

Структурные исследования в нанометровом диапазоне расстояний с помощью импульсной спектроскопии ЭПР

С.А.Дзюба

*Институт химической кинетики и горения Сибирского отделения Российской академии наук
630090 Новосибирск, ул. Институтская, 3, факс (3833)30–7350*

Рассмотрены возможности исследования наноструктуры вещества методами импульсной спектроскопии ЭПР, основанными на измерении диполь-дипольного взаимодействия между спинами неспаренных электронов. Показано, что с помощью этих методов можно определять конформации длинноцепочечных органических бирадикалов и биомолекул, дважды спин-меченых или содержащих парамагнитные ионы металлов, а также исследовать супрамолекулярную структуру вещества — кластеризацию пептидов, гетерогенность упаковки полимеров, детали строения фотосинтезирующих реакционных центров и других сложных систем. Исследование фотоиндуцированных спин-коррелированных радикальных пар позволяет также находить закономерности переноса заряда в этих системах. Методы отличаются высокой точностью измерений (0.03 нм) и применимы для изучения расстояний в диапазоне ~ 1.5–10 нм.

Библиография — 148 ссылок.

Оглавление

I. Введение	686
II. Спектр ЭПР радикальной пары	687
III. Экспериментальные методики на основе модуляции спада электронного спинового эха	690
IV. Экспериментальные методики на основе спиновой релаксации	695
V. Конформации длинноцепочечных бирадикалов, дважды спин-меченых и металлсодержащих биомолекул	697
VI. Наноструктура кластеров	699
VII. Фотосинтезирующие реакционные центры растений и бактерий — стабильные парамагнитные пары	701
VIII. Фотосинтезирующие реакционные центры растений и бактерий — фотоиндуцированные спин-коррелированные пары	702
IX. Заключение	704

I. Введение

Изучение структуры вещества в нанометровом диапазоне расстояний (1–10 нм или 10–100 Å) необходимо для определения конформаций биомолекул, выяснения наноструктуры других сложных молекулярных систем, решения различных задач супрамолекулярной химии. Если систему удастся закристаллизовать, то хорошие результаты получают, используя обычную рентгеновскую кристаллографию.¹ Для двумерных кристаллов применяют электронную кристаллографию² или сканирующую туннельную микроскопию.³ С помощью спектроскопии многомерного ЯМР можно определять структуру биомолекул массой до 100 кДа.⁴ При исследовании неупорядоченных сред для изучения объектов размером от 5 до 100 нм применяют методы малоуглового рентгеновского рассеяния⁵ и малоуглового рассеяния нейт-

ронов.⁶ Метод резонансного переноса энергии флуоресценции используют при определении расстояний (в диапазоне от 1 до 10 нм) между хромофорами.⁷

Если в системе присутствуют парамагнитные центры в виде свободных радикалов и ионов, то для измерения расстояний между ними используют спектроскопию ЭПР. Ее применение основано на изучении диполь-дипольного ($d-d$) взаимодействия спинов электронов. При наличии пар или кластеров парамагнитных центров (в состав многих биомолекул входят парамагнитные ионы металлов) по данным о расстоянии между этими центрами можно определять ряд параметров супрамолекулярной структуры. В физико-химических и биофизических исследованиях часто используют метод спиновых меток и зондов, когда в систему специально вводят парамагнитные центры. В качестве примера появления пар парамагнитных центров можно привести разделение зарядов в фотосинтезе, при котором возникают катион-анионные пары радикалов.

Диполь-дипольное взаимодействие спинов электронов в паре парамагнитных центров характеризуется величиной порядка

$$\frac{\mu_0}{4\pi} \frac{g_e^2 \beta^2}{r^3},$$

где μ_0 — магнитная проницаемость вакуума, g_e — g -фактор свободного электрона, β — магнетон Бора, r — расстояние

С.А.Дзюба. Доктор физико-математических наук, директор ИХКГ СО РАН. Телефон: (3833)33–1276, e-mail: dzuba@ns.kinetics.nsc.ru
Область научных интересов: спектроскопия ЭПР, электронное спиновое эхо, структура и динамика сложных молекулярных систем, биомембраны, молекулярные стекла, радикальные пары в фотохимии, фотосинтез.

Дата поступления 19 февраля 2004 г.

между парамагнитными центрами в паре. Стационарную спектроскопию ЭПР применяют для изучения расстояний в паре электронных спинов до 1–1.5 нм.⁸ Этот предел обусловлен наличием маскирующего неоднородного уширения линий ЭПР за счет неразрешенных сверхтонких взаимодействий с ядрами матрицы, которое для органических сред достигает ~0.5 мТл.

Гораздо более чувствительны к диполь-дипольным взаимодействиям импульсные методы ЭПР, основанные на спектроскопии электронного спинового эха (ЭСЭ).^{9,10} В таких методах диполь-дипольное взаимодействие надо сравнивать с однородным уширением, которое для органических сред значительно меньше (~0.01 мТл). Это дает верхнюю границу измеряемых расстояний ~5–10 нм. Нижняя граница определяется временной разрешающей способностью прибора (~10⁻⁸ с) и составляет ~1.5 нм. В настоящем обзоре обобщены полученные с помощью спектроскопии ЭСЭ данные для длинноцепочечных органических бирадикалов и радикальных пар в твердом теле. Расстояние между парамагнитными центрами в исследованных системах составляет от ~2 до 8 нм.

Для спектроскопии ЭСЭ характерна высокая точность измерений в указанном диапазоне расстояний. Так, при $r \sim 3$ нм погрешность может быть ~0.03 нм. За счет высокой разрешающей способности данного метода при изучении наноструктуры вещества можно обнаружить ряд тонких эффектов, которые не выявляются при исследовании другими методами. Кроме того, при использовании ЭСЭ не требуется особой процедуры приготовления образца (например, его кристаллизации, высокой степени очистки и др.)

Возможность применения спектроскопии ЭСЭ для изучения пар парамагнитных центров установлена достаточно давно. В работе¹¹ исследованы пары $\text{SO}_4^- \cdots \text{SO}_4^-$, стабилизированные под действием УФ-облучения в монокристалле $\text{H}_2\text{S}_2\text{O}_8$. Такие факторы, как небольшая ширина спектра ЭПР (доступная для возбуждения СВЧ-импульсами), отсутствие магнитных ядер и пространственная ориентированность пар, способствовали тому, что с помощью обычного метода двухимпульсного ЭСЭ удалось определить расстояние в парах. Однако метод оказался малоприменим для анализа свободных радикалов в органических полиориентированных системах из-за большой ширины линий в спектре ЭПР, маскирующего влияния электрон-ядерных взаимодействий и наличия проблемы «мертвого» времени. Позже появились другие методики. В работах^{12,13} был предложен метод импульсного двойного электрон-электронного резонанса (Pulsed Electron-Electron Double Resonance (PELDOR)), впоследствии были разработаны методы «2+1» (см.¹⁴) и двухквантовой когерентности,^{15,16} а также методы, основанные на твердотельных последовательностях ЯМР.¹⁷ Показано, что обычный двухимпульсный метод позволяет изучать спин-коррелированные радикальные пары в фотосинтезирующих реакционных центрах.¹⁸ В таких средах указанные выше проблемы, характерные для органических полиориентированных систем, снимаются. В работе¹⁹ впервые использованы эффекты релаксации спина-партнера в паре радикал-ион металла. Позже методика была существенно модифицирована²⁰ (метод релаксационного зонда). Эффекты релаксации также использовали в методе селективного «выжигания» провала²¹ и релаксационного усиления модуляции.²²

В настоящее время спектроскопию ЭСЭ активно применяют при изучении наноструктур сложных молекулярных систем. Для изучения радикальных пар и бирадикалов в термодинамическом равновесии наиболее часто используют метод PELDOR, а для изучения спин-коррелированных радикальных пар — метод двухимпульсного эха. По результатам исследований написано довольно много обзоров (см., например,^{23–35}), большинство из которых появилось недав-

но. Цель данной работы — описать все имеющиеся в спектроскопии ЭСЭ подходы к анализу расстояний в нанометровом диапазоне и изученные на основе таких подходов системы.

II. Спектр ЭПР радикальной пары

Бирадикалы и радикальные пары отличаются друг от друга соответственно наличием или отсутствием ковалентных связей между парамагнитными фрагментами. Для магнитного резонанса это отличие несущественно, поэтому ниже мы будем использовать термин «радикальная (или парамагнитная) пара» (РП), за исключением случаев, когда речь идет о конкретных химических структурах.

1. Спин-гамильтониан радикальной пары

Основным взаимодействием в длинноцепочечных бирадикалах и в РП является магнитное диполь-дипольное взаимодействие между магнитными моментами электронов. Классическое выражение для энергии двух взаимодействующих диполей

$$E_d = \frac{\mu_0}{4\pi} \frac{r^2 \mu_1 \mu_2 - (\mu_1 r)(\mu_2 r)}{r^5}, \quad (1)$$

где r — радиус-вектор, соединяющий две частицы, дипольные моменты которых μ_1, μ_2 .

Для двух одинаково ориентированных в пространстве диполей

$$E_d = \frac{\mu_0}{4\pi} \frac{\mu_1 \mu_2}{r^3} (1 - 3 \cos^2 \theta), \quad (2)$$

где θ — угол между направлениями оси ориентации диполей и радиуса-вектора r .

В квантовой механике выражение (1) заменяется гамильтонианом

$$H_d = \frac{\mu_0}{4\pi} g_1 g_2 \beta^2 \frac{r^2 S_1 S_2 - (S_1 r)(S_2 r)}{r^5}, \quad (3)$$

где g_1, g_2 — g -факторы частиц 1 и 2; S_1, S_2 — операторы спинов этих частиц.

В системах, рассмотренных в настоящем обзоре, расстояния между спинами велики и обменное взаимодействие всегда мало, поэтому им можно пренебречь.

Волновые функции неспаренных электронов распределены в пространстве, причем для некоторых молекул распределение может быть протяженным. Тем не менее мы везде будем использовать приближение точечных диполей, т.е. считать, что спиновая плотность неспаренных электронов локализована в точке. Во всех практически важных случаях это приближение себя оправдывает (см. ниже).

Другое приближение — электрон-электронное диполь-дипольное взаимодействие — считаем малым по сравнению с зеемановским взаимодействием электронных спинов с магнитным полем, т.е.

$$\frac{\mu_0}{4\pi} \frac{g_e \beta}{r^3} \ll B_0,$$

где B_0 — напряженность магнитного поля. Для рассматриваемых в настоящей работе расстояний в паре данное приближение заведомо выполняется, поэтому можно использовать теорию возмущений, считая гамильтониан (3) малой добавкой к гамильтониану зеемановского взаимодействия. Причем выражение (3) существенно упрощается, если отбросить составляющие, не дающие вклада в первом порядке теории возмущений. В сферических координатах с осью Z , направление которой совпадает с направлением магнитного поля, выражение (3) принимает вид

$$H_d = \frac{\mu_0}{4\pi} \frac{g_1 g_2 \beta^2}{r^3} (1 - 3 \cos^2 \theta) \left[S_{1z} S_{2z} - \frac{1}{4} (S_{1+} S_{2-} + S_{1-} S_{2+}) \right]. \quad (4)$$

Здесь использованы проекции операторов спина на ось Z и операторы повышения – понижения.

Отметим аналогию выражений (4) и (2), которая, однако, является неполной: члены с операторами повышения – понижения классического аналога не имеют, они отражают факт тождественности частиц. Матричные элементы с их участием начинают играть роль только при близости g -факторов двух электронов, когда разность зеемановских энергий $|g_1 - g_2| \beta B_0$ становится сравнимой с энергией диполь-дипольного взаимодействия. При выполнении этого условия говорят о сильной связи между спинами (или о приближении эквивалентных спинов). Если же

$$\frac{\mu_0}{4\pi} \frac{g_1^2 \beta^2}{r^3} \ll |g_1 - g_2| \beta B_0,$$

связь слабая (неэквивалентные спины). Отметим, что для систем, рассмотренных в настоящем обзоре, характерна слабая связь.

Гамильтониан (4) можно переписать, используя оператор общего спина $S = S_1 + S_2$,

$$H_d = \frac{\mu_0}{4\pi} \frac{g_1 g_2 \beta^2}{r^3} (1 - 3 \cos^2 \theta) (3S_z^2 - S^2). \quad (5)$$

2. Уровни энергии и спектр ЭПР радикальной пары в магнитном поле

Рассмотрим РП, состоящую из двух радикалов с разными g -факторами. Гамильтониан РП в магнитном поле (в единицах частоты) имеет вид

$$\frac{H}{\hbar} = \omega_1 S_{1z} + \omega_2 S_{2z} + \frac{1}{4} \varepsilon_d (3S_z^2 - S^2), \quad (6)$$

где ω_1, ω_2 — резонансные частоты двух радикалов в отсутствие диполь-дипольного взаимодействия, ε_d — величина диполь-дипольного взаимодействия

$$\varepsilon_d = \frac{\mu_0}{4\pi} \frac{g_1 g_2 \beta^2}{r^3 \hbar} (1 - 3 \cos^2 \theta).$$

Решение гамильтониана (6) запишем через волновые функции триплетного

$$\begin{aligned} |T_+\rangle &= |\alpha\alpha\rangle, \\ |T_0\rangle &= \frac{1}{\sqrt{2}} (|\alpha\beta\rangle + |\beta\alpha\rangle), \\ |T_-\rangle &= |\beta\beta\rangle \end{aligned}$$

и синглетного

$$|S\rangle = \frac{1}{\sqrt{2}} (|\alpha\beta\rangle - |\beta\alpha\rangle),$$

состояний РП (α и β — проекции спинов электронов)

$$\begin{aligned} |1\rangle &= |T_+\rangle, \\ |2\rangle &= \cos \phi |S\rangle + \sin \phi |T_0\rangle, \\ |3\rangle &= -\sin \phi |S\rangle + \cos \phi |T_0\rangle, \\ |4\rangle &= |T_-\rangle, \end{aligned} \quad (7)$$

где

$$\tan 2\phi = \frac{2\Delta\omega}{\varepsilon_d}, \quad \Delta\omega = \omega_1 - \omega_2.$$

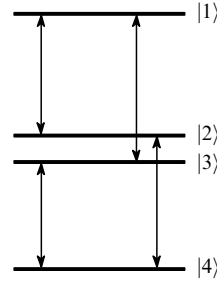


Рис. 1. Схематическое изображение спиновых уровней в магнитном поле для радикальной пары (бирадикала). Показаны разрешенные переходы ЭПР.

Отметим, что для слабой связи $\phi \approx \pi/4$, и волновые функции $|2\rangle$ и $|3\rangle$ превращаются соответственно в $|\alpha\beta\rangle$ и $|\beta\alpha\rangle$. Уровни энергии представлены на рис. 1 и описываются выражениями

$$E_1 = \frac{1}{2}(\omega_1 + \omega_2) + \frac{1}{4}\varepsilon_d, \quad (8)$$

$$E_2 = -\frac{1}{4}\varepsilon_d + \frac{1}{4}\sqrt{\varepsilon_d^2 + 4(\Delta\omega)^2},$$

$$E_3 = -\frac{1}{4}\varepsilon_d - \frac{1}{4}\sqrt{\varepsilon_d^2 + 4(\Delta\omega)^2},$$

$$E_4 = -\frac{1}{2}(\omega_1 + \omega_2) + \frac{1}{4}\varepsilon_d.$$

Выражения для шести возможных разностей энергий имеют вид

$$E_{12} = \frac{1}{2}(\omega_1 + \omega_2) + \frac{1}{2}\varepsilon_d - \frac{1}{4}\sqrt{\varepsilon_d^2 + 4(\Delta\omega)^2}, \quad (9)$$

$$E_{13} = \frac{1}{2}(\omega_1 + \omega_2) + \frac{1}{2}\varepsilon_d + \frac{1}{4}\sqrt{\varepsilon_d^2 + 4(\Delta\omega)^2},$$

$$E_{24} = \frac{1}{2}(\omega_1 + \omega_2) - \frac{1}{2}\varepsilon_d + \frac{1}{4}\sqrt{\varepsilon_d^2 + 4(\Delta\omega)^2},$$

$$E_{34} = \frac{1}{2}(\omega_1 + \omega_2) - \frac{1}{2}\varepsilon_d - \frac{1}{4}\sqrt{\varepsilon_d^2 + 4(\Delta\omega)^2},$$

$$E_{14} = \omega_1 + \omega_2,$$

$$E_{23} = \frac{1}{2}\sqrt{\varepsilon_d^2 + 4(\Delta\omega)^2}.$$

Четыре первые разности соответствуют разрешенным одноквантовым переходам (см. рис. 1), две последние — запрещенным двухквантовому и нульквантовому переходам.

Интенсивности разрешенных переходов для системы в термодинамическом равновесии в соответствии с уравнениями (7) определяются множителями $\sin^2 \phi$ или $\cos^2 \phi$, так как только матричные элементы между триплетными состояниями отличны от нуля. Таким образом, спектр ЭПР пары состоит из двух дублетов с расщеплением внутри каждого, равным ε_d (рис. 2,а). В случае слабой связи интенсивности всех линий одинаковы.

Спектр ЭПР для спин-коррелированной РП, возникающей из исходного синглетного состояния, представлен на рис. 2,б. Подробнее такие пары описаны в разделе III.

Во всех методиках ЭСЭ (как будет показано ниже) возникают временные зависимости типа $\cos \varepsilon_d t$ для пар в термодинамическом равновесии и типа $\sin \varepsilon_d t$ для спин-коррелированных пар. После преобразования Фурье таких зависимостей в спектрах появляется дублет на частотах $\pm \varepsilon_d$, симметричный относительно нулевой частоты в первом случае и антисимметричный — во втором. По аналогии со спектрами

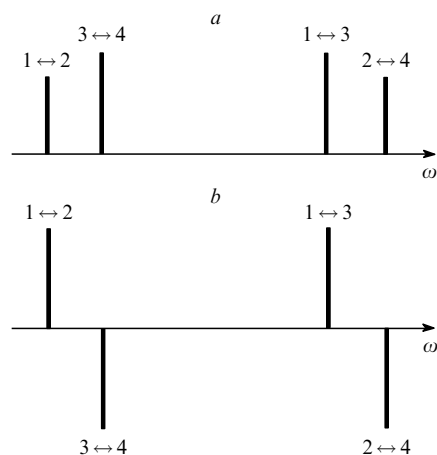


Рис. 2. Спектр ЭПР радикальной пары в термодинамическом равновесии (а) и спин-коррелированной радикальной пары (б).

ЯМР твердого тела такой дублет часто называют пейковским. Однако эта аналогия не совсем точна: в ЯМР всегда имеет место случай сильной связи и расщепление в дублете равно $(3/2)\epsilon_d$. В нашем случае дублет имеет полное расщепление $2\epsilon_d$,[†] и мы будем его называть дипольным.

3. Дипольный дублет в полиориентированной системе

Для полиориентированной системы интенсивности линий дипольного дублета в спектре ЭПР в зависимости от частоты ω определяются усреднением по всем ориентациям пары в пространстве

$$f(\omega) = \frac{1}{4\pi} \int_0^\pi d\theta \sin \theta \int_0^{2\pi} d\varphi \left[\delta(\omega - \epsilon_d) \pm \delta(\omega + \epsilon_d) \right] \propto \quad (10)$$

$$\propto \left(1 - \frac{4\pi}{\mu_0} \frac{r^3 \hbar}{g_1 g_2 \beta^2} \omega \right)^{-1/2} \pm \left(1 + \frac{4\pi}{\mu_0} \frac{r^3 \hbar}{g_1 g_2 \beta^2} \omega \right)^{-1/2}$$

(плюс — для пар в термодинамическом равновесии, минус — для спин-коррелированных пар). Частота ω для двух резонансных линий изменяется в пределах от

$$\omega_\perp = \pm \frac{\mu_0}{4\pi} \frac{g_1 g_2 \beta^2}{r^3 \hbar}$$

до

$$\omega_\parallel = \mp 2 \frac{\mu_0}{4\pi} \frac{g_1 g_2 \beta^2}{r^3 \hbar}$$

(здесь знаки имеют другой смысл: верхний для первого слагаемого в уравнении (10) и нижний для второго). Первый предел соответствует $\theta = \pi/2$ (перпендикулярная ориентация пары). При этом в спектре возникает сингулярность. Второй предел соответствует $\theta = 0$ или $\theta = \pi$ (параллельная ориентация пары) и определяет края спектра.

Практически всегда происходит дополнительное уширение спектра, вызванное спиновой релаксацией или распределением по расстояниям. Расчетный спектр, для которого дополнительное уширение моделировалось гауссовой функ-

[†] В спектроскопии ЭСЭ преобразование по τ сложилось исторически, хотя правильнее делать преобразование по 2τ , тогда расщепление в дублете будет ϵ_d .

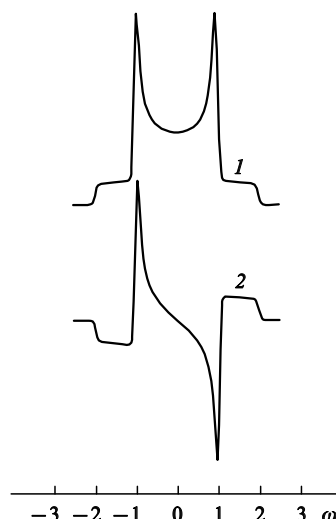


Рис. 3. Дипольный дублет в полиориентированном образце. 1 — радикальная пара в термодинамическом равновесии, 2 — спин-коррелированная радикальная пара. Частота указана в единицах

$$\frac{\mu_0}{4\pi} \frac{g_1 g_2 \beta^2}{r^3 \hbar}.$$

цией с полушириной между точками максимального наклона, равной

$$0.05 \frac{\mu_0}{4\pi} \frac{g_1 g_2 \beta^2}{r^3 \hbar},$$

представлен на рис. 3.

Вследствие относительно малой интенсивности других линий в экспериментальном спектре часто удается наблюдать только сингулярность, и по ее положению сразу можно определить расстояние r .

Отметим, что с учетом наряду с диполь-дипольным также и обменного взаимодействия в паре (J) выражения для $\omega_\perp$ и $\omega_\parallel$ принимают следующий вид:¹⁸

$$\omega_\perp = \pm \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \frac{g_1 g_2 \beta^2}{r^3 \hbar} - 2J \right), \quad (11)$$

$$\omega_\parallel = \pm \left(-2 \frac{\mu_0}{4\pi} \frac{g_1 g_2 \beta^2}{r^3 \hbar} - 2J \right).$$

Поэтому, установив положения сингулярности и краев спектра, можно определить величину обменного взаимодействия.

4. О точности приближения точечных диполей

В соответствии с приближением точечных диполей предполагается, что вся спиновая плотность сосредоточена в одной точке. Оценим погрешность, которая возникает при этом из-за наличия распределения спиновой плотности в молекуле. Измеряемой величиной является ϵ_d , которая пропорциональна $1/r^3$ (r — расстояние от данного спина до спина-партнера). Вариация $\Delta\epsilon_d$ при изменении расстояния на величину Δr из-за распределения спиновой плотности в первом приближении пропорциональна $-3\Delta r/r^4$. Если начало координат совмещено с «центром тяжести» спиновой плотности, т.е. среднее значение по молекуле $\langle \Delta r \rangle$ принимается равным нулю, то среднее значение $\langle \Delta\epsilon_d \rangle$ в этом приближении также будет равно нулю. Во втором приближении $\langle \Delta\epsilon_d \rangle$

пропорционально $6\langle\Delta r^2\rangle/r^5$. Вследствие такого изменения ε_d расстояние, измеряемое в приближении точечных диполей, будет иметь систематическую отрицательную погрешность

$$\delta r = -\frac{1}{3}\langle\Delta\varepsilon_d\rangle r^4 = -2\frac{\langle\Delta r^2\rangle}{r}.$$

Для радикалов со среднеквадратичной шириной распределения спиновой плотности $\langle\Delta r^2\rangle = (1.5\text{ \AA})^2$ и расположенных на расстоянии $30\text{ \AA}$ друг от друга оценка δr по этой формуле дает значение $-0.15\text{ \AA}$. Если распределение спиновой плотности известно и может быть учтено при расчете диполь-дипольного взаимодействия, то данную небольшую ошибку можно еще уменьшить.

III. Экспериментальные методики на основе модуляции спада электронного спинового эха

При воздействии на спиновую систему, находящуюся в магнитном поле, СВЧ-импульса с частотой, равной резонансной частоте спинов, возникает сигнал свободной индукции. Сигнал максимален для угла поворота вектора намагниченности на 90° и со временем спадает по двум причинам: из-за необратимой релаксации, вызванной стохастическими процессами, и из-за фазовой расфокусировки, обусловленной статистическим разбросом резонансных частот в образце. Расфокусировка является обратимой, при наложении импульса 180° опять возникает сигнал свободной индукции — с задержкой после второго импульса. Продолжительность задержки (τ) равна временному интервалу между двумя импульсами. Этот сигнал называют спиновым эхом (рис. 4,а).

Происхождение сигнала легко понять из следующих простых рассуждений. После действия первого импульса из-за статического разброса резонансных частот каждый спин прецессирует в своем локальном магнитном поле. Обозначим через $\Delta\omega_0$ отклонение резонансной частоты некоторого спина от несущей частоты спектрометра. К началу второго

импульса набирается фаза $\Delta\omega_0\tau$ (см. рис. 4,а). Если $\Delta\omega_0\tau \gg 1$, то после усреднения по всем спинам сигнал свободной индукции падает до нуля. Под действием второго 180° -градусного импульса фаза обращается, т.е. становится равной $\pi - \Delta\omega_0\tau$. Затем опять происходит «набор» фазы — с течением времени она изменяется как $\pi - \Delta\omega_0\tau + \Delta\omega_0(t - \tau)$, где t — время, отсчитываемое от первого импульса. В момент $t = 2\tau$ фазы всех спинов станут одинаковыми (равными π) и не будут зависеть от $\Delta\omega_0$. Это и означает рефокусировку и появление сигнала эха.

Описанный случай соответствует двухуровневой спиновой системе, для которой вследствие различных дополнительных взаимодействий допускается распределение лишь по разности энергий уровней (распределение $\Delta\omega_0$). Ситуация усложняется (например, как в случае радикальной пары (см. рис. 1)), если уровней несколько, а СВЧ-импульсы возбуждают разные переходы. При этом возникают дополнительные эффекты, обусловленные альтернированием магнитных взаимодействий в паре под действием импульсов. Ниже будет показано, что такие эффекты приводят к модуляции спада сигнала эха при изменении τ .

В настоящей главе принимается, что оба спина пары имеют достаточно длительные времена релаксации ($> 10^{-6}$ с).

1. Модуляция в методе двухимпульсного электронного спинового эха

Наиболее простой эксперимент, в котором можно изучать диполь-дипольное взаимодействие спинов в паре, — это обычное двухимпульсное эхо. Под действием второго импульса происходит не только обращение фазы прецессии, но и меняется ориентация спина-партнера в паре. Такие изменения приводят к сдвигу частоты прецессии на величину ε_d . В результате фаза прецессии спинов в момент 2τ будет равна уже не π , а $\pi \pm \varepsilon_d\tau$. Измеряемый сигнал пропорционален $\cos \varepsilon_d\tau$, что означает осцилляцию спада сигнала спинового эха с изменением τ . В таком случае говорят, что спад модулирован (Electron Spin Echo Envelope Modulation (ESEEM)).

В работах ^{11,36} проведены подробные расчеты модуляции спада сигнала эха для спинов в паре — соответственно для случая термодинамического равновесия и для более общего случая произвольного заселения уровней. Авторы статьи ¹¹ специально не рассматривали влияние угла поворота первого импульса, они постулировали его действие таким же, как и для одиночного спина. В опубликованной значительно позже статье ³⁶ показано, что такое влияние имеет более сложный характер. Однако в данной работе не рассмотрено влияние угла поворота второго импульса, хотя в статье ¹¹ указано, что такое влияние имеет место. Видимо, оба результата для произвольных углов поворота неточны. Для стандартной импульсной последовательности $90^\circ - \tau - 180^\circ - \tau$ — эхо результаты обоих расчетов совпадают. Сигнал эха пары в термодинамическом равновесии определяется выражением

$$\begin{aligned} E(2\tau) = & \sin^2 2\phi \cdot \cos \varepsilon_d\tau + \\ & + \cos^2 2\phi \cdot \cos\left(\frac{1}{2}\sqrt{\varepsilon_d^2 + 4(\Delta\omega)^2}\tau\right) \cdot \cos \varepsilon_d\tau - \\ & - \cos 2\phi \cdot \sin\left(\frac{1}{2}\sqrt{\varepsilon_d^2 + 4(\Delta\omega)^2}\tau\right) \cdot \sin \varepsilon_d\tau. \end{aligned} \quad (12)$$

Отметим, что второй и третий члены в правой части уравнения (12) при $\tau \neq 0$ эффективно усредняются благодаря большому неоднородному уширению ЭПР ($\Delta\omega\tau \gg 1$). Остается только первый член, пропорциональный $\cos \varepsilon_d\tau$. Этот результат находится в соответствии с проведенным выше

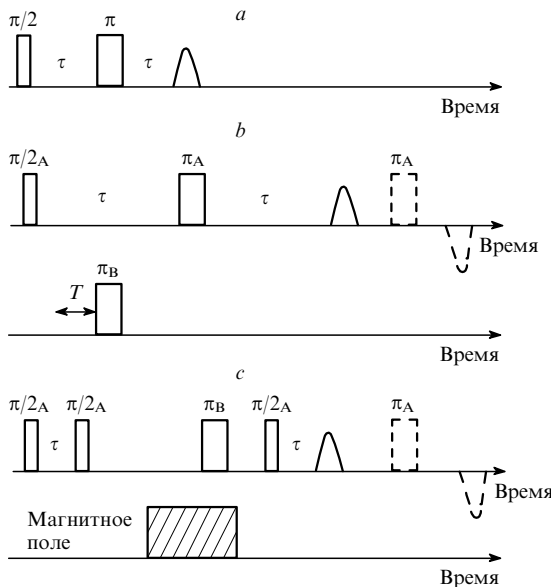


Рис. 4. Импульсные последовательности, используемые в методе ЭСЭ для изучения диполь-дипольного взаимодействия электронных спинов в радикальной паре.

а — обычная двухимпульсная последовательность, б — двухчастотный двойной резонанс (PELDOR), в — PELDOR со скачком магнитного поля.

простым качественным рассмотрением. Очевидно, он должен быть справедлив для любых углов поворота вектора намагниченности импульсами. Роль второго и третьего членов еще меньше, если связь слабая ($\phi \approx \pi/4$). В случае сильной связи (в настоящей работе он не рассматривается) сигнал пропорционален $\cos(3/2)\varepsilon_d\tau$, как это отмечено выше.

Однако применение данного двухимпульсного подхода к изучению диполь-дипольного взаимодействия в РП сопряжено с рядом трудностей. Во-первых, СВЧ-импульсы имеют ограниченную амплитуду (обычно не более 1 мТл), а сигнал, например, нитроксильных бирадикалов — общую ширину ~ 7 мТ. Поэтому вероятность возбуждения спина-партнера в паре (а это необходимое условие применения данного подхода) невелика. В итоге эффект модуляции спада сигнала на фоне значительной доли немодулированного спада от одиночных спинов оказывается мал. Во-вторых, в модуляцию кроме электрон-электронных дают вклад электрон-ядерные взаимодействия. Для нитроксильных бирадикалов этот вклад оказывается доминирующим.²² В-третьих, существует проблема «мертвого» времени: измерение нельзя проводить сразу после импульса из-за «звона» резонатора (обычно при $\tau < 100$ нс). Следует отметить, что достоверность результатов математической экстраполяции в область «мертвого» времени всегда оставляет сомнение.

Можно привести немного примеров работ, авторы которых наблюдали в спектрах двухимпульсного ЭСЭ модуляцию, обусловленную электрон-электронным диполь-дипольным взаимодействием. В числе таких работ статья¹¹ — первая работа, в которой были исследованы пары в монокристаллах без магнитных ядер. В случае жидких кристаллов для растворенных нитроксильных бирадикалов после преобразования Фурье спада сигнала наблюдался пик, который был приписан диполь-дипольному взаимодействию в паре.²⁶ Такой пик был зарегистрирован для полиориентированных нитроксильных бирадикалов.²² В работах^{22, 26} вклад от этого типа модуляции был очень мал по сравнению со вкладом от электрон-ядерного взаимодействия.

Отметим, что в случае двухимпульсного ЭСЭ спин-коррелированных РП, образующихся в фотохимических процессах, указанные выше трудности практически полностью снимаются (см. ниже).

Поиски решения проблем, возникающих при применении обычного двухимпульсного ЭСЭ к исследованию РП, стимулировали развитие ряда модифицированных методик.

2. Импульсный двойной электрон-электронный резонанс

Первой модификацией метода ЭСЭ, созданной для изучения ESEEM, вызванной электрон-электронным дипольным взаимодействием, стал импульсный двойной электрон-электронный резонанс — PELDOR.^{12, 13} В данном методе сигнал эха формируется с помощью стандартной двухимпульсной последовательности, при этом на другой резонансной частоте подается дополнительный 180-градусный импульс накачки (см. рис. 4, б). Спины, от которых наблюдается сигнал эха, называют спинами А, спины-партнеры в паре (на которые в данном случае действует дополнительный импульс) называют спинами В.

Результат данного эксперимента легко представить с помощью фазовых соотношений, считая, что реализуется случай слабой связи между спинами. Фаза, набираемая спином А после первого импульса к моменту времени t , будет $(\Delta\omega_0 \pm (1/2)\varepsilon_d)t$ (знак плюс или минус зависит от проекции спина В). После действия импульса 180° на частоте спинов В в момент времени T сдвиг частоты прецессии за счет диполь-дипольного взаимодействия меняет знак, и набираемая фаза в момент времени τ (т.е. перед приложением второго импульса на частоте А) будет иметь вид

$$\varphi_A = \Delta\omega_0\tau \pm \frac{1}{2}\varepsilon_d T \mp \frac{1}{2}\varepsilon_d(\tau - T).$$

После второго импульса на частоте А

$$\varphi_A = \pi - \Delta\omega_0\tau \mp \frac{1}{2}\varepsilon_d T \pm \frac{1}{2}\varepsilon_d(\tau - T) + \Delta\omega_0(t - \tau) \mp \frac{1}{2}\varepsilon_d(t - \tau).$$

Отсюда в момент времени 2τ

$$\varphi_A = \pi \mp \varepsilon_d T.$$

Сигнал эха пропорционален $\cos \varepsilon_d T$, что означает модуляцию сигнала при изменении времени T с частотой ε_d .

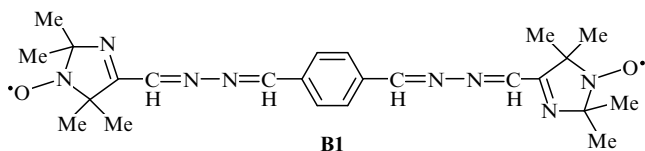
В эксперименте под действием импульса накачки возбуждается лишь часть спинов-партнеров данного спина А. Обозначим ее через P_B . Тогда с вероятностью $(1 - P_B)$ спад будет немодулированным, с вероятностью P_B — модулированным, и сигнал

$$V(T) = 1 - P_B + P_B \cos \varepsilon_d T. \quad (13)$$

Достоинством метода PELDOR является отсутствие электрон-ядерной модуляции. Действительно, импульс на резонансной частоте спинов В не меняет электрон-ядерных взаимодействий спина А. Существенно также, что при использовании данного метода практически снимается проблема «мертвого» времени, так как импульс на частоте В можно подавать сразу по окончании первого импульса на частоте А. Остается лишь некоторая неопределенность из-за конечной длительности импульсов. Можно уменьшить и ее, если использовать дополнительный рефокусирующий импульс на частоте спинов А (см. штриховые линии на рис. 4, б), а импульс накачки расположить между вторым импульсом на частоте А и дополнительным импульсом.³⁷ Положение импульса накачки может совпадать с положением эха от первого и второго импульсов на частоте А, что должно соответствовать нулевому времени. Еще одним достоинством метода является то, что на модуляцию сигнала не накладывается спад за счет спиновой релаксации (как в рассмотренном выше двухимпульсном методе).

В настоящее время метод PELDOR наиболее часто используют при исследовании термодинамически равновесных систем.

Кроме воздействия на спины В другой резонансной частотой, возможно импульсное смещение магнитного поля, которое использовалось для X- (см.³⁸) и для W-диапазонов СВЧ.³⁹ Последовательность импульсов представлена на рис. 4, в. Использована трехимпульсная последовательность стимулированного эха для возбуждения спинов А. В промежутке между вторым и третьим импульсами магнитное поле меняется скачком, и в этот момент прикладывается 180-градусный импульс накачки. Из-за смещения резонансного поля этот импульс влияет только на спины В. Трехимпульсную (вместо двухимпульсной, как в двухчастотном методе PELDOR) схему возбуждения спинов А используют потому, что скачок магнитного поля в двухимпульсном варианте приводит к существенным искажениям фазы, набираемой спинами А. В соответствии с трехимпульсной схемой намагниченность между вторым и третьим импульсами сохраняется вдоль оси Z вращающейся системы координат и дополнительная фаза не набирается. Время τ между первым и вторым импульсами варьируется. При этом помимо модуляции за счет электрон-электронных взаимодействий возникает также электрон-ядерная модуляция. Разделить два механизма можно с помощью отключения импульса накачки. Оба механизма независимы, поэтому они должны мультипликативным образом определять наблюдаемую модуляцию спада. Такой подход реализован при исследовании жесткого бирадикала В1 методом PELDOR со скачком магнитного поля.³⁸



Спады сигнала ЭСЭ для **B1** в протонированных и дейтерированных растворителях иллюстрирует рис. 5. В исходных спадах (см. кривые *I* и *2*) заметна только модуляция с частотами электрон-ядерных взаимодействий, результат же деления (кривая *3*) не зависит от типа изотопов ядер. Поэтому наблюдаемую модуляцию спада можно отнести к типу электрон-электронной. Результаты фурье-преобразования представлены на рис. 6 (спектры *I*, *II*). Видны четкие линии, соответствующие сингулярности дипольного дублета (см. рис. 3,а). По положению этих сингулярностей было определено расстояние между парамагнитными фрагментами — $r = 19.0 \pm 1.6 \text{ \AA}$.

На спектрах *I* и *II* отсутствуют плечи дипольного дублета, которые согласно теории (см. рис. 3) должны были бы быть. Вероятно, их отсутствие обусловлено низкой интенсивностью, которую можно увеличить, если ориентировать бирадикалы в образце так, чтобы линия, соединяющая оба спина, стала параллельной направлению магнитного поля. Это возможно, если поместить радикал в жидкий кристалл, ориентированный таким образом, чтобы ось его

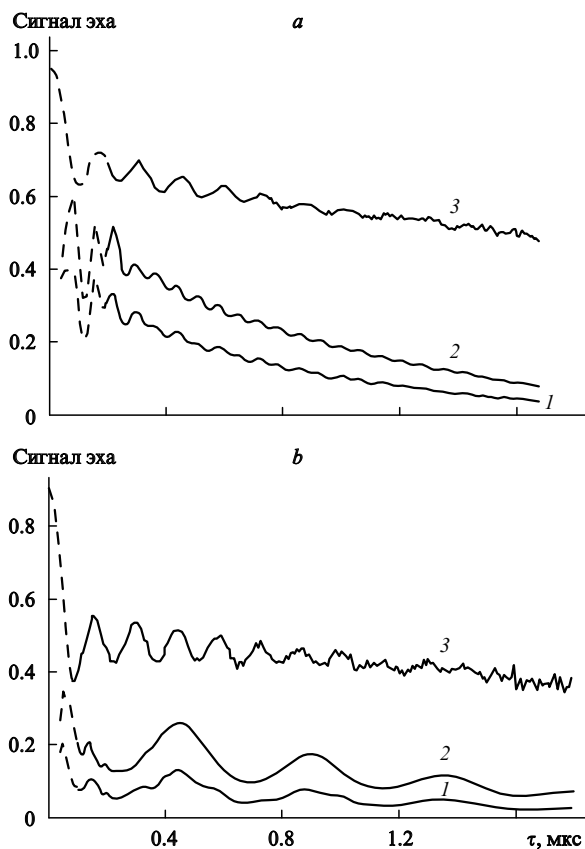


Рис. 5. Спады сигналов в методе PELDOR со скачком магнитного поля для бирадикала **B1** в обычном (а) и дейтерированном (б) толуоле при 77 К.³⁸

I — спады сигнала при сканировании по τ (см. рис. 4,с); *2* — то же, но с выключенным импульсом накачки τ ; *3* — результат деления спадов *I* и *2*. Для кривых *I* и *2* вертикальная шкала относительная, для кривых *3* — абсолютная. Штриховой линией показаны сигналы, восстановленные в «мертвом» времени.

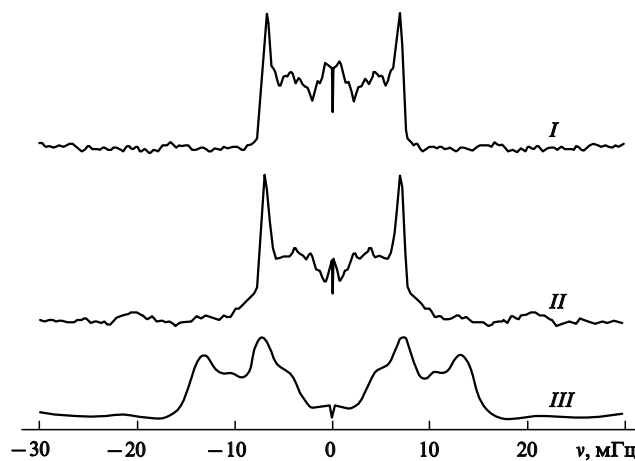


Рис. 6. Результаты косинусного фурье-преобразования экспериментальных данных во временной области.³⁸

Исходные данные: *I* — рис. 5,а, кривая *3*; *II* — рис. 5,б, кривая *3*; *III* — данные для бирадикала **B1** в ориентированном жидком кристалле (ось бирадикала примерно параллельна направлению магнитного поля).

директора была параллельна направлению внешнего магнитного поля. Результаты исследования такого бирадикала **B1** также приведены на рис. 6 (спектр *III*).³⁸ Видно, что интенсивность плечей резко возросла. По их положению на основании формул (11) был сделан вывод о нулевой величине обменного взаимодействия.

Метод PELDOR со скачком магнитного поля имеет преимущество перед двухчастотным вариантом PELDOR, заключающееся в возможности использования сканирующей накачки,³⁸ благодаря повышению доли возбуждаемых спинов (радикальных пар). Для устранения «мертвого» времени здесь также можно использовать дополнительный рефокусирующий импульс. Однако недостатком является влияние процессов релаксации на наблюдаемый спад эха.

Проведено сравнительное исследование бирадикалов методом PELDOR в двух СВЧ-диапазонах — X и S.⁴⁰ Так как электрон-ядерная модуляция зависит от СВЧ-диапазона, а электрон-электронная — не зависит, такой подход можно применять для выделения вклада последней.

Метод PELDOR не может быть использован при изучении пар с относительно узким спектром ЭПР (с шириной $< 2 \text{ мТл}$). Такие спектры типичны для свободных радикалов в фотосинтезирующих реакционных центрах, где возбуждения импульсами накачки и импульсами наблюдения перекрываются, и интерпретация эффектов затруднена. Для таких систем предпочтительны «одночастотные» методы, в которых спины А и В возбуждаются одинаково (см. ниже).

3. Метод «2 + 1»

Метод «2 + 1»^{14, 27} в значительной степени повторяет рассмотренный выше метод PELDOR. Используют такие же импульсные схемы (см. рис. 4,б), однако импульсы действуют на одной резонансной частоте, т.е. базовая последовательность имеет такой вид: импульс 1 — T — импульс (+1) — $(\tau - T)$ — импульс 2 — τ — эхо. Эхо формируется двумя импульсами — 1 и 2, дополнительный импульс (который и называется +1) включается для альтернирования диполь-дипольного взаимодействия. В эксперименте варьируется время T при фиксированном τ . Модуляция спада возникает по тому же механизму, что и в методе PELDOR. Однако здесь оба спина-партнера возбуждаются одинаково.

Кроме возможности изучения узких спектров, метод «2+1» (по сравнению с методом PELDOR) не требует использования дополнительного генератора и резонатора специальной конструкции. Однако он имеет и серьезные недостатки. Во-первых, метод «2+1» не свободен от электрон-ядерной ESEEM. Чтобы избавиться от этой модуляции, необходимы специальные приемы, например, сравнение с контрольным образцом, в котором отсутствует диполь-дипольное взаимодействие. Во-вторых, диполь-дипольное взаимодействие альтернируется не только под воздействием импульса $+1$, но и под воздействием второго импульса (см. выше). Интерференцию между этими двумя эффектами не всегда можно корректно учесть. Например, если в полиориентированной среде имеются два типа пар — с большим и малым расстояниями, то сигнал эха будет наблюдаться в основном от пар с большим расстоянием: для пар с малым расстоянием из-за указанного альтернирования сигнал быстро затухает. Поэтому при наличии распределения по расстояниям получится существенное искажение функции распределения. От данного недостатка метод PELDOR свободен, так как при использовании этого метода наблюдение обычно проводят на краю спектра, где возбуждается лишь малая доля спинов А.

4. Метод на основе двухквантовой когерентности

С помощью импульсной последовательности, составленной определенным образом, можно возбудить когерентность между самым верхним и самым нижним уровнями в схеме, представленной на рис. 1.^{15, 16, 26} Базовая импульсная последовательность для этого эксперимента приведена на рис. 7,а. Она состоит из четырех импульсов. Три из них ($\pi/2$ -импульсы) формируют сигнал стимулированного эха. В промежутке между вторым и третьим импульсами (посередине между ними) включается дополнительный π -импульс.

Первые два импульса создают двухквантовую и нульквантовую когерентности. Они рефокусируются под действием π -импульса и под действием $\pi/2$ -импульса развиваются в одноквантовую когерентность, наблюдаемую как сигнал эха. Чтобы выделить вклад двухквантовой когерентности, применяют циклическое изменение фазы импульсов

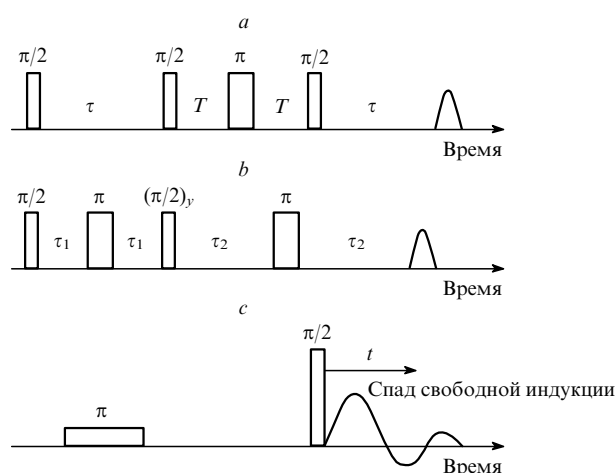


Рис. 7. Импульсные последовательности в ЭСЭ, используемые для изучения диполь-дипольного взаимодействия электронных спинов в радикальной паре.

а — метод двухквантовой когерентности, б — метод твердотельного эха, с — селективное «выжигание» провала.

от одной серии к другой. В эксперименте варьируется время τ , сигнал при этом оказывается модулированным с частотой ε_d .

Чтобы избежать потери сигнала в течение «мертвого» времени, используют дополнительный рефокусирующий пятый импульс или шестимпульсную последовательность, в которой двухквантовая когерентность создается не двумя, а тремя импульсами $\pi/2 - \tau/2 - \pi - \tau/2 - \pi/2$.²⁶ Преимуществом данного метода является отсутствие описанных для метода «2+1» эффектов интерференции. Однако и здесь имеет место электрон-ядерная ESEEM. К недостаткам следует отнести большое число циклов изменения фазы (64 цикла), что может служить источником дополнительной погрешности. Кроме того, теоретическое описание достаточно сложное, и отсутствует наглядная картина явления.

5. Методы на основе последовательностей ЯМР твердого тела

В работе¹⁷ предложен одночастотный метод для рефокусировки диполь-дипольных взаимодействий (Single-Frequency Technique for Refocusing (SIFTER)). Он основан на известных в ЯМР твердого тела импульсных последовательностях типа «твердотельное эхо» и последовательности Джинера – Брукэрта (Jeener – Broekaert). Рассмотрим возникающие эффекты на примере твердотельного эха.

В ЯМР используют последовательность $(\pi/2)_x - \tau - (\pi/2)_y - \tau$ — эхо. При этом достигается рефокусировка диполь-дипольного взаимодействия в паре ядерных спинов (например, протонов в молекуле воды в кристаллогидрате). Причем сигнал эха слева и справа от его максимума модулирован с частотой диполь-дипольного взаимодействия. Для наблюдения этой модуляции не возникает проблемы «мертвого» времени. Это обстоятельство стало одним из побудительных мотивов использования именно этой последовательности.¹⁷ Однако данный подход применим только для пары эквивалентных спинов, когда $\Delta\omega \ll \varepsilon_d$ (как в ЯМР твердого тела). В ЭПР ситуация обратная: спины в паре неэквивалентны. Эта проблема решается путем добавления еще двух рефокусирующих $(\pi)_x$ -импульсов (см. рис. 7,б). При $\tau_2 = \tau_1$ возникает твердотельное эхо. Особенности его формирования таковы, что статический разброс резонансных частот в образце, исключая их смещение из-за диполь-дипольного взаимодействия в паре, на форму сигнала эха не влияет. Варьирование разности двух задержек

$$t = \tau_2 - \tau_1$$

приводит к модуляции наблюдаемого сигнала за счет диполь-дипольного взаимодействия. Это варьирование проводится при фиксированной суммарной задержке $\tau_2 + \tau_1$, что позволяет исключить влияние процесса релаксации.

Для выделения полезного сигнала используют циклическое изменение фазы (3 цикла). Для подавления электрон-ядерной модуляции спада измерения проводят при разных суммарных задержках $\tau_2 + \tau_1$. От величины этого параметра электрон-ядерная ESEEM зависит, а электрон-электронная не зависит. Поэтому усреднение результатов должно приводить к выделению желаемого эффекта. Авторы работы¹⁷ усреднение проводили по 25 значениям этого параметра.

Экспериментальная схема данного метода по сравнению с методом наблюдения двухквантовой когерентности значительно проще, так как уменьшается число циклов изменения фазы. Однако теоретическое описание по-прежнему сложное, и также отсутствует наглядная картина явления (без использования формализма матрицы плотности результат получить очень сложно).

Таким образом, анализ разных методик исследования систем в термодинамическом равновесии показал, что наиболее удобным является метод PELDOR. При использо-

вании этого метода получают наглядную картину явления и соответственно упрощается (и намного!) теоретическое описание. Кроме того, практически отсутствуют эффекты электрон-ядерной модуляции. Единственным ограничением этого подхода является невозможность его применения в случае узких спектров ЭПР пары (бирадикала).

6. Модуляция в методе двухимпульсного электронного спинового эха вне фазы для спин-коррелированных радикальных пар

В ходе химической или фотохимической реакции могут появляться радикальные пары в спин-коррелированном состоянии. Примером может служить реакция фотосинтеза в растениях и бактериях, в которой при поглощении кванта света образуется катион-радикал первичного донора электрона и электрон, захватываемый поочередно разными молекулами-акцепторами с образованием соответствующих анион-радикалов. Исходное спиновое состояние пары синглетное.

В энергетической схеме (см. рис. 1) при исходном синглетном состоянии заселены только два средних уровня. Населенности четырех уровней в соответствии с долей синглетного состояния (см. уравнения (7)) будут: $p_1 = 0$, $p_2 = \cos^2 \phi$, $p_3 = \sin^2 \phi$, $p_4 = 0$. Данные населенности термодинамически неравновесны, поэтому возникает эффект спиновой поляризации. Для случая слабой связи такое распределение населенностей означает, что если один спин находится в состоянии α , то второй — в состоянии β , и наоборот. Поэтому такие пары называются спин-коррелированными. Помимо неравновесных населенностей имеет место и квантово-механическая когерентность уровней. Однако эти эффекты быстро затухают (менее чем за 100 нс), и их рассмотрение выходит за рамки настоящей работы. Спектр ЭПР спин-коррелированной РП состоит из двух линий в поглощении и двух линий в эмиссии (см. рис. 2, б), причем интенсивности всех линий одинаковы.

Расчет сигнала эха для обычной двухимпульсной последовательности (см. рис. 4, а) для спин-коррелированных состояний осуществлен в работах^{36, 41–43}. В статье³⁶ проведено усреднение эффектов когерентности состояний. Для произвольных начальных населенностей p_1 , p_2 , p_3 и p_4 при воздействии двух импульсов вдоль оси X вращающейся системы координат θ_1 и 180° в момент 2τ возникает сигнал эха с проекциями как на ось Y (обычное эхо), так и на ось X (эхо вне фазы). Интенсивности этих сигналов пропорциональны соответствующим намагниченностям

$$M_x = P \sin \theta_1 \cdot [S_0 \sin^2 2\phi + \cos 2\phi \cdot (S_{-1} \cos^2 \phi - S_{+1} \sin^2 \phi)] + \sin \theta_1 (p_2 - p_3) \cdot \sin^2 2\phi \cdot \cos 2\phi \cdot \left(S_0 - \frac{1}{2} S_{+1} - \frac{1}{2} S_{-1} \right), \quad (14)$$

$$M_y = (p_4 - p_1) \sin \theta_1 \times \\ \times [C_0 \sin^2 2\phi + \cos 2\phi \cdot (C_{-1} \cos^2 \phi - C_{+1} \sin^2 \phi)],$$

где

$$P = -\frac{1}{2} p_1 + p_2 \sin^2 \phi + p_3 \cos^2 \phi - \frac{1}{2} p_4,$$

$$S_q = \sin \left(-\varepsilon_d \tau + q \frac{1}{2} \sqrt{\varepsilon_D^2 + 4(\Delta\omega)^2} \tau \right),$$

$$C_q = \cos \left(-\varepsilon_d \tau + q \frac{1}{2} \sqrt{\varepsilon_D^2 + 4(\Delta\omega)^2} \tau \right).$$

В термодинамическом равновесии $p_2 = p_3$, $P = 0$ и эхо вне фазы отсутствует, результат для M_y совпадает с приведенным выше (см. уравнение (12)). Для спин-коррелированных

Сигнал эха, произв. ед.

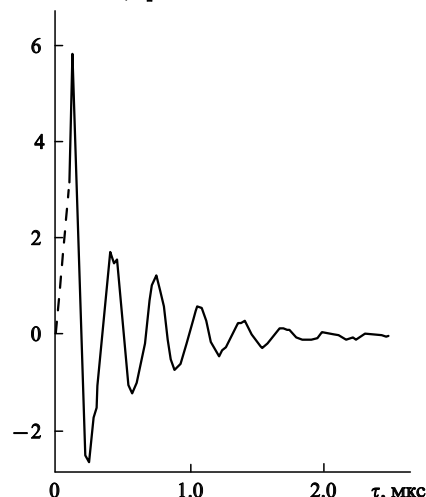


Рис. 8. Модуляция сигнала эха вне фазы для спин-коррелированной радикальной пары $P_{700}^+A_1^-$ в фотосистеме I.

Штриховой линией показан сигнал, интерполированный в «мертвом» времени.

РП с исходным синглетным состоянием, наоборот, присутствует только эхо вне фазы.

Для неэквивалентных спинов (случай слабой связи) формулы (14) существенно упрощаются:

$$M_x = -\frac{1}{2} (-p_1 + p_2 + p_3 - p_4) \sin 2\theta_1 \cdot \sin \varepsilon_d \tau, \quad (15)$$

$$M_y = (p_4 - p_1) \sin \theta_1 \cdot \cos \varepsilon_d \tau.$$

Пример наблюдаемой в эксперименте модуляции иллюстрирует рис. 8 (РП в фотосистеме I). На рис. 9 представлен результат фурье-преобразования этих экспериментальных данных.

Удивительной особенностью ЭСЭ в спин-поляризованной РП является отсутствие эффектов электрон-ядерной модуляции. Это следует прежде всего из хорошего соответствия экспериментального и расчетного спектров в частотной области (см. рис. 9 и 3, кривая 2); причем пики, которые можно было бы приписать электрон-ядерному взаимодействию, на рис. 9 отсутствуют. Сравнение образцов с изотоп-

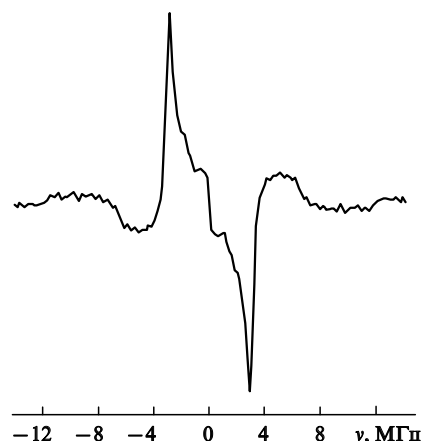


Рис. 9. Результат синусного фурье-преобразования данных, приведенных на рис. 8.

ным замещением ^{14}N на ^{15}N (см.¹⁸) и ^1H на ^2H (см.⁴⁴) показало идентичность результатов. Компьютерное моделирование⁴⁵ помогло выяснить, что причиной отсутствия эффектов электрон-ядерной модуляции является поляризация соответствующих электрон-ядерных переходов, причем в полиориентированном образце соответствующие пики в частотном спектре взаимно уничтожаются.

Другой особенностью метода является синусная зависимость амплитуды сигнала ЭСЭ от времени τ . Это позволяет сразу указать величину сигнала при $\tau = 0$, где она с необходимостью равна нулю. Таким образом, задача экстраполяции сигнала в область «мертвого» времени сводится к значительно более простой задаче интерполяции (см. рис. 8).

Наконец, ширина линий в спектре свободных радикалов в фотосинтезирующих реакционных центрах порядка 1–2 мТл, что соответствует амплитудам используемых СВЧ-импульсов (полосе возбуждения). Это означает, что условия для возбуждения обоих радикалов в паре хорошие.

Перечисленные выше особенности эксперимента ЭСЭ спин-поляризованных РП делают метод весьма эффективным инструментом изучения особенностей структуры реакционных центров.

7. Модуляция спада свободной индукции при селективном возбуждении

В данном методе используют импульсную схему, представленную на рис. 7.^{с.46} Первый импульс 180° малой амплитуды селективно возбуждает лишь один из переходов пары (см. рис. 1 и 2). Его действие можно представить как «выжигание» узкого провала в спектре. Второй импульс большой амплитуды возбуждает все четыре перехода пары (неселективный импульс). Он выполняет двойную роль — формирует сигнал свободной индукции и меняет диполь-дипольное взаимодействие в паре. Интерференция частот разных переходов приводит к модуляции спада свободной индукции с частотой ε_d . В работе⁴⁶ показано, что для спин-коррелированных пар в этом методе можно получить лучшее отношение сигнал/шум по сравнению с двухимпульсным ЭСЭ. Также можно изучать такие важные характеристики пары, как времена нульквантовой и двухквантовой релаксации.

IV. Экспериментальные методики на основе спиновой релаксации

Подходы, в которых используют эффекты спиновой релаксации партнеров, можно разделить на две группы: в первой спин В релаксирует быстро; во второй он релаксирует медленно. В последнем случае спины А и В могут быть одного типа. Случай быстрой релаксации соответствует обменному сужению расщепления за счет диполь-дипольного взаимодействия, когда $\varepsilon_d^2 T_{1B}^2 \ll 1$. Медленная релаксация означает выполнение обратного неравенства. Быстро релаксирующие спины характерны для ионов металлов. Медленно релаксирующие спины могут быть у свободных радикалов и также у ионов металлов. При быстрой релаксации методы исследования основаны на измерении скоростей продольной (T_1 -эффекты) и поперечной (T_2 -эффекты) релаксации спинов А. При медленной релаксации используют методики селективного «выжигания» провала и диполь-дипольного усиления модуляции в стимулированном ЭСЭ.

1. Измерение скорости продольной релаксации спинов А. T_1 -Эффекты

При быстрой релаксации спина В, когда $\varepsilon_d T_{1B} \ll 1$, скорость продольной релаксации спина А (T_{1A}^{-1}) связана с временами продольной (T_{1B}) и поперечной (T_{2B}) релаксаций спина В следующим образом:⁴⁷

$$\frac{1}{T_{1A}} = \frac{1}{T_{1A}^0} + S_B(S_B + 1) \frac{\mu_0^2}{16\pi^2} \times \left[\frac{b^2 T_{2B}}{1 + (\omega_B - \omega_A)^2 T_{2B}^2} + \frac{c^2 T_{1B}}{1 + \omega_A^2 T_{1B}^2} + \frac{e^2 T_{2B}}{1 + (\omega_B + \omega_A)^2 T_{2B}^2} \right], \quad (16)$$

где T_{1A}^0 — время T_{1A} в отсутствие спина В, S_B — спин В, ω_A и ω_B — резонансные частоты спинов А и В,

$$b^2 = \frac{1}{6} g_A^2 g_B^2 \beta^4 \frac{(1 - 3 \cos^2 \theta)^2}{\hbar^2 r^6},$$

$$c^2 = 3 g_A^2 g_B^2 \beta^4 \frac{\sin^2 \theta \cdot \cos^2 \theta}{\hbar^2 r^6},$$

$$e^2 = \frac{3}{2} g_A^2 g_B^2 \beta^4 \frac{\sin^4 \theta}{\hbar^2 r^6}.$$

Время T_{1A} измеряется в экспериментах по восстановлению сигнала после импульсного насыщения (или инверсии). Проводят эксперименты двух типов: с использованием спектрометра ЭСЭ, в котором производится импульсное детектирование сигнала (обычно с помощью спинового эха), и с использованием импульсного спектрометра ЭПР, в котором сигнал детектируют с помощью низкоамплитудного стационарного СВЧ-поля. Различные типы спектрометров ЭПР описаны в работе⁴⁸.

Для определения расстояния r с помощью формулы (16) необходимо знать параметры T_{2B} , T_{1B} , ω_A , ω_B . Для спектров, протяженных по резонансной частоте, необходимо проводить усреднение по ω_A , ω_B . Серьезная проблема состоит в том, что не все переходы спинов В наблюдаются в эксперименте. Даже для кramerсовы ионов, таких как Fe^{3+} , из-за большого расщепления в нулевом поле наблюдается только один переход в X-диапазоне ЭПР между подуровнями $m_S = \pm 1/2$. Другие ненаблюдаемые переходы также могут давать вклад в релаксацию спинов В. Существенной проблемой является также сложность учета в измерениях спектральной диффузии, которая возникает из-за того, что возбуждается лишь некоторый участок неоднородно уширенного спектра ЭПР.

В силу указанных причин достоверность результатов, полученных в рамках данного подхода, не всегда очевидна, и некоторые опубликованные результаты впоследствии были признаны ошибочными. Поэтому в настоящем обзоре полученные этим методом данные цитируются только в случае сравнительных экспериментов.

2. Измерение скорости поперечной релаксации спинов А. T_2 -Эффекты, метод релаксационного зонда

Скорость поперечной релаксации в случае $T_{1B}|\omega_A - \omega_B| \gg 1$ (по-прежнему $\varepsilon_d^2 T_{1B}^2 \ll 1$) определяется уравнением⁴⁷

$$\frac{1}{T_{2A}} = \frac{1}{T_{2A}^0} + \frac{1}{2T_{1A}} + S_B(S_B + 1) \times \frac{\mu_0^2}{16\pi^2} g_B^2 g_A^2 \beta^4 T_{1B} \frac{(1 - 3 \cos^2 \theta)^2}{3\hbar^2 r^6}, \quad (17)$$

где T_{2A}^0 — время T_{2A} в отсутствие спина В.

Поперечная релаксация измеряется по спаду сигнала ЭСЭ. Для применения данного подхода требуется только знание T_{1B} .

В работе⁴⁹ предложен метод измерения, в котором T_{1B} определяли по поперечной релаксации спинов А в образце с равномерным неупорядоченным пространственным распределением спинов обоих типов. Для таких образцов спад сигнала эха⁹

$$v_{\text{random}}(2\tau) = \exp \left[-\frac{16\pi\sqrt{\pi}}{27} \sqrt{S_B(S_B + 1)} \times \right. \\ \left. \times \frac{\mu_0}{4\pi} \frac{g_B g_A \beta^2}{\hbar} C_B \sqrt{2\tau T_{1B}} \right]. \quad (18)$$

где C_B — концентрация спинов В.

Отсюда легко найти T_{1B} . Достоинством такого подхода является его внутренняя замкнутость. В случае парного и равномерного пространственного распределения измеряют одну и ту же величину — скорость поперечной релаксации спинов А, и реализуется один и тот же механизм релаксации. Указанная выше проблема, заключающаяся в том, что не все переходы спина В наблюдаются, снимается здесь автоматически. Ограничением является лишь необходимость приготовления образцов с равномерным распределением спинов В.

Радикальные и ион-радикальные пары, возникающие в радиационных и фотохимических реакциях в твердом теле, часто характеризуются широким разбросом расстояний. Зависимость $(T_{2A})^{-1}$ от расстояния в паре (см. уравнение (17)) позволяет ставить задачу о нахождении функции распределения пар по расстояниям. Это можно сделать, если варьировать температуру, изменяя тем самым T_{1B} (в пределах, когда физические свойства образца остаются неизменными). Спины А, которые находятся вблизи спинов В, не будут давать вклада в сигнал ЭСЭ. Таким образом, вокруг спина В возникает область «невидимости» для спинов А, размер которой варьируется с изменением температуры. Такой подход можно назвать методом релаксационного зонда. Обычно температурные зависимости T_{1A} и T_{2A}^0 значительно слабее, чем T_{1B} (напомним, что спины А — обычно спины органических радикалов, а спины В — спины ионов металлов). Функцию распределения пар по расстояниям с хорошей точностью можно оценить при сравнении данных двух экспериментов⁴⁹ как

$$n(r) = \frac{dv_{\text{pair}}(2\tau)}{d[\ln(v_{\text{random}}(2\tau))/C_B]}, \quad (19)$$

где $v_{\text{pair}}(2\tau)$ — спад ЭСЭ для образца с исследуемым парным распределением.

3. Селективное «выжигание» провала

Методику селективного выжигания провала применяют в случае медленно релаксирующего спина В, когда $\varepsilon_d^2 T_{1B}^2 \gg 1$. При этом условии из уравнения (17) следует, что $T_{1B} \gg T_{2A}$, т.е. спин-решеточная релаксация спинов В протекает медленно в масштабе времени получения ЭСЭ. Так как спин В обычно относится к ионам металлов с широким спектром ЭПР, в рассматриваемом ниже подходе будем пренебрегать возможностью их возбуждения СВЧ-импульсами. В этом заключается основное отличие рассматриваемого метода от описанного выше метода селективного возбуждения.

Импульсная последовательность в методе селективного «выжигания» провала²¹ представлена на рис. 7,с. Первый малоамплитудный импульс «выжигает» узкий провал в спектре ЭПР, ширина которого по порядку величины совпадает с амплитудой импульса. Через время T провал уширяется за счет изменения диполь-дипольного взаимодействия вследствие флуктуации ориентации спина В, обусловленной спин-решеточной релаксацией.

Рассмотрим спин А, резонансная линия которого сдвинута на величину $\pm(1/2)\varepsilon_d$ за счет взаимодействия со спином В (спин В в рассматриваемом случае равен $1/2$). Через время T с вероятностью $(1/2)[1 - \exp(-T/T_{1B})]$ спин В изменит свое значение на противоположное, а с вероятностью $(1/2)[1 + \exp(-T/T_{1B})]$ это значение останется прежним.

Таким образом, если провал описывался в частотной области первоначально функцией $h_0(\omega)$, то через время T она изменится на

$$h_T(\omega) = \frac{1}{2} \left[1 + \exp\left(-\frac{T}{T_{1B}}\right) \right] h_0(\omega) + \\ + \frac{1}{2} \left[1 - \exp\left(-\frac{T}{T_{1B}}\right) \right] \left[\frac{1}{2} h_0(\omega - \varepsilon_d) + \frac{1}{2} h_0(\omega + \varepsilon_d) \right].$$

Под действием второго импульса последовательности происходит спад свободной индукции (без изменения взаимодействий в системе, так как возбуждением спинов В мы пренебрегаем). Этот спад соответствует фурье-образу спектра ЭПР. Если рассматривать разницу между сигналами, когда первый селективный импульс присутствует и когда он отсутствует, то спад свободной индукции можно описать выражением

$$H_T(t) = \int_{-\infty}^{\infty} d\omega [1 - h_T(\omega)] \cos \omega t = \\ = \frac{1}{2} \left[1 + \exp\left(-\frac{T}{T_{1B}}\right) \right] + \frac{1}{2} \left[1 - \exp\left(-\frac{T}{T_{1B}}\right) \right] \cos \varepsilon_d t. \quad (20)$$

Таким образом, спад свободной индукции модулирован с частотой ε_d , и глубина модуляции тем больше, чем больше отношение T/T_{1B} .

Обычно в ЭПР из-за значительного неоднородного уширения спад свободной индукции очень короткий и затухает в пределах «мертвого» времени. В данном же случае спад наблюдается благодаря тому, что вклад в него дают только спины, резонансные частоты которых лежат в пределах узкого спектрального интервала, определяемого шириной «выжигаемого» провала.

4. Релаксационное усиление диполь-дипольного взаимодействия в методе стимулированного эха

Рассмотрим трехимпульсную последовательность стимулированного ЭСЭ $\pi/2 - \tau - \pi/2 - T - \pi/2$ -эхо. В промежутке между вторым и третьим импульсами спин В с вероятностью $(1/2)[1 - \exp(-T/T_{1B})]$ меняет свое направление и с вероятностью $(1/2)[1 + \exp(-T/T_{1B})]$ его направление остается прежним. Рассмотрение фаз прецессии спинов между первым и вторым импульсами, с одной стороны, и после третьего — с другой, приводит к следующему выражению для спада сигнала эха

$$E(2\tau + T) = \frac{1}{2} \left[1 + \exp\left(-\frac{T}{T_{1B}}\right) \right] + \\ + \frac{1}{2} \left[1 - \exp\left(-\frac{T}{T_{1B}}\right) \right] \cos \varepsilon_d \tau, \quad (21)$$

что означает модуляцию с частотой ε_d при сканировании по τ .²² Отсюда можно определить ε_d . Наблюдаемый эффект тем выше, чем больше отношение T/T_1 , поэтому данный подход можно назвать методом релаксационного усиления модуляции (Relaxation Induced Dipolar Modulation Enhancement (RIDME)).

Выражения (20) и (21) аналогичны. Это неудивительно, так как оба подхода — селективное «выжигание» провала и релаксационное усиление диполь-дипольной модуляции — основаны на одном и том же физическом принципе, а различаются лишь методом регистрации. Причем модуляция возникает за счет стохастического процесса спиновой релаксации между импульсами, а не вследствие описанных выше

когерентных эффектов при возбуждении импульсами разных переходов в спиновой системе.

Имеется некоторая аналогия с методом двойного резонанса PELDOR, в котором используется искусственное изменение диполь-дипольного взаимодействия под действием СВЧ-импульса. Здесь же изменение достигается за счет естественного процесса спин-решеточной релаксации. Преимуществом является значительно большая доля спинов В, участвующих в формировании модуляции (P_B). Из уравнений (20) и (21) видно, что эта доля может достигать 50%. Для PELDOR в X-диапазоне P_B составляет лишь 10–20%.

В случае ЭПР высоких полей из-за неоднородного уширения линий P_B в PELDOR становится незначительной величиной, так что эффект модуляции наблюдать нельзя. Для описанных выше релаксационных методик селективного «выжигания» провала и релаксационного усиления диполь-дипольной модуляции эта доля не зависит от используемого частотного диапазона ЭПР. В работе⁵⁰ описано применение данного метода в высокопольном ЭПР (4.5 Тл).

Релаксационные методики имеют недостаток, заключающийся в том, что вклад в наблюдаемую релаксацию могут давать и другие механизмы, например внутримолекулярные движения.⁵¹ Чтобы их отделить, необходимы дополнительные приемы. В работе⁵⁰ для разделения вкладов релаксации спинов В и вращения метильных групп в методе релаксационного усиления модуляции изучалась температурная зависимость этих вкладов. Внутримолекулярные движения зависят от температуры согласно уравнению Аррениуса, а T_1 свободных радикалов обычно пропорционально T^2 . Во втором случае зависимость от температуры довольно слабая, и, понизив ее, можно убрать вклад от внутримолекулярных движений. В методе селективного «выжигания» провала для отделения других механизмов использовали образец сравнения, в котором отсутствуют частицы, несущие спин В.⁵²

5. Метод стимулированного электронного спинового эха вне фазы для спин-коррелированных триплет-радикальных пар

Если партнером радикала в фотоиндуцированной спин-коррелированной паре является молекула в короткоживущем триплетном состоянии, то в начальный момент присутствует только сигнал эха в нормальной фазе,⁵³ а затем возникает сигнал стимулированного эха вне фазы, причем его появление происходит симбатно с деградацией триплетного состояния. При варьировании времени τ наблюдается модуляция с частотой диполь-дипольного взаимодействия, причем модулированы как сигнал эха в нормальной фазе, так и сигнал эха вне фазы.

Модуляция сигнала в нормальной фазе возникает по механизму, аналогичному рассмотренному выше механизму релаксационного усиления диполь-дипольного взаимодействия. Различие лишь в том, что там к модуляции приводил спонтанный сдвиг резонансной частоты спина за счет изменения диполь-дипольного взаимодействия при спин-решеточной релаксации, а здесь — за счет его изменения при исчезновении парамагнитного триплетного состояния. Сигнал эха вне фазы и его модуляция обусловлены как этой причиной, так и спиновой поляризацией исходного состояния триплет-триплетной РП. Получены следующие уравнения для сигналов в нормальной фазе и вне фазы:⁵³

$$\begin{aligned} M_y &= n_0 + (n_1 + n_{-1}) \exp(-KT) + \\ &+ (n_1 + n_{-1}) [1 - \exp(-KT)] \cos \varepsilon_d \tau, \\ M_x &= (n_1 - n_{-1}) [1 - \exp(-KT)] \sin \varepsilon_d \tau, \end{aligned} \quad (22)$$

где n_1 , n_0 , n_{-1} — исходные населенности соответствующих триплетных состояний пары, K — константа гибели триплетного состояния.

Отметим, что сигнал вне фазы возникает только при наличии диполь-дипольного взаимодействия и только в результате гибели триплетного состояния. Кроме того, необходима спиновая поляризация.

Для триплет-радикальных пар также возможен эксперимент селективного «выжигания» провала, аналогичный описанному выше для спин-коррелированных РП.⁵⁴ В этом случае возникает модуляция спада сигнала свободной индукции.

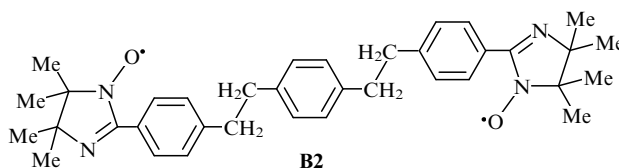
V. Конформации длинноцепочечных бирадикалов, дважды спин-меченых и металлсодержащих биомолекул

1. Нитроксильные длинноцепочечные бирадикалы

Длинноцепочечные бирадикалы при наличии в их структуре одинарных связей могут принимать различные конформации, которые характеризуются разной длиной бирадикала. Расстояние между парамагнитными фрагментами, находящимися на концах бирадикала, можно использовать для характеристики конформационного строения. Для жестких бирадикалов, в структуре которых предполагается лишь одна конформация, результаты измерений таких расстояний обычно хорошо согласуются с результатами моделирования структуры.^{17, 22, 55, 56}

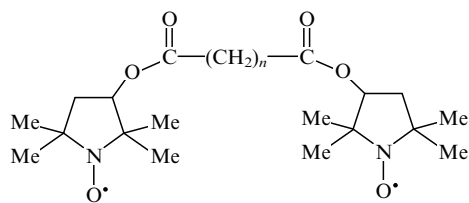
Для длинноцепочечных бирадикалов число возможных конформаций может быть больше. В таком случае следует говорить о функции распределения по расстояниям между парамагнитными фрагментами. С математической точки зрения данная задача представляет собой обратную задачу на решение интегрального уравнения Фредгольма первого рода. В литературе для этого предлагаются разные подходы. В частности, используют усеченное разложение ядра интегрального уравнения,⁵⁷ а также дискретное интегральное преобразование уравнения с соответствующим образом подобранным ядром преобразования (аналогичное фурье-преобразованию)^{33, 58} и регуляризацию Тихонова.³³

Все эти методы, однако, включают достаточно сложную вычислительную процедуру. Если предполагают, что распределение по расстояниям будет достаточно узким, то его ширину можно оценить сразу из затухания модуляции.³⁸ Такой подход был реализован в работе³⁸ при изучении методом PELDOR со скачком магнитного поля жесткого бирадикала **B1** (см. выше) и гибкого радикала **B2**.



Спады сигнала ЭСЭ для **B1** показаны на рис. 5, а результат фурье-преобразования — на рис. 6. Для **B2** модуляция затухала гораздо быстрее, чем для **B1**. Это затухание можно связать с наличием распределения по расстояниям. Расстояние, оцененное по положению пика в частотной области для **B2**, составило 20.5 Å. Затухание модуляции жесткого бирадикала обусловлено разбросом дипольных частот из-за полиориентированности образца. Любое дополнительное затухание можно связать с распределением по расстояниям. При сравнении спадов сигналов для **B2** и **B1** получена ширина распределения $\Delta r = 3$ Å.³⁸

С использованием метода PELDOR изучались конформации бирадикала^{58, 59}



Этот бирадикал содержит n метиленовых групп ($n = 8-20$). Средние расстояния между радикальными фрагментами рассчитаны из частотных спектров, полученных в результате фурье-преобразования временных спадов. Эти данные сравнивали с результатами расчета для предельного случая полностью растянутой *транс*-конформации и с результатами вычисления конформационной статистики при температуре стеклования полистирольной матрицы. Данные по измерению расстояний оказались близки (в пределах ошибки эксперимента) к рассчитанной статистике конформаций.

Функцию распределения по расстояниям для $n = 10$ определяли путем интегрального преобразования и с помощью регуляризации по Тихонову.^{33,58} Оба метода дали близкие результаты: для $n = 10$ при среднем расстоянии $r = 21 \text{ \AA}$ ширина функции распределения на полувысоте оказалась $\sim 5 \text{ \AA}$.

При наличии в образце сложного взаимного пространственного распределения пар для нахождения функции распределения по расстояниям возникает дополнительная проблема разделения внутри- и межпарного взаимодействий. Эта задача представляется непростой из-за сложных корреляций радиальных и угловых переменных. Показано,⁵⁸ что если глубина модуляции спада сигнала эха мала, угловыми корреляциями между спинами пар можно пренебречь.

Методом PELDOR можно измерять диполь-дипольное взаимодействие не только в нитроксильных бирадикалах, но и в бирадикалах, содержащих в качестве спина-партнера парамагнитный ион металла. Выше отмечалось, что для применения метода необходимо, чтобы спиновая релаксация иона за время действия импульсной последовательности была медленной, а спектр ЭПР не очень широким. Авторы работы⁶⁰ изучали комплекс Cu(II) на основе тер-пиридина с присоединенными с двух сторон жесткими группами на основе фенилена и этинилена и двумя нитроксильными метками на концах. Наблюдаемую модуляцию спада интерпретировали как результат диполь-дипольных взаимодействий в парах медь-нитроксил (расстояние $24.3 \text{ \AA}$) и нитроксил-нитроксил (расстояние $48.6 \text{ \AA}$).

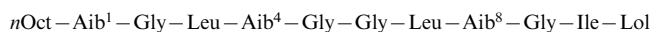
Методом PELDOR также можно изучать конформационное строение спин-меченых полимеров, представляющих собой по сути полирадикалы. Для этого можно использовать кинетику спада сигнала, которая становится заметно неэкспоненциальной, если полимер линейный (корень кубический из времени под экспонентой). Именно такой закон спада установлен при изучении спин-меченого поли(4-винилпиридина) в застеклованном растворе.⁶¹

2. Дважды спин-меченые пептиды и РНК

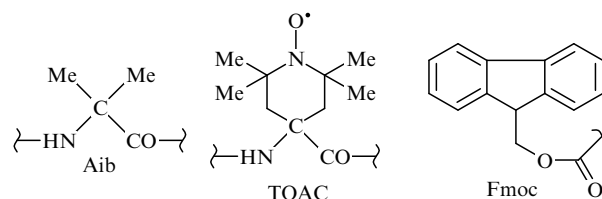
В настоящее время в связи с развитием биохимических методов селективного пришивания меток к заданному участку биомолекулы широко используют спиновые метки.^{62,63} На основании изучения диполь-дипольного взаимодействия между спиновыми метками в дважды спин-меченом пептиде можно сделать вывод о его вторичной структуре. Если расстояние между метками $< 15 \text{ \AA}$, исследование проводят с помощью стационарного ЭПР. Некоторые из полученных результатов приведены в работе⁶⁴. Если расстояние между метками $> 15 \text{ \AA}$, диполь-дипольное взаимодействие в стационарном ЭПР не разрешается, и необходимо применять методы импульсной спектроскопии ЭПР.

Дважды спин-меченый пептид трихогин GA IV изучался авторами работ⁶⁵⁻⁷⁰. Он принадлежит к семейству пептидов-антибиотиков грибкового происхождения, богатых аминокислотой (Aib) и обладающих антибактериальными и антигрибковыми свойствами. Такие пептиды способны создавать ионные каналы в мембранах, что приводит к их проницаемости и может вызывать гибель клетки.

Отличительной особенностью трихогина GA IV является его небольшая длина. Длина пептида мала по сравнению с толщиной мембраны, поэтому механизм возникновения ее проницаемости в настоящее время неясен. Структура пептида содержит три остатка аминокислоты.



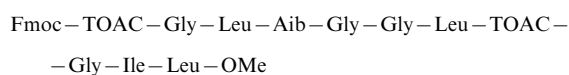
Эти остатки в химическом синтезе замещаются на близкие по строению нитроксильные спиновые метки TOAC.⁶⁸



Использовали трихогин двух типов — с замещением n -октаноильной группы на Fmoc (F-трихогин) и без такого замещения. Кроме того, остаток 1,2-аминолойцинола (Lol) замещался на остаток L-лейцинового метилового эфира (Leu-OMe). В работе⁷¹ приведены данные, показывающие, что указанные выше замещения не приводят к изменению биологической активности пептидов.

Опубликованы результаты исследования пептидов, дважды меченных по положениям 1 и 4, 4 и 8, 1 и 8. Для первых двух типов бирадикалов использовали стационарный ЭПР,⁶⁴ для последнего — импульсный ЭПР (из-за большого расстояния между спинами).

Конформацию спин-меченого F-трихогина-1,8



изучали при 77 K в разных стеклующихся растворителях. Был применен метод PELDOR в трехимпульсном варианте. Фурье-преобразование, как правило, не проводили, весь анализ осуществляли во временной области. Авторы работы⁶⁵ приписали наблюдаемую модуляцию спада ЭСЭ в растворе хлороформа и диметилсульфоксида диполь-дипольному взаимодействию с расстоянием между спинами $\sim 20 \text{ \AA}$. Затухание модуляции было связано с распределением по расстояниям с шириной $\sim 2 \text{ \AA}$. Следует отметить, что только 25% меченых молекул имеют такие параметры функции распределения, остальные 75% характеризуются более широким распределением.

В исследовании⁶⁶ дважды меченые трихогин-1,8 и F-трихогин-1,8 изучали в других полярных застеклованных растворителях — метаноле, этаноле, трифторэтаноле и смеси хлороформ/диметилсульфоксид с разным соотношением компонентов. Оказалось, что модуляция существенно отличается в зависимости от типа молекулы и матрицы. Для F-трихогина-1,8 модуляция наблюдается только в смеси хлороформ/диметилсульфоксид, в то время как для трихогина-1,8 она имеет место во всех матрицах, но с разной частотой осцилляций. Расстояния между парамагнитными фрагментами варьируются от 15.3 в трифторэтаноле до $21.8 \text{ \AA}$ в этаноле.

Эти расстояния можно сопоставить со структурными параметрами пептидов, найденными методом рентгеновского рассеяния.^{69,70} Если для торсионных углов остова

пептида взять общепринятые значения для вторичных структур (таких как α -3₁₀-, 2₇- и 2₅-спирали), то можно рассчитать расстояния между спинами.^{65, 69, 70} По результатам расчетов сделан вывод, что трихогин-1,8 и F-трихогин-1,8 принимают конформации 2₇-спирали во всех матрицах за исключением трифторэтанола, где конформация 3₁₀.

Конформации того же дважды меченого пептида в агрегированном состоянии в слабополярной матрице (смесь хлороформ/толуол), где пептиды образуют тетрамер, изучена в работе⁶⁷. Найдено $r = 15.7 \text{ \AA}$, что близко к значению $14 \text{ \AA}$, рассчитанному для 3₁₀-спирали.

Для изучения структур дважды спин-меченых белков — мутантов лизоцима T4 — был использован метод двухквантовой когерентности.⁷² Исследование проводили в двух диапазонах СВЧ-спектрометра — 9 и 17 ГГц. Расстояния найдены в интервале от $20 \text{ \AA}$ (для мутанта 65/76) до $47 \text{ \AA}$ (для мутанта 61/135). Получены спектры хорошего качества, что позволило сделать выводы о функции распределения по расстояниям. Анализ функции показал наличие множества конформаций этих молекул. Результаты эксперимента были сопоставлены с данными молекулярного моделирования.

Первое исследование спин-меченой РНК проведено в работе⁷³. Изучались два типа РНК с известной молекулярной структурой, меченные нитрокислыми метками в двух положениях по уридиновому остатку. Согласно структурным данным, между парамагнитными фрагментами должно быть расстояние $35 \text{ \AA}$ для одного типа и широкий набор расстояний для другого. Исследование проводили методом PELDOR. Результаты совпали с ожидаемыми: наблюдаемая модуляция сигнала соответствовала расстоянию $35 \pm 2 \text{ \AA}$ в первом случае и не наблюдалась во втором.

Метод PELDOR был использован для определения расстояния между двумя тирозильными радикалами в рибонуклеиновой редуктазе *E. coli*.⁷⁴ По положению пика в частотной области найдено расстояние между двумя радикалами, равное $33.5 \pm 0.4 \text{ \AA}$. Судя по глубине модуляции, минимум 25% радикалов были спарены (в данной системе возможно наличие и одиночных радикалов).

3. Металлсодержащие биомолекулы

Многие белки и ферменты содержат парамагнитные ионы металлов. При наличии пар и кластеров таких ионов для изучения их взаимного пространственного расположения можно применять ЭПР. В металлсодержащих биомолекулах второй спин можно создавать путем введения нитрокислой спиновой метки. В некоторых случаях диамагнитные ионы белков могут быть заменены на парамагнитные, например Zn(II) на Co(II), Mg(II) на Mn(II).

Авторы работ^{75–78} изучали спиновую релаксацию спиновой метки в широком диапазоне температур с целью реализации и быстрой, и медленной релаксации иона. Поперечную релаксацию изучали с помощью двухимпульсной последовательности, продольную — методом насыщения — восстановления. Низкоспиновые железо(III)порфирины рассмотрены в статье⁷⁵. Повышение температуры в интервале от 8 до 120 К приводило к уменьшению, а затем к увеличению T_2 . При анализе экспериментальных данных использовали измеренные времена релаксации для Fe(III). Расстояние в паре металл–ион было оценено величиной $10.5–15 \text{ \AA}$. Высокоспиновые железо(III)порфирины изучены в работе⁷⁶. В качестве аксиальных лигандов использовали фтор, хлор и бром. На температурной зависимости T_2 наблюдался минимум вблизи 6 К. Данные анализировали с использованием независимо найденных скоростей релаксации железа. Оцененные расстояния в паре находятся в интервале от 11.6 до $15.0 \text{ \AA}$, что согласуется с описанным выше случаем низкоспинового железа. При изучении низкоспиновых метемоглобинов, спин-меченых в положении β -93 цистеина, установлено,⁷⁷ что с повышением температуры от 6 до 120 К

значение T_2 сначала уменьшалось, а затем возрастало. Аналогичным образом было найдено расстояние в паре спиновая метка–ион, составившее $15–15.5 \text{ \AA}$. В высокоспиновых фтор- и аква-метемоглобинах эти расстояния увеличились до $15.8–17.5 \text{ \AA}$.⁷⁸

Метод PELDOR был применен для изучения диполь-дипольного взаимодействия между двумя парамагнитными центрами (ПЦ) кластеров $[3\text{Fe}–4\text{S}](+)$ и $[\text{NiF}]$ в гидрогеназе из *Desulfovibrio vulgaris Miazaki F.*⁷⁹ Расстояния между ПЦ, известное из рентгеновских данных и измеренное с помощью PELDOR, различаются. Возможно, это обусловлено специфическим обменным связыванием в железосерном кластере. Тем не менее подобные исследования позволяют получать информацию о внутреннем строении многоядерных кластеров металлов.

В работе⁸⁰ с использованием метода PELDOR проводилось изучение сульфитооксидазы в состоянии Mo(V)/Fe(III) при 4.2 К в разных диапазонах СВЧ (X- и C-диапазоны). Спинами А были спины ионов Fe(III). Анализ данных позволил сделать вывод о множественности конформаций гибкой петли, соединяющей молибден и железо.

VI. Наноструктура кластеров

1. Агрегация пептидов в неполярных средах

Пептиды могут образовывать кластеры или агрегаты, и это свойство может иметь определяющее значение для их физиологических функций. Спектроскопия ЭСЭ предоставляет уникальную возможность изучения кластеризации спин-меченых пептидов. Во всех известных методиках принцип, на основе которого проводят такие исследования, один и тот же. Рассмотрим его на примере PELDOR.

Для радикалов в паре сигнал эха определяется формулой (13). Положим, что кластер состоит из N частиц и вероятность одновременного возбуждения более одного спина В мала, т.е. $P_B N \ll 1$. Тогда для n -й частицы ($n = 1, 2, \dots, N$)

$$V_n(T) = \prod_{k \neq n} \left[1 - P_B + P_B \cos(\epsilon_d^{nk} T) \right],$$

где ϵ_d^{nk} — параметр диполь-дипольного взаимодействия с k -м спином.

Это выражение необходимо усреднить по всем возможным парам. При малых P_B усреднение можно проводить для каждой пары независимо

$$V(T) = \left[1 - P_B \langle 1 - \cos(\epsilon_d T) \rangle \right]^{N-1}.$$

Из этого выражения следует, что при $t \rightarrow \infty$ величина $V(T)$ стремится к пределу

$$(1 - P_B)^{N-1} \approx 1 - (N-1) P_B. \quad (23)$$

Число частиц N в кластере можно оценить из асимптотической (на больших временах) кинетики ЭСЭ.

С использованием данного подхода исследована агрегация спин-меченого пептида трихогина GA IV (см. раздел V) в застеклованных при 77 К полярных и слабополярных растворах методами PELDOR и стационарного ЭПР.⁸¹ Высказана гипотеза о том, что данный пептид образует каналы в мембранах путем связывания в пучок нескольких молекул с полярными группами, направленными внутрь, и гидрофобными группами, находящимися снаружи. Однако, несмотря на множество проведенных исследований, образования таких агрегатов не установлено. Использовали растворители двух типов — смеси хлороформ/толуол (7:3) и хлороформ/толуол/этанол (3.5:1.5:5). Выбор состава смесей определялся двумя факторами — растворимостью пептида и стеклообразованием при замораживании. В случае первой смеси среда была слабополярной, в случае второй — полярной. Пептиды

имели спиновую метку по первому и четвертому положениям.

Исследование разных сред с помощью стационарного ЭПР при 77 К показало отсутствие различий в спектрах. Данные, полученные методом PELDOR, представлены на рис. 10. Видно, что в полярной матрице наблюдается гладкий спад сигнала, характерный для равномерного межмолекулярного распределения. В неполярной матрице при временах 100–150 нс наблюдается резкий спад сигнала, который существенно больше спада сигнала, приведенного для сравнения бирадикала F-трихогина-1,8.

Такое поведение можно объяснить агрегацией молекул в неполярной матрице. Воспользовавшись формулой (23) и данными для модельной бирадикальной системы, можно сразу оценить число молекул в агрегате. Действительно, при одинаковых условиях эксперимента с учетом близости формы спектра ЭПР в обоих случаях из асимптотики для бирадикала находят долю возбуждаемых спинов P_B (в данном случае $N = 2$). Зная величину P_B из данных асимптотик (см. рис. 10), можно сразу определить, что в слабополярном растворе $N \approx 4$. Таким образом, молекулы пептида в застеклованном слабополярном растворе образуют агрегаты в виде тетрамеров.

Наблюдаемую модуляцию сигнала (см. рис. 10, кривые 1 и 2) можно объяснить тем, что агрегаты имеют структуру с фиксированными расстояниями между спиновыми метками. Размер данного агрегата, оцененный по начальной скорости спада (до 150 нс), составляет 30–36 Å. Расстояния, найденные из модуляции спада для F-трихогина-4 и для трихогина-4, равны 23.5 и 26.0 Å соответственно.⁸¹

Интересно, что при комнатной температуре стационарные спектры ЭПР в этих растворителях существенно различны.⁸¹ В случае слабополярного растворителя линии значительно шире, что похоже на уширение за счет замедления ориентационного движения, известное в ЭПР спиновых меток и зондов. Такого замедления следует ожидать именно при кластеризации, так как время ориентационной релаксации согласно соотношению Стокса–Эйнштейна–Дебая пропорционально размеру частицы. Исходя из уширения стационарных спектров ЭПР, были сделаны количественные оценки размера агрегата.⁸² Результаты измерений совпали с оценкой числа молекул в агрегате ($N \approx 4$). Следовательно, данные стационарного ЭПР для жидкости при комнатной температуре и данные метода PELDOR для застеклованных растворов в обоих случаях подтверждают наличие агрегации пептидов.

Аналогичные измерения проведены для смесей других слабополярных растворителей: хлороформ/толуол, четыреххлористый углерод/толуол, дихлорэтан/толуол.⁸³ Во всех

случаях имела место агрегация с $N \approx 3.1–4.3$ в зависимости от системы. Наблюдаемая модуляция соответствовала расстояниям между спиновыми метками 23, 26 и 33 Å (одно из этих расстояний или их набор в зависимости от системы).

В работе⁸⁴ изучена агрегация спин-меченого зервамина IIА (гексадекапептида грибкового происхождения), о котором известно, что он формирует полые каналы в двойных фосфолипидных слоях. Результаты исследования методом PELDOR застеклованных при 77 К смесей в системе толуол/метанол показали наличие агрегатов. Среднее расстояние между спиновыми метками составило 25–35 Å (в зависимости от состава смеси). Был сделан вывод об антипараллельной ориентации молекул пептидов, причем увеличение содержания метанола в смеси приводило к разрушению структуры кластера.

Агрегации спин-меченых димеров трихогина (ковалентных соединений двух молекул типа «голова к хвосту») в метаноле не наблюдалось, но она имела место в смеси хлороформ/толуол (от 2 до 3 молекул).⁸⁵ Расстояние между спиновыми метками в агрегате найдено в интервале от 30 до 45 Å. В неполярных растворителях при повышении концентрации пептидов происходит агрегация в тетрамеры.⁸⁶

Методом ЭСЭ на основе двухквантовой когерентности¹⁶ установлена агрегация пептидов MTSL–CPPPC–MTSL в смеси глицерин/вода/трифторэтанол при -82°C . С увеличением концентрации пептида от 0.75 до 3 ммоль·л⁻¹ появлялся сигнал двухквантовой когерентности как от внутримолекулярных, так и от межмолекулярных пар. В последнем случае характеристики сигнала свидетельствовали о высокой локальной концентрации спинов. Агрегация наблюдается в полярной матрице. Для близкого по строению пептида MTSL–CPPPC–MTSL агрегация не обнаружена.¹⁶

2. Наноструктура иономеров

Иономеры — полимеры с концевыми ионными группами^{87,88} — характеризуются наличием кластеров ионных групп, которые имеют размеры порядка нескольких нанометров, и расстояние между ними того же порядка. Оба эти параметра наноструктуры могут быть оценены с использованием ионных спиновых зондов.^{33,89,90} Изучение иономеров на основе сополимера полиизопрена и полистирола показало, что ионные группы могут находиться на одном конце цепи, на обоих концах, а также посередине в точке соединения полиизопрена и полистирола. Показано, что ионные зонды попадают на поверхность ионных кластеров.⁹¹

Описанные в работах^{33,89,90} эксперименты проводили с использованием метода PELDOR. Концентрацию спиновых зондов подбирали такой, чтобы на каждый кластер их приходилось в среднем по два. Временную эволюцию сигнала PELDOR интерпретировали как результат проявления парной функции распределения, представляющей собой наложение двух гауссовых кривых, и равномерного распределения. Гауссовы кривые соответствовали расстояниям $r_1 \approx 2$ нм и $r_2 \approx 5–7$ нм, где r_1 — характерное расстояние между частицами в кластере, r_2 — характерное межкластерное расстояние.

Контрольный опыт с использованием неполярного спинового зонда показал лишь равномерное распределение. Подтверждением приведенной выше интерпретации служили данные для трех ионных спиновых зондов с увеличивающимся расстоянием между нитроксильной и ионной группами. Первый пик распределения смещался в сторону больших расстояний,⁸⁹ что интерпретировали как дополнительное свидетельство местонахождения зонда на поверхности (с погружением нитроксильной группы в полимерные цепи), а также того, что этот пик надо приписать размеру кластера. Данные по малоугловому рентгеновскому рассеянию⁹¹ согласуются с данными метода PELDOR³³ (при некоторых предположениях об особенностях интерпретации результатов обоих методов).

Сигнал эха, отн. ед.

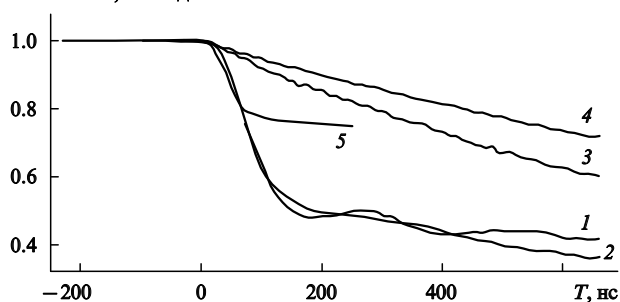


Рис. 10. Спад сигнала в двухчастотном PELDOR при сканировании по времени T (см. рис. 4,б) для застеклованных растворов пептида при 77 К.⁸¹

1, 2 — F-трихогин-4 и трихогин-4 в смеси хлороформ/толуол соответственно; 3, 4 — то же в смеси хлороформ/толуол/этанол; 5 — дважды меченый пептид F-трихогин-1,8 в метаноле.

При изучении полимеров с различной молекулярной массой (и, соответственно, с различной длиной цепи) показано, что размер кластера от этого параметра не зависит. Однако зависимость наблюдается, если размер ионной группы много меньше длины цепи. Расстояние между кластерами должно коррелировать с длиной цепи линейно. Такая корреляция установлена для полимеров с ионной группой на одном конце³³ в виде

$$r_2 \sim M^{0.334},$$

где M — молекулярная масса кластера. Для полимеров с ионными группами на двух концах (в сополимере полиизопрена и полистирола) имеются анион на одном фрагменте и катион на другом) r_2 от M не зависело. Это связано с особенностями упаковки полимеров, для которой характерно появление поверхности раздела между полиизопреновыми и полистирольными участками с расположением ионных групп на поверхности. При этом увеличение M может не влиять на взаимное расположение кластеров на поверхности.

VII. Фотосинтезирующие реакционные центры растений и бактерий — стабильные парамагнитные пары

1. Радикалы и ионы в фотосинтезирующих реакционных центрах

Процесс фотосинтеза в высших растениях, водорослях и некоторых бактериях происходит в фотосинтезирующих реакционных центрах. Они представляют собой сложные белковые комплексы, несущие ряд кофакторов, которые осуществляют функции поглощения энергии кванта света и последующего разделения зарядов. При этом возникают радикальные пары из парамагнитных катион- и анион-радикалов. Кроме того, в структуре РЦ изначально присутствуют парамагнитные ионы. Поэтому спектроскопия ЭПР может служить эффективным инструментом исследования структуры и функционирования РЦ.^{92–95}

Строение РЦ изучалось рентгеноструктурными методами в ряде работ (см., например,^{96–102} и библиографию в них). Для применения этих методов образцы необходимо закристаллизовать. Пространственное разрешение варьируется от 2 до 4 Å в зависимости от сложности системы и качества кристалла. Полезным при анализе структуры оказывается также метод молекулярного моделирования,¹⁰³ в котором выводы о строении более сложных систем делают на основе известных данных относительно простых систем (РЦ пурпурных бактерий).

Исследование РЦ методами импульсного ЭПР имеет следующие преимущества. Во-первых, приготовление образца и различных его модификаций (например, с искусственной заменой кофакторов) значительно менее трудоемкий процесс, чем кристаллизация образца, исключаются также связанные с этим артефакты. Во-вторых, более высокое пространственное разрешение позволяет уточнить супрамолекулярную структуру, полученную другими методами, и в ряде случаев при этом удается облегчить интерпретацию данных. В-третьих, становится возможным наблюдение перестройки структуры под действием света и температуры. Наконец, возникает возможность изучения связи структуры с функционированием РЦ, так как в методе ЭПР непосредственно изучают кофакторы, отвечающие за перенос электрона.

Проще всего устроен бактериальный РЦ. Для него получены данные с максимальным разрешением, 2,3–3 Å.^{96–99} Он содержит первичный донор электронов — димер молекулы бактериохлорофилла, который обычно обозначают как P_{870} (нижний индекс означает длину волны максимума полосы оптического поглощения в нанометрах). Поглощение кванта света приводит к появлению катион-радикала P_{870}^{+} и элект-

рона, мигрирующего по цепи других кофакторов. При миграции электрон последовательно образует соответствующие анион-радикалы. Сначала он попадает на соседнюю с димером молекулу бактериохлорофилла, затем на молекулу бактериофеофитина, затем на первичный хинонный акцептор Q_A и на вторичный хинонный акцептор Q_B . На каждом этапе разделения зарядов имеют дело с парой частиц (радикальной парой). Катион димера восстанавливается за счет переноса электрона с близлежащей молекулы цитохрома. После поглощения двух квантов света дважды восстановленный Q_B протонируется до хинона и покидает реакционный центр. Его место занимает другой хинон из так называемого хинонного пула, и процесс может происходить вновь. В бактериальном РЦ имеется также парамагнитный негемовый ион железа $Fe(II)$. Все кофакторы имеют своего «двойника», расположенного симметрично относительно линии, соединяющей центр P_{870} и ион железа (группа симметрии C_2 , сам димер P_{870} также симметричен). Таким образом, имеются две ветви, А и В. Причем разделение заряда происходит только вдоль ветви А. Почему ветвь В остается неактивной, пока неясно.

Фотосинтез высших растений гораздо более сложен, он включает последовательную работу двух РЦ, фотосистемы II (ФС II) и фотосистемы I (ФС I). Одним из результатов их работы является, как известно, выделение кислорода из молекулы воды. Это происходит в так называемом кислородвыделяющем комплексе — четырехъядерном марганцевом кластере.

Структура ФС I установлена с помощью рентгеновских методов (разрешение 4 Å).¹⁰⁰ Перенос электрона в ФС I с первичного хлорофиллового донора P_{700} происходит сначала на молекулу хлорофилла (A_0), затем на молекулу филлохинона (A_1). Образуется пара $P_{700}^{+}A_1^{-}$.

Структура ФС II также установлена с помощью рентгеновских методов (разрешение 3.7–3.8 Å).^{101, 102} Белковый остов ФС II содержит набор кофакторов, аналогичных бактериальному РЦ, — хлорофилловый донор электронов P_{680} , феофитин, пластохинон, негемовое железо(II). Считается, что эти кофакторы тоже образуют структуру с симметрией C_2 , аналогичную бактериальному РЦ. Пластохинон Q_B превращается в пластохинол, который посредством цитохрома b_6f становится донором электронов для ФС I; P_{680}^{+} восстанавливается тирозином Y_Z . Имеется еще одна симметрично расположенная молекула тирозина, обозначаемая Y_D . Ее функция не установлена.

Марганцевый кластер окисляется ступенчато, при последовательном поглощении квантов света. В результате при поглощении четырех квантов света он расщепляет 2 молекулы воды на 4 протона и 4 электрона, при этом проходит 5 промежуточных состояний — S_0, S_1, S_2, S_3, S_4 (переход из S_4 в S_0 темновой) и дает в конце молекулу кислорода.¹⁰⁴ В литературе описано несколько моделей функционирования этого кластера (см., например,¹⁰⁵).

В лабораторных условиях разные состояния цикла $S_0–S_4$ достигаются определенной процедурой биохимической обработки, облучения и замораживания. В состоянии S_2 наблюдается широкий многокомпонентный сигнал ЭПР четырехъядерного марганцевого кластера, имеющего спин 1/2.

2. Стабильные парамагнитные пары

Авторы работы¹⁰⁶ изучали пары $P_{870}^{+} - Q_A^{-}Fe^{2+}$ в РЦ пурпурных бактерий *Rhodobacter sphaeroides* R26. Был использован метод селективного «выжигания» провала. Расстояние найдено равным 26 ± 2 Å, что хорошо согласуется с данными рентгеноструктурного анализа. Этот факт авторы считали подтверждением адекватности используемого подхода, который позже применяли для ряда других систем.

Пару $Y_Z - Mn_4$ в ФС II изучали методом насыщения – восстановления в ЭСЭ.¹⁰⁷ Установлено расстояние 15 Å.

В работе¹⁰⁸ были указаны возможные источники ошибок метода. Необходимо отметить, что диполь-дипольное взаимодействие в этой паре хорошо наблюдается в стационарном ЭПР; на основе анализа формы линии разными авторами найдено расстояние $\sim 8 \text{ \AA}$.^{109–112}

При исследовании пары Y_D-Mn_4 в ФС II измерения проводили разными методами спектроскопии ЭСЭ, в частности селективным «выжиганием» провала.⁵² В этом методе принципиальное значение имеет исключение всех источников уширения провала, кроме связанных с диполь-дипольным взаимодействием. Это достигалось путем сравнения полученных спектров со спектрами образца, в котором марганцевый комплекс был удален. Для лучшего согласия с экспериментом предполагалось, что спин-решеточная релаксация марганцевого комплекса является неэкспоненциальной, с небольшой сильно затянутой компонентой (ее доля 12%). Кроме того, предполагалось наличие распределения по расстояниям в диапазоне 4–6 Å. Измерения для состояния S_2 дали расстояние 28 Å. Методом PELDOR¹¹³ получена близкая величина $27 \pm 0.2 \text{ \AA}$.

Результаты упомянутых выше исследований показали, что Y_D и Y_Z расположены существенно несимметрично относительно марганцевого комплекса. Значительное удаление от него Y_D дает основание считать, что эта молекула не вовлечена в первичный перенос электрона.

Диполь-дипольное взаимодействие в парах Y_D и Y_Z в ФС II изучалось методом «2 + 1»¹¹⁴ на образцах с удаленным марганцевым комплексом. Найдено расстояние $\sim 30 \text{ \AA}$. В рамках такого же подхода в работе¹¹⁵ были исследованы ориентированные мембраны. Определяли угол между радиусом-вектором пары и нормалью к мембране, который оказался равным $100 \pm 2^\circ$.

Ориентированные мембраны с удаленным марганцевым комплексом изучали методом «2 + 1».¹¹⁶ Было определено направление вектора, соединяющего Y_D и Chl_z относительно нормали к мембране (угол составлял $50 \pm 5^\circ$). Расстояние в паре, найденное для полиориентированного образца, равно $29.4 \pm 0.5 \text{ \AA}$.^{116, 117} В радикальной паре $Y_D-Q_A^-$, изученной тем же методом, расстояние оказалось равным $38.8 \pm 1.1 \text{ \AA}$.¹¹⁷

При исследовании пар $Y_D-Fe(II)$ в ФС II использовали метод селективного «выжигания» провала.¹⁰⁶ Расстояние составило $42 \pm 2 \text{ \AA}$. При расчетах принимали во внимание наличие расщепления в нулевом поле, с учетом которого эффективный спин иона оказался равным 0.81.

Данные по парам $Y_Z-Fe(II)$ и $Y_D-Fe(II)$ были получены методом насыщения–восстановления.¹¹⁸ Выше отмечено, что этим методом трудно получить достоверные количественные данные, однако качественная информация может оказаться полезной. Изучены образцы, освобожденные от марганцевого комплекса. В мутантах, не содержащих Y_D , можно охарактеризовать в чистом виде пары $Y_Z-Fe(II)$. Оказалось, что кинетика насыщения–восстановления для Y_Z и Y_D одинакова. Это дает основание предположить, что расстояние обоих тирозинов от $Fe(II)$ одинаково, т.е. они расположены симметрично относительно $Fe(II)$.

VIII. Фотосинтезирующие реакционные центры растений и бактерий — фотоиндуцированные спин-коррелированные пары

В изолированных РЦ можно исследовать короткоживущие РП, возникающие после поглощения кванта света в ходе переноса электрона. Например, в бактериальных РЦ при низких температурах переноса за пределы Q_A не происходит, пара $P_{870}^+Q_A^-$ живет 30 мс и исчезает в процессе обратной рекомбинации. Расстояние в паре $\sim 25 \text{ \AA}$, что делает ее удобным объектом для изучения методами спектроскопии ЭСЭ. Так как исходное спиновое состояние пары синглетное, в начальный момент ее спины не находятся в термодинами-

ческом равновесии со средой и пара является спин-коррелированной. Поэтому применение ЭСЭ представляет дополнительный интерес для изучения эффектов спиновой корреляции.

Впервые сигнал ЭСЭ от радикальной пары в фотосинтезирующих РЦ зарегистрирован в работе¹¹⁹. Было обнаружено, что сигнал сдвинут по фазе на 90° по сравнению с обычными сигналами систем в термодинамическом равновесии (сигнал вне фазы). Природа сигнала и сдвига фазы тогда не были понятны. Теория ЭСЭ спин-коррелированных РП создана значительно позднее^{41, 42} и действительно предсказывает сигнал вне фазы для спин-коррелированных РП (см. раздел III).

Другим предсказанием этой теории является модуляция сигнала двухимпульсного ЭСЭ с увеличением интервала между импульсами (ESEEM) с частотой диполь-дипольного взаимодействия в паре. Модуляция сигнала действительно наблюдалась,¹²⁰ однако была приписана электрон-ядерному взаимодействию, и ее не анализировали. Значительно позже было установлено, что электрон-ядерное взаимодействие в спин-коррелированных РП не проявляется, а наблюдаемая модуляция целиком определяется электрон-электронным взаимодействием в паре.^{18, 44} Помимо хорошего согласия экспериментального дипольного дублета с теоретическим, на это указывали также результаты экспериментов^{18, 44} по изотопному замещению ^{14}N на ^{15}N и водорода на дейтерий.

Причина отсутствия электрон-ядерного вклада в модуляцию спада ЭСЭ (который сильно осложняет измерения диполь-дипольного взаимодействия для пар в термодинамическом равновесии) связана, по-видимому, с поляризацией электрон-ядерных переходов, линии которых взаимно уничтожаются в частотной области полиориентированного образца.⁴⁵

После работы¹⁸ методом модуляции спада ЭСЭ вне фазы для РП в фотосинтезирующих РЦ было выполнено большое число исследований. Из-за отсутствия электрон-ядерного вклада, соответствия ширины спектра ЭПР ширине полосы возбуждения спектрометра ЭСЭ, легкости интерполяции сигнала в «мертвом» времени (см. раздел IV) дипольный дублет получается близким к теоретическому (см. рис. 3 и 9). Хорошо разрешается не только перпендикулярная ориентация, но и параллельная. Это позволяет определять расстояние в паре с очень высокой точностью (до долей ангстрема) и анализировать тонкие эффекты, связанные с изменением структуры под действием внешних факторов.

В трех типах РЦ — бактериальных, ФС I и ФС II — на начальных этапах процесса переноса электрона возникают близкие по строению РП. Для изучения методом ЭСЭ удобны пары, которые состоят из первичного донора электрона и первичного хинонного акцептора.

1. Бактериальные реакционные центры

В реакционных центрах пурпурных бактерий *Rhodobacter sphaeroides* R26 при низких температурах электрон с Q_A на Q_B не переносится, и возникает радикальная пара $P_{870}^+Q_A^-$, которая живет 30 мс и исчезает в процессе обратной рекомбинации. Эта пара изучалась в Zn-замещенных образцах.^{18, 44, 121, 122} Был обнаружен сигнал эха вне фазы, который с изменением τ сильно модулирован. При анализе дипольного дублета в частотной области определены расстояния в паре. Строение этих РЦ хорошо известно из рентгеноструктурных данных, поэтому одной из главных целей исследования была проверка новой методики.

Оказалось, что расстояния в паре, полученные в разных работах, отличаются. По данным метода рентгеновского рассеяния расстояние в паре должно быть 28.1 (см.⁹⁸) или 29.2 Å.⁹⁹ Найдена величина диполь-дипольного взаимодействия в паре,¹⁸ которая соответствовала меньшему расстоянию. Для свежеприготовленных образцов расстояние состав-

ляло $28.9 \text{ \AA}$,¹²² что хорошо согласуется с рентгеноструктурными данными. Расхождение результатов приписано «старению» образца, т.е. изменению его структуры при длительном хранении (в работе¹⁸ были использованы образцы, хранившиеся при температуре жидкого азота в течение нескольких месяцев). В работах^{44, 121} найдено расстояние $28.4 \text{ \AA}$, что в пределах погрешности близко к данным исследования¹²².

Полученное хорошее соответствие с рентгеноструктурными данными позволяет говорить о том, что подход на основе регистрации модуляции спада сигнала эха вне фазы дает адекватную информацию о расстояниях в паре. Следует отметить, что этими методами изучают различающиеся системы. В рентгеноструктурном анализе это кристаллический образец, нет светового облучения и зарядов в системе. При исследовании методом ЭСЭ образец обычно аморфный (хотя может быть и кристаллическим, см. ниже) и изучается пара из двух разноименно заряженных частиц. Поэтому полученные результаты означают, кроме всего прочего, что эти различия не приводят к заметным структурным изменениям. В частности, эффекты электрострикции при разделении зарядов должны быть малы.

Авторы работы¹²³ изучали РЦ бактерий *Rhodospseudomonas viridis* в Zn-замещенных образцах и обработанных *о*-фенантролином для блокирования переноса электрона на Q_B . Для пары $P_{960}^+ Q_A^-$ найдено расстояние, также оказавшееся близким к расстоянию, определенному с использованием метода рентгеновского рассеяния.¹²⁴

Для исследованных бактериальных РЦ в области криогенных температур обнаружена температурная зависимость формы дипольного дублета, которая интерпретирована как результат перегруппировки белкового остова РЦ при изменении температуры.

2. Реакционный центр ФС I

Спин-коррелированные пары $P_{700}^+ A_1^-$ в ФС I изучали в работах^{44, 121, 125–130}. Обнаружено, что форма дипольного дублета в фурье-преобразованном спаде сигнала эха для этих систем (см. рис. 9) близка к теоретической, т.е. он почти не уширен за счет других взаимодействий (см. рис. 3). Линии здесь гораздо уже, чем в спектрах аналогичных пар в бактериальных РЦ или в реакционном центре ФС II (см. ниже). Также не установлено температурной зависимости этого спектра. Из-за того что ширина линий мала, расстояние в паре было определено с рекордной для этого диапазона точностью. В работах^{44, 121} измеренное расстояние составило $25.4 \pm 0.3 \text{ \AA}$. Практически такой же результат получен в работе¹²⁵. Отметим уменьшение r по сравнению с бактериальными РЦ.

Указанная точность примерно соответствует и ширине распределения по расстояниям в паре. Столь малая ширина распределения для довольно значительных расстояний представляется нетривиальным фактом. Подчеркнем, что речь идет об аморфной системе ($\sim 60\%$ по объему занимает глицерин — криопротектор, стеклюющийся при низкой температуре). Обнаруженный факт означает, что большие по размеру биологические молекулы в аморфном окружении могут проявлять высокий уровень структурной организации в нанометровом диапазоне расстояний.

Исследование РЦ, в которых филлохинон замещен различными искусственными хинонами, проведено в работах^{125, 128, 129}. Оказалось, что в пределах экспериментальной точности в этих системах расстояния в паре не изменялись. Это означает, что искусственные хиноны встраиваются точно в то же место, что и нативные. Из данных по спиновой поляризации в ЭПР (см.⁹³) следует, что нативный и искусственный хиноны ориентированы по-разному. Одинаковое расстояние в этих двух случаях означает, что функциониро-

вание A_1 как акцептора электронов не зависит от направления связывания хинона.¹²⁸

В работе¹²⁷ изучали монокристаллы реакционного центра ФС I, принадлежащие к группе симметрии $P6_3$, с двумя тримерами ФС I в единичной ячейке. При вращении кристалла показана сильная ориентационная зависимость дипольного дублета, из которой была определена ориентация оси, соединяющей обе частицы в паре. Относительно кристаллографической оси c угол составил $27 \pm 5^\circ$, а ее проекция на плоскость ab оказалась параллельной оси a .

Полученные результаты позволили довольно точно определить две возможные локализации филлохинона A_1 в цепи переноса электрона, которые оказались связаны симметрией псевдо- C_2 кофакторов хлорофилла. Эти результаты использованы при интерпретации данных рентгеновского рассеяния.¹³¹

При изучении ориентированных мембран¹³⁰ определен угол между направлением пары $P_{700} A_1$ и нормалью к мембране, который оказался равным $24 \pm 4^\circ$. На основании этих результатов и данных по рентгеновскому рассеянию сделан вывод о направлении переноса электрона в РЦ.

3. Реакционный центр ФС II

При поглощении кванта света в ФС II появляется радикальная пара $P_{680}^+ Q_A^-$ (см.^{130, 132–134}). В эксперименте наблюдаются довольно широкие линии, причем их ширина и форма зависят от способа приготовления образца.¹³² В тех случаях, когда ширина заметно отличалась от теоретической, предполагалось наличие двух разных типов пар с расстояниями между парамагнитными центрами от 26 до $29 \text{ \AA}$.¹³² В других случаях получены расстояния в паре $r = 27.4 \pm 0.3 \text{ \AA}$,^{130, 133} $27.2 \pm 1 \text{ \AA}$,¹³² $27.7 \pm 0.7 \text{ \AA}$.¹³⁴ Как видно, данные результаты хорошо согласуются между собой, хотя в работе¹³² исследование проводили при 80 K, а в работах^{133, 134} — вблизи комнатной температуры. В связи с большой шириной линий указанная в публикациях^{130, 133} точность измерений представляется завышенной.

При изучении ориентированных мембран определен¹³⁰ угол между нормалью к мембране и осью пары $P_{680}^+ Q_A^-$ (он оказался равным $21 \pm 5^\circ$).

Имеются сведения о трансформации дипольного дублета с увеличением задержки после лазерного импульса с характерным временем порядка 1 мкс.^{133, 134} Эта трансформация объясняется реакцией восстановления P_{680} тирозином Y_Z с образованием пары $Y_Z^{ox} O_A^-$. Анализ дипольного дублета для этой пары показал, что расстояние равно $34 \pm 1 \text{ \AA}$.¹³⁴

4. Эффект Клейнфельда

Кинетика обратной рекомбинации $P_{870}^+ Q_A^-$ и $P_{870}^+ Q_B^-$ в реакционных центрах пурпурных бактерий резко различается в зависимости от того, был образец заморожен при наличии или в отсутствие света.¹³⁵ Считается, что это связано со структурными изменениями под действием света. В работе¹³⁶ проведены рентгеноструктурные исследования образцов, замороженных в темноте и под действием света. В последнем случае получались пары $P_{870}^+ Q_B^-$. Для Q_B^- было найдено смещение на $5 \text{ \AA}$ при неизменном положении нейтральной молекулы Q_A .

Методом ЭСЭ вне фазы проводили сравнительное изучение пар $P_{870}^+ Q_A^-$ в образцах, замороженных при наличии и в отсутствие света. В работе¹³⁷ изменение расстояния не было зарегистрировано, а в работе¹³⁸ указано на возможное его увеличение на $0.4 \pm 0.2 \text{ \AA}$. Повышенная точность измерения в данном случае обусловлена тем, что сравниваются два практически одинаковых по форме спектра. Полученная величина оказалась, однако, слишком мала, чтобы эффект Клейнфельда можно было объяснить изменением расстояния

между кофакторами P_{870} и Q_A . Возможно, причину следует искать в перемещении отдельных полярных групп молекул, вовлеченных в перенос заряда.

5. Температурная зависимость супрамолекулярной структуры бактериальных реакционных центров

Для бактериальных РЦ была обнаружена заметная температурная зависимость дипольного дублета.^{18, 122} Ниже 100 К дублет заметно уширяется. Уширение можно связать с появлением распределения по расстояниям. Сопоставление с модельными расчетами показало, что при понижении температуры до 15 К ширина функции распределения возрастает от ~ 1 до ~ 4 Å. При $T < 100$ К вид распределения зависит от температуры, и при ее изменении наблюдался гистерезис.

Эти данные свидетельствуют о низкотемпературной динамике белков, составляющих остоу РЦ и несущих на себе исследуемые в данном случае кофакторы P_{870} и Q_A . О наличии такой динамики известно из данных, полученных различными методами — «выжигания» спектрального провала в оптических спектрах и фотонного эха,^{139–141} инфракрасного эха,^{142, 143} спектроскопии одной молекулы,¹⁴⁴ мёсбауэровской спектроскопии¹⁴⁵ и др. Однако во всех этих случаях исследовалась динамика в атомной шкале расстояний. Расстояния в паре $P_{870}^+Q_A^-$ указывают на то, что эти эффекты могут носить кооперативный характер и определяться движением некоего кластера молекул нанометрового размера.

Авторы статьи¹⁴⁶ провели исследование, аналогичное работе¹²², при температуре ~ 15 К и ниже. Оказалось, что в интервале 13–20 К понижение температуры приводит к заметному сужению линий дипольного дублета. Это означает более упорядоченное состояние при понижении температуры. Переход из одного состояния в другое оказывается полностью обратимым. Внешне он напоминает превращение кристалл–высоковязкая жидкость (в пользу последней свидетельствует также упомянутый выше температурный гистерезис). Ранее такие структурные переходы при низких температурах не были описаны.

Полученный результат означает наличие в энергетическом ландшафте белка РЦ очень низких барьеров. При изучении миоглобина методом фотонного эха¹³⁹ установлены барьеры низкой величины (примерно несколько десятков К).

Для наблюдаемого перехода должны существовать возможности структурной перегруппировки в ближайшем окружении белка (в нанометровом диапазоне расстояний). Вопрос о наличии динамической гетерогенности в молекулярных неупорядоченных средах, возникающей в этом диапазоне расстояний, в настоящее время активно обсуждается.^{147, 148}

IX. Заключение

Методы импульсной спектроскопии ЭПР, основанные на применении электронного спинового эха, позволяют изучать конформации биомолекул, наноструктуру полимеров и супрамолекулярную структуру таких сложных образований, как фотосинтезирующие реакционные центры растений и бактерий. Эти методы дают возможность определять расстояния между парамагнитными фрагментами в диапазоне от 15 до ~ 100 Å, при этом достигается высокая точность измерений. Например, при изучении спин-коррелированных радикальных пар в ФС I при $r \approx 25$ Å точность составила 0.3 Å. Высокая разрешающая способность позволяет получать информацию о тонких изменениях в наноструктуре вещества, происходящих под влиянием внешних воздействий. Одним из ярких примеров этого является обнаруженная

динамика наноструктуры фотосинтезирующего бактериального реакционного центра при криогенных температурах.

Основой для применения методов является наличие в системе свободных радикалов или ионов, объединенных в пары или в кластеры. Такая ситуация может возникать естественно (например, в фотосинтезирующих реакционных центрах или в металлсодержащих биомолекулах), либо создаваться искусственно — путем введения спиновых зондов и меток (обычно на основе нитроксильных радикалов). В настоящее время спиновые метки широко применяют в связи с развитием биохимических методов селективного пришивания меток к заданному участку биомолекулы.

В литературе предложено много разных вариантов исследования диполь-дипольного взаимодействия между парамагнитными центрами. Для каждой системы выбор конкретного метода определяется шириной сигнала в спектре ЭПР и временами релаксации. Большое значение могут иметь другие свойства системы, например возможность проведения контрольных экспериментов, когда изучаемое диполь-дипольное взаимодействие отсутствует. При выборе метода важны простота теоретического описания и отсутствие маскирующего влияния других взаимодействий (в частности, электрон-ядерных). Для наиболее часто исследуемого случая нитроксильных бирадикалов лучшие результаты дает метод двойного резонанса — PELDOR. При изучении фотоиндуцированных спин-коррелированных радикальных пар удобно использовать обычный метод двухимпульсного ЭСЭ.

Появление в последнее время новых результатов, выполненных в разных лабораториях, указывает на перспективность структурных исследований сложных молекулярных систем методами импульсной спектроскопии ЭПР.

Автор благодарен академику Ю.Д.Цветкову за внимание к работе и полезное обсуждение. Данная работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 02-03-32022), NWO (проект 047.009.008), CRDF (проект NO-008-X1), комплексного интеграционного проекта СО РАН № 36 и гранта по научным школам (НШ 919.2003.3).

Литература

1. J.Drenth. *Principles of Protein X-ray Crystallography*. Springer, New York, 1994
2. W.Kühlbrandt, D.W.Wang, Y.Fujiyoshi. *Nature (London)*, **367**, 614 (1994)
3. S.De Feyter, F.C.De Schryver. *Chem. Soc. Rev.*, **32**, 393 (2003)
4. А.А.Шахатуни, А.Г.Шахатуни. *Успехи химии*, **71**, 1132 (2002)
5. *Smaller Angle X-ray Scattering*. (Eds O.Kratky, O.Glatter). Academic Press, London, 1982
6. J.S.Higgins, H.C.Benoit. *Polymers and Neutron Scattering*. Clarendon Press, Oxford, 1994
7. P.Wu, L.Brand. *Anal. Biochem.*, **218**, 1 (1994)
8. О.Е.Якимченко, Я.С.Лебедев. *Успехи химии*, **47**, 1018 (1978)
9. К.М.Салихов, А.Г.Семенов, Ю.Д.Цветков. *Электронное спиновое эхо и его применение*. Новосибирск, Наука, 1976
10. A.Schweiger, G.Jeschke. *Principles of Pulsed Electron Paramagnetic Resonance*. Oxford University Press, Oxford, 2001
11. В.Ф.Юданов, К.М.Салихов, Г.М.Жидомиров, Ю.Д.Цветков. *Теорет. эксперим. химия*, **5**, 663 (1969)
12. А.Д.Милов, К.М.Салихов, М.Д.Щириков. *Физика тв. тела*, **23**, 975 (1981)
13. A.D.Milov, A.B.Ponomarev, Yu.D.Tsvetkov. *Chem. Phys. Lett.*, **110**, 67 (1984)
14. V.V.Kurshev, A.M.Raitsimring, Yu.D.Tsvetkov. *J. Magn. Reson.*, **81**, 441 (1989)
15. S.Saxena, J.H.Freed. *Chem. Phys. Lett.*, **251**, 102 (1996)
16. P.P.Borbat, J.H.Freed. *Chem. Phys. Lett.*, **313**, 145 (1999)
17. G.Jeschke, M.Pannier, A.Godt, H.W.Spiess. *Chem. Phys. Lett.*, **331**, 243 (2000)
18. S.A.Dzuba, P.Gast, A.J.Hoff. *Chem. Phys. Lett.*, **236**, 595 (1995)

19. П.П.Борбат, В.М.Бердников, А.Д.Милов, Ю.Д.Цветков. *Физика тв. тела*, **19**, 1080 (1977)
20. С.А.Дзюба, А.М.Райтсминг, Ю.Д.Цветков. *Теорет. эксперим. химия*, **14**, 193 (1978)
21. S.A.Dzuba, Y.Kodera, H.Hara, A.Kawamori. *J. Magn. Reson. A*, **102**, 257 (1993)
22. L.V.Kulik, S.A.Dzuba, I.A.Grigoryev, Yu.D.Tsvetkov. *Chem. Phys. Lett.*, **343**, 315 (2001)
23. S.A.Dzuba, A.Kawamori. *Concept. Magn. Reson.*, **8**, 49 (1996)
24. A.D.Milov, A.G.Maryasov, Yu.D.Tsvetkov. *Appl. Magn. Reson.*, **15**, 107 (1998)
25. S.S.Eaton, G.R.Eaton. In *Distance Measurements in Biological Systems by EPR, Biological Magnetic Resonance. Vol. 19*. (Eds G.R.Eaton, S.S.Eaton, L.J.Berliner). Kluwer Academic; Plenum, New York, 2000. P. 348
26. P.Borbat, J.H.Freed. In *Distance Measurements in Biological Systems by EPR, Biological Magnetic Resonance. Vol. 19*. (Eds G.R.Eaton, S.S.Eaton, L.J.Berliner). Kluwer Academic; Plenum, New York, 2000. P. 383
27. A.Raitsimring. In *Distance Measurements in Biological Systems by EPR, Biological Magnetic Resonance. Vol. 19*. (Eds G.R.Eaton, S.S.Eaton, L.J.Berliner). Kluwer Academic; Plenum, New York, 2000. P. 461
28. K.V.Lakshmi, G.W.Brudvig. In *Distance Measurements in Biological Systems by EPR, Biological Magnetic Resonance. Vol. 19*. (Eds G.R.Eaton, S.S.Eaton, L.J.Berliner). Kluwer Academic; Plenum, New York, 2000. P. 513
29. S.A.Dzuba, A.J.Hoff. In *Distance Measurements in Biological Systems by EPR, Biological Magnetic Resonance. Vol. 19*. (Eds G.R.Eaton, S.S.Eaton, L.J.Berliner). Kluwer Academic; Plenum, New York, 2000. P. 569
30. T.Prisner, M.Rohrer, F.MacMillan. *Annu. Rev. Phys. Chem.*, **52**, 279 (2001)
31. W.Lubitz, F.Lendzian, R.Bittl. *Acc. Chem. Res.*, **35**, 313 (2002)
32. G.Jeschke. *Chem. Phys. Chem.*, **3**, 927 (2002)
33. G.Jeschke. *Macromol. Rapid Commun.*, **23**, 227 (2002)
34. Yu.D.Tsvetkov. In *EPR: Instrumental Methods, Biological Magnetic Resonance. Vol. 21*. (Eds C.J.Bender, L.J.Berliner). Kluwer Academic; Plenum, New York, 2004. P. 385
35. Л.В.Кулик, С.А.Дзюба. *Журн. структ. химии*, **45**, 313 (2004)
36. C.R.Timmel, C.E.Fursman, A.J.Hoff, P.J.Hore. *Chem. Phys.*, **226**, 271 (1998)
37. M.Pannier, S.Veit, A.Godt, G.Jeschke, H.W.Spiess. *J. Magn. Reson.*, **142**, 331 (2000)
38. L.V.Kulik, Yu.A.Grishin, S.A.Dzuba, I.A.Grigoryev, S.V.Klyatskaya, S.F.Vasilevsky, Yu.D.Tsvetkov. *J. Magn. Reson.*, **157**, 61 (2002)
39. A.A.Dubinskii, Yu.A.Grishin, A.N.Savitsky, K.Mobius. *Appl. Magn. Reson.*, **22**, 369 (2002)
40. A.Weber, O.Schiemann, B.Bode, T.Prisner. *J. Magn. Reson.*, **157**, 277 (2002)
41. K.M.Salikhov, Yu.E.Kandrashkin, A.K.Salikhov. *Appl. Magn. Reson.*, **3**, 199 (1992)
42. J.Tang, M.C.Thurnauer, J.R.Norris. *Chem. Phys. Lett.*, **219**, 283 (1994)
43. J.Tang, M.C.Thurnauer, A.Kubo, H.Hara, A.Kawamori. *J. Chem. Phys.*, **106**, 7471 (1997)
44. R.Bittl, S.G.Zech. *J. Phys. Chem. B*, **101**, 1429 (1997)
45. S.A.Dzuba. *Chem. Phys. Lett.*, **278**, 333 (1997)
46. I.V.Borovykh, L.V.Kulik, S.A.Dzuba, A.J.Hoff. *Chem. Phys. Lett.*, **338**, 173 (2001)
47. A.V.Kulikov, G.I.Likhtenshtein. *Adv. Mol. Relax. Interact. Process*, **10**, 47 (1977)
48. R.W.Quine, S.S.Eaton, G.R.Eaton. *Rev. Sci. Instrum.*, **63**, 4252 (1992)
49. S.A.Dzuba, A.M.Raitsimring, Yu.D.Tsvetkov. *Chem. Phys.*, **44**, 357 (1979)
50. L.V.Kulik, S.V.Paschenko, S.A.Dzuba. *J. Magn. Reson.*, **159**, 237 (2002)
51. L.V.Kulik, I.A.Grigor'ev, E.S.Salnikov, S.A.Dzuba, Yu.D.Tsvetkov. *J. Phys. Chem. A*, **107**, 3692 (2003)
52. Y.Kodera, S.A.Dzuba, H.Hara, A.Kawamori. *Biochim. Biophys. Acta*, **1186**, 91 (1994)
53. I.V.Borovykh, L.V.Kulik, S.A.Dzuba, A.J.Hoff. *J. Phys. Chem. B*, **106**, 12066 (2002)
54. L.V.Kulik, I.V.Borovykh, P.Gast, S.A.Dzuba. *J. Magn. Reson.*, **162**, 423 (2003)
55. А.Д.Милов, А.Б.Пономарев. *Журн. структ. химии*, **25**, 51 (1984)
56. R.G.Larsen, D.J.Singel. *J. Chem. Phys.*, **98**, 5134 (1993)
57. А.Ю.Пусеп, Н.В.Шохирев. *Оптика и спектроскопия*, **57**, 792 (1984)
58. G.Jeschke, A.Koch, U.Jonas, A.Godt. *J. Magn. Reson.*, **155**, 72 (2002)
59. V.Pfannebecker, H.Klos, M.Hubrich, T.Volmer, A.Heuer, U.Wiesner, H.W.Spiess. *J. Phys. Chem.*, **100**, 13428 (1996)
60. E.Narr, A.Godt, G.Jeschke. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **41**, 3907 (2002)
61. A.D.Milov, Yu.D.Tsvetkov. *Appl. Magn. Reson.*, **12**, 495 (1997)
62. W.L.Hubbell, C.Altanbach, C.M.Hubbell, H.G.Kworana. *Adv. Protein Chem.*, **63**, 288 (2003)
63. H.J.Steinhoff, B.Suess. *Methods*, **29**, 188 (2003)
64. J.C.McNulty, G.L.Millhauser. In *Distance Measurements in Biological Systems by EPR, Biological Magnetic Resonance. Vol. 19*. (Eds G.R.Eaton, S.S.Eaton, L.J.Berliner). Kluwer Academic; Plenum, New York, 2000. P. 277
65. A.D.Milov, A.G.Maryasov, Yu.D.Tsvetkov, J.Raap. *Chem. Phys. Lett.*, **303**, 135 (1999)
66. А.Д.Милов, А.Г.Марьясов, Р.И.Самойлова, Ю.Д.Цветков, Я.Раап, В.Монако, Ф.Формаджио, М.Крисма, К.Тониоло. *Докл. АН*, **370**, 265 (2000)
67. A.D.Milov, Yu.D.Tsvetkov, F.Formaggio, M.Crisma, C.Toniolo, J.Raap. *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 3784 (2001)
68. P.Hanson, G.Martinez, G.L.Millhauser. *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 271 (1996)
69. V.Monaco, F.Formaggio, M.Crisma, C.Toniolo, P.Hanson, G.Millhauser, C.Cegre, J.Deschamps, J.Flippin-Anderson. *Bioorg. Med. Chem.*, **7**, 119 (1999)
70. D.Anderson, P.Hanson, J.McNulty, G.Millhauser, V.Monaco, F.Formaggio, M.Crisma, C.Toniolo. *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 6919 (1999)
71. V.Monaco, F.Formaggio, M.Crisma, C.Toniolo, P.Hanson, G.L.Millhauser. *Biopolymers*, **50**, 239 (1999)
72. P.P.Borbat, H.S.McHaourab, J.H.Freed. *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 5304 (2002)
73. O.Schiemann, A.Weber, T.E.Edwards, T.Prisner, S.T.Sigurdsson. *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 3434 (2003)
74. M.Bennati, A.Weber, J.Aubnic, D.L.Pearlstein, J.Robbles, J.Stabber. *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 14988 (2003)
75. M.H.Rakowsky, K.M.More, A.V.Kulikov, G.R.Eaton, S.S.Eaton. *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 2049 (1995)
76. M.H.Rakowsky, A.Zececiv, G.R.Eaton, S.S.Eaton. *J. Magn. Reson.*, **131**, 97 (1998)
77. V.Budker, J.L.Du, M.Seiter, G.R.Eaton, S.S.Eaton. *Biophys. J.*, **68**, 2531 (1995)
78. M.Seiter, V.Budker, J.L.Du, G.R.Eaton, S.S.Eaton. *Inorg. Chim. Acta*, **273**, 354 (1998)
79. C.Elasser, M.Brecht, R.Bittl. *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 12606 (2002)
80. R.Codd, A.V.Astashkin, A.Pacheco, A.M.Raitsimring, J.H.Enemark. *J. Biol. Inorg. Chem.*, **7**, 338 (2002)
81. A.D.Milov, Yu.D.Tsvetkov, F.Formaggio, M.Crisma, C.Toniolo, J.Raap. *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 3843 (2000)
82. A.D.Milov, Yu.D.Tsvetkov, F.Formaggio, M.Crisma, C.Toniolo, G.L.Millhauser, J.Raap. *J. Phys. Chem. B*, **105**, 11206 (2001)
83. A.D.Milov, Yu.D.Tsvetkov, J.Raap. *Appl. Magn. Reson.*, **19**, 215 (2000)
84. A.D.Milov, Yu.D.Tsvetkov, E.Yu.Gorbunova, L.G.Mustaeva, T.V.Ovchinnikova, J.Raap. *Biopolymers*, **64**, 326 (2002)
85. A.D.Milov, Yu.D.Tsvetkov, F.Formaggio, S.Oancea, C.Toniolo, J.Raap. *J. Phys. Chem. B*, **107**, 13719 (2003)
86. A.D.Milov, Yu.D.Tsvetkov, F.Formaggio, M.Crisma, C.Toniolo, J.Raap. *J. Peptide Sci.*, **9**, 690 (2003)
87. S.Schlick. *Ionomers: Characterization, Theory and Applications*. CRC Press, New York, 1996
88. A.Eisenberg, J.-S.Kim. *Introduction to Ionomers*. Wiley Interscience, New York, 1998
89. M.Pannier, V.Schadler, M.Schops, U.Wiesner, G.Jeschke, H.W.Spiess. *Macromolecules*, **33**, 7812 (2000)

90. M.Pannier, M.Schops, V.Schadler, U.Wiesner, G.Jeschke, H.W.Spiess. *Macromolecules*, **34**, 5555 (2001)
91. V.Schadler, A.Frank, U.Wiesner, H.W.Spiess. *Macromolecules*, **30**, 3832 (1997)
92. A.J.Hoff, J.Deisenhofer. *Phys. Rep.*, **287**, 1 (1997)
93. A.van der Est. *Biochem. Biophys. Acta*, **1507**, 212 (2001)
94. R.Bittl, S.G.Zech. *Biochem. Biophys. Acta*, **1507**, 194 (2001)
95. W.Lubitz, F.Lendrian, R.Bittl. *Acc. Chem. Res.*, **35**, 3313 (2002)
96. J.Deisenhofer, O.Epp, K.Miki, R.Huber, H.Michel. *J. Mol. Biol.*, **180**, 385 (1984)
97. J.P.Allen, G.Feher, T.O.Yeates, H.Komiyama, D.C.Rees. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 5730 (1987)
98. H.Komiyama, T.O.Yeates, D.C.Rees, J.P.Allen, J.Feher. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 9012 (1988)
99. C.-H.Chang, O.El-Kabbani, D.Tiede, J.Norris, M.Schiffer. *Biochemistry*, **30**, 5352 (1991)
100. N.Krauss, W.-D.Schubert, O.Klukas, P.Fromme, H.T.Witt, W.Saenger. *Nat. Struct. Biol.*, **3**, 965 (1996)
101. A.Zouni, H.T.Witt, J.Kern, P.Fromme, N.Krauss, W.Saenger, P.Orth. *Nature (London)*, **409**, 739 (2001)
102. N.Kamiya, J.R.Shen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 98 (2003)
103. J.Xiong, S.Subramaniam. *Govindjee, Photosynth. Res.*, **3**, 229 (1998)
104. B.Kok, B.Forbush, M.McGloin. *Photochem. Photobiol.*, **11**, 457 (1970)
105. J.Limburg, V.A.Szalai, G.W.Brudvig. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **9**, 1353 (1999)
106. H.Hara, A.Kawamori. *Appl. Magn. Reson.*, **13**, 241 (1997)
107. Y.Kodera, H.Hara, A.V.Astashkin, A.Kawamori, T.A.Ono. *Biochim. Biophys. Acta*, **1232**, 43 (1995)
108. D.Koulougliotis, R.H.Schweitzer, G.V.Brudvig. *Biochemistry*, **36**, 9735 (1997)
109. K.V.Lakshmi, S.S.Eaton, G.R.Eaton, H.A.Frank, G.W.Brudvig. *J. Phys. Chem. B*, **102**, 8327 (1998)
110. J.M.Peloquin, K.A.Campbell, R.D.Britt. *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 6840 (1998)
111. P.Dorlet, M.Di Valentin, G.T.Babcock, J.L.McCracken. *J. Phys. Chem. B*, **102**, 8239 (1998)
112. K.V.Lakshmi, S.S.Eaton, G.R.Eaton, G.W.Brudvig. *Biochemistry*, **38**, 12758 (1999)
113. H.Hara, A.Kawamori, A.V.Astashkin, T.Ono. *Biochim. Biophys. Acta*, **1276**, 140 (1996)
114. A.V.Astashkin, Y.Kodera, A.Kawamori. *Biochim. Biophys. Acta*, **1187**, 89 (1994)
115. A.V.Astashkin, H.Hara, A.Kawamori. *J. Chem. Phys.*, **108**, 3805 (1998)
116. M.Tonaka, A.Kawamori, H.Hara, A.V.Astashkin. *Appl. Magn. Reson.*, **19**, 141 (2000)
117. K.Shigemori, H.Hara, A.Kawamori, K.Akabori. *Biochim. Biophys. Acta*, **1363**, 187 (1998)
118. D.Koulougliotis, X.-S.Tang, B.A.Diner, G.W.Brudwig. *Biochemistry*, **34**, 2850 (1995)
119. M.C.Thurnauer, J.R.Norris. *Chem. Phys. Lett.*, **76**, 557 (1980)
120. M.C.Thurnauer, C.Clark. *Photochem. Photobiol.*, **40**, 381 (1984)
121. S.G.Zech, W.Lubitz, R.Bittl. *Ber. Bunsen-Ges. Phys. Chem.*, **100**, 2041 (1996)
122. S.A.Dzuba, P.Gast, A.J.Hoff. *Chem. Phys. Lett.*, **268**, 273 (1997)
123. A.T.Gardiner, S.G.Zech, F.MacMillan, H.Kass, R.Bittl, E.Schlodder, F.Lendzian, W.Lubitz. *Biochemistry*, **38**, 11773 (1999)
124. R.Lancaster, H.Michel. *Structure*, **5**, 1339 (1997)
125. S.A.Dzuba, H.Hara, A.Kawamori, M.Iwaki, S.Itoh, Yu.D.Tsvetkov. *Chem. Phys. Lett.*, **264**, 238 (1997)
126. H.Hara, J.Tang, A.Kawamori, S.Itoh, M.Iwaki. *Appl. Magn. Reson.*, **14**, 367 (1998)
127. R.Bittl, S.G.Zech, P.Fromme, H.T.Witt, W.Lubitz. *Biochemistry*, **36**, 12001 (1997)
128. S.G.Zech, A.J.van der Est, R.Bittl. *Biochemistry*, **36**, 9774 (1997)
129. M.Iwaki, S.Itoh, H.Hara, A.Kawamori. *J. Phys. Chem. B*, **102**, 10440 (1998)
130. T.Yoshii, H.Hara, A.Kawamori, K.Akabori, M.Iwaki, S.Itoh. *Appl. Magn. Reson.*, **16**, 565 (1999)
131. W.-D.Schubert, O.Klukas, N.Krauss, W.Saenger, P.Fromme, H.T.Witt. *J. Mol. Biol.*, **272**, 741 (1997)
132. H.Hara, S.A.Dzuba, A.Kawamori, K.Akabori, T.Tomo, K.Satoh, M.Iwaki, S.Itoh. *Biochim. Biophys. Acta*, **1322**, 77 (1997)
133. S.G.Zech, J.Kurreck, H.J.Eckert, G.Renger, W.Lubitz, R.Bittl. *FEBS Lett.*, **414**, 454 (1997)
134. S.G.Zech, J.Kurreck, G.Renger, W.Lubitz, R.Bittl. *FEBS Lett.*, **442**, 79 (1999)
135. D.Kleinfeld, M.Y.Okamura, G.Feher. *Biochemistry*, **23**, 5780 (1984)
136. M.H.B.Stowell, T.M.McPhillips, D.C.Rees, S.M.Soltis, E.Abresch, G.Feher. *Science*, **276**, 812 (1997)
137. S.G.Zech, R.Bittl, A.T.Gardiner, W.Lubitz. *Appl. Magn. Reson.*, **13**, 517 (1997)
138. I.V.Borovykh, S.A.Dzuba, I.I.Proskuryakov, P.Gast, A.J.Hoff. *Biochim. Biophys. Acta*, **1363**, 182 (1998)
139. D.T.Leeson, D.A.Wiersma, K.Frisch, J.Friedrich. *J. Phys. Chem. B*, **101**, 6331 (1997)
140. F.T.H.den Hartog, C.van Papendrecht, U.Storkel, S.Volker. *J. Phys. Chem. B*, **103**, 1375 (1999)
141. J.Schlichter, J.Friedrich, L.Herenyi, J.Fidy. *Biophys. J.*, **80**, 2011 (2001)
142. K.D.Rector, J.R.Engholm, C.W.Rella, J.R.Hill, D.D.Dlott, M.D.Fayer. *J. Phys. Chem. A*, **103**, 2381 (1999)
143. M.D.Fayer. *Annu. Rev. Phys. Chem.*, **52**, 315 (2001)
144. C.Tietz, F.Jelezko, U.Gerken, S.Schuler, A.Schubert, H.Rogl, J.Wrachtrup. *Biophys. J.*, **81**, 556 (2001)
145. F.Parak, K.Achterhold. *Hyperfine Interact.*, **123**, 825 (1999)
146. I.V.Borovykh, L.V.Kulik, P.Gast, S.A.Dzuba. *Chem. Phys.*, **294**, 433 (2003)
147. H.Sillescu. *J. Non-Cryst. Solids*, **243**, 81 (1999)
148. M.D.Ediger. *Annu. Rev. Phys. Chem.*, **51**, 99 (2000)

PULSED EPR STRUCTURAL STUDIES IN THE NANOMETER RANGE OF DISTANCES

S.A.Dzuba

*Institute of Chemical Kinetics and Combustion, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences
3, Ul. Institutskaya, 630090 Novosibirsk, Russian Federation, Fax +7(3833)30–7350*

The possibilities of investigations of substance nanostructure by pulsed EPR spectroscopy based on the measurement of the dipole–dipole coupling between the spins of unpaired electrons are considered. It is shown that using these methods, one can determine the conformations of long-chain organic biradicals and biomolecules either doubly spin-labelled or containing paramagnetic metal ions and study the supramolecular structure of the matter, *i.e.*, peptide clusterisation, heterogeneity of the polymer packing, structural details of photosynthesising reaction sites and other complex systems. Study of the photoinduced spin-correlated radical pairs also reveals the regularities of charge transfer in these systems. The methods are characterised by high accuracy of measurements (0.03 nm) and are applicable to 1.5–10 nm distances.

Bibliography — 148 references.

Received 19th February 2004