

УДК 541.1+541.6.67

## ТЕХНИКА Э.П.Р.-СПЕКТРОСКОПИИ ИМПУЛЬСНОГО ДВОЙНОГО ЭЛЕКТРОН-ЭЛЕКТРОННОГО РЕЗОНАНСА (PELDOR) (обзор)

© 2009 г. Ю. Д. Цветков, Ю. А. Гришин

*Институт химической кинетики и горения СО РАН  
Россия, 630090, Новосибирск, ул. Институтская, 3  
Факс (383)330-7350*

*E-mail: tsvetkov@kinetics.nsc.ru*

Поступила в редакцию 25.02.2009 г.

После доработки 27.04.2009 г.

Дан обзор техники и рассмотрены вопросы методики э.п.р.-спектроскопии импульсного двойного электрон-электронного резонанса (PELDOR – Pulsed Electron Double Resonance). Приведены основные теоретические результаты, демонстрирующие возможности метода при исследовании парамагнитных частиц. Показано, что в хаотически ориентированных системах можно определять расстояния между парамагнитными частицами в парах и в супрамолекулярных ансамблях в нанометровом (1.5–8 нм) диапазоне расстояний. Помимо расстояния, из анализа кинетики спада сигнала PELDOR можно определять также функцию распределения по расстояниям, взаимную ориентацию частиц, число парамагнитных частиц при образовании агрегатов. Приведена общая блок-схема спектрометра PELDOR, дано описание спектрометров сантиметрового и миллиметрового диапазонов длин волн, имеющихся в зарубежных и отечественных лабораториях. Обсуждаются вопросы чувствительности и разрешающей способности PELDOR, определен диапазон расстояний, который доступен для измерений с помощью этого метода, рассмотрены способы и методы определения экспериментальных параметров, необходимых для интерпретации кинетики спада сигнала PELDOR и определения структурных параметров исследуемой системы парамагнитных центров. Описан метод PELDOR со скачком магнитного поля. Метод PELDOR, его преимущества и недостатки, рассмотрен в сравнении с другими методами определения расстояний.

PACS: 73.30.-v, 76.70.Dx

### ВВЕДЕНИЕ

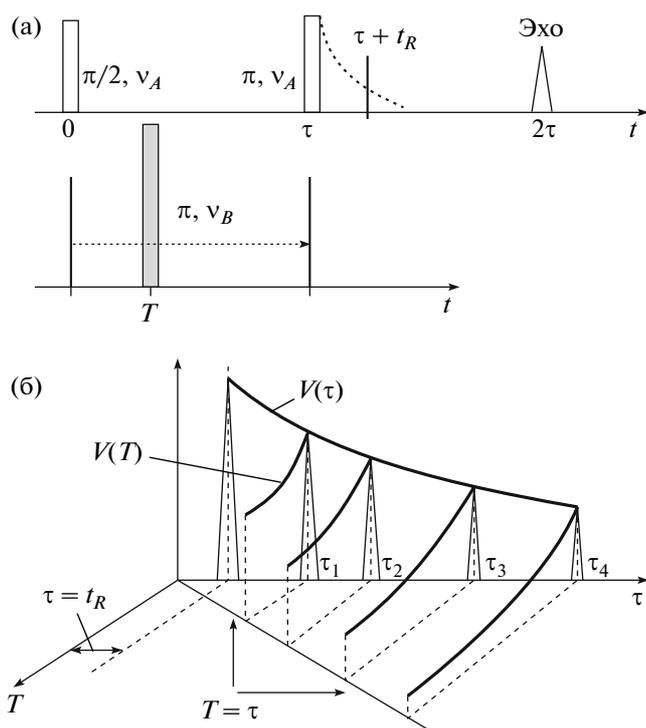
Величина магнитных дипольных взаимодействий между парамагнитными частицами содержит важную структурную информацию. Для исследований этих взаимодействий широко используется метод электронного парамагнитного резонанса (э.п.р.). В твердых телах с хаотически ориентированными парамагнитными центрами (радикалы, спиновые метки) при исследовании дипольных взаимодействий стационарным методом э.п.р. можно определять расстояния меньше 1–2 нм, поскольку дипольное уширение линий при больших расстояниях маскируется другими вкладами в ширину линий, такими как анизотропия  $g$ -фактора, сверхтонкое и квадрупольное взаимодействия. Заметим, что здесь и далее термин “расстояние” используется для обозначения расстояния между точечными диполями без учета пространственной делокализации электронов, что оправдано в большинстве случаев для расстояний  $>1-1.5$  нм.

Существенный прогресс достигнут при разработке и применении импульсных методов э.п.р.,

снижающих неоднородное уширение, например метода электронного спинового эха (э.с.э.). Этот метод и его многочисленные модификации получили широкое распространение в физико-химических и биофизических приложениях [1–4].

Отметим, однако, что при исследованиях с помощью э.с.э. также возникает ряд ограничений. Минимальная измеряемая величина расстояния между частицами в этом методе составляет ~3 нм и определяется мертвым временем спектрометра э.с.э. ( $\geq 100$  нс) [1]. Если парамагнитная частица имеет в ближайшем окружении магнитные ядра, то спад сигнала э.с.э., из анализа которого определяется дипольное уширение, будет модулирован на частотах анизотропного сверхтонкого взаимодействия с этими ядрами (эффекты модуляции в э.с.э. – так называемые эффекты ESEEM) [5]. Модуляция осложняет анализ кинетики спада: возникает неоднозначность при выделении параметров (частот) дипольного взаимодействия.

Трудности удалось обойти, когда в ИХКГ СО РАН, Новосибирск, для исследования магнитных спин-спиновых дипольных взаимодействий был предложен двухчастотный импульсный вариант



**Рис. 1.** а – импульсная последовательность трехимпульсного метода PELDOR: два импульса на частоте  $\nu_A$  в моменты времени  $t$ , равном 0 и  $\tau$ , формируют сигнал спинового эха при  $t = 2\tau$ , импульс накачки на частоте  $\nu_B$  при  $t = T$  создает расфазировку спинов  $A$ , что уменьшает сигнал эха; штриховая линия – спад сигнала звона резонатора после второго импульса;  $t_R$  – мертвое время, ограничивающее возможность регистрации сигнала эха при малых временах  $\tau$ ; б – спады сигналов спинового эха  $V(\tau)$  и PELDOR  $V(T)$ ; спады  $V(T)$  показаны для разных фиксированных значений времени  $\tau$ .

э.с.э. – метод импульсного двойного электрон-электронного резонанса [6, 7]. Метод получил сокращенное название PELDOR, что соответствует принятому в литературе сокращению ELDOR (Electron Double Resonance) для двухчастотного стационарного метода э.п.р. Некоторые исследователи предпочитают сокращение DEER (Double Electron Electron Resonance). В этом случае, однако, возникают трудности, например, при компьютерном поиске информации.

Метод PELDOR нашел широкое применение для решения структурных задач, в особенности при измерении расстояний в парах свободных радикалов и спиновых меток. Новым направлением структурных приложений становится метод PELDOR на высоких частотах, позволяющий получить данные о взаимной ориентации спиновых меток в паре [8]. Судя по программам многих конференций, популярность этого метода у физико-химиков и биофизиков постоянно возрастает в связи с разработкой новых химических методов введения спиновых меток в биологические системы.

Настоящий обзор посвящен технике PELDOR и некоторым методическим вопросам, связанным с применением этого метода. Изложены основы теории метода, описаны общие для спектрометров PELDOR блок-схемы и некоторые конкретные спектрометры, рассмотрены характеристики и элементы PELDOR-спектроскопии, наиболее важные для проведения экспериментов. Проведено сопоставление метода PELDOR с другими методами определения расстояний в атомно-молекулярных системах.

## ОСНОВЫ МЕТОДА

Импульсная последовательность PELDOR в трехимпульсном варианте показана на рис. 1а. Два с.в.ч.-импульса, соответствующие углам поворота  $\theta_1 = \pi/2$  и  $\theta_2 = \pi$  вектора намагниченности  $\mathbf{M}$ , формируют сигнал эха от образца, содержащего парамагнитные частицы и находящегося в постоянном магнитном поле  $H_0$  при резонансных условиях  $\nu = \gamma H_0$ . Угол поворота  $\theta$  определяется длительностью импульса  $t_p$  и его амплитудой  $H_1$ :

$$\theta = \gamma H_1 t_p. \quad (1)$$

При PELDOR-экспериментах в неоднородно уширенном спектре э.п.р., который описывается функцией формы линии  $g(\nu)$ , выделяют спины двух типов –  $A$  и  $B$  с частотами  $\nu_A$  и  $\nu_B$ , расположенными в разных частях спектра. В обычной э.с.э.-спектроскопии только спины  $A$ , прецессирующие в плоскости  $XY$  (ось  $Z$  параллельна  $H_0$ ), формируют сигнал эха под действием  $\pi/2$ - и  $\pi$ -импульсов.

В двухчастотном методе на  $B$ -спины дополнительно воздействуют и  $\pi$ -импульсами накачки на частоте  $\nu_B$ . Импульсы накачки  $B$  находятся при  $t = T$  во временном интервале  $0 - \tau$  между первым и вторым импульсами на частоте  $\nu_A$  (рис. 1а). Действующий на спины  $B$  импульс меняет их ориентацию и тем самым изменяет локальное магнитное поле на спинах  $A$ . Величина этого изменения определяется магнитным дипольным взаимодействием спинов  $A$  и  $B$ , пропорциональным величине  $r^{-3}$ , где  $r$  – расстояние между спинами  $A$  и  $B$ .

В результате возникает дополнительная расфазировка при прецессии вектора намагниченности в плоскости  $XY$ , что приводит к изменению амплитуды сигнала эха  $V(\tau)$  по сравнению с амплитудой этого сигнала в отсутствие импульсной накачки (рис. 1б). Эффект, регистрируемый в виде спада сигнала эха  $V(T)$ , определяется дипольным взаимодействием спинов  $A$  и  $B$ . Интервал  $\tau$  в экспериментах PELDOR фиксируется ( $\tau = \tau_0$ ), но может и быть выбран разным. В зависимости от него может измениться начальная амплитуда сигнала (рис. 1б).

Трехимпульсный метод PELDOR позволяет исследовать кинетику спада амплитуды сигнала

э.с.э., нормированную на начальную амплитуду сигнала в отсутствие накачки  $V(T) = V(T, \tau_0)/V(\tau_0)$ , как функцию временного интервала  $T$  (рис. 1б). Поскольку интервал  $\tau$  между  $\pi/2$ - и  $\pi$ -импульсами фиксирован, то удается исключить из кинетики спада сигнала эха маскирующее влияние динамических и релаксационных процессов, присущих кинетике  $V(\tau)$  в обычном двухимпульсном э.с.э., и получить изменение сигнала эха исключительно за счет дипольных взаимодействий.

Следует подчеркнуть, что PELDOR, в отличие от обычного метода э.с.э., не имеет мертвого времени (например, за счет “звона” резонатора, см. ниже), и минимальное значение  $T$  определяется только длительностью импульса накачки. Отметим, что в спектроскопии ядерного магнитного резонанса (я.м.р.) используется аналогичный метод изучения дипольных взаимодействий ядер [9, 10].

Предложен и достаточно широко применяется в настоящее время также PELDOR с тремя возбуждающими импульсами на частоте  $\nu_A$  [11]. В этом случае (четырёхимпульсный метод PELDOR) два первых импульса формируют сигнал эха, а дополнительный третий – рефокусирует намагниченность. Импульс накачки приложен между вторым и третьим импульсами на частоте  $\nu_A$ . Измеряется зависимость амплитуды рефокусированного эха  $V(T)$  от положения импульса накачки. Как и в трехимпульсном варианте PELDOR, информация о дипольном взаимодействии содержится в кинетике спада  $V(T)$ . Этот вариант метода PELDOR также обладает нулевым мертвым временем.

Приведем некоторые положения теории PELDOR, иллюстрирующие возможности метода, важные при решении методических вопросов.

Поскольку существующие спектрометры PELDOR позволяют достаточно эффективно исследовать только удаленные пары спинов с расстоянием между частицами  $\geq 1-1.5$  нм (см. ниже), при теоретическом анализе (анализ ведется в высокотемпературном приближении,  $kT > h\nu$ ) обычно предполагается, что величина магнитного дипольного взаимодействия между спинами  $A$  и  $B$  существенно меньше, чем разность частот импульсов  $\Delta\nu_{AB}$ . Это взаимодействие также мало по сравнению с амплитудой с.в.ч.-импульсов, поэтому последние в случае пары спинов возбуждают обе компоненты дипольного дублета в равной степени, а в случае множества частиц – дипольный контур линии полностью. Амплитуда и длительность с.в.ч.-импульсов такова, что влиянием возбуждающих эхо импульсов на спины  $B$  и импульса накачки на спины  $A$  можно пренебречь. Использование перечисленных предположений оправдано при теоретическом анализе в большинстве случаев применения метода PELDOR. Некоторые ситуации, когда указанные приближения не выполняются, рассмотрены в [12, 13].

Предполагается также, что в исследуемой спиновой системе спин-решеточной и фазовой релаксацией спинов парамагнитных центров можно пренебречь, и сигнал PELDOR для пространственно ориентированных пар, например для пар с фиксированной ориентацией в монокристалле, можно представить как [6–8]

$$V(T) = V(0)[1 - p_b(1 - \cos(DT))]. \quad (2)$$

Здесь  $p_b$  – вероятность изменения ориентации спина  $B$  под действием импульса накачки или степень возбуждения спектра на частоте  $\nu_B$ ;  $V(0)$  – сигнал эха в отсутствие накачки ( $T = 0$ );  $D$  – константа взаимодействия спинов  $A$  со спинами  $B$ , включая в общем случае дипольное и обменное взаимодействия:

$$D = \omega_D(1 - 3\cos^2\theta) + J; \quad \omega_D = 2\pi\nu_D = \frac{\gamma^2\hbar}{r_{AB}^3}, \quad (3)$$

где  $\gamma$  – гиромагнитное отношение для электронного спина;  $\hbar$  – константа Планка;  $r_{AB}$  – расстояние между спинами  $A$  и  $B$ ;  $\theta$  – угол между направлением внешнего магнитного поля и вектором  $\mathbf{r}$ ;  $J$  – обменный интеграл.

Соотношения (2) и (3) содержат информацию, необходимую для анализа данных PELDOR в простейших ориентированных системах, как, например, пары парамагнитных центров в монокристаллах. Кинетику спада сигнала  $V(T)$  для хаотически ориентированных систем (поликристаллов, аморфных сред, стекол, полимеров) можно получить соответствующим усреднением уравнения (2).

Если расстояние в парах фиксировано,  $r = \text{const}$ , то функцию, описывающую кинетику спада сигнала PELDOR, можно найти, проведя усреднение (2) только по углу  $\theta$ . Получаются следующие соотношения [7, 8]:

$$V(T) = V(0)[1 - p_b(1 - \Phi(T))],$$

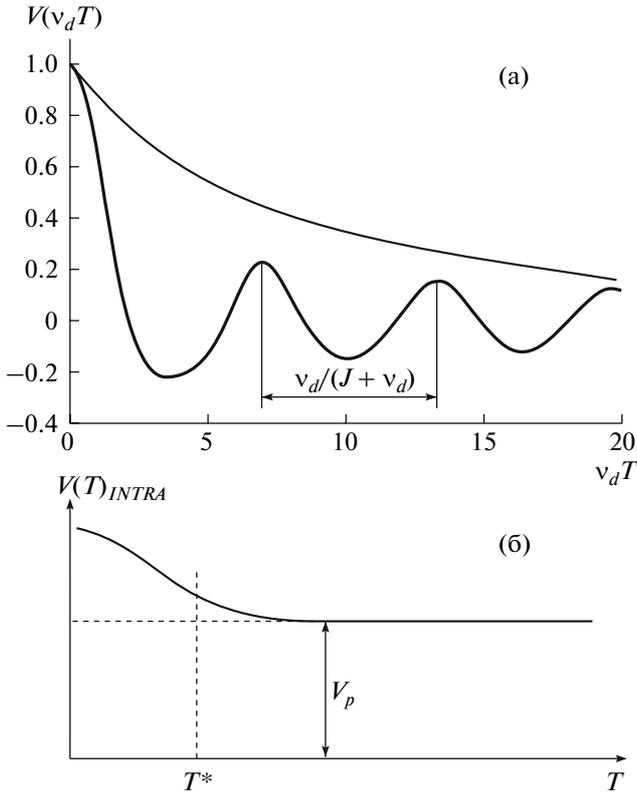
$$\Phi(T) = \left[ \frac{\pi(c^2 + s^2)}{6\omega_D T} \right]^{1/2} \cos[(\omega_D + J)T - \arctg(s/c)], \quad (4)$$

где  $c$  и  $s$  – интегралы Френеля:

$$c = \int_0^v \cos\left(\frac{\pi}{2}x^2\right)dx, \quad s = \int_0^v \sin\left(\frac{\pi}{2}x^2\right)dx, \quad v = \left(\frac{6\omega_D T}{\pi}\right)^{1/2}.$$

Соотношения (4) показывают, что в спаде сигнала PELDOR за счет дипольного и обменного взаимодействий в хаотически ориентированных парах возникают осцилляции на частоте  $\omega_D + J$  как при  $J > 0$ , так и при  $J < 0$  (рис. 2а). Более сложные осцилляции спада сигнала будут наблюдаться для пар с  $J < 0$  [8]. В любом случае фурье-анализ позволяет получить сведения о расстоянии  $r$  и об обменном интеграле  $J$  из спада  $V(T)$ .

Для хаотически распределенных в трехмерном пространстве парамагнитных центров ( $r \neq \text{const}$ )



**Рис. 2.** Кинетика спада сигнала PELDOR (а) для хаотически распределенных спинов и пар спинов с фиксированным расстоянием в паре ( $J > 0$ ); а также сигнала PELDOR  $V_{INTRA}$  (б) для групп с числом  $N$  спинов в группе.

усреднение (4) по  $\theta$  и  $r$  дает экспоненциальный спад  $V(T)$  в виде [8]

$$V(T) = V(0) \exp[-2p_b \Delta\omega_{1/2} T] = V(0) \exp[-\alpha T^{A/3}], \quad (5)$$

где  $\Delta\omega_{1/2} = 8.2 \cdot 10^{13} \text{C cm}^3 \cdot \text{c}^{-1}$  – дипольная ширина линии,  $C$  – концентрация парамагнитных центров (рис. 2а). Величины  $\alpha$  и  $A$  в общем случае зависят от размерности пространства, например:  $A = 3$  для трехмерного пространства,  $A = 2$  для плоскости,  $A = 1$  для линии [8]. Возможен расчет  $\alpha$  и  $A$  и для более сложных случаев пространственного распределения парамагнитных центров. Сопоставление экспериментально найденных величин  $\alpha$  и  $A$  с расчетом открывает возможность для исследования особенностей пространственного распределения методом PELDOR [8, 14].

В сложных реальных системах, содержащих группы спинов (кластеры, агрегаты), существуют дипольные взаимодействия двух типов: между парамагнитными центрами внутри такого элемента и между центрами различных групп. Если эти взаимодействия считать независимыми и кинетику спада сигнала PELDOR за счет этих вкладов обозначить как  $V(T)_{INTRA}$  и  $V(T)_{INTER}$ , то полная функ-

ция, описывающая спад сигнала  $V(T)$ , может быть представлена как [8]

$$V(T) = V(T)_{INTRA} V(T)_{INTER}. \quad (6)$$

Это дает возможность разделения дипольных вкладов в сложных системах. Часто расстояния между частицами в группе значительно меньше, чем между группами, как, например, в радикальных парах, образующихся при фотолизе или радиоллизе твердых тел. Тогда анализ спада сигнала PELDOR позволяет оценить геометрические параметры таких групп и число парамагнитных центров в группе [8].

Так, если исследуемая система состоит из одинаковых групп, содержащих по  $N$  частиц в группе, то спад сигнала PELDOR (3) за счет дипольных взаимодействий внутри группы можно представить как

$$V(T)_{INTRA} = V(0) [1 - p_b \langle 1 - \cos(DT) \rangle_{r, \theta}]^{N-1}, \quad (7)$$

где  $\langle \dots \rangle_{r, \theta}$  означает усреднение по углу и расстояниям между спинами в группе.

Усреднение (7) дает быстрый спад  $V(T)_{INTRA}$  на малых временах  $T \leq T^*$ , соответствующих дипольному взаимодействию спинов с эффективным расстоянием  $r_{eff}$  между ними в группе,  $T^* = r_{eff}^3 / \gamma^2 \hbar$  (рис. 2б). Функция  $V(T)_{INTRA}$  в (7) стремится к своему предельному значению  $V_p$  при  $T \geq T^*$ , когда можно считать, что  $\langle \cos(DT) \rangle = 0$ . Выражение для предельного значения  $V_p$  имеет вид

$$V_p = (1 - p_b)^{N-1} \cong 1 - (N - 1)p_b. \quad (8)$$

Из соотношения (8) следует, что если из эксперимента известны  $V_p$  и  $p_b$ , то возможна оценка числа  $N$  спинов в группе (рис. 2б) [8].

Для получения функции распределения по расстояниям между спиновыми метками в группах используется спад  $V_{INTRA}(T)$ . Функцию распределения спиновых меток по расстояниям обозначим как  $F(r) = dn(r)/dr$ , где  $dn(r)$  есть доля пар спиновых меток в агрегате с расстоянием между метками в паре в диапазоне от  $r$  до  $r + dr$ . Соотношение для нормированного сигнала PELDOR после усреднения по  $\theta$  ( $J = 0$ ) в (7) имеет вид

$$V(T) = 1 - (N - 1)p_b (1 - \langle f(r, T) \rangle_r), \quad (9)$$

где  $\langle f(r, T) \rangle_r$  – усредненное по расстоянию соотношение

$$f(r, T) = \left\langle \cos \left[ \frac{\gamma^2 \hbar}{r^3} (1 - 3 \cos^2(\theta)) T \right] \right\rangle_{\theta}. \quad (10)$$

В случае непрерывного распределения по расстояниям между метками в группах кинетику спада (9) можно представить в виде

$$V(T) = V_p + (1 - V_p)p_b \int_{r_1}^{r_2} F(r) f(r, T) dr, \quad (11)$$

где  $V_p = 1 - (N - 1)p_b$ .

Расчет  $F(r)$  сводится, по существу, к решению обратной задачи методами регуляризации Тихонова [15]. При этом необходимо иметь в виду, что сохраняются свойства неустойчивости решения обратной задачи. Способы расчета функции распределения по расстояниям в радикальных парах по данным PELDOR разработаны сравнительно недавно [16–20] и сразу стали активно применяться на практике. В качестве примера приведем функцию  $F(r)$  для нитроксильных бирадикалов в замороженном растворе толуола, когда анализ обнаруживает две конформации этого бирадикала с расстояниями 1.62 и 1.7 нм и  $J = 1.4 \pm 0.5$  МГц [21] (рис. 3).

Импульсы  $A$  и  $B$  действуют селективно в разных узких интервалах частот спектра э.п.р. Если анизотропия магнитно-резонансных параметров парамагнитных центров достаточно велика (например, пары нитроксильных радикалов или спиновые метки), то возникает ориентационная селективность воздействия с.в.ч.-импульсов на спиновую систему.

Селективность заключается в том, что по-разному ориентированные в пространстве радикалы в разной степени возбуждаются импульсами, формирующими сигнал спинового эха, и импульсом накачки. Когда радикалы пары имеют вполне определенную ориентацию по отношению друг к другу, то между параметрами  $V(0)$ ,  $p_b$  и  $D$  в уравнении (2) будет существовать корреляция, которую можно корректно учесть [8].

Теоретический анализ и эксперимент показали, что если проводить измерения, меняя положение импульсов  $A$  и  $B$  по частоте в спектре, то можно из спадов сигнала PELDOR получить сведения о взаимной ориентации радикалов в паре [22, 23].

Обычно исследования методом PELDOR ведутся в условиях, соответствующих высокотемпературному приближению,  $kT > \hbar\nu$ . Возможно проведение PELDOR-экспериментов и при достаточно низких температурах на высоких частотах ( $kT < \hbar\nu$ ). Влияние Больцмановской поляризации спинов при низких температурах на спиновую динамику пар парамагнитных центров, связанных слабым диполь-дипольным взаимодействием, рассмотрено в [24, 25].

Если спин-решеточной релаксацией можно пренебречь, то влияние поляризации спинов при низких температурах, сравнимых с зеемановским квантом (но гораздо больших, чем энергия дипольного взаимодействия), сводится к увеличению амплитуды сигнала спинового эха пропорционально поляризации спинов и появлению противофазной компоненты сигнала эха. В неупорядоченных системах эта компонента усредняется из-за изменения знака  $D$  для пар, различно ориентированных по отношению к лабораторной

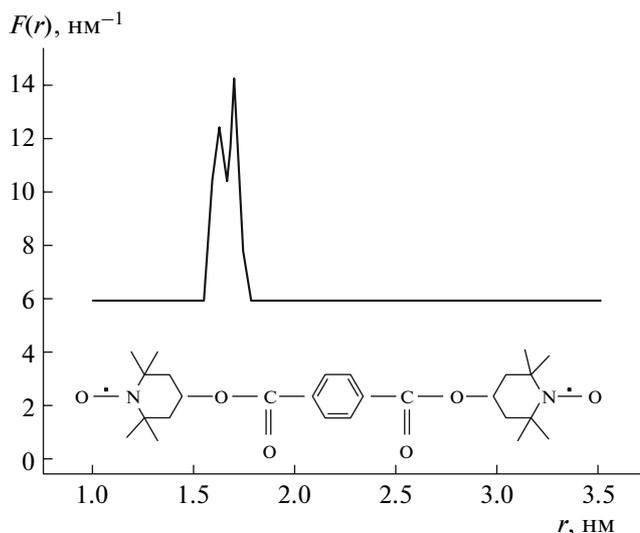


Рис. 3. Функция распределения расстояний в паре  $F(r)$  для бирадикала, структура которого приведена на рисунке (раствор в толуоле при 77 К).

системе координат. Таким образом, при понижении температуры до значений порядка электронной зеемановской энергии можно пользоваться результатами “высокотемпературной” теории расчета сигналов PELDOR. Ситуация, однако, серьезным образом меняется при понижении температуры до величины, сравнимой с диполь-дипольным взаимодействием. Особенности расчетов дипольного уширения линий э.п.р. в этом случае рассмотрены в работах [26, 27].

Используя изложенные выше результаты теоретического анализа, можно сформулировать следующую последовательность обработки экспериментальных данных PELDOR:

- 1) из экспериментально зарегистрированной кинетики спада сигнала  $V(T)$  выделяют сомножители  $V(T)_{INTER}$  и  $V(T)_{INTRA}$ ;
- 2) исходя из закономерностей  $V(T)_{INTER}$  делают заключение об особенностях пространственного распределения парамагнитных частиц;
- 3) исходя из кинетики  $V(T)_{INTRA}$  идентифицируют группы спинов, определяют число частиц в них или особенности статистики частиц в группах, оценивают расстояние из фурье-анализа  $V(T)_{INTRA}$ , рассчитывают функцию распределения по расстояниям  $F(r)$ , определяют взаимную ориентацию спинов.

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

Наименование и длины волн в гигагерцовом диапазоне частот

Диапазон	Частота, ГГц	Длина волны, см
<i>L</i>	1–2	15–30
<i>S</i>	2–4	7.5–15
<i>C</i>	4–8	3.75–7.5
<i>X</i>	8–12	2.5–3.75
<i>Ku</i>	12–18	1.67–2.5
<i>K</i>	18–27	1.11–1.67
<i>Q</i>	33–50	0.6–0.9
<i>Ka</i>	27–40	0.75–1.11
<i>mm</i>	40–300	1–7.5 мм
<i>V</i>	40–75	4.0–7.5 мм
<i>W</i>	75–110	2.7–4.0 мм

#### ОБЩАЯ БЛОК-СХЕМА СПЕКТРОМЕТРА PELDOR

Эффект PELDOR детектируется по кинетике спада сигнала э.с.э. после воздействия на спиновую систему импульсами накачки. Для этого необходим спектрометр э.с.э., формирующий сиг-

нал эха, и дополнительное оборудование для создания импульсов накачки и наблюдения за эффектами PELDOR. В литературе описано большое число конкретных спектрометров э.с.э., работающих в широком диапазоне частот, от 3–4 до 600 ГГц, и имеющих свои особенности [1, 28–36]. В таблице приведены принятые в литературе обозначения и соответствующие диапазоны частот радиочастотного спектра. Описание отдельных элементов техники э.п.р.-спектроскопии можно найти в работах [37–39].

В спектрометрах в зависимости от диапазона частот применяются различные источники радиоволн и разная волноводная техника. Общая блок-схема спектрометра э.с.э. X-диапазона (рис. 4) содержит источник с.в.ч.-мощности – обычно твердотельный генератор (с диапазоном частот в несколько единиц гигагерц с последующим умножением частоты) или диод Ганна и в качестве усилителя – лампу бегущей волны (л.б.в.), которая на выходе обеспечивает импульсную мощность ~1–3 кВт.

Импульсы с.в.ч. длительностью от 3–5 нс до нескольких микросекунд через циркулятор и аттенюатор подаются в резонатор *I* с исследуемым парамагнитным образцом. Резонатор располо-

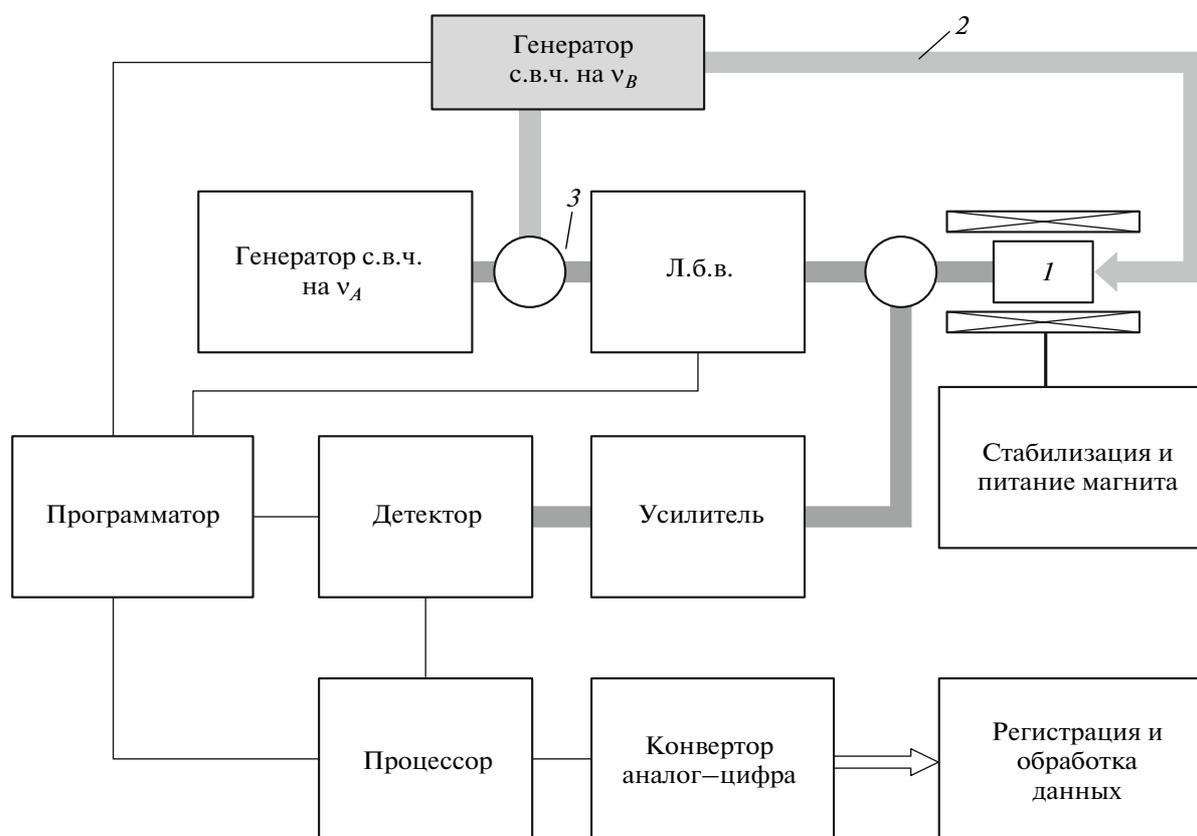


Рис. 4. Общая блок-диаграмма э.с.э. PELDOR-спектрометра. *I* – резонатор; *2* – волновод для импульсов накачки; *3* – волноводный тройник.

жен в электромагните, питаемом от управляемого стабилизированного источника тока. Сигнал э.с.э. из резонатора спектрометра через циркулятор поступает на вход усилителя и, далее, на фазочувствительный детектор. После детектора сигнал поступает в аналоговый процессор, где, как правило, осуществляется накопление сигнала для повышения отношения сигнал/шум, вычитание “нулевой линии” и другая первичная обработка. Далее сигнал э.с.э. поступает в быстродействующий аналого-цифровой преобразователь и уже в цифровой форме – на компьютер для регистрации и дальнейшей обработки.

Приемник сигнала э.с.э. должен регистрировать очень слабые, сравнимые с уровнем тепловых шумов сигналы эха сразу после воздействия на вход этого приемника мощных импульсов некомпенсированного отраженного с.в.ч.-сигнала, т.е. должен иметь короткое время восстановления от перегрузки.

Возбуждающие сигнал эха с.в.ч.-импульсы и изменяемый временной интервал  $\tau$  между ними ( $\pi/2 - \tau - \pi$ ) формируются многофункциональным программатором. Программатор управляет усилителем на л.б.в. и с.в.ч.-ключами, что позволяет создать импульсную последовательность, управлять длительностью импульсов, интервалом между ними, частотой повторения серии импульсов. Он используется также для управления блоком обработки и регистрации сигналов эха.

Спектрометр спинового эха позволяет детектировать и регистрировать сигнал э.с.э. на частоте  $\nu_A$ . В PELDOR-экспериментах необходимо дополнительно воздействовать на образец  $\pi$ -импульсом накачки на частоте  $\nu_B$ , действующим в момент времени  $T$  во временном интервале между  $\pi/2$ - и  $\pi$ -импульсом на частоте  $\nu_A$  (рис. 1а). Это осуществляется с помощью дополнительного источника с.в.ч.-мощности на частоте  $\nu_B$ .

Существует два способа введения импульсов на частоте  $\nu_B$  в резонатор. Если мощность источника импульсов  $\nu_B$  достаточно велика, например, когда в качестве источника используется магнетрон или л.б.в., то импульсы на частоте  $\nu_B$  могут поступать прямо в резонатор через дополнительный волновод накачки 2.

Во втором способе используется импульсный источник малой мощности. Импульсы  $\nu_B$  поступают на л.б.в. основного спектрометра э.с.э. через тройник 3, усиливаются вместе с импульсами  $\nu_A$  и, далее, поступают в резонатор. В этом случае можно применять только мономодальный резонатор, в то время как первый вариант допускает использование как мономодального, так и бимодального резонатора.

Время задержки  $T$  и длительность импульса накачки контролируются программатором. Такая комбинация из спектрометра э.с.э. и дополни-

тельного блока импульсов накачки и образует установку (спектрометр) PELDOR.

## СПЕКТРОМЕТРЫ PELDOR

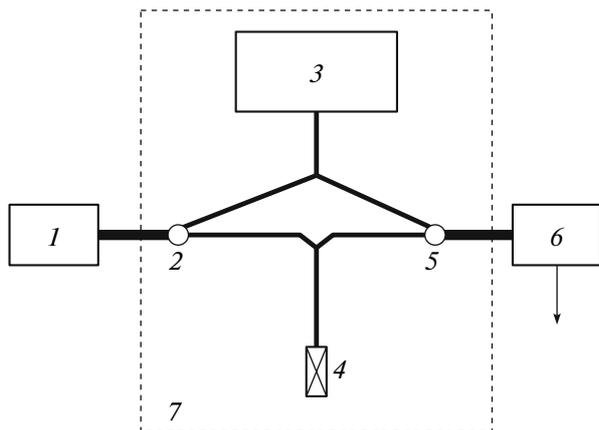
В настоящее время наибольшее распространение получили спектрометры PELDOR, работающие в  $X$ -диапазоне. Рассмотрим более детально конструкцию спектрометра этого диапазона, построенного на основе когерентного импульсного э.п.р.-спектрометра [40] (рис. 4), успешно работающего в течение многих лет в ИХКГ СО РАН, Новосибирск.

Важной характеристикой этого спектрометра является возможность получения с.в.ч.-импульсов мощностью до нескольких киловатт и длительностью  $\geq 20$  нс. Импульсы генерирует магнетрон, синхронизированный по частоте и фазе импульсами, усиленными каскадом л.б.в. Если в качестве генератора используется только усилитель л.б.в. в режиме возбуждения, то выходная мощность составляет  $\sim 1$  кВт. Другая особенность этого прибора – применение модуляции фазы с.в.ч.-импульсов, что позволяет уменьшить мертвое время при регистрации э.с.э. до значений  $\sim 200$  нс [41].

Программатор вырабатывает импульсы, которые используются для внешней синхронизации и в качестве строб-импульсов в детекторе приемника. Длительность импульсов и интервалы между ними контролируются дискретно с интервалом 1 нс. Интервалы между импульсами могут быть установлены в пределах  $0 - 10^{-2}$  с и изменены с заданной скоростью и дискретностью. Программатор вырабатывает также импульс управления фазовращателем, изменяющим фазу первого импульса последовательности  $\pi/2 - \pi$ . Частота повторений импульсных серий лежит в интервале  $2 \cdot 10^{-2} - 10^{-4}$  Гц. Коэффициент шума приемника спектрометра составляет 5–6 дБ. Возможно цифровое накопление сигнала э.с.э. В спектрометре используется блок развертки магнитного поля (стабилизация по сигналу я.м.р. протонов воды). Точность стабилизации составляет  $3 \cdot 10^{-4}\%$ .

Описанный выше прибор стал основой для создания спектрометра PELDOR. Источником для накачки на частоте  $\nu_B$  в нем служит магнетрон, работающий в режиме самовозбуждения (применяется импульсная модуляция анодного напряжения магнетрона) и имеющий фиксированную частоту 9400 МГц. Максимальная выходная мощность с.в.ч.-колебаний магнетрона 5 кВт, длительность импульсов 30–40 нс.

Предусмотрен режим работы, в котором при фиксированном значении внешнего магнитного поля  $H_0$  имеется возможность наблюдения сигнала э.с.э. от спинов как  $A$ , так и  $B$ . Для этого магнетрон на частоте  $\nu_B$  работает в режиме последова-



**Рис. 5.** Блок-схема мультимастотного спектрометра PELDOR фирмы Брукер. 1 – блок, формирующий импульсы накачки и детектирования  $X$ -диапазона (основная частота 9.65 ГГц); 2 – повышающий конвертор (смеситель); 3 – генератор частот высокого диапазона ( $Q = 24.4$  ГГц,  $W = 84.0$  ГГц); 4 – резонатор с образцом; 5 – понижающий конвертор (смеситель); 6 – блок регистрации сигнала  $X$ -диапазона; 7 – сменный мост мультимастотного спектрометра.

тельной генерации двух импульсов, формирующих сигнал эха спинов  $B$ .

Сигнал эха через циркулятор и волноводный переключатель поступает на вход с.в.ч.-усилителя, и после амплитудного детектирования его можно наблюдать на осциллографе. Такой режим работы спектрометра необходим, например, для экспериментального определения угла поворота спинов  $\theta$ .

Многие исследователи используют для PELDOR-измерений спектрометры  $X$ -диапазона фирмы Брукер E580/E680 (серия ELEXYS) [36] или их предыдущую модель ESP 380 [32–35]. В спектрометре E580 дополнительный (маломощный) импульсный источник с.в.ч. с частотой  $\nu_B$  присоединен к основному с.в.ч.-мосту. Частота этого источника может изменяться в диапазоне 9–10 ГГц ступенчато по 100 Гц, а максимальная разность  $\Delta\nu_{AB} = \nu_A - \nu_B$  составляет 800 МГц.

Импульсы на частотах  $\nu_A$  и  $\nu_B$  формируются высокоскоростными ключами, которые позволяют получать с.в.ч.-импульсы с типичными фронтами 1 нс и минимальной длительностью 8 нс. Далее оба импульса  $\nu_A$  и  $\nu_B$  подаются на вход усилителя (типа л.б.в., выходная мощность  $\sim 1$  кВт). Амплитуда, длительность и фаза импульсов с частотами  $\nu_A$  и  $\nu_B$  устанавливаются независимо. После усиления импульсы направляются в измерительную ячейку – диэлектрический резонатор низкой добротности либо в резонатор типа разрезное кольцо.

Таким образом, важным отличием E580/E680 от описанного выше спектрометра, созданного в

ИХКГ [40], является то, что импульсы на обеих частотах формируются независимо, но усиливаются одной и той же л.б.в. Это означает, что в PELDOR-спектрометре такого типа можно использовать только мономодальный широкополосный резонатор, тогда как в [40] применяется бимодальный прямоугольный резонатор, имеющий два волноводных входа – для импульсов на частоте  $\nu_A$  (с выхода усилителя на л.б.в.) и на частоте  $\nu_B$  (с выхода магнетрона).

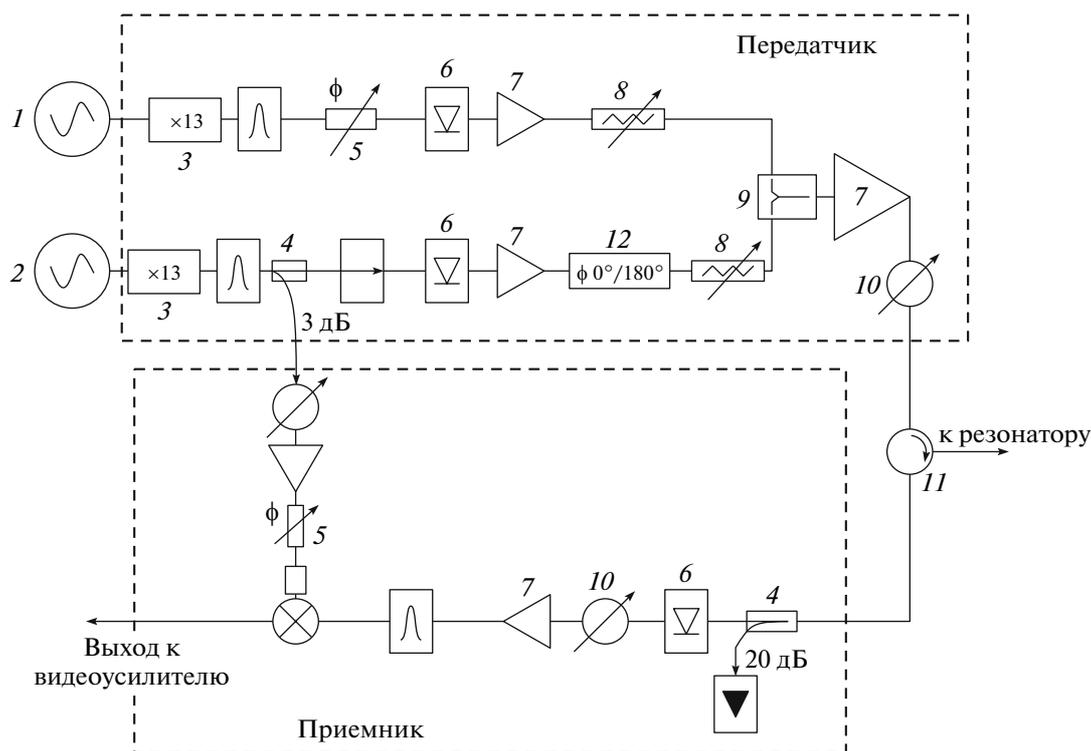
Для детектирования сигнала в спектрометрах E580/E680 применяется быстродействующий импульсный усилитель и квадратурный детектор. Этот вариант спектрометра PELDOR широко используется при исследованиях нитроксильных биорадикалов и спин-меченых биологически важных систем [8].

PELDOR-эксперименты на частотах выше, чем в  $X$ -диапазоне, более сложны. В частности, трудно сконструировать бимодальный резонатор, что несколько ограничивает диапазон применимых частот (разность частот  $\Delta\nu_{AB}$  не может превышать ширину полосы резонатора).

За счет анизотропии  $g$ -фактора и увеличения интенсивности электрон-ядерных переходов с  $\Delta m_1 = \pm 1$  спектры э.п.р. парамагнитных частиц в хаотически ориентированных образцах на высоких частотах становятся значительно шире, чем в  $X$ -диапазоне. Поэтому при одинаковых параметрах импульса накачки из-за уменьшения степени возбуждения спектра  $p_b$ , модуляционные эффекты в PELDOR будут значительно слабее на высоких частотах (2 мм,  $W$ -диапазон), чем в  $X$ -диапазоне. В то же время условия эксперимента при высоких частотах позволяют проводить уникальные исследования ориентационной селективности в парах радикалов и парамагнитных ионов, что практически трудно сделать в диапазонах низких частот.

Сотрудниками фирмы Брукер предложена [36, 42–44] модификация спектрометра E580  $X$ -диапазона, позволяющая с помощью дополнительных блоков проводить исследования в  $L$ -,  $S$ -,  $Q$ - и  $W$ -диапазонах непрерывным и импульсным методами э.п.р., включая спектроскопию PELDOR. Общая блок-схема такого мультимастотного спектрометра для  $Q$ - и  $W$ -диапазонов показана на рис. 5. Использован гетеродинный принцип повышения и понижения частоты с помощью смесителей, причем промежуточная частота лежит в  $X$ -диапазоне. Это дает возможность использования блоков стандартного спектрометра  $X$ -диапазона как для формирования с.в.ч.-импульсов, так и для детектирования сигнала.

Спектрометр, работающий и в  $X$ -, и в  $Ku$ -диапазонах и предназначенный, главным образом, для э.п.р.-спектроскопии двойной квантовой когерентности (Double Quantum Coherence spectro-



**Рис. 6.** Э.п.р.-спектрометр *W*-диапазона [46]. 1 – генератор  $7.3 \pm 0.1$  ГГц; 2 – генератор 7.3 ГГц; 3 – умножитель частоты  $\times 13$ ; 4 – направленный ответвитель; 5 – механический фазовращатель; 6 – быстрый *p-i-n*-переключатель; 7 – усилитель; 8 – программно-управляемый аттенюатор; 9 – сумматор мощности; 10 – волноводный механический аттенюатор; 11 – циркулятор; 12 – быстрый фазовый модулятор.

споры (DQC)), разработан в Корнельском университете (США) и детально описан в работе [45]. Поскольку в DQC-экспериментах необходимо возбуждать весь спектр э.п.р., в спектрометре используются импульсы с шириной полосы возбуждения  $\sim 70$  Гс (200 МГц). Этого достаточно, чтобы возбуждать, например, спектр э.п.р. нитроксильных меток.

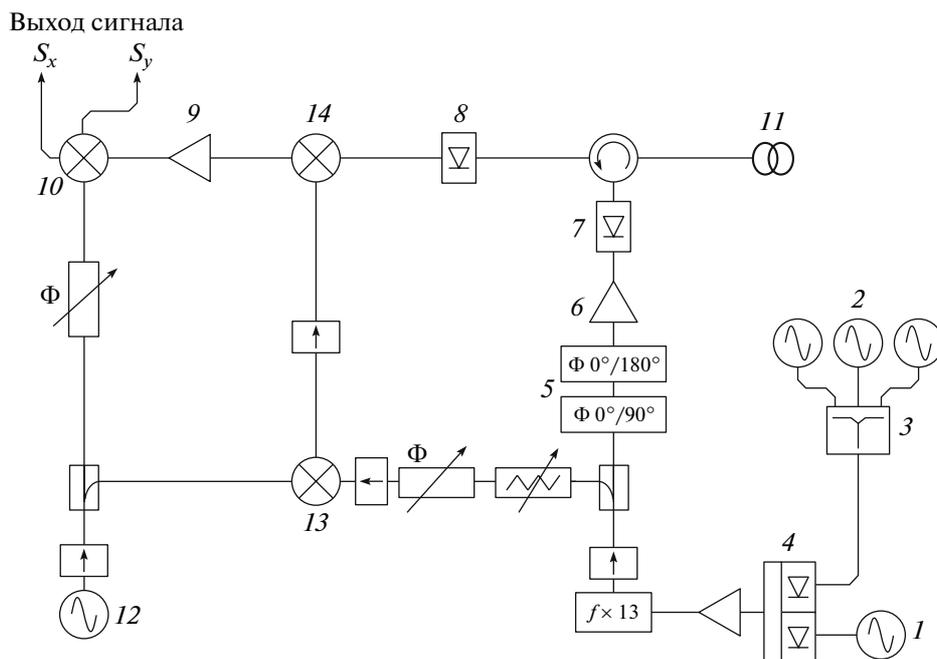
Гомодинный двухканальный мост в *X*-диапазоне позволяет формировать импульсы длительностью 3–5 нс с четырьмя фиксированными фазами и минимальной раздвижкой по времени 5 нс. В *Ku*-диапазоне ( $\sim 17$  ГГц) этот мост работает в качестве гетеродина, кроме того, используют дополнительный (с частотой 9.25 ГГц) с.в.ч.-генератор, смеситель и выходной усилитель *Ku*-диапазона. В приемнике сигнал *Ku*-диапазона вновь преобразуется в сигнал *X*-диапазона, усиливается и детектируется после квадратурного смесителя.

Для того чтобы получить PELDOR-установку, работающую в *Ku*- и *X*-диапазонах, в спектрометр добавлен блок импульсов накачки. Этот блок содержит импульсный с.в.ч.-генератор и л.б.в.-усилитель *Ku*-диапазона. Разность частот  $\Delta\nu_{AB}$  может быть установлена от 0 до 700 МГц. Импульс накачки вводится в волноводный мост с помощью направленного ответвителя.

Отметим, что в настоящее время в качестве задающего генератора в высокочастотных (выше *X*-диапазона) приборах широко применяются сравнительно низкочастотные (6–7 ГГц) генераторы, стабилизированные диэлектрическим резонатором с последующим умножением частоты. Они обеспечивают низкий по сравнению с диодами Ганна уровень фазовых и амплитудных шумов, что позволяет существенно повысить чувствительность спектрометра.

В гомодинном спектрометре *W*-диапазона [46], упрощенная схема которого приведена на рис. 6, используются два независимых источника с.в.ч.-колебаний, построенные по схеме с умножением частоты. Один из них – перестраиваемый – состоит из задающего генератора  $\sim 7.3$  ГГц и умножителя частоты  $\times 13$ , что обеспечивает на выходе диапазон перестройки  $\nu_B 94.9 \pm 1.3$  ГГц с шагом 13 кГц. Второй генератор, по схеме аналогичный первому, имеет фиксированную частоту 94.9 ГГц. Он используется для создания поля  $H_1$  с частотой  $\nu_A$ . Формируются импульсы независимыми *p-i-n*-ключами на высокой частоте, затем на входе твердотельного усилителя они складываются (выходная мощность до 1 Вт).

С учетом всех потерь, вносимых с.в.ч.-трактом, авторы [46] оценивают мощность на входе резона-



**Рис. 7.** Э.п.р.-спектрометр  $W$ -диапазона [47]. 1 – генератор  $7.3 \pm 0.023$  ГГц; 2 – генераторы  $7.3 + 0.023$ ,  $7.3$ ,  $7.3 - 0.023$  ГГц; 3 – сумматор мощности; 4 – быстрый  $p-i-n$ -переключатель; 5 – быстрые фазовые модуляторы; 6 – усилитель мощности на л.п.д.; 7 – быстрый  $p-i-n$ -переключатель; 8 – защитный быстрый  $p-i-n$ -переключатель; 9 – малошумящий усилитель 4 ГГц; 10 – смеситель – квадратурный детектор; 11 – резонатор  $TE_{011}$ ; 12 – генератор 4 ГГц; 13 – смеситель сдвига  $4+95$  ГГц; 14 – смеситель сдвига  $99-4$  ГГц.

тора (цилиндрический,  $TE_{100}$ ) в 300–350 мВт. В результате  $\pi$ -импульс при нагруженной добротности резонатора  $Q_L \sim 1000$  имеет длительность  $\sim 26$  нс. Мертвое время прибора при комнатной температуре резонатора составляет  $\sim 50$  нс, а при низких температурах из-за увеличения проводимости стенок и, следовательно, добротности резонатора –  $\sim 150$  нс.

Один из наиболее совершенных приборов  $W$ -диапазона (95 ГГц), блок-схема которого приведена на рис. 7, создан в Берлинском университете [47, 48]. Датчик э.п.р.-спектрометра размещен в теплом отверстии криомагнита диаметром 114 мм, что позволило применить гелиевый криостат с полезным диаметром  $\sim 90$  мм. Развертка поля в пределах 0–1000 Гс осуществлялась изменением тока в дополнительных сверхпроводящих катушках магнита. С.в.ч.-мост прибора сконструирован по гетеродинной схеме с промежуточной частотой 4 ГГц. Задающий генератор, стабилизированный диэлектрическим резонатором, имеет частоту  $\sim 7$  ГГц (реально используется один из трех генераторов, имеющих близкие частоты, что облегчает настройку моста при изменении собственной частоты резонатора).

После умножителя часть с.в.ч.-мощности ( $\sim 10$  мВт) ответвляется (в качестве опорного сигнала) в приемный канал, остальная мощность подается через систему импульсных ключей и фазо-

вращателей на вход л.п.д.-усилителя (выходная мощность до 300 мВт), откуда через аттенюатор и циркулятор поступает в резонатор датчика э.п.р.

Сигнал с выхода циркулятора через  $p-i-n$ -ключ (защита приемника от мощных отраженных импульсов с.в.ч.) поступает на приемный смеситель, на второй вход которого поступают с.в.ч.-колебания частотой 99 ГГц. Выделенный сигнал на частоте 4 ГГц через малошумящий усилитель подается на квадратурный детектор и, далее, на вход сигнал-процессора для дальнейшей обработки.

Наличие программно-управляемых аттенюаторов и ключей позволяет проводить эксперименты как в непрерывном режиме э.п.р., так и в импульсном: регистрировать электронное спиновое эхо (э.с.э.), времяразрешенный э.п.р, импульсный электронно-ядерный резонанс, двойной электронно-электронный резонанс (PELDOR) – двухчастотный ( $\Delta\nu_{AB} \sim 900$  МГц) и с быстрым переключением (скачком) магнитного поля. В последнем случае возможно наблюдение PELDOR в диапазоне полей  $\pm 160$  Гс, что соответствует разности частот около 900 МГц в обычном двухчастотном PELDOR. Для упомянутых методик имеются соответствующие резонаторы: цилиндрические  $TE_{011}$ , резонаторы типа Фабри-Перро.

Мертвое время прибора в импульсном режиме составляет  $\sim 20$  нс, коэффициент шума приемни-

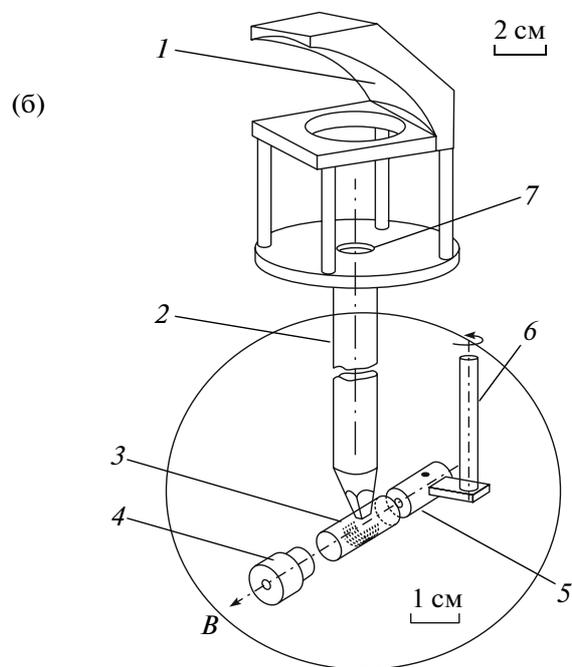
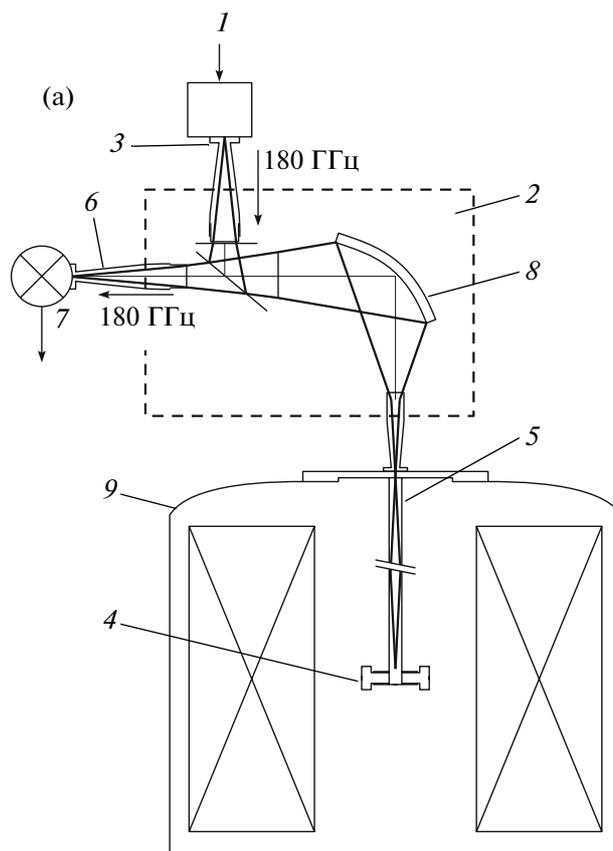
ка с.в.ч. не хуже 11 дБ. С помощью этого спектрометра получены данные о геометрии и расстояниях в парамагнитных структурах реакционных центров фотосинтеза [49].

В нескольких лабораториях сконструированы PELDOR-спектрометры, работающие на частотах выше 95 ГГц. В работах [50–52] дано описание импульсного э.п.р.-спектрометра, работающего на частоте 180 ГГц. Прибор построен по гетеродинной схеме, применены генераторы на диодах Ганна в диапазоне частот ~45 ГГц. Основной канал передатчика этого гетеродинного спектрометра состоит из генератора с фиксированной частотой 45 ГГц и удвоителя частоты. В канале накачки используется перестраиваемый (44–46 ГГц) генератор, а также удвоитель частоты.

Импульсы длительностью ~100 нс формируются быстродействующими ключами (время срабатывания 5 нс) в двух независимых каналах и смешиваются в Т-мосте. Сформированная импульсная (двухчастотная) последовательность через удвоитель частоты поступает в л.п.д.-усилитель, с выхода которого следует на вход квазиоптического циркулятора.

Общая схема прибора приведена на рис. 8а, а внешний вид датчика э.п.р. (упрощенно) показан на рис. 8б. Мощность от блока, формирующего с.в.ч.-импульсы, поступает через волновод с раструбом 3 в циркулятор 2. Поскольку для этого диапазона частот пока нет волноводных устройств, использован квазиоптический циркулятор с эллиптическим зеркалом, который подводит мощность ~20 мВт к цилиндрическому резонатору 4 через гофрированный сверхразмерный волновод 5 с малыми потерями. Волновод оканчивается конусом-согласователем (рис. 8б), соединенным с отверстием связи (Ø0.4 мм) в цилиндрическом резонаторе с внутренним диаметром 2.2 мм.

Отраженный от резонатора сигнал э.с.э. с помощью эллиптического зеркала фокусируется на входном коническом согласователе волновода и, далее, направляется в блок регистрации и обработки сигнала спектрометра. Криогенный магнит спектрометра создает постоянное поле до 70 кГс с регулируемым диапазоном 1.5 кГс. С помощью этого спектрометра проведены исследования



**Рис. 8. а** – схема измерительной части спектрометра PELDOR на 180 ГГц [51]: 1 – блок импульсов, формирующих эхо и импульс накачки; 2 – квазиоптический циркулятор; 3 – волновод с раструбом; 4 – резонатор; 5 – сверхразмерный волновод; 6 – волновод приемника; 7 – приемник, выход сигнала; 8 – эллиптическое зеркало; 9 – криомагнит; **б** – устройство резонатора спектрометра диапазона 180 ГГц: 1 – эллиптическое зеркало; 2 – сверхразмерный волновод; 3 – резонатор (показаны щели для ввода света или р.ч.-излучения); 4 – фиксированный поршень; 5 – подвижный поршень; 6 – привод движения поршня; 7 – герметизированное тefлоновое окно.

ориентационной селективности димеров тирозильных радикалов в белках [53, 54].

Некоторые из рассмотренных выше и используемых на практике спектрометров PELDOR построены на основе спектрометров э.с.э. как приставки или как модификация этой аппаратуры. Наибольшее применение в физико-химических и биофизических исследованиях получили спектрометры  $X$ -диапазона. Успешно осваиваются диапазоны более высоких частот. Можно ожидать, судя по рекламным сообщениям, что в недалеком будущем будут работать спектрометры э.с.э. и PELDOR на частоте 260 ГГц [36].

### РЕЗОНАТОРЫ

Исследуемый образец помещается в резонатор спектрометра в пучность магнитного с.в.ч.-поля. В PELDOR-спектроскопии применяют как мономодальные, так и бимодальные структуры. Мономодальный резонатор возбуждается в одном и том же объеме на двух частотах, действующих на образец. Бимодальный резонатор устроен так, что каждый объем возбуждается на своей частоте, а образец находится в общем объеме резонатора.

Конструкция резонатора для PELDOR-экспериментов должна удовлетворять следующим условиям. Во-первых, создавать достаточно большие значения напряженности поля  $H_1$  в образце для поворота вектора намагниченности и возбуждения, по возможности, всего или большей части спектра э.п.р. (для  $\pi$  поворота импульсом длительностью 10 нс необходима амплитуда  $H_1 \sim 10$  Гс). Во-вторых, резонатор должен допускать возбуждение образца на двух частотах  $\nu_A$  и  $\nu_B$ . Эти два условия достаточно противоречивы с точки зрения их одновременного выполнения.

Обычно в стационарных спектрометрах э.п.р. напряженность магнитной составляющей в полом согласованном резонаторе определяется его добротностью  $Q$  и поступающей на вход с.в.ч.-мощностью  $P$ :

$$H_1 = \delta (QP)^{1/2}, \quad Q = \nu_0 / \Delta\nu_0,$$

где  $\delta$  — параметр, зависящий от конструкции резонатора, объема образца, коэффициента заполнения;  $\nu_0$ ,  $\Delta\nu_0$  — соответственно резонансная частота и ширина полосы пропускания резонатора.

Мощность, поступающая на вход резонатора, в спектрометрах PELDOR обычно ограничена и составляет  $\sim 1$  кВт. Простейший путь увеличения  $H_1$  — повышение добротности резонатора, как это делается обычно в стационарной э.п.р.-спектроскопии, — неприемлем для импульсной э.п.р.-спектроскопии (высокая добротность приводит к увеличению мертвого времени за счет звона и к искажению формы с.в.ч.-импульсов).

Согласно [1], для неискаженного воспроизведения коротких импульсов ширина полосы про-

пускания резонатора должна удовлетворять условию

$$\Delta\nu_0 \geq 0.57/t_{и},$$

где  $t_{и}$  — длительность импульса, а оптимальная добротность должна составлять

$$Q_{\text{опт}} \leq 1.75 t_{и} \nu_0,$$

т.е. в  $X$ -диапазоне для неискаженного воспроизведения прямоугольных импульсов длительностью 10 нс оптимально иметь добротность  $Q_{\text{опт}} \leq 175$ .

Мертвое время  $t_R$  — это интервал, необходимый для спада сигнала звона после возбуждающего с.в.ч.-импульса до уровня мощности шума (рис. 1а):

$$t_R = (Q/4\pi\nu_0) \ln(P_0/P_n), \quad (12)$$

здесь  $P_0$  — мощность с.в.ч.-импульсов, а  $P_n = \pi k T \nu_0 / Q$  — мощность шумов. Оценки показывают, что при  $P_0 = 1$  кВт,  $Q = 500$ ,  $T = 300$  К,  $\nu_0 = 9$  ГГц мертвое время спектрометра будет достигать 120 нс. Подробный анализ этих величин проведен в работах [39, 47, 48].

Из соотношения (12) видно, что для уменьшения мертвого времени надо использовать резонаторы с низкой добротностью. Это, однако, приведет к потере чувствительности, так как она пропорциональна величине  $Q^{1/2}$  (см. далее). Поэтому для уменьшения мертвого времени в импульсной э.п.р.-спектроскопии предложен ряд методов: линии задержки [55, 56], циклинга фазы первого импульса [40], пяти импульсов с циклингом фазы [57], бимодального резонатора [58–60], шелевого резонатора [61] и детектирования продольной намагниченности [62].

При коротких временах звона возникают дополнительные эффекты, усложняющие регистрацию сигналов э.с.э. в интервале коротких времен задержки между  $\pi/2$ - и  $\pi$ -импульсами. Это действующие на приемник сигналы свободной индукции, наводки из-за утечки мощности из волноводного тракта и другие сигналы.

Низкая добротность необходима в экспериментах PELDOR при применении в спектрометре в качестве измерительной ячейки мономодального резонатора. Положение относительно резонансной кривой резонатора спектров прямоугольных импульсов регистрации  $\nu_A$  и накачки  $\nu_B$  длительностью  $t_A$  и  $t_B$  для объемного мономодального и скрещенного бимодального резонаторов приведено на рис. 9. В первом случае векторы  $H_1$  ориентированы параллельно и возможно перекрывание спектров для узких импульсов, во втором — перекрывание спектров исключено. Из условия минимизации перекрывания спектров импульсов для мономодального резонатора должно выполняться соотношение

$$Q_L > \Delta\nu_{AB} / \nu_0.$$

Для PELDOR-экспериментов с нитроксильными метками и органическими радикалами раз-

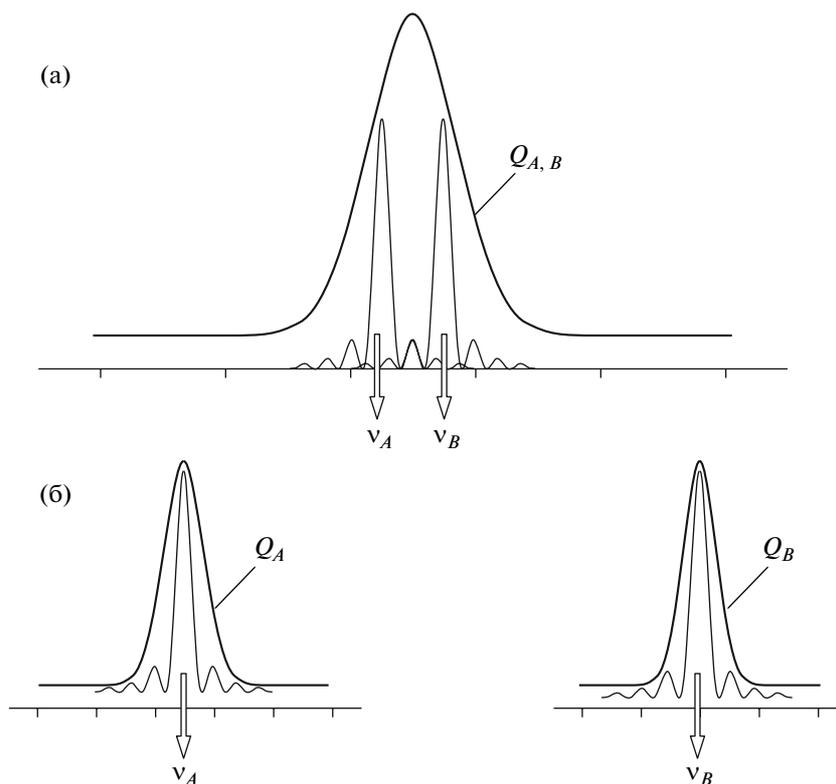


Рис. 9. Положение импульсов, формирующих сигнал эха на частоте  $\nu_A$  и импульсов накачки на частоте  $\nu_B$ , относительно резонансной кривой для мономодального (а) и бимодального (б) резонаторов.

ность между частотой наблюдения  $\nu_A$  и частотой накачки  $\nu_B$  должна быть  $\geq 80-100$  МГц для  $X$ -диапазона, что также ограничивает  $Q_L$  до величины  $100-130$ . Для мономодальных резонаторов удовлетворить одновременно оба условия – высокое значение  $H_1$  и малую добротность – можно только путем перехода от обычных объемных структур к специальным конструкциям.

В литературе описано достаточно много конструкций резонансных структур, используемых в импульсной э.п.р.-спектроскопии. В большинстве случаев для PELDOR-экспериментов используют низкодобротные мономодальные резонаторы, поскольку при этом нет необходимости иметь отдельный волноводный тракт, работающий на частоте накачки  $\nu_B$ .

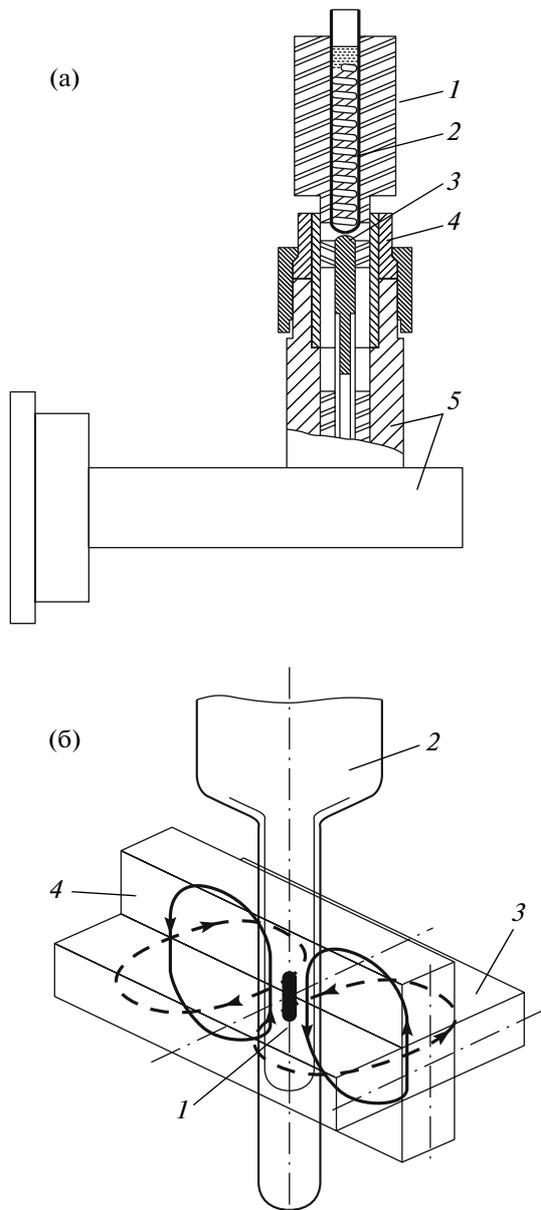
Необходимая напряженность  $H_1$  для мономодальных резонаторов достигается несколькими способами. Один из них – использование резонаторов с полусосредоточенными параметрами, в которых электрическое и магнитное с.в.ч.-поля существенно разделены в пространстве (резонансные спирали [63] (рис. 10а), резонаторы типа разрезной трубки [64], щелевые резонаторы [61, 65], резонаторы типа разрезное кольцо [66]).

Такие резонаторы обычно имеют гораздо меньший объем, что в значительной мере ком-

пенсирует потери чувствительности, даже с учетом уменьшения добротности и соответственно поля  $H_1$ . Применяются также низкодобротные диэлектрические резонаторы [67]. Отметим, что в пионерских работах по стационарному двойному электрон-электронному резонансу использовались спиральный резонатор [68] и прямоугольный бимодальный скрещенный резонатор с колебаниями типа  $TE_{102}$  [69].

Мономодальные [70] и бимодальные резонаторы типа разрезное кольцо [59, 71, 72], а также резонаторы с перекрещенным разрезом предложены и исследованы как для  $X$ -, так и для  $S$ -диапазонов в спектрометрах стационарного ELDOR. Такие резонаторы обладают высоким коэффициентом заполнения при низкой добротности и позволяют существенно увеличить чувствительность спектрометра [73]. Резонаторы с полусосредоточенными параметрами имеют, как правило, более сложную конструкцию, чем классические объемные прямоугольный  $TE_{102}$  или цилиндрический  $TE_{011}$  (рис. 11а–11г).

Обзор конструкций разных резонаторов, используемых в э.с.э.- и ELDOR-спектроскопии, можно найти в работах [74, 75]. В кольцевых диэлектрических резонаторах с.в.ч.-колебания возбуждаются в среде с высокой диэлектрической постоянной (например, сапфир с  $\epsilon \sim 10$ ). Такой



**Рис. 10.** а – конструкция резонансной спирали и согласующего устройства ( $X$ -диапазона): 1 – тефлоновый цилиндр; 2 – контейнер с образцом; 3 – антенна; 4 – коаксиальный разъем; 5 – волноводно-коаксиальный переход; б – измерительный бимодальный резонатор: 1 – образец; 2 – кварцевый сосуд Дьюара; 3, 4 – два скрещенных объема с колебаниями типа  $TE_{102}$ .

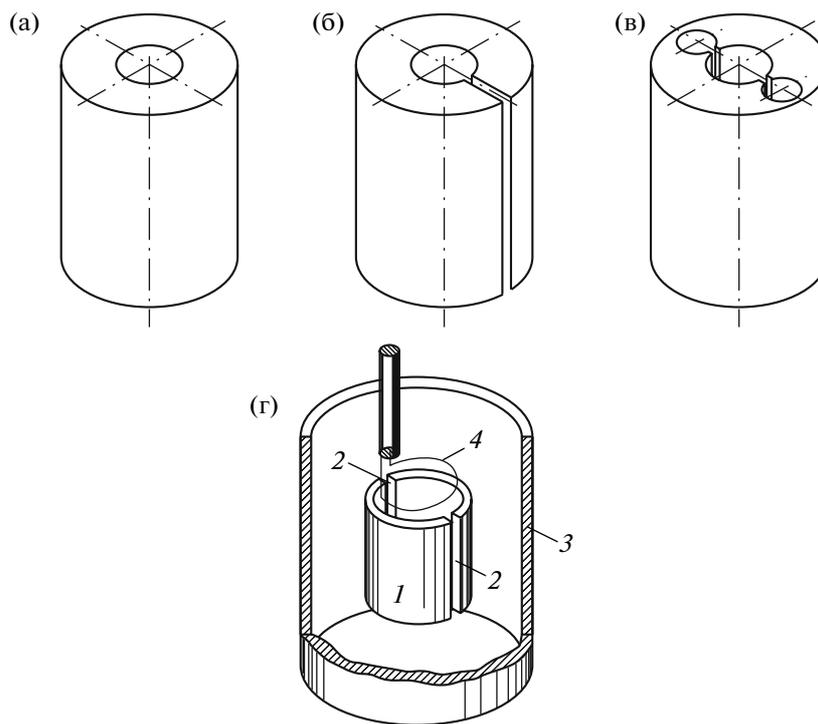
резонатор в виде сапфировой трубки и с отверстием связи имеет высокий коэффициент заполнения и низкую добротность. Проведены расчеты конфигурации и амплитуды  $H_1$  внутри диэлектрического резонатора [42, 61]. По нашим данным, такая структура позволяет снизить входную мощность для оптимальной регистрации сигнала

э.с.э. на 10–15 дБ по сравнению с обычными объемными резонаторами типа  $TE_{102}$ .

Другой метод понижения добротности резонатора состоит в усилении его связи с волноводом ( $K \gg 1$ ). Соответствующий подбор диаметра отверстия связи [76] изменяет величину  $\Delta\nu_0$ , а следовательно, и напряженность поля  $H_1$ . Резонансные кривые для диэлектрических резонаторов и резонаторов типа плоское кольцо фирмы Брукер приведены на рис. 12 [58]. Они использованы в PELDOR-спектрометрах этой фирмы. Из данных рис. 12 следует, что для резонатора типа плоское кольцо при  $\Delta\nu$ , равном 500 и 700 МГц, напряженность поля  $H_1$  может достигать (в единицах частоты) 90 и 60 МГц в зависимости от коэффициента связи.

Объемные скрещенные бимодальные резонаторы широко распространены в стационарной спектроскопии двойного резонанса. Обзор их конструкций дан в работах [77, 78]. Такие резонаторы с взаимно ортогональными векторами  $\mathbf{H}_1$  в месте расположения исследуемого образца используются и в импульсной э.п.р.-спектроскопии для того, чтобы “развязать” моды возбуждения сигнала и детектирования, что, в свою очередь, снижает мертвое время спектрометра. Развязка мод может достигать 70–80 дБ. В результате с.в.ч.-импульсы, которые используются для возбуждения сигнала эха по первой моде резонатора, значительно ослаблены во второй моде (моде детектирования). В результате отпадает необходимость в создании защитного устройства для приемника, и, таким образом, мертвое время для приемника сигнала эха может быть снижено до 30 нс. Другое преимущество – величина  $\Delta\nu_{AB}$  регулируется отдельной настройкой частот резонаторов и может быть легко достигнута 700 МГц.

В работах по PELDOR в Новосибирске используется скрещенный объемный бимодальный резонатор. Его схематическое изображение вместе с сосудом Дьюара и образцом показано на рис. 10б. В этом резонаторе две  $TE_{102}$ -моды перекрываются под прямым углом. Конструкция резонатора аналогична предложенной для экспериментов по двойному резонансу в стационарной э.п.р.-спектроскопии [69]. Оба резонатора настраиваются введением в соответствующий объем кварцевых или тефлоновых стержней. Развязка между резонаторами на  $\nu_A$  и  $\nu_B$  составляет 20 дБ при  $\nu_A = 9.4$  ГГц для добротности  $Q_a = 220$  и  $Q_b = 150$ . Величина  $\Delta\nu_{AB}$  в случае экспериментов с нитроксильными радикалами составляет ~65 МГц. Образец длиной 5–6 мм помещается обычно в ампулу диаметром 5 мм. При работе с различными температурами возможна замена сосуда Дьюара на трубку с газовым потоком.



**Рис. 11.** Внутренний объем различных диэлектрических резонаторов (а, б, в) и резонатор типа разрезное кольцо (г). 1 – кольцо; 2 – щелевой разрез; 3 – экран; 4 – индуктивное кольцо связи. Образец всюду помещается на оси резонатора.

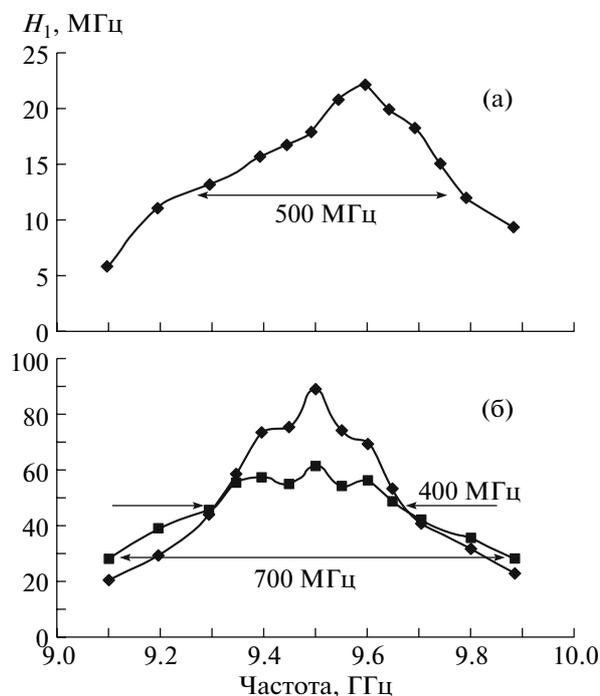
### О ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ И РАЗРЕШАЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ В PELDOR-СПЕКТРОСКОПИИ

Чувствительность в PELDOR-экспериментах, т.е. минимальное число частиц, детектируемых установкой PELDOR, определяется чувствительностью базового спектрометра э.с.э. Начальная амплитуда сигнала PELDOR при фиксированном интервале  $\tau$  соответствует амплитуде сигнала э.с.э. Расчеты чувствительности спектрометров э.с.э. проводились неоднократно (см., например, [28, 30, 78] и ссылки в них). Отношение сигнал/шум ( $S/N$ ) для импульсных спектрометров э.п.р. для случая полного возбуждения спектра с.в.ч.-импульсами можно представить в виде [79, 80]

$$(S/N)_0 = \left( \frac{Q_0}{V_0 F \Delta f k T} \right)^{1/2} \frac{v_0^n}{k T},$$

где  $V_0$  – эффективный объем резонатора;  $F$  – фактор шумов детектирующего канала приемника;  $\Delta f$  – ширина полосы приемника;  $k$  – константа Больцмана;  $T$  – температура.

Показатель степени  $n$  зависит от конкретных условий эксперимента и может даже менять знак  $7/2 \leq n \leq -3/2$  [79]. Как правило, с ростом частоты чувствительность возрастает. Например, в [81] отмечено, что при близких условиях проведения экспериментов чувствительность прибора в  $X$ -диапазоне по сравнению с  $S$ -диапазоном ока-



**Рис. 12.** Резонансные кривые, измеренные методом нутации (каменный уголь) для диэлектрического резонатора (а) и резонатора типа кольцо (б). В последнем случае резонансные кривые приведены для двух коэффициентов связи [58].

залась в 30–40 раз больше. Чувствительность спектрометров  $Q$ -диапазона в зависимости от условий эксперимента в  $10$ – $10^3$  раз больше, чем спектрометров  $X$ -диапазона [82]. Детальный анализ вопросов чувствительности э.с.э.-спектрометров в различных диапазонах длин волн изложен в работе [79].

Чувствительность спектрометра можно повысить путем накопления сигнала. Эффективность накопления зависит от того, какой тип детектирования сигнала используется – когерентный (фазочувствительный) или некогерентный. В случае когерентного приемника при накоплении сигнала чувствительность возрастает пропорционально квадратному корню из числа актов накопления  $\sqrt{N}$ , тогда как в случае некогерентного приема чувствительность растет только как  $\sqrt[4]{N}$  [1].

Оптимальная частота накопления определяется как [1]

$$[v_R]_{opt} = 0.8/T_1.$$

Расчет [1] показал, что чувствительность идеально когерентного спектрометра э.с.э.  $X$ -диапазона при условии полного возбуждения спектра для времен релаксации  $T_1 = 10^{-6}$  с и  $T_2 = 10^{-6}$  с составляет  $10^{10}$ – $10^{11}$  спинов в образце. Это соответствует чувствительности современных стационарных спектрометров э.п.р. Однако чувствительность реального импульсного спектрометра значительно ниже из-за неоптимальной конструкции резонатора (малые длительности импульсов накачки и сигнала эха требуют широкой полосы пропускания резонатора, т.е. низкой добротности, что приводит к уменьшению мощности принимаемого сигнала и к увеличению шумов), неоптимальной частоты повторения возбуждающих с.в.ч.-импульсов и, наконец, неполного возбуждения э.п.р. вследствие технических ограничений на мощность и длительность с.в.ч.-импульсов накачки. Влияние всех этих факторов детально обсуждается в работах [1, 28]. В результате, как правило, импульсные спектрометры на один-два порядка менее чувствительны, чем стационарные.

Особенность PELDOR-экспериментов состоит в том, что они выполняются при фиксированном ( $\tau = \tau_0$ ) времени между  $\pi/2$ - и  $\pi$ -импульсами, индуцирующими эхо-сигнал. Начальное время  $\tau_0$  нельзя выбрать слишком малым, так как это сужает интервал времени  $T$ , что ведет к потере информации в PELDOR-эксперименте. Это означает, что начальный PELDOR-сигнал или чувствительность снижаются с уменьшением начального сигнала из-за фазовой релаксации, характеризующейся временем  $T_f$ :

$$S/N \sim (S/N)_0 \exp[-(\tau_0/T_f)].$$

Заметим также, что в экспериментах по PELDOR упомянутое выше частичное возбуждение спек-

тра (при этом  $S/N \sim p_b$ ) является принципиально необходимым. Таким образом, чувствительность в PELDOR-экспериментах в несколько раз ниже по сравнению с экспериментами в обычной импульсной э.п.р.-спектроскопии. Оценки показывают, что для надежной регистрации сигнала от спин-меченых белков и других биополимеров необходимо иметь в образце  $\geq 10^{12}$  молекул [83].

Однако недостаточно высокая чувствительность метода PELDOR в значительной мере компенсируется его высоким временным разрешением по сравнению с обычным э.с.э. Если в спектрометрах э.с.э. в случае двухимпульсного метода минимальное временное разрешение определяется суммой длительностей импульсов и времени звона,  $t_{p1} + t_{p2} + t_R$ , то для спектрометров PELDOR в трехимпульсном варианте эта величина равна только длительности импульса накачки  $t_p$ , так как спад сигнала PELDOR  $V(T)$  начинает фиксироваться с момента времени  $T = t_p$ . Отметим что спад  $V(T)$  и в этом интервале можно рассчитать при известных условиях эксперимента [21].

#### ОПРЕДЕЛЕНИЕ НАПРЯЖЕННОСТИ С.В.Ч.-ПОЛЯ $H_1$

В импульсной спектроскопии э.п.р. важно провести настройку генератора спектрометра таким образом, чтобы с.в.ч.-импульсы поворачивали спиновую намагниченность на заданные углы  $\theta$ . Согласно (1), это достигается вариацией амплитуды  $H_1$  или длительности  $t_p$  с.в.ч.-импульсов. Например, для PELDOR-экспериментов импульс накачки соответствует обычно  $\pi$ -повороту, а импульсы э.с.э. – соответственно  $\pi/2$  и  $\pi$  вращениям вектора спиновой намагниченности.

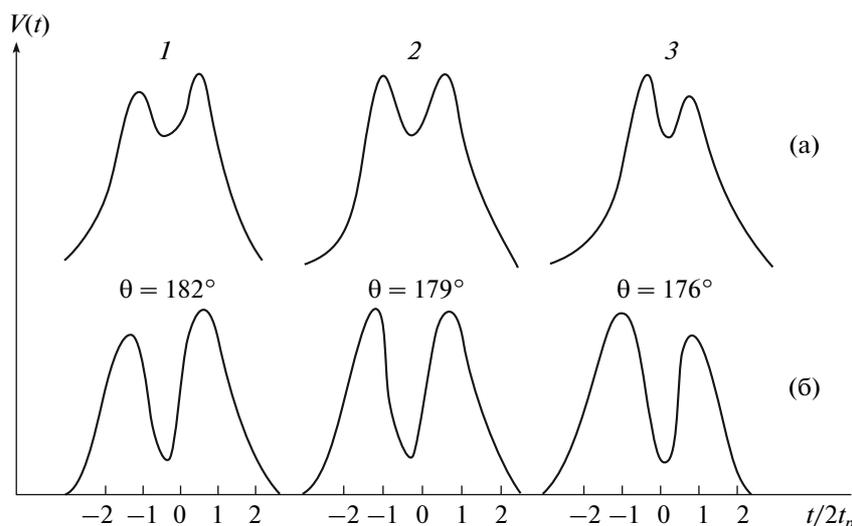
Необходимо определять амплитуду  $H_1$  не на входе в резонатор, а в месте расположения исследуемого образца. По-видимому, это проще всего сделать путем измерения биений сигнала нутации (осцилляции Тори) для образца, обладающего узкой линией э.п.р. [30, 58]. В таких экспериментах должно выполняться условие полного возбуждения спектра, а образец должен обладать достаточно длительным временем фазовой релаксации.

Одним из простых удобных и часто применяемых твердых образцов является каменный уголь. Используют и растворы стабильных радикалов с узкими (по сравнению с  $H_1$ ) линиями э.п.р., например раствор  $n$ -пероксиламин дисульфоната (соль Фреми) [73]. В таких экспериментах сигнал нутации модулирован на частоте

$$\omega_1 = \gamma H_1,$$

что позволяет прямо измерить амплитуду поля  $H_1$ .

Другой подход представляется иногда более удобным, поскольку в нем для определения  $H_1$  нет необходимости заменять образец на стандарт



**Рис. 13.** Экспериментальная (а) и рассчитанная (б) формы сигналов спинового эха (атомы водорода в облученной серной кислоте при 77 К) при различных значениях амплитуды с.в.ч.-импульсов [84]. Величины  $H_1$  для сигналов эха 1 и 3 отличаются на  $\pm 0.05$  дБ от сигнала 2.

в резонаторе, и метод применим как для узких, так и для широких спектров э.п.р. В этом случае регистрируют форму сигнала двухимпульсного э.с.э., меняя амплитуду с.в.ч.-импульсов. Расчеты, проведенные в [1, 28], показывают, что форма линии э.с.э.-сигнала имеет симметричный двугорбый вид с провалом вблизи  $t = 2\tau$  при  $\theta = \pi$  при полном и частичном возбуждениях спектра с.в.ч.-импульсами [84] (рис. 13).

Этот эффект позволяет провести точную настройку амплитуды импульсов по форме линии сигнала спинового эха в PELDOR-эксперименте. Настройка проводится для импульсов регистрации и импульсов накачки путем поочередного подключения соответствующих источников и регистрации от них сигнала эха.

Если известно численное значение  $H_1$  для некоторых параметров регистрации сигнала эха, то значения  $H_1$ , соответствующие разным углам поворота вектора намагниченности, легко получить, меняя поступающую в резонатор микроволновую мощность с помощью калиброванного аттенюатора без изменения при этом настройки спектрометра.

### ВОЗБУЖДЕНИЕ СПЕКТРА И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПАРАМЕТРА $p_b$

Для PELDOR-спектроскопии на двух частотах  $\nu_A$  и  $\nu_B$  возникают ограничения, связанные с шириной э.п.р.-линии, разностью частот  $\Delta\nu_{AB}$  и длительностью микроволновых импульсов. Спектры прямоугольных импульсов  $\nu_A$  и  $\nu_B$  не должны перекрываться, т.е. необходимо чтобы выполнялось условие  $\Delta\nu_{AB}t_p \gg 1$ , при том что  $\Delta\nu_{AB} < \Delta$ , где  $\Delta$  —

эффективная ширина спектра э.п.р. Для азотокисных меток и радикалов  $\Delta \sim 300$  МГц, и если эксперимент проводился для  $\Delta\nu_{AB} \sim 100$  МГц и  $t_p \sim 40$  нс, то эти условия выполняются. Однако это вносит существенные ограничения при изучении узких спектров э.п.р. и при использовании импульсов малой длительности для PELDOR.

Для анализа кинетики спада сигналов PELDOR необходимо определить параметр  $p_b$  в (2). Он связан с углом поворота  $\theta$  намагниченности за счет спинов  $B$  под действием импульса накачки и характеризует степень возбуждения спектра импульсом на частоте  $\nu_B$ . Если ширина линии мала по сравнению с амплитудой импульса накачки ( $H_1$ ), то все спины будут повернуты на одинаковый угол, а величину  $p_b$  можно определить как

$$p_b = \sin^2(\theta/2) = \sin^2(\gamma H_1 t_p / 2). \quad (13)$$

Для широкой линии э.п.р. соотношение (13) следует усреднить по функции, описывающей контур линии  $g(\nu)$ , а для прямоугольного импульса величина  $p_b$  может быть рассчитана как [1, 28]

$$p_b = \int_{-\infty}^{+\infty} \frac{\omega_1^2 g(\nu)}{\omega_1^2 + 4\pi^2(\nu_B - \nu)^2} \times \sin^2\left(\frac{t_p}{2} \sqrt{\omega_1^2 + 4\pi^2(\nu_B - \nu)^2}\right) d\nu,$$

где  $\omega_1 = \gamma H_1$ .

Таким образом, величину  $p_b$  можно рассчитать, если известны форма линии э.п.р.  $g(\nu)$  и длительность импульса накачки  $t_p$ .

Однако экспериментальный путь определения  $p_b$  представляется более надежным. Например,

этот параметр можно определить из экспериментального экспоненциального спада  $V(T)$  для модельной системы с равномерно распределенными в образце частицами с известной концентрацией (см. формулу (5)). Это особенно удобно делать для стеклообразных растворов стабильных радикалов, когда их спектр стационарного э.п.р. совпадает со спектром исследуемых радикалов. Величину  $p_b$  можно также получить, используя формулу (8) для радикальных пар, когда известно, что  $N = 2$ . В некоторых экспериментах важно знать также параметр  $p_a$  — степень возбуждения спектра импульсами на  $\nu_A$ . Для расчета или экспериментального определения используются те же методы, что и для  $p_b$ .

### ДИАПАЗОН РАССТОЯНИЙ, ИЗМЕРЯЕМЫХ МЕТОДОМ PELDOR

Оценим границы диапазона расстояний  $r$ , доступных для измерений по осцилляциям спада сигнала PELDOR. Биения сигнала PELDOR происходят на частоте  $\omega_D = \gamma^2 \hbar / r^3$ . Наименьшее значение дипольной частоты  $\omega_D$  определяется максимальным временным интервалом  $\tau_{\max}$  между возбуждающими эхо импульсами на частоте  $\nu_A$ , при котором еще возможно детектирование сигнала в двухимпульсной методике э.с.э. Время  $\tau_{\max}$  соответствует времени фазовой релаксации  $T_f$  и определяется концентрацией электронных и ядерных спинов, температурой и другими свойствами спиновой системы.

Для органических матриц неустранимой причиной фазовой релаксации (даже при понижении температуры до субгелиевых) является спектральная диффузия в системе электронных спинов, обусловленная спиновой диффузией в системе ядерных спинов (протонов матрицы) [1, 3], причем спад сигнала спинового эха в этом случае происходит по закону  $\exp[-(\tau/T_f)^3]$ . В обычных случаях  $T_f \sim \tau_{\max} \sim 5$  мкс для органических матриц. Полагая, что для регистрации одного полупериода осцилляций в спаде  $V(T)$  необходимо, чтобы выполнялось условие  $\omega_D \tau_{\max} = \pi$ , верхний предел расстояний в соответствии с (3) можно оценить как

$$r_{\max} = \left[ \frac{\gamma^2 \hbar}{\pi} \tau_{\max} \right]^{1/3},$$

что при  $\tau_{\max} \sim 5$  мкс дает значение  $r_{\max} \sim 8$  нм.

Если ширина полосы пропускания приемника достаточно велика, минимальное значение расстояния  $r_{\min}$  или максимальная дипольная ширина будут определяться амплитудой с.в.ч.-поля  $H_1$  на образце на частоте  $\nu_B$ . Величина  $H_1$  должна быть достаточной, чтобы возбуждать обе линии

Пейковского дипольного дублета, расщепление в котором равно  $2\omega_D$ . В этом случае  $2\omega_D = \gamma H_1$ , и для  $\pi$ -импульса накачки  $\gamma H_1 \tau_p = \pi$ , где  $\tau_p$  — длительность импульса на  $\nu_B$ . Минимальное значение расстояния можно оценить как

$$r_{\min} = \left[ \frac{\gamma^2 \hbar}{\pi} \tau_p \right]^{1/3},$$

что при  $t_p \sim 30$  нс дает значение  $r_{\min} \sim 1.2$  нм.

Таким образом, диапазон измерений расстояний по осцилляциям спада сигнала PELDOR, по этим оценкам, лежит в области 1.2–8 нм.

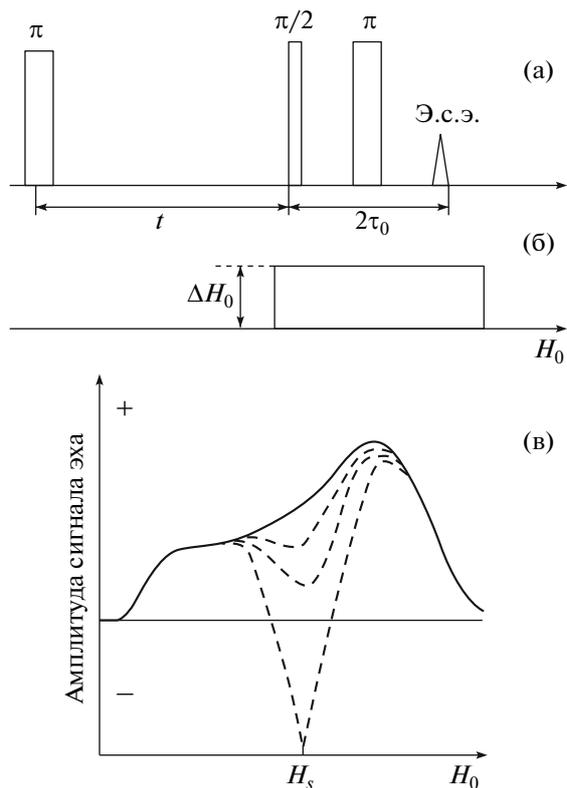
В спектроскопии PELDOR на современном уровне определяются не только расстояния, но и функция распределения по расстояниям  $F(r)$ . Границы ее надежного определения лежат в этой же области.

### МЕТОД PELDOR СО СКАЧКОМ $H_0$

Как было показано, введение импульсов накачки на второй частоте в с.в.ч.-диапазоне требует дополнительно источника и специальной конструкции резонатора — бимодального или низкочастотного мономодального. Альтернативный путь — быстро изменить напряженность магнитного поля  $H_0 = \nu_A / \gamma$  так, чтобы она стала соответствовать частоте импульса накачки  $\nu_B = \gamma (H_0 + \Delta H_0)$ .

Эксперименты PELDOR по такой методике были предложены и выполнены для измерений времени спин-решеточной релаксации  $T_1$  спектральной диффузии [85], передачи насыщения в спектрах э.п.р., для изучения механизмов молекулярных движений [86–88]. В этих экспериментах использована импульсная последовательность  $\pi - t - \pi/2 - \tau_0 - \pi$  (рис. 14а). Первый импульс обращает вектор намагниченности  $M_0$ , а второй и третий — формируют сигнал э.с.э. Время  $\tau_0$  фиксировано, а  $t$  меняется в интервале от двух до нескольких микросекунд. В отличие от трехимпульсного метода PELDOR здесь вместо импульса накачки формируется скачок напряженности магнитного поля  $\Delta H_0$  в виде прямоугольного импульса, который подается в интервале между вторым, третьим импульсами и сигналом эха (рис. 14б).

Передача насыщения в этих экспериментах может быть исследована двумя способами — изменением величины  $\Delta H$  при фиксированном времени  $t$  или изменением времени  $t$  при фиксированном скачке поля  $\Delta H_0$ . Рис. 14в иллюстрирует спектр, регистрируемый таким способом. В первом случае исследуется эволюция во времени спектрального провала, образующегося в спектре после действия первого насыщающего импульса. В экспериментах с фиксированным значением  $\Delta H_0$  исследуется кинетика восстановления сигнала

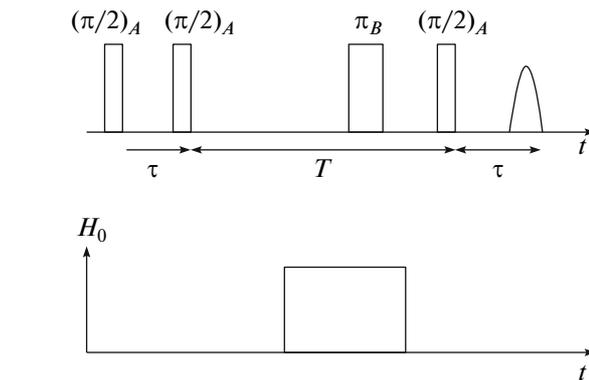


**Рис. 14.** Импульсная последовательность (а) и импульс магнитного поля (б) в экспериментах по исследованию кинетики насыщения спектра э.п.р.; восстановление спектра э.п.р., насыщенного при  $H_0 = H_s$  (в).

ла  $V(t)$  после действия насыщающего импульса в микросекундном интервале времени.

В работе [89] метод PELDOR со скачком  $H_0$  применен для определения расстояния между парамагнитными центрами. При этом для детектирования сигнала использован трехимпульсный вариант стимулированного эха (рис. 15а). Скачок магнитного поля, соответствующий импульсу накачки ( $\Delta\nu_{AB} = \gamma H$ ), приложен в момент между вторым и третьим импульсом стимулированного эха (рис. 15б). Спад сигнала стимулированного эха исследуется в зависимости от величины интервала  $\tau$  между первым и вторым импульсами.

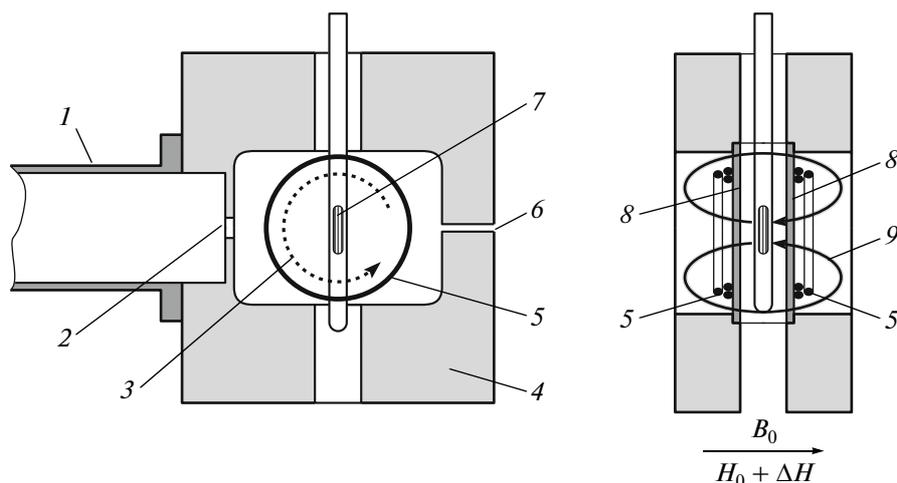
В работе [89] использован импульсный спектрометр ESP-380 фирмы Брукер. Для экспериментов со скачком  $H_0$  был изготовлен специальный прямоугольный резонатор с колебаниями типа  $H_{102}$ . Импульс магнитного поля в нем создавался подачей тока в катушки Гельмгольца — два кольца со средним диаметром 24 мм, прикрепленные к плоским стенкам резонатора. Каждое кольцо состояло из трех витков изолированной медной проволоки, а стенки резонатора выполнялись из тонкой фольги (25 мкм) из немагнитной нержавеющей стали с сопротивлением  $1 \text{ Ом} \cdot \text{мм}^2/\text{м}$ . Малая проводимость стенок обеспечивала низкую собственную добротность резонатора, что необходимо для PELDOR-экспериментов в  $X$ -диапазоне. Конструкция резонатора показана на рис. 16. Генератор импульсов тока, создающих скачок поля, содержит цепи коррекции для получения максимально плоской вершины импульса поля при минимальной длительности фронтов (из-за токов Фуко в стенках резонатора формы импульсов тока и поля разные). Времена нарастания и спада импульса магнитного поля определяли по сдвигу линии э.п.р. эхо-детектированного спектра. Их величина составила  $\sim 1$  мкс. Для импульса тока эти времена значительно меньше,  $\sim 300$  нс. Максимальная амплитуда импульса магнитного поля составила  $\pm 170$  Гс, длительность импульсов варьировалась в диапазоне 1.0 мс–1.0 с. Другие детали эксперимента приведены в работе [89].



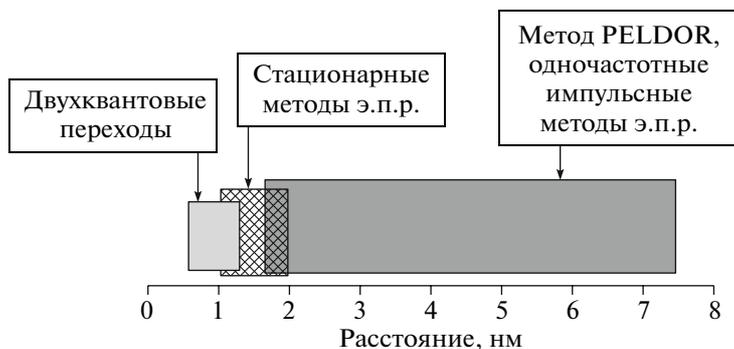
**Рис. 15.** Импульсная последовательность  $(\pi/2)_A-\tau-(\pi/2)_A-T-(\pi/2)_A-\tau$ -эхо для метода PELDOR со скачком магнитного поля. Импульс накачки  $\pi_B$  приложен в интервале  $T$  и сдвинут за счет действия импульса магнитного поля  $\Delta H_0$  с частоты  $\nu_A$  на частоту  $\nu_B = \nu_A - \gamma \Delta H_0$ .

Подобная установка для экспериментов PELDOR со скачком магнитного поля в  $W$ -диапазоне описана в работе [48]. Отметим, что в приборе  $W$ -диапазона особенно проявляется преимущество этого метода по сравнению с двухчастотным методом PELDOR — можно применять высокодобротный резонатор, т.е. реализовывать максимально возможную чувствительность.

Представляется, что метод PELDOR со скачком магнитного поля весьма перспективен, так как в этом случае удается исключить использование достаточно дорогой аппаратуры для генерирования с.в.ч.-импульсов накачки в спектрометре PELDOR. Этот вариант, по сути, имеет все преимущества существующих одночастотных импульсных методов э.п.р.



**Рис. 16.** Конструкция резонатора  $X$ -диапазона для PELDOR-экспериментов со скачком поля. 1 – волновод; 2 – отверстие связи; 3 – импульсный ток; 4 –  $H_{012}$ -резонатор из бронзы; 5 – витки, создающие магнитное поле; 6 – щель; 7 – образец; 8 – стенки резонатора, фольга из нержавеющей стали; 9 – силовые линии высокочастотного магнитного поля.



**Рис. 17.** Шкала расстояний, доступных для определения разными методами э.п.р., в хаотически ориентированных системах.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В заключение сопоставим PELDOR с другими структурными методами, с тем чтобы определить его место среди них и еще раз суммировать его преимущества и недостатки.

Рентгеновская кристаллография является наиболее распространенным методом определения расстояний между атомами. При этом необходимо вырастить достаточно большие монокристаллы из исследуемого вещества. В случае биомолекул возникают проблемы при получении монокристаллов из-за недостатка исходного вещества, большого молекулярного веса и плохой растворимости. Эти проблемы, как правило, особенно трудно обойти, если исследуются сложные биологические комплексы, такие как белково-мембранные.

Методы э.п.р., в частности PELDOR, не имеют таких ограничений. Для исследования достаточно нескольких пикомолей биомолекул, кото-

рые можно исследовать в самых различных молекулярных окружениях и в виде комплексов с другими биосистемами. Важнейшая особенность PELDOR состоит в том, что этот метод позволяет исследовать хаотически ориентированные образцы.

В хаотически ориентированных системах расстояния могут определяться методом флуоресцентной резонансной передачи энергии [90]. С помощью этого оптического метода исследуется квантовый выход флуоресценции при передаче энергии между донором и акцептором – хромофорами, введенными в качестве меток в молекулу. Механизм этой передачи связан с диполь-дипольным взаимодействием наведенных электрических диполей, и его эффективность пропорциональна  $\alpha/r^6$ , где  $\alpha$  есть функция, определяемая в дополнительных экспериментах. Метод получил достаточно широкое распространение благодаря высокой чувствительности (в экспериментах мо-

жет регистрироваться до одной молекулы) и возможности проведения измерений в жидкой фазе. Диапазон измеряемых здесь расстояний примерно совпадает с диапазоном PELDOR. Недостаток — необходимость независимого определения функции  $\alpha$ , более жесткие и объемные хромофоры по сравнению со спиновыми метками, что ведет к существенным проблемам при интерпретации измеренных расстояний, к меньшей точности при определении  $r$  и невозможности определения  $F(r)$ .

Для измерений расстояний порядка нескольких нанометров широко используется метод я.м.р. Для твердых тел, однако, он имеет ряд ограничений. Если невозможно получить исследуемый образец в виде монокристалла, для измерений расстояний между ядрами в твердых телах метод я.м.р., как правило, применяется с использованием ориентирующих сред, таких как бислои или мицеллы. При расчетах расстояний в ориентирующих средах необходимо знать параметр, характеризующий степень ориентации среды. Трудности возникают и при исследовании методом я.м.р. малых количеств больших биомолекул. Из-за меньших магнитных моментов ядер по сравнению с магнитным моментом электрона диапазон измеряемых расстояний в твердотельном я.м.р. обычно ограничен несколькими нанометрами. Несомненные преимущества метода я.м.р. — его универсальность, высокий уровень аппаратной разработки и доступность. При использовании метода я.м.р. не нужно вводить специальные метки и возможно определение расстояний между разными ядрами.

Простейший метод измерения расстояний по дипольному уширению — анализ ширины и формы линии в стационарных спектрах э.п.р. Разработаны методы расчета формы спектров, методы математической деконволюции. В расчет включаются не только дипольные, но и обменные и квадрупольные взаимодействия, дающие вклад в неоднородную ширину линий. Характерная область применения таких расчетов  $r < 1.5\text{--}2$  нм, поскольку для больших расстояний вклад дипольных взаимодействий по сравнению с другими становится меньше, и расчеты не дают надежных результатов.

Отметим так называемый метод половинного поля, работающий в области малых расстояний. Обычно запрещенные переходы для пары спинов в триплетном состоянии между уровнями с  $m_s = -1$  и  $m_s = +1$  оказываются возможными для близких спинов ( $r \sim 4\text{--}5$  Å) и лежат в полях  $(1/2)H_0$  ( $g \sim 4$ ), где  $H_0$  — резонансное поле э.п.р. для основного перехода. Интенсивность линий за счет этих переходов  $I_{\pm 1}$  по сравнению с линиями на  $g \sim 2$  мала, но, согласно теории [91],  $I_{\pm 1}/I_0 \sim 1/r^6$ , что позволяет оценить  $r$ . Обзор различных стационарных и

некоторых импульсных методов э.п.р. можно найти в монографии [92].

В настоящее время получили наибольшее распространение трех- и четырехимпульсные варианты метода PELDOR. Значительно реже используются одночастотные импульсные методы, такие как “2 + 1” [93] или SIFTER (Single frequency technique for refocusing dipolar couplings) [94]. Вместе с тем следует отметить разработку одночастотного метода DQC и серию приложений к нему [95, 96]. В этом методе спектр э.п.р. возбуждается полностью серией из шести импульсов и исследуется спад одного из сигналов спинового эха, который модулирован дипольными частотами. Специальная импульсная последовательность позволяет выделить парное дипольное взаимодействие. Аппаратурное обеспечение метода и его теоретическое обоснование значительно сложнее, чем метода PELDOR.

Детальный обзор исследований строения и свойств различных биомолекулярных структур, выполненных с помощью метода DQC, опубликован недавно в работе [97]. Как уже отмечалось, этот метод эффективен при измерениях больших расстояний, до  $r \sim 7.0\text{--}8.0$  нм, и обладает более высокой чувствительностью благодаря полному, а не частичному, как в PELDOR, возбуждению спектра импульсами.

Метод DQC, как и другие импульсные методы, из-за технических трудностей пока, к сожалению, используется лишь в единичных лабораториях.

На современном этапе развития радиоспектроскопии и ее приложений метод PELDOR занимает важное место среди других, структурно ориентированных методов, таких как стационарные и различные импульсные варианты методов э.п.р., я.м.р., я.к.р. Особенность PELDOR — относительная простота методики, обуславливающая его доступность для экспериментального освоения в большинстве радиоспектроскопических лабораторий, а также развитость методов интерпретации результатов. Недостаток, связанный с необходимостью вводить в исследуемые системы парамагнитные центры, такие как спиновые метки, компенсируется широким арсеналом специальных химических методов, предложенных в настоящее время, для введения меток в простые молекулы и сложные биологические структуры. На рис. 17 представлены возможности стационарной и импульсной спектроскопии э.п.р. при измерениях расстояний между парамагнитными частицами в хаотически ориентированных твердых образцах.

В заключение суммируем основные особенности метода PELDOR. Метод PELDOR позволяет:

— снять неоднородное уширение линий в спектрах э.п.р. и получить сведения о диполь-ди-

польных магнитных взаимодействиях в хаотически ориентированных системах;

– проводить измерения расстояний между парамагнитными центрами с хорошей точностью в диапазоне 1.5–8 нм;

– из спада сигнала PELDOR рассчитать функцию распределения по расстояниям  $F(r)$  и определить особенности пространственного распределения парамагнитных центров, а также их взаимную ориентацию;

– определить число  $N$  дипольно взаимодействующих центров в пространственно ограниченных группах (комплексах, агрегатах, кластерах и т.п.).

При наличии импульсных спектрометров э.п.р. метод аппаратурно доступен для применений широкому кругу исследователей. Теория метода достаточно детально разработана для анализа результатов экспериментов и получения структурной информации.

Следует еще раз подчеркнуть, что PELDOR-спектроскопия позволяет не только с хорошей точностью проводить измерения расстояний между парамагнитными центрами и получать сведения об их распределении в хаотически ориентированных системах, но и исследовать процессы самосборки, образования супрамолекулярных комплексов, взаимодействия с мембранами различных биологически важных структур, а также динамические процессы с участием парамагнитных частиц. Нет сомнений, что PELDOR-спектроскопия, как и химическая радиоспектроскопия э.п.р. высокого разрешения, будет находить все больше применений в физике, химии и биологии.

Авторы благодарны И.П. Цветковой и О.В. Полукариковой за помощь при подготовке рукописи и D. Goldfarb, T. Prisner, H. Hofera, а также издательства Elsevier и Wiley за любезное разрешение использовать иллюстрации из опубликованных ими работ.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке по грантам научных школ (НШ-551.2008.3), РФФИ-ННИО (09-03-91335-ННИО-а), программы 7 ОХНМ РАН, по интеграционному проекту СО РАН № 51.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Салихов К.М., Семенов А.Г., Цветков Ю.Д. // В кн. "Электронное спиновое эхо и его применение". Новосибирск: Наука, 1976. С. 342.
2. Цветков Ю.Д. // Изв. АН СССР. Сер. хим. 1976. Т. 4. С. 90.
3. Salikhov K.M., Tsvetkov Yu.D. // In Time Domain Electron Spin Resonance. N.Y.: John Wiley & Sons, 1979. P. 231.
4. Цветков Ю.Д. // Успехи химии. 1983. Т. 52. С. 1490.
5. Dikanov S.A., Tsvetkov Yu.D. // Electron Spin Echo Envelope Modulation (ESEEM) Spectroscopy. London: CRC Press, 1992. P. 412.
6. Милов А.Д., Салихов К.М., Щиров М.Д. // Физика твердого тела. 1981. Т. 23. С. 975.
7. Милов А.Д., Пономарев А.Б., Цветков Ю.Д. // Журн. структ. хим. 1984. Т. 25. С. 51.
8. Цветков Ю.Д., Милов А.Д., Марьясов А.Г. // Успехи химии. 2008. Т. 6. С. 515.
9. Kaplan A.D., Hahn E.L. // J. Phys. Radium. 1958. V. 19. P. 821.
10. Graf R., Demco D.E., Gottwald J. et al. // J. Chem. Phys. 1997. V. 106. P. 885.
11. Pannier M., Veit S., Godt A. et al. // J. Magn. Reson. 2000. V. 142. P. 331.
12. Maryasov A.G., Tsvetkov Yu.D. // Applied Magn. Reson. 2000. V. 18. P. 583.
13. Bowman M.K., Maryasov A.G. // J. Magn. Reson. 2007. V. 185. P. 270.
14. Milov A.D., Samoiloa R.I., Tsvetkov Yu.D. et al. // Appl. Magn. Reson. 2002. V. 23. P. 81.
15. Tikhonov A.N., Arsenin V.Y. Solutions of ill-posed Problems. N.Y.: Wiley, 1977.
16. Bowman M.K., Maryasov A.G., Kim N. et al. // Appl. Magn. Reson. 2004. V. 26. P. 23.
17. Jeschke G., Koch A., Jonas U. et al. // J. Magn. Reson. 2002. V. 155. P. 72.
18. Milov A.D., Tsvetkov Yu.D., Formaggio F. et al. // J. Phys. Chem. B. 2003. V. 107. P. 13719.
19. Jeschke G., Panek G., Godt A. et al. // Appl. Magn. Reson. 2004. V. 26. P. 223.
20. Chiang Y.-W., Borbat P.P., Freed J.H. // J. Magn. Reson. 2005. V. 172. P. 279.
21. Milov A.D., Naumov B.D., Tsvetkov Yu.D. // Appl. Magn. Reson. 2004. V. 26. P. 587.
22. Savitsky A., Dubinskii A., Flores M. et al. // J. Phys. Chem. B. 2007. V. 111. P. 6245.
23. Marko A., Margraf D., Yu H. et al. // J. Chem. Phys. 2009. V. 130. P. DOT 064102.
24. Maryasov A.G., Dzuba S.A., Salikhov K.M. // J. Magn. Reson. 1982. V. 50. P. 432.
25. Марьясов А.Г. // Дис. ... канд. физ.-мат. наук. Новосибирск: ИХКиГ, 1988.
26. Джепаров Ф.С., Хеннер Е.К. // ЖЭТФ. 1989. Т. 96. С. 1844.
27. Dzheparov F.S., Henner E.K. // Phys. Stat. Solidi. B. 1989. V. 151. P. 663.
28. Мимс В.Б. // Приборы для научных исследований. 1965. № 10. С. 78.
29. Блумберг В.Б., Мимс В.Б., Цукерман Д. // Приборы для научных исследований. 1973. № 5. С. 10.
30. Хьюзен А., Хайд Дж.С. // Приборы для научных исследований. 1974. № 11. С. 57.
31. The new technology X-band microwave bridge for cw and FT-EPR // Bruker report. 2001. V. 149. P. 14.
32. Holczer K., Schmalbein D. // Bruker report. 1987. V. 1. P. 22.
33. Hofer P. // Bruker Report. 1988. V. 116. P. 15.

34. *Barth H., Hofer P., Holczer K.* // Bruker Report. 1988. V. 114. P. 2.
35. The BRUKER FT-EPR Spectrometer ESP 380, in Pulsed EPR: a new field of application. Amsterdam: North Holland, 1989. P. 81.
36. Bruker BioSpin. ELEXSYS spectrometer series. <http://www.reuker-biospin.com/elexsys>
37. *Bender C.J.* // Biological Magnetic Resonance. 2004. V. 21. P. 1.
38. *Bender C.J.* // Biological Magnetic Resonance. 2004. V. 21. P. 212.
39. *Пул Ч.* Техника ЭПР-спектроскопии. М.: Мир, 1970. С. 557.
40. *Семенов А.Г., Широв М.Д., Жидков В.Д. и др.* Препринт № 3. Новосибирск: Институт химической кинетики и горения СО РАН, 1980.
41. *Mizuta Y., Kohno M., Fuji K.* // Jpn. J. Appl. Phys. 1993. V. 32. P. 1262.
42. *Hofer P., Kamlowski A.* // Bruker report. 2001. V. 149. P. 16.
43. *Hofer P., Heilig R., Maier D.C. et al.* // Bruker report. 2003. V. 152. P. 37.
44. *Carl P., Heilig R., Maier D.C. et al.* // Bruker report. 2004. V. 154/155. P. 35.
45. *Borbat P.P., Crepeau R.H., Freed J.H.* // J. Magn. Reson. 1997. V. 127. P. 155.
46. *Goldfarb D., Lipkin Ya., Potapov A. et al.* // J. Magn. Reson. 2008. V. 194. P. 8.
47. *Moebius K., Savitsky A., Schnegg A. et al.* // Phys. Chem. Chem. Phys. 2005. V. 7. P. 19.
48. *Doubinskii A.A., Grishin Yu.A., Savitsky A.N. et al.* // Appl. Magn. Reson. 2002. V. 22. P. 369.
49. *Moebius K., Savitsky A.* High-Field EPR Spectroscopy on Proteins and their Model (Systems Characterization of Transient Paramagnetic States). London: RSC Publishing, 2008. P. 375.
50. *Rohrer M., Brughmann O., Kinzer B. et al.* // Appl. Magn. Reson. 2001. V. 21. P. 257.
51. *Hertel M.M., Denysenkov V.P., Bennati M. et al.* // Magn. Reson. Chem. 2005. V. 43. P. 248.
52. *Denysenkov V.P., Prisner T.F., Stubbe J. et al.* // Appl. Magn. Reson. 2005. V. 29. P. 375.
53. *Denysenkov V.P., Prisner T.F., Stubbe J. et al.* // PNAS. 2006. V. 103. P. 13386.
54. *Denysenkov V.P., Biglino D., Lubitz W. et al.* // Angew. Chem. Int. Ed. 2008. V. 47. P. 1224.
55. *Дэвис Дж.Л., Мимс В.Б.* // Приборы для научных исследований. 1981. № 1. С. 147.
56. *Нараяна П.А., Массот Р.Дж., Кеван Л.* // Приборы для научных исследований. 1982. № 5. С. 71.
57. *Cho H., Pfenninger S., Gemperle C. et al.* // Chem. Phys. Lett. 1989. V. 160. P. 391.
58. *Hofer P., Carl P.* // Bruker report. 2008. V. 157/158. P. 52.
59. *Piasecki W., Froncisz W.* // Rev. Sci. Instr. 1996. V. 67. P. 1896.
60. *Rinard G.A., Eaton G.R.* // Biological Magnetic Resonance. 2004. V. 24. P. 1.
61. *Пфеннингер С., Форрер Дж., Швайгер А. и др.* // Приборы для научных исследований. 1988. № 5. С. 66.
62. *Schweiger A., Ernst R.R.* // J. Magn. Reson. 1988. V. 77. P. 512.
63. *Волино Ф., Чаквари Ф., Серво-Гавен П.* // Приборы для научных исследований. 1968. № 11. С. 50.
64. *Mehring M., Freysoldt F.* // J. Phys. E: Sci. Instruments. 1980. V. 13. P. 894.
65. *Hyde J.S., Froncisz W.* // In Advanced EPR: Amsterdam: Elsevier, 1989. P. 277.
66. *Biehl R., Schmailbein D., Laukien G.* US Patent № P3300767.5. 1984.
67. *Biehl R.* // Bruker report. 1986. V. 1. P. 45.
68. *Bendersky V., Blumenfeld L., Staunzas P. et al.* // Nature. 1968. V. 220. P. 365.
69. *Hyde J., Chion J., Freed J.* // J. Chem. Phys. 1968. V. 48. P. 421.
70. *Hyde J.S., Jun-Jie Yin, Froncisz W. et al.* // J. Magn. Reson. 1985. V. 63. P. 142.
71. *Rinard G.A., Quine R.W., Ghim B.T. et al.* // J. Magn. Reson. 1996. V. A 122. P. 50.
72. *Rinard G.A., Quine R.W., Ghim B.T. et al.* // J. Magn. Reson. 1996. V. A 122. P. 58.
73. *Mailer C., Haas D.A., Hustedt E.J. et al.* // J. Magn. Reson. 1991. V. 91. P. 475.
74. *Keijzers C.P., Reijerse E.J., Schmidt J.* Pulsed EPR: a new field of application. Amsterdam: North Holland, 1989. P. 238.
75. *Bender C.J.* // Biological Magnetic Resonance. 2004. V. 21. P. 115.
76. *Rinard G.A., Quine R.W., Eaton S.S. et al.* // J. Magn. Reson. 1994. V. A 108. P. 71.
77. *Hyde J.S., Froncisz W., Oles T.* // J. Magn. Reson. 1989. V. 82. P. 223.
78. *Schweiger A., Jeschke G.* Principles of pulse electron paramagnetic resonance. Oxford Univ. Press., 2001. P. 578.
79. *Rinard G.A., Quine R.W., Eaton S.S. et al.* // Biological Magnetic Resonance. 2004. V. 21. P. 115.
80. *Prisner T.F., Rohrer M., Moebius K.* // Appl. Magn. Reson. 1994. V. 7. P. 167.
81. *Romanelli M., Kurshev V., Kevan L.* // Appl. Magn. Reson. 1994. V. 7. P. 427.
82. *Davoust C.E., Doan P.E., Hoffman B.M.* // J. Magn. Reson. 1996. V. A 119. P. 38.
83. *Klug C.S., Camenish T.G., Hubbell W.L. et al.* // Biophys. J. 2005. V. 88. P. 3641.
84. *Райцимринг А.М., Салихов К.М., Уманский Б.А. и др.* // ФТТ. 1974. Т. 16. С. 756.
85. *Rengan S.K., Rhagat V.R., Sastry V.S.S. et al.* // J. Magn. Reson. 1979. V. 33. P. 227.
86. *Дзюба С.А., Цветков Ю.Д.* // Химическая физика. 1982. Т. 9. С. 1197.
87. *Dzuba S.A., Maryasov A.G., Salikhov K.M. et al.* // J. Magn. Reson. 1984. V. 58. P. 95.
88. *Kispert L.D.* // Biological Magnetic Resonance. 2004. V. 24. P. 65.
89. *Kulik L.V., Grishin Yu.A., Dzuba S.A. et al.* // J. Magn. Reson. 2002. V. 157. P. 1.
90. *Lakowicz J.R.* Principles of Fluorescence Spectroscopy. N.Y.: Springel, 2006. P. 250.

91. *De Groot M.S., Van der Waals J.H.* // *Molecular Phys.* 1960. V. 3. P. 190.
92. *Berliner L.J., Eaton S.S., Eaton G.R.* Distance Measurements in Biological Systems by EPR. *Biological Magnetic Resonance.* V. 19. N.Y.: Kluwer/Plenum, 2000. P. 614.
93. *Kurshev V.V., Raitsimring A.M., Tsvetkov Yu.D.* // *J. Magn. Reson.* 1989. V. 81. P. 441.
94. *Jeschke G., Pannier M., Godt A. et al.* // *Chem. Phys. Lett.* 2000. V. 331. P. 243.
95. *Borbat P.P., Freed J.H.* // *Chem. Phys. Lett.* 1995. V. 313. P. 145.
96. *Borbat P.P., Freed J.H.* // *Biological Magnetic Resonance.* 2000. V. 19. P. 383.
97. *Borbat P.P., Freed J.H.* // *EPR Newsletter.* 2007. V. 17. P. 21.