

Spectroscopie RPE appliquée au contrôle qualité

M2-Contrôle Qualité, Assurance Qualité,
Méthodes de Validation (CQ/AQ/MV)



Fabrice THOMAS

(fabrice.thomas@ujf-grenoble.fr)

Bureau 234 au DCM

TP au DCM, bâtiment recherche (bat C)

301 rue de la Chimie

Domaine Universitaire

Document téléchargeable:

<http://imbg.ujf-grenoble.fr>

onglet « cours on-line »

I. Introduction

- RPE (ou ESR) découverte en 1945 par E. Zavoisky (physicien russe).
- Basée sur l'absorption d'une onde électromagnétique.
- En solution, solide (et gaz)
- Utilisée en recherche fondamentale et dans l'industrie

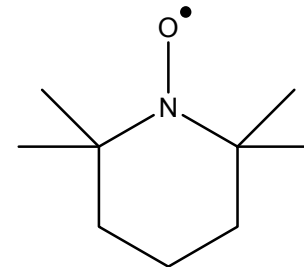
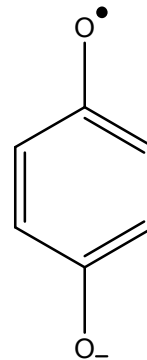


A) Systèmes concernés

- Concerne les molécules paramagnétiques uniquement (un électron non-apparié au moins).
- Méthode quantitative ET qualitative
- Un électron (spin S) non apparié: $S = 1/2$, 2 électrons non appariés $S = 1$, 3 électrons non appariés $S = 3/2$... Jusqu'à $7/2$ pour les systèmes les plus complexes.
- Lorsque $S = 0$: molécule diamagnétique \rightarrow RMN
- Généralement lorsque S pair les espèces sont difficiles à détecter.

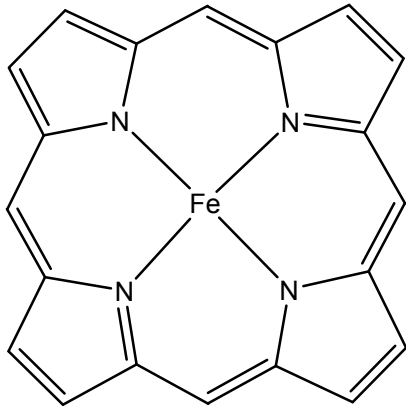
Espèces chimiques radicalaires:

- Radicaux organiques ($S = 1/2$):
 - Quinones
 - Cofacteurs enzymatiques
 - Dommages dus aux radiations
 - Marqueurs de spin
 - Phénoxyles
- Radicaux inorganiques:
 - NO, O₂ ($S = 1$)



- Métaux:

- Fe^{2+} ($S = 2$), Fe^{3+} ($S = 1/2$ ou $5/2$), Cu^{2+} ($S = 1/2$), Mn^{2+} ($S = 5/2$)



Isotope	S	I	Abondance
^{55}Mn	$3/2$ (+IV) 2 (+III) $5/2$ (+II)	$5/2$	100
^{56}Fe	$5/2$ $1/2$ (+III) 2 (+II)	0 0	91.7
^{59}Co	$3/2$ (+II) 1 (+I)	$7/2$	100
$^{58,60}\text{Ni}$	$1/2$ (+III) 0 ou 1 (+II) $1/2$ (+I)	0	68,26
$^{63,65}\text{Cu}$	0 ou 1 (+III) $1/2$ (+II)	$3/2$	69,31



B) Domaines concernés

- Contrôle qualité: Détection d'ionisations

Bruker BioSpin

[About Us](#) | [Products](#) | [Solutions](#) | [Service & Support](#) | [News](#) | [Office](#)
[Home](#) | [Contact](#) | [Career](#) | [Events](#) | [Investors](#) | [Store](#)

NMR
EPR
 Systems
 ELEXSYS-II
 EMX
 e-scan
 e-scan Alanine Dosimeter Reader
 e-scan Food Analyzer
 e-scan Beer Analyzer
 Performance
 Software
 Multi-Frequency
 Magnets
 Resonators
 Accessories
 What is EPR?
 Service & Support
 MRI
 TD-NMR
 Analytical Services

e-scan™ Food Analyzer
 Irradiated Food Control according to European Norms

Food irradiation is used to reduce the health risk associated with food-borne pathogens such as Salmonella and to prolong shelf life (sprout inhibition, delay of ripening). In fact, ionizing radiation inhibits the division of microorganisms and creates so-called radiolytic products as well as free radicals. In a dry environment these radicals are relatively stable.



For example, irradiated poultry bones or dried spices may contain a substantial amount of stable radicals which can be easily detected by EPR spectroscopy (EPR = electron paramagnetic resonance, also known as ESR). Extensive consultations and round-robin tests were conducted during the 1990s in order to set European-wide standards for sample preparation, measurement protocol and unequivocal identification of irradiated food via EPR. Currently three EU norms exist, defining food irradiation control via EPR spectroscopy.

Foodstuffs sample holders (left) and height positioning template (right)

- **EN 1786:1996**
Foodstuffs – Detection of irradiated food containing bone by ESR spectroscopy.
- **EN 1787:2000**
Foodstuffs – Detection of irradiated food containing cellulose by ESR spectroscopy.
- **EN 13708:2001**
Foodstuffs – Detection of irradiated food containing crystalline sugar by ESR spectroscopy.

With standard research EPR spectrometers such as Bruker's EMX and ELEXSYS series, food irradiation control can be conducted with superior sensitivity. However, experienced technicians or scientists are required to operate these complex spectrometers with their full array of technical capabilities.

However, for food irradiation control by EPR to become a safe, reliable and accepted method.

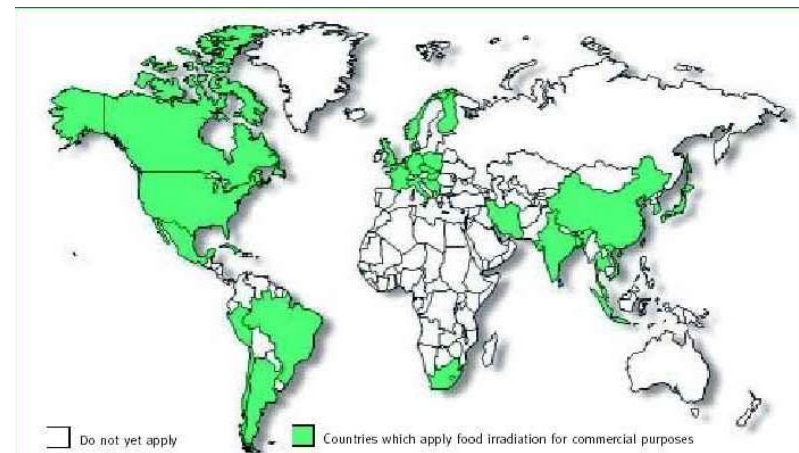
Aérial
 Centre de Ressources Technologiques
 Institut Technique Agro-Industriel

[Accueil](#) | [Qui sommes-nous ?](#) | [Agenda](#) | [Contact](#) | [Liens](#) | [Sitemap](#) | [Offres de Stages](#)
[Presse](#) | [Agenda](#) | [Contact](#) | [Liens](#) | [Sitemap](#) | [Offres de Stages](#)

Détection des aliments ionisés

- **Détection des produits alimentaires ionisés**
 Détection d'aliments ionisés contenant des lipides par chromatographie en phase gazeuse des hydrocarbures ou par chromatographie en phase gazeuse (CPG) couplée avec une spectrométrie de masse des 2-alkylcyclobutanes (MS)
 Détection d'aliments ionisés contenant des os, des arêtes, de la cellulose ou des sucres en phase cristalline par spectroscopie de résonance paramagnétique électronique (R.P.E.)
 Lyophilisation
 Partenaires
- **Détection d'aliments ionisés dont les minéraux silicatés peuvent être extraits. Analyse par thermoluminescence.**
- **Détection d'aliments ionisés par des méthodes bactériologiques (comparaison des numérations DEFT/GAM, étude des flores radioresistantes)**
- **Détection d'aliments ionisés par microélectrophorèse des cellules isolées des aliments.**
[\[lien normes\]](#)

Aériel CRT et ITAI - Parc d'Innovation - rue Laurent Pries - 67400 Illkirch - Membre de l'ACTIA
 "La bonne dose d'Innovation" Tél : 33 (0) 3 88 19 15 15 - Email : b.ducartoin@aerial-crt.com - Hervé Léné



- Contrôle qualité: Performances d'anti-oxydants

Bruker BioSpin

About Us | **Products** | Solutions | Service & Support | News | Office


Home | Contact | Career | Events | Investors | Store

NMR
EPR
Systems
ELESYS-II
EMX
e-scan
e-scan Alanine Dosimeter Reader
e-scan Food Analyzer
e-scan Beer Analyzer
Performance
Software
Multi-Frequency
Magnets
Resonators
Accessories
What is EPR?
Service & Support
MRI
TD-NMR
Analytical Services

e-scan

Optimizing your beer's shelf life

Fast and automated quality control and optimization of beer's shelf life.




Overview | Methodology | Automation | Workflow | Services | Related Products

The EPR lag time assay is a truly powerful technique for measuring the antioxidant capacity in beer. Bruker introduces the e-scan, an instrument dedicated to the **lag time assay**. Now you can perform this once very specialized assay with a compact, easy-to-use benchtop analyzer.

Key Features

- Fully automated sample handling
- Up to 20 samples per analysis
- Unattended data acquisition
- Automatic lag time calculation
- Easy-to-learn Windows™ software

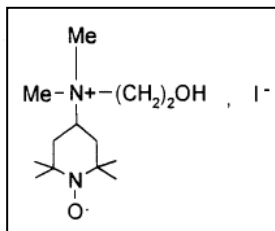


Dans les crèmes de beauté ...

Dans la bière ...

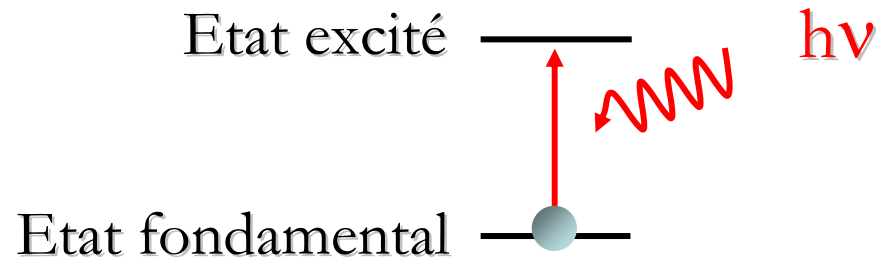
- Contrôle qualité: Cosmétologie

<p>(19) </p>	<p>Europäisches Patentamt European Patent Office Office européen des brevets</p>	 <p>(11) EP 0 661 038 B1</p>
<p>(12) FASCICULE DE BREVET EUROPEEN</p>		
<p>(45) Date de publication et mention de la délivrance du brevet: 24.07.1996 Bulletin 1996/30</p>		<p>(51) Int. Cl.⁶: A61K 7/00</p>
<p>(21) Numéro de dépôt: 94402980.0</p>		
<p>(22) Date de dépôt: 21.12.1994</p>		
<p>(54) Composition dépigmentante pour le traitement simultané des couches superficielles et profondes de la peau</p> <p>Depigmentierendes Mittel zur gleichzeitigen Behandlung von Hautoberschichten und Hauttiefenschichten</p> <p>Depigmentation composition for the simultaneous treatment of the superficial skinlayers and the deep skinlayers</p>		
<p>(84) Etats contractants désignés: AT BE CH DE ES FR GB IT LI NL SE</p>		<p>• Segot, Evelyne F-94130 Nogent-sur-Marne (FR)</p>
<p>(30) Priorité: 30.12.1993 FR 9315870</p>		<p>(74) Mandataire: Lhoste, Catherine L'OREAL, 90 rue du Général Roguet F-92583 Clichy Cédex (FR)</p>
<p>(43) Date de publication de la demande: 05.07.1995 Bulletin 1995/27</p>		<p>(56) Documents cités: EP-A- 0 559 502 WO-A-93/15708 FR-A- 2 408 387</p>
<p>(73) Titulaire: L'OREAL F-75008 Paris (FR)</p>		

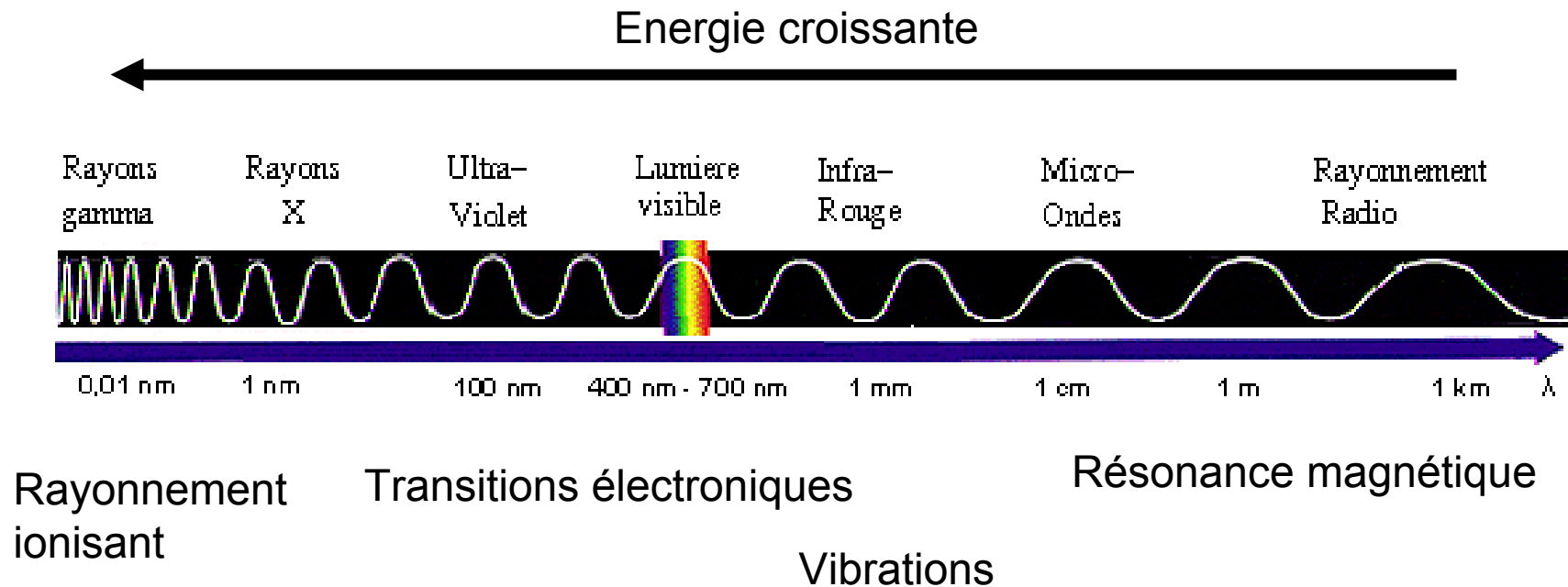


Radical nitroxide

C) RPE vs. autres spectroscopies



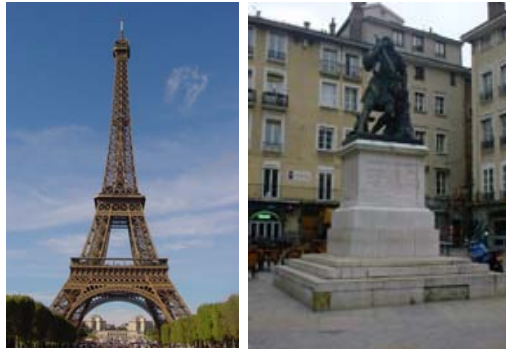
Type de phénomène dépend de $h\nu$



Transitions électroniques: $10\ 000 - 20\ 000\ \text{cm}^{-1}$

Energie thermique: $200\ \text{cm}^{-1}$ à $298\ \text{K}$

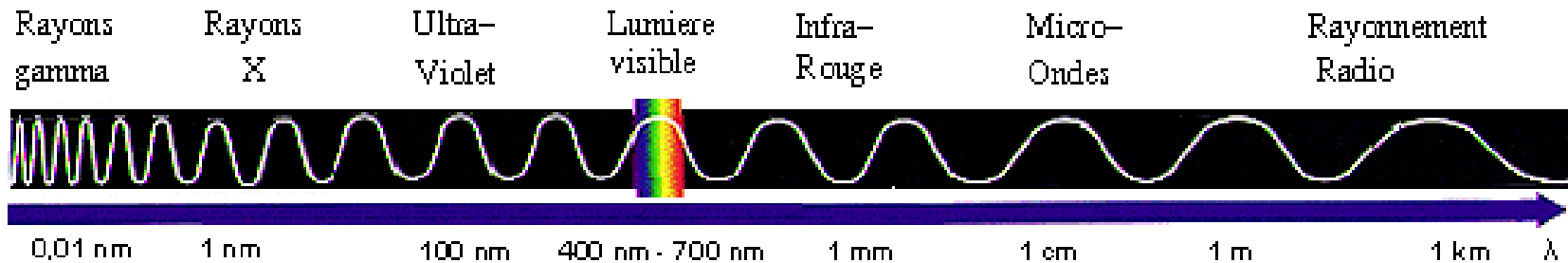
Dédoublément d'orbitales sous l'effet d'un champ magnétique de $0.5\ \text{T}$: $0.5\ \text{cm}^{-1}$



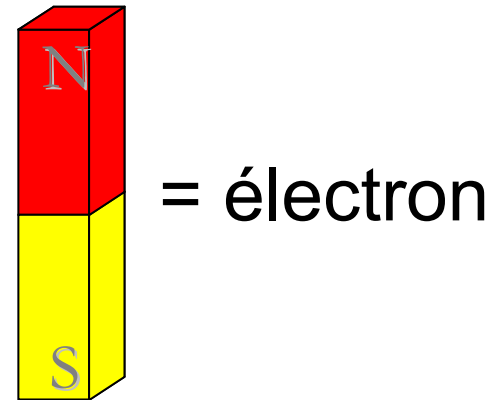
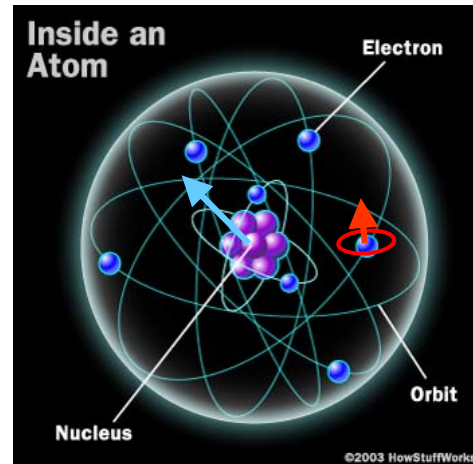
→ Interactions magnétiques sont FAIBLES



Grande importance de la température en RPE car énergie thermique > phénomène observé



II. Théorie de la RPE: Energie et résonance



Moments magnétiques de l'électron:

- Présence et mouvement des **électrons** (charges négatives) confèrent des propriétés magnétiques à la molécule.
- Magnétisme électron \gg magnétisme du noyau
- 2 Moments magnétiques associés aux mouvements de l'électron:
 - Rotation sur lui-même: On parle de moment magnétique de **spin (en rouge)** μ_S .
 - Orbite autour du noyau: On parle de moment magnétique **orbital (en bleu)** μ_L
- Ces moments ne sont pas totalement indépendants: L'électron va se trouver perturbé dans sa trajectoire par les autres électrons. On parle alors de couplage spin-orbite.

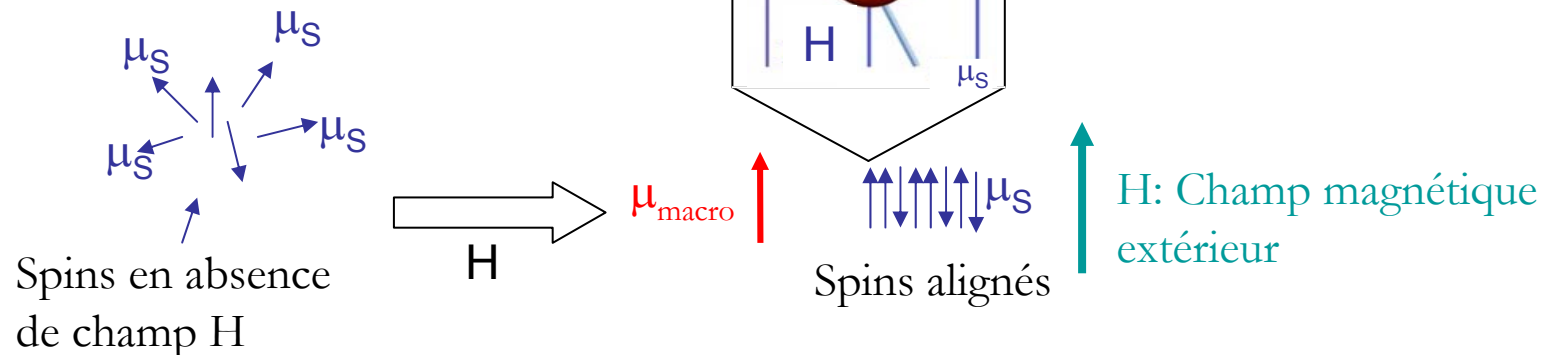
L'électron dans un champ magnétique

- Aimants s'alignent dans un champ magnétique



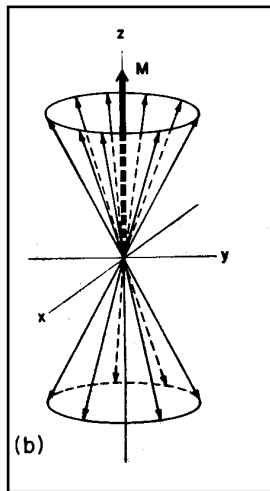
- Electrons (spins \approx aimants) font de même. Ils vont avoir un mouvement de précession autour du champ externe $H \rightarrow$ Un **moment magnétique de spin** μ est créé. On va trouver des spins orientés parallèles (état le plus stable) et d'autres antiparallèles (état le moins stable) au champ.

Il y a un excès de spin parallèle d'où création d'un moment magnétique macroscopique μ_{macro}



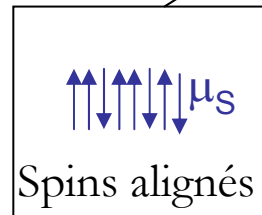
A) Niveaux d'énergie de l'électron dans un champ magnétique: Traitement quantique

- Un électron non apparié: Spin décrit par le nombre quantique $S = \frac{1}{2}$
- $m_S =$ prend toujours une valeur comprise entre $+S$ à $-S$ par palier d'une unité.
Ex: Pour $S=1/2$, $m_S = +1/2$ ou $-1/2$
 Pour $S = 1$, $m_S = -1, 0$ ou $+1$

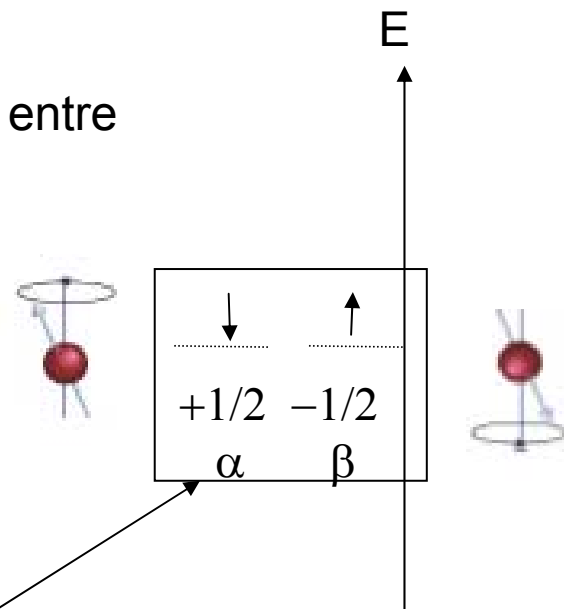


Electron Spins Precess at the Larmor Frequency about the External Field
 $\gamma_e = 1.76 \times 10^7$ rad/sec/G

μ_{macro} ↑

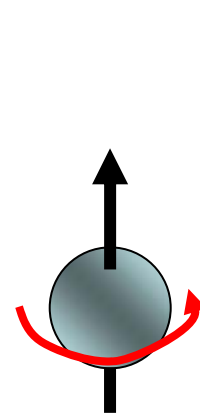


H: Champ magnétique extérieur ↑



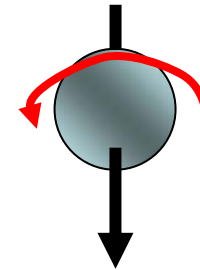
Energie des spins dépend de leur orientation et de H

H ↑



$M_S = -1/2$

Parallèle
(+ stable)

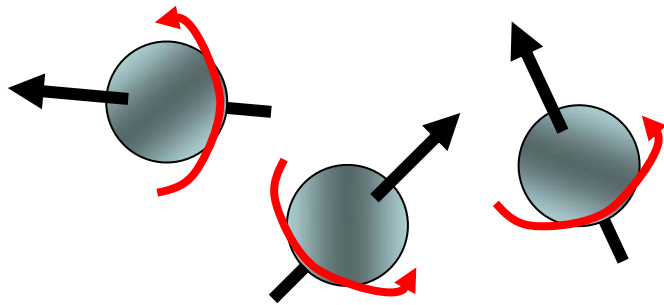


$+1/2$

Parallèle
(- stable)

E ↑

Rappel: $H = 0$



B) Effet Zeeman: Levée de dégénérescence des niveaux d'énergie par application d'un champ magnétique externe.

L'énergie de l'électron est fonction du champ magnétique externe:

$$E = gH\mu_B \cdot m_S$$

g = facteur de Landé (2.0023 pour l'électron libre)

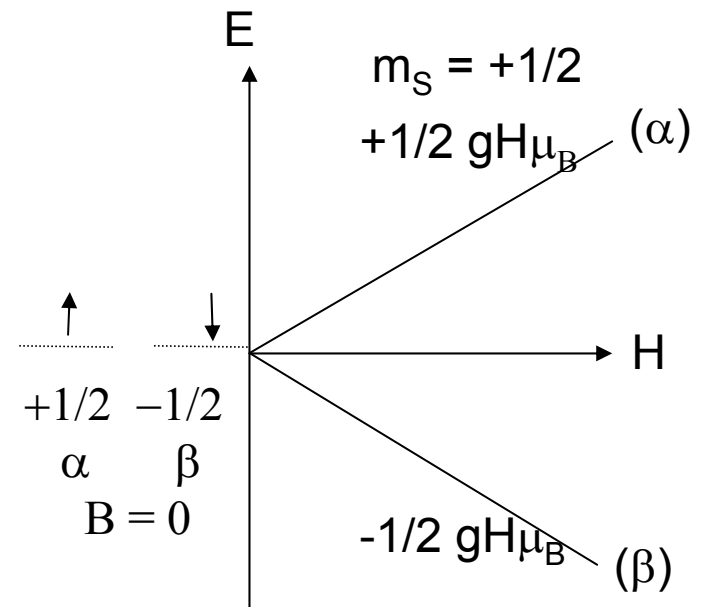
μ_B = Magnéton de Bohr = $9,2740154 \cdot 10^{-24} \text{ J T}^{-1}$

H = champ magnétique appliqué, Tesla ou Gauss
(1 G = 0.1 mT)

$m_S = +1/2$ ou $-1/2$

- Pour l'électron $m_S = +1/2$ correspond à un alignement antiparallèle au champ magnétique, $m_S = -1/2$ un alignement parallèle.

- L'état β est plus stable (en RMN c'est l'état α car $\gamma_{\text{électron}}$ est de signe opposé à $\gamma_{\text{nucléaire}}$).



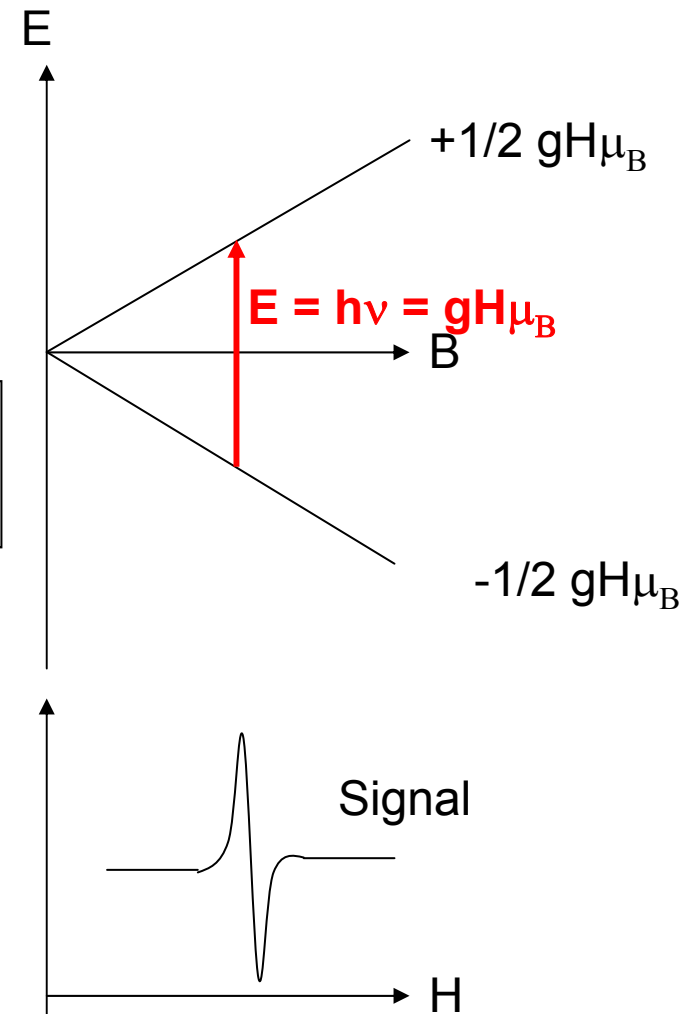
C) Condition de résonance:

- Résonance lorsqu'on applique une radiofréquence correspondant à la différence d'énergie entre α et β
- Energie à appliquer sous la forme d'une radiofréquence $h\nu$ (où $h = 6,6260755 \cdot 10^{-34}$ Js)

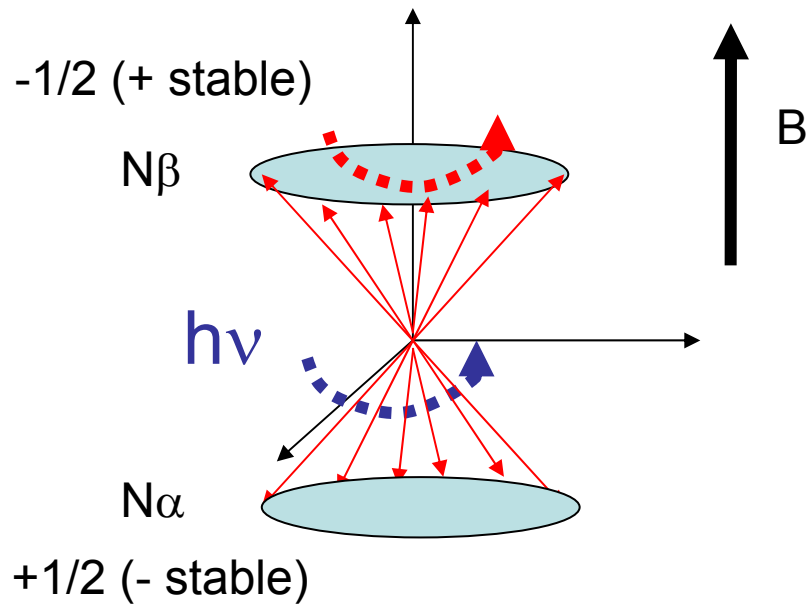
$$E = h\nu = +1/2 gH\mu_B - (-1/2 gH\mu_B) = gH\mu_B$$

Equation fondamentale de la RPE

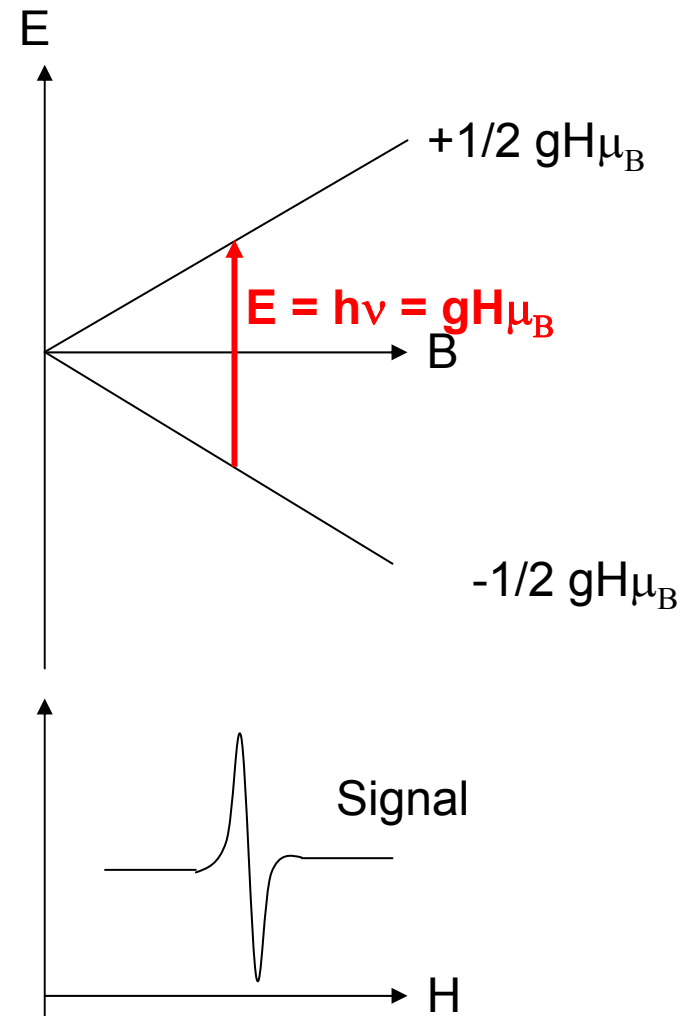
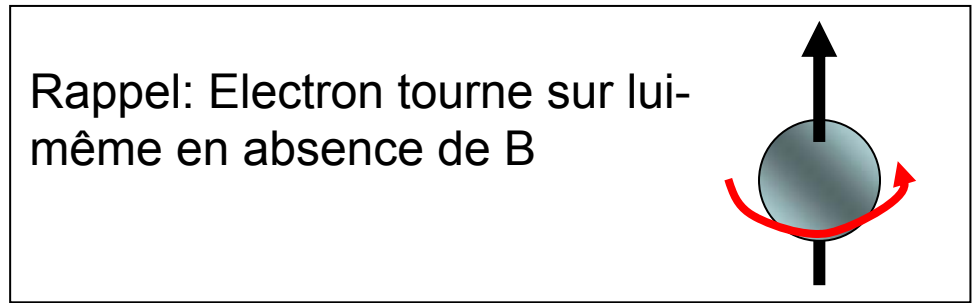
Cette énergie permet de faire passer les spins de l'état β à l'état α (retournement de spin). On irradie le système avec cette énergie \Rightarrow retournement du spin \uparrow . Après, il retourne à son état fondamental \downarrow , puis il absorbe encore E : $\downarrow \Rightarrow \uparrow \dots$ On a un phénomène de **résonance**. C'est la base de l'expérience de RPE



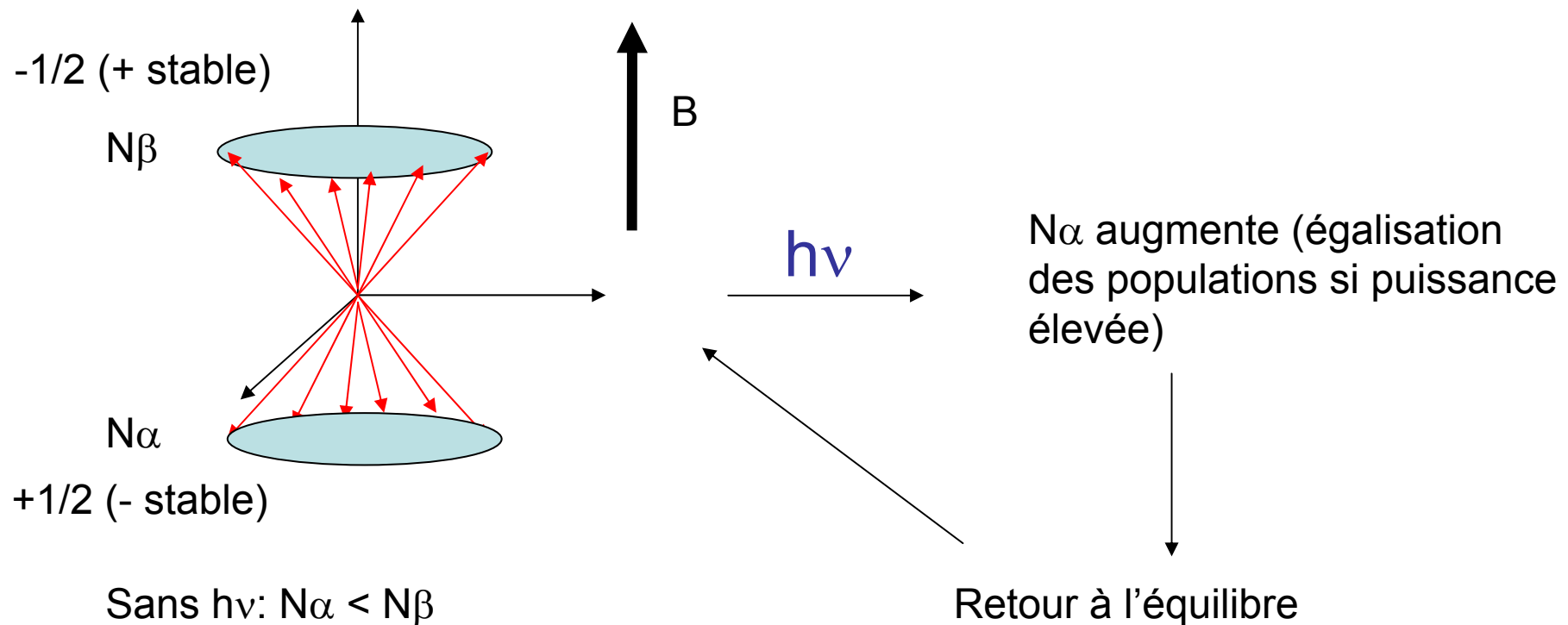
Condition de résonance en mécanique classique:



$h\nu$ Sous la forme d'une radiofréquence
EN PLUS de B (champ magnétique extérieur).
 Lorsque $h\nu$ accroche la rotation de l'électron =
 résonance



Conséquences de la résonance



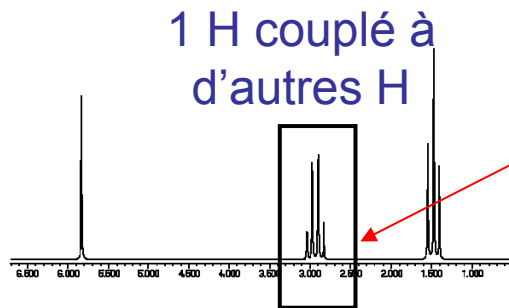
Le temps durant lequel le spin qui s'est retourné reste à l'état moins stable est appelé durée de vie.

Le retour à l'équilibre est appelé Relaxation. Il se produit selon 2 phénomènes:
- spin-réseau: Echange avec le milieu extérieur (énergie dissipée par vibration)
- spin-spin: Transfert d'énergie à d'autres spins.

La durée de vie est inversement proportionnelle à la largeur de raie et donc à la forme du signal.

D) Forme du signal détecté

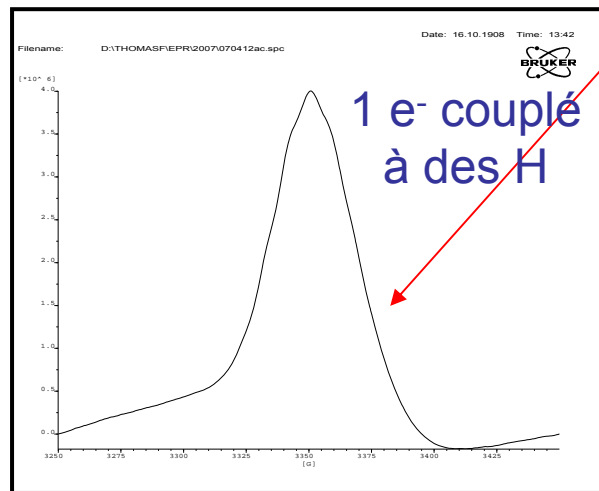
- RMN: Signal en absorption



raies fines, couplages faciles à détecter

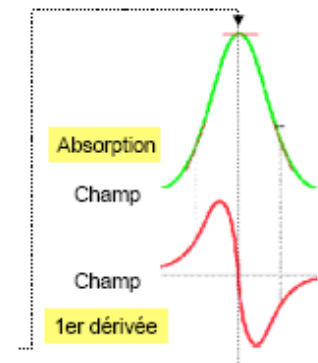
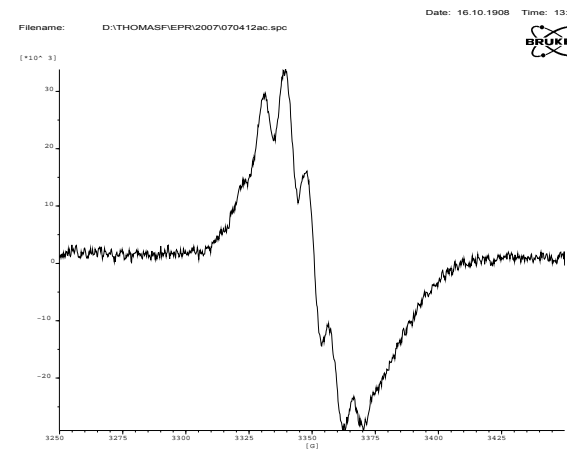
Durées de vie = $10^{-1} - 10^{-5}$ sec

- RPE: Signal en absorption



raies larges car relaxation des spins plus rapide, couplages difficiles à détecter

Durées de vie = $10^{-4} - 10^{-8}$ sec



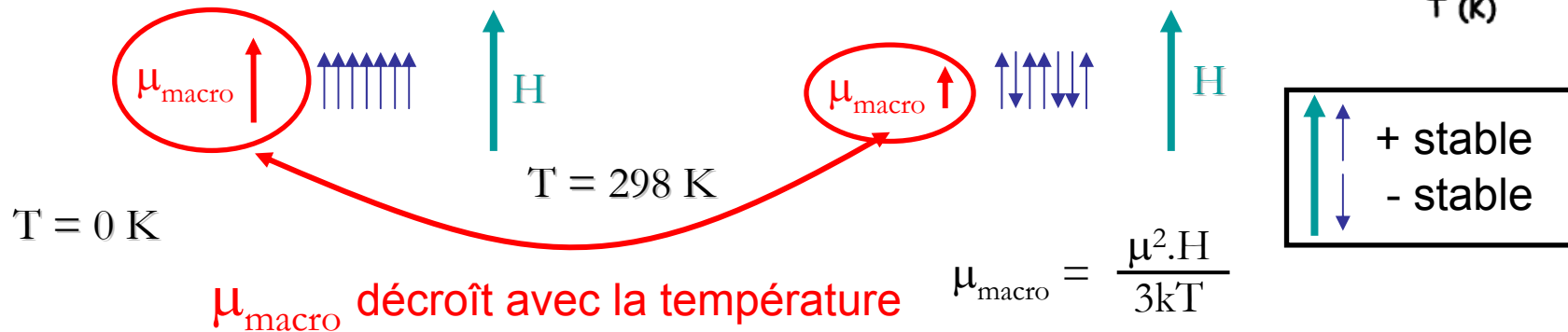
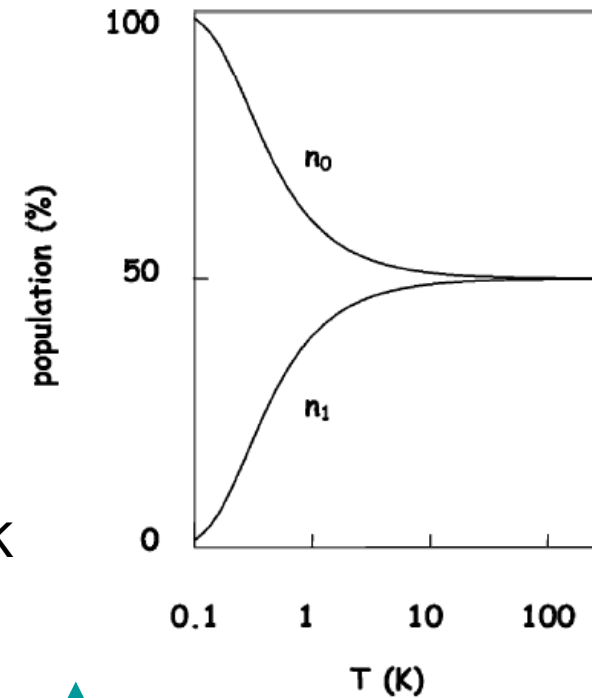
RPE: Dérivée du même signal →
Couplages plus évidents à détecter

E) RPE et température

La différence d'énergie entre les 2 niveaux α (n_0) et β (n_1) est faible ($\sim 0.3 \text{ cm}^{-1}$). Or la relation de Boltzmann nous dit que:

$$n_1 = n_0 e^{-\left(\frac{\Delta E}{kT}\right)}$$

L'excès de spin $\beta/\alpha = e^{-(-\Delta E/kT)} = 1.0016$ à 298 K
(avec $k = 1.380658 \cdot 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$)



L'intensité du spectre est fonction de la probabilité de transition qui est elle-même fonction de l'excès de spin β/α . L'intensité du spectre diminue donc lorsque la température augmente. Malgré tout excès de spin \gg RMN d'où meilleure sensibilité en RPE

III. Spectromètre RPE

- Energie et champ magnétique: RPE vs RMN

$m_{\text{proton}} \gg m_{\text{électron}}$ ($1,67263 \cdot 10^{-27}$ kg vs. $9,1093897 \cdot 10^{-31}$ kg) d'où des rapports gyromagnétiques γ différents et des fréquences de résonance ν différentes

Cte. gyromagnétique | Fréquence de résonance | $\nu = \frac{\gamma B_0}{2\pi}$ | Champ magnétique

1 T = 10000 G

On aura en RPE des champs magnétiques moins intenses (0,3 T vs. 21 T en RMN) et des fréquences plus élevées (usuels: $\nu = 10$ GHz vs. 900 MHz en RMN).

RMN: Cryo-aimant pour produire champ élevé



RPE: Electro-aimant (champ plus faible)

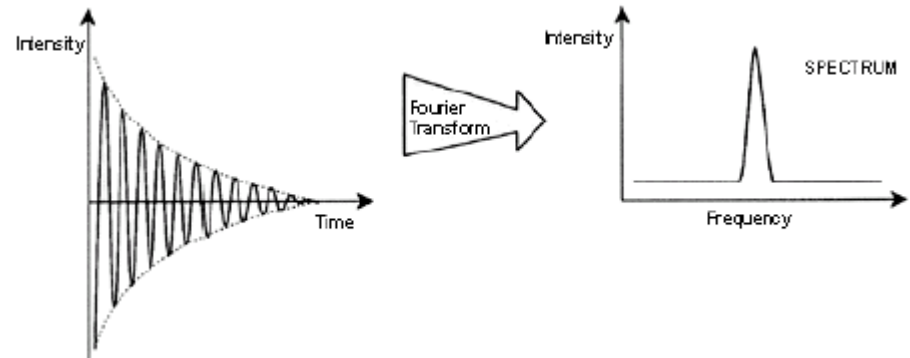


En pratique on va fixer la valeur de fréquence et on va balayer en champs. C'est l'inverse de la RMN car le champ est plus faible (0 à 0.5 T) et la fréquence plus élevée (9.4 GHz maintenue constante).

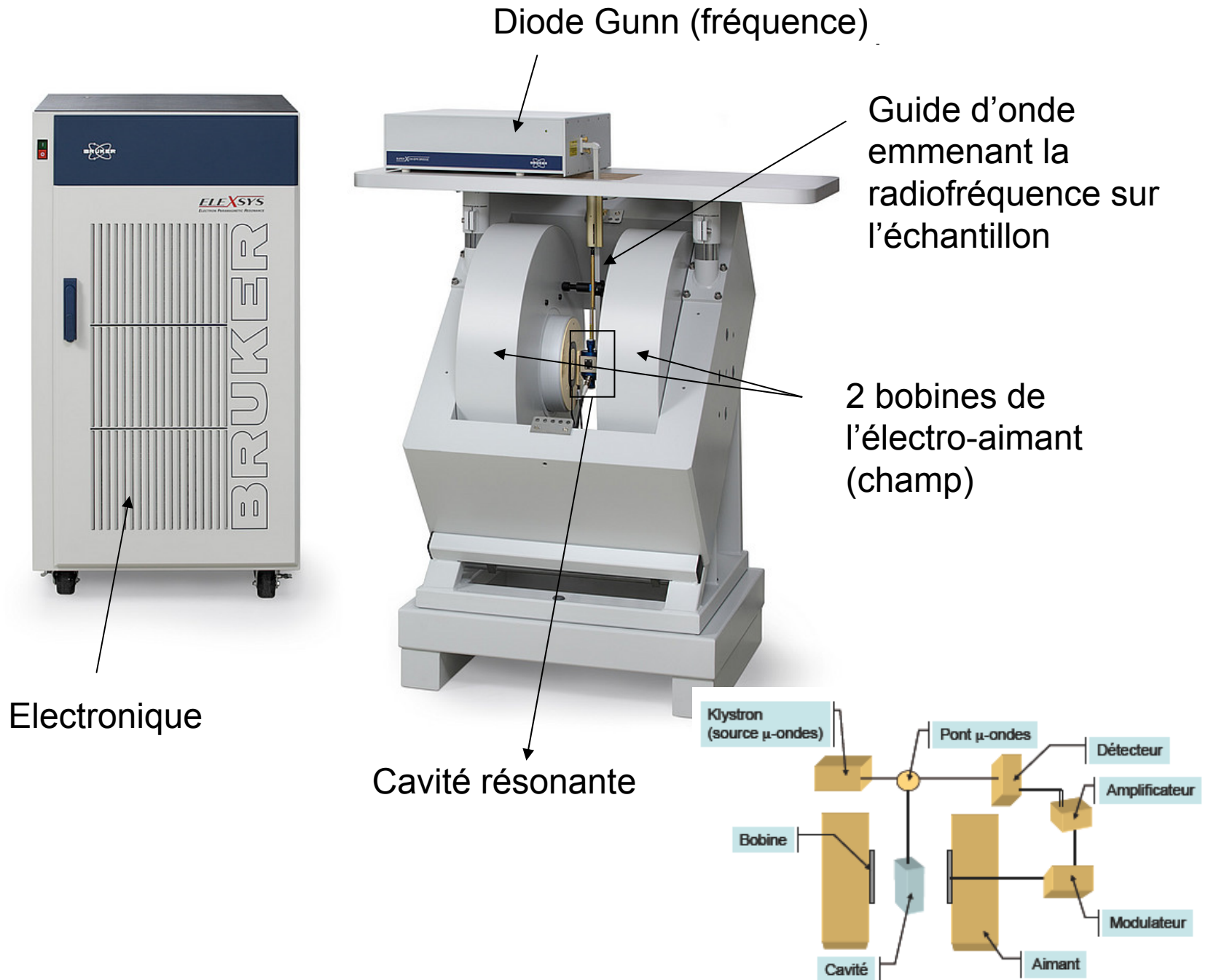
Diode Gunn (haute fréquence) pour la RPE



Pulse puis transformée de Fourier en RMN



Spectre RPE en unité de champ magnétique



Autres fréquences et champs de travail en RPE (moins classiques)

$$\nu = \frac{g\beta B_0}{h} = 2,8024 \cdot 10^{10} \cdot B_0$$



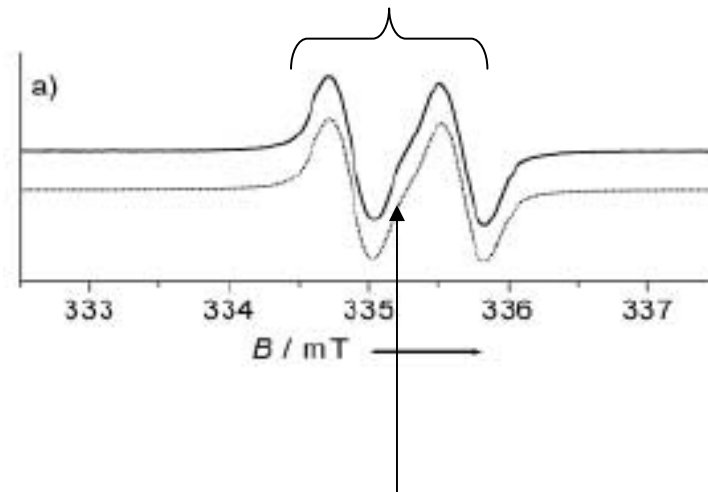
Bandes	B ₀	ν (GHz)
L	43 mT	1,2
S	114 mT	3,2
X	336 mT	9,4
K	892 mT	25
Q	1,249 T	35

W 3.5 T 95 GHz



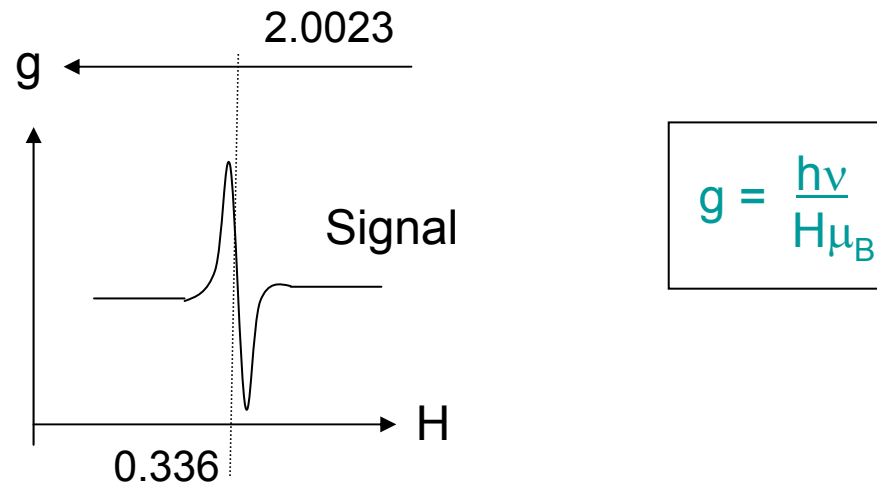
IV Données importantes en RPE

Eclatement du signal: Interaction entre l'électron et des noyaux environnants de spin nucléaire non nul



Position du centre du spectre → Informations sur le type de radical (métal, nitroxyde, phénoxyde ...)

A) Mesure de la position du pic de résonance



La position du pic se lit en gauss sur le spectre, mais s'exprime en g:

→ Pourquoi ? **Seul le g est propre à chaque molécule.**

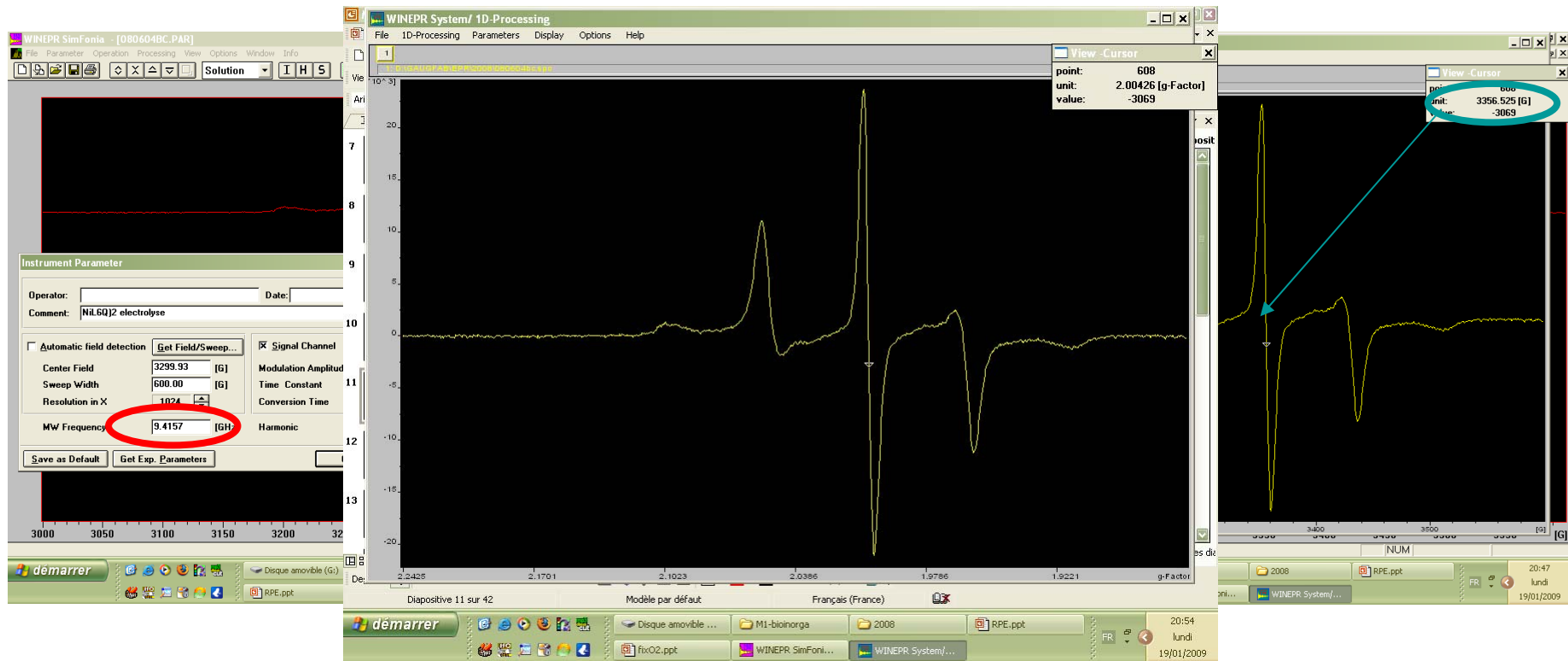
L'appareil doit être réglé avant d'enregistrer un spectre. Ce réglage consiste à accorder la fréquence propre de la cavité avec celle du spectro, et implique de modifier à chaque fois un peu la fréquence. **Si ν change entre chaque spectre alors H changera.** On s'affranchit de ceci en utilisant la valeur de g pour caractériser les systèmes.

g en RPE \approx δ (déplacement chimique) en RMN

La valeur de g se déduit du spectre en appliquant la relation $g = h\nu/(H\mu_B)$.

Le pic de résonance de l'électron libre s'observe à $g = 2.0023$. La valeur de g est plus élevée pour les autres radicaux.

Exemple de calcul de g à partir d'un spectre



$$g = h\nu / (H\mu_B)$$

$$g = (6,6260755 \cdot 10^{-34} \times 9.4151 \cdot 10^9) / (0.3356 \times 9,2740154 \cdot 10^{-24}) = 2.00443$$

Hz

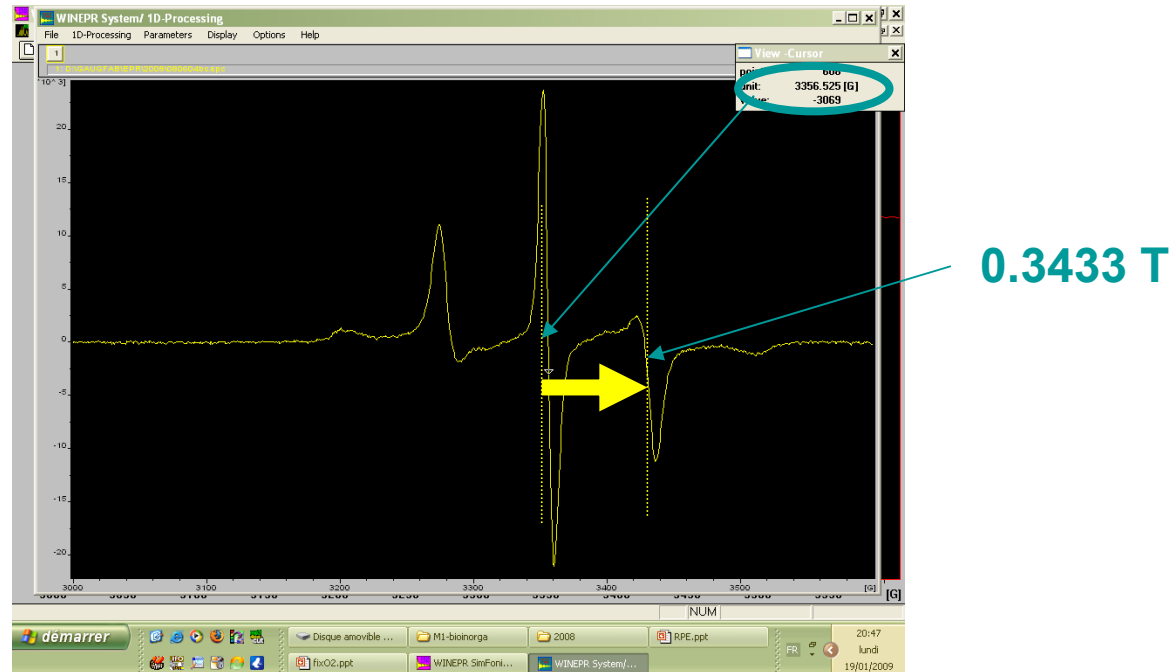
En Tesla (1 T = 1000 G)

Si ν d'un appareil différent = 9.63 GHz, alors pour cette même valeur de g

$$g = h\nu / (H\mu_B) \leftrightarrow H = h\nu / (g\mu_B)$$

$$H = (6,6260755 \cdot 10^{-34} \times 9.63 \cdot 10^9) / (2.00443 \times 9,2740154 \cdot 10^{-24}) = 0.3433 \text{ T}$$

Exemple de calcul de g à partir d'un spectre



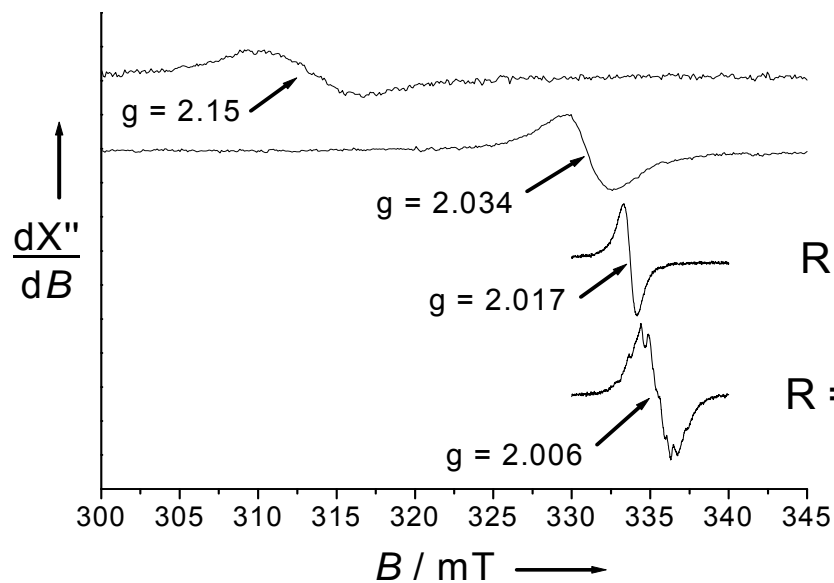
Si ν d'un appareil différent = 9.63 GHz, alors pour cette même valeur de g

$$g = h\nu / (H\mu_B) \leftrightarrow H = h\nu / (g\mu_B)$$

$$H = (6,6260755 \cdot 10^{-34} \times 9.63 \cdot 10^9) / (2.00443 \times 9,2740154 \cdot 10^{-24}) = 0.3433 \text{ T}$$

Valeurs de g typiques

- 2.0023 (électron libre) < $g < 2.2$
- g augmente lorsque des atomes lourds sont au voisinage de l'électron non apparié (fort couplage spin orbite):
 - Pour les radicaux phénoxyles, $g \approx 2.0045$.
 - Pour les radicaux nitroxydes $g \approx 2.0066$.
 - Pour les métaux d = $g > 2.05$

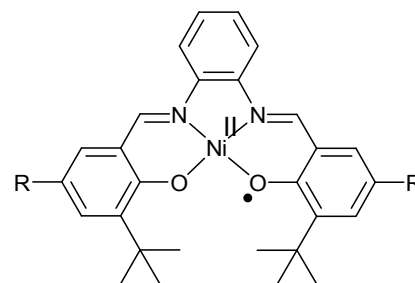


R = t-Bu dans pyridine* Spin: > 80% d, <20% p

R = t-Bu Spin: 6.6% d, 93.4% p

R = OMe Spin: 4.7% d, 95.3% p

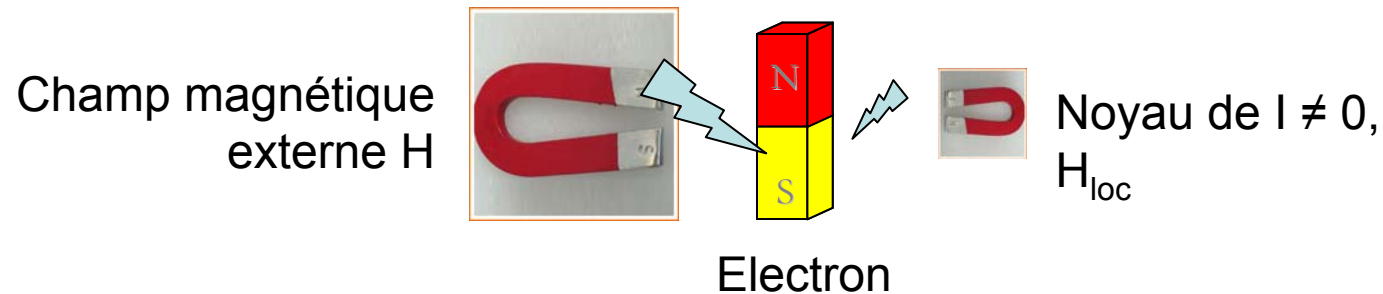
R = NMe₂ Spin: 1.8% d, 98.2% p



Ni(II) est diamagnétique

*: caractère Ni^{III} plutôt que Ni^{II}-radical

B) Eclatement du signal: Interaction électron-noyau *Exemple du radical H•*



L'électron non apparié est soumis à l'influence des atomes voisins possédant un moment magnétique, en particulier les **noyaux de $I \neq 0$** qui modifient le champ H. Cette interaction se décrit en tenant compte, en plus du terme Zeeman électronique ($E = g \cdot \mu_B \cdot H \cdot m_S$), de:

- 1) Terme Zeeman nucléaire (par analogie au terme Zeeman électronique)

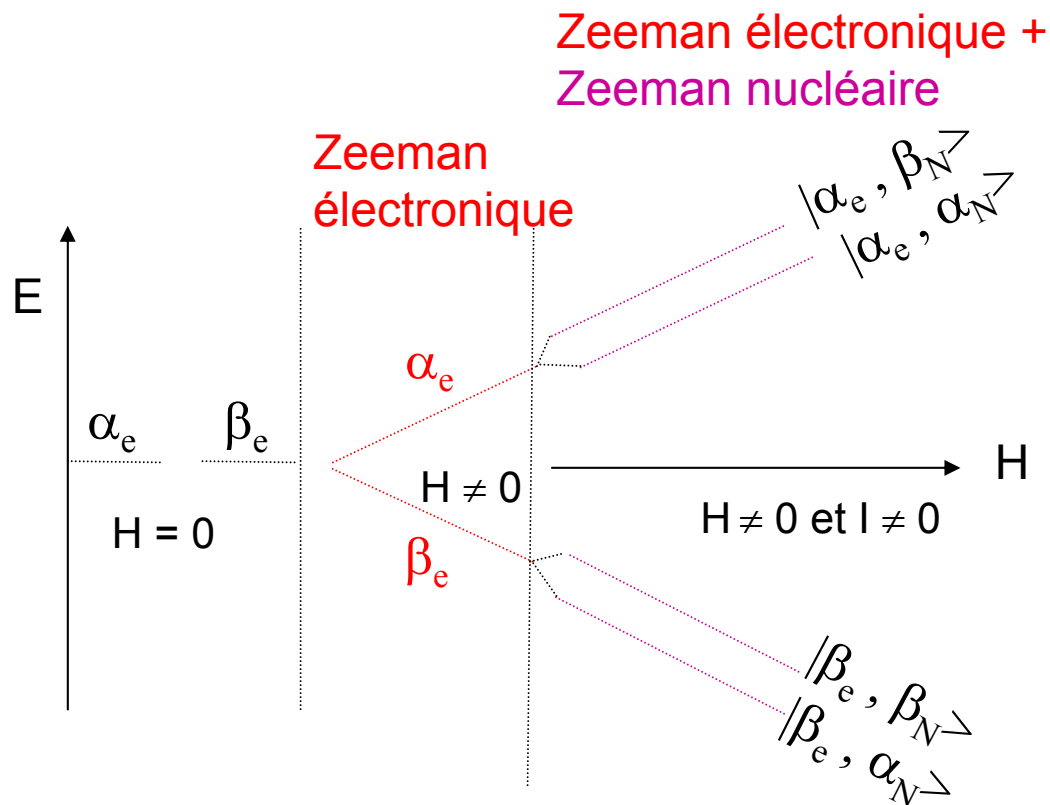
$$E_{\text{noyau}} = g_N \cdot \mu_N \cdot H \cdot m_I$$

- 2) Couplage électron-noyau

Terme scalaire a

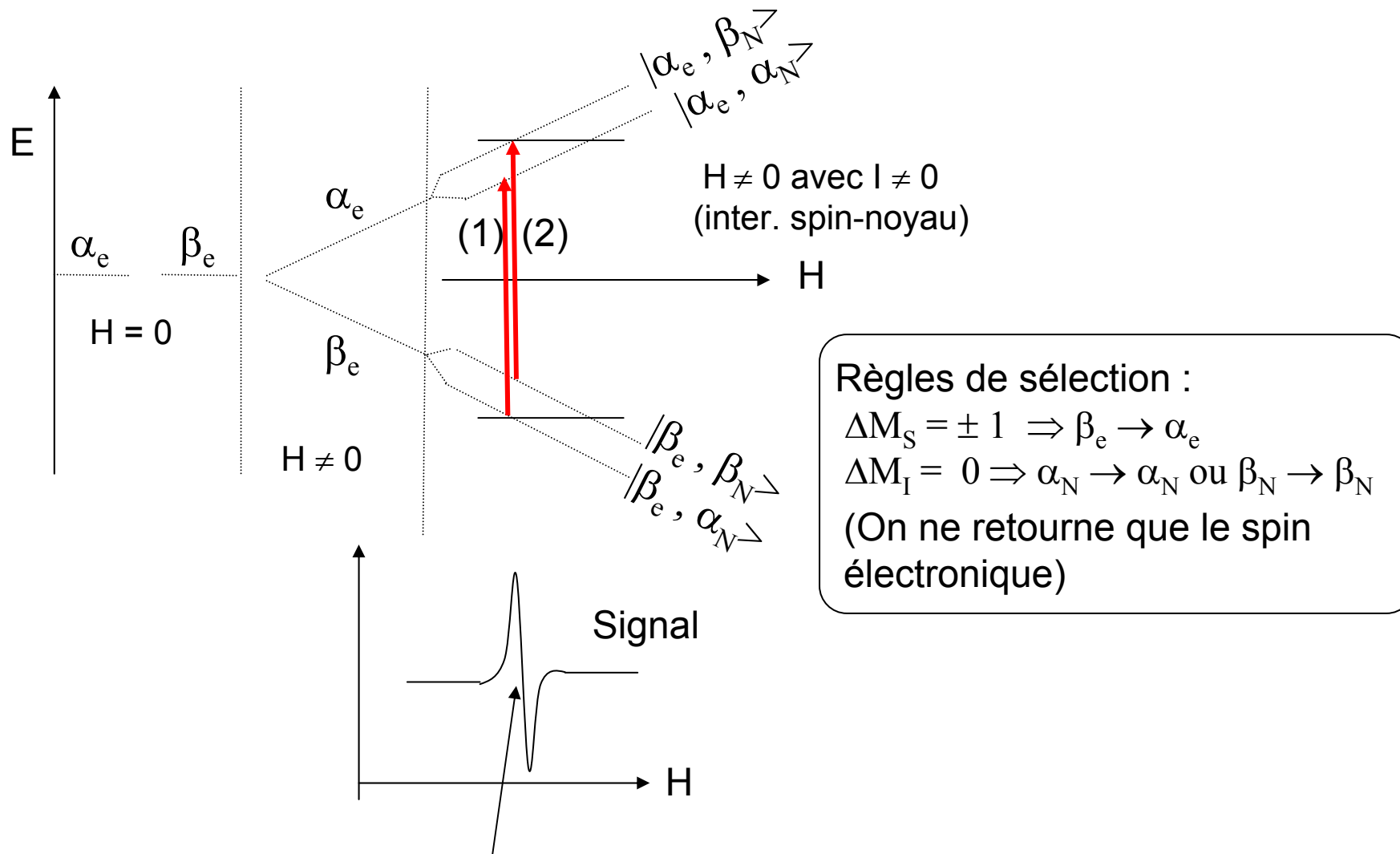
Effet du terme Zeeman nucléaire $E_{\text{noyau}} = g_N \cdot \mu_N \cdot H \cdot m_I$

Le niveau α_e (rem on rajoute l'indice e pour électron) va se trouver scindé en sous niveaux α_e, α_N et α_e, β_N . De la même façon, le niveau β_e (rem on rajoute l'indice e pour électron) va se trouver scindé en sous niveaux β_e, α_N et β_e, β_N .



Effet Zeeman nucléaire \ll Zeeman électronique
 → N'est représenté que sous la forme d'une perturbation

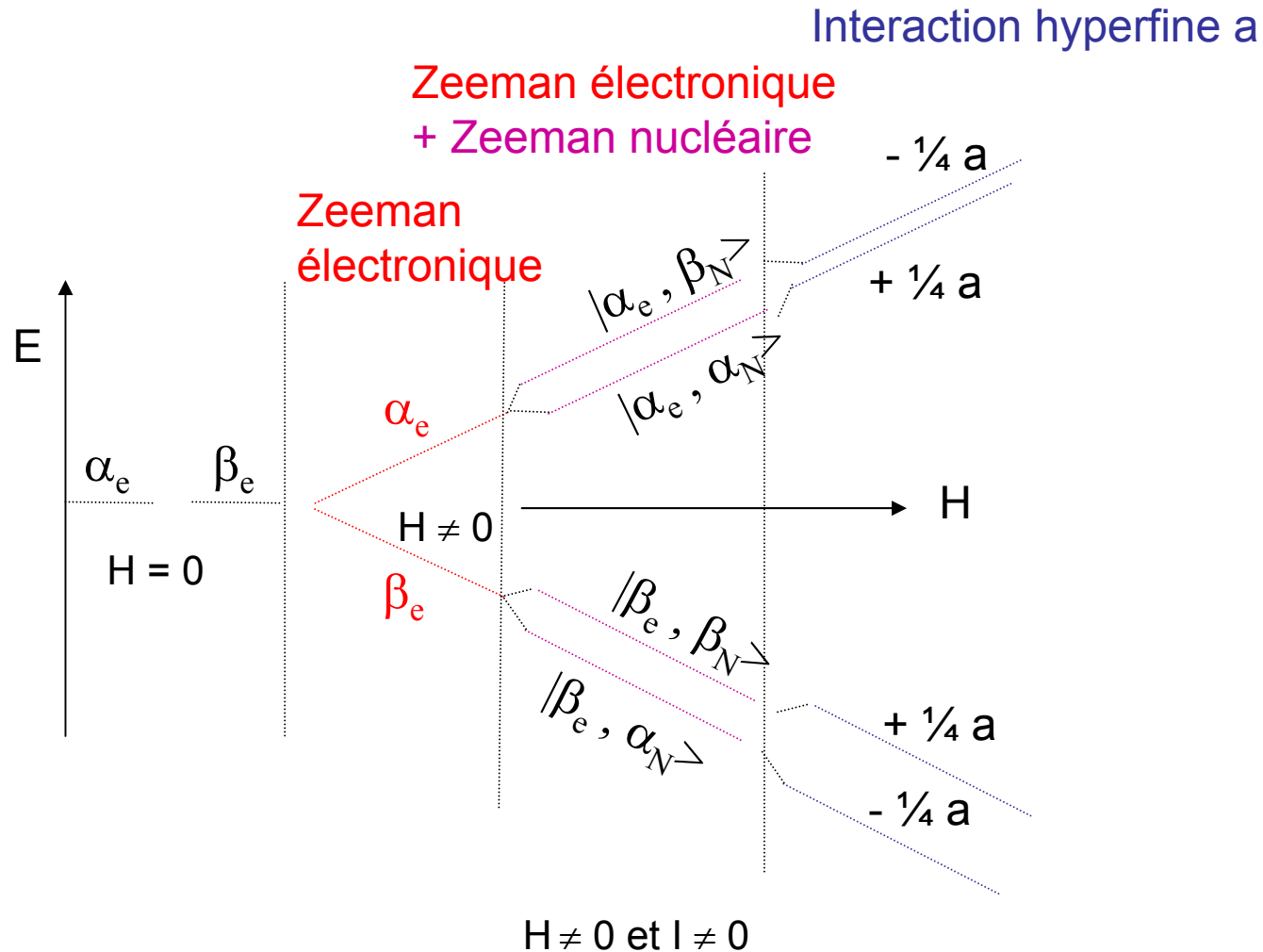
Transitions



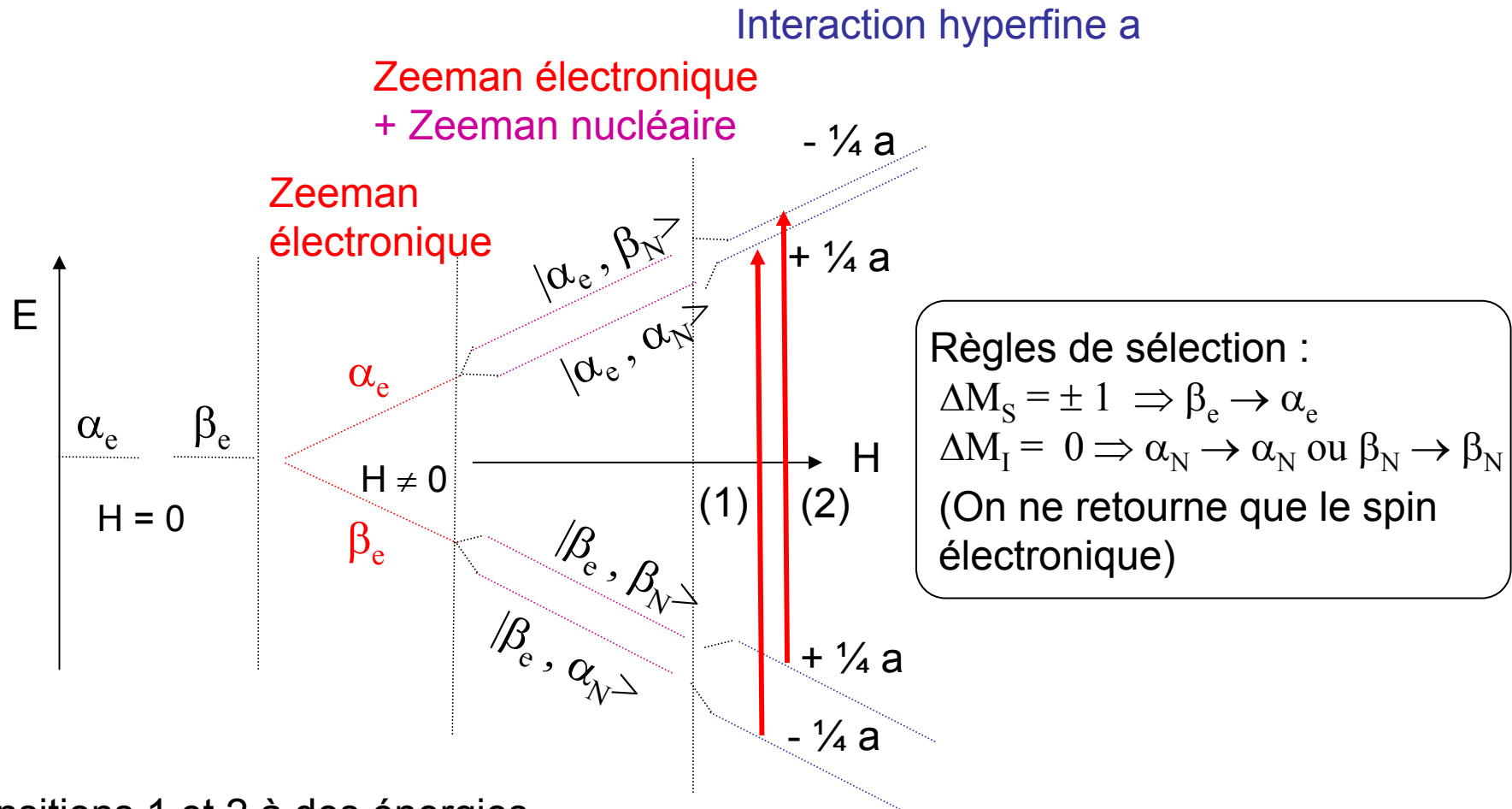
Transitions 1 et 2 à la même énergie: Un seul signal

Effet du **terme scalaire a**

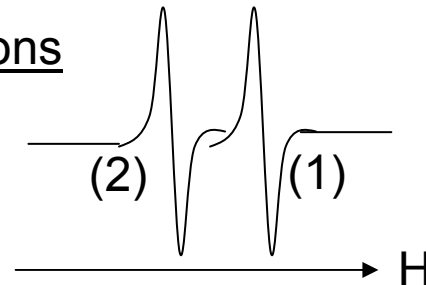
Le couplage entre le noyau et l'électron se manifeste par une modification des niveaux Zeeman.



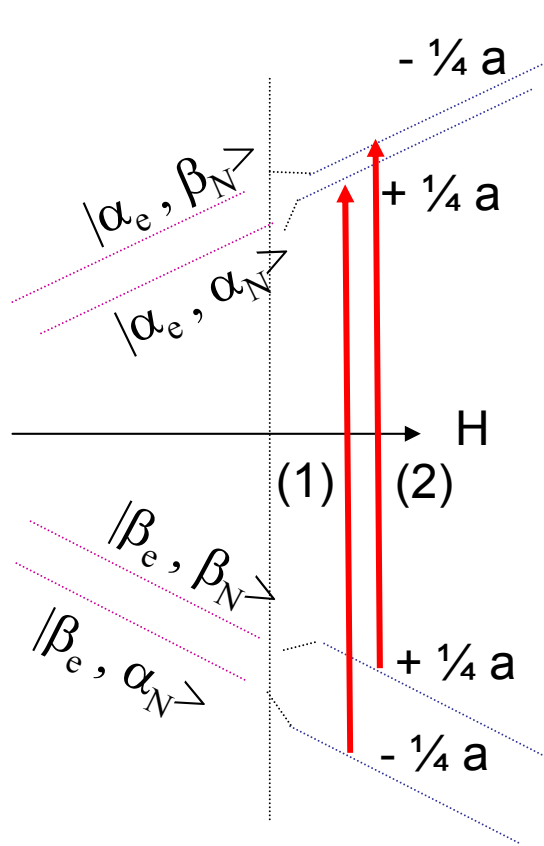
Effet du **terme scalaire a**



Transitions 1 et 2 à des énergies différentes: \Rightarrow On observe 2 transitions



Effet du **terme scalaire a**



$$+1/2 \llcorner E \llcorner -1/4 a$$

$$+1/2 \llcorner E \llcorner +1/4 a$$

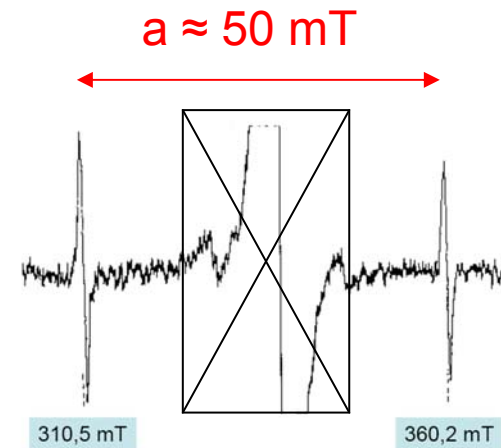
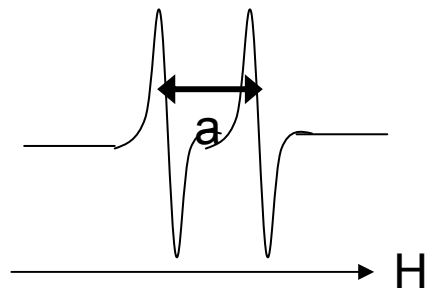
$$\text{Transition (1): } +1/2 \llcorner E \llcorner +1/4 a - (-1/2 \llcorner E \llcorner -1/4 a)$$

$$= E + 1/2 a$$

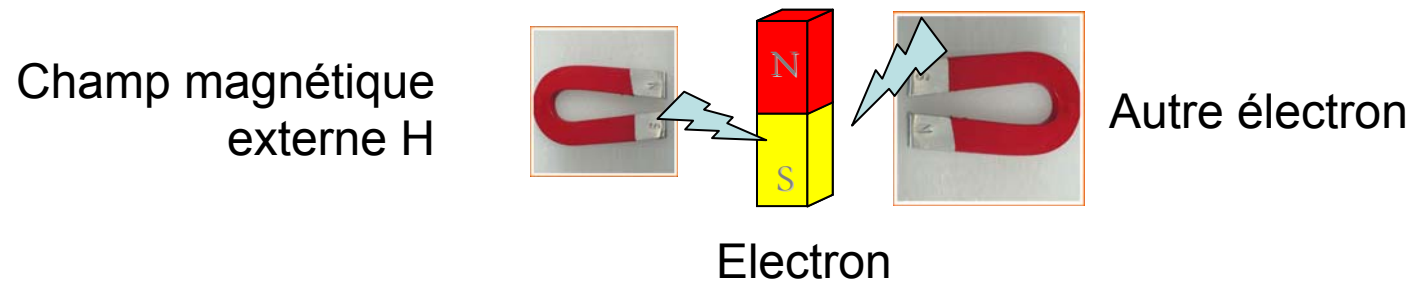
$$\text{Transition (2): } +1/2 \llcorner E \llcorner -1/4 a - (-1/2 \llcorner E \llcorner +1/4 a)$$

$$= E - 1/2 a$$

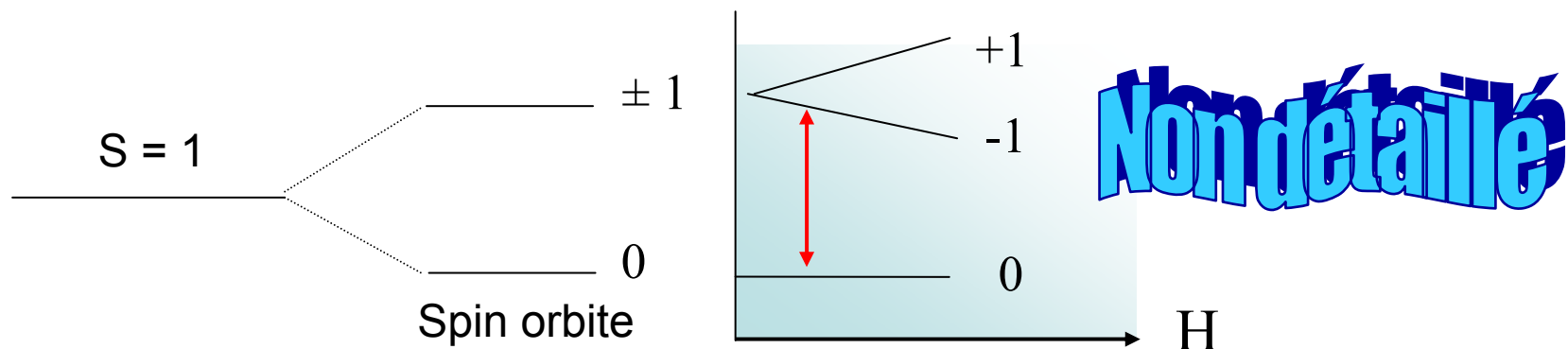
Soit 2 transitions séparées de a



C) Autres facteurs influençant l'allure d'un spectre: Interaction dipolaire lorsque 2 électrons proches ($S = \frac{1}{2} + \frac{1}{2}$)



L'électron non apparié est soumis à l'influence d'un autre électron situé à son voisinage. Le champ H produit par cet autre électron est tellement fort qu'il va lever la dégénérescence de S en niveaux m_S . Ces niveaux m_S prennent les valeurs comprises entre $+S$ en $-S$ par pallier d'une unité mais restent dégénérées quant à leur signe (Cf diagramme). Ce phénomène est sous l'influence du couplage spin-orbite (faible couplage = faible écart entre les niveaux). La dégénérescence de signe est levée par application d'un champ magnétique externe.



V. Calcul du nombre de raies

L'interaction entre un électron et un noyau de spin non nul se manifeste par un couplage hyperfin et une multiplication du nombre de raies. La multiplicité de spin nucléaire détermine le nombre de raies (toutes équidistantes et de même intensité)

D'une manière générale:

- Lorsque n noyaux équivalents de spin nucléaire I_n sont couplés à l'électron non apparié:

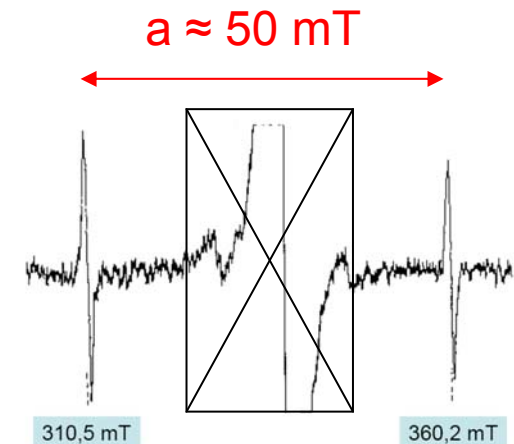
$$\text{Nombre de raies} = 2 I_n \times n + 1$$

- Lorsque n noyaux équivalents I_n et n' noyaux équivalents $I_{n'}$ sont couplés à l'électron non apparié:

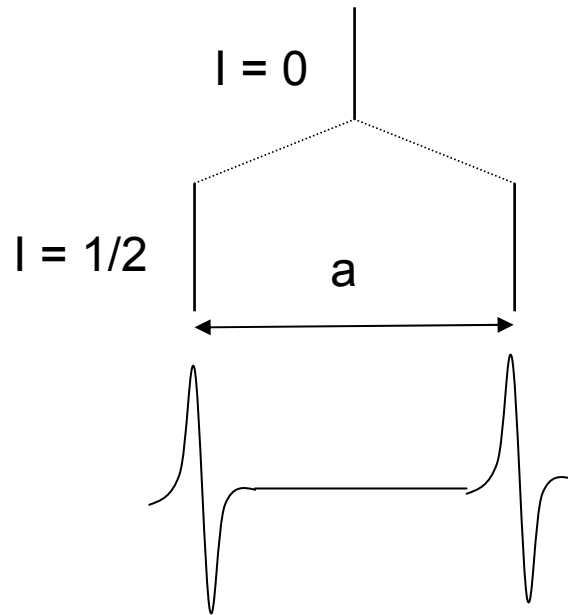
$$\text{Nombre de raies} = (2 I_n \times n + 1) \times (2 I_{n'} \times n' + 1)$$

Ex: Radical H•

$$\text{Nombre de raies} = 2 \times \frac{1}{2} \times 1 + 1 = 2 \text{ raies}$$

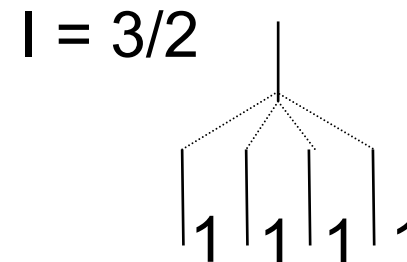
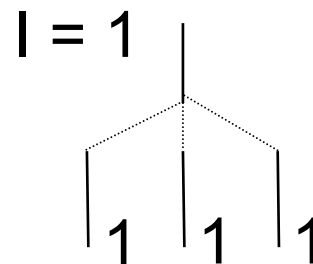
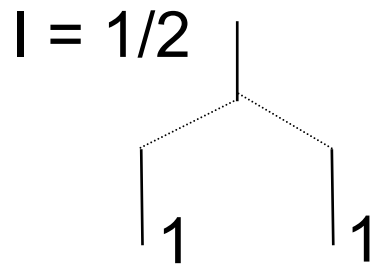


Effet de I_n sur le nombre de raies: Diagrammes en bâtonnets



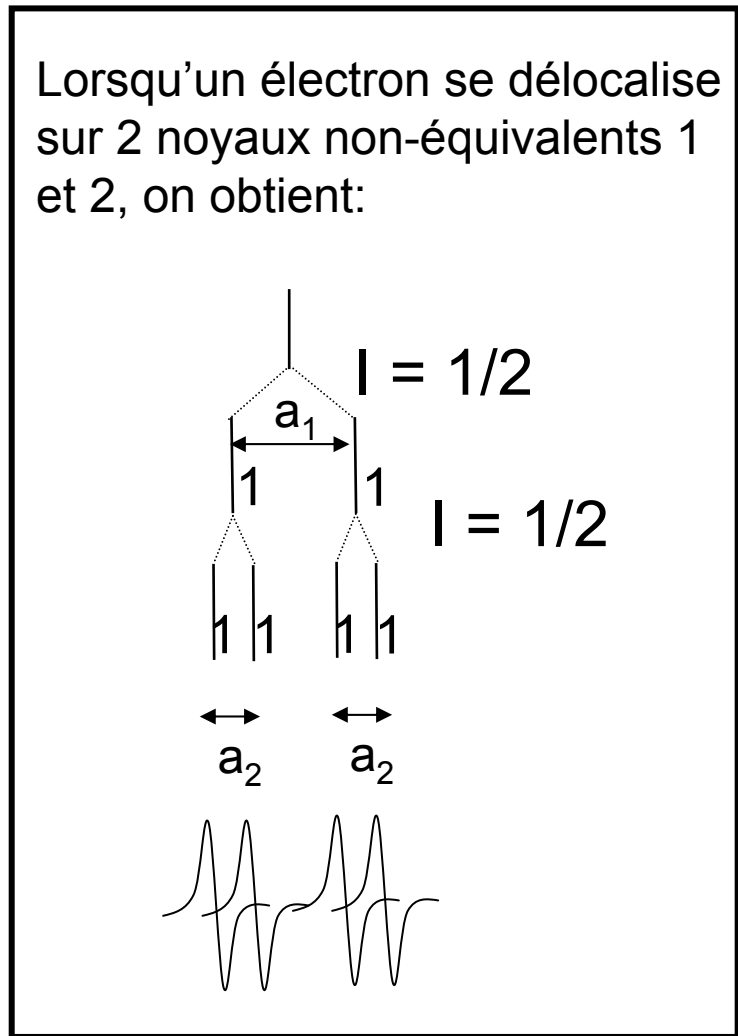
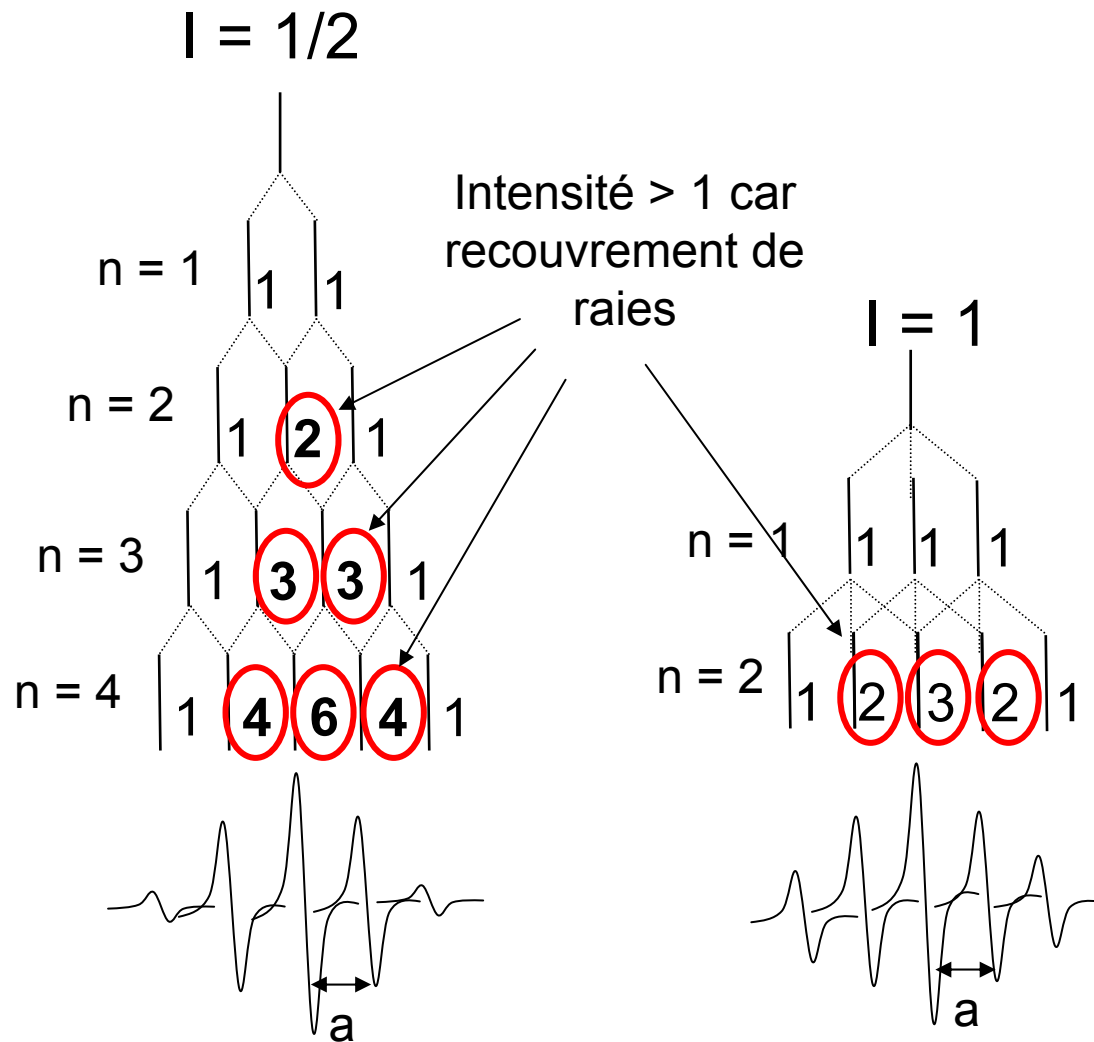
Intensité des raies:

- $I = 1/2 \rightarrow 2 \times 1 \times 1/2 + 1 = 2$ raies
- $I = 1 \rightarrow 2 \times 1 \times 1 + 1 = 3$ raies
- $I = 3/2 \rightarrow 2 \times 1 \times 3/2 + 1 = 4$ raies



Multiplicité lorsque $n > 1$

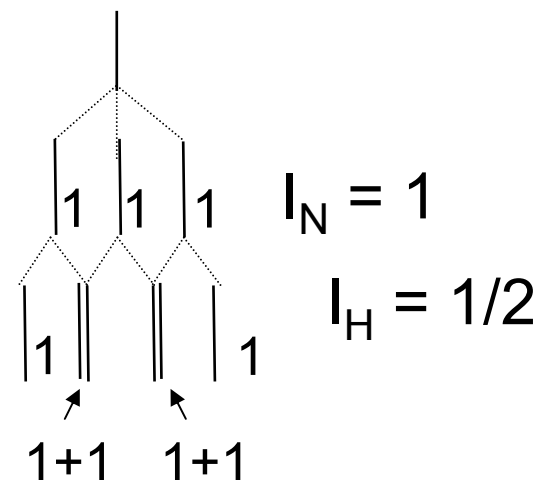
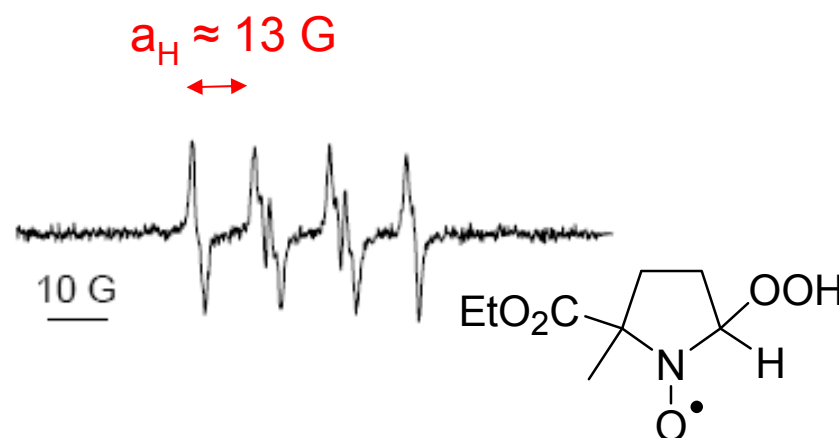
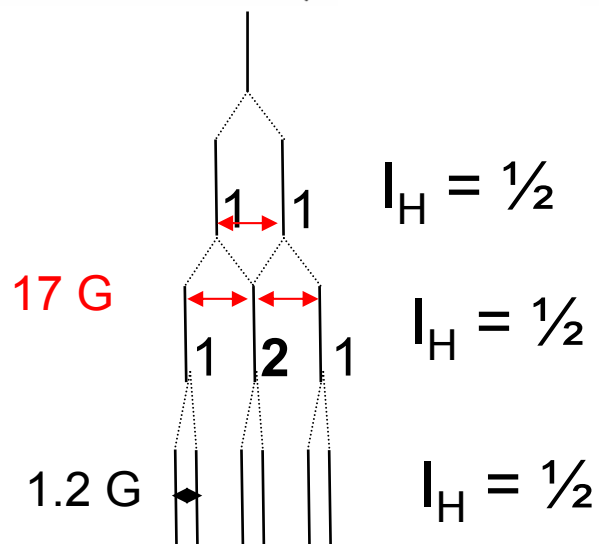
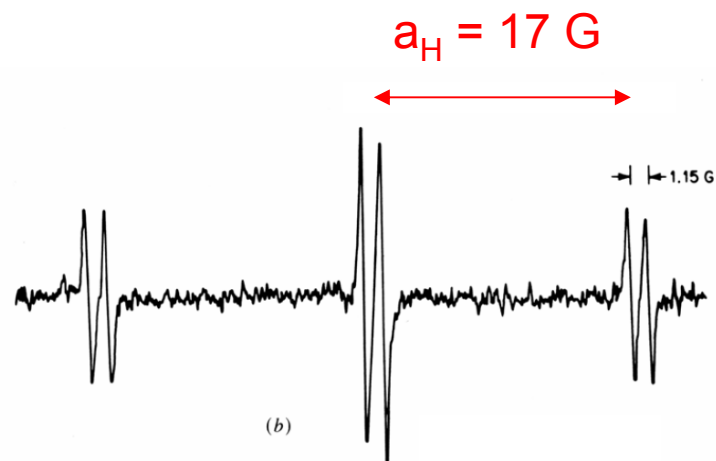
Lorsqu'un électron se délocalise sur n noyaux équivalents, on obtient:



Intensité quand n noyaux de $I = 1/2$: Triangle de Pascal

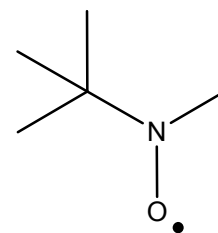
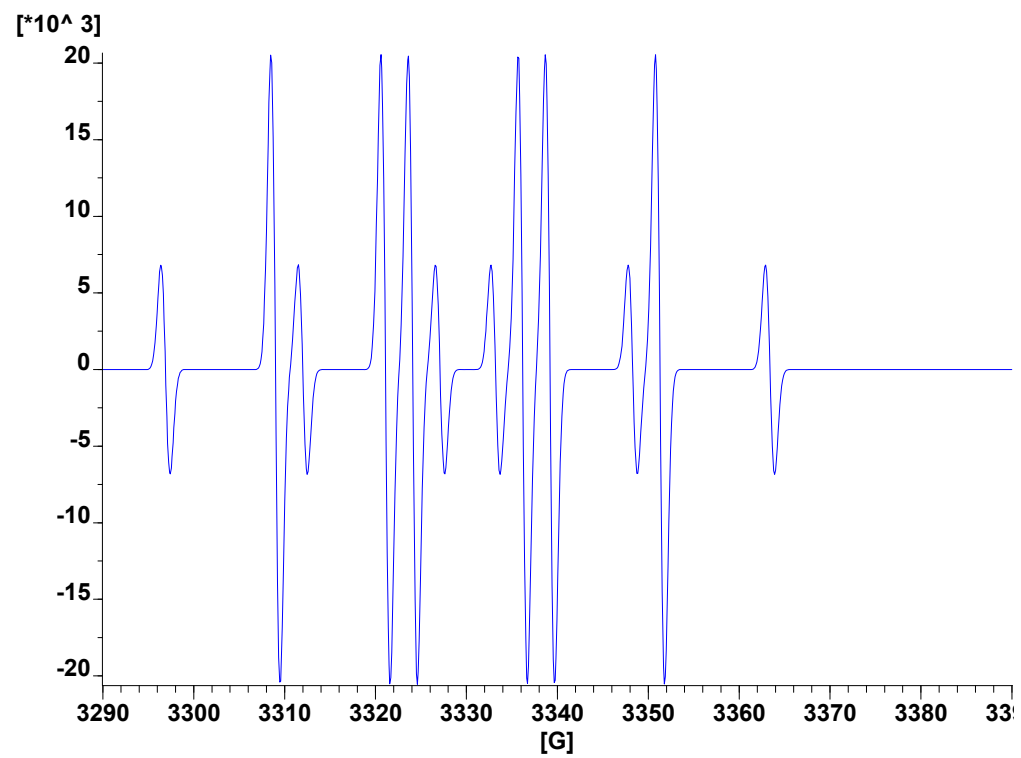
$n = 0$				1							
$n = 1$				1	1						
$n = 2$				1	2	1					
$n = 3$				1	3	3	1				
$n = 4$				1	4	6	4	1			
$n = 5$				1	5	10	10	5	1		
$n = 6$				1	6	15	20	15	6	1	
$n = 7$				1	7	21	35	35	21	7	1

Quelques exemples de spectres isotropes de radicaux organiques: Interaction via les liaisons



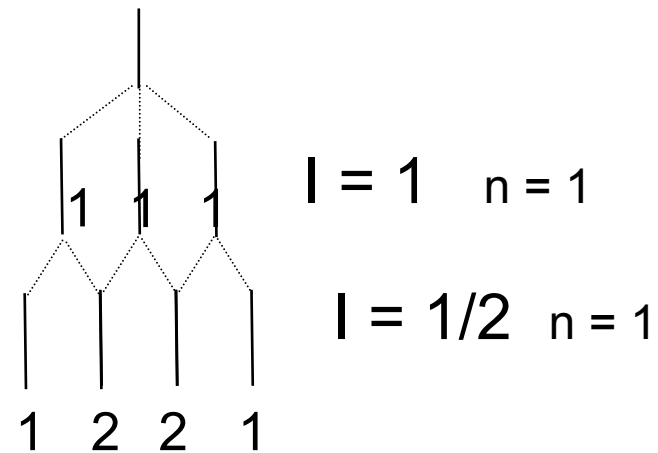
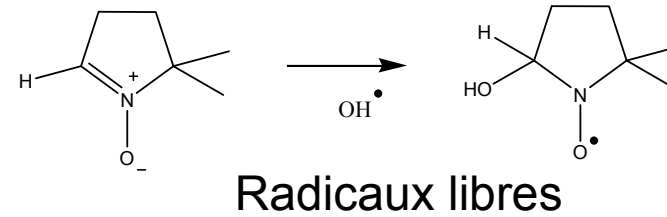
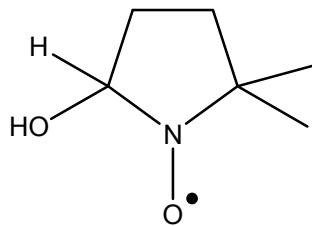
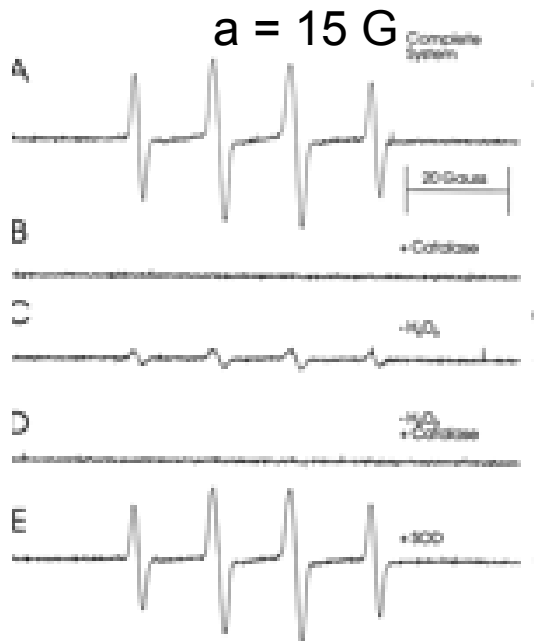
A est d'autant plus élevée que le noyau de $I \neq 0$ est proche de l'électron célibataire

Rappel: $I_O = I_C = 0$

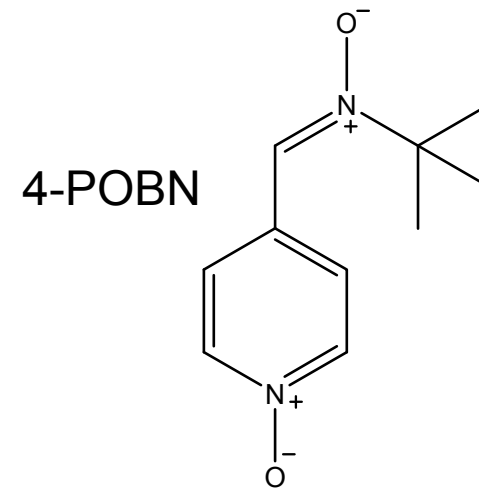
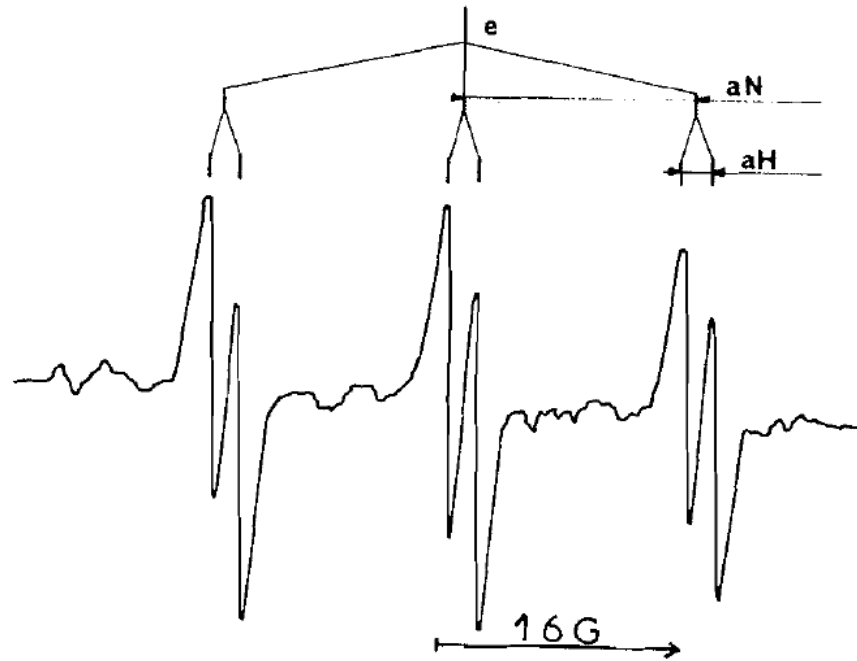


Spectre d'un spin trap universel: DMPO

DMPO/SG

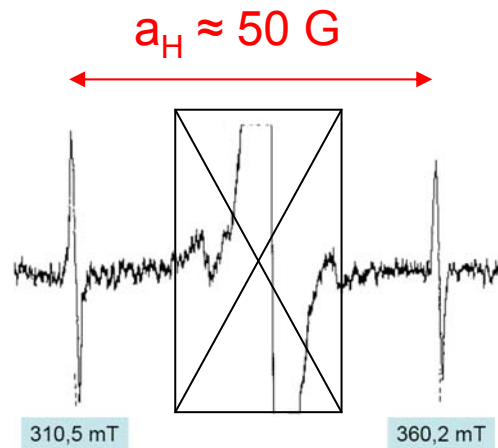


Spectre d'un spin trap moins universel: 4-POBN

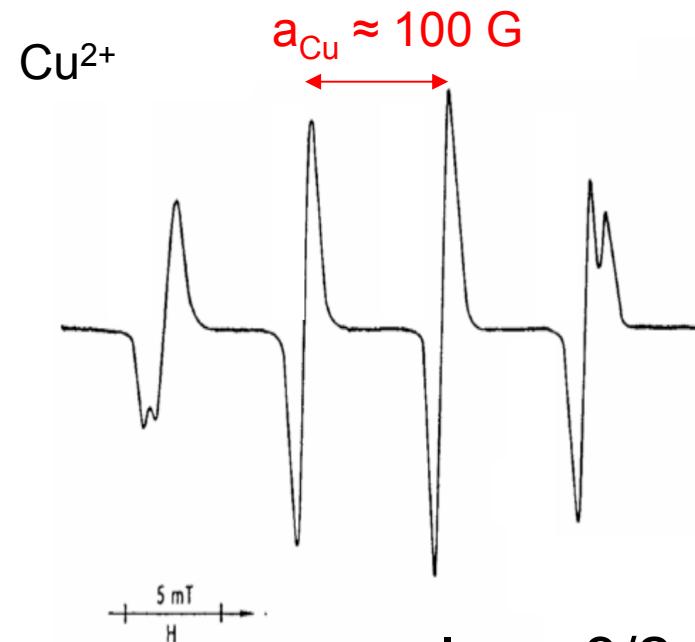


Spectres isotropes de composés dans lesquels l'électron célibataire est porté par un noyau de $I \neq 0$

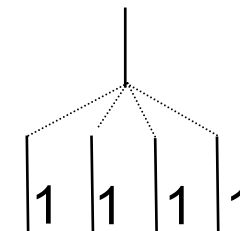
Radical $H\cdot$



Constantes de couplage hyperfines beaucoup plus élevées que précédemment car interaction beaucoup plus forte entre l'électron célibataire et le noyau.

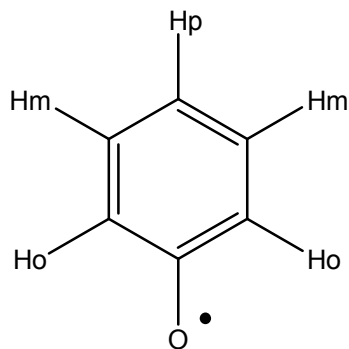


$$I_{Cu} = 3/2$$



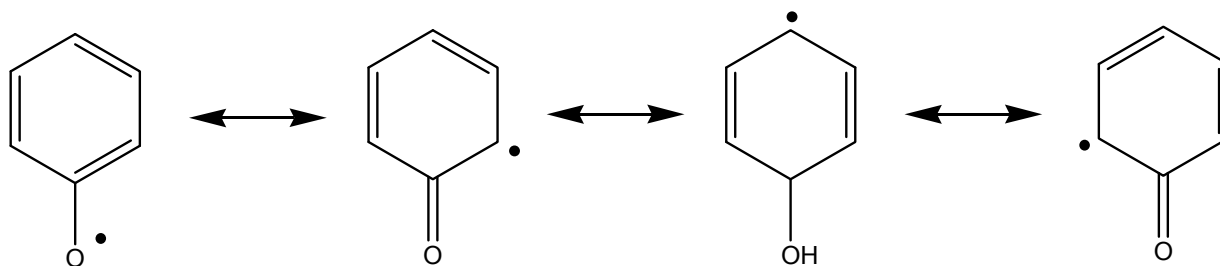
Rem: spectre en phase inversée

Interactions hyperfines et mésomérie

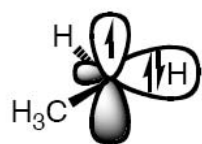
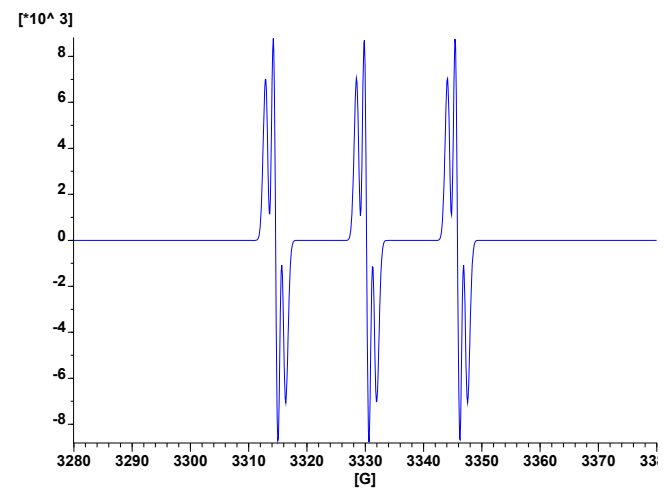
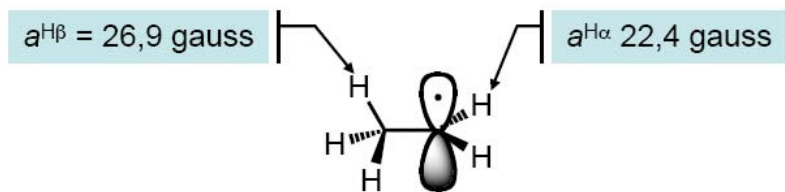


Radical phénoxy

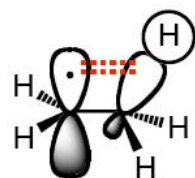
Bien que Hm soient plus près que Hp, $a_{Hp} \gg a_{Hm}$ à cause de la mésomérie



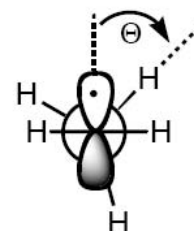
Interactions hyperfines et interactions à longue distance



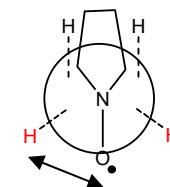
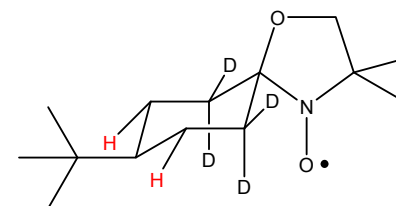
Interaction par polarisation de spin



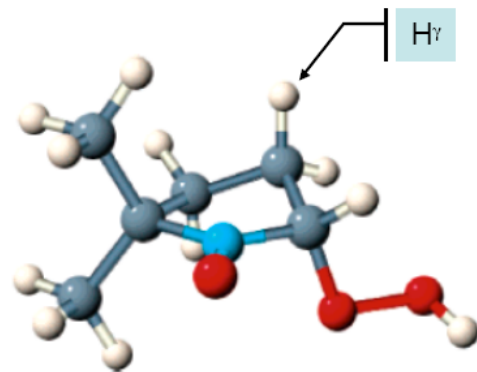
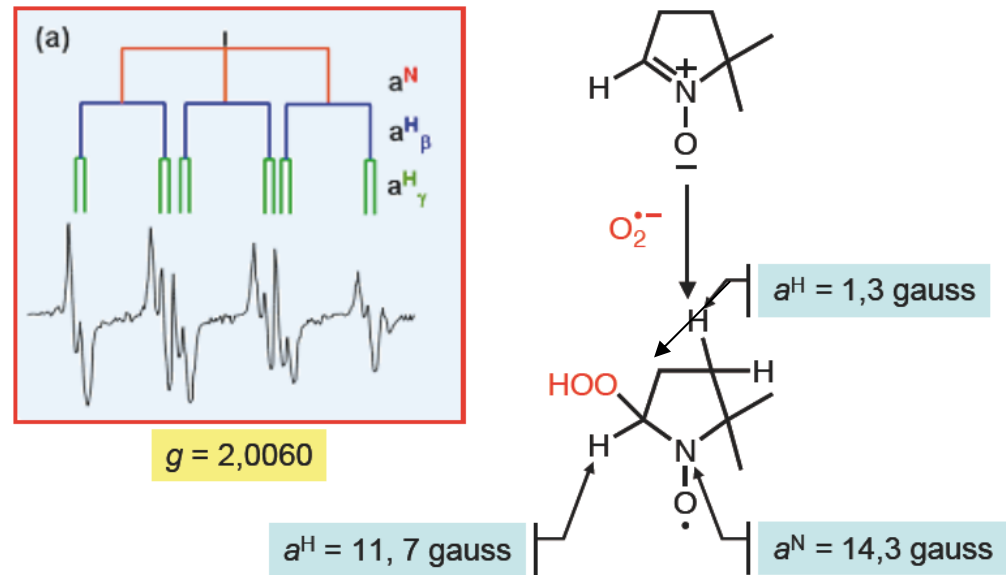
Interaction par hyperconjugaison



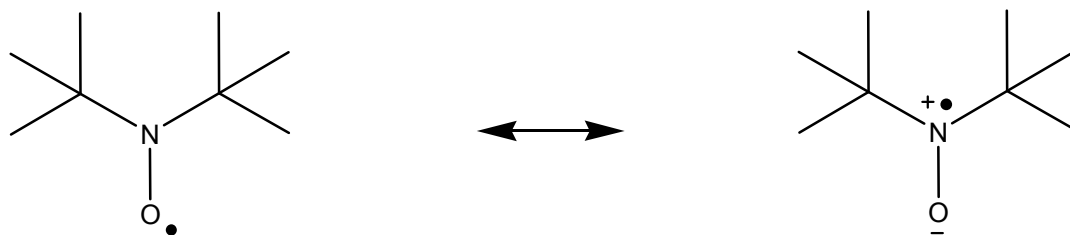
$$a^{H\beta} = A + B \cos^2 \theta$$



DMPO, piégeage du superoxyde



Interactions hyperfines et solvant



Pas de charges partielles: Forme favorisée en solvant apolaire

Apparition de charges partielles: Forme favorisée en solvant polaire



Electron non apparié plus loin de l'azote: a_N plus petit



Electron non apparié porté par l'azote: a_N grand

$a_N = 14.8 \text{ G}$, $g = 2.0061$ (hexane)

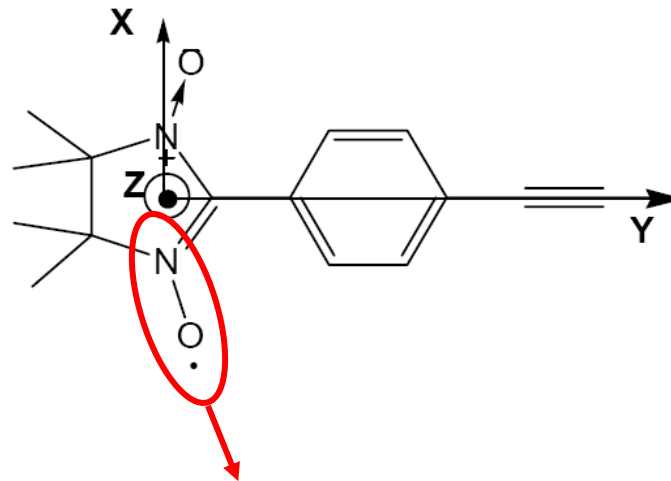
$a_N = 16.7 \text{ G}$, $g = 2.0056$ (eau)

VI. Anisotropie en g

Les valeurs de g vont varier selon l'axe choisi car la circulation des électrons va être perturbée selon des directions privilégiées dans l'espace.

On définira des valeurs de g généralement en fonction des axes x,y,z (symétrie rhombique), ou des valeurs de $g_{//}$ et g_{\perp} au champ magnétique externe (symétrie axiale)

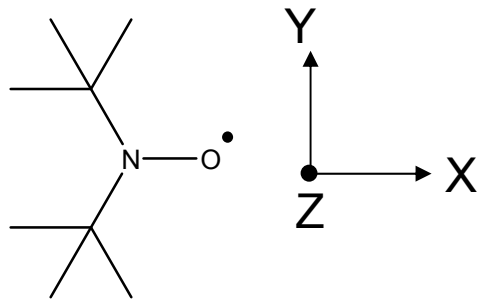
Exemple



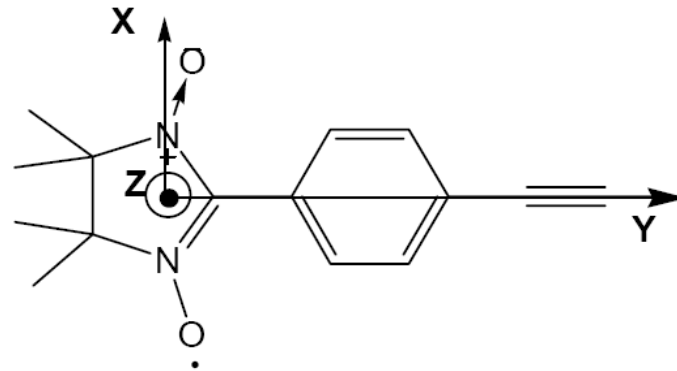
Axe x: Le plus influencé par le couplage SO (avec les atomes NO•) $\rightarrow g_x = 2.011$

Axe z: Le moins influencé (orthogonal) $\rightarrow g_z = 2.003$

Axe y: Intermédiaire $\rightarrow g_y = 2.007$



$g_x = 2.0088$
 $g_y = 2.0061$
 $g_z = 2.0027$



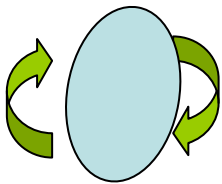
$g_x = 2.011$ → Effet plus important des 2 NO
 $g_y = 2.007$
 $g_z = 2.003$

Spectres isotropes et anisotropes

Solution isotrope:

Molécules tournent sur elles-mêmes: On obtient une valeur de g moyenne appelée g_{isotrope} qui est proche (mais un peu différente) de la moyenne des $g_{\text{anisotrope}}$ appelée g_{moyen} .

Rem: $g_{\text{moyen}} = (g_x + g_y + g_z)/3$

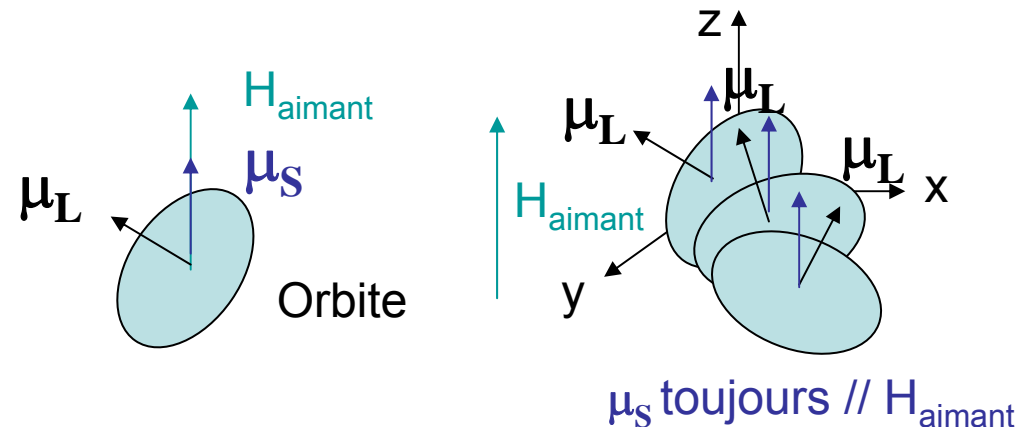


Solution gelée ou solide :

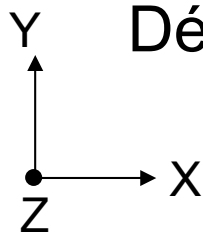
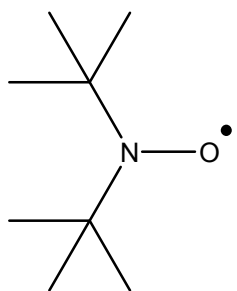
μ_S et μ_L sont couplés, mais μ_L non colinéaire à H
→ Résultante entre μ_L et μ_S non colinéaire à H . La réponse du système va donc dépendre de la direction de la perturbation.

→ On observe un déplacement (anisotropie) de la position de la résonance lorsqu'on effectue des rotations dans différents plans cristallins d'un monocristal.

→ En solution gelée on observe une somme de spectres correspondant à toutes les orientations de molécules: Permet d'obtenir toutes les valeurs de $g_{\text{anisotrope}}$ (g_x, g_y, g_z). En cristal on observe soit g_x , soit g_y , soit g_z en fonction de son orientation



Détermination des g anisotropes



$g_x = 2.0088$
 $g_y = 2.0061$
 $g_z = 2.0027$

$a_x = 7.1 \text{ G}$
 $a_y = 5.6 \text{ G}$
 $a_z = 32.0 \text{ G}$

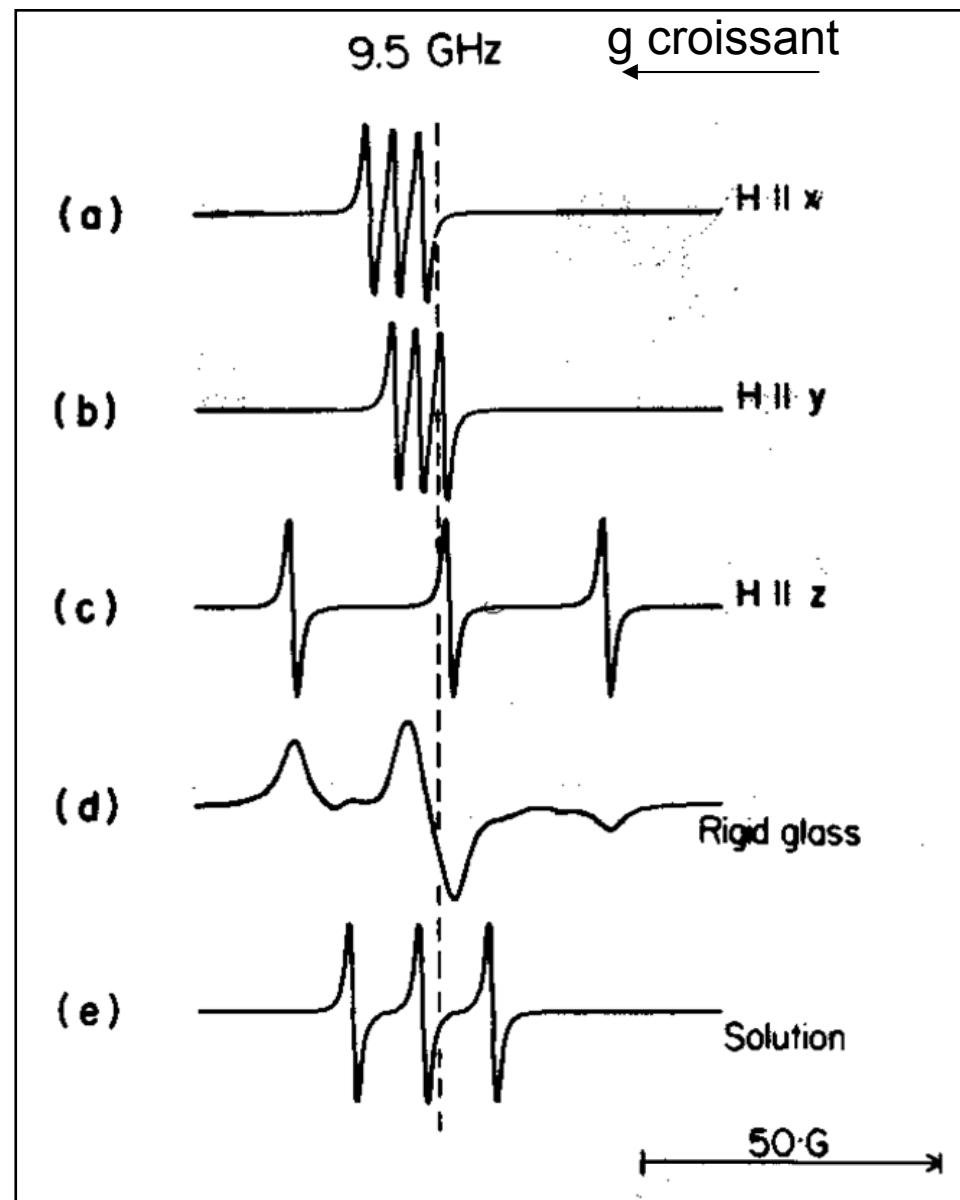
Single Crystal - x

Single Crystal - y

Single Crystal - z

Polycrystalline

Crystal Dissolved
in Water



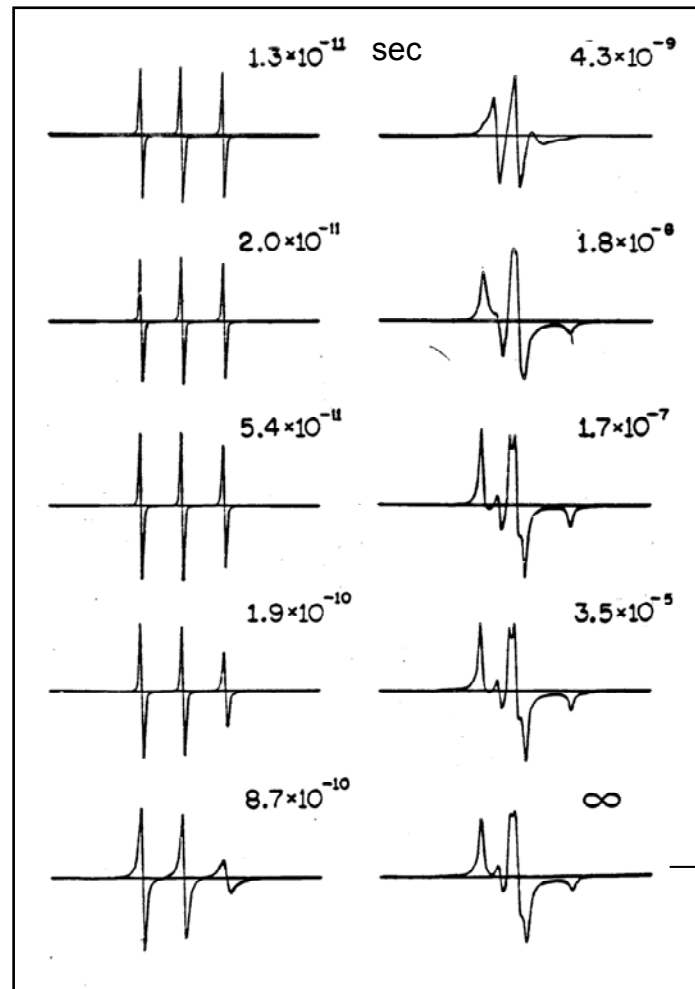
Remarquez que a est anisotrope également ! ($a_z \neq a_y \neq a_x$)

Spectres RPE et temps de corrélation rotationnel τ_r

$$\tau_r = 4\pi\eta r_h^3 / 3kT \quad r = \text{rayon de la molécule}, \eta = \text{viscosité du milieu}$$

Temps mis par la molécule pour tourner d'un radian

Nitroxyde dans H₂O



Petite protéine

Grosse protéine 1 MDa

~ Spectre dans une matrice rigide

$$\tau_c = 6.6 \cdot 10^{-10} \times \Delta H_{(+1)} \times [h_{(+1)}/h_{(-1)} - 1]$$

$\Delta H_{(+1)}$ = largeur de raie bas champ, $h_{(+1)/(-1)}$ = hauteurs des raies haut/bas champ

Applications en biologie: « Spin labelling »

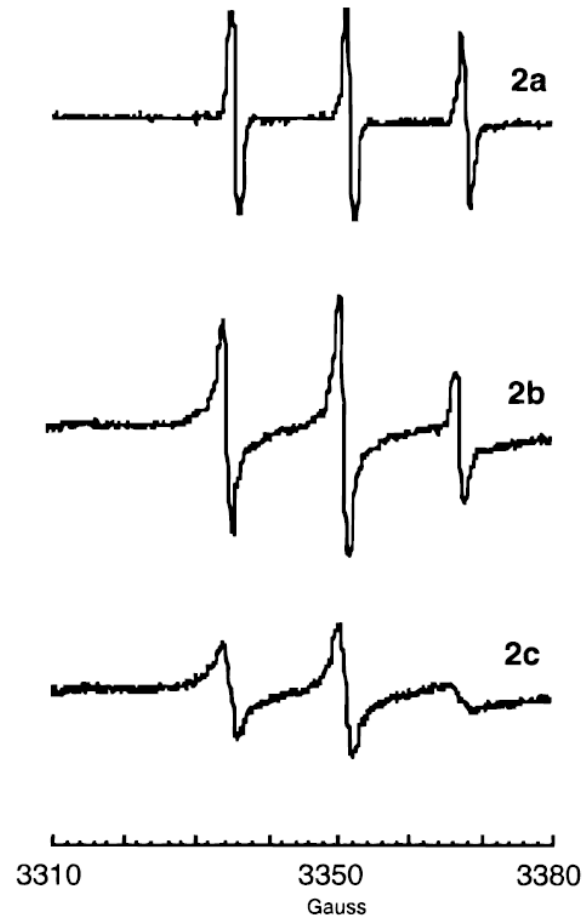
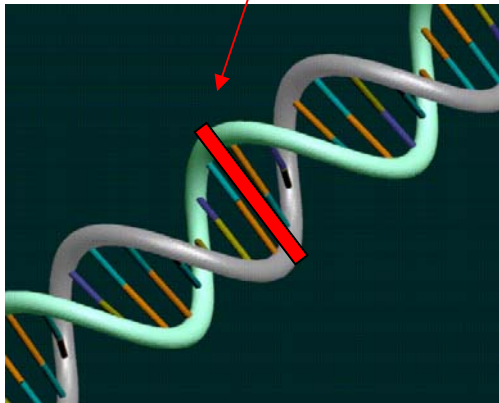
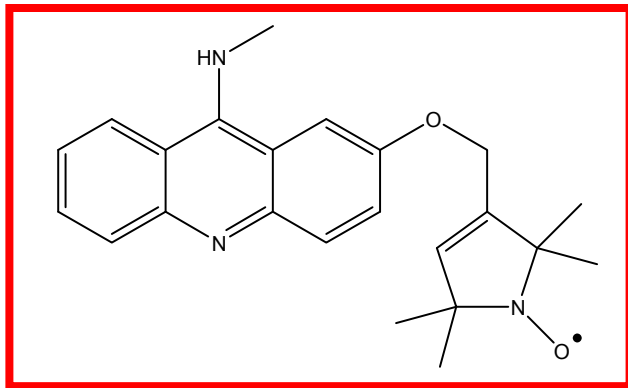


FIGURE 2: EPR spectra of (a) **5**, 2×10^{-5} M, in 25 mM Tris-HCl, pH 7.0, 0.1 M NaCl, and 0.2 mM EDTA with 2% DMSO; (b) **5**, 2×10^{-5} M, in the presence of oligonucleotide TA, 4.56×10^{-5} M; (c) subtraction of spectrum 2a from spectrum 2b.

Intercalation entre les paires de base l'ADN → Mouvement de la sonde devient mouvement de l'oligonucléotide

« Spin labelling »: Fluidité de membranes

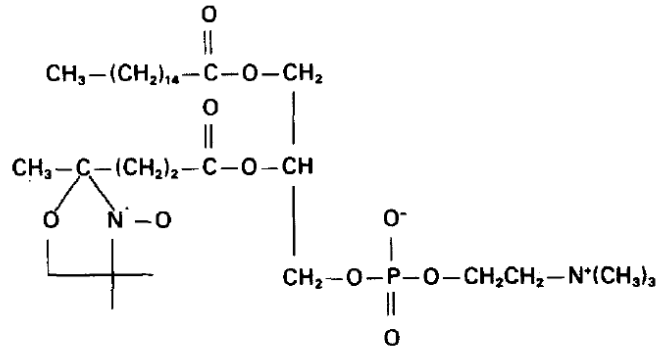


Fig. 1. The chemical structure of probe 1, 1-palmitoyl-2-(4)-doxyl-pentanoyl glycerophosphocholine.

Spectres plus fins: Fluidité augmente

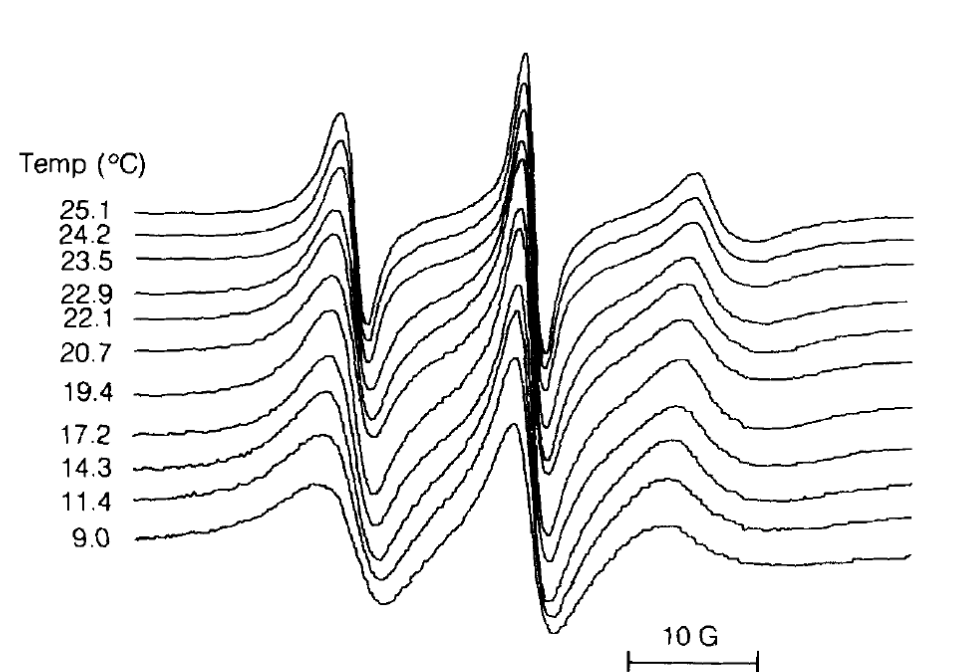
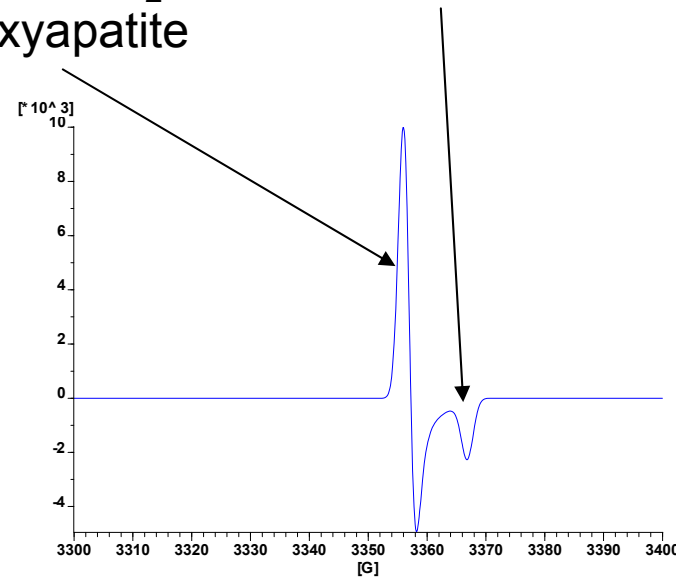
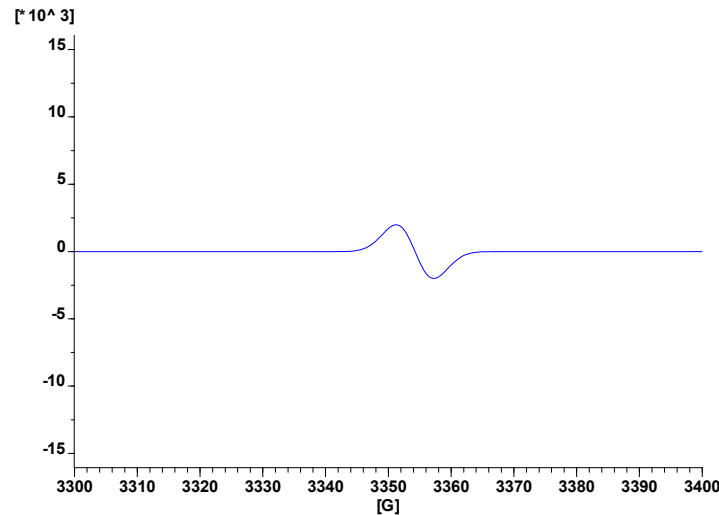


Fig. 2. Temperature-dependency of the ESR spectra of spin probe 1 in dimyristoylphosphatidylcholine multi-lamellar membranes in phosphate-buffered saline, pH 7.4. The membrane vesicles containing spin probe 1 were prepared as described in Methods. The host lipid concentration was 10 mM and the molar ratio of probe-to-lipid was 1-to-100.



Détection de l'irradiation dans des os

$g_1 = 2.0030-2.0033$ et $g_2 = 1.9969-1.997$
→ Radical hydroxyapatite



Os non irradié (gauche) ou irradié à 2 kGy (droite) ; Freq. 9.41 GHz, power : 10 mW, Mod Freq. 100 KHz, Amp. 4 G.

Signal non symétrique: Le dédoublement n'est pas du à une constante de couplage mais à une anisotropie en g (phénomène typique pour un échantillon solide)

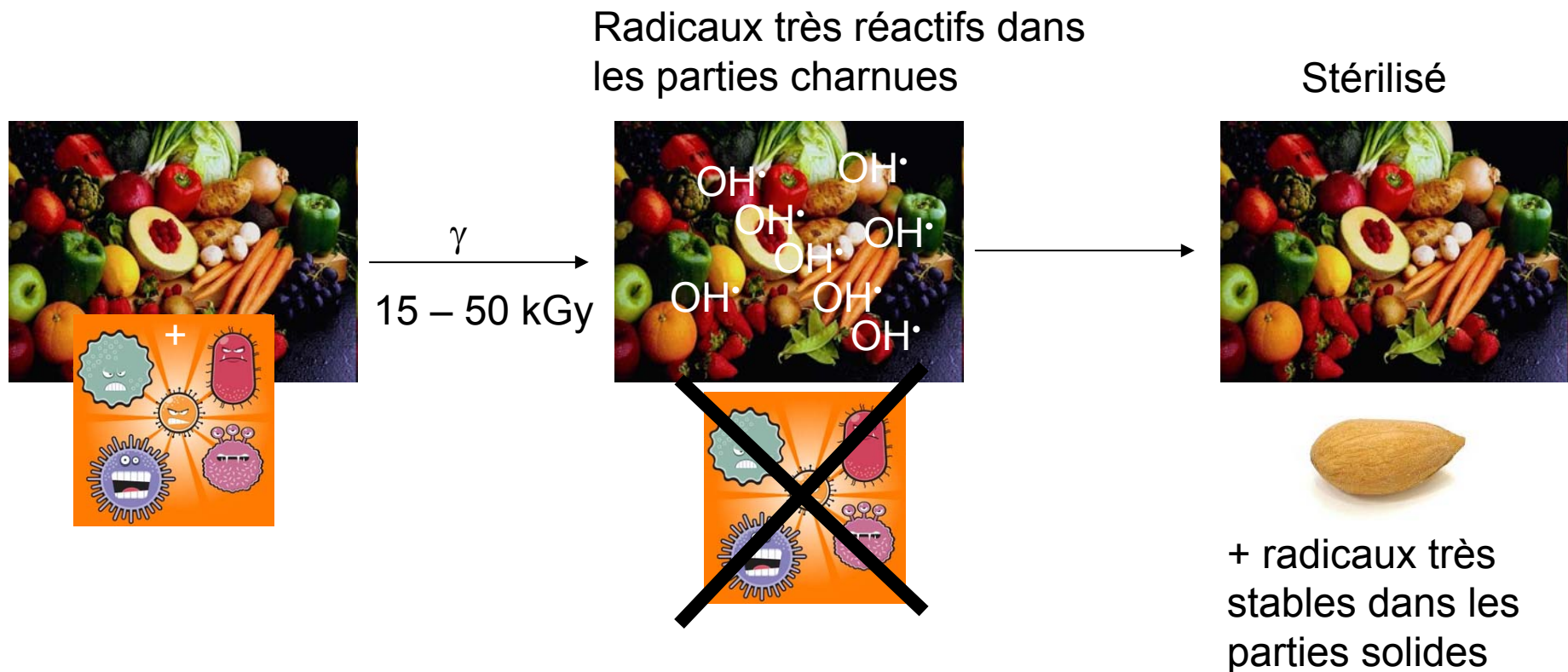
VII. Irradiation dans les aliments et RPE

- Le traitement ionisant est un traitement qui vise à assainir et/ou augmenter la durée de conservation des aliments. Toutefois, comme il est voisin du nucléaire, il risque, à priori, d'être rejeté par un consommateur mal informé.
- Le traitement ionisant consiste à soumettre des aliments (ou des médicaments) soit à un rayonnement γ (source ^{60}Co ou ^{127}Cs), soit à des rayons X d'énergie inférieure à 5 MeV, soit à un faisceau d'électrons accélérés d'énergie inférieure à 10 MeV.
- Les effets sur le produit dépendent de la dose appliquée. Celle-ci se mesure en Gray (Gy) : 1 Gy = 1 J / kg d'aliment.
 - 0.04 – 0.10 kGy : inhibition de la germination
 - 0.03 – 0.20 kGy : stérilisation d'insectes
 - 1 – 4 kGy : destruction de la charge microbienne
 - 1 – 6 kGy : pasteurisation (destruction des germes pathogènes)
 - 15 – 50 kGy : stérilisation

Energie <<<



Energie provoque l'éjection d'un électron périphérique. Ce premier électron s'approche d'un autre atome, éjecte un deuxième électron, et ainsi de suite. Il y a jusqu'à 6000 ionisations successives, avec production de radicaux organiques. A chaque ionisation, il y a perte d'énergie, et à la fin, l'énergie est trop faible pour éjecter un électron, mais induit la rupture de liaisons chimiques. Les radicaux organiques ainsi générés (à faible durée de vie) sont très réactifs et tuent les micro-organismes.

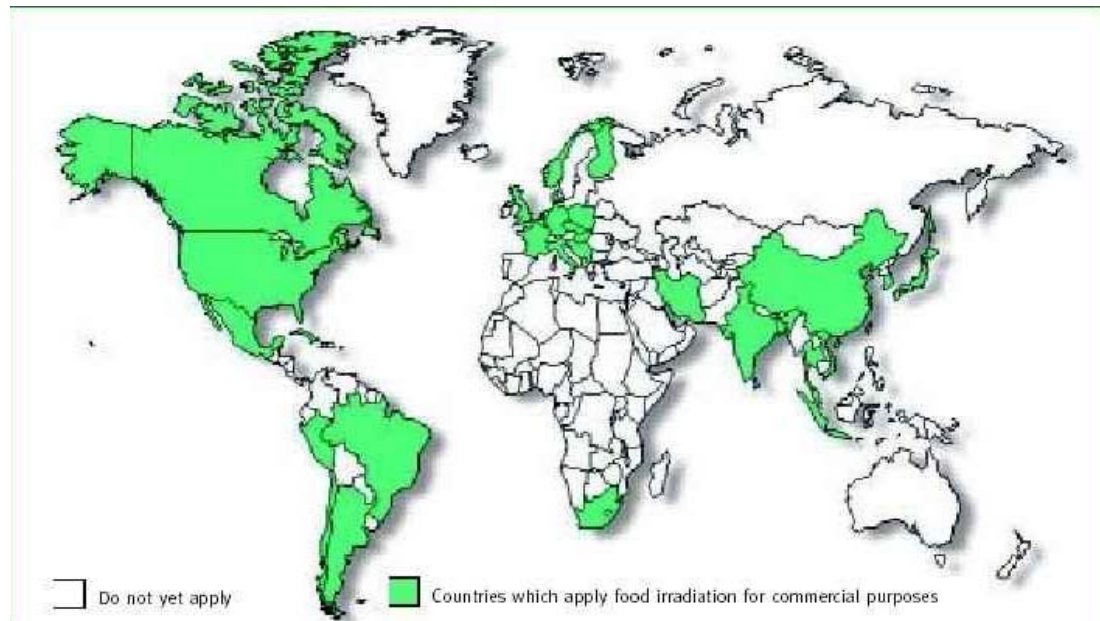


La méthode d'ionisation est reconnue par l'OMS, autorisée dans environ 40 pays, interdite dans d'autres, alors que la plupart n'ont pas de réglementation. En France, une autorisation est nécessaire pour réaliser l'ionisation des aliments : environ 30 autorisations ont été données, ce qui représente environ 17 000 tonnes d'aliments traités par an.

De multiples études menées jusqu'en 1980 ont conclu que l'irradiation d'aliments jusqu'à 10 kGy ne présentait pas de risque toxique, et cette méthode est la plus étudiée à ce jour.



Logo identifiant un produit irradié



<http://www.iaea.org/nafa/d5/public/foodirradiation.pdf>

Diversité de réglementations → mise en place de protocoles permettant de détecter l'ionisation, afin de contrôler les échanges et valider les étiquetages de produits traités.

Protocoles validés par l'union européenne :

- mesure de dégâts induits sur l'ADN.
- Extraction des lipides irradiés et analyse par GC.
- Thermoluminescence
- **RPE**

Pour que le protocole RPE soit validé, il faut que la durée de vie du signal RPE soit supérieure à la durée commerciale du produit. Ce protocole se base sur le fait que lors de l'ionisation, des radicaux à durée de vie longues (donc non réactifs) sont générés en plus des radicaux très réactifs tuant les microorganismes. Ces radicaux non réactifs sont générés dans les parties solides des aliments (os, arêtes, coquilles ...).

Le protocole diffère selon l'aliment

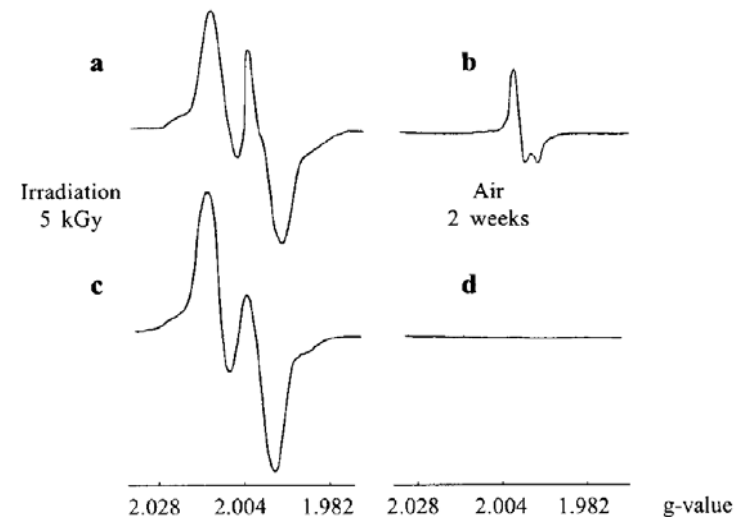


Fig. 2. The EPR spectra of compact bone powder and collagen extracted from Achilles tendon irradiated with the dose of 5 kGy. The samples were degassed (deaerated) on a vacuum line before irradiation. **a** EPR spectrum of degassed compact bone powder recorded 24 hour after irradiation, **b** EPR spectrum of the same sample of bone powder but recorded 2 weeks after admission of air to the sample tube, **c** EPR spectrum of degassed collagen powder recorded 24 hours after irradiation, **d** EPR spectrum of the same collagen sample but recorded 2 weeks after admission of air to the sample tube.

Viandes : les radicaux radio-induits sont détectés dans les os. Ceux-ci ne présentent naturellement pas de signal RPE, ou alors possèdent un faible signal symétrique centré à $g_{\text{iso}} = 2.0044$ (largeur de raie = 6 G), attribué à la moelle. Les os irradiés présentent un signal asymétrique attribués au radical de l'hydroxyapatite $[(\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{H}_2\text{O})_2)]$. Ce dernier signal est insensible au chauffage et au stockage (> an). Un protocole de dosimétrie est en train d'être mis au point.

$g_1 = 2.0030-2.0033$ et $g_2 = 1.9969-1.997$
→ Radical hydroxyapatite

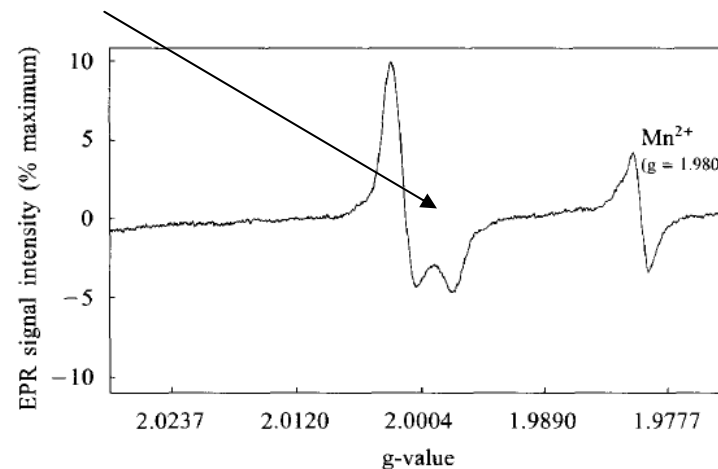
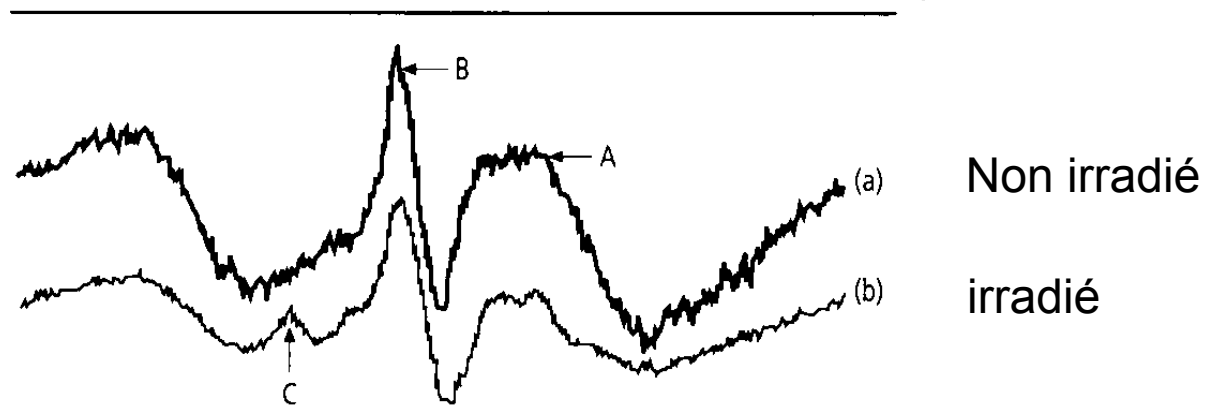


Fig. 1. The EPR spectra of the bone powder standard (asymmetric singlet) and Mn^{2+} interior standard.

Poissons : similaire au os de viande, la détection se fait dans les arêtes.

Fruits et légumes : Les radicaux étant peu stable en solution, les signaux proviennent des parties solides du fruit (noyaux, graines) ou des fruits secs. La composition chimique des fruits et légumes étant différente de celles des os, les signaux observés seront différents, et seront d'une manière générale plus compliqués. Ceci est en partie dû au fait que les végétaux non irradiés possèdent à l'origine un signal RPE :

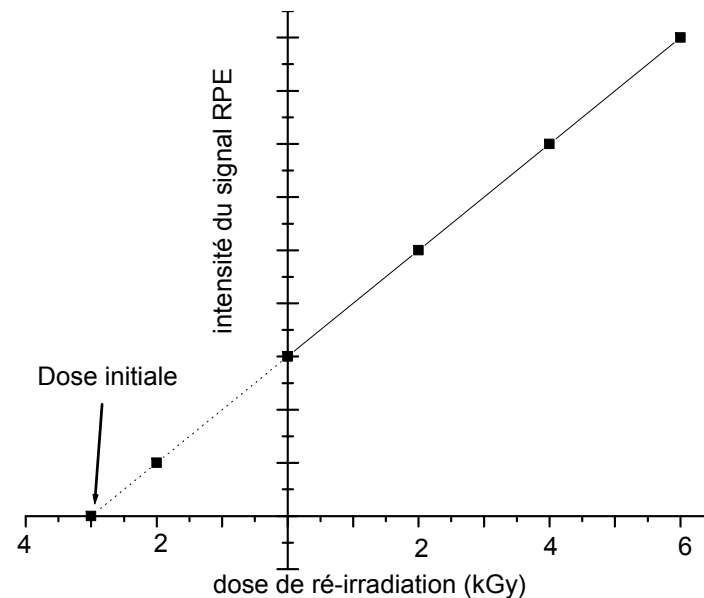
- Un signal large comportant 6 raies correspondant au manganèse du photosystème ($I = 5/2$, $2 I + 1$ raies). (A)
- Un signal de radical organique de type quinone (B).
- Après irradiation, on observe un faible signal triplet ($S = 1$) du au radical de la cellulose (C).



Source: [17]

Dosimétrie

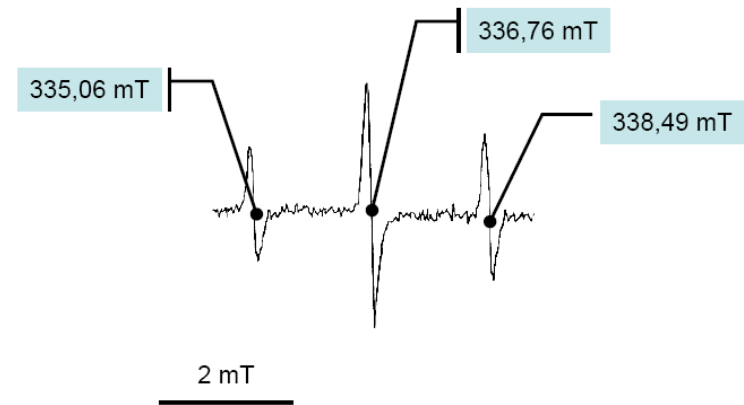
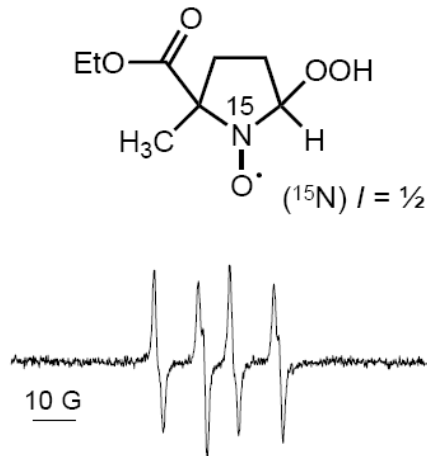
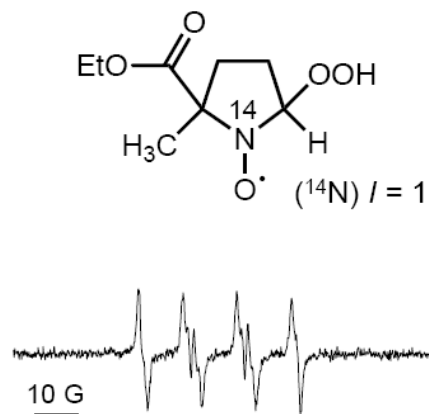
La dosimétrie n'est possible que dans le cas des os c'est-à-dire quand les radicaux produits sont les plus stables. Le principe consiste à ré-irradier les os avec des doses connues et croissantes, et à enregistrer les spectres RPE correspondant à chaque dose. En reportant l'intensité du signal RPE en fonction de la dose d'irradiation, et en extrapolant l'ordonnée à l'origine, on obtient la dose initiale.



Intensité du signal RPE d'un os de poulet irradié en fonction de la dose de ré-irradiation. La dose initiale de 3 Gy est obtenue par extrapolation de la droite de réponse et correspond à l'intersection avec l'axe des x.

VIII. Exercices

1. Le spectre RPE du radical $\text{CH}_2\text{OH}^\bullet$ comporte 3 raies centrées à 3350.6 G, 3367.6 G et 3384.9 G. La fréquence de travail de l'appareil est de 9.4424 GHz. Déterminez la valeur de g et interprétez les constantes de couplage observées.
2. Expliquez les spectres suivants:



Interprétez les spectres suivants obtenu lors du piégeage de radicaux D[•] et H[•] par la DMPO (on rappelle que $I_H = \frac{1}{2}$ et $I_D = 1$)

