrednio (rodniki) oraz pośrednio (procesy chemiczne)
- Możliwość obserwacji żywych organizmów i tkanek:

Częstotliwość	~300 MHz	~750 MHz	1-2 GHz	~3 GHz	9-10 GHz
Głębokość penetracji	> 10 cm	6-8 cm	1-1.5 cm	1-3 mm	1 mm
Obiekt	mysz, szczur	mysz	mysz, szczur, organy (serce)	Skóra, ogon	in vitro (~100 uL.)

Uwaga: próbki biologiczne zawierają wodę są zazwyczaj dielektryczne
Konwencjonalny spektrometr EPR wykorzystuje pole (9-10 GHz), które nagrzewa próbkę (oraz ma złą penetrację) – częstotliwość musi więc ulec zmniejszeniu.

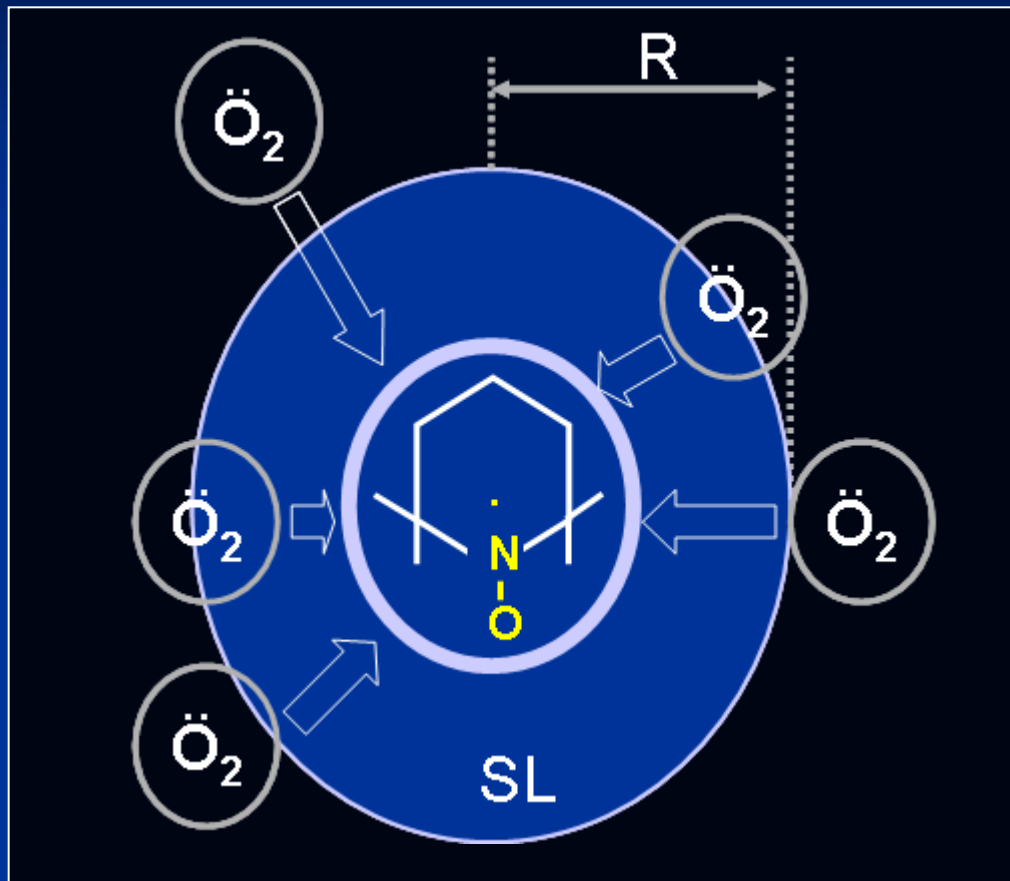
Cząsteczka tlenu jest paramagnetykiem



Tlen cząsteczkowy ma dwa niesparowane elektrony – jest silnym paramagnetykiem

- Tlen w fazie gazowej daje wyraźne sygnały w EPR
- Jednak po rozpuszczeniu jest w zasadzie niewykrywalny (sygnały zbyt rozmyte)
- Mimo wszystko możliwe jest wykorzystanie EPR do pomiarów ilościowych – metoda **spin-label EPR oximetry**
- Wykorzystuje się oddziaływanie tlen cząsteczkowego ze związkami paramagnetycznymi – tzw. sondami oksymetrycznymi

Podstawy oksymetrii EPR

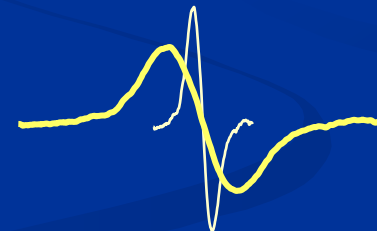


Kolizja pomiędzy sondą oksymetryczną a tlenem cząsteczkowym prowadzi do wymiany spinów

W badaniach ilościowych wykorzystuje się oddziaływanie tlenu z sondami oksymetrycznymi: Ftalocyjanian litu (LiPc)

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

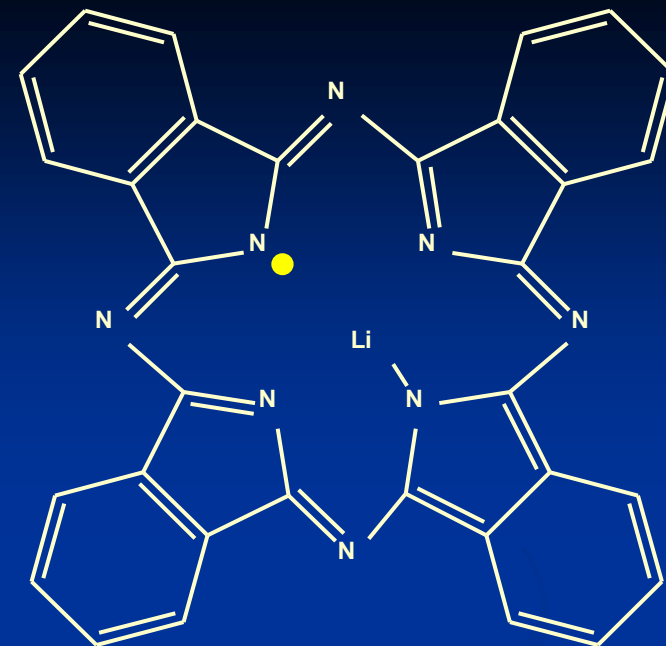
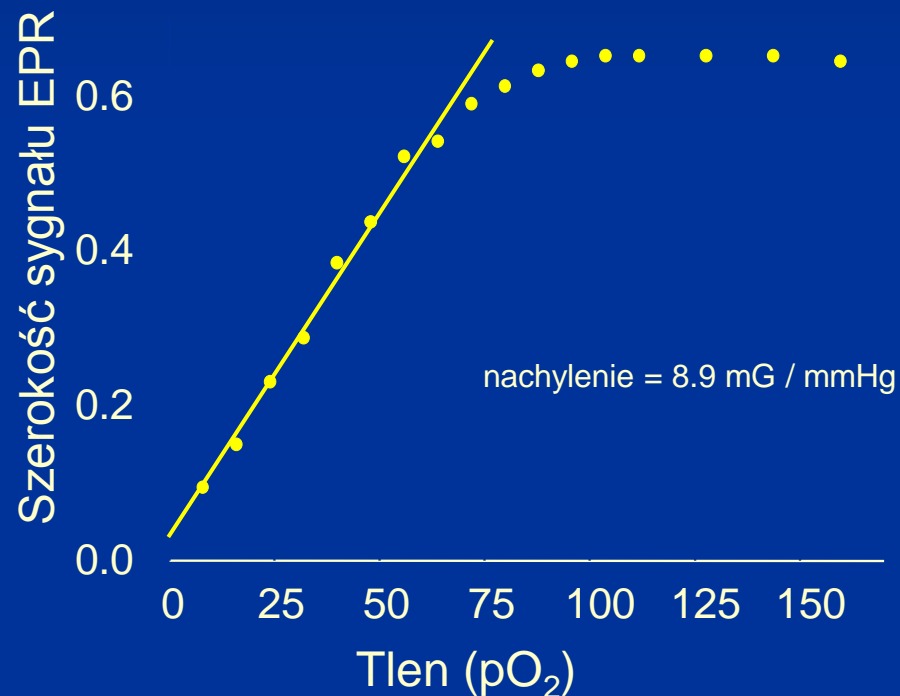
$$\Delta\omega = k D_{O_2} [O_2]$$



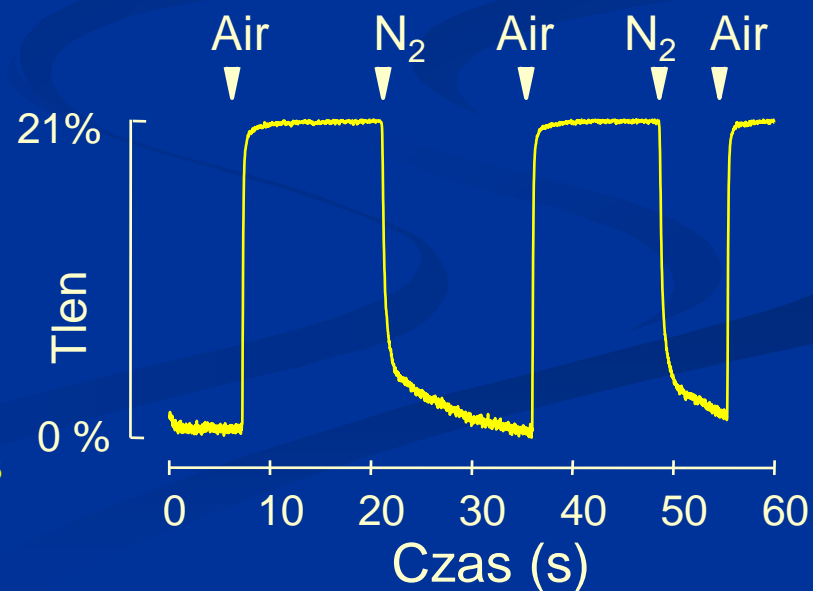
LiPc Ftalocyjanian litu

Sonda oksymetryczna EPR

Odpowiedź na tlen

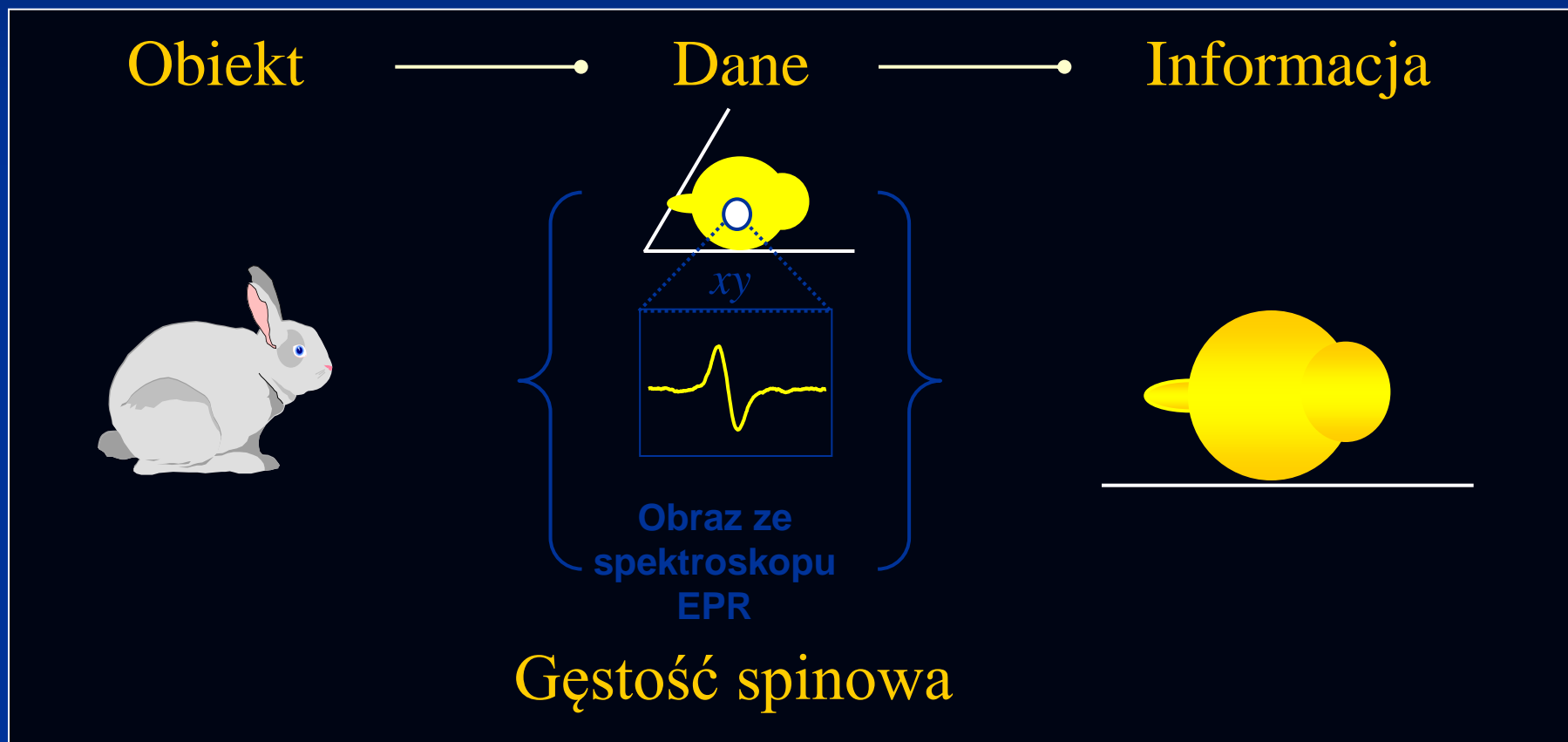


Czas odpowiedzi tlenu



Ilangovan, G., Li, H., Zweier, J.L., Kuppusamy, P.
J. Phys. Chem. B 104, 4047 (2000); 104, 9404 (2000); 105, 5323 (2001)

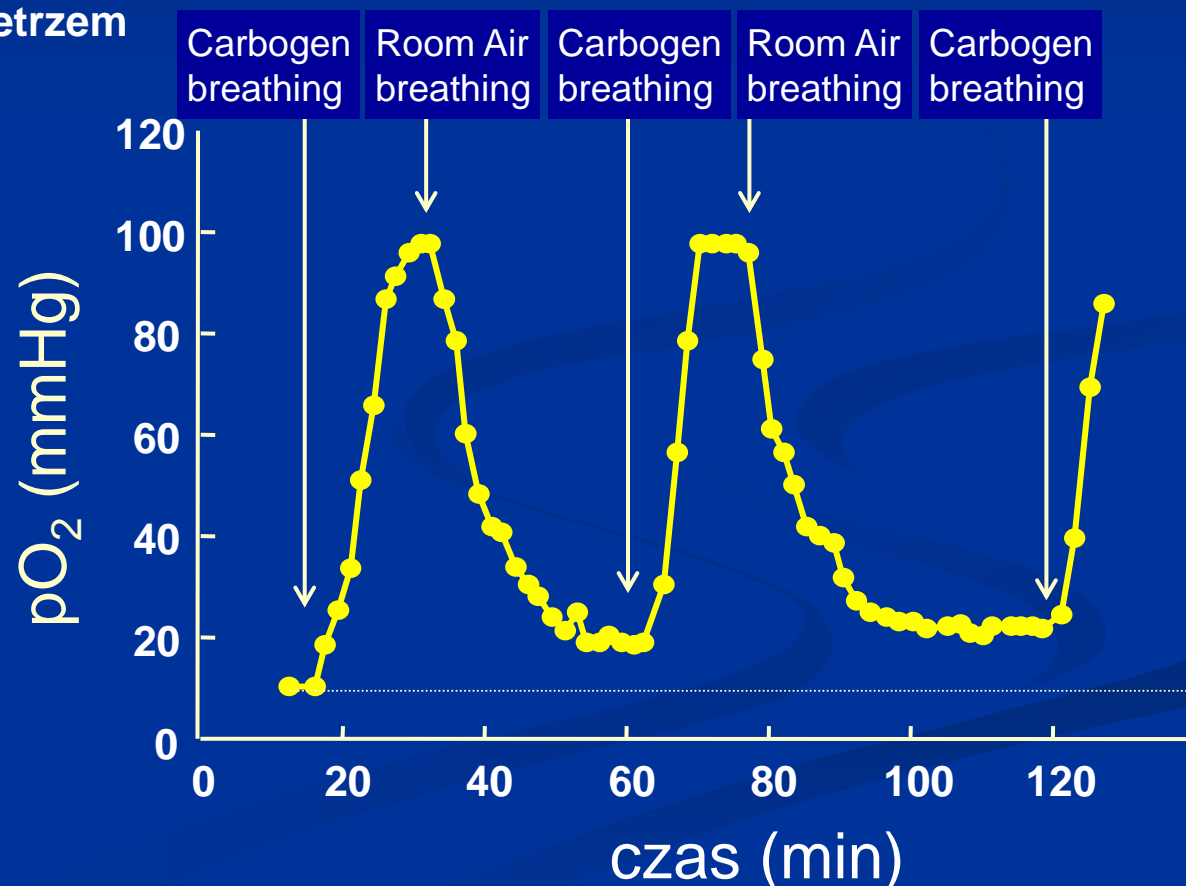
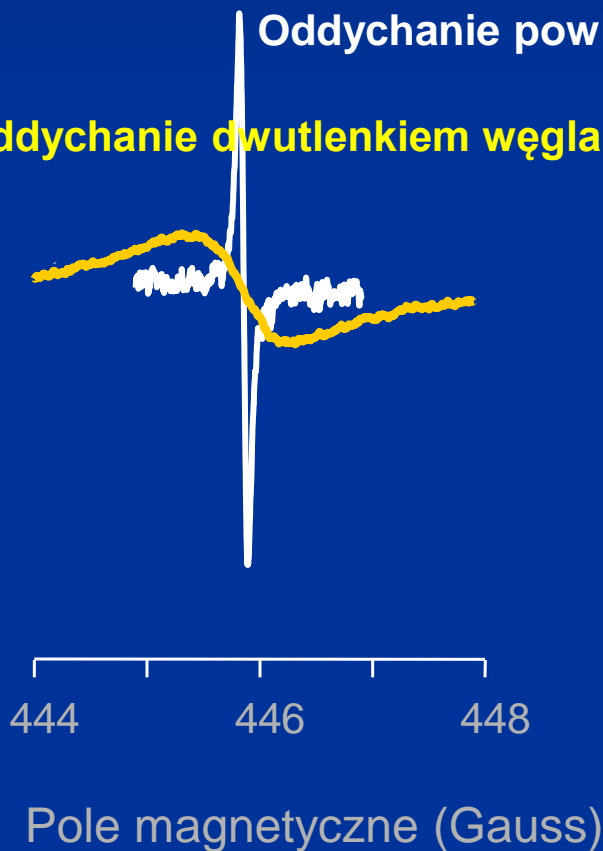
Mapowanie tlenu



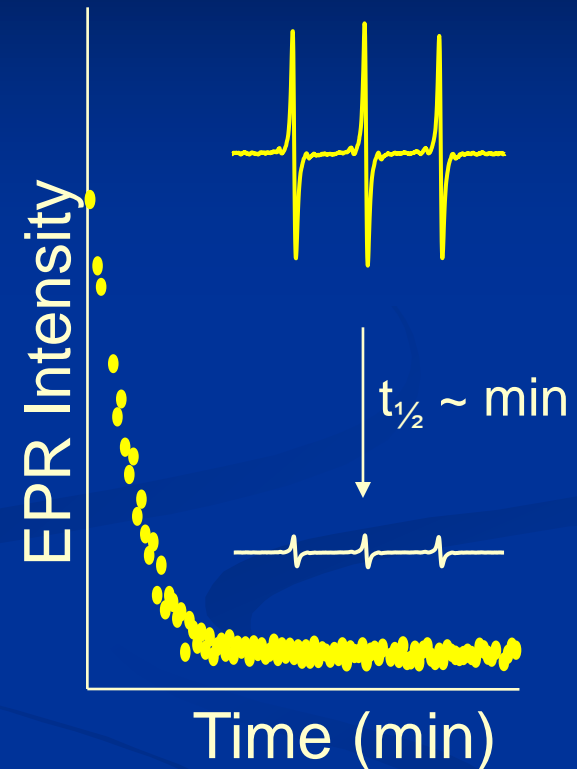
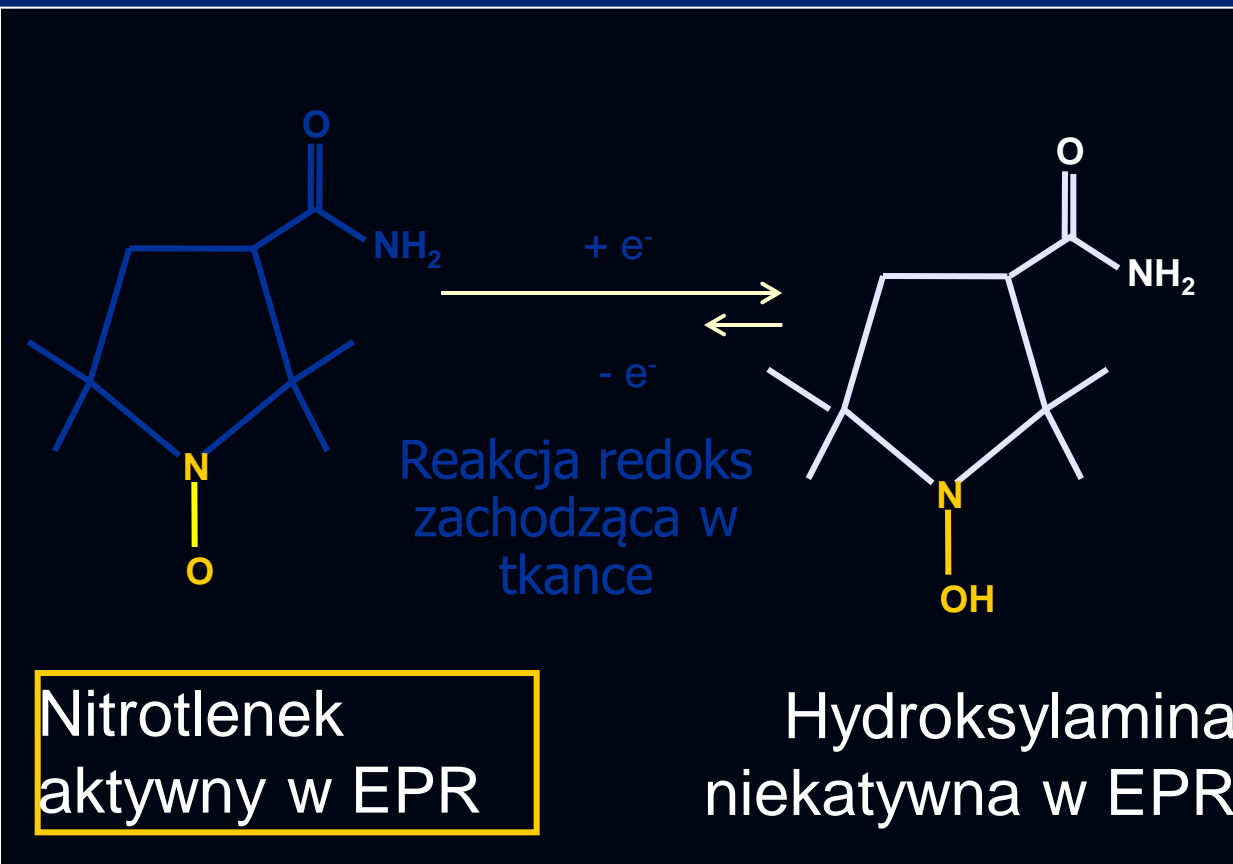
Stopień utlenowienia nowotworu (oddychanie węglowe)

Oddychanie powietrzem

Oddychanie dwutlenkiem węgla



Nitrotlenki – sondy stanu redukcyjnego



Swartz et al, Free Radic. Res. Commun., 9, 399-405 (1990)

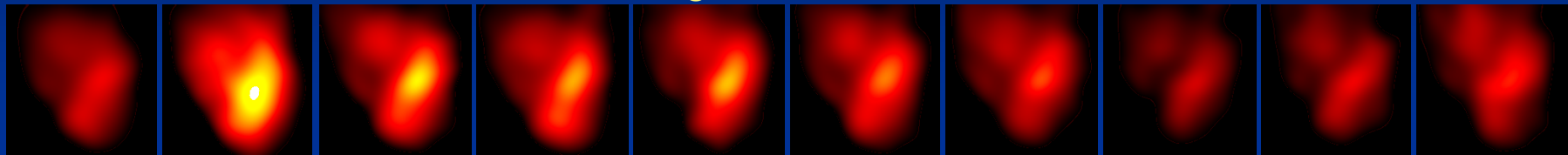
Kuppusamy et al, Cancer Research, 58, 1562-1568 (1998)

Krishna et al, Breast Disease, 10, 209-220 (1998)

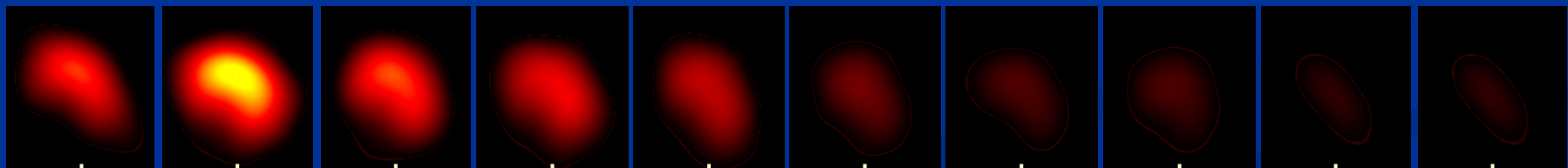
Stan redukcyjne w tkankach zdrowych i nowotworowych



TKANKA NORMALNA – lewa noga



TKANKA NOWOTWOROWA – prawa noga



3.0 4.5 6.0 7.5 9.0 10.5 12.0 13.5 15.0 16.5

Czas (min)

Intensywność -->

C3H mice with RIF-1 tumor; ~30 g bw; dose: 100 mg/kg, iv; Measured *in vivo* using surface resonator at L-band (1.25 GHz); Images: 10x10 mm²

PODSUMOWANIE

1. Spektroskopia EPR jest technika umożliwiającą bezpośrednią detekcję oraz oznaczanie wolnych rodników oraz substancji paramagentycznych
2. EPR o niskiej częstotliwości umożliwia oznaczanie wolnych rodników (endogennych/egzogennych) w układach biologicznych włączając tkanki, izolowane organu, czy organizmy żywe
3. Spektroskopia EPR *in vivo* wraz technikami obrazowania umożliwiają nieinwazyjne pomiary i mapowanie tkanek pod kątem pO_2 , stratusu redukującego, pH.