

ОБЗОРЫ

УДК 541.1:541.6.67

НИТРОКСИЛЬНЫЕ РАДИКАЛЫ В СПЕКТРОСКОПИИ ИМПУЛЬСНОГО ДВОЙНОГО ЭЛЕКТРОН-ЭЛЕКТРОННОГО РЕЗОНАНСА (PELDOR)**Ю.Д. Цветков***Институт химической кинетики и горения им. В.В. Воеводского СО РАН, Новосибирск
E-mail: tsvetkov@kinetics.nsc.ru**Статья поступила 20 февраля 2013 г.*

В обзоре рассмотрены основные положения теории PELDOR. Показано как из анализа кинетики спада сигнала PELDOR возможно найти такие параметры спиновой системы, как пространственное распределение, число спинов в агрегатах и комплексах, обменный интеграл, разделить для дальнейшего анализа межмолекулярный и внутримолекулярные вклады в дипольное взаимодействие. Приведены примеры приложений метода для исследования пространственного распределения нитроксильных радикалов, влияния заряда дипольно взаимодействующих нитроксидов на их пространственное распределение, представлены результаты определения расстояний и спектра расстояний для нитроксильных би-, три- и тетрадикалов. Дан анализ работ по нитроксильным радикалам, в которых методом PELDOR исследуется эффект ориентационной селективности, спиновый обмен и конформационные свойства радикалов. Рассмотрены работы по исследованиям структуры пар парамагнитный ион — нитроксильный радикал и данные о PELDOR нитроксидов на высоких частотах (в высоких полях). В последней части обзора рассмотрены работы по исследованиям таких свойств, как молекулярная гибкость олигомеров и супрамолекул с нитроксильными радикалами.

Ключевые слова: ЭПР (электронный парамагнитный резонанс), PELDOR, нитроксиды, дипольные магнитные взаимодействия, расстояния, спектр расстояний.

ВВЕДЕНИЕ. ОСНОВЫ ТЕОРИИ

Стабильные нитроксильные (имидоксильные) радикалы, обладающие парамагнитным фрагментом $>N-O\bullet$, как только были разработаны надежные методы их синтеза, стали модельными объектами в исследованиях химии и физики свободных радикалов методом ЭПР. Результаты этих работ, в которых используется наиболее популярная и простая методика с непрерывным источником микроволнового воздействия на образец, так называемый стационарный ЭПР, детально изложены в монографиях [1–6], многочисленных обзорах и сборниках (см., например, [7]). Развитие импульсной ЭПР спектроскопии и ее физико-химических приложений, в том числе такого метода, как электронное спиновое эхо (ЭСЭ), также во многом опирается на применение нитроксильных радикалов [8, 9].

Однако, по-видимому, наибольший прогресс был достигнут с помощью другого импульсного метода ЭПР — метода двойного электрон-электронного резонанса, предложенного впервые в 1981 г. в Институте химической кинетики и горения СО АН СССР [10]. Метод двойного электрон-электронного резонанса, PELDOR или DEER (сокращение от Pulsed Electron Double Resonance или от Double Electron Electron Resonance, в дальнейшем используется первое сокращение), в настоящее время является наиболее популярным ЭПР методом, широко используемым для структурных исследований систем, содержащих парамагнитные центры. Диполь-

ное и обменные магнитные взаимодействия между этими центрами, сведения о которых дает PELDOR, содержат информацию о расстояниях между центрами и их взаимной ориентации, об образовании агрегатов и комплексов парамагнитных частиц, о пространственном распределении и динамике парамагнитных частиц в исследуемой системе. Важнейшей уникальной особенностью метода является возможность его приложений для хаотически ориентированных образцов. Это позволяет исследовать широкий класс различных биологически важных спин-меченых молекул, получить которые в виде кристаллов для рентгеновской дифракции весьма затруднительно. Диапазон доступных расстояний для измерений методом PELDOR лежит в области 1,5—8,0 нм. Техника PELDOR спектроскопии за последние годы получила серьезное развитие как в разных лабораториях, так и в фирменном производстве (см. обзор [11]).

Среди различных молекул, комплексов, полимеров и других систем, содержащих парамагнитные центры и исследованных в последнее десятилетие методом PELDOR, особое место занимают нитроксильные радикалы. Нитроксильные бирадикалы явились первым примером обнаружения модуляции спада сигнала PELDOR за счет дипольных взаимодействий [12]. В дальнейшем они служили модельными молекулами для отработки методов определения расстояний и спектров расстояний между радикальными центрами, расчета параметров обменного взаимодействия, определения взаимной ориентации радикальных фрагментов и других структурных параметров.

В настоящем обзоре мы попытались подвести некоторые итоги серии исследований методом PELDOR строения и свойств нитроксильных радикалов — моно-, би-, полирадикалов и некоторых супрамолекул с нитроксильными радикалами. Это, на наш взгляд, позволит открыть возможности для синтеза и исследований новых типов нитроксильных радикалов, комплексов и супрамолекулярных систем на их основе, что, в свою очередь, приведет к созданию новых материалов с практически важными магнитными свойствами и новых практических применений нитроксильных радикалов. Мы не рассматриваем в настоящем обзоре спин-меченые молекулы, несмотря на то, что парамагнитные нитроксильные фрагменты практически всегда служат спиновыми метками. Эта широкая область приложений PELDOR нашла свое отражение в ряде уже опубликованных обзорных работ (см., например, [13]).

Отметим, что попытка систематизировать данные PELDOR, относящиеся к нитроксильным радикалам и полирадикалам, сделана нами в общем обзоре 2008 г., касающемся метода PELDOR и его применений [14]. За счет все возрастающей популярности PELDOR за последние годы получен ряд новых результатов с использованием нитроксильных радикалов, что и побудило нас сделать более детальный обзор этой области структурных исследований. Обзор основан на литературе, опубликованной в научных статьях в 1984—2012 гг.

Векторная модель движения намагниченности поясняет процесс образования и некоторые особенности сигнала PELDOR. Рассмотрим два дипольно взаимодействующих спина А и В. Их магнитное взаимодействие описывается дипольным взаимодействием D и обменным интегралом J [15, 16]:

$$D = v_D(1 - \cos^2 \theta) + J, \quad v_D = \gamma^2 \hbar / r^3. \quad (1)$$

Здесь v_D — дипольная константа; r — расстояние между спинами; θ — угол между направлением внешнего магнитного поля и вектором, соединяющим спины; γ — гиромагнитное отношение для электронного спина; \hbar — константа Планка. Для определения дипольной константы, а значит и расстояния между спинами, используется трехимпульсная последовательность (3рPELDOR). На рис. 1 показана эта импульсная последовательность. Отметим, что угол поворота вектора намагниченности M импульсом с амплитудой H_1 и длительностью Δt будет равен $\varphi = \gamma H_1 \Delta t$. Последовательность 3рPELDOR состоит из двух типов импульсов, $\pi/2$ и π на частоте ν_A , действующих на спины А в спектре ЭПР (рис. 1, *b*), для регистрации сигнала спинового эха от них. Интервал τ между этими импульсами зафиксирован. В этом интервале расположен действующий на спины В импульс накачки на частоте ν_B с задержкой T , отсчитываемой от первого $\pi/2$ импульса регистрации. Спад сигнала 3рPELDOR метода $V(T)$ регистрируется как изменение амплитуды спинового эха на ν_A при изменении задержки T в интервале $0-\tau$.

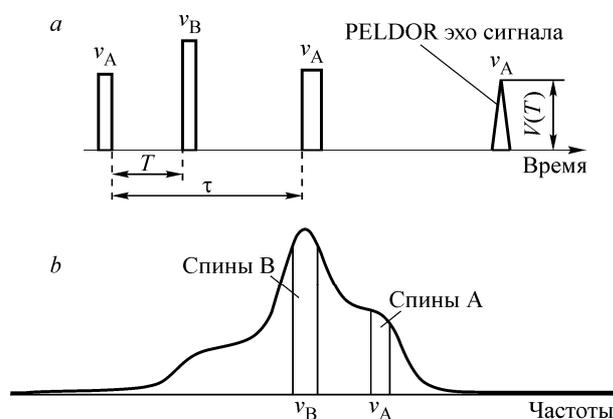


Рис. 1. Последовательность трехимпульсного метода 3pPELDOR. Сигнал спинового эха $V(\tau)$ возникает после действия импульсов $\pi/2$ и π на частоте ν_A . Между этими импульсами приложен π импульс накачки на частоте ν_B . Этот импульс в интервале $0-\tau(T)$ меняет амплитуду сигнала эха. Изменение фиксируется в виде кинетики спада сигнала PELDOR, $V(T)$ (a). Положение импульсов детектирования (наблюдения) на частоте ν_A и импульса накачки на частоте ν_B в спектре ЭПР (b)

Используется также четырехимпульсная последовательность 4pPELDOR. В ней сигнал эха образуется под действием трех импульсов, $\pi/2$, π , π , на частоте ν_A , а его изменение (эффект PELDOR) возникает за счет π импульса, приложенного на частоте ν_B в интервале τ между вторым и третьим импульсами, и регистрируется как $V(\tau)$.

Модуляция спада сигналов PELDOR за счет дипольного взаимодействия спинов легко обнаруживается при анализе движения вектора намагниченности спинов A во вращающейся с частотой ν_A системе координат. В момент времени $t = 0$ вектор намагниченности спинов A ориентирован вдоль оси Z системы координат (рис. 2, a). Приемник регистрирует сигнал эха с поляризацией вдоль оси y. После действия $\pi/2$ импульса на ν_A вектор намагниченности спинов A будет ориентирован вдоль оси y вращающейся системы координат (см. рис. 2, a). Распад этого вектора на изохроматы во временном интервале $t > 0$ в плоскости xy будет происходить с угловой частотой $\Delta\nu_A + \nu_{AB}M_S^B$, где $\Delta\nu_A$ — отклонение изохроматов от резонансного значения, обусловленное неоднородным уширением линии ЭПР; $\nu_{AB} = D$ — дипольное уширение спинов A за счет спинов B; $M_S^B = \pm 1/2$ — квантовый номер, определяющий ориентацию спинов B в магнитном поле. В соответствии с проекцией B спинов M_S^B изохроматы A распадаются на два вектора. Один из них вращается по часовой стрелке, другой — против часовой стрелки (обозначены сплошной и штриховой линиями на рис. 2). В момент времени $t = T$ фазовый угол между этими изохроматами будет $\alpha = DT$ (см. рис. 2, b). Если приложить теперь в момент времени $t = T$ импульс π на частоте ν_B , то знак M_S^B изменится (импульс повернет спины B, см. рис. 2, b).

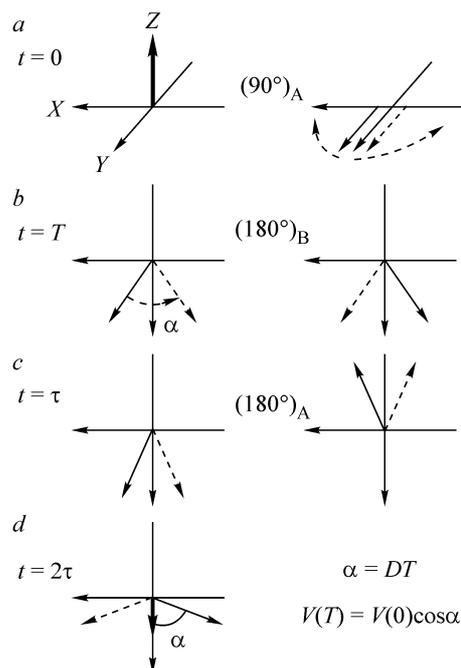


Рис. 2. Векторная модель, иллюстрирующая движение вектора намагниченности при действии импульса A во вращающейся системе координат, его распад под действием импульса накачки B (b) и образование сигнала PELDOR, осциллирующего с частотой DT , $V(T) = V(0)\cos DT$ (d)

За счет этого угловая частота спинов А изменится и станет $\Delta\nu_A - DM_S^B$. Импульс π на частоте ν_A в момент времени $t = \tau$ (см. рис. 2, *c*) изменяет знак всех фаз, зависящих от проекции спинов А. Изохроматы намагниченности соответственно вращаются теперь с угловой частотой $-\Delta\nu_A + DM_S^B$. Полная фаза, накопленная изохроматами за время $t > \tau$, будет

$$\varphi(t) = (\Delta\nu_A + DM_S^B)T + (\Delta\nu_A - DM_S^B)(\tau - T) + (-\Delta\nu_A + DM_S^B)t,$$

и в момент времени τ , после последнего импульса π на частоте ν_A , аккумулированная фаза составит $\varphi(t) = 2DM_S^B T = \pm DT$ (см. рис. 2, *d*). Регистрируемая амплитуда эхо-сигнала, ориентированного вдоль y нормализованного к единице при $T = 0$, может быть записана как $V(T) = \cos(DT)$. Косинус Фурье-преобразования этого модулированного сигнала даст простой спектр дипольного взаимодействия в виде одной линии на частоте, соответствующей дипольной константе D , что, в свою очередь, определяет расстояние между спинами r .

Приведем некоторые результаты теории PELDOR, иллюстрирующие возможности метода.

Если расстояние в группе из N спинов фиксировано, $r = \text{const}$, то функцию, описывающую кинетику спада сигнала PELDOR, можно представить в виде [14—16] (рис. 3, *a*):

$$V(T) = V(0) \{1 - (N-1)p_b [1 - \langle \cos DT \rangle_\theta]\}. \quad (2)$$

Здесь $\langle \dots \rangle_\theta$ — означает усреднение по углу θ ; p_b — степень возбуждения спектра ЭПР импульсом накачки. Соотношение (2) можно использовать при достаточно малых величинах p_b . Экспериментальные методы определения или расчета p_b изложены в [14, 15].

Соотношения (1) и (2) показывают, что в спаде сигнала PELDOR за счет дипольного и обменного взаимодействий в хаотически ориентированных парах возникают осцилляции на частоте $\nu_D + J$, и анализ Фурье (2) позволяет получить так называемый пейковский дублет с особыми точками на частотах ν_{\parallel} и ν_{\perp} (см. рис. 3, *b*):

$$\nu_{\parallel} = |2\nu_D - J| \text{ и } \nu_{\perp} = |\nu_D + J|. \quad (3)$$

Таким образом из спада $V(T)$ могут быть получены сведения о расстоянии r и об обменном интеграле J в хаотически ориентированных радикальных парах с $r = \text{const}$.

При достаточно больших временах ($T \rightarrow \infty$) периодические колебания затухают и функция $V(r, T)$ стремится к предельному значению V_p (см. рис. 3, *a*),

$$V_p = (1 - p_b)^{N-1} \cong 1 - (N-1)p_b. \quad (4)$$

Это соотношение позволяет определить число спинов N в группе при известном p_b .

Плотность распределения спиновых меток по расстояниям (спектр расстояний) будем обозначать как $F(r) = dn(r)/dr$, где $dn(r)$ есть доля пар спиновых меток с расстоянием между метками в паре в диапазоне от r до $r+dr$. Соотношение для нормированного сигнала PELDOR, после усреднения по θ , дано в (2), и его усредняемая по r часть, в соответствии с (1), будет

$$f(r, T) = \langle \langle \cos[D(1 - 3\cos^2(\theta)T)] \rangle_\theta \rangle_r. \quad (5)$$

В случае непрерывного распределения по расстояниям между метками в группах кинетику спада сигнала PELDOR можно представить в виде:

$$V(T) = 1 - (N-1)p_b \left(\int_{r_1}^{r_2} F(r)(1 - f(r, T))dr \right). \quad (6)$$

Расчет $F(r)$ сводится, по существу, к решению обратной задачи методами регуляризации Тихонова [17], когда известен экспериментальный спад сигнала PELDOR $V(T)$ в соотношении (6). При этом необходимо иметь в виду, что сохраняются свойства неустойчивости решения обратной задачи. Способы расчета плотности распределения по расстояниям в радикальных парах из данных PELDOR разработаны в работах [18—22].

В реальных системах, содержащих группы спинов, имеются два типа дипольных взаимодействий: между парамагнитными центрами внутри такого элемента и между центрами различных групп. Если эти взаимодействия считать независимыми и кинетику спада сигнала PELDOR

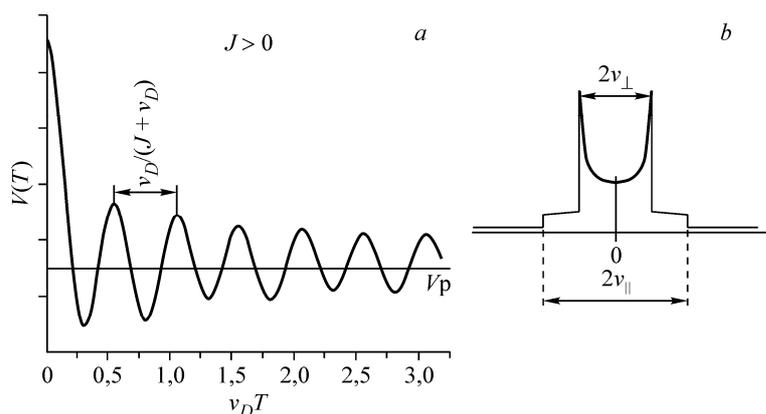


Рис. 3. Функция, описывающая спад сигнала PELDOR для группы спинов ($N=2$) (а). Спектр Фурье спада сигнала PELDOR для хаотически ориентированных радикальных пар с $r = \text{const}$ (б)

за счет этих вкладов обозначить $V(T)_{\text{INTRA}}$ и $V(T)_{\text{INTER}}$, то полная функция, описывающая спад сигнала $V(T)$, может быть представлена как [14, 15]

$$V(T) = V(T)_{\text{INTRA}} \cdot V(T)_{\text{INTER}}. \quad (7)$$

Для парамагнитных центров, хаотически распределенных в пространстве с фрактальной размерностью d , усреднение (4) по θ и r дает экспоненциальный спад $V(T)_{\text{INTER}}$ в виде [14, 15]

$$V(T) = V(0) \cdot \exp[-\alpha T^{d/3}]. \quad (8)$$

Величины α и d в общем случае зависят от размерности пространства. Например, $d=3$ для трехмерного пространства; $d=2$ — для плоскости; $d=1$ — для линии [15]. Для трехмерного пространства $\alpha = 2p_b \cdot \Delta\omega_{1/2}$, где $\Delta\omega_{1/2} = 8,2 \cdot 10^{-13} \cdot C \text{ см}^3 \cdot \text{с}^{-1}$ — дипольная ширина линии и C — концентрация парамагнитных центров. Возможен расчет α и d для более сложных случаев пространственного распределения парамагнитных центров [23]. Сопоставление экспериментально найденных величин α и d с расчетом открывает возможность исследовать особенности пространственного распределения методом PELDOR. Разработаны методы разделения внутримолекулярного $V(T)_{\text{INTRA}}$ и межмолекулярного $V(T)_{\text{INTER}}$ вкладов в общий спад сигнала PELDOR, регистрируемый экспериментально [24].

Используя изложенные выше результаты теории, можно сформулировать следующую последовательность анализа экспериментальных данных PELDOR.

1. Из экспериментально зарегистрированной кинетики спада сигнала $V(T)$ выделяются множители $V(T)_{\text{INTER}}$ и $V(T)_{\text{INTRA}}$.
2. Закономерности $V(T)_{\text{INTER}}$ позволяют сделать заключение об особенностях пространственного распределения парамагнитных частиц.
3. Кинетика $V(T)_{\text{INTRA}}$ дает возможность идентифицировать группы спинов, определить в них число частиц или особенности статистики частиц в группах, сделать оценки расстояний из анализа Фурье $V(T)_{\text{INTRA}}$, провести расчет плотности распределения по расстояниям $F(r)$, определить взаимную ориентацию радикальных центров из анализа эффектов ориентационной селективности (см. ниже).

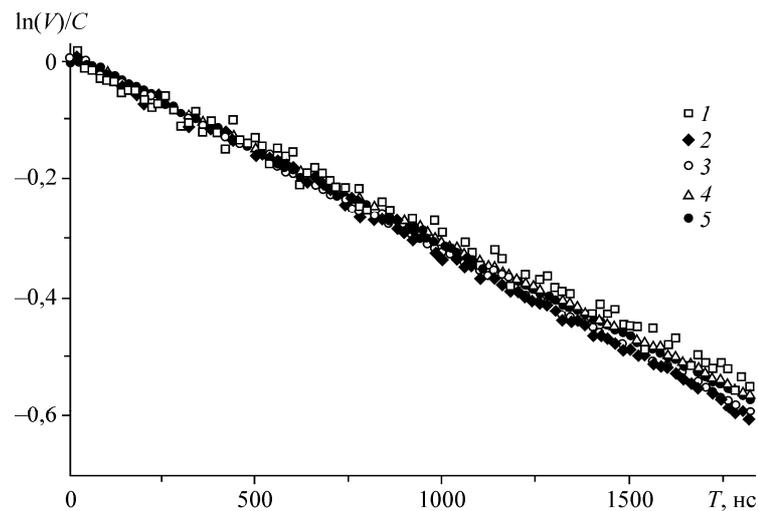
Эти данные, как правило, создают основу для заключений о строении радикальных пар или агрегатов. Достоверность полученных результатов может быть проверена расчетными методами квантовой химии, например методами молекулярной динамики (МД).

1. НИТРОКСИЛЫ В ИССЛЕДОВАНИЯХ ПРОСТРАНСТВЕННОГО РАСПРЕДЕЛЕНИЯ

Нитроксильные радикалы (монорадикалы) широко используются для экспериментального исследования методами ЭПР процессов магнитной релаксации, таких как спектральная и мгновенная диффузия, кросс-релаксация, спин-решеточная релаксация. Стабильность и определенность химической структуры делают нитроксилы удобными модельными объектами для многих физико-химических исследований. К ним относятся, например, исследования методами PELDOR дипольных, спин-спиновых взаимодействий для систем с разным пространственным распределением парамагнитных центров.

Равномерное распределение в объеме. В литературе существует достаточно примеров исследования фазовой релаксации импульсными методами ЭПР в системах со случайным, равномерным распределением парамагнитных центров в объеме. Избежать неоднородности в рас-

Рис. 4. Экспериментальная зависимость спада сигнала PELDOR от концентрации радикалов TEMPON в замороженных водно-глицериновых растворах (30 % H₂O) при концентрациях радикалов (см⁻³): 1,7·10¹⁷ (1), 4·10¹⁷ (2), 6·10¹⁷ (3), 9·10¹⁷ (4), 1,4·10¹⁸ (5) [25]

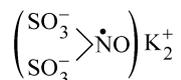


пределении, как правило, удается, когда исследуются центры в стеклообразных матрицах, замороженных стеклообразных растворах. Кинетика спада сигнала PELDOR для равномерного случайного распределения центров в объеме в твердых телах описывается экспоненциальным законом (8) с $d = 3$.

В качестве примера исследования фазовой релаксации в системе с равномерным распределением центров приведем данные для радикала 2,2,6,6-тетраметил-4-оксопиперидин-1-оксила TEMPON [25]. Спады сигнала PELDOR для этого радикала изучены в широком диапазоне концентраций в замороженных до 77 К водно-глицериновых растворах (рис. 4). Видно, что в этом случае достаточно точно выполняется экспоненциальный закон спада в широком интервале времен T . Аналогичные результаты были получены и для ряда других стеклюющихся при замораживании жидкостей, таких как метанол, этанол, толуол, декалин и др.

Влияние заряда на пространственное распределение. Отклонение от случайного распределения спинов находит свое отражение в закономерностях кинетики спада сигнала PELDOR. Например, когда локальная концентрация спинов выше средней (пары спинов, группы или кластеры, радикальные треки), тогда на малых временах T в PELDOR спад идет с большой скоростью за счет близко расположенных спинов и их сильного дипольного взаимодействия. С другой стороны противоположный случай также возможен, когда расстояние наименьшего сближения спинов по тем или иным причинам ограничено. В этом случае доля близко расположенных спинов, связанных с сильным дипольным взаимодействием, будет малой. В результате скорость релаксации на коротких временах будет меньшей, чем в случае случайного распределения спинов.

Ограничения для расстояния наименьшего сближения частиц могут возникать для заряженных частиц, таких как ион-радикалы. В этой связи с целью обнаружения эффекта электростатического взаимодействия на фазовую релаксацию при дипольных взаимодействиях в [25] методом 3pPELDOR исследованы замороженные стеклообразные растворы простейших нитро-кислых ион-радикалов, так называемые соли Фреми:



Исследование обменных взаимодействий методом ЭПР в жидких растворах соли Фреми показало, что заряды существенно увеличивают расстояние наименьшего сближения для ион-радикалов [26, 27].

Предполагается, что при замораживании до 77 К водно-глицериновых растворов соли Фреми пространственное распределение парамагнитных частиц не изменяется. Как видно из рис. 5, в этом случае закон спада сигнала PELDOR отличается от простой экспоненты. Нелинейность в координатах $\ln(I)/C - T$ особенно заметна при низких концентрациях соли в растворах (исследованы растворы соли Фреми в глицерине, содержащие 30 мол. % воды). Скорость релаксации при коротких временах T ($T \approx 100$ нс) значительно меньше, чем в случае равномерно распределенных частиц, и увеличивается с ростом T . При увеличении концентрации соли Фреми функция $\ln(I)/C$ становится линейной по T .

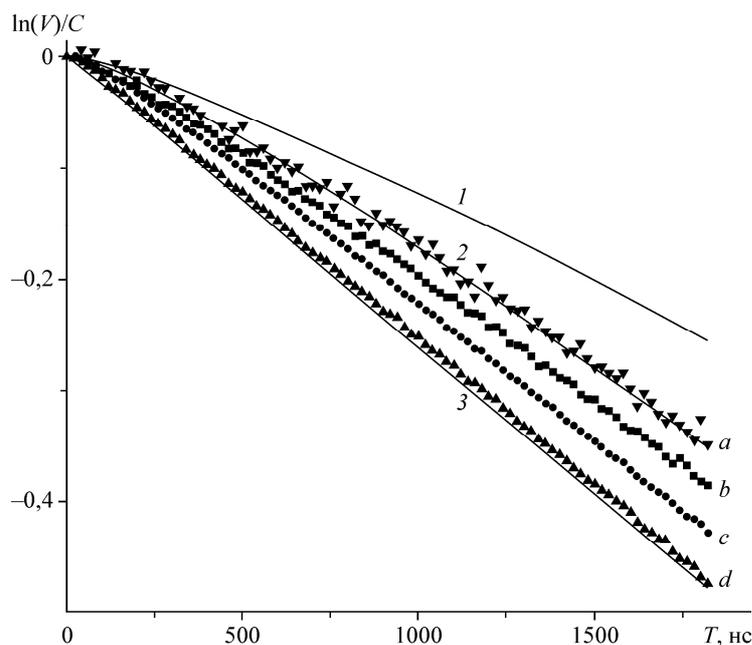


Рис. 5. Эксперимент и расчет спадов сигнала PELDOR, нормированных на концентрацию, для соли Фреми в водно-глицериновом растворе при 77 К. Точки — эксперимент при следующих концентрациях (см^{-3}): $2,6 \cdot 10^{17}$ (a), $8 \cdot 10^{17}$ (b), $2,2 \cdot 10^{18}$ (c), $8 \cdot 10^{17} + 0,3 \text{ М/л } \text{K}_2\text{CO}_3$ (d). Сплошные линии 1, 2, 3 — расчет для концентраций радикалов $2,6 \cdot 10^{17} \text{ см}^{-3}$ и следующих значений ионной силы в М/л: 0 (1), $1,3 \cdot 10^{-3}$ (2), 1,0 (3) [25]

K_2CO_3 к раствору соли Фреми (см. рис. 5) увеличивает ионную силу, что экранирует электростатическое взаимодействие парамагнитных ионов. Это, в свою очередь, ведет к их равномерному пространственному распределению, так же как и в случае увеличения концентрации ионов в растворе (см. рис. 5).

В работе [25] влияние взаимного отталкивания нитроксильных ион-радикалов на фазовую релаксацию количественно описано с помощью классической теории Дебая—Гюккеля для разбавленных ионных растворов [28]. Это позволило провести расчет функции $V(T)$ в зависимости от концентрации ион-радикалов и при постоянной диэлектрической константе среды. Результаты такого расчета [25], проведенного с помощью метода Монте-Карло, также приведены на рис. 5 (кривые 1, 2, 3). Видно, что расчет и эксперимент находятся в хорошем согласии. Возможны оценки расстояния наименьшего сближения ион-радикалов r_0 . Так, для наименьшей концентрации ион-радикалов в условиях эксперимента $2,6 \cdot 10^{17} \text{ см}^{-3}$ $r_0 = 30$. Эта величина существенно больше геометрических размеров нитроксильных ион-радикалов.

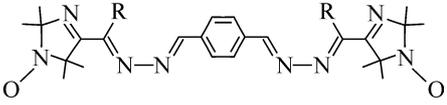
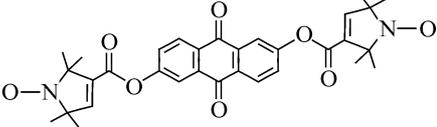
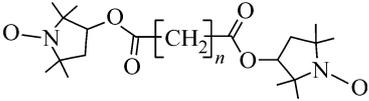
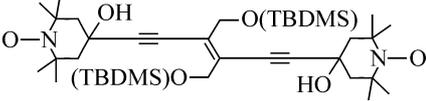
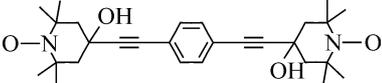
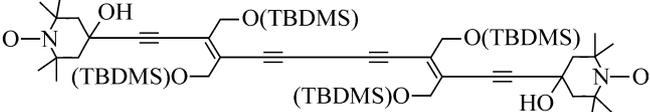
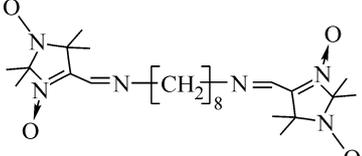
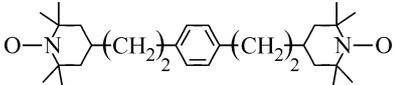
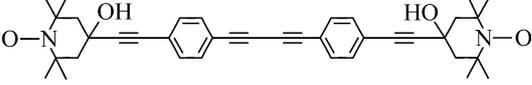
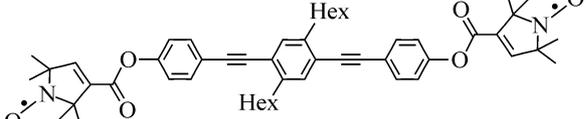
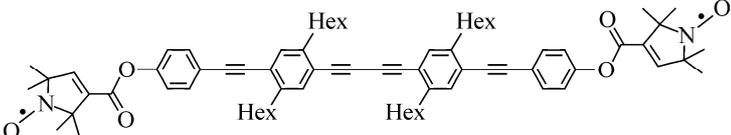
Анализ кинетики спада сигнала PELDOR для пространственно более сложных систем, используя соотношение (8), позволяет выделить его часть V_{INTER} , соответствующую распределению частиц в объеме или в другой пространственной конфигурации. Это имеет важное значение для химии твердого тела и в катализе. К сожалению, таких работ с использованием метода PELDOR пока немного.

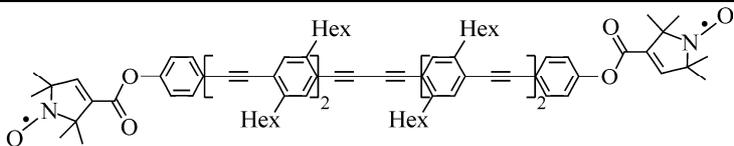
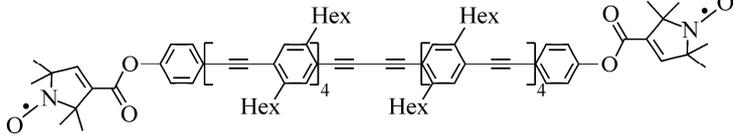
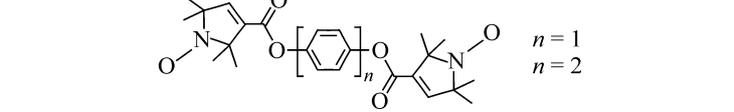
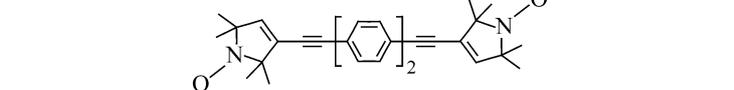
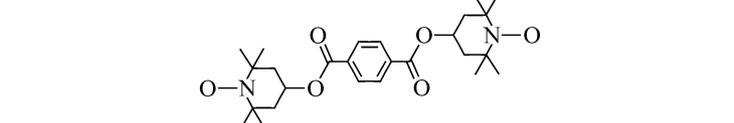
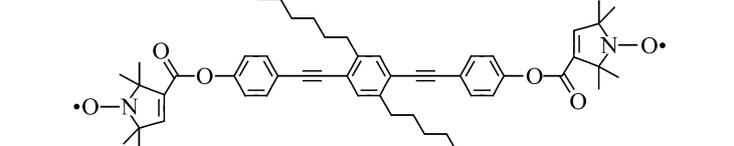
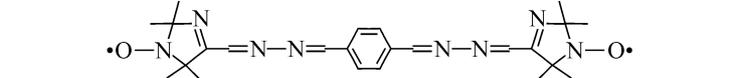
2. НИТРОКСИЛЬНЫЕ БИРАДИКАЛЫ

Нитроксильные бирадикалы оказались модельными системами, на которых проводили экспериментальную проверку большинства теоретических представлений метода PELDOR. Исследованы, как правило, линейные молекулярные структуры с двумя пиперидиновыми, пирролидиновыми, пирролиновыми или 3-имидазолиновыми концевыми радикальными фрагментами. Строение и свойства бирадикалов такого типа по данным стационарного метода ЭПР детально обсуждаются в монографиях [2, 4, 5]. Ниже будут представлены данные, относящиеся к исследованиям этих соединений методом PELDOR. Структура изученных нитроксильных бирадикалов и результаты измерений расстояний между фрагментами $>\text{N}-\text{O}\cdot$ в них приведены в табл. 1. Модуляция спада сигнала PELDOR за счет дипольных взаимодействий впервые обнаружена в экспериментах с замороженными стеклообразными растворами нитроксильных бирадикалов типа 1.1 (табл. 1, рис. 6) [12].

Т а б л и ц а 1

Нитроксильные бирадикалы, изученные методом PELDOR

N	Структура	r, нм J, МГц	Литература
1	2	3	4
1.1	 <p style="text-align: center;">R = H, CH₃</p>	1,9±0,16 1,94±0,02 1,99±0,06 <i>J</i> = +0,7±0,4	[12] [30] [30] [30]
1.2		1,97 1,98±0,07 1,94±0,05 1,97±0,03	[31] [32] [33] [34]
1.3	 <p style="text-align: center;"><i>n</i> = 8 <i>n</i> = 12 <i>n</i> = 14 <i>n</i> = 20</p>	2,04±0,07 2,48±0,13 2,71±0,19 3,28±0,44	[32]
1.4	 <p style="text-align: center;">TBDMS-<i>трет</i>-бутилдиметилсиллил</p>	1,54±0,02	[38]
1.5		1,72±0,03	[38]
1.6		2,20±0,07	[38]
1.7		*	[35]
1.8		*	[35]
1.9		2,57±0,14	[38]
1.10		2,83±0,05 2,92±0,04	[36] [34]
1.11		3,63±0,10	[36]

1	2	3	4
1.12		4,92±0,20 5,00±0,40	[36] [37]
1.13		7,44±0,82	[37]
1.14		1,54±0,03 1,97±0,03	[34]
1.15		2,40±0,04 $J = 11,0 \pm 0,03$	[34]
1.16		1,62±0,04 1,70±0,04 $J = 1,4 \pm 0,5$	[30]
1.17		2,90±0,02	[66]
1.18		1,94±0,01	[66]

* Широкое распределение по конформациям.

Расстояние между неспаренными электронами определяли либо прямым измерением периода модуляции спада сигнала PELDOR, либо по его фурье-спектру. В дальнейшем этот бирадикал (с R=H) был выбран в качестве тестовой системы в первой работе, в которой предложен метод PELDOR со скачком магнитного поля [29].

В работе [30] для бирадикалов **1.1** (R=H) и бирадикалов **1.16** проведен расчет спектра расстояний (рис. 7). В отличие от обычных методов применен метод, учитывающий при расчете функции $F(r)$ длительность импульсов в PELDOR экспериментах. Это позволило повысить надежность функции распределения $F(r)$ и определить величину и знак обменного интеграла J для бирадикалов с расстояниями между фрагментами >NO менее 2 нм (см. табл. 1). Для **1.16** обнаружены две конформации бирадикала с близкими значениями расстояний 1,62 и 1,70 нм.

Наиболее популярным среди исследователей оказался нитроксильный бирадикал **1.2**. Расстояние между фрагментами >NO определено по спектру Фурье 3pPELDOR [31, 32] и 4pPELDOR [33]. Отметим, что в последнем случае этот бирадикал использовали для тестирования впервые предложенной методики 4pPELDOR. Среднее расстояние, измеренное разными авторами, составляет в этом случае $1,97 \pm 0,07$ нм (см. табл. 1), что соответствует расчету с помощью молекулярных моделей [32]. Предполагается, что бирадикал **1.2** стабилизируется в условиях эксперимента (стеклообразная матрица, 80 К) только в одной из возможных конформаций, поскольку линии спектра Фурье оказываются достаточно узкими, ~3—4 МГц.

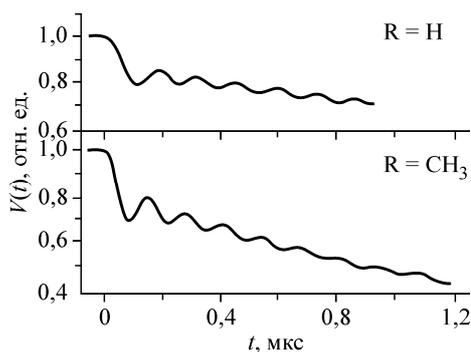


Рис. 6. Спады сигналов PELDOR замороженных растворов бирадикалов **1.1** в толуоле [12]

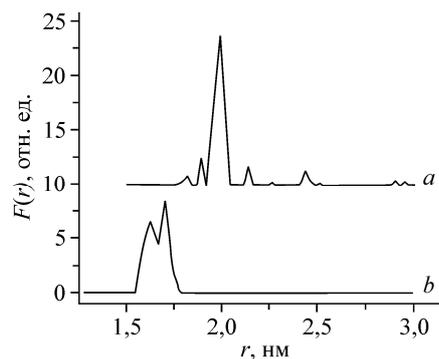


Рис. 7. Спектры расстояний для бирадикалов **1.1** (R=H) (a), **1.16** (b) [30]

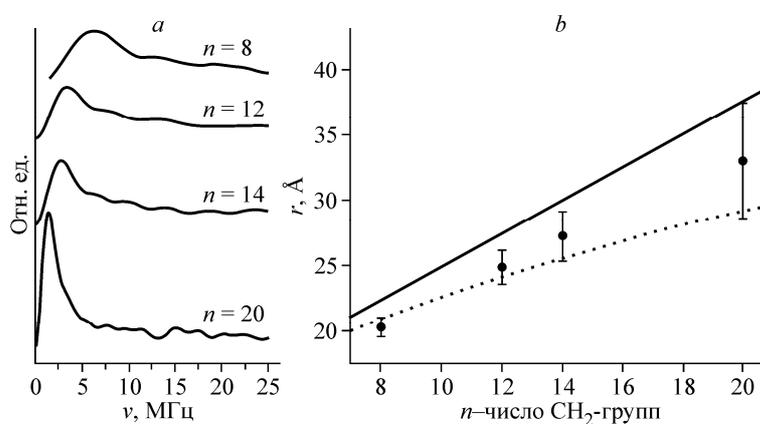


Рис. 8. Спектры Фурье бирадикалов **1.3** (a). Расстояния r между группами $>NO\bullet$ в зависимости от числа CH_2 -групп в бирадикалах **1.3** (b). Точки — эксперимент для $n = 8, 12, 14, 20$; кривая точками — расчет методом конформационной статистики; сплошная линия — полностью вытянутые *транс*-структуры [32]

В ряде работ [32, 35] нитроксильные радикалы использовались в качестве "линейки" для сопоставления измеряемых с помощью PELDOR расстояний между спиновыми метками и расчетными значениями этих величин, а также для экспериментального определения предельных расстояний, определяемых этим методом. Расстояния варьировались размерами молекулярной мостиковой группы, соединяющей радикальные фрагменты. Так, в работе [32] изучены бирадикалы с алифатическим связывающим мостиком. Измерение проводили при 80 К с образцами бирадикалов **1.3**, растворенными в полимерной матрице полистирола. Несмотря на то что полученные в эксперименте спектры Фурье имеют достаточно большую ширину (рис. 8, a), их максимумы последовательно сдвигаются с увеличением длины цепи в область низких частот.

Получены значения расстояний от 2,04 нм при $n = 8$ до 3,28 нм при $n = 20$ [32]. Увеличение цепочки на одно звено приводит к возрастанию расстояния между фрагментами $>NO$ в бирадикале **1.3** на величину около 0,1 нм. Ширина спектров Фурье в этих экспериментах определяется набором конформаций алифатической полимерной цепи. Оказалось, что определенные в работе значения расстояний находятся в согласии с расчетами, если применить методы статистики в предположении о полностью вытянутой конформации алифатической цепочки (рис. 8, b).

Отметим, что бирадикал **1.3** является, по-видимому, исключением, поскольку для весьма близких по строению бирадикалов **1.7**, **1.8** нам в этом случае не удалось зафиксировать модуляционных биений в спаде сигнала $3rPELDOR$ [35]. Это связано, по нашему мнению, с широким набором конформаций (повышенной гибкостью) для алифатического мостика в этих двух бирадикалах. В последующих работах строение мостиковой группы, связывающей группы $>N-O\bullet$ выбирали, по возможности, максимально жестким и конформационно фиксированным.

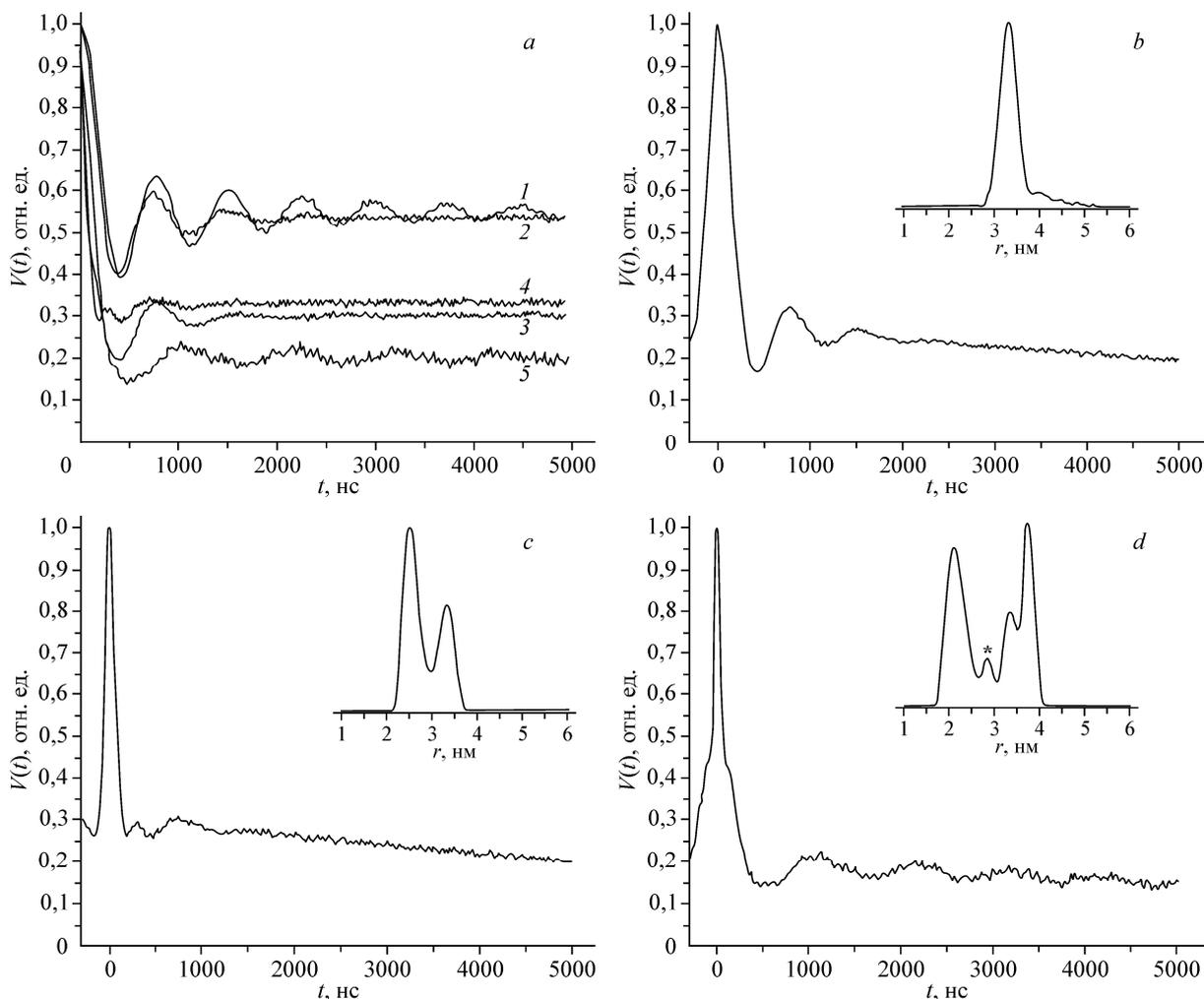


Рис. 9. Экспериментальные спады сигналов PELDOR, использованные для определения числа N при $t = 5000$ нс: для бирадикалов **2.1**, **2.2** (спады *1*, *2*) (эксперимент $N_{\text{эсп}} = \mathbf{2.1}$, $\mathbf{2.1}$); для трирадикалов **2.3**, **2.4** (спады *3*, *4*) ($N_{\text{эсп}} = \mathbf{3.1}$, $\mathbf{3.0}$); для тетрадикала **2.5** (спад *5*) ($N_{\text{эсп}} = \mathbf{3.9}$); спады сигнала PELDOR и спектры расстояний для **2.2** (*b*), **2.4** (*c*), **2.5** (*d*) (структуры радикалов приведены в табл. 2) [40]

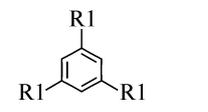
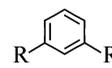
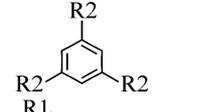
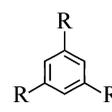
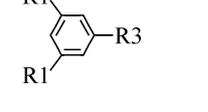
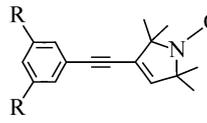
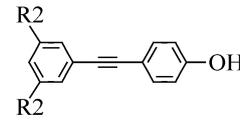
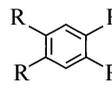
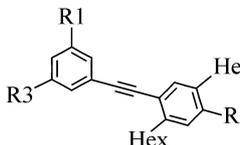
Определить верхнюю границу расстояний, измеряемых с помощью метода PELDOR, попытались авторы нескольких работ [36, 37], исследуя бирадикалы с жесткой структурой, строение которой определяется молекулярной "линейкой" из тройных связей и бензольных колец (бирадикалы **1.9—1.15**). Наибольшее расстояние $7,44 \pm 0,82$ нм зафиксировано для растворов бирадикала **1.13** в дейтероортотерфениле при 50 К [37]. С хорошей точностью определено расстояние $5,0 \pm 0,4$ нм в бирадикале **1.12** ($n = 2$) в работах [37, 38]. Для этого бирадикала расстояние между спинами, равное $5,10 \pm 0,12$ нм, определено также с помощью предложенного в этой работе [36] импульсного одночастотного метода SIFTER. Теоретический расчет для этого бирадикала дал значение расстояния $5,23—5,15$ нм. Отметим, что корреляция между расчетом линейной сопряженной структуры методом МД и измеренными методом PELDOR расстояниями между $>N-O\bullet$ фрагментами концевых радикалов обнаруживается и для других, более коротких, но "жестких" бирадикалов типа **1.4—1.6**, **1.9**, **1.10** [34, 36, 38, 39].

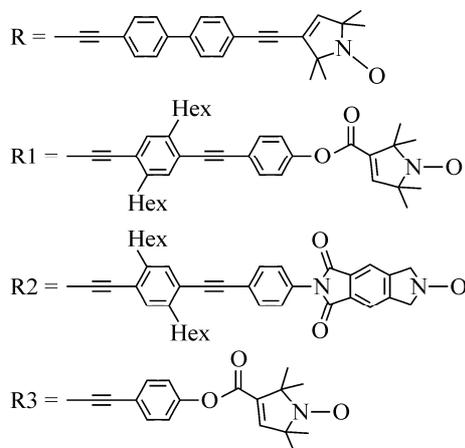
3. ТРИ- И ТЕТРАНИТРОКСИЛЫ

Наиболее четкие результаты получены на модельных нитроксилах, специально синтезированных в виде пар, троек, четверок [40]. Авторы поставили цель — экспериментально проверить теоретические расчеты (см. соотношение (4)), составляющие базу для определения числа

Т а б л и ц а 2

Би-, три- и тетранитроксилы, изученные методом PELDOR в [41, 42]

<i>N</i>	Структура	<i>R</i> , нм	Литература	<i>N</i>	Структура	<i>R</i> , нм	Литература
2.1	R—R	3,40(3,4)*	[40]	2.6		3,52 3,54 3,60	[41]
2.2		3,30(3,4)	[40]	2.7		3,83	[41]
2.3		3,30(3,4)	[40]	2.8		2,90 3,07 3,60	[41]
2.4		1,3/1,5** 2,50(2,5) 3,5 3,40(3,4)	[40]	2.9		3,83	[41]
2.5		<i>орто</i> *** 2,20(5,0) <i>мета</i> 3,30(4,0) <i>пара</i> 3,80(3,0)	[40]	2.10		3,23 3,88 4,32	[41]



* В скобках даны расчетные значения расстояний.

** Приведены положения заместителей (радикалов) в бензольном кольце.

*** Расстояния для пар радикалов в *орто*-, *мета*- и *пара*-положениях друг к другу.

частиц в группе спинов для фиксированных значений $N = 2, 3, 4$, и определить функцию парного распределения в этих полирадикалах. Строение исследованных соединений показано в табл. 2, структуры **2.1—2.5**. Исследовали модулированные спады 4pPELDOR для замороженных растворов в дейтерированном толуоле (рис. 9). Два параметра спада определены экспериментально — предельное значение амплитуды сигнала V_p после нормирования к экспоненциальному спаду за счет дипольных межмолекулярных взаимодействий и вероятность возбуждения спектра импульсом накачки p_b . Последний параметр ($p_b = 0,43$ и $p_b = 0,12$ для длительностей импульса накачки 12 и 92 нс соответственно) определяли из спада сигнала PELDOR для модельных бирадикалов типа **1.2, 1.14, 1.15** ($N = 2$). Для расчета N авторы использовали соот-

ношение (4). С точностью около 5 % экспериментальные величины N для бирадикалов **2.1**, **2.2** оказались равными 2,1, для трирадикалов **2.3**, **2.4** $N = 3,0$, и для тетрарадикала **2.5** $N = 3,9$, что полностью соответствует ожидаемым значениям N для этих полирадикалов. Распределение по расстояниям для полирадикалов имеет свои особенности. Если для бирадикалов **2.1**, **2.2** и симметричного трирадикала **2.3** функция $F(r)$ имеет только один максимум, то для трирадикала типа **2.4** из-за неэквивалентных положений спиновых меток спектр расстояний содержит две линии с отношением интенсивностей 2/1 (см. рис. 9). Тетрарадикал **2.5** дает $F(r)$ с тремя максимумами, соответствующими трем возможным расстояниям в прямоугольнике с вершинами — спиновыми метками. Данные о расстояниях в этих полирадикалах приведены в табл. 2, где в скобках для сравнения приведены также результаты молекулярного моделирования.

В работе [41] детально рассмотрен вопрос о теоретических особенностях PELDOR для ансамбля из трех парамагнитных частиц. В этом случае помимо трех дипольных частот в спектре должны присутствовать их комбинации в виде сумм и разностей этих частот. Этот вклад приводит к появлению как в Фурье-спектре, так и в спектре расстояний дополнительных линий (если их частоты попадают в диапазон, доступный для измерений методом PELDOR) или возможно уширение линии в спектре на дипольных частотах. В [41] теоретически показано, что разделить вклад от линий на частотах радикальных пар и линий на комбинированных частотах (вклад троек) можно, если проводить измерения не при фиксированных значениях параметра p_b , а при нескольких его значениях. Вклад троек содержит информацию о взаимной ориентации трех векторов, соединяющих центры в трехспиновом ансамбле.

Эксперименты в [41] с помощью 4pPELDOR проводили со специально синтезированными би- и трирадикалами [42] в стеклообразных растворах пердейтерированного *орто*-терфенила при 50 К. Строение радикалов **2.6**—**2.10** показано в табл. 2. Импульс накачки для поворота на 180° длительностью 15 нс настраивали по частоте на максимум спектра ЭПР нитроксила. Зависимость глубины модуляции спада сигнала PELDOR от p_b исследовали путем увеличения длительности импульса накачки. Полученные результаты показывают, что такие эксперименты приводят если не к разделению спектров пар и троек, то к существенному улучшению разрешения в спектре расстояний трирадикалов. Эффекты комбинированных частот обнаружены и в спектрах Фурье PELDOR. Отметим, что даже в случае структурно полностью симметричного трирадикала **2.6** обнаружена неэквивалентность расстояний между тремя фрагментами $>N-O\bullet$. В [41] исследованы также смеси би- и трирадикалов.

Отметим, что моделирование полирадикальных систем нитроксилами создает основу для надежного определения числа радикальных меток при исследованиях комплексообразования и агрегации в биологических системах.

4. ОРИЕНТАЦИОННАЯ СЕЛЕКТИВНОСТЬ В PELDOR, СПИНОВЫЙ ОБМЕН, ДИНАМИКА

Именно результаты исследования этих явлений, как правило, составляют содержание работ последнего периода, посвященных применению PELDOR в ЭПР спектроскопии нитроксидов. Поэтому прежде чем перейти к обзору этих работ, следует, на наш взгляд, сделать некоторые пояснения.

Ориентационная селективность. Импульсы А и В действуют селективно в разных узких интервалах частот спектра ЭПР. Если величина анизотропии магнитно-резонансных параметров парамагнитных центров ($>N-O\bullet$ фрагментов для нитроксидов) достаточно велика, то возникает ориентационная селективность воздействия СВЧ импульсов на спиновую систему. Она отсутствует при хаотическом наборе ориентаций этих фрагментов, но проявляется при их коррелированном расположении (рис. 10, а). Эта селективность заключается в том, что по-разному ориентированные в пространстве радикальные фрагменты в разной степени возбуждаются импульсами, формирующими сигнал спинового эха, и импульсом накачки.

Когда радикальные фрагменты имеют вполне определенную ориентацию по отношению друг к другу, то между величинами параметров $V(O)$, p_b и D в уравнении (2) будет существовать корреляция, которую можно корректно учесть.

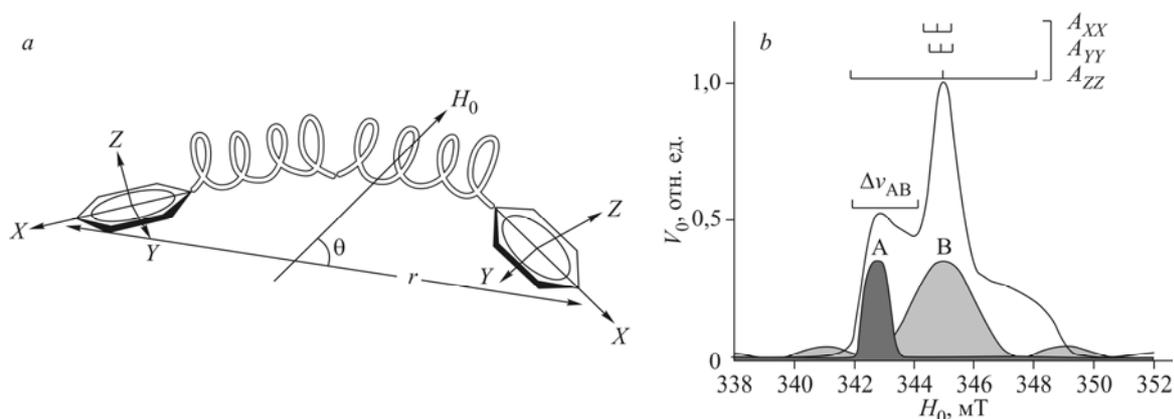


Рис. 10. Схема, поясняющая возможную взаимную ориентацию радикальных фрагментов в бирадикале (а). Спектр ЭПР нитроксила в X диапазоне, A_{xx} , A_{yy} , A_{zz} линии, соответствующие N^{14} анизотропному СТВ в спектре; А и В — импульсы детектирования и накачки (b)

Первые исследования ориентационной селективности в нитроксилах выполнены в работе [31]. Теоретический анализ и эксперимент показали, что если проводить измерения, меняя положение импульсов А и В в спектре или изменяя $\Delta\nu_{AB}$, то из спадов сигнала PELDOR можно получить сведения о взаимной ориентации радикалов в паре [43—45]. Схема проведения таких экспериментов для типичного спектра ЭПР нитроксила в X диапазоне показана на рис. 10, b. Эти эффекты обнаруживаются в наибольшей степени на высоких частотах (Q , W — диапазоны*), где анизотропия g-фактора не в меньшей степени, чем СТВ, определяет форму спектра ЭПР и возникает возможность селективного возбуждения разных частей спектра, соответствующих разным ориентациям g-тензора парамагнитных частиц.

Обменное взаимодействие. Как отмечалось выше, для расстояний между неспаренными электронами $r > 1,5$ нм в общем случае обменное взаимодействие пренебрежимо мало, $J \sim 0$. Ситуация меняется, если расстояния меньше или бирадикал имеет жесткую систему сопряженных связей, которая определяет возможность для делокализации электронов и эффективного обмена. В этом случае $J \neq 0$ и, более того, при $J > 0$ такая спиновая система обладает антиферромагнитными свойствами, а при $J < 0$ — ферромагнитными. Корректное определение знака J является важным для определения свойств спиновой системы. Величина и знак обменного интеграла определяется из Фурье-спектров PELDOR.

Динамика нитроксилов и PELDOR. Спектр расстояний, получающийся в результате тихоновского преобразования нормированного спада сигнала PELDOR, позволяет определить не только расстояние r из максимума линии спектра, но и ширину этой линии Δr , и ее форму. Предполагается, что эти параметры определяются набором i конформаций исследуемого бирадикала, т.е. распределением по расстояниям. Эти конформации существуют в растворе бирадикала и, как предполагается, фиксируются в точке заморозания (измерения дипольных параметров ведутся в твердой замороженной стеклообразной матрице). Имеется ряд результатов, подтверждающих это предположение. Распределение по расстояниям не меняется с изменением скорости замораживания [46] и структуры стеклующегося растворителя [47]. Многочисленные расчеты (МД или другие методы) возможного набора конформаций и соответствующего распределения по расстояниям в жидкости по разным моделям движения дают результаты, практически совпадающие с данными PELDOR [47—51]. Таким образом, можно утверждать, что есть достаточно оснований считать данные по спектрам PELDOR отражающими динамику радикальных спин-меченых систем в жидкости (выше температуры стеклования). Усредненным параметром, характеризующим динамику, является гибкость молекул, которая может быть рассчитана по данным PELDOR в соответствии с той или иной теорией молекулярной гибкости.

* S соответствует частотам 8—12 ГГц, Q — 33—50 ГГц и W — 75—110 ГГц.

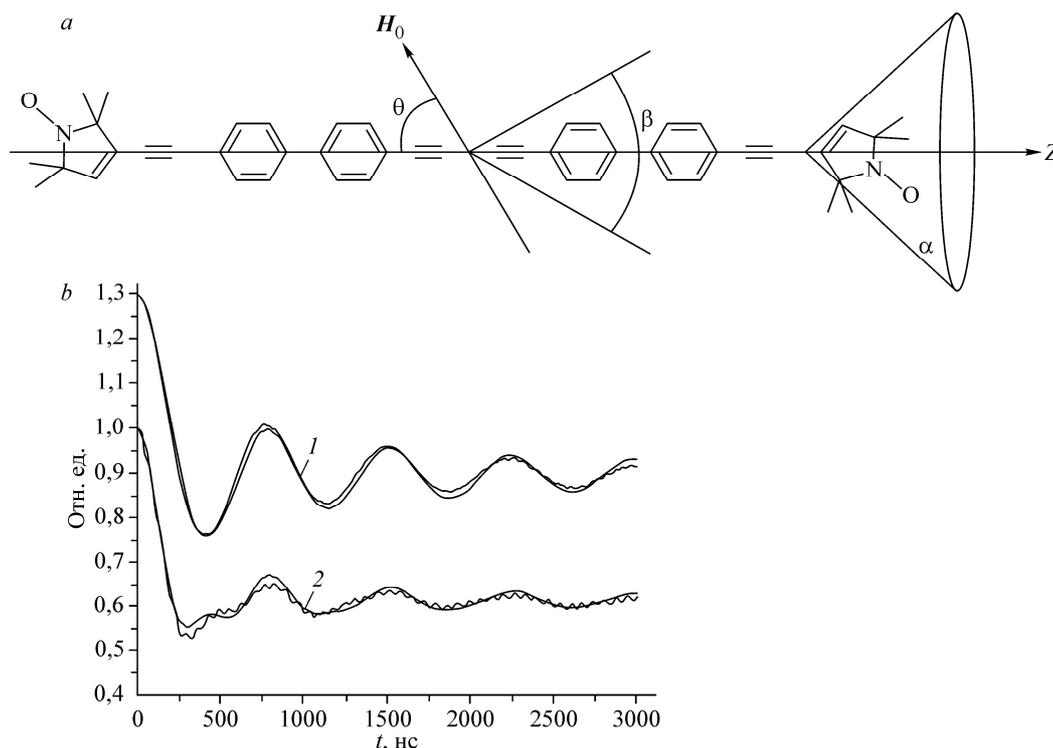
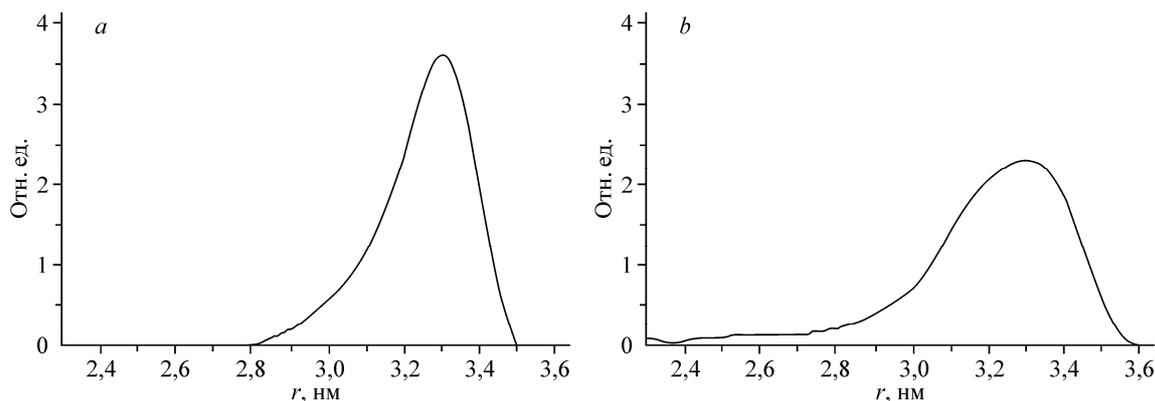


Рис. 11. Геометрическая модель, использованная в [49] для описания ансамбля конформеров бирадикалов **2.1** и **2.2** (а). Спады сигнала PELDOR для $\Delta\nu_{AB} = 80$ (1) и 40 МГц (2) (б). Видно, что эксперимент и расчет по предложенной модели практически совпадают

Имея в виду сделанные выше замечания, перейдем вначале к обзору по исследованиям ориентационной селективности в PELDOR. Ориентационная селективность приводит к зависимости частоты и глубины модуляции спада сигнала PELDOR от расстройки $\Delta\nu_{AB}$. В работе [49] изучены спады сигналов PELDOR бирадикалов **2.1** и **2.2** (см. табл. 2) для разных $\Delta\nu_{AB}$ в диапазоне 40—80 МГц. Измерения проведены в замороженных при 40 К растворах толуола и терфенила. Было найдено, что частота и глубина модуляции меняется с изменением $\Delta\nu_{AB}$, и спад сигналов PELDOR не удается описать в рамках модели случайных конформационных ориентаций. Авторы [48] для учета ориентационной селективности предположили простую модель, описывающую эксперимент (рис. 11, а).

Радикалы на концах линейной (**2.1**) и изогнутой (**2.2**) молекул ориентированы в пространстве не стохастически, а вращаются вокруг тройной связи, внутри конуса с $\alpha = 22^\circ$ (расчет по молекулярным моделям для пятичленного нитроксильного цикла). Цепочка (мост), связывающая радикальные пары, испытывает колебания изгиба (конформации изгиба) с амплитудой, величина которой является случайной и лежит в конусе с углом β . Этот угол характеризует конформационную гибкость исследуемых бирадикалов. Оказалось, что его оптимальные значения, описывающие эксперимент, равны соответственно 40° для бирадикала **2.1** и 20° для бирадикала **2.2** с начальным значением изгиба 120° . Отметим, что в рамках этой модели рассчитывались численно, по специально составленной программе, исходные спады сигналов PELDOR, а не Фурье-спектры или спектры расстояний (см. рис. 11, б). Результаты расчета, по мнению авторов [49], описывают эксперимент и позволяют оценивать конформационные свойства молекул, такие как гибкость структуры.

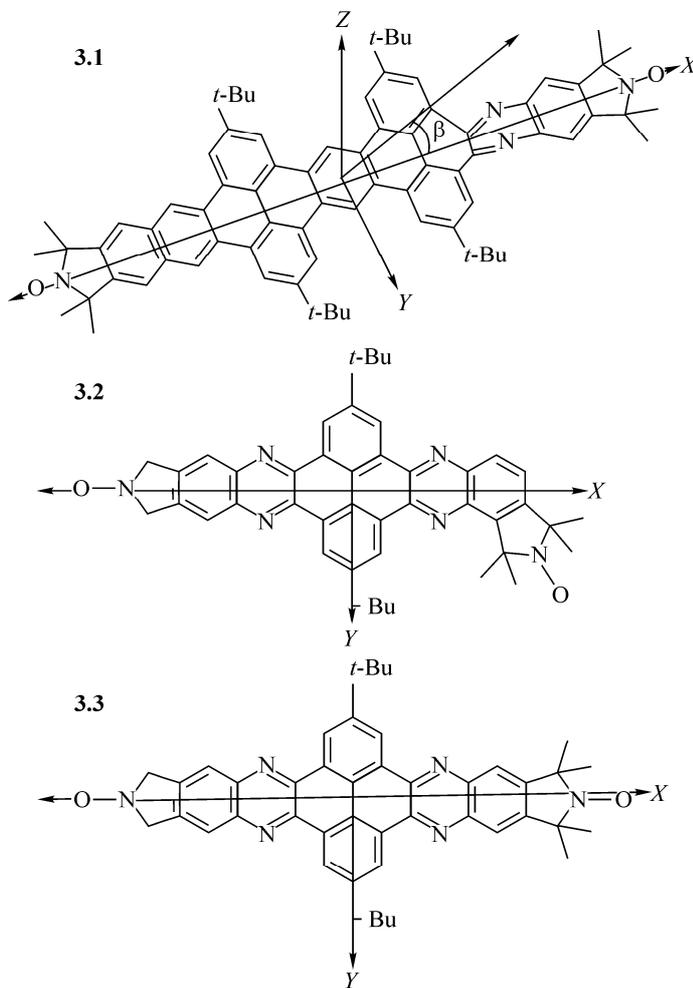
Попытка более детального рассмотрения вопроса об ориентационной селективности для нитроксильных радикалов типа **2.1** и **2.2** в X диапазоне для тех же экспериментальных условий, что и в [48], сделана в работе [44]. Авторы этой работы показали, что сигнал PELDOR может быть представлен в виде свертки (конволюции) ядра, содержащего функцию распределения по расстояниям $F(r)$, и функции угловой интенсивности $\lambda(\cos\theta)$, где θ — угол между направлением-

Рис. 12. Спектры расстояний нитроксилов **2.1** (a) и **2.2** (b) [44]Рис. 13. Структуры плоских бирадикалов **3.1—3.3** [53—55]

ем внешнего магнитного поля и вектором, соединяющим парамагнитные центры (см. рис. 10). Эта функция становится постоянной величиной при стохастическом распределении ориентаций парамагнитных центров. В случае корреляции $\lambda(\cos\theta)$ пропорциональна относительному вкладу радикальных пар с ориентацией под углом θ в амплитуду сигнала PELDOR. В [44] показано, что для получения $F(r)$ и $\lambda(\cos\theta)$ из экспериментальных данных о зависимости спада сигнала PELDOR от $\Delta\nu_{AB}$, необходимо найти функцию $F(r)$ методами тихоновской регуляризации, усреднив все спады PELDOR для различных $\Delta\nu_{AB}$, т.е. не учитывать угловую корреляцию для спиновых меток, полагая далее, что функция распределения $F(r)$ известна, вновь решить тихоновскую задачу для определения теперь уже функции угловой корреляции $\lambda(\cos\theta)$.

Функции распределения по расстояниям $F(r)$ для обоих радикалов, найденные в [44], имеют максимум при $\sim 3,3$ нм (рис. 12), но распределение по ширине значительно большее для **2.2**, чем для **2.1**. Асимметрия $F(r)$ указывает на конформационную гибкость бирадикалов **2.1** и **2.2** (см. ниже). Менее прямой представляется интерпретация рассчитанной функции $\lambda(\cos\theta)$, что, видимо, связано с частичным перекрытием спектров для разных ориентаций в X диапазоне.

В работах [52, 53] эффекты ориентационной селективности использованы для исследования геометрии и динамики бирадикалов с плоским пространственным сопряжением, строение которых показано на рис. 13. В этих случаях, очевидно, что нитроксилы жестко ориентированы таким образом, что главные значения тензора A_{ZZ} нормальны к плоскости бирадикала. Расстоя-



Т а б л и ц а 3
Структурные данные для
плоских бирадикалов
[52, 53, 68]

<i>N</i> (рис. 11)	<i>r</i> , нм	<i>J</i> , МГц	β , град.
3.1	2,7	~0	5
3.2	1,84	-3,2	10
3.3	1,97	+2,5	10

[55—58].

Приведем несколько примеров определения обменного интеграла и его знака методом PELDOR.

Детальное исследование величины и знака обменного интеграла проведены в *X* диапазоне на нитроксильных бирадикалах **3.1—3.3** [52, 53]. Их плоская структура определяет особую ориентационную селективность в спадах сигналов PELDOR. Получены спады сигналов PELDOR и их спектры Фурье для различных значений $\Delta\nu_{AB}$ в нитроксильном триплете спектра ЭПР нитроксила. Импульс накачки на ν_B приложен в максимуме центральной компоненты триплета, а импульс наблюдения на ν_A — на ряде частот в диапазоне $\Delta\nu_{AB} = 40—80$ МГц с шагом 10 МГц. В этом случае для наибольшей расстройки $\Delta\nu_{AB} = 80$ МГц регистрируется вклад A_{ZZ} компоненты тензора N^{14} , а для меньших, $\Delta\nu_{AB} < 80$ МГц, — вклад A_{ZZ} , A_{XX} и A_{YY} (см. рис. 9). В плоских бирадикалах типа **3.1—3.3** ось *Z* тензора СТВ ориентирована перпендикулярно плоскости бирадикала, а оси *X* и *Y* лежат в их плоскости. Измерения на разных $\Delta\nu_{AB}$ позволяют в этом случае более надежно определить частоты ν_{\perp} и ν_{\parallel} в спектрах Фурье PELDOR и, следовательно, угол θ , величину *r*, величину и знак *J*. Для определения этих параметров использовали специальную программу расчета спада сигналов PELDOR и спектров Фурье, модулированных дипольным и обменным взаимодействием [50, 52]. Результаты такого определения значений *r* и обменного интеграла *J* с учетом знака последнего приведены в табл. 3. Следует отметить, что спектры Фурье, полученные из исходных спадов PELDOR, допускают, как правило, расчет разных по знаку значений обменного интеграла *J*. Проверка правильности выбора знака в этом случае проводится из сравнения расчета для $+J$ и $-J$ с экспериментом.

Увеличение расстояния *r* в бирадикале **3.1** по сравнению с **3.2** и **3.3** приводит к "затуханию" обменного взаимодействия $J \approx 0$, а, казалось бы незначительное структурное изменение при переходе от бирадикала **3.2** к **3.3** меняет знак *J*, т.е. взаимодействие меняется от ферромагнитного до антиферромагнитного.

При детальном исследовании бирадикала **1.1** (см. табл. 1) в работе [30] сделана оценка величины и знака обменного интеграла $J = +0,7 \pm 0,4$ МГц.

Нитроксильные бирадикалы **1.2**, **1.10**, **1.14**, **1.15** детально изучены в замороженных растворах дейтеротолуола методом PELDOR в *X* (9,7 ГГц) и *S* (2,1 ГГц) диапазонах длин волн [35]. Это позволило сделать однозначным отнесение линий спектра Фурье к дипольным или сверхтонким взаимодействиям, линии которых лежат в одном диапазоне частот. Для всех бирадикалов в *X* и *S* диапазонах обнаружены линии на частотах, соответствующих ν_{\perp} и ν_{\parallel} , но только для бирадикала **1.15** оказалось, что $\nu_{\perp} \neq 2\nu_{\parallel}$. Расчет для этого бирадикала позволил определить величину и знак (уточнен в работе [52]) обменного интеграла $J = -11,0$ МГц.

Представляет интерес еще один результат из работы [34]. Для бирадикала со структурой типа **1.15**, но с одним бензольным кольцом в мостиковой группе, не было обнаружено никакой модуляции спада сигнала PELDOR как в *X*, так и в *S* диапазонах. Авторы считают, что это связано с тем, что такой бирадикал обладает сильным обменом (анализ спектра ЭПР дает значение обменного интеграла $|J| = 73$ МГц) и имеет два связанных состояния — триплетное и синглетное, а не два дублетных слабо связанных состояния, как обычно в бирадикалах со слабым обменом ($J \sim 0$), дающим модуляцию в PELDOR.

ния между группами $>NO\bullet$ определяли либо из спектров Фурье [52, 53], либо путем тихоновского преобразования усредненных спадов PELDOR [54].

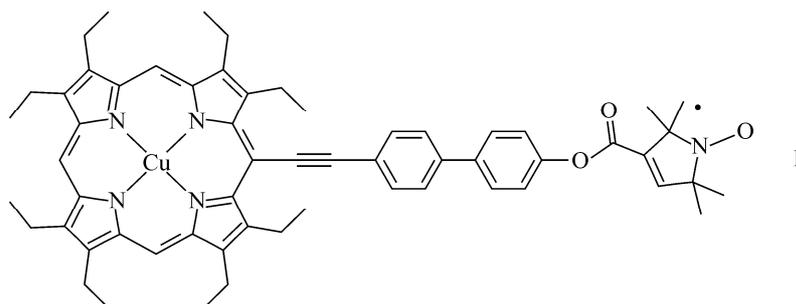
Ориентационная селективность содержит ценную информацию о геометрии и динамике нитроксильных групп. Вместе с тем возникает неоднозначность в определении расстояний за счет разных значений *r* для разных ориентаций $>NO\bullet$ групп. Именно поэтому были разработаны методы усреднения селективных спадов сигнала PELDOR, полученных при разных $\Delta\nu_{AB}$, позволяющие рассчитывать расстояния и в случае ориентационной селективности

5. ПАРЫ ПАРАМАГНИТНЫЙ ИОН—НИТРОКСИЛЬНЫЙ РАДИКАЛ

Данные о строении молекулярных систем, содержащих пары парамагнитный ион—нитроксильный радикал, представляют интерес не только с точки зрения создания искусственных супрамолекулярных ансамблей с заданными свойствами, но и для синтеза металлосодержащих белков и мембранных комплексов с парамагнитными ионами. В отличие от пар нитроксил—нитроксил, синтез которых является непростой задачей для сложных биологических систем, в некоторых случаях задача упрощается, если возможно введение в качестве второй спиновой метки в полярную группу парамагнитного иона, и наоборот — при введении нитроксила в пару с ионом.

В большинстве случаев такие пары ион—нитроксил обладают специфическими парамагнитными свойствами, обусловленными ионами металлов. Из-за анизотропии g -фактора их спектры ЭПР имеют большую протяженность по сравнению со спектрами радикалов. Поэтому в импульсном эксперименте необходимо учитывать взаимное положение детектирующего импульса и импульса накачки в спектре ЭПР, так называемую ориентационную селективность PELDOR. Парамагнитные ионы, как правило, укорачивают времена фазовой и спин-решеточной релаксации, что приводит к уменьшению интервала измеряемых расстояний. Эксперименты показывают, однако, что некоторые из них, такие как Cu^{2+} и Gd^{3+} , позволяют провести PELDOR измерения.

Парамагнитные ионы меди входят в состав многих биологических систем, таких как металлопротеины и супрамолекулярные ансамбли. В [59] детально исследованы методом PELDOR двухспиновые молекулы (I), состоящие из порфириновых комплексов меди Cu^{2+} ($S = 1/2$) и групп, содержащих нитроксильный радикал:



Типичные спады сигналов PELDOR в этом случае для двух различных $\Delta\nu_{\text{AB}}$ (226 и 603 МГц) показаны на рис. 14, где приведен также спектр ЭПР этой пары, зарегистрированный методом ЭСЭ с указанием мест приложения импульсов регистрации (A) и накачки (B, C) в PELDOR эксперименте. Эти спады находят свое объяснение, если учитывать при расчете дипольного

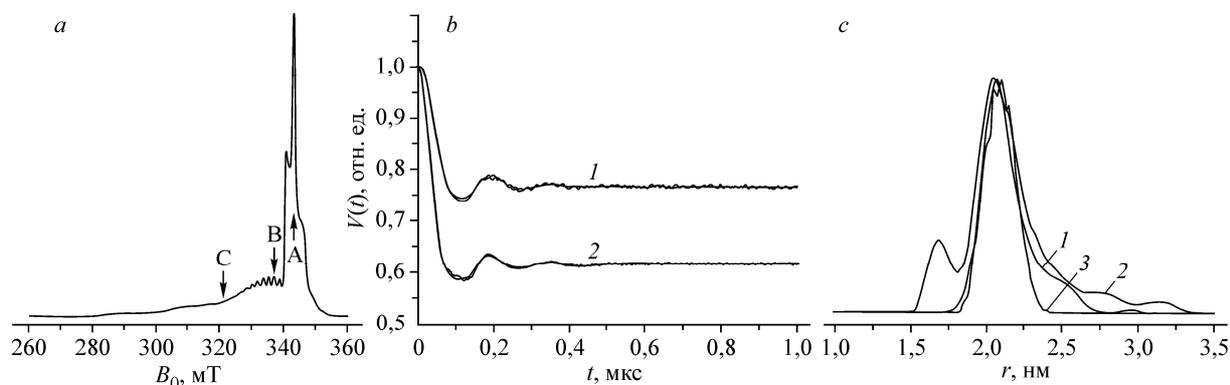
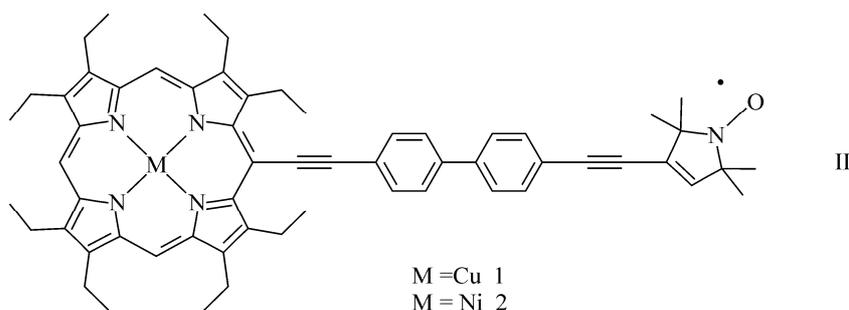


Рис. 14. Спектр ЭПР (регистрация по сигналу двухимпульсного эха, X диапазон) (а). Экспериментальные спады сигнала PELDOR для $\Delta\nu_{\text{AB}} = 603$ (1) и 226 МГц (2) (b). Спектры расстояний, найденные тихоновским преобразованием для спада при $\Delta\nu_{\text{AB}} = 226$ (1) и 603 МГц (2); расчет для Гауссова распределения по расстояниям ион меди—нитроксил в плоскости порфиринового кольца (3) [59] (c)

взаимодействия спинов распределение спиновой плотности по атомам азота (данные получены ранее в работах с помощью стационарного метода ЭПР), ориентационную селективность и конформационную гибкость исследуемых ион-радикальных систем. Кроме того, в расчетах использованы данные рентгеновского анализа, выполненного в той же работе [59] для этих молекул.

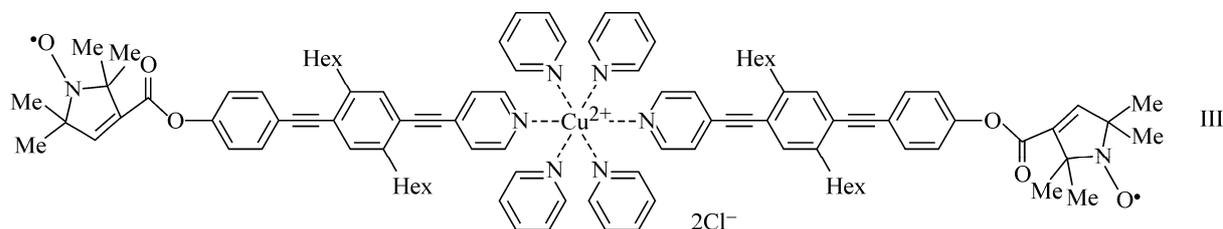
Известно, что применение тихоновского преобразования для анализа систем с ориентационной селективностью считается неоправданным. В [59] авторы тем не менее решили проверить возможность этого способа определения расстояний, несмотря на ориентационную селективность для ион-радикальной пары I. Результаты показаны на рис. 14. Основным максимум $F(r)$ для обеих раздвижек ν_{AB} (спады PELDOR приведены на том же рисунке) оказался при $r = 2,06$ нм, что соответствует данным рентгеноструктурного анализа. Однако $F(r)$ имеет дополнительные ложные максимумы при меньших и больших значениях r , что может приводить к ложным выводам о возможных конформациях исследуемой пары ион—радикал. Авторы [59] делают вывод, что в случае, когда взаимная ориентация спиновых фрагментов фиксирована жестко, как в ряде спиновых меток в протеинах (в белках), т.е. при сильных эффектах спектральной селективности, решение обратной задачи методом тихоновской регуляризации некорректно.

При достаточно больших расстояниях между спинами в паре (расстояния более 1,5 нм) определение слабого обменного вклада J в стационарном ЭПР представляется затруднительным. Методы анализа данных PELDOR, развитые в [59], использованы для определения величины и знака обменного интеграла в близкой по строению к I ион-радикальной паре II [60].



В этой паре в отличие от I пиримидиновый комплекс меди связан с нитроксильным радикалом полностью сопряженным мостиком. Оказалось, что спады сигналов PELDOR для II при различных $\Delta\nu_{AB}$ могут быть рассчитаны только с учетом слабого обменного взаимодействия, величина и знак которого ($J = +4$ МГц) определены в [60].

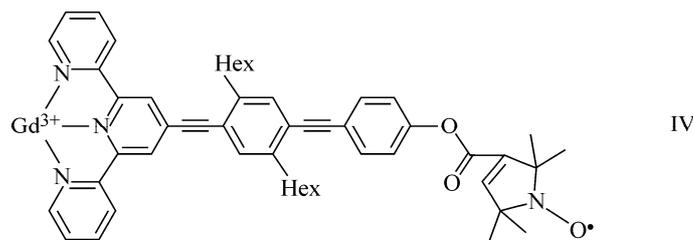
Исследован комплекс гексакоординированного иона Cu^{2+} , в котором лиганды содержат два нитроксильных радикала [61]



Спектр ЭПР в X диапазоне такого комплекса состоит из обычного триплета от нитроксила с $g \approx 2,003$ и анизотропной линии шириной около 55 мТ для иона Cu^{2+} ($S = 1/2$) с $g_z = 2,258$. Возбуждение проводили импульсами длительностью 32 нс (измерения выполнены при 15 К) в нескольких вариантах. Если импульс накачки фиксировался на максимуме линии, то импульс регистрации возбуждал спины ионов Cu^{2+} на частотах, сдвинутых относительно импульса накачки на 200 или 1465 МГц. В этом случае анализ модуляции спада сигнала PELDOR дал два расстояния $r_{(\text{NO}^{\bullet} \cdots \text{Cu}^{2+})} = 2,43$ и 2,46 нм. Если проводился обычный эксперимент с возбуждением

и накачкой внутри контура линии ЭПР нитроксильного радикала, то модуляция PELDOR соответствовала $r_{(>NO' \rightarrow NO')} = 5,2$ нм. Квантово-химический расчет с хорошей точностью подтвердил результаты эксперимента.

В качестве спиновой метки в паре нитроксил—ион могут быть использованы ионы Gd^{3+} ($S = 7/2$). В замороженных дейтеросодержащих растворах эти ионы имеют достаточно длинные времена поперечной релаксации, сравнимые с временами для нитроксидов, и обладают слабой ориентационной селективностью [62—65]. PELDOR эксперименты выполнены в X (9,5 ГГц) и Q (34,0 ГГц) диапазонах [62] для ион-радикалов, структура которых приведена ниже.



В X диапазоне спектр ЭПР нитроксила перекрывается с максимумом линии широкого ЭПР спектра иона Gd^{3+} (переход $-1/2 \rightarrow +1/2$), а в Q диапазоне этот максимум лежит вне нитроксильного триплета. Импульс накачки приложен в максимуме спектра нитроксила, а детектирующий импульс на расстоянии 80 МГц (X диапазон) или 300 МГц (Q диапазон) от импульса накачки. Авторы [62] отмечают существенный рост (в 34 раза) чувствительности измерений для Q диапазона по сравнению с X диапазоном. В обоих случаях спад сигнала PELDOR модулирован на частоте, соответствующей расстоянию ион—радикал, равному 2,54 нм, однако глубина модуляции в Q диапазоне (0,2) оказалась меньше в 2 раза, чем в X диапазоне. Тихоновский анализ спадов PELDOR обнаруживает помимо основной линии на 2,54 нм сателлиты в области 2,8 нм (X диапазон) и в области 1,8 нм (Q диапазон), а также линии, соответствующие дейтерной модуляции сигнала PELDOR за счет эффектов ESEEM.

Происхождение сателлитных линий пока не выяснено, хотя и рассмотрено несколько гипотез [62]. Несмотря на эти осложнения для интерпретации спектров PELDOR, авторы [62] считают, что ионы Gd^{3+} могут служить ценной альтернативой нитроксильным меткам для структурных исследований биологически важных молекул, в особенности для PELDOR в Q диапазоне.

Очевидно, что, несмотря на экспериментальные и теоретические трудности, метод PELDOR будет находить все более широкое применение при изучении систем ион—радикал и ион—ион, которые представляют особый интерес в биохимической физике и биокатализе.

6. НИТРОКСИЛЬНЫЕ БИРАДИКАЛЫ В СПЕКТРОСКОПИИ PELDOR НА ВЫСОКИХ ЧАСТОТАХ

Основным преимуществом спектроскопии PELDOR в диапазонах высоких частот (Q , W и выше) является высокое разрешение по g -фактору. Появляется возможность проводить измерения, меняя положение импульсов детектирования А и накачки В в спектре ЭПР, селективно для линий g_x , g_y , g_z спектра ЭПР (рис. 15). Это открывает более широкие по сравнению с X диапазоном возможности для определения пространственной ориентации нитроксидов.

Методология исследований дипольных взаимодействий в импульсной ЭПР спектроскопии на высоких частотах (W — диапазон, 95 ГГц) детально изложена в работе [66] и проиллюстрирована на примерах двух бирадикалов **1.17** и **1.18** (см. табл. 1). Исследованы N^{14} - и N^{15} -содержащие бирадикалы. Найдены следующие структурные параметры для бирадикала **1.17**. Оси z g -тензора обоих радикалов в **1.17** параллельны между собой и перпендикулярны вектору r , соединяющему парамагнитные центры ($r = 2,9 \pm 0,02$ нм) (см. рис. 10). Таким образом, плоскости радикалов xy копланарны. В этой же общей плоскости лежит вектор r , направленный под углом $26 \pm 2^\circ$ к оси x . Последний, как всегда, ориентирован вдоль NO-связи. Для бирадикала

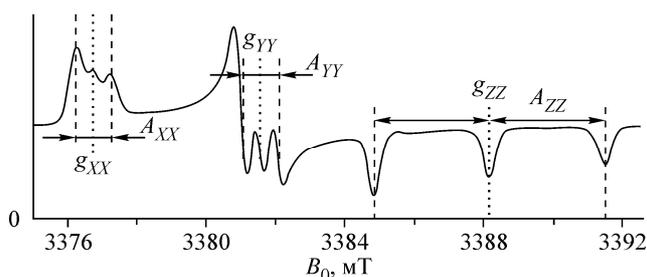


Рис. 15. Типичный спектр ЭПР (первая производная) нитроксильного радикала в W диапазоне. Разрешены линии, соответствующие тензору СТВ и g -фактора

1.18 найдены такие же пространственные параметры, за исключением угла между осью x и вектором r , который составляет 44° . Авторы отмечают, что метод, однако, не позволяет сделать выбор между *цис*- и *транс*-ориентациями нитроксильных радикалов в обоих случаях бирадикалов **1.17** и **1.18**.

4pPELDOR в W диапазоне (95 ГГц) использован для исследования ориентационной селективности бирадикала **1.11** и трирадикала **2.3** [67]. В отличие от обычных экспериментов с изменением $\Delta\nu_{AB}$ в этой работе фиксировались частоты ν_A и ν_B и менялось постоянное магнитное поле H_0 . Изучены растворы этих соединений в дейтерированном *o*-тетфениле при 77 К. Исследовали глубину модуляции спада сигнала PELDOR и спектры Фурье в шести точках спектра ЭПР, отвечающих сверхтонким константам A_\perp и A_\parallel анизотропного нитроксильного триплетта. Полученные экспериментальные и расчетные результаты показали, что для таких бирадикалов с жесткой геометрией остова подвижными остаются нитроксильные радикалы на концах. Их заторможенное вращение в конусе с образующей 25° коррелировано.

Из-за ограничения мощности генераторов спектрометров на высоких частотах (Q и W диапазоны) не удается полностью инвертировать вектор спиновой намагниченности, чтобы получить оптимальную чувствительность спектрометра и регистрировать максимальную глубину модуляции спадов сигнала PELDOR. В работе [68] эти недостатки были в значительной мере устранены с применением источника мощностью около 1 кВт на частоте 94 ГГц (W диапазон) и импульсов длительностью до 14 нс. Изучены бирадикалы, показанные на рис. 13. Получены спады сигнала PELDOR, соответствующие шести различным положениям в спектре ЭПР импульсов детектирования и накачки. Эти положения фиксировались как для g_x, g_y, g_z линий спектра, так и для A_x, A_y, A_z . Для каждого бирадикала измерено 6 спадов сигнала PELDOR, отличающихся значениями ν_{AB} . Проведен расчет экспериментальных спадов PELDOR с использованием параметров спинового Гамильтониана, полученных в этой же работе при анализе стационарных спектров ЭПР в W диапазоне и с соответствующим подбором угла гибкости β (см. рис. 13). Наименьшее отклонение расчета от эксперимента получено для величин расстояний и углов гибкости, приведенных в табл. 3.

Как показано в работе [58], для спектрометра Q диапазона при мощности в резонаторе 50 Вт и длительности импульсов до 8 нс возможно проводить PELDOR эксперименты с подавлением эффектов ориентационной селективности при высокой чувствительности и разрешающей способности. Здесь же найдены условия для подавления ориентационной селективности и в X диапазоне [58].

7. ОЛИГОМЕРЫ И СУПРАМОЛЕКУЛЫ С НИТРОКСИЛЬНЫМИ РАДИКАЛАМИ

При исследованиях методом PELDOR олигомеров и супрамолекул помимо определения структурных параметров, таких как расстояния, в большинстве случаев целью являлось получить также данные о гибкости линейных молекулярных структур.

Для оценки реального размера молекулярной основы сложного бирадикала и ее гибкости, необходимо оценить методами МД возможные величины всех конформационных вкладов, таких как конформации нитроксильных групп и конформации цепочки, и сопоставить результаты таких расчетов с данными о ширине и форме линий спектра расстояний PELDOR. Такой анализ проведен для бирадикалов **1.10**—**1.13** (см. табл. 1), моделирующих олигомеры парафениленэтинилена [50]. Эти "жесткие" молекулярные системы могут служить блоками для построения различных наноструктур. Авторы работы [50] считают, что предложенный ими метод расчета

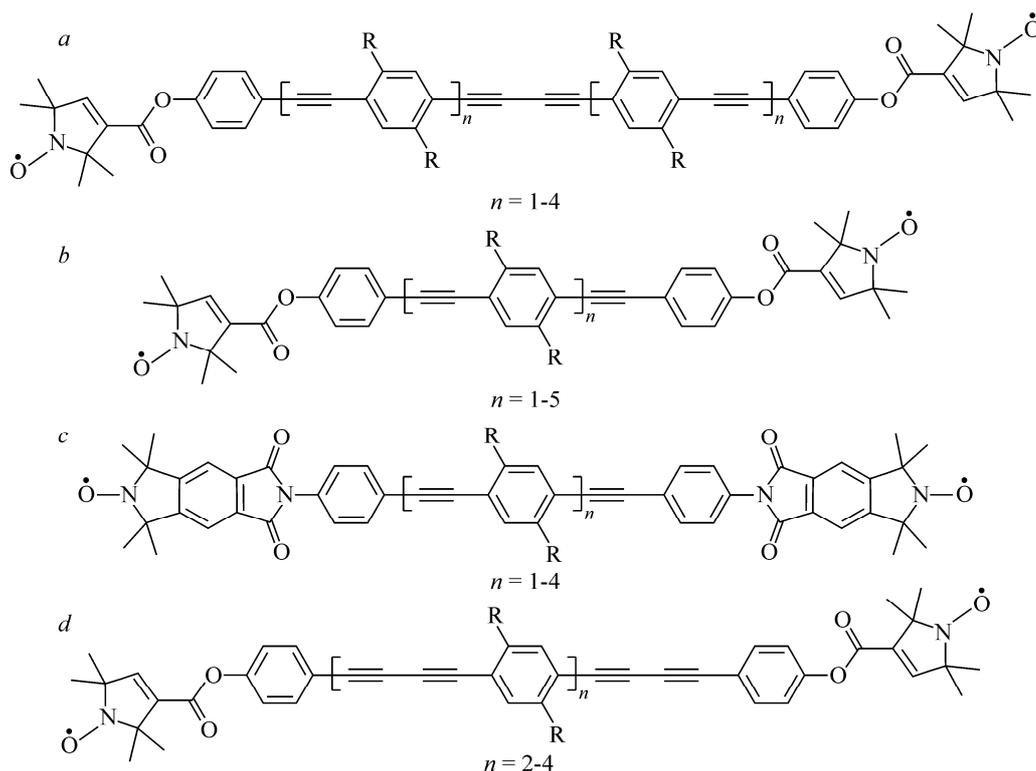


Рис. 16. Структуры олигомеров *p*-фенилен + этиниленов, исследованных в работах. Здесь заместитель R может быть либо гексилем, либо 6-токсигексилем [50, 69]

может быть использован для оценки гибкости молекул и олигомеров, используемых при конструировании молекулярных наноструктур с заданными свойствами.

Длинные π -сопряженные олигомеры, так называемые молекулярные проволоки, используются в органических проводниках и сенсорах, имеют потенциальное значение для создания различных наномеханизмов. Для таких приложений важную роль играет конформационная молекулярная гибкость олигомеров. Поскольку PELDOR позволяет измерять расстояния в нанометровом диапазоне и функцию распределения по расстояниям, этот метод стал одним из немногих методов для определения параметров молекулярной жесткости. Разработаны методы синтеза и исследована серия нитроксилсодержащих *p*-фенилен + этиниленов с различной структурой (рис. 16) [50, 69].

Измерения проведены при 50 К в серии стеклюющихся растворителей с разными температурами стеклования T_g . Проведен анализ положения и формы линии для функции распределения по расстояниям для этих спин-меченых олигомеров. Для примера на рис. 17 приведены данные для олигомеров типа (c). В [50] на основе расчетов методом МД разработана схема выделения вклада цепи сопряженных звеньев в общую гибкость спин-меченой молекулы. Показано, что гибкость такой цепочки может быть описана на основе модели "гармонической сегментальной подвижности" (HSC). Согласно этой теории, плотность распределения по расстояниям $F(r)$ для линейных молекул, обладающих устойчивой персистентной формой, может быть рассчитана и имеет асимметричный вид. Ширина распределения существенно увеличивается с увеличением длины остова молекулы. Все эти особенности обнаруживаются для исследованных в [50, 69] нитроксидов и показаны на рис. 17. Установлено, что структура нитроксильных спиновых меток слабо (10 %) влияет на экспериментально найденные параметры плотности распределения по расстояниям.

Молекулярные лестнично-спиральные блоки, меченые с двух концов пирролиновыми радикалами, изучены в работе [70]. Блоки представляют собой бис-пептидные мономеры, число которых можно последовательно увеличивать с помощью специально разработанного синтеза.

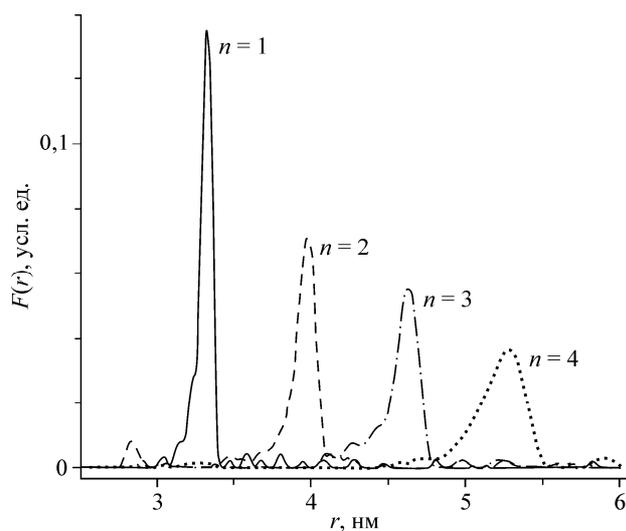


Рис. 17. Спектры расстояний между $>NO\bullet$ группами, найденные тихоновским методом регуляризации, из данных PELDOR для олигомеров типа *c* (см. *c* на рис. 16), $n = 1-4$ [69]

Структуры таких спин-меченых блоков **4.1** при $n = 4-8$ приведены в табл. 4. В отличие от других бирадикалов, приведенных в табл. 1, которые, как правило, растворимы только в органических растворителях, эти бирадикалы воднорастворимы. Водные растворы исследовали при 80 К в буфере с добавлением для стеклования глицерина. Кинетику спада сигналов 4pPELDOR анализировали с использованием Фурье-спектров и расчета функции распределения по расстоя-

ниям. Определены расстояния между $>NO\bullet$ фрагментами в серии этих соединений, а также соответствующие функции распределения $F(r)$. С увеличением числа n среднее расстояние увеличивается от 2,37 нм при $n = 4$ до 3,46 нм при $n = 8$, так что каждый дополнительный блок, соединяющий радикалы цепочки, вносит 0,27 нм в среднее расстояние. Примечательно, что разброс расстояний (стандартное отклонение) увеличивается с увеличением длины цепочки от 0,18 нм для $n = 4$ до 0,58 нм для $n = 8$. Эта величина характеризует молекулярную гибкость данной структуры. Показано, что полученные результаты в целом согласуются с расчетами методами МД.

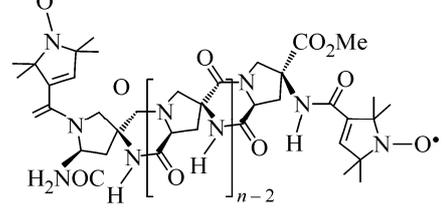
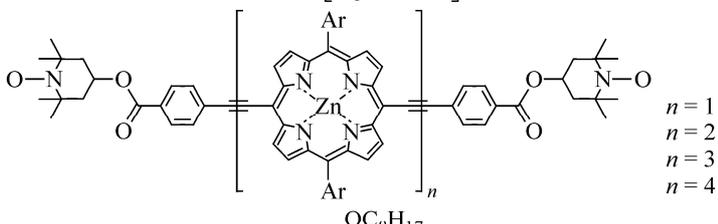
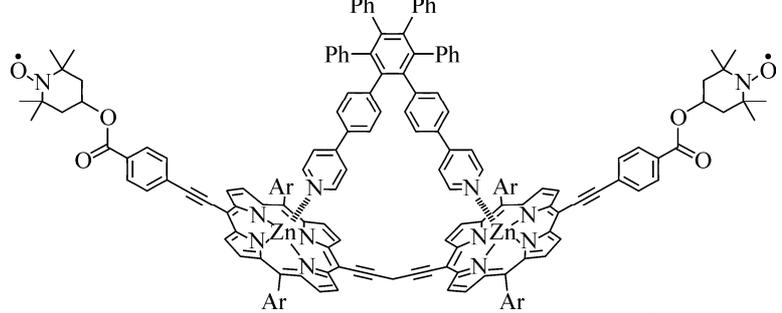
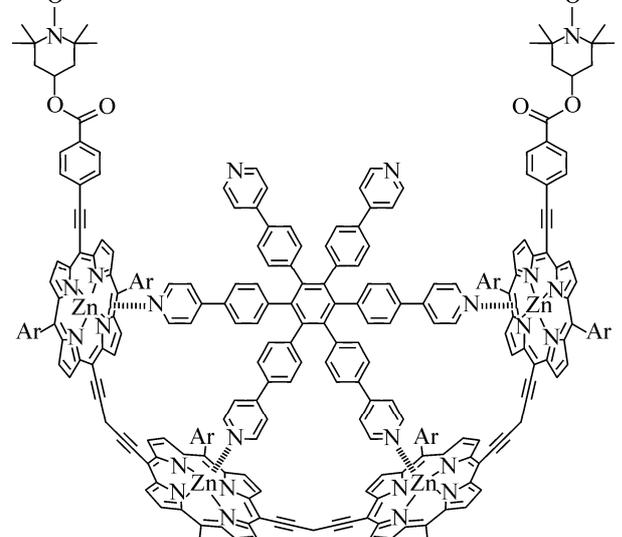
В дальнейшем в работе тех же авторов [71] синтезированы и изучены бис-пептидные лестничные структуры типа **4.1** с $n = 8$, но с заменой от одного до трех звеньев цепочки на близкую по строению мономерную группу RR (табл. 4). Такая замена, в зависимости от места и числа k введенных групп в лестничную цепь, меняет форму полимера, например, от линейной при $k = 0$ до *S*-образной при $k = 2$ или почти *O*-образной при $k = 3$. При этом изменяется как расстояние между группами $>N-O\bullet$, так и величина ширины на полувысоте функции $F(r)$, характеризующая конформационный разброс или гибкость макромолекулы. Так, например, по данным PELDOR, если при $k = 0$ и $n = 8$ расстояние между концами полимера составляет 3,3 нм при ширине на полувысоте 0,53 нм, то при $k = 3$ расстояние становится существенно меньше 2,56 нм, а ширина увеличивается до 0,59 нм. Авторы [71] считают, что направленный синтез лестничных супрамолекулярных структур, в особенности с мономерами, содержащими разные функциональные группы, позволит направленно конструировать полезные наносистемы. При этом PELDOR будет важным объективным методом измерения размеров и других свойств таких наносистем.

В работе [72] дан теоретический расчет строения и свойств бис-пептидных наноструктур на основе предложенной авторами модели "жестких объединенных сегментов", отвечающей свойству ограниченной конформационной подвижности сегментов таких структур. Показано, что эта модель лучше описывает экспериментально найденные функции парного распределения по расстояниям для лестничных структур бис-пептидов типа **4.1** (см. табл. 4), чем обычно используемые модели в методах МД.

Порфириновые олигомеры могут служить удобным строительным материалом для синтеза разных супрамолекулярных структур, потенциально пригодных для наноэлектроники и наноробототехники. Такими могут быть олигомеры, содержащие нитроксильные радикалы на концах, и комплексы линейных олигомеров с относительно короткими лигандами (см. табл. 4). Изучены линейные супрамолекулярные структуры из Zn-содержащих порфириновых циклов, соединенных бутадиеновыми мостиками и имеющими на начале и конце соответствующего олигомера нитроксильную группу [73] (см. табл. 4). Исследовали замороженные растворы этих молекул в дейтерированном толуоле и *орто*-терфениле с добавками соответственно пиридина- d_5

Т а б л и ц а 4

Супрамолекулярные системы, изученные методом PELDOR

N	Супрамолекула	r, нм	Литература
1	2	3	4
4.1	 <p style="text-align: right; margin-right: 20px;"> $n = 4$ $n = 5$ $n = 6$ $n = 7$ $n = 8$ </p>	<p>2,37±0,10 2,67±0,17 2,94±0,10 3,23±0,14 3,45±0,11</p>	<p>[70, 71]</p>
4.2	 <p style="text-align: right; margin-right: 20px;"> $n = 1$ $n = 2$ $n = 3$ $n = 4$ </p>	<p>3,36 (3,36)* 3,44** 4,64 (4,60) 4,79 5,88 (5,78) 6,14 7,36 (7,18) 7,50</p>	<p>[73]</p>
4.3		<p>4,2 (4,3)</p>	<p>[73]</p>
4.4		<p>2,5 (2,8)</p>	<p>[73]</p>

1	2	3	4				
4.5		2,69 (2,7) 4,62 (4,7) 4,76 (0,1)	[73]				
4.6		~2,5 ~3,7 ~5,0	[73]				
	<table border="1"> <thead> <tr> <th>-R-</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1 -(CH₂)₁₁-</td> </tr> <tr> <td>2 -(CH₂)₂₃-</td> </tr> <tr> <td>3 -(CH₂)₂₃-≡-O-(CH₂)₂₃-</td> </tr> </tbody> </table>	-R-	1 -(CH ₂) ₁₁ -	2 -(CH ₂) ₂₃ -	3 -(CH ₂) ₂₃ -≡-O-(CH ₂) ₂₃ -		
-R-							
1 -(CH ₂) ₁₁ -							
2 -(CH ₂) ₂₃ -							
3 -(CH ₂) ₂₃ -≡-O-(CH ₂) ₂₃ -							

* Значения, найденные расчетом по МД.

** Значения из рентгеновского анализа кристаллов.

и 4-бензилпиридина. Добавки вводили для предотвращения агрегации олигомеров, измерения проводили при 50 К. Для получения спектров Фурье и спектров расстояний использовали стандартную программу обработки спадов сигналов PELDOR с усреднением ориентационной селективности. На рис. 18 приведены спады сигналов PELDOR для ряда синтезированных порфириновых цепочек с $n = 1-4$ и соответствующие функции $F(r)$. Оказалось, что положение линий в спектре расстояний (см. табл. 4) и их асимметричная форма хорошо описываются теорией ограниченной гибкости (WLC) [74], что позволяет определить величины таких параметров гибкости, как персистентная длина. В табл. 4 даны также расстояния, рассчитанные методом МД и полученные из рентгеновского анализа, выполненного в этой же работе [73]. Отметим превосходное совпадение этих величин с найденными методом PELDOR.

Отметим, что спектры Фурье в линейных олигомерах указывают на отсутствие спинового обмена. Это неожиданный эффект, поскольку считается, что порфириновые олигомеры обладают высокой электронной делокализацией и поляризуемостью (см. ссылки в [73]). Такие свойства делают их идеальными единицами для конструирования молекулярных проводников.

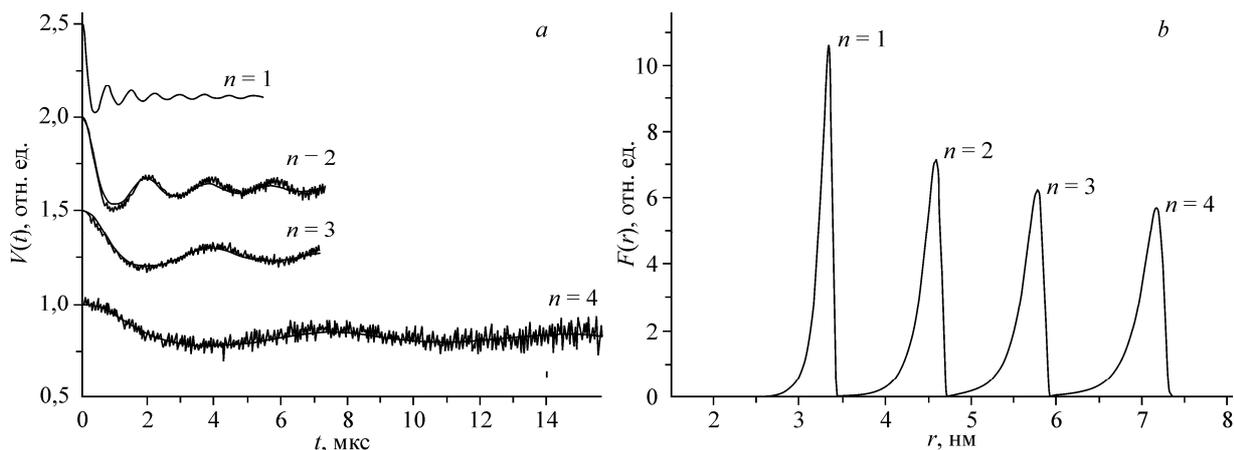


Рис. 18. Спады сигналов PELDOR для ряда синтезированных порфириновых цепочек с $n = 1$ —4 (а) и соответствующие функции распределения по расстояниям $F(r)$ [73] (б)

Управлять свойствами таких супрамолекулярных систем, как Zn-содержащие порфирины, возможно путем синтеза на их основе различных многоцентровых комплексов, меняющих геометрию линейной структуры. Примерами могут служить спин-меченые комплексы **4.3**—**4.5** (см. табл. 4), исследованные в [73]. Первый из них координирует два порфириновых центра, второй — четыре. Оказалось, что конформационные вариации функции $F(r)$ в этих сложных случаях описываются не теорией WLC для линейных систем, а гауссовой функцией, описывающей гибкость групп, содержащих нитроксильный фрагмент $>N-O\bullet$. Используя такое описание для $F(r)$, авторы [73] нашли, что для комплекса типа **4.3** расстояние между $>N-O\bullet$ группами составляет 4,3 нм при гауссовской ширине линии на полувысоте 0,46 нм. Те же данные для комплекса **4.4** найдены как 2,79 нм и 0,94 нм. Эти результаты подтверждены расчетами расстояний в комплексах **4.3** и **4.4** методом МД. Более сложная ситуация возникает в случае четырех нитроксильных меток $>N-O\bullet$ в комплексе **4.5**. Здесь геометрию комплекса определяют три расстояния — стороны и диагональ прямоугольника. Данные эксперимента и МД вычислений этих расстояний приведены в табл. 4. Экспериментально найденная диагональ прямоугольника (величина) 4,76 нм значительно меньше, чем следует из МД вычислений (5,08 нм) и прямоугольной структуры с измеренными сторонами. Это свидетельствует об образовании скрученной конформации комплекса **4.5** в растворе. Расчет по возможной в этом случае D_2 геометрии комплекса показывает возможность возникновения угла закручивания 44° .

Увеличить жесткость конструкций молекулярных элементов машин и механизмов — одна из задач молекулярного дизайна, решить которую можно путем синтеза супрамолекулярных агрегатов и исследования гибкости таких систем. В работе [75] методом PELDOR получены данные об изменении подвижности нитроксильного бирадикала А на основе 1,4-дизамещенного триазола при образовании супрамолекулярного комплекса кукурбит[6]урил[3]ротаксана В. Исследованы замороженные (77 К) водно-глицериновые растворы этих молекул, структура которых показана на рис. 19.

Основной результат этих исследований — замораживание конформационных движений молекулы А в результате образования супрамолекулярного комплекса В. Это следует из отсутствия модуляции спада сигнала PELDOR для А в отличие от В, где анализ достаточно глубокой модуляции позволил получить путем тихоновской регуляризации спектр расстояний с $r = 3,07$ нм и шириной 0,07 нм. Близкое по параметрам получено и распределение $F(r)$ методом МД. Предполагается, что для молекулы А существует набор разных конформаций, дающий широкое распределение по расстояниям, максимум которого сдвинут в область $r \geq 2,5$ нм. Это также подтверждается расчетами спектра расстояний методом МД. Авторы [75] считают, что применение метода PELDOR дает эффективный подход для экспериментальной оценки гибкости супрамолекул и, что особенно важно, эксперименты проводятся не в монокристаллах, а в замороженных растворах.

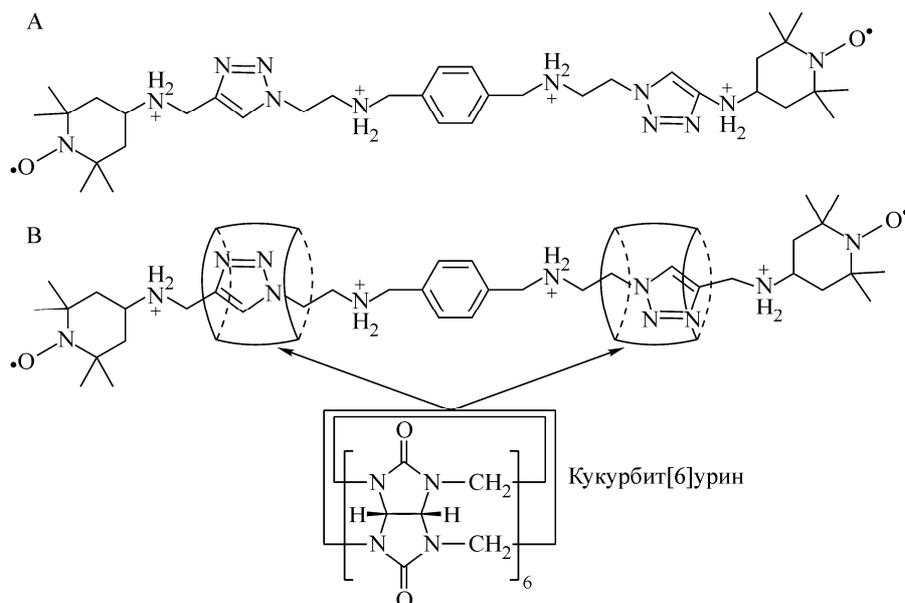


Рис. 19. Структуры бирадикала А и соответствующего ротахана В [75]

Примером широкого распределения по конформациям и взаимным пространственным ориентациям могут служить спин-меченые [2]катенаны, содержащие нитроксильные группы (4.6, см. табл. 4) [76]. Эти супрамолекулярные структуры представляют собой кольца, вдетые друг в друга. Кольца достаточно большие и построены из молекулярных групп, практически не взаимодействующих между собой. При введении нитроксидов проблема взаимной ориентации колец становится эквивалентной проблеме нахождения спектра расстояний между группами >NO•, которая может быть решена с помощью метода PELDOR.

В работе [76] проведен расчет модельной $F(r)$, учитывающей равновероятное взаимное расположение групп >NO• в модели цепочки из двух круговых колец с эффективным радиусом $r_{\text{эфф}}$. Затем расчетная функция $F(r)$ сопоставлена с PELDOR экспериментом для замороженных растворов [2]катенанов в трех растворителях — в хлороформе, в *o*-терфениле и в 2-метилтетрагидрофуране (измерения выполнены при 15 К). Авторы [76] обнаружили, что только для хлороформа экспериментальная функция $F(r)$ соответствует предложенной теоретической модели. Для других растворителей наблюдается либо агрегация [2]катенанов (в 2-метилтетрагидрофуране), либо существенное искажение геометрии кольца, которое, по-видимому, связано с нелинейной конформацией алкильной части макроцепи в *o*-терфениле. Оценки экспериментально найденных для растворов в хлороформе средних эффективных расстояний приведены в табл. 4. При этом ширина функции распределения достигает 4 нм. Расчетные значения $r_{\text{эфф}}$ близки к экспериментальным для хлороформа, т.е. для этого растворителя все относительные положения групп >NO• возможны, а значит кольца свободно перемещаются относительно друг друга. Принятая авторами простейшая модель достаточно хорошо описывает свойства молекул размером несколько нанометров и может быть полезной, по их мнению, и в других случаях для анализа больших супрамолекулярных систем.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В обзоре на примере нитроксильных радикалов мы рассмотрели новые возможности для структурных исследований, которые открываются в связи с теоретической и экспериментальной разработкой импульсного ЭПР — PELDOR. Это, прежде всего, точные измерения расстояний между парамагнитными центрами и, более того, определение спектра расстояний. Ширина и форма линий такого спектра содержат информацию о динамических свойствах нитроксидов, а эффекты ориентационной селективности — о пространственной геометрии радикальных пар.

Возможности PELDOR стимулировали развитие методов спиновых меток, в особенности методов направленного введения спиновых меток в биологически важные молекулы (SDSL). PELDOR в сочетании с SDSL стал стандартным методом измерений расстояний и подвижности биологических структур.

Близким по методической постановке и возможностям является оптический метод FRET (fluorescence resonance energy transfer) [77], с помощью которого исследуется передача возбуждения между введенными метками донора и акцептора. Отметим, что две флуоресцентные метки, которые вводятся для FRET измерений, отличаются по строению (а не одинаковые, как для PELDOR) и, как правило, достаточно объемные в сравнении со спиновыми нитрокильными метками. Эффективность FRET пропорциональна величине $1/[1 + (r/R_0)^6]$, где R_0 — радиус Ферстера, r — расстояние между метками [78]. Радиус Ферстера зависит от ряда таких параметров, как интеграл перекрывания спектров донора и акцептора, квантового выхода флуоресценции, ориентации электрических диполей. Это требует, в отличие от PELDOR, проведения дополнительных экспериментов или калибровок для определения расстояния между метками, что снижает точность определения этих расстояний. Главное преимущество FRET — его предельно высокая чувствительность. Как для многих современных оптических методов, с его помощью возможны измерения до единичных молекул, в том числе измерения быстропротекающих превращений в жидкостях. Предельная чувствительность PELDOR составляет около 10^{12} частиц в образце [11].

Таким образом, выбор того или иного метода исследования структуры и свойств нитроксидов и спин-меченых молекул определяется, прежде всего, постановкой задачи и возможностями эксперимента. В идеале сочетание PELDOR и FRET дают наиболее полную структурную и динамическую информацию. Такие работы уже появляются в литературе [79—82].

PELDOR, как и в целом импульсная ЭПР спектроскопия, постоянно совершенствуется и развивается. За последние годы, как показано в обзоре, расширился частотный диапазон метода, что позволило увеличить разрешение и чувствительность по сравнению со стандартным X диапазоном. Появилась работа, в которой используется новая пятиимпульсная методика PELDOR, позволяющая увеличить чувствительность и диапазон измеряемых расстояний до $r \sim 10$ нм и существенно сократить время измерений. Развиваются методы синтеза и физическая химия нитроксидов и спиновых меток на их основе. Эти работы, например, успешно ведутся в Новосибирском институте органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН в лаборатории И.А. Григорьева. Несомненно, есть все основания для новых успешных приложений метода PELDOR в структурной химии.

Автор благодарен А.Д. Милову и А.Г. Марьясову за постоянное сотрудничество в работах в области импульсной ЭПР спектроскопии, А.Д. Милову за прочтение этого обзора и ценные замечания. Автор признателен И.А. Григорьеву (зав. лабораторией азотистых соединений ИОХ СО РАН) за представленные для наших исследований нитроксиды и постоянное внимание к этим работам, а также О.В. Полукариковой за помощь при подготовке обзора.

Выражаю признательность издательствам American Chemical Society, American Institute of Physics, Taylor and Francis за разрешение опубликовать безвозмездно рисунки из работ, опубликованных в их научных журналах. Автор благодарен за финансовую поддержку Российскому фонду фундаментальных исследований (грант 11-03-0011а) и Отделению химии и наук о материалах РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бучаченко А.Л. Стабильные радикалы. — М.: Изд-во АН СССР, 1963.
2. Родионов В.А., Розанцев Э.Г. Долгоживущие радикалы. — М.: Наука, 1972.
3. Лебедев Я.С., Муромцев В.И. ЭПР и релаксация стабилизированных радикалов. — М.: Химия, 1972.
4. Бучаченко А.Л., Вассерман А.Н. Стабильные радикалы. — М.: Химия, 1973.
5. Пармон В.Н., Кокорин А.И., Жидомиров Г.М. Стабильные радикалы. — М.: Наука, 1980.
6. Вассерман А.М., Коварский А.Л. Спиновые метки и зонды в физикохимии полимеров. — М.: Наука, 1986.

7. Nitroxides—theory, experiment and applications. / Ed. A.I. Kokorin — Intech Publ., 2012.
8. Салихов Л.М., Семенов А.Г., Цветков Ю.Д. Электронное спиновое эхо и его применение. – Новосибирск: Наука, 1976.
9. Dikanov S.A., Tsvetkov Yu.D. Electron spin echo envelope modulation (ESEEM) spectroscopy. – Boca Raton: CRC Press, 1992.
10. Милов А.Д., Салихов К.М., Щиров М.Д. // Физика тв. тела. – 1981. – **23**. – С. 975.
11. Цветков Ю.Д., Гришин Ю.А. // Приборы и техника эксперимента. – 2009. – **5**. – С. 5 – 28.
12. Пономарев А.Б., Милов А.Д., Цветков Ю.Д. // Журн. структур. химии. – 1984. – **25**. – С. 51.
13. Reginson G.W., Schiemann O. // Biochem. J. – 2011. – **434**. – P. 353 – 363.
14. Цветков Ю.Д., Милов А.Д., Марьясов А.Г. // Успехи химии. – 2008. – **6**. – С. 515 – 551.
15. Milov A.D., Maryasov A.G., Tsvetkov Yu.D. // Appl. Magn. Res. – 1998. – **15**. – P. 107.
16. Maryasov A.G., Tsvetkov Yu.D. // Appl. Magn. Res. – 2000. – **18**. – P. 583.
17. Tikhonov A.N., Arsenin V.Y. Solutions of ill-posed problems. – New York: Wiley, 1977.
18. Bowman M.K., Maryasov A.G., Kim N. et al. // Appl. Magn. Res. – 2004. – **26**. – P. 23.
19. Jeschke G., Koch A., Jonas U. et al. // J. Magn. Res. – 2002. – **155**. – P. 72.
20. Milov A.D., Tsvetkov Yu.D., Formaggio F. et al. // J. Phys. Chem. B. – 2003. – **107**. – P. 13719.
21. Jeschke G., Panek G., Godt A. et al. // Appl. Magn. Res. – 2004. – **26**. – P. 223.
22. Chiang Y.-W., Borbat P.P., Freed J.H. // J. Magn. Res. – 2005. – **172**. – P. 279.
23. Milov A.D., Samoilova R.I., Tsvetkov Yu.D., Gusev V.A., Formaggio F., Crisma M., Toniolo C., Raap J. // Appl. Magn. Res. – 2002. – **23**. – P. 81.
24. Milov A.D., Maryasov A.G., Tsvetkov Yu.D., Raap J. // Chem. Phys. Lett. – 1999. – **303**. – P. 135.
25. Milov A.D., Tsvetkov Yu.D. // Appl. Magn. Res. – 2000. – **18**. – P. 217.
26. Pearson R.G., Buch T. // J. Chem. Phys. – 1962. – **36**. – P. 1277 – 1282.
27. Jones M.T. // J. Chem. Phys. – 1963. – **38**. – P. 2892 – 2895.
28. Debye P., Hückel E. // Physik. Zeitschr. – 1923. – **24**, N 9. – S. 185 – 206.
29. Kulik L.V., Grishin Yu.A., Dzuba S.A., Grigoryev I.A., Klyatskaya S.V., Vasilevsky S.F., Tsvetkov Yu.D. // J. Magn. Res. – 2002. – **157**. – P. 1.
30. Milov A.D., Naumov B.D., Tsvetkov Yu.D. // Appl. Magn. Res. – 2004. – **26**. – P. 587.
31. Larsen R.G., Singel D.J. // J. Chem. Phys. – 1993. – **98**. – P. 5134.
32. Pfannebecker V., Klos H., Hubrich M., Volkmer T., Heuer A., Wiesner U., Spiess H.W. // J. Phys. Chem. – 1996. – **100**. – P. 13428.
33. Pannier M., Veit S., Godt A., Jeschke G., Spiess H.W. // J. Magn. Res. – 2000. – **142**. – P. 331.
34. Weber A., Schiemann O., Bode B., Prisner T.F. // J. Magn. Res. – 2002. – **157**. – P. 277.
35. Milov A.D., Ponomarev A.B., Tsvetkov Yu.D. // Chem. Phys. Lett. – 1984. – **110**. – P. 67.
36. Jeschke G., Pannier M., Godt A., Spiess H.W. // Chem. Phys. Lett. – 2000. – **331**. – P. 243.
37. Jeschke G., Bender A., Paulsen H., Zimmermann H., Godt A. // J. Magn. Res. – 2004. – **169**. – P. 1.
38. Martin R.E., Pannier M., Diederich F., Gramlich V., Hubrich M., Spiess H. // *Angev. Chem., Int. Ed.* – 1998. – **37**. – P. 2834.
39. Jeschke G., Pannier M., Spiess H.W. // *In Biological Magnetic Resonance*. – **19**. – (Distance Measurements in Biological Systems by EPR). – (Ed. Berliner L.J., Eaton S.S., Eaton G.R.). – New York: Kluwer/Plenum, 2000.
40. Bode B.D., Margraf D., Plackmeyer J., Dürner G., Prisner T.F., Schiemann O. // J. Amer. Chem. Soc. – 2007. – **129**. – P. 6736.
41. Jeschke G., Sajid M., Schulte M., Godt A. // Phys. Chem. Chem. Phys. – 2009. – **11**. – P. 6580 – 6591.
42. Godt A., Franzen C., Veit S., Enkelmann V., Pannier M., Jeschke G. // J. Org. Chem. – 2000. – **65**. – P. 7575 – 7582.
43. Savitsky A., Dubinskii A, Flores M., Lubitz W., Möbius K. // J. Phys. Chem. B. – 2007. – **111**. – P. 6245.
44. Marko A., Margraf D., Yu H., Mu Y., Stock G., Prisner T. // J. Chem. Phys. – 2009. – **130**. – P. 064102.
45. Marko A., Margraf D., Cekan P., Sigurdsson S.T., Schiemann O., Prisner T.F. // Phys. Rev. E. – 2010. – **81**. – P. 021911.
46. Salnikov E.S., Erilov D.A., Milov A.D., Tsvetkov Yu.D., Peggion C., Formaggio F., Toniolo C., Raap J., Dzuba S.A. // Biophys. J. – 2006. – **91**. – P. 1532.
47. Jeschke G., Sajid M., Ramezani N., Volkov A., Zimmermann H., Godt A. // J. Amer. Chem. Soc. – 2010. – **132**. – P. 10107 – 10117.
48. Margraf D., Bode B.E., Marko A., Schiemann O., Prisner T.F. // Mol. Phys. – 2007. – **105**. – P. 2153 – 2160.
49. Schiemann O., Piton N., Mu Y., Stock G., Engels J.W., Prisner T.F. // J. Amer. Chem. Soc. – 2004. – **126**. – P. 5722 – 5729.

50. Godt A., Schulte M., Zimmermann H., Jeschke G. // *Angew. Chem. Int. Ed.* – 2006. – **45**. – P. 7560 – 7564.
51. Dockter C., Volkov A., Bauer C., Polyhach Y., Joly-Lopez Z., Jeschke G., Paulsen H. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* – 2009. – **106**. – P. 18485 – 18490.
52. Margraf D., Cekan P., Prisner T.F., Sigurdsson S.Th., Schiemann O. // *Phys. Chem. Chem. Phys.* – 2009. – **11**. – P. 6708 – 6714.
53. Schiemann O., Cekan P., Margraf D., Prisner T.F., Sigurdsson S.Th. // *Angew. Chem. Int. Ed.* – 2009. – **48**. – P. 3292 – 3595.
54. Jeschke G., Chechik V., Ionita P., Godt A., Zimmermann H., Bbanham J., Timmel C.R., Hilger D., Jung H. // *Appl. Magn. Res.* – 2006. – **30**. – P. 473 – 498.
55. Jeschke G., Koch A., Jones H., Godt A. // *J. Magn. Res.* – 2002. – **155**. – P. 72.
56. Godt A., Schulte M., Zimmermann H., Jeschke G. // *Angew. Chem. Int. Ed.* – 2006. – **45**. – P. 7560.
57. Sicoli G., Mathis G., Aci-Seche S., Saint-Pierre C., Boulard Y., Gasparutto D., Gambarelli S. // *Nucleic Acids Res.* – 2009. – **37**. – P. 3165.
58. Polyhach Y., Bordignon E., Tschaggelar R., Gandra S., Godt A., Jeschke G. // *Phys. Chem. Chem. Phys.* – 2012. – **14**. – P. 10762 – 10773.
59. Bode B.E., Plackmeyer J., Prisner T.F., Schiemann O. // *J. Phys. Chem. A.* – 2008. – **112**. – P. 5064.
60. Bode B.E., Plackmeyer J., Bolte M., Prisner T.F., Schiemann O. // *J. Organomet. Chem.* – 2009. – **694**. – P. 1172.
61. Narr E., Godt A., Jeschke G. // *Angew. Chem. Int. Ed.* – 2002. – **41**. – P. 3907.
62. Lueders P., Jeschke G., Yulikov M. // *J. Phys. Chem. Lett.* – 2011. – **2**. – P. 604 – 609.
63. Raitsimring A.M., Gunanathan C., Potapov A., Efremenko I., Martin J.M.L., Milstein D., Goldfarb D. // *J. Amer. Chem. Soc.* – 2007. – **129**. – P. 14138 – 14139.
64. Potapov A., Song Y., Meade T.J., Goldfarb D., Astashkin A.V., Raitsimring A.M. // *J. Magn. Res.* – 2010. – **205**. – P. 38 – 49.
65. Potapov A., Yagi H., Huber T., Jergic S., Dixon N.E., Otting G., Goldfarb D. // *J. Amer. Chem. Soc.* – 2010. – **132**. – P. 9040 – 9048.
66. Savitsky A., Dubinskii A.A., Zimmermann H., Lubitz W., Möbius K. // *J. Phys. Chem. B.* – 2011. – **115**. – P. 11793 – 11804.
67. Polyhach Ye., Godt A., Bauer C., Jeschke G. // *J. Magn. Res.* – 2007. – **185**. – P. 118.
68. Reginson G.W., Hunter R.I., Cruickshank P.A.S., Bolton D.R., Sigurdsson S.Th., Smith G.M., Schiemann O. // *J. Magn. Res.* – 2012. – **216**. – P. 175 – 178.
69. Jeschke G., Sajid M., Schulte M., Godt A. // *J. Amer. Chem. Soc.* – 2010. – **132**. – P. 10107 – 10117.
70. Pornsuwan S., Bird G., Schafmeister C.E., Saxena S. // *J. Amer. Chem. Soc.* – 2006. – **128**. – P. 3876.
71. Bird G.H., Pornsuwan S., Saxena S., Schafmeister C.E. // *ACS NANO*. – 2008. – **2**. – P. 1857.
72. Pornsuwan S., Schafmeister C., Saxena S. // *J. Phys. Chem.* – 2008. – **112**. – P. 1377 – 1384.
73. Lovett J.E., Hoffmann M., Cnossen A., Shutter A., Hogben H., Warren J., Pascu S., Kay C., Timmel C., Anderson H. // *J. Amer. Chem. Soc.* – 2009. – **131**. – P. 13852 – 13859.
74. Wilhelm J., Frey E. // *Phys. Rev. Lett.* – 1996. – **77**. – P. 2581 – 2584.
75. Pievo P., Casati C., Franchi P., Mezzina E., Benneti M., Lucarini M. // *Chem. Phys. Chem.* – 2012. – **13**. – P. 2659 – 2661.
76. Jeschke G., Godt A. // *Chem. Phys. Chem.* – 2003. – **4**. – P. 1328.
77. Lacowicz J.R., *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 2nd Ed. Kluwer Academic/Plenum Publishers, 1999.
78. Förster T. // *Ann. Phys.* – 1948. – **437**. – P. 55.
79. Grohmann D., Klose D., Klare J.P., Kay C.W.M., Steinhoff H.-J., Werner F. // *J. Amer. Chem. Soc.* – 2010. – **132**. – P. 5954 – 5955.
80. Sarver J.L., Townsend J.E., Rajapakse G., Jen-Jacobson L., Saxena S. // *J. Phys. Chem. B.* – 2012. – **116**. – P. 4024 – 4033.
81. Ward R., Bowman A., El-Mkami H., Owen-Hughes T., Norman D.G. // *J. Amer. Chem. Soc.* – 2009. – **131**. – P. 1348 – 1349.
82. Borbat P.P., Georgieva E.R., Freed J.H. // *Phys. Chem. Lett.* – 2013 (в печати).