

Казанский (Приволжский) федеральный университет  
Институт физики

**ПРИМЕНЕНИЕ СТАЦИОНАРНОГО ЭПР:  
ИЗМЕРЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ПАРАМАГНИТНЫХ  
ПРИМЕСЕЙ**

Учебно-методическое пособие

Казань 2023

УДК 537.635, 577.334  
ББК 22, 28

*Печатается по решению Редакционно-издательского совета  
ФГАОУВПО  
«Казанский (Приволжский) федеральный университет»  
методической комиссии Института Физики  
Протокол № 7 от 20 марта 2023 г.  
заседания кафедры квантовой электроники и радиоспектроскопии  
протокол № 7 от 02 февраля 2023 г.*

Председатель комиссии О.В. Недопекин

Авторы:

к.ф.-м.н., доцент Г.В. Мамин  
ассистент Д.В. Шуртакова  
к.ф.-м.н., зав. каф. Р.В. Юсупов  
к.ф.-м.н., ст. преп. А.В. Дуглав  
д.ф.-м.н., проф. Гафуров М.Р.

Рецензент:

д.х.н., в.н.с. Кадиров М.К.

Аннотация:

Учебное пособие содержит теоретический и практический материал, касающийся методик измерения концентрации парамагнитных центров с помощью методов электронного парамагнитного резонанса. Рассмотрена методика прямого измерения, методика сравнением с калиброванным образцом, а также наиболее часто встречающиеся примеры их практического применения. Учебно-методическое пособие адресовано, прежде всего, магистрам специальностей 03.04.03 «Физика магнитных явлений», 03.04.02 «Медицинская физика», как теоретическое введение к выполнению лабораторных работ

## СОДЕРЖАНИЕ

Введение	4
1 Устройство ЭПР спектрометра	5
2 Определения концентраций парамагнитных примесей с помощью метода стационарного ЭПР	7
2.1. Влияние положения и размера образца на точность измерений количества парамагнитных центров	13
2.2. Определение интегральной интенсивности линии ЭПР, записанной на спектрометре с двойной модуляцией магнитного поля.	14
2.3. Применение ЭПР для определения концентраций парамагнитных примесей в твердых телах	20
2.4. Применение ЭПР для определения концентраций парамагнитных примесей в растворах	21
3 Применение ЭПР для определения степени вхождения парамагнитных ионов в кристаллы и стекла	25
4 Применение ЭПР для определения поглощенных доз внешнего гамма-излучения по зубной эмали	28
5 Применение ЭПР для определения выработки супероксид аниона $O_2^-$ , гидроксил аниона $OH^-$ и $NO$ радикала.	32
5.1. Циклические нитронные ловушки	32
5.2. Ациклические нитронные спиновые ловушки	33
5.3. Циклический гидроксиламин	33
5.4. Нитрозильные спиновые ловушки	34
5.5. Спиновые ловушки на основе ДЭТК или ДТКс	35
5.6. Пробоподготовка при измерениях со спиновыми ловушками	37
6 Задания для выполнения	39
Используемая литература	41

## ВВЕДЕНИЕ

Метод электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) является мощным методом исследования веществ, содержащих парамагнитные примеси. Спектрометры ЭПР выпускаются промышленностью в большом ассортименте и их можно условно разделить на группу научных спектрометров и группу лабораторных спектрометров. Лабораторные спектрометры обычно позволяют работать только в стационарном режиме с двойной модуляцией магнитного поля и предназначены для измерения серий однотипных образцов. Для таких измерений не требуется глубокое знание фундаментальных основ теории магнитного резонанса, поскольку используются простые методики, позволяющие извлечь легко измеряемые параметры спектра ЭПР. Одним из таких параметров служит интегральная интенсивность линии ЭПР, так как считается, что она прямо пропорциональна количеству парамагнитных центров (ПЦ) в образце [1, 2]. Из количества ПЦ можно определить концентрацию парамагнитной примеси, а такая величина является крайне важной для характеристики и изучения ряда физических, химических и биологических систем и процессов. Высокая чувствительность спектрометров ЭПР позволяет определить крайне малые концентрации, вплоть до  $10^9$  спинов на 1 миллиграмм образца ( $10^{-11}$  моль/грамм). В учебно-методическом пособии рассматриваются как теоретические основы измерений концентрации ПЦ методами ЭПР, так и чисто практические, как интегрирование производной от сигнала поглощения с ненулевой базовой линией, способы повышения точности измерений. Приведены практические примеры определения концентрации ПЦ.

# 1 УСТРОЙСТВО ЭПР СПЕКТРОМЕТРА

Стандартный спектрометр ЭПР состоит из блоков, показанных на рисунке 1.1.

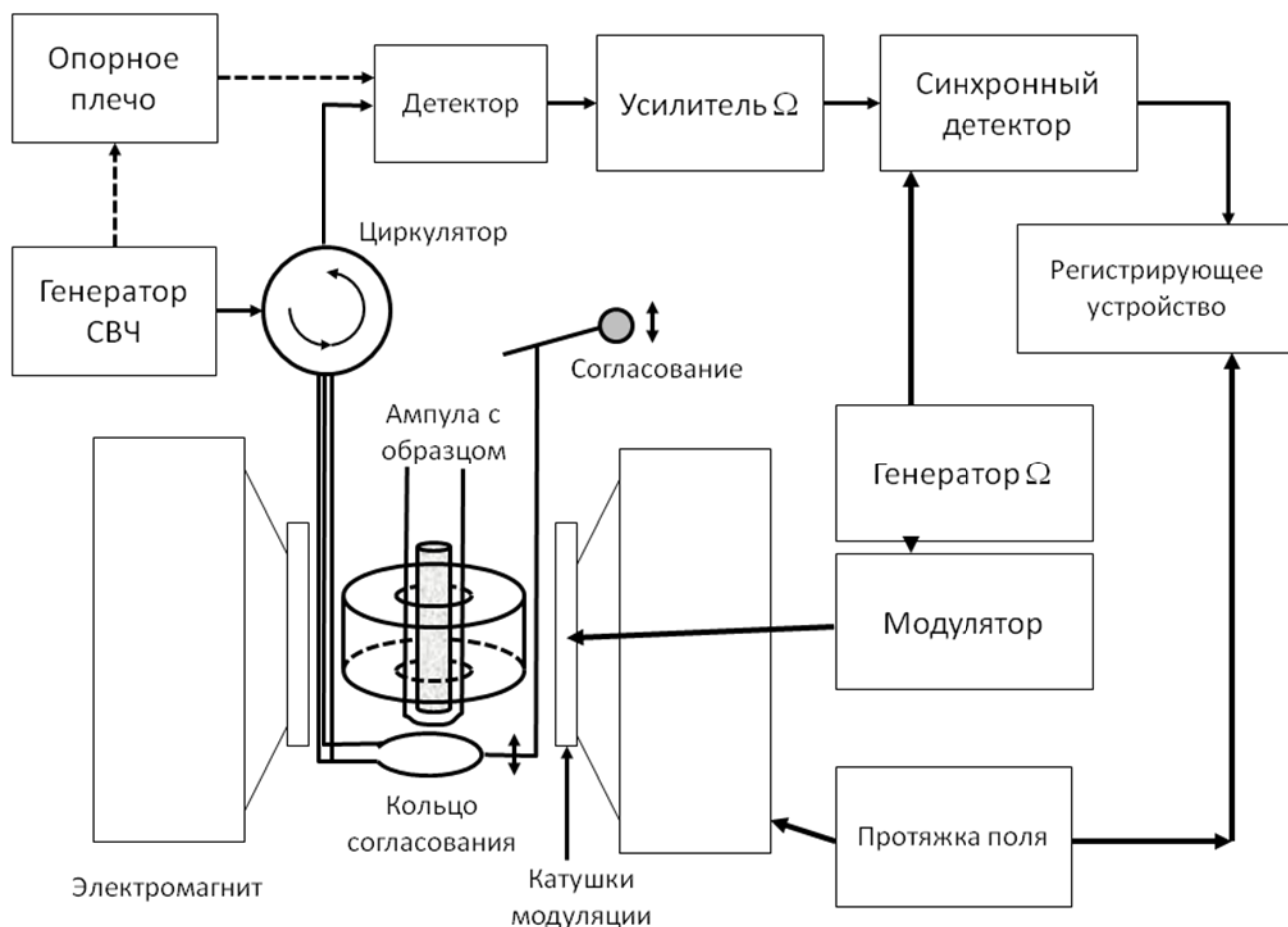


Рис. 1. Блок-схема спектрометра с двойной модуляцией магнитного поля

Спектр ЭПР записывается при изменении внешнего магнитного поля на образце электромагнитом при неизменной частоте микроволнового генератора (генератора СВЧ – сверхвысокой частоты). Благодаря изменению магнитного поля в дополнительных катушках (вторая модуляция магнитного поля) удается улучшить отношение сигнал/шум прибора в десятки тысяч раз, но спектр ЭПР в этом случае регистрируется в виде первой производной от кривой поглощения. В некоторых спектрометрах можно выключить вторую модуляцию магнитного поля и измерять изменение сигнала поглощения ЭПР непосредственно на детекторе спектрометра. Такой режим называется прямой режим детектирования и обладает меньшей чувствительностью.

Каковы особенности настройки спектрометра для измерения концентрации ПЦ? Во-первых, необходимо следить за отсутствием насыще-

ния линий спектра ЭПР эталонного (опорного) и измеряемого образцов, регулируя аттенюатором мощность, подаваемую на резонатор.

Во-вторых, необходимо следить за постоянной величиной добротности резонатора, при необходимости корректируя ее изменение.

В-третьих, амплитуду модуляции магнитного поля можно выбрать максимально возможной для увеличения чувствительности. На искажения формы линии в этом случае внимания можно не обращать.

В-четвертых, необходимо внимательно следить за отсутствием частичного интегрирования фильтром синхронного детектора при завышенном значении  $\text{time constant}$ . Даже небольшая примесь интеграла к производной кривой поглощения не даст восстановить первообразную.

## 2 ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИЙ ПАРАМАГНИТНЫХ ПРИМЕСЕЙ С ПОМОЩЬЮ МЕТОДА СТАЦИОНАРНОГО ЭПР

Одним из наиболее часто применяемых приложений стационарного ЭПР является измерение количества парамагнитных примесей в веществах. Такое измерение необходимо в биологии, например, при применении спиновых ловушек, для контроля протекающих химических реакций, состава минералов, определения дозы облучения в дозиметрии и т.п. В связи с высокой чувствительностью, метод ЭПР позволяет измерять концентрации парамагнитных примесей порядка  $10^{-9}$  ат. %. С другой стороны, существует ограничение на возможность определения высоких концентраций (порядка 10 ат. %), связанное с уширением линии ЭПР за счет спин-спинового взаимодействия.

Рассмотрим основные особенности определения количества ПЦ. Для начала проанализируем, от каких параметров зависит интенсивность линии поглощения в спектрометре, работающем в прямом режиме детектирования изменения отраженного от резонатора СВЧ-сигнала.

Образец помещается в резонаторе в пучность магнитного поля. Если резонатор представить в виде колебательного контура, то пучность магнитного поля соответствует пространству внутри катушки индуктивности колебательного контура. Катушка выполнена из реального металла, т.е. кроме индуктивности имеет и активное сопротивление. Таким образом, импеданс катушки  $Z = j\omega L_0 + r_0$ . При помещении образца в катушку индуктивность катушки изменяется и становится равной  $L = L_0(1 + 4\pi\chi)$ , где  $\chi = \chi' - j\chi''$  – восприимчивость спиновой системы образца. Импеданс катушки индуктивности становится равным:

$$\begin{aligned} Z_L &= j\omega L_0(1 + 4\pi\chi) + r_0 = j\omega L_0(1 + 4\pi\chi' - j4\pi\chi'') + r_0 = \\ &= j\omega L_0 + j\omega L_0 4\pi\chi' + \omega L_0 4\pi\chi'' + r_0 = j\omega(L_0 + \Delta L_0) + \Delta r_0 + r_0 \end{aligned}$$

При протяжке постоянного магнитного поля через резонансное значение изменяется индуктивность катушки на величину  $\Delta L_0$  и ее активное сопротивление на величину  $\Delta r_0$ . Изменение индуктивности приводит к изменению резонансной частоты резонатора, но система АПЧ (автоматической подстройки частоты) спектрометра поддерживает частоту СВЧ-генератора спектрометра всегда равной резонансной частоте резонатора,

так что связанная с  $\Delta L_0$  дисперсия восприимчивости спиновой системы (сигнал дисперсии  $\chi'$ ) не наблюдается. Относительное же изменение со-

противления катушки  $\frac{\Delta r}{r_0} = \frac{4\pi\omega L_0}{r_0} \chi'' = 4\pi Q \chi''$  оказывается пропорцио-

нальным ЭПР-поглощению и добротности резонатора. То же самое происходит с отраженным от резонатора СВЧ-сигналом и напряжением на СВЧ-детекторе: изменение напряжения пропорционально  $\chi''$  и добротности резонатора:  $\Delta U / U = 4\pi Q \chi''$ .

Известно выражение для  $\chi''$ :

$$\chi'' = \frac{C_N g^2 \mu_B^2 S(S+1)}{3k_B T},$$

где  $C_N$  – объемная концентрация парамагнитных центров,  $\mu_B$  – магнетон Бора,  $k_B$  – постоянная Больцмана,  $T$  – температура образца,  $S$  – величина электронного спина парамагнитной примеси.

Однако для катушки или резонатора надо учесть, что образец не полностью заполняет объем катушки или резонатора, а только его часть. Таким образом, если ввести коэффициент заполнения резонатора,  $a$ , как отношение интеграла  $H_1^2$  по объему образца к такому же интегралу по объему резонатора, то средняя по объему восприимчивость будет равна:

$$\chi'' = \frac{C_N g^2 \mu_B^2 S(S+1)}{3k_B T} a.$$

Отсюда следует, что относительное изменение напряжения при резонансе за счет ЭПР-поглощения будет выражаться в виде:

$$\Delta U / U = 4\pi Q_0 \frac{C_N g^2 \mu_B^2 S(S+1)}{3k_B T} a$$

При этом подразумевается, что переменное магнитное поле воздействует на все спины одновременно. Но за счет неоднородного уширения линии ЭПР такое взаимодействие распределено по спектру частот, характеризуемое функцией формы линии  $f(\omega)$ , а вклад в СВЧ-поглощение дают только магнитные моменты, частота которых совпадает с резонансной.

Для всего спектрального диапазона:

$$\Delta U = \int f(\omega) d\omega.$$

В случае формы линии гауссового вида (рисунок 2)



$$f(\omega) = \frac{1}{\delta\sqrt{2\pi}} \exp\left(-\frac{(\omega - \omega_0)^2}{2\delta^2}\right),$$

$$\Delta U = 1.46\Delta\omega A_{line},$$

где  $\Delta\omega$  – ширина линии на полувысоте, а  $A_{line}$  – пиковая амплитуда линии ЭПР.

Для лоренцевой формы (рисунок 2)

$$f(\omega) = \frac{\delta}{\pi} \frac{1}{(\omega - \omega_0)^2 + \delta^2},$$

$$\Delta U = 2\Delta\omega A_{line}.$$

Так, для гауссовой формы линии можно выразить объемную концентрацию как:

$$C_N = 1.46\Delta\omega I \frac{3k_B T}{2\pi a Q_0 g^2 \mu_B^2 S(S+1)\rho}.$$

Переводя частотные единицы в единицы измерения магнитного поля, получим:

$$C_N = 1.46\Delta H \frac{g\mu_B}{h} A_{line} \frac{3k_B T}{2\pi a Q_0 g^2 \mu_B^2 S(S+1)\rho}.$$

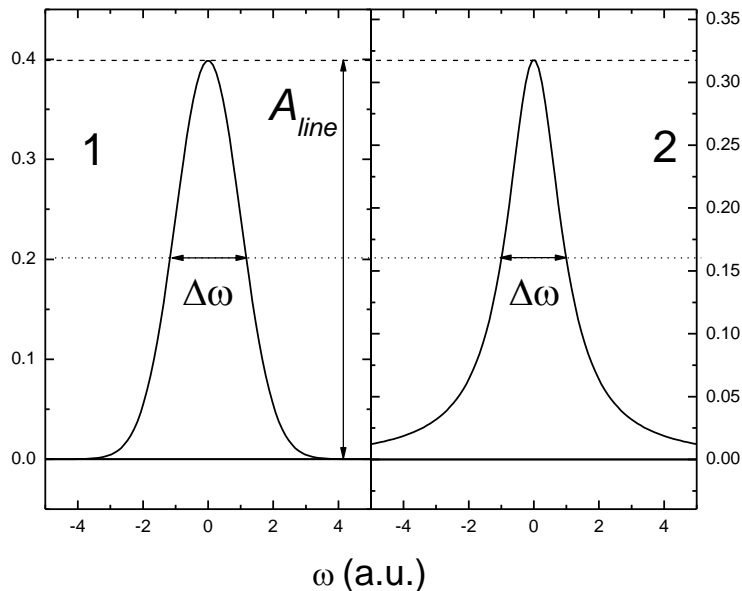


Рис. 2. Форма линии ЭПР. 1. Гауссовая форма линии. 2. Лоренцевая форма линии. В расчетах использовалось положение линии  $\omega_0 = 0$  и  $\Delta\omega = 1$ . Площадь под обеими кривыми равна единице

И после сокращений получим:

$$C_N = 1.46 \Delta H A_{line} \frac{3k_B T}{2\pi h a Q_0 g \mu_B S(S+1)\rho} = 1.56 \cdot 10^{29} \Delta H A_{line} \frac{T}{a Q_0 g S(S+1)\rho},$$

где  $\Delta H$  выражено в гауссах,  $T$  в кельвинах, а  $A_{line}$  и  $\rho$  в вольтах.

Если объем образца, и, следовательно, коэффициент заполнения не известен, то можно определить только количество ПЦ в образце.

$$N = 1.46 \Delta H A_{line} \frac{3k_B T V}{2\pi h Q_0 g \mu_B S(S+1)\rho} = 1.56 \cdot 10^{29} \Delta H A_{line} \frac{T V}{Q_0 g S(S+1)\rho},$$

где  $V$  – объем резонатора.

Таким образом, измерив интенсивность линии  $A_{line}$ , можно определить объемную концентрацию парамагнитных центров в образце. Рассмотрим требования к спектрометру ЭПР для измерения количества парамагнитных центров:

1. В спектрометре должен быть реализован режим прямого детектирования, без второй модуляции магнитного поля.
2. Для измерения интенсивности сигнала ЭПР при любой форме линии ЭПР необходимо уметь выполнять интегрирование  $\Delta U = \int f(\omega) d\omega$  для получения площади линии.
3. Коэффициент заполнения резонатора  $a$  зависит от объема образца. Следовательно, требуется знание объема образца, измерение которого для ряда образцов является нетривиальной задачей.
4. Спектрометр ЭПР должен позволять измерять добротность резонатора  $Q$ , так как возможное нерезонансное диэлектрическое поглощение разных образцов ухудшает добротность.
5. Мощность СВЧ-генератора должна поддерживаться строго заданной во время всего процесса измерения концентрации методами ЭПР.
6. Температура образца должна быть известна (измеряться или в программе расчета должно быть окно ввода для значения температуры). Необходимо отметить, что СВЧ-излучение может вызывать дополнительный нагрев материалов.
7. Должна быть возможность измерения g-фактора, хотя бы примерно.
8. Спин парамагнитной примеси должен учитываться при расчетах. К примеру, если настройки спектрометра были проведены для  $S=1/2$ , то в расчетах концентрации ионов  $Mn^{2+}$  без учета электронного спина марганца  $S=5/2$  возникнет 9-кратная ошибка.

В современном спектрометре ЭПР, с большой долей цифрового управления, пункты 1-8 достаточно просто реализовать, поэтому во многих спектрометрах встроены средства измерения количества парамагнитных центров в образце. К сожалению, режим прямого детектирования сигнала ЭПР (пункт 1), несмотря на простую аппаратную реализацию, приводит к существенному ухудшению чувствительности спектрометра.

Рассмотрим, что изменится в случае использования для измерений спектрометра ЭПР с двойной модуляцией магнитного поля, который обладает существенно большей чувствительностью, чем спектрометр прямого детектирования. Во-первых, форма линии записывается в виде производной от сигнала поглощения. Для получения значения интенсивности – площади под линией поглощения – необходимо провести двухкратное интегрирование. Во-вторых, интегральная интенсивность линии ЭПР будет прямо пропорционально зависеть от амплитуды модуляции магнитного поля. Значит, необходима калибровка модулирующей системы, с последующим учетом реальной амплитуды модуляции при расчетах. Поэтому формула для определения количества ПЦ принимает следующий вид:

$$N = K \int \left[ \int f_{2\text{mod}}(H) dH \right] dH \frac{T}{M \sqrt{P} Q_0 g S (S + 1)},$$

где  $M$  – амплитуда модуляции,  $P$  – мощность СВЧ, падающая на резонатор. Коэффициент  $K$  теперь включает не только физические постоянные, но и содержит аппаратные характеристики: объем резонатора, коэффициенты потерь в СВЧ тракте, распределение магнитного поля в резонаторе. Поэтому, стандартно, его определяют эмпирически, измеряя площадь линии образца с известным количеством парамагнитных центров. Следует отметить, что коэффициент  $K$  в этом случае вычисляется только для данного резонатора, в случае замены резонатора или применения нестандартных ампул для образцов, меняющих картину силовых линий магнитной компоненты поля СВЧ в резонаторе, определение коэффициента  $K$  следует проводить заново.

В случае, если для ЭПР спектрометра тяжело реализовать точное выполнение вышеперечисленных пунктов 2-8, то используют прямое сравнение количества парамагнитных центров в измеряемом образце с известным количеством в опорном образце. Стандартно, при таком измерении стараются выбирать одинаковые для измеряемого и опорного образцов параметры настройки спектрометра, такие как СВЧ мощность и амплитуда модуляции магнитного поля. В этом случае измерения

$\Delta U = \int f(\omega) d\omega$  проводят два раза, один раз измеряют опорный образец, получая  $\Delta U_1$ , второй раз измеряется образец, в котором нужно определить количество парамагнитных центров, находя  $\Delta U_2$ . Если в опорном образце количество парамагнитных центров  $N_1$ , то искомое количество центров выражается как:

$$N_2 = N_1 \frac{\Delta U_2 g_1 S_1 (S_1 + 1)}{\Delta U_1 g_2 S_2 (S_2 + 1)}.$$

В зависимости от типа образцов есть разные методики реализации этого метода, рассмотрим их в порядке точности определения количества парамагнитных примесей.

В простейшем случае сначала в резонатор помещается измеряемый образец, производится настройка спектрометра и записывается спектр ЭПР образца. Затем образец заменяется на опорный и записывается спектр опорного образца. Исходя из отношения площадей линий, вычисляется количество парамагнитных примесей в образце. В этом случае основными проблемами для точности определения количества парамагнитных примесей будет являться изменение добротности резонатора.

В более сложном случае исследуемый и опорный образец помещаются в одну ампулу, как можно ближе друг к другу. Таким образом, достигается полное совпадение параметров записи для опорного и исследуемого образца, но накладывается требование на форму спектра опорного образца. Его линии не должны перекрываться со спектром ЭПР исследуемого образца. Такую пару могут составить, например, образец керамики MgO с примесью ионов  $Mn^{2+}$  и образец, содержащий стабильные свободные радикалы.

В третьем варианте используется специальный резонатор TE<sub>104</sub> (рисунки 3-4) с двумя отдельными модуляционными катушками. В этом случае исследуемый и опорный образец помещают в разные части резонатора. Параметры записи, такие как добротность и амплитуда модуляции, по-прежнему одинаковы для обоих образцов. После чего включают только первую модуляционную катушку, записывают, к примеру, спектр исследуемого образца. Затем выключают первую и включают вторую модуляционную катушку, записывая спектр ЭПР опорного образца. Такой способ измерения концентрации наиболее точен и не требует подбора специальных пар образцов.

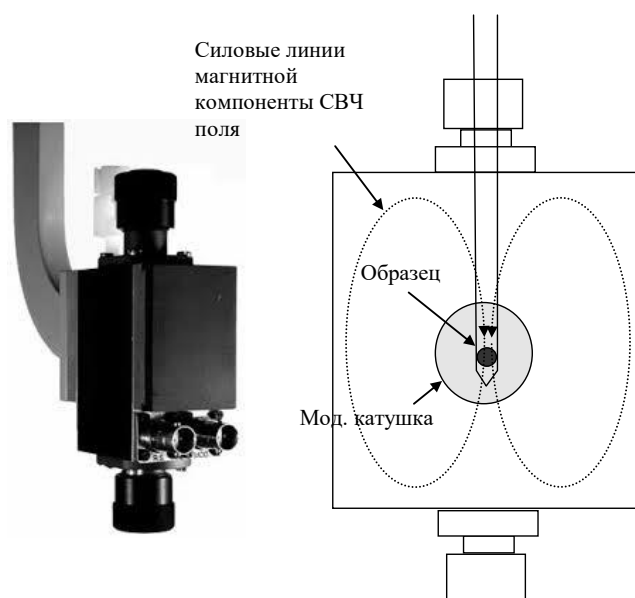


Рис. 3. Вид резонатора  $TE_{102}$  и его схематическое изображение

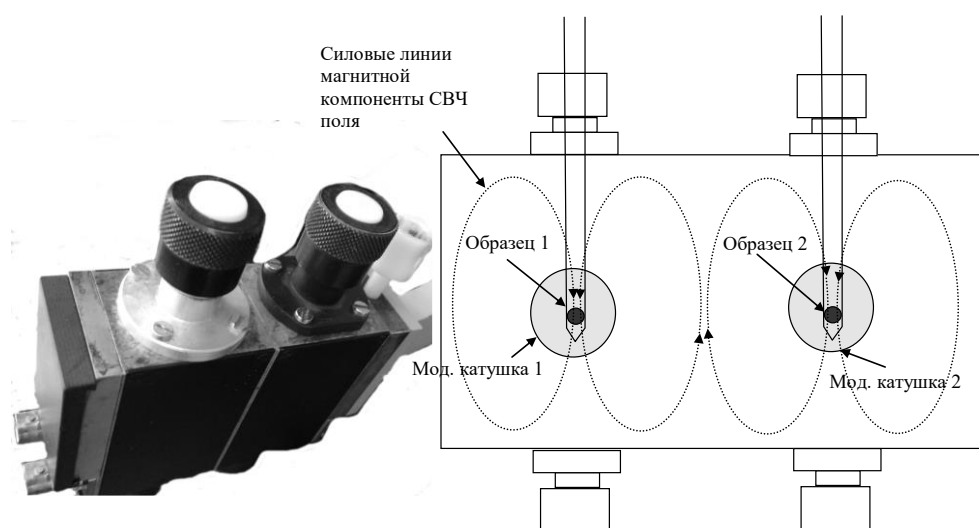


Рис. 4. Вид резонатора  $TE_{104}$  и его схематическое изображение

Теперь перейдем к рассмотрению влияния различных параметров, снижающих точность определения количества ПЦ.

### **2.1. Влияние положения и размера образца на точность измерений количества парамагнитных центров**

Рассмотрим, какие геометрические параметры резонатора образца влияют на интегральную интенсивность линии ЭПР и, следовательно, на точность определения количества парамагнитных центров. Как можно увидеть из рисунка 3, плотность силовых линий магнитной компоненты СВЧ поля в резонаторе максимальна в центре резонатора и ослабевает по мере удаления от центра. В связи с тем, что диаметр образца обычно сильно ограничен диаметром ампулы, в которую он помещается, рассмот-

рим изменения только вдоль оси ампулы. Переменное магнитное поле, создаваемое модуляционной катушкой, тоже убывает по мере удаления от центра резонатора. Характер влияния двух этих факторов можно измерить, используя геометрически малый образец (рисунок 5). Из рисунков 3-5 видно, что, несмотря на то, что высота объемного резонатора примерно 3 см, образец (для достижения точности не хуже 10%) следует размещать в зоне высотой всего 1.8 см. Для диэлектрического резонатора высота такой зоны составляет всего 5 мм.

Таким образом, для измерений необходимо использовать образец высотой, не превышающей высоту указанной зоны резонатора, и размещать его точно в центре.

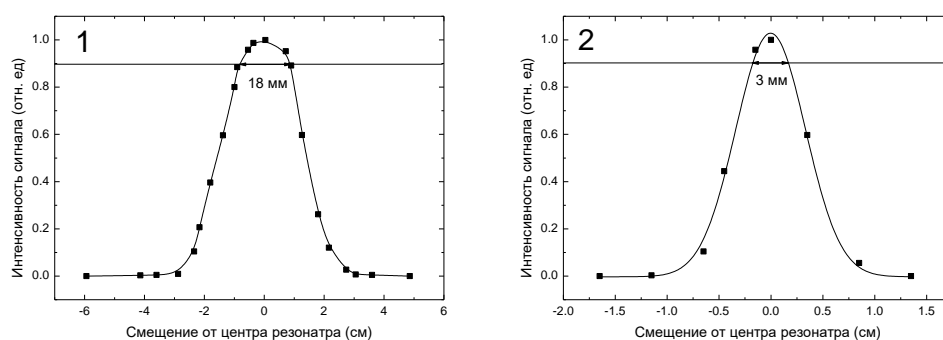


Рис. 5. Зависимость интенсивности сигнала образца карбонизата размером 100 мкм от положения в резонаторе. 1. Прямоугольный резонатор ER 4012ST (мода колебаний TE<sub>102</sub>). 2. Диэлектрический резонатор MD4

## 2.2. *Определение интегральной интенсивности линии ЭПР, записанной на спектрометре с двойной модуляцией магнитного поля*

В спектрометрах с двойной модуляцией записывается первая производная сигнала поглощения. Для вычисления интегральной интенсивности полученный спектр необходимо подвергнуть двухкратному интегрированию: сначала получить линию спектра поглощения (рисунок 6), затем величину площади под этой линией. Однако зачастую при первом интегрировании линия спектра поглощения получается неправильной формы. Рассмотрим, какие аппаратные эффекты искажают интеграл от производной линии поглощения ЭПР.

Во-первых, неточная настройка нуля аналого-цифрового преобразователя (АЦП) или смещение на постоянный уровень  $C_0$  на выходе синхронного детектора. При интегрировании константы  $C_0$  возникает дополнительная зависимость  $C_0(B_0 - B_{\min})$ , показанная на рисунке 7.  $B_{\min}$  – зна-

чение индукции магнитного поля для первой точки спектра при интегрировании, при условии, что интегрирование происходит с меньших полей.

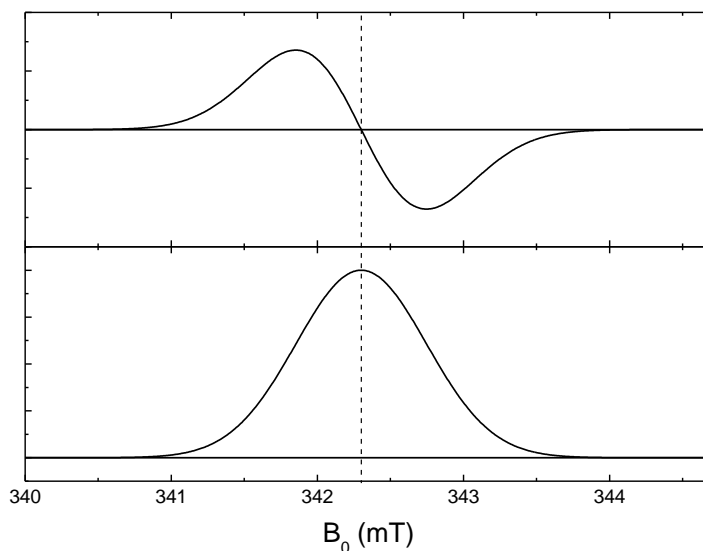


Рис. 6. Интегрирование спектра ЭПР, записанного на спектрометре с двойной модуляцией магнитного поля. Сверху исходный спектр, снизу интеграл

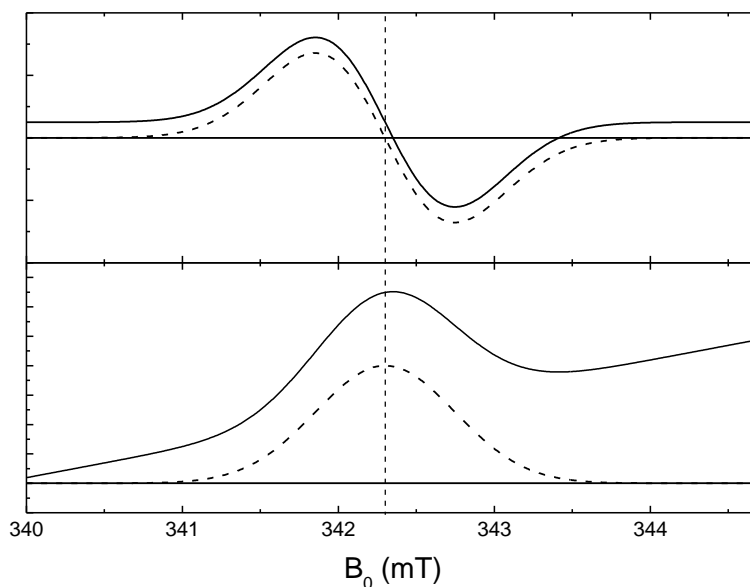


Рис. 7. Интегрирование спектра ЭПР, записанного на спектрометре с двойной модуляцией магнитного поля при наличии постоянного уровня. Сверху исходный спектр, снизу интеграл. Пунктиром показана форма спектра без искажений

Во-вторых, катушки второй модуляции в магните спектрометра по устройству подобны динамике, поэтому вторая модуляция вызывает механические колебания в устройстве согласования спектрометра. Амплитуда этих колебаний пропорциональна магнитному полю  $B_0$ , а сами

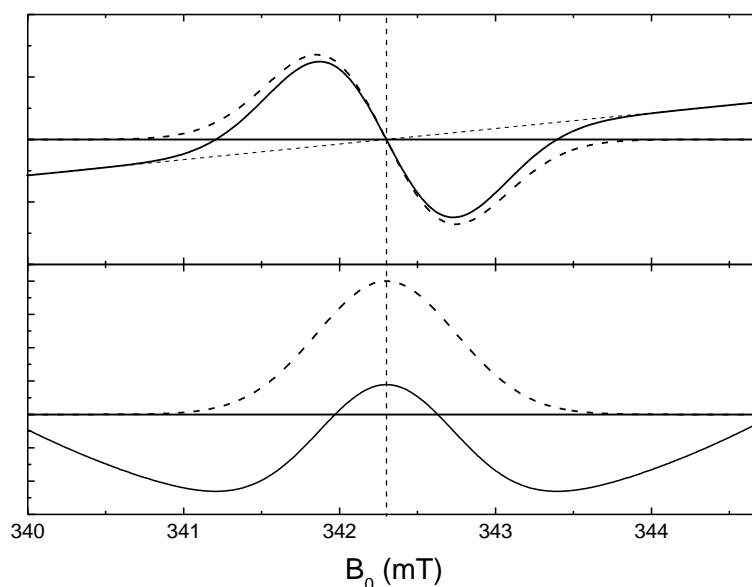


Рис. 8. Интегрирование спектра ЭПР, записанного на спектрометре с двойной модуляцией магнитного поля при наличии линейного по полю искажения. Сверху исходный спектр, снизу интеграл. Пунктиром показана форма спектра без искажений

колебания модулируют согласование спектрометра. При неточной настройке системы согласования на входе синхронного детектора появляется дополнительный модулированный сигнал из-за этого эффекта амплитудой  $C_1 B_0$ , а на выходе к интегралу первой производной поглощения будет добавлена парабола  $C_1(B_0 - B_{\min})^2$ , показанная на рисунке 8.

В-третьих, возможно присутствие широкого дополнительного сигнала ЭПР как от образца, так и от резонатора спектрометра или удерживающих образец ампул и т.п. В этом случае возможно внесение дополнительных искажений как в виде константы (рисунок 9 – линия 1), так и в виде прямых (рисунок 9 – линия 2). Кроме того, при определенном соотношении ширин основной и дополнительной линии может возникать добавка в виде параболической зависимости  $C_2(B_0 - B_{C2})^2$  ( $B_{C2}$  соответствует положению экстремума в дополнительной форме линии), которая после интегрирования даст зависимость, пропорциональную кубу  $B_0$  (рисунок 10).



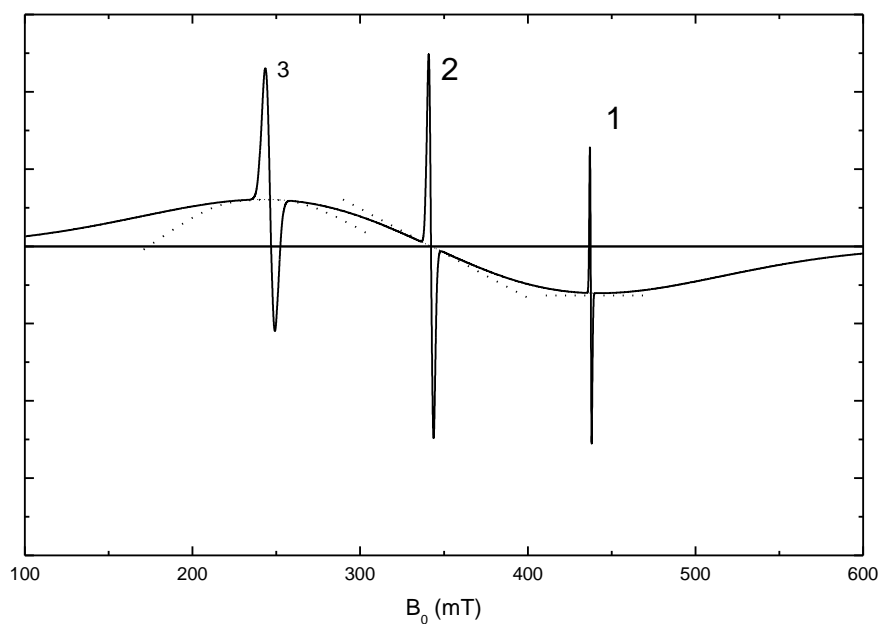


Рис. 9. Наложение широкой и узких линий. 1 – Вносит искажение в виде константы  $C_0$ , 2 – вносит искажение в виде линии  $C_1 B_0$ , 3 – вносит искажение в виде параболы  $C_2 (B_0 - B_{C2})^2$

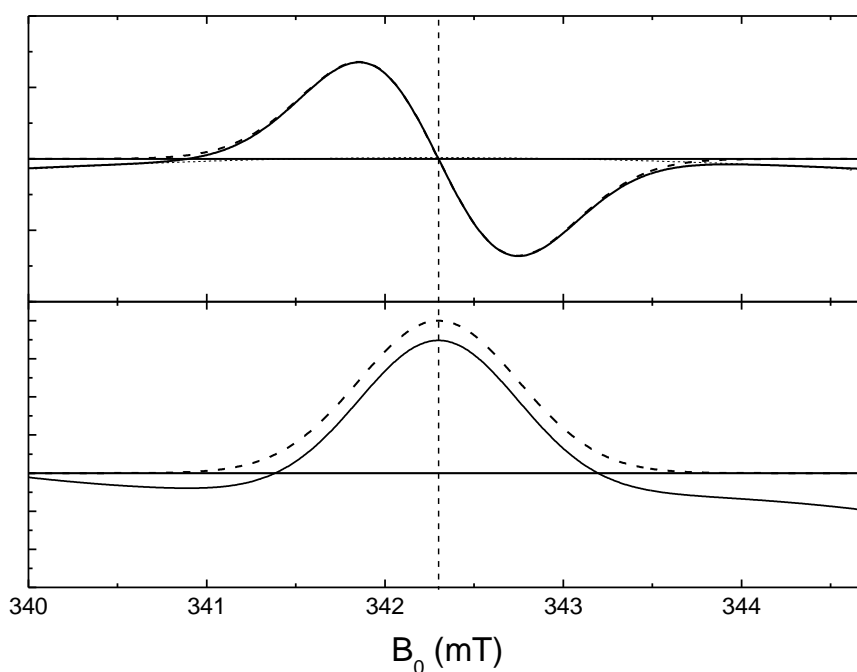


Рис. 10. Интегрирование спектра ЭПР, записанного на спектрометре с двойной модуляцией магнитного поля при наличии квадратичного по полю искажения. Сверху исходный спектр, снизу интеграл. Пунктиром показана форма спектра без искажений

В общем же случае, в записанном спектре могут присутствовать все три вида искажений. Для них вводится определение – базовая линия (baseline). Перед интегрированием спектра ЭПР необходимо провести базовую линию, а затем вычесть ее из исходного спектра. Только в этом случае интегральная площадь линии, полученная при втором интегрировании, будет вычислена правильно. Следует отметить, что сам спектр ЭПР должен быть записан полностью, развертка магнитного поля выбирается примерно в 2 раза больше видимого спектра. Особенно это важно для спектров ЭПР, содержащих линии лоренцевой формы, из-за длинного спада на крыльях линии.

Каковы критерии правильности проведения (выбора) базовой линии?

Во-первых, после вычитания базовой линии области спектра ЭПР, где отсутствует изучаемый (полезный) сигнал, должны иметь значения, близкие к нулю (среднее значение должно быть близко к нулю). Этим самым убеждаемся, что не вносятся дополнительные искажения.

Во-вторых, в интеграле от первой производной кривой поглощения первая и последняя точка спектра должны быть близки к нулю – значит, смещение на константу скорректировано правильно (рисунок 7).

В-третьих, в интеграле от первой производной кривой поглощения области, где отсутствует полезный сигнал, должны в среднем соответствовать нулевому значению – тем самым линейное по полю смещение будет скомпенсировано правильно (рисунок 8).

В-четвертых, в интеграле от первой производной кривой поглощения должны отсутствовать области, в которых кривая становится отрицательной.

Коррекция базовой линии может проводиться в различных программах. Например, в программе Microcal Origin есть специальная вкладка Baseline. В ней можно настроить количество точек, установить каждую точку на кривую спектра ЭПР и провести через точки сплайн или полином, который и будет базовой линией. Затем базовая линия вычитается, и получившийся спектр интегрируется, для проверки всех четырех критериев.

Чтобы выполнить первые три критерия, достаточно базовой линии в виде прямой. Для ее проведения необходимы только две точки, обычно помещаемых на минимальное и максимальное значение магнитных полей в спектре. Базовая линия создается в программе Microcal Origin в специальном окне «Baseline» кнопкой «Create Baseline». Кнопка «Modify» позволяет вручную скорректировать значение точек базовой линии (рисунок

11 – а и б). Кнопка «Subtract» вычитает базовую линию из спектра. После чего можно перейти на вкладку «Area» и взять интеграл. Если один из четырех вышеперечисленных пунктов не выполняется, то операция «Undo Subtract» возвращает к исходным данным, и затем коррекция базовой линии проводится заново. В случае если не удастся провести базовую линию по двум точкам, можно добавить третью точку – это позволит учесть вклад искажений параболического типа в исходный спектр. Большое количество точек нежелательно, в связи с увеличением степеней свободы сверх необходимого по физике процесса предела.

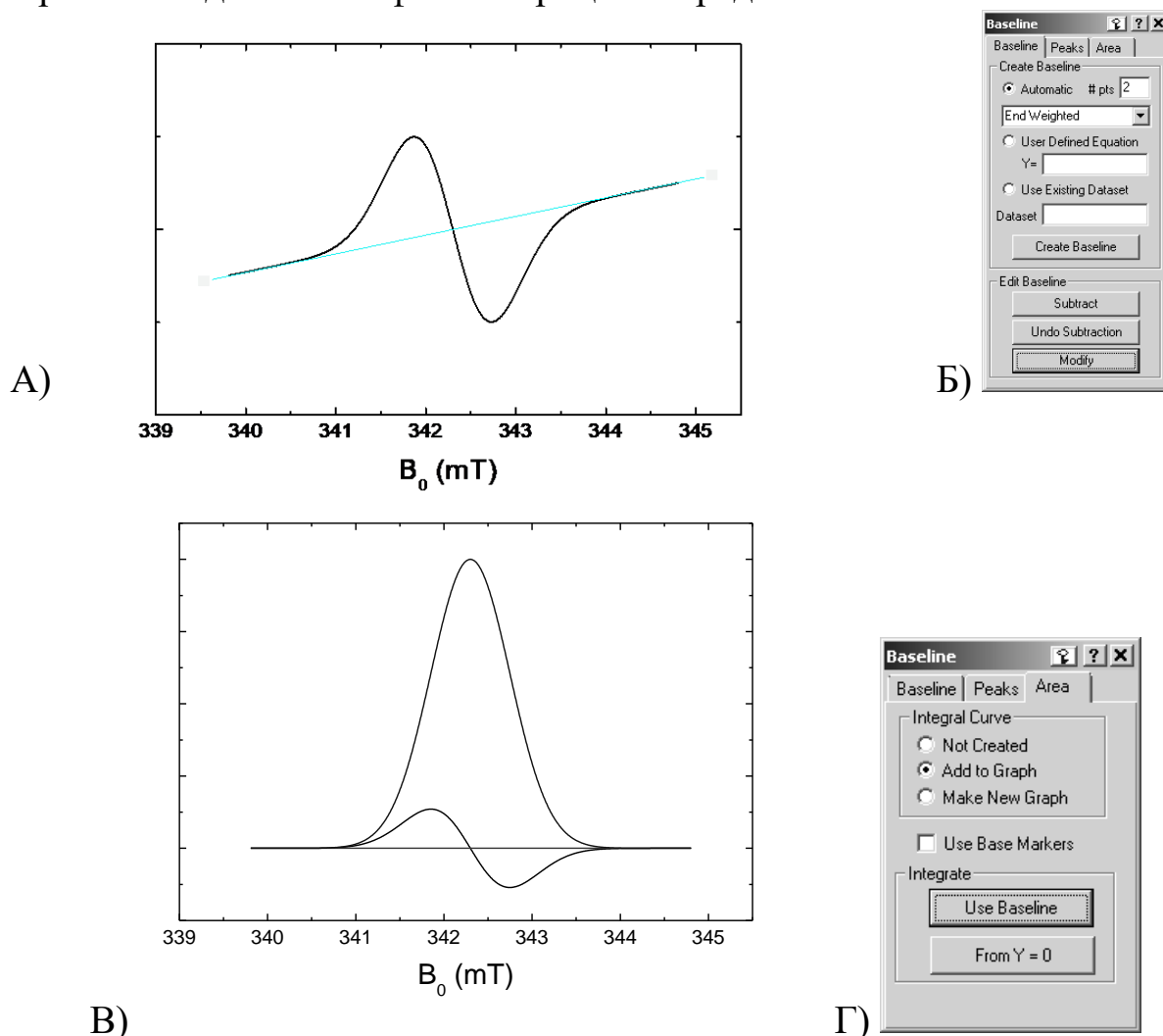


Рис. 11. Вычитание базовой линии (baseline) в программе Microcal Origin. А) исходный спектр и базовая линия в режиме Modify. Б) вкладка окна программы работы с базовыми линиями. В) спектр с вычитенной базовой линией и интеграл от него. Г) вкладка интегрирования спектра после вычитания базовой линии

После получения интегрированного спектра его необходимо еще раз проинтегрировать (рисунок 12), получив значение площади под кривой поглощения или в окне вывода результатов (Area), либо из кривой, выби-

рая ординату точки, соответствующей окончанию спектра (кружок на рисунке 12).

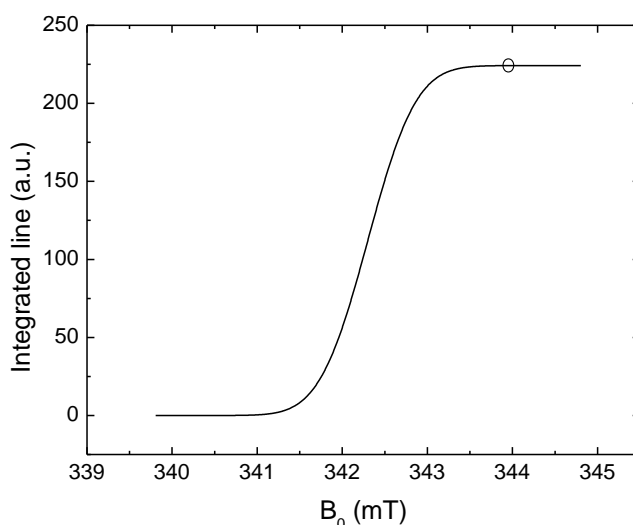


Рис. 12. Интеграл от кривой поглощения. Линия в области, отмеченной кружком, соответствует площади под кривой поглощения

### 2.3. Применение ЭПР для определения концентраций парамагнитных примесей в твердых телах

Концентрация парамагнитных центров в твердых телах может быть определена из измеренного по изложенной выше методике количества парамагнитных центров и наиболее простого измеряемого параметра для твердого тела – его массы:

$$C_{\text{ПЦ}} \left( \frac{\text{центров}}{\text{грамм}} \right) = \frac{N_{\text{ПЦ}} \text{ (количество центров)}}{m \text{ (грамм)}}.$$

Для однородных веществ полезной является относительная концентрация парамагнитных центров, показывающая, какое количество атомов химических элементов заменила изучаемая примесь. Для ее определения нужна молярная масса молекулы или элементарной ячейки исходного вещества  $M$  и количество замещаемых атомов в этой молекуле или ячейке  $N_{\text{замещаемых}}$  (натуральное число). В этом случае количество замещаемых атомов в 1 грамме вещества можно определить, как:

$$C_{\text{замещаемых}} \left( \frac{\text{центров}}{\text{грамм}} \right) = N_a \text{ (моль}^{-1}\text{)} N_{\text{замещаемых}} \frac{1 \text{ (грамм)}}{M \text{ (моль/грамм)}}.$$

Можно определить относительное количество замещенных атомов как:

$$C = \frac{C_{\text{ПЦ}}}{C_{\text{замещаемых}}} \cdot 100 \text{ атомных \%} .$$

Точность определения числа парамагнитных центров измеряемого  $\Delta I_{\text{изм}}$  (%) и опорного  $\Delta I_{\text{опорн.}}$  (%) образцов можно оценить из изменения значения интегральной интенсивности, проводя несколько измерений с выниманием образца из резонатора и для каждого измерения выполняя несколько раз интегрирование с коррекцией базовой линии. Оценим точность определения концентрации, учитывая и точность взвешивания  $\Delta m$  (грамм).

$$\Delta = \left[ 1 - \left( 1 - \frac{\Delta I_{\text{изм.}}}{100\%} \right) \left( 1 - \frac{\Delta I_{\text{опорн.}}}{100\%} \right) \left( 1 - \frac{\Delta m}{m} \right) \right] \cdot 100\% .$$

Обычно  $\Delta I_{\text{изм}}$  и  $\Delta I_{\text{опорн.}}$  получаются не хуже 5%. Но масса образцов (при переходе на более высокочастотные спектрометры, W-диапазона, например, или при исследовании новых материалов, синтезированных в ограниченном количестве) могут быть крайне малыми. Так, при массе образца 3 миллиграмма и погрешности измерений в 1 миллиграмм основная погрешность будет определяться точностью взвешивания (33%). Поэтому для W-диапазона, например, метод определения концентраций слабо применим.

#### **2.4. Применение ЭПР для определения концентраций парамагнитных примесей в растворах**

Для измерения концентрации спинов в растворах используют специальные ампулы с калиброванным внутренним диаметром, причем заливают раствора существенно больше, чем зона чувствительности резонатора (рис. 13).

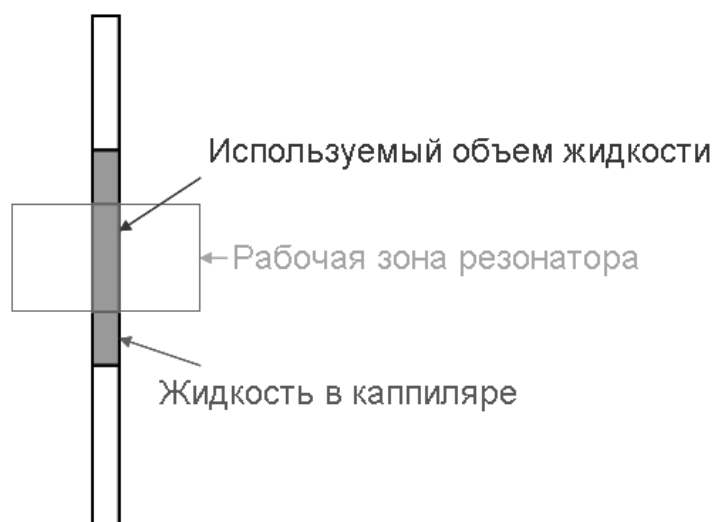


Рис. 13. Расположение ампулы с образцом в резонаторе

В этом случае сравнивают интегральные интенсивности спектров ЭПР измеряемого и опорного образцов, используя тот факт, что распределение по высоте амплитуды магнитной компоненты СВЧ поля  $B_1$ , распределение поля модуляционных катушек дают одинаковый результат для обоих образцов. При известной концентрации центров в опорном образце  $C_1$  концентрацию парамагнитных центров в измеряемом образце  $C_2$  можно определить как

$$C_2 = C_1 \frac{\Delta U_2 g_1 S_1 (S_1 + 1)}{\Delta U_1 g_2 S_2 (S_2 + 1)}.$$

Расчеты существенно упрощаются, если растворены одностипные вещества в одинаковых типах растворителя и их концентрация меньше 10 миллимоль/литр. В этом случае ширины линий ЭПР совпадают, и спектры ЭПР будут отличаться только интенсивностями, поэтому достаточно измерить пиковые интенсивности линий в измеряемом и опорном образцах и определить концентрацию по формуле:

$$C_2 = C_1 \frac{I_{pp2}}{I_{pp1}}.$$

К сожалению, присутствующий в спектрах шум ухудшает точность определения  $I_{pp}$ . В этом случае подбирают коэффициент пропорциональности  $K$  между спектрами в измеряемом и опорном образцах, минимизируя следующую функцию по  $K$ :

$$F(K) = \sum_{i=0}^N (K \cdot y_{(2)i} - y_{(1)i})^2,$$

где  $y_{(2)i}$  и  $y_{(1)i}$  – точки по оси ординат для спектров в измеряемом и опорном образцах.

Согласно методу наименьших квадратов (МНК) для нахождения  $K$  нужно продифференцировать функцию  $F(K)$  по  $K$ , приравнять производную к нулю:

$$2 \sum_{i=0}^N (K \cdot y_{(2)i} - y_{(1)i}) y_{(2)i} = 0$$

и решить получившееся уравнение:

$$K = \frac{\sum_{i=0}^N y_{(1)i} \cdot y_{(2)i}}{\sum_{i=0}^N y_{(2)i}^2}.$$

Также можно при минимизации методом МНК учесть разницу в базовых линиях для измеряемого и опорного образцов:

$$F(K, \Delta A, \Delta B) = \sum_{i=0}^N (K \cdot y_{(2)i} - y_{(1)i} + \Delta A + \Delta B \cdot x_i)^2$$

Частные производные в этом случае будут равны:

$$2 \sum_{i=0}^N (K \cdot y_{(2)i} - y_{(1)i} + \Delta A + \Delta B \cdot x_i) y_{(2)i} = 0 : \frac{\partial F}{\partial K}$$

$$2 \sum_{i=0}^N (K \cdot y_{(2)i} - y_{(1)i} + \Delta A + \Delta B \cdot x_i) = 0 : \frac{\partial F}{\partial \Delta A}$$

$$2 \sum_{i=0}^N (K \cdot y_{(2)i} - y_{(1)i} + \Delta A + \Delta B \cdot x_i) x_i = 0 : \frac{\partial F}{\partial \Delta B}$$

Система получившихся уравнений будет следующей:

$$K \cdot \sum_{i=0}^N y_{(2)i}^2 + \Delta A \sum_{i=0}^N y_{(2)i} + \Delta B \cdot \sum_{i=0}^N x_i y_{(2)i} = \sum_{i=0}^N y_{(2)i} y_{(1)i}$$

$$K \cdot \sum_{i=0}^N y_{(2)i} + \Delta A N + \Delta B \cdot \sum_{i=0}^N x_i = \sum_{i=0}^N y_{(1)i}$$

$$K \cdot \sum_{i=0}^N x_i y_{(2)i} + \Delta A \sum_{i=0}^N x_i + \Delta B \cdot \sum_{i=0}^N x_i^2 = \sum_{i=0}^N x_i y_{(1)i}$$

Коэффициент  $K$  в этом случае можно получить как

$$K = \frac{N \sum x^2 \sum y_{(2)} y_{(1)} - N \sum x y_{(1)} \sum x y_{(2)} - \sum x \sum x \sum y_{(2)} y_{(1)} + \sum x \sum x y_{(1)} \sum y_{(2)} + \sum x \sum x y_{(2)} \sum y_{(1)} - \sum x^2 \sum y_{(2)} \sum y_{(1)}}{\sum x^2 \sum y_{(2)}^2 - N \sum x y_{(2)} \sum x y_{(2)} - \sum x \sum x \sum y_{(2)}^2 + 2 \sum x \sum x y_{(2)} \sum y_{(2)} - \sum x^2 \sum y_{(2)} \sum y_{(2)}}$$

где опущены индексы  $i$  для краткости.

Каким образом можно приготовить опорный раствор самостоятельно? Для этого понадобятся точные весы и набор микропипеток. Концентрацию спинов в опорном растворе можно рассчитать по простой формуле:

$$C = n \frac{m}{M} \frac{1}{V},$$

где  $C$  – концентрация (в моль/литр),  $n$  – количество парамагнитных центров в одной молекуле (натуральное число),  $M$  – молярная масса в грамм/моль,  $m$  – масса растворяемого вещества в граммах,  $V$  – объем растворителя. Данная формула пригодна для небольших концентраций, когда растворение вещества не влияет на объем раствора.

Иногда для малых концентраций нельзя сделать слишком малую навеску растворяемого вещества, в этом случае сначала получают стоковый раствор (с большой концентрацией), а затем разбавляют стоковый раствор растворителем. Следует помнить, что если  $V_1$  – объем чистого раствора, а  $V_2$  – объем разбавляемого раствора с концентрацией  $C_0$ , то новая концентрация определяется как:

$$C = C_0 \frac{V_2}{V_1 + V_2}.$$

Погрешности определения концентрации раствора можно определить из абсолютных погрешностей измерения весов и микропипеток  $\Delta m$ ,  $\Delta V$ :

$$1 - \left(1 - \frac{\Delta m}{m}\right) \left(1 - \frac{\Delta V}{V_1}\right) \left(1 - \frac{\Delta V}{V_2}\right)$$

Поэтому для уменьшения погрешности выгодно брать большие значения масс и объемов. К примеру, необходимо разбавить раствор концентрацией 100 миллимоль/литр в 100 раз, при абсолютной погрешности микропипетки 1 мкл и максимальном объеме 1000 мкл. Сначала разбавим напрямую: возьмем 10 мкл раствора и 990 мкл растворителя. Погрешность будет

$$1 - \left(1 - \frac{1}{10}\right) \left(1 - \frac{1}{990}\right) = 10.1\%.$$

Теперь проведем растворения в два приема, каждый раз уменьшая концентрацию в 10 раз:

$$1 - \left[ \left(1 - \frac{1}{100}\right) \left(1 - \frac{1}{900}\right) \right]^2 = 2.2\%.$$

Как видно, получившаяся погрешность меньше почти в 5 раз, несмотря на то, что погрешность микропипетки вносилась 4 раза, вместо 2.



### 3 ПРИМЕНЕНИЕ ЭПР ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СТЕПЕНИ ВХОЖДЕНИЯ ПАРАМАГНИТНЫХ ИОНОВ В КРИСТАЛЛЫ И СТЕКЛА

Для промышленных применений кристаллы обычно выращиваются из расплава методами Чохральского, Бриджмена-Стокбаргера, методом зонной плавки. Для приобретения кристаллами необходимых свойств в них добавляют примеси в виде химических элементов, не входящих в основной состав кристалла. К примеру, добавление трехвалентного хрома в сапфир  $Al_2O_3$  приводит к его красной окраске – получается полудрагоценный камень рубин, на котором в свою очередь был построен первый лазер. Сейчас большинство твердотельных лазеров также основаны на внедрении примеси в базисную кристаллическую или стекольную структуру: редкоземельные ионы в иттрий-алюминиевом гранате или в ванадатаном стекле, ионы группы железа в сапфире и т.п.

Обычно примесные ионы замещают один из ионов кристаллического матрикса, при этом важно соотношение их ионных радиусов и валентностей. Если эти величины не совпадают, то может возникнуть вытеснение ионов примеси в расплав и концентрация примеси в кристалле будет сильно меньше, чем стехиометрическое соотношение, заложенное при подготовке шихты. Особенно этим отличается метод зонной плавки, при котором примеси вытесняются к краям заготовки.

Каким образом можно контролировать этот процесс? Если концентрация примеси велика, то контроль проще осуществлять методами масс-спектрометрии или рентгеновской люминесценции. Однако эти методы не могут дать ответа о валентности примеси, что является важным при создании кристаллов с заданными свойствами. Если же примесь является редкоземельным ионом или ионом группы железа, то часто на помощь приходит метод ЭПР, который кроме определения крайне малых концентраций, может определить и валентность примеси. Кроме того, метод ЭПР относится к неразрушающим методам и при его использовании не возникают радиационно-наведенные дефекты. Дополнительным плюсом метода является то, что он позволяет обнаружить и наличие даже небольшого количества нежелательных примесей, попавших в кристалл.

Концентрацию методом ЭПР определяют стандартными способами, описанными выше. Необходимо, однако, учитывать, что многие парамагнитные примеси требуют понижения температуры для возможности регистрации спектров ЭПР. Поэтому необходимо следить за отсутствием эф-

фактов насыщения при выбранной мощности СВЧ, как для измеряемого, так и для опорного образцов. В случае невозможности записать спектр ЭПР при одной температуре нужно учесть вклад зависимости разности населенностей уровней от температуры  $1/T$ , а также изменение добротности резонатора для flex-line-подобных систем (резонатор внутри криостата). Также необходимо учитывать спин примеси, при сравнении линий спектра ЭПР ионов гадолиния, например, со спектром ЭПР свободных радикалов: без учета значения  $S$  ошибка будет составлять 21 раз. Также необходимо интегрировать весь спектр ЭПР, включая туда все возможные линии, если часть линий выходит за границы магнитных полей, создаваемых спектрометром, их также нужно учитывать, через сравнение с видимыми линиями.

Пример. В спектре ЭПР ионов  $Gd^{3+}$  зафиксировали только одну линию, соответствующую переходу  $(1/2) - (-1/2)$  с интегральной интенсивностью 1, какую интегральную интенсивность нужно учитывать при расчетах?

Подсказка. Всего для ионов  $Gd^{3+}$  ( $S = 7/2$ ) будут наблюдаться 7 линий. Их интенсивности распределены в соответствии с квадратом оператора  $S_x$   $\langle M_1 | S_x | M_2 \rangle = \sqrt{S(S+1) - M_1 M_2}$ , т.е. 7, 12, 15, 16, 15, 12, 7. Таким образом, измеренную в эксперименте интенсивность нужно увеличить в 5.25 раза и не забыть, конечно, сделать коррекцию на значение спина, как  $S(S+1)$ .

После определения концентрации парамагнитных примесей в одном грамме вещества необходимо ее пересчитать в атомарные проценты  $x$ , которые показывают, какая часть ионов матрикса заместились ионами примеси. Делают это с помощью стандартной формулы аналитической химии:

$$x = C_m \frac{M_{\text{молекулы}}}{nN_A} 100\% ,$$

где  $C_m$  – концентрация в центров/грамм,  $n$  – количество парамагнитных центров в одной молекуле (натуральное число),  $M_{\text{молекулы}}$  – молярная масса одной молекулы в грамм/моль,  $N_A$  – число Авогадро. Данная формула пригодна для небольших концентраций, когда не нужно учитывать изменение молярной массы молекулы за счет замещения части ионов ионами примеси с другой молярной массой.

Иногда для кристалла приводится лишь массовый состав шихты. К примеру: в  $CaF_2$  добавили при росте 0.1 %  $MnSO_4$ . В этом случае атомар-

ный процент для примеси  $x_0$ , заложенный при росте кристалла, можно рассчитать по следующей формуле:

$$x_0 = x_2 \frac{n_2 M_1}{n_1 M_2},$$

где  $n_1$  – количество замещаемых ионов в одной молекуле матрикса (натуральное число),  $M_1$  – молярная масса одной молекулы матрикса в грамм/моль,  $n_2$  – количество ионов парамагнитной примеси в одной молекуле добавочной примеси (натуральное число),  $M_2$  – молярная масса одной молекулы добавочной примеси в грамм/моль,  $x_2$  – сколько массовых процентов примеси добавили. Опять же данная формула справедлива только для небольших концентраций. Для приведенного выше примера ( $\text{CaF}_2 + 0.1\% \text{MnSO}_4$ ) имеем:

$$x_0 = 0.1 \frac{1.78}{1.151} = 0.05 \text{ ат. \%}$$

#### 4 ПРИМЕНЕНИЕ ЭПР ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОГЛОЩЕННЫХ ДОЗ ВНЕШНЕГО ГАММА-ИЗЛУЧЕНИЯ ПО ЗУБНОЙ ЭМАЛИ

Определение дозы облучения описывается в ГОСТ Р 22.3.04-95 «Безопасность в чрезвычайных ситуациях, контроль населения, дозиметрический метод определения поглощенных доз внешнего гамма-излучения по спектрам электронного парамагнитного резонанса зубной эмали».

Зубная эмаль человека представляет из себя практически чистый биоминерал гидроксиапатит, содержащий непарамагнитные примеси  $\text{CO}_2$  и  $\text{CO}_3$ . В нормальном состоянии она не содержит свободные радикалы, так как при росте зуба они эффективно подавляются защитными силами организма. Под воздействием гамма-излучения непарамагнитные примеси переходят в парамагнитные  $\text{CO}_2^-$  и  $\text{CO}_3^{2-}$ , причем концентрация этих примесей прямо пропорциональна полученной дозе облучения, вплоть до считающихся смертельными 300 рентген. Рекомбинация образующихся свободных радикалов очень медленная, и характерное время рекомбинации при комнатной температуре достигает нескольких десятков тысяч лет. Это дает возможность определить полученную дозу облучения, даже если облучение произошло несколько десятков лет назад.

Для определения дозы облучения у пациента берут небольшой образец зубной эмали или удаленный по другим медицинским показаниям зуб. Зуб в этом случае необходимо разрезать на несколько частей, оставив только верхнюю часть. Так как скорость рекомбинации парамагнитных центров минимальна только в зубной эмали, а в дентине или мягких тканях она существенно выше, то важно очистить зубную эмаль от дентина, остатков зубного камня и другой органики.

Существуют два способа очистки зубной эмали:

- Первый способ механический. В нем используют не содержащий парамагнитные примеси алмазный инструмент. Использование стального инструмента или корундовых дисков недопустимо, так как они создадут дополнительные ПЦ. Все манипуляции проводят под струей воды, чтобы не допустить нагрева образца, существенно ускоряющего процессы рекомбинации. Степень отчистки контролируют визуально по степени диффузности отраженного света.
- Во втором способе части зуба погружают в 30% раствор  $\text{NaOH}$  в ультразвуковую ванночку на 2-3 ч. Щелочь размягчает органические части

зуба, но не влияет на гидроксипатит. Размягченный дентин выскребают алмазным инструментом.

После отчистки выделенную зубную эмаль размалывают в агатовой ступке до размера зерна порядка 0.5 мм. Затем образец промывают в ультразвуковой ванночке в дистиллированной воде, сменяя воду 8-10 раз, тратя на каждый этап 5 минут. После размола на поверхности порошинок образуются оборванные связи, приводящие к появлению поверхностных парамагнитных центров. Для их удаления тонкий слой поверхности стравливают в 10% уксусной кислоте в течении 10-20 минут. Далее порошок зубной эмали тщательно промывают в дистиллированной воде и сушат в вакууме в течение 2-3 часов. В результате такой обработки в качестве образца для ЭПР измерений остается чистый гидроксипатит, не содержащий дополнительных фракций. Контроль отчистки зубной эмали также осуществляют с помощью метода ЭПР, наблюдая за сигналами свободных радикалов в органической фракции (рисунок 14). Следует понимать, что несмотря на то, что сигнал ЭПР от органической фракции может быть выделен и вычтен из общего спектра (к примеру, с помощью импульсных

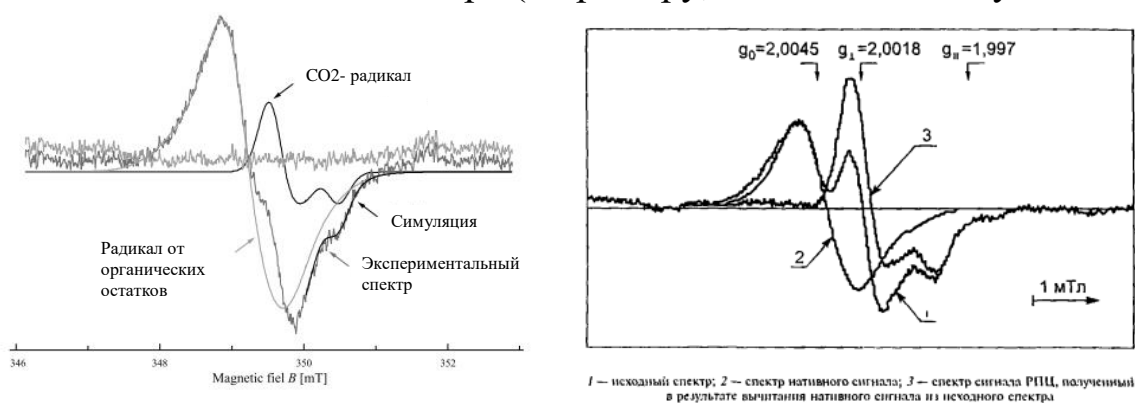


Рис. 14. Виды спектров ЭПР в фракциях зуба после облучения дозой 500 милли-Грей слева и 2 Грей справа [3, 4]

методик), наличие органических остатков сильно снижает точность определения концентрации парамагнитных центров.

Далее образец помещают в спектрометр, и соблюдая вышеперечисленные в главе 1 условия, проводят измерение концентрации ПЦ в образце.

Так как концентрация примесей  $\text{CO}_2$  может быть разной у различных людей, то проводят ряд дополнительных облучений с некоторым шагом по поглощенной дозе. Если доза образца без дополнительного облучения оценивалась как  $D$ , то шаг выбирают 1-3  $D$ . Число точек дооблучения

должно быть не менее 4. После этого в каждой точке измеряют интегральную интенсивность спектра ЭПР и проводят через эти точки прямую (рисунок 15).

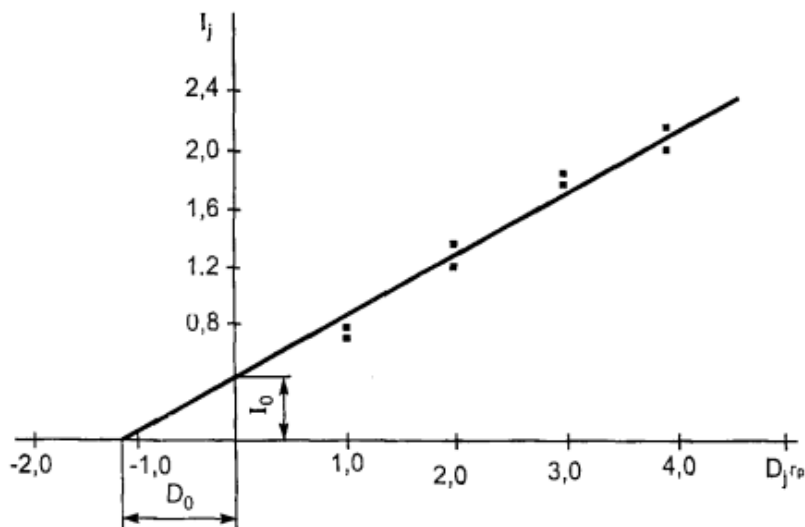


Рис. 15. Восстановление первоначальной поглощенной дозы  $D_0$  методом последовательного дооблучения исследуемого образца

Накопленная поглощенная доза будет соответствовать пересечению прямой с осью абсцисс. Более точно это значение можно получить с помощью метода МНК, минимизируя следующую функцию (число измеренных точек равно  $N+1$ ):

$$F(D_0, K) = \sum_{i=0}^N (I_i - I_0 - K \cdot D_i)^2$$

Берем частные производные и приравниваем их к 0:

$$\frac{\partial F}{\partial K} = \sum_{i=0}^N (I_i - I_0 - K \cdot D_i) D_i = 0$$

$$\frac{\partial F}{\partial D_0} = \sum_{i=0}^N (I_i - I_0 - K \cdot D_i) = 0$$

Получим два уравнения:

$$I_0 \sum_{i=0}^N D_i + K \sum_{i=0}^N D_i^2 = \sum_{i=0}^N I_i D_i$$

$$I_0 N + K \sum_{i=0}^N D_i = \sum_{i=0}^N I_i$$

Их решение даст:

$$I_0 = \frac{\sum_{i=0}^N I_i D_i \sum_{i=0}^N D_i - \sum_{i=0}^N I_i \sum_{i=0}^N [D_i^2]}{\left[ \sum_{i=0}^N D_i \right]^2 - N \sum_{i=0}^N [D_i^2]}$$

$$K = \frac{\sum_{i=0}^N I_i \sum_{i=0}^N D_i - N \sum_{i=0}^N I_i D_i}{\left[ \sum_{i=0}^N D_i \right]^2 - N \sum_{i=0}^N [D_i^2]}$$

Тогда  $D_0$  можно найти как:

$$D_0 = \frac{I_0}{K} = \frac{\sum_{i=0}^N I_i D_i \sum_{i=0}^N D_i - \sum_{i=0}^N I_i \sum_{i=0}^N [D_i^2]}{\sum_{i=0}^N I_i \sum_{i=0}^N D_i - N \sum_{i=0}^N I_i D_i} .$$

Данный метод требует источники с нормированной мощностью радиационного излучения.

Также есть возможность ускоренной проверки дозы облучения. Точность такого метода ниже, так как предполагается, что концентрация примесей  $\text{CO}_2$  одинакова для всех образцов зубной эмали. В этом случае измеряют интегральную интенсивность измеряемого  $I_{изм.}$  и опорного образца  $I_{опор.}$  с известной поглощенной дозой  $D_{опор.}$ , а также массы обоих образцов  $m_{изм.}$  и  $m_{опор.}$

Дозу облучения находят по формуле:

$$D = D_0 \frac{I_{изм.}}{I_{опор.}} \frac{m_{опор.}}{m_{изм.}} .$$

## 5 ПРИМЕНЕНИЕ ЭПР ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВЫРАБОТКИ СУПЕРОКСИД АНИОНА $O_2^-$ , ГИДРОКСИЛ АНИОНА $OH^-$ И NO РАДИКАЛА

Во многих живых системах важную роль играют свободные радикалы. Концентрация радикалов обычно невелика, однако они обладают высокой реакционной способностью. Поэтому для изучения свободных радикалов следует использовать методы, имеющие высокую чувствительность и обладающие способностью детектировать нестабильные молекулы, для некоторых из которых предусмотрен специальный механизм дополнительного подавления. Поэтому важен метод, который позволит отследить изменение концентрации такого рода свободных радикалов, в том числе в режиме реального времени.

Для определения возникновения свободных радикалов используют *спиновые ловушки*, которые путем химической реакции с короткоживущими радикалами образуют устойчивые парамагнитные соединения, чья концентрация может быть измерена с помощью метода ЭПР.

Различают три основных вида биологически активных свободных радикалов. Первые два – это супероксид анион  $O_2^-$  и гидроксил анион  $(OH)^-$  обладают большой активностью, способностью повреждать ДНК. Для их идентификации и определения концентрации разработан целый ряд спиновых ловушек.

### 5.1. Циклические нитронные ловушки

Циклические нитронные ловушки представляют из себя пятичленное кольцо, включающее атом азота с кислородом, прикрепленную группу NO и дополнительную боковую цепь  $R_2$ . В зависимости от  $R_2$  спиновые ловушки различаются названием DMPO, DEPMPO, EMPO, VMPO. Для всех них характерен спектр ЭПР из шести линий, появляющийся при захвате радикала (рисунок 16).



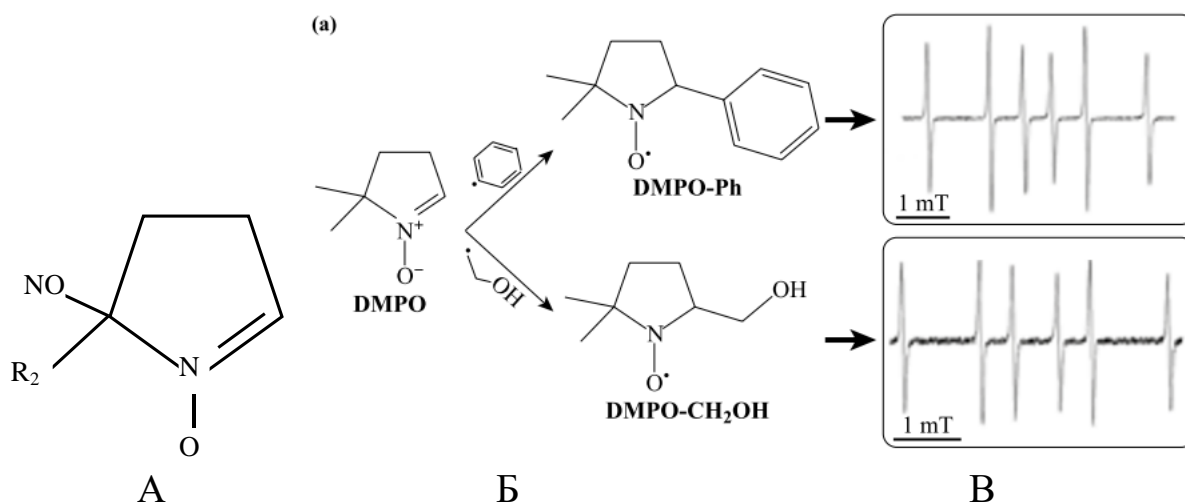


Рис. 16. – А) Основа циклической нитронной ловушки. Б) захват радикала ловушкой. В) характерный спектр ЭПР циклической нитронной ловушки после захвата радикала

### 5.2. Ациклические нитронные спиновые ловушки

Ациклические нитронные спиновые ловушки: PBN, POBN, PPN, POPN, EPPN, TN представляют нитронную группу с присоединенными одним или несколькими бензольными кольцами. Для всех этой группы спиновых ловушек также характерен спектр ЭПР из шести линий, появляющийся при захвате радикала (рисунок 17).

### 5.3. Циклический гидроксилламин

Циклический гидроксилламин имеет формулу 1-гидрокси-2,2,5,5-тетраметил-4-фенил 3-имидазолин-3-оксид. Для циклического гидроксилламина характерен спектр ЭПР, состоящий из трех линий (рисунок 18).

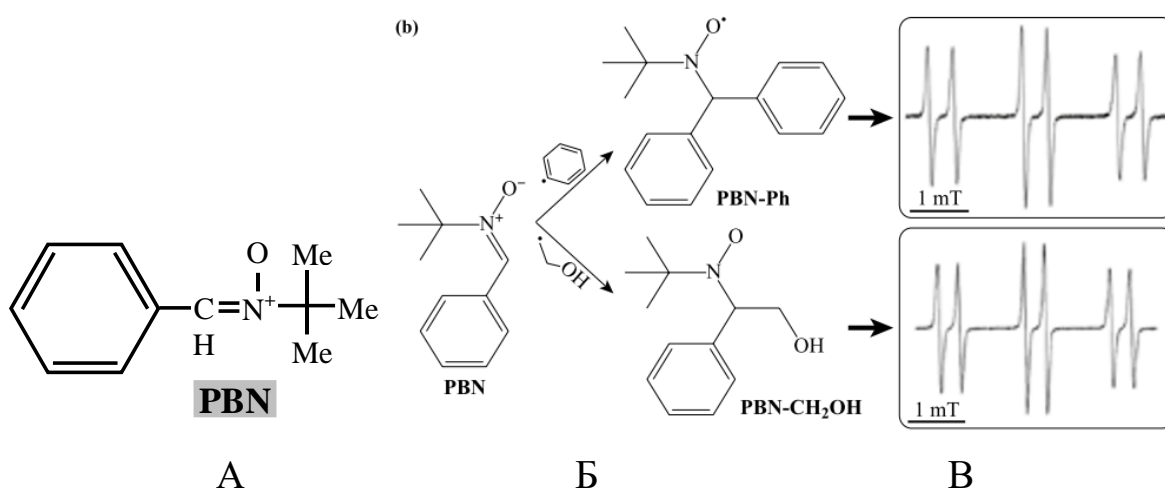


Рис. 17. А) Основа ациклической нитронной ловушки. Б) захват радикала ловушкой. В) характерный спектр ЭПР ациклической нитронной ловушки после захвата радикала

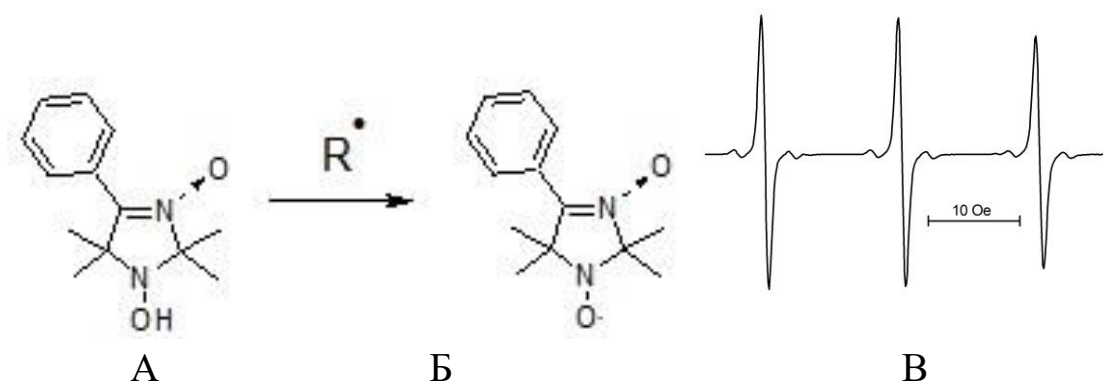


Рис. 18. А) Основа спиновой ловушки на основе циклического гидроксилamina. Б) захват радикала ловушкой. В) характерный спектр ЭПР спиновой ловушки на основе циклического гидроксилamina после захвата радикала

#### 5.4. Нитрозильные спиновые ловушки

Основа нитрозильных спиновых ловушек – нитрозная функциональная группа  $R-N=O$ . Поскольку реакция с радикалом всегда сопровождается появлением неспаренного электрона на азоте, то спектр ЭПР содержит три группы линий, обязанных сверхтонкому взаимодействию с магнитным моментом  $I = 1$  ядра азота  $^{14}N$  (рисунок 19). Расщепление в группе линий зависит как от типа ловушки, так и от захваченного радикала.

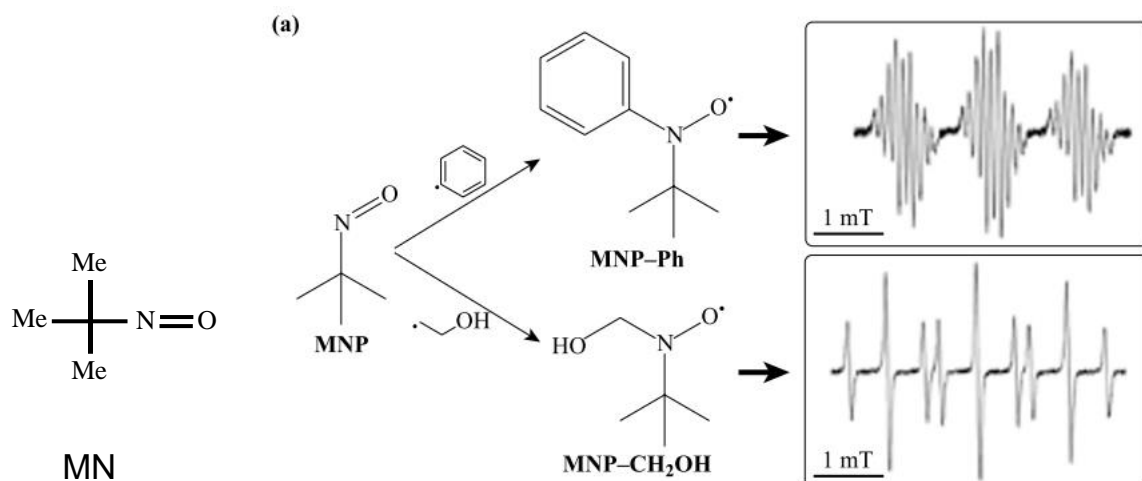


Рис. 19. А) Основа нитрозильной спиновой ловушки. Б) захват радикала ловушкой. В) характерный спектр ЭПР нитрозильной спиновой ловушки после захвата радикала

### 5.5. Спиновые ловушки на основе ДЭТК или ДТКс

Кроме супероксид и гидроксид анионов существует радикал оксид азота (NO), для захвата которого применяются спиновые ловушки на основе дитиокарбаматов ДЭТК (N,N-диэтилдитиокарбамат), ДТКс (N-(дитиокарбокси)саркозин) (рисунок 20), ПДТК (пирролидиндитиокарбамат), проДТК (L-пролиндитиокарбамат) и аналогичных соединений МГД (N-метил-D-глюкаминдитиокарбамат), МСД (N-метил-L-сериндитиокарбамат). Молекулы спиновых ловушек представляют из себя две или три функциональные группы (рисунок 21), объединенные ионом железа или меди.

Выбор функциональной группы позволяет проводить захват NO-радикала как в питательной среде, так и внутри клеток, защищенных гидрофобными клеточными мембранами (таблица 1).

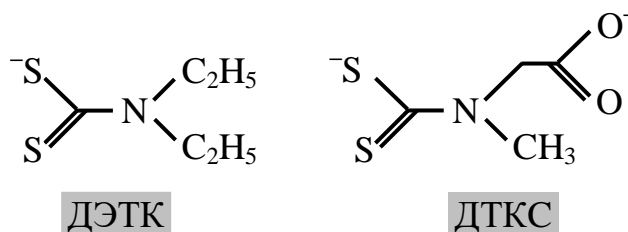


Рис. 20. Функциональные группы ДЭТК и ДТКс

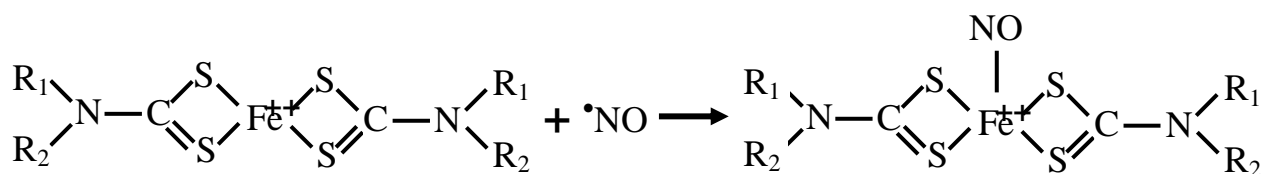


Рис. 21. Захват Fe(ДЭТК)<sub>2</sub> NO радикала

Таблица 1

Характеристики спиновых меток на основе ДТК – комплексов Fe<sup>II</sup>(ДТК)<sub>2</sub>.

	Растворимость в H <sub>2</sub> O
ДТК	нерастворим
ДЭТК	нерастворим
ПДТК	нерастворим
МГД	растворим
ДТКС	растворим
ПродТК	растворим
МСД	растворим

Спектр ЭПР зависит от связующего иона и для меди представляет 4 линии сверхтонкой структуры, с расщеплением, характерным для ее 63 и 65 изотопов (рисунок 22). По мере появления NO он начинает захватываться молекулами спиновой ловушки, и в спектре появляются 3 линии, соответствующие сверхтонкому расщеплению азота (рисунок 22). Следует отметить, что примерно только половина молекул с захваченным NO перейдет в парамагнитное состояние, это необходимо учитывать при расчете концентрации NO радикала.

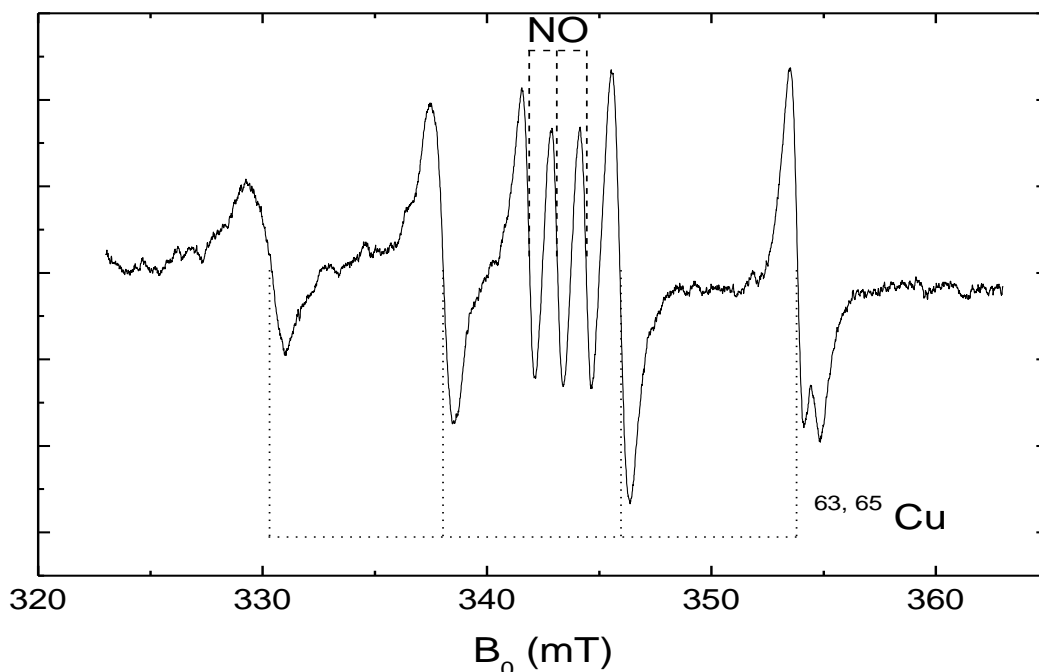


Рис. 22. Типичный спектр ЭПР  $\text{Cu}(\text{ДЭТК})_2$  в этилацетате с захваченным NO при комнатной температуре

### 5.6. Пробоподготовка при измерениях со спиновыми ловушками

Спиновые ловушки относятся к высокоактивным химическим веществам. При работе с ними необходимо соблюдать стандартные требования безопасности при работе с химическими веществами «ГОСТ 12.1.007-76 Системы стандартов безопасности труда. Вредные вещества» [5].

Концентрацию спиновой ловушки выбирают примерно в 2-5 раз больше максимально ожидаемой концентрации захватываемого ей радикала, но не больше максимальной концентрации, определенной производителем спиновой ловушки. Дальнейший протокол эксперимента отличается в зависимости от объекта исследований. В случае бактериальной среды, вырабатывающей свободные радикалы, раствор со спиновой ловушкой добавляют через определенное время после запуска процесса генерации, так как часто спиновая ловушка оказывается токсичной. После чего полученный раствор взбалтывают в вортексе. При исследовании фрагментов растительного или животного происхождения образец помещают в раствор спиновой ловушки, после чего его гомогенизируют, а получившуюся взвесь фильтруют.

Кроме того, нужно учитывать, что радикалы, улавливаемые спиновыми ловушками, также содержатся и в атмосфере. Поэтому работу с использованием спиновых ловушек рекомендуется проводить в специальном вытяжном шкафу (перчаточной камере), заполненном инертным газом. При отсутствии такой камеры после взятия навески спиновой ловушки из герметичного контейнера, контейнер в обязательном порядке продувают инертным газом. Вода для растворения спиновой ловушки в обязательном порядке используется деионизированная. Остальные растворители должны быть особой химической чистоты (ОХЧ) или лучшего качества.

В случае долгого хранения спиновой ловушки ее необходимо проверить на соответствие характеристикам. Для этого растворяют спиновую ловушку в чистом растворителе в указанной производителем максимальной концентрации и методом ЭПР проверяют концентрацию прореагировавших во время хранения ловушки молекул. Их должно быть менее 1% от общего числа молекул в растворе. Затем спиновую ловушку помещают в раствор, который генерирует определенное количество свободных радикалов, и проверяют степень улавливания этих радикалов. Для супероксид-аниона можно использовать раствор перекиси водорода, с облучением последнего ультрафиолетовым светом (на каждую молекулу  $\text{H}_2\text{O}_2$  выделяется один активный радикал).

## 6 ЗАДАНИЯ ДЛЯ ВЫПОЛНЕНИЯ

1. Получить у преподавателя образец порошка гидроксиапатита с добавлением  $\text{MnSO}_4$  ( $S=5/2$ , ионы  $\text{Mn}^{2+}$  замещают ионы  $\text{Ca}$ ) в концентрации 0.01-1% весовой процент и опорный образец  $\text{Cu}(\text{ДЕТК})_2$  с известным числом ионов  $\text{Cu}^{2+}$  ( $S=1/2$ ). Прогреть весы, взвесить пустую ампулу для измерений и вычесть ее массу с помощью кнопки тарирования. Приготовить навеску образца гидроксиапатита, поместить в ампулу для измерений и взвесить. Измерить спектры ЭПР обоих образцов, результаты измерений оформить в виде рисунков. Высыпать гидроксиапатит обратно в контейнер и вымыть ампулу. Провести первое интегрирование измеренных спектров ЭПР с коррекцией базовой линии, результат оформить в виде рисунков. Рассчитать атомарную концентрацию  $x$  ионов марганца в измеренном образце. Рассчитать атомарную концентрацию  $x_0$  ионов марганца в растворе, из которого готовился гидроксиапатит. Сделать вывод о способности ионов марганца замещать ионы кальция в гидроксиапатите.
2. Получить у преподавателя образцы порошка зубной эмали с неизвестной и известной дозами облучения. Прогреть весы, взвесить пустую ампулу для измерений и вычесть ее вес с помощью кнопки тарирования. Приготовить навеску образца порошка зубной эмали с неизвестной дозой облучения, поместить в ампулу для измерений и взвесить. Измерить спектры ЭПР образца порошка зубной эмали с неизвестной дозой облучения. Высыпать образец порошка зубной эмали обратно в контейнер. Вымыть ампулу и засыпать образец порошка зубной эмали с известной дозой облучения. Измерить спектры ЭПР образца порошка зубной эмали с известной дозой облучения. Высыпать образец порошка зубной эмали обратно в контейнер и вымыть ампулу. Результаты измерений оформить в виде рисунков. Сравнить спектры ЭПР, сделать вывод о совпадении или несовпадении форм линий ЭПР сигналов. В случае несовпадения провести первое интегрирование измеренных спектров ЭПР с коррекцией базовой линии, результат оформить в виде рисунков. Полученную дозу облучения первым образцом рассчитать из сравнения интегральных интенсивностей. В случае совпадения форм линий

воспользоваться методом МНК и рассчитать отношение интегральных интенсивностей, из которого рассчитать дозу облучения.

3. Получить у преподавателя контейнер со спиновой ловушкой, раствор перекиси водорода и опорный образец  $\text{Cu}(\text{DETK})_2$  с известной концентрацией ионов меди ( $S=1/2$ ). Приготовить раствор перекиси водорода в указанной преподавателем концентрации. Приготовить раствор спиновой ловушки по описанной выше методике. Измерить спектр ЭПР раствора спиновой ловушки, оценив тем самым ее деградацию, результат измерений оформить в виде рисунка. Измерить спектр ЭПР опорного образца  $\text{Cu}(\text{DETK})_2$ , результат измерений оформить в виде рисунка. Смешать растворы перекиси водорода и спиновой ловушки и установить их под ультрафиолетовый источник на 20 минут. Измерить спектр ЭПР раствора спиновой ловушки с захваченным супероксид анионом, результат измерений оформить в виде рисунка. Провести первое интегрирование всех измеренных спектров ЭПР с коррекцией базовой линии, результат оформить в виде рисунков. Рассчитать интегральные интенсивности линий ЭПР и вычислить объемную концентрацию захваченного супероксид аниона и сравнить ее концентрацией перекиси водорода.



## ИСПОЛЬЗУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Абрагам А. Электронный парамагнитный резонанс переходных ионов. 1 том. [Текст]: учеб. для вузов / А. Абрагам, Б. Блини. Москва: Мир, 1972. 651с
2. Абрагам А. Электронный парамагнитный резонанс переходных ионов. 2 том. [Текст]: учеб. для вузов / А. Абрагам, Б. Блини. Москва: Мир, 1973. 349 с
3. Bertrand P. Electron paramagnetic resonance spectroscopy. Application. / P. Bertrand // Springer -2022. pp. 454. DOI 10.1007/978-3-030-39668-8
4. ГОСТ Р 22.3.04-95 Безопасность в чрезвычайных ситуациях, контроль населения, дозиметрический метод определения поглощенных доз внешнего гамма-излучения по спектрам электронного парамагнитного резонанса зубной эмали: нац. стандарт Рос. Федерации : дата введения 1996-07-01. – М. : Издательство стандартов, 1995. – 27 с.
5. ГОСТ 12.1.007-76 Системы стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности: нац. стандарт Рос. Федерации : дата введения 1977-01-01. – М. : Стандартинформ, 1977. – 7 с.