

ЭПР – всегда в резонансе

**Электронный парамагнитный резонанс
в химии, материаловедении и биологии**

С. Л. ВЕБЕР,
М. Ю. ИВАНОВ,
О. А. КРУМКАЧЕВА,
И. В. КУРГАНСКИЙ,
О. В. МИНАКОВА,
Д. М. ПОЛЮХОВ,
А. С. ПОРЬВАЕВ,
И. О. ТИМОФЕЕВ,
С. В. ТУМАНОВ,
М. В. ФЕДИН



Впервые сигнал ЭПР (электронного парамагнитного резонанса) наблюдал на самодельной установке 21 января 1944 г. молодой научный сотрудник Казанского государственного университета Е. К. Завойский. Когда в конце того же года он приехал в Москву представить эти результаты на семинаре в знаменитом ФИАНе (Физическом институте им. П. Н. Лебедева), то, как писал академик П. Л. Капица, «его прогнали оттуда, сказав, что этого не может быть. Тогда я предложил ему у нас сделать прибор. За неделю сделали. Потом позвали фиановцев и показали: смотрите, вот ведь, штука работает». Метод ЭПР стал первым работающим магнитно-резонансным методом в мире и остается ключевым для изучения «магнитных» веществ. Как отметил лауреат Международной премии им. Завойского, американский ученый Д. Фрид, «никто и мечтать не мог об огромной сфере применений этой техники сегодня в химии, физике, биологии, материаловедении и медицине»

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ:

Сотрудники лаборатории ЭПР спектроскопии Международного томографического центра СО РАН (Новосибирск): старший научный сотрудник, канд. физ.-мат. наук Сергей Леонидович ВЕБЕР; научный сотрудник, канд. физ.-мат. наук Михаил Юрьевич ИВАНОВ; старший научный сотрудник, канд. физ.-мат. наук Олеся Анатольевна КРУМКАЧЕВА; младшие научные сотрудники: Иван Викторович КУРГАНСКИЙ, Даниил Максимович ПОЛЮХОВ, Артем Сергеевич ПОРЬВАЕВ, Иван Олегович ТИМОФЕЕВ, Сергей Витальевич ТУМАНОВ; лаборант Ольга Владимировна МИНАКОВА; заведующий лабораторией, заместитель директора по научной работе, д-р физ.-мат. наук, профессор РАН Матвей Владимирович ФЕДИН

Коллектив лаборатории ЭПР спектроскопии МТЦ СО РАН: слева направо, верхний ряд – О. В. Минакова, С. Л. Вебер, О. А. Крумкачева, А. А. Кужелев, М. В. Федин, И. В. Курганский, С. В. Туманов, И. О. Тимофеев; нижний ряд – Д. М. Полюхов, А. С. Порываев, М. Ю. Иванов

Ключевые слова: электронный парамагнитный резонанс (ЭПР), молекулярный магнетизм, ионные жидкости, металлоорганические каркасы, биополимеры.

Key words: electron paramagnetic resonance (EPR), molecular magnetism, ionic liquids, metal-organic frameworks, biopolymers

Слева – «Элементарные частицы». Рис. Е. К. Завойского. Пастель. Москва, 1973–1976 гг. Из фонда музейных предметов и музейных коллекций Казанского (Приволжского) федерального университета

© С. Л. Вебер, М. Ю. Иванов, О. А. Крумкачева, И. В. Курганский, О. В. Минакова, Д. М. Полюхов, А. С. Порываев, И. О. Тимофеев, С. В. Туманов, М. В. Федин, 2020

АКАДЕМИК АН СССР Е. К. ЗАВОЙСКИЙ (1957):

«Представьте себе, что вы настраиваете радиоприемник, т. е. ловите нужную вам волну. Вы вращаете ручку настройки, меняя при этом частоту приемника. Когда она совпадает с частотой работающей радиостанции, вы слышите передачу. Так и в магнитных телах. Их атомы обладают собственными частотами. Если воздействовать на атомы соответствующими радиоволнами, то они отзовутся определенными колебаниями, иначе говоря, будут резонировать.

Посредством парамагнитного резонанса оказалось возможным изучать разнообразие особенности веществ, недоступные наблюдению другими способами, даже рентгеновскими лучами и оптическими методами. Радиоспектроскопами можно исследовать вещество в дозах, исчисляемых одной стомиллионной грамма. Это примерно в тысячу раз меньше веса точки, сделанной отточенным карандашом. Наблюдая ПР, ученые исследуют ход сложных химических реакций, процессы обмена веществ в живых организмах, определяют некоторые свойства атомного ядра»

Первооткрыватель электронного парамагнитного резонанса Е. К. Завойский. Внизу – отреставрированная установка для наблюдения ЭПР, на которой ученый сделал свое открытие в 1944 г. Фото 1997 г. Из фонда музейных предметов и музейных коллекций Казанского (Приволжского) федерального университета

Магнитным резонансом называют явление резонансного поглощения энергии переменного электромагнитного поля системой, включающей в себя фрагменты, обладающие не равным нулю собственным магнитным моментом – спином. Это поглощение вызывает переходы между энергетическими уровнями, обусловленными различными пространственными ориентациями спинов. В случае ядер такое явление называют ядерным магнитным резонансом (ЯМР), электронов – электронным парамагнитным резонансом (ЭПР)



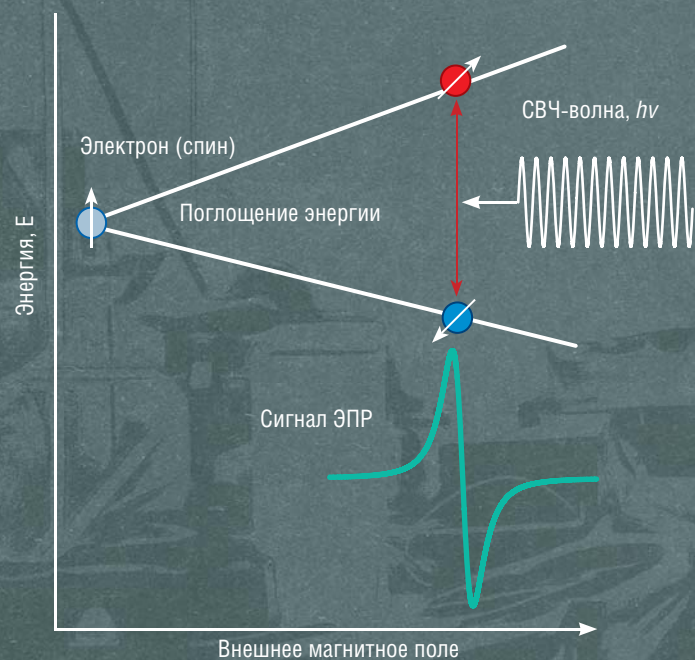
В наши дни метод *электронного парамагнитного резонанса* (ЭПР) получил гораздо меньшее распространение, чем *ядерного магнитного резонанса* (ЯМР), хотя оба метода взаимно дополняют друг друга и во многих приложениях идут бок о бок. При этом если с помощью ЯМР в основном изучают *диамагнитные* вещества, не проявляющие магнитные свойства в привычном смысле этого слова, то ЭПР позволяет изучать *парамагнитные* молекулы и материалы («магнитные» вещества), способные намагничиваться в направлении внешнего магнитного поля.

При помещении парамагнетика в такое магнитное поле уровни его энергии, связанные с собственным магнитным моментом электрона (*спином*), расщепляются. Величина этого расщепления, в частности, зависит от величины внешнего магнитного поля. Ключевой момент метода ЭПР состоит в том, что переходы между различными уровнями энергии можно вызвать, если приложить к парамагнетику дополнительное переменное, как правило, *сверхвысокочастотное* (СВЧ) электромагнитное поле. Однако это становится возможным лишь тогда, когда квант энергии переменного поля равен величине энергетического зазора между двумя спиновыми уровнями. Именно поэтому поглощение энергии в данном случае называется *резонансным*.

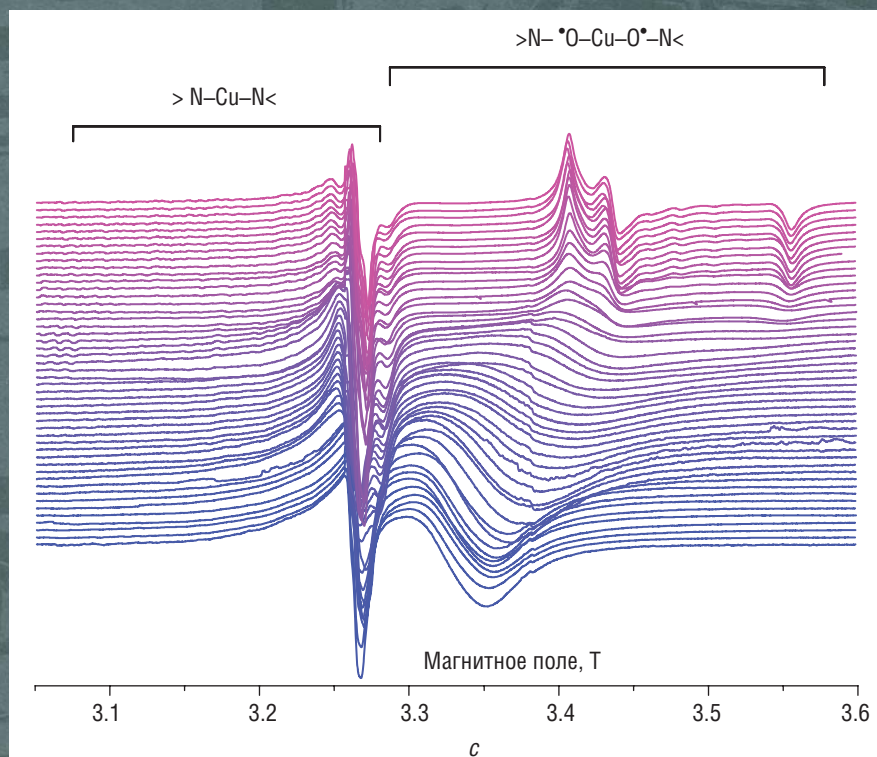
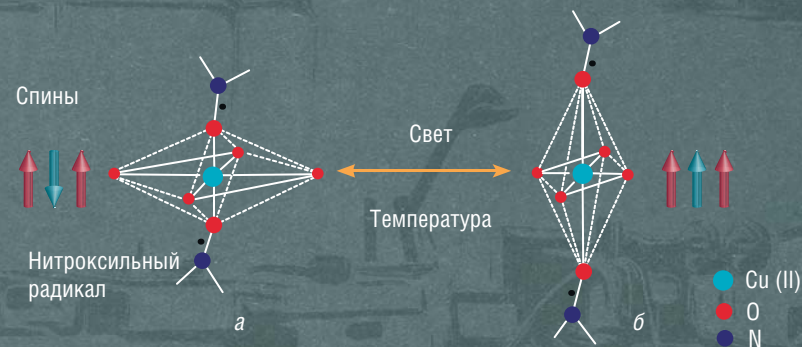
Как правило, когда мы изучаем новое вещество, то ничего не знаем о его магнитных свойствах. Но вот частоту приложенного СВЧ-поля мы задаем

Установка для исследований методом электронного парамагнитного резонанса в лаборатории ЭПР-спектроскопии Международного томографического центра СО РАН (Новосибирск). Современный спектрометр работает не только в стационарном, но и в импульсном режиме, а диапазон магнитных полей, которые в нем используются, в разы больше, чем у «прародителя»





Как получается простейший спектр ЭПР? При помещении в сильное постоянное магнитное поле образца с неспаренными электронами (например, со спином $S = 1/2$) спиновые уровни энергии расщепляются. Верхний уровень отвечает проекции спина вдоль направления внешнего магнитного поля, нижний – против. Расщепление между энергетическими уровнями растет с ростом приложенного внешнего магнитного поля. Когда разница энергий совпадет с энергией подаваемой СВЧ-волны, наблюдается резонансное поглощение ($h\nu = \Delta E$). Как правило, в эксперименте излучение СВЧ подают непрерывно, а мощность магнитного поля меняют так, чтобы «найти» положение резонанса. Конкретная форма спектра ЭПР связана с техническими особенностями детектирования



Фрагменты медь-нитроксильных молекулярных магнетиков – координационные октаэдры меди – в зависимости от условий могут иметь разную форму: быть вытянутыми либо перпендикулярно оси, содержащей нитроксильные радикалы (а), либо вдоль нее (б). Магнитные взаимодействия между спинами иона меди и радикалов в этих двух ситуациях отличаются, что и обуславливает «переключение» магнитных свойств. В зависимости от конфигурации октаэдра изменяется и спектр ЭПР (с). Самый верхний спектр получен при низких температурах, самый нижний – при высоких. По: (Fedin et al., 2015)

сами. При постепенном изменении величины внешнего магнитного поля в какой-то момент условие резонанса выполняется и СВЧ-излучение поглощается системой. Так мы получаем информацию о магнитных свойствах вещества и его электронной структуре.

С момента открытия ЭПР было создано множество различных вариантов этого метода, в которых используется постоянное или импульсное СВЧ-поле, а также комбинации с лазерным или радиочастотным излучением. В свою очередь, сами импульсные методы включают огромное число протоколов, позволяющих получать информацию не только об электронах, но и об окружающих их ядрах. В настоящее время метод ЭПР стал важным структурным методом исследования химических соединений, материалов и биомолекул. Особенно полезен он оказывается в тех случаях, когда наиболее мощные методы структурной химии – рентгеноструктурные – малоинформативны.

В принципе, с помощью ЭПР можно изучать лишь вещества с неспаренными электронами, например: стабильные радикалы, ионы переходных и редкоземельных металлов, фотовозбужденные молекулы и др. Однако даже абсолютно немагнитные вещества могут быть «помечены» с помощью свободных зондовых молекул либо спиновых меток (как правило, ковалентно «пришитых»), что еще более расширяет область применения ЭПР.

Все эти подходы можно рассмотреть на примере интересных задач, которые в последние годы решались в новосибирском Международном томографическом центре СО РАН с помощью метода ЭПР.

На уровне молекул

Обычные ферромагнетики, с которыми мы сталкиваемся в повседневной жизни (к примеру, объекты из переходных металлов, таких как железо), проявляют намагниченность в отсутствие внешнего магнитного поля. При этом магнетизм у них реализуется на уровне доменов с минимальными размерами в десятки нанометров, т.е. ансамблей из миллионов отдельных атомов. В то же время для высокоплотной записи информации и устройств ее обработки требуются более миниатюрные носители магнитного момента.

И здесь многообещающими кандидатами являются «магнитные молекулы», т.е. микроскопические объекты с типичным размером порядка нанометра, проявляющие полезные магнитные свойства – молекулярный магнетизм. К таким соединениям традиционно относят парамагнитные молекулы, содержащие один или несколько неспаренных электронов. При объединении множества таких молекул мы можем получить макрообъект с качественно другим магнетизмом, при этом магнитные свойства самих молекулярных магнетиков можно задавать посредством направленного молекулярного дизайна.

Молекулярный магнетизм представляет собой бурно развивающуюся область научного знания на стыке химических и физических наук, и в лаборатории ЭПР-спектроскопии проводятся исследования по нескольким направлениям в этой сфере.

Так, метод ЭПР оказался крайне информативным при исследовании магнитно-структурных аномалий

в случае молекулярных магнетиков, созданных на основе полимерных комплексов меди (II) со стабильными нитроксильными радикалами*, которые были открыты более 15 лет назад в лаборатории многоспиновых координационных соединений МТИЦ СО РАН, возглавляемой академиком В.И. Овчаренко.

Эти комплексы уникальны тем, что их магнитный момент изменяется (плавно или скачкообразно) в зависимости от температуры. Подобные проявления типичны для так называемого *спинового кроссовера*, когда под влиянием внешних воздействий в переходном металле меняется спиновая конфигурация внутренней электронной *d*-оболочки, которую занимают валентные электроны.

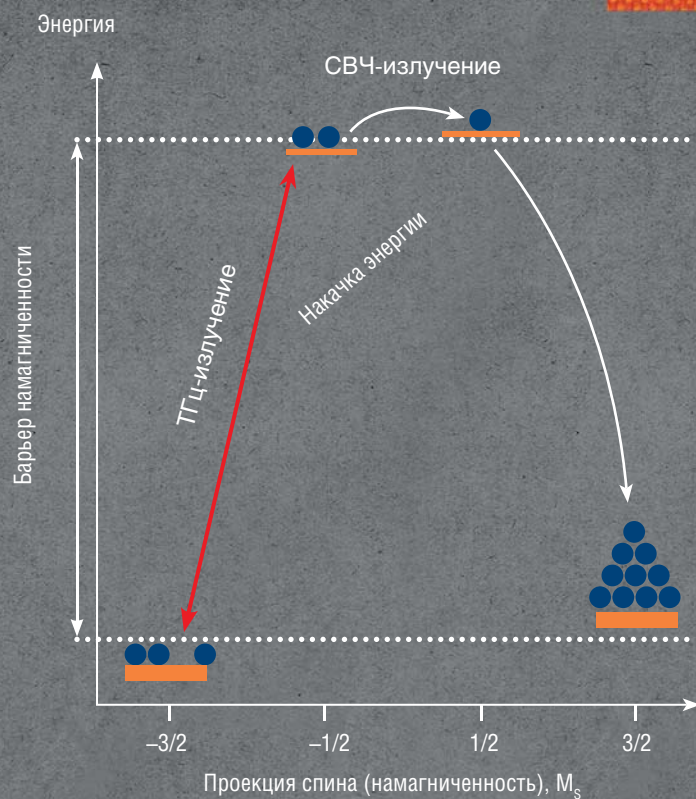
Однако в случае медь-нитроксильных соединений классический спиновый кроссовер невозможен, так как и радикалы, и медь(II) имеют лишь один неспаренный электрон со спином $S = 1/2$. Тем не менее и в этом случае может произойти изменение («переключение») полного магнитного момента всего медь-нитроксильного кластера, причем изменение магнитных свойств сопровождается и структурной трансформацией.

С помощью ЭПР в таких молекулярных магнетиках были изучены как магнитные (*обменные*) взаимодействия при «неклассических» спиновых

переходах, так и более слабые обменные взаимодействия между отдельными медь-нитроксильными кластерами. Таким образом удалось установить одномерную топологию магнитных «цепей» в кристаллах, выращенных на основе этих соединений, когда каналы, по которым распространяются магнитные взаимодействия, представляют собой однонаправленные цепочки. Наконец, с помощью лазерного возбуждения впервые было показано, что этот класс молекулярных магнетиков можно «переключать» светом, что важно для практических приложений в спинтронике.

Параллельно разрабатываются и применяются комбинированные методы ЭПР для исследования другого класса молекулярных магнетиков – *мономолекулярных магнетиков* (МММ). Явление мономолекулярного магнетизма, впервые экспериментально открытое в 1991 г., заключается в том, что вещество проявляет свойства постоянного

* Подробнее в статье «Молекулярные магнетики, или Кристаллы, которые дышат, прыгают и меняют цвет. С. 14–21.



Каждое из спиновых состояний мономолекулярного магнетика с полным спином $S = 3/2$ имеет свою энергию, при этом наиболее стабильными (нижними) являются энергетические уровни с проекциями спина электронов, равными $+3/2$ и $-3/2$. Эти уровни отвечают намагниченности вдоль направления внешнего магнитного поля или против него соответственно. Когда внешнего поля нет, эти уровни вырождены (пунктирная линия), но если его приложить, то заселится самый нижний. Поскольку между двумя стабильными уровнями имеется барьер перемагничивания U , то при достаточно низких температурах намагниченность будет сохраняться и после снятия внешнего поля. Однако МММ можно и «перемагнитить», т. е. перевести в состояние $M_s = +3/2$, для этого надо одновременно сделать накачку ТГц и СВЧ-излучением. Таким образом можно перевалить через энергетический барьер и система сама «упадет» в другое состояние

энергетически выгодной. При этом даже магнитно-изолированная молекула будет крайне медленно терять намагниченность, и основной причиной такого поведения является *магнитная анизотропия*, под которой в общем случае понимается неодинаковость магнитных свойств тел по различным направлениям.

В случае МММ речь идет о расщеплении уровней энергий спиновой системы, что приводит к формированию энергетического барьера между состояниями с противоположной намагниченностью. Для современных МММ этот барьер уже достаточно высок, и мы можем наблюдать МММ-поведение даже при температурах жидкого азота.

Чтобы использовать МММ в прикладных задачах, нужно научиться манипулировать их намагниченностью, т. е. спиновым состоянием. Так, для «перемагничивания» молекулы необходимо контролируемо пройти несколько ее спиновых состояний, разделенных энергетическим барьером. Этот барьер для большинства известных МММ лежит в терагерцовой и дальней ИК-области, и чтобы индуцировать соответствующий спиновый переход, необходим именно такой квант энергии.

Это монохроматическое излучение соответствует диапазону *лазера на свободных электронах* (ЛСЭ) в ЦКП «Сибирский центр синхротронного и терагерцового излучения» (Новосибирск). Так родился научный проект по изучению МММ, совместный с Институтом ядерной физики СО РАН. В его рамках была создана исследовательская станция ЭПР-спектроскопии, на которой проводят уникальные эксперименты с целью научиться контролируемо «перемагничивать» МММ путем селективного возбуждения спиновых переходов лазерным излучением.

Спиновые зонды (например, молекулы фуллеренов) в ионной жидкости могут попадать в разные микроокружения. На рисунке одна из таких зондовых молекул (отмечена зеленым цветом) окружена ароматическими фрагментами ионной жидкости, а другие (синим цветом) — преимущественно алкильными цепочками катионов. По: (Ivanov, Fedin, 2018)

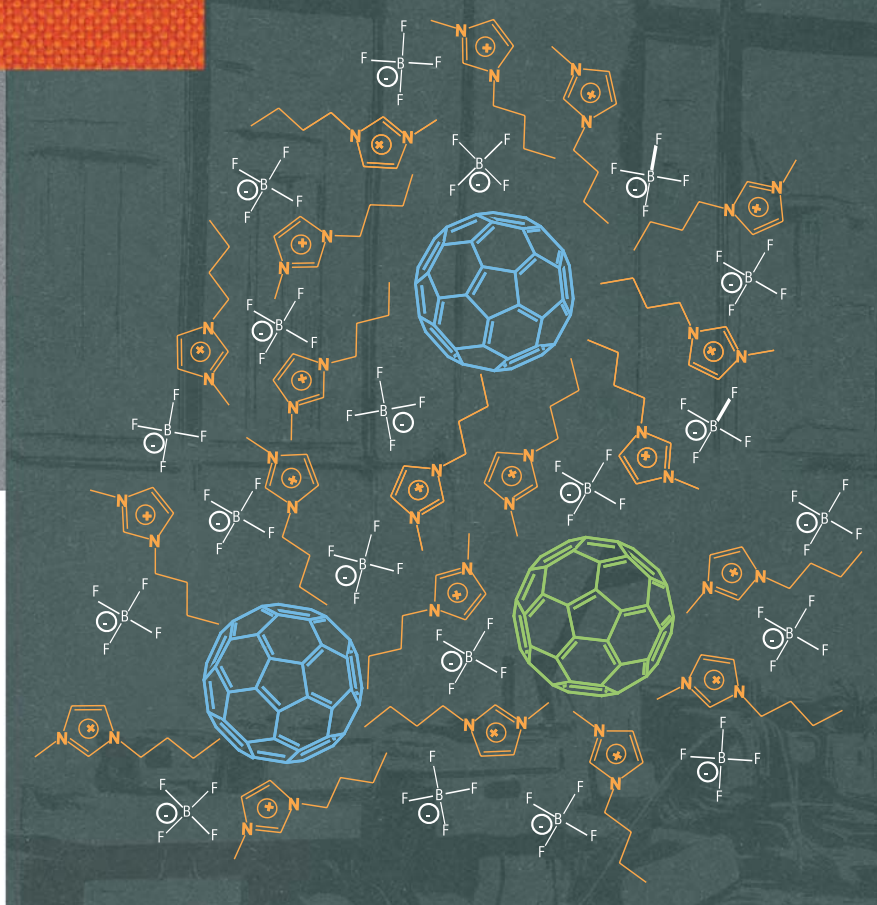
Сам себя организовал

Ряд необычных свойств могут проявлять и так называемые *самоорганизующиеся системы*, в которых идет упорядочивание в нано- и микромасштабе.

Особое место среди них занимают *ионные жидкости* (ИЖ). В простейшем случае речь идет о расплавах солей, но в целом спектр ИЖ достаточно широк и охватывает многочисленные комбинации из органических и неорганических катионов и анионов. Разнообразен и спектр их удивительных физико-химических свойств (в первую очередь та самая нано- и микрогетерогенность), которые могут найти применение в самых разных сферах науки и промышленности: от катализа до биомедицины.

На сегодня обнаружено, в основном теоретически, множество различных типов наноструктур, формирующихся в ИЖ: ионные пары, подструктуры на основе водородных связей, ионные кластеры, мицеллоподобные наноструктуры, губкоподобные массивы наноструктур микрометрового масштаба. При этом многие из результатов теоретического моделирования достаточно трудно подтвердить экспериментально.

В большинстве случаев ИЖ являются диамагнитными, поэтому в «чистом виде» не могут быть исследованы с помощью метода ЭПР.



Для этого в них следует растворить (как правило, в следовых количествах) специальный парамагнитный спиновый зонд.

Такой подход имеет свои преимущества и недостатки. С одной стороны, сами зондовые молекулы, растворенные в чистой ИЖ, могут специфически взаимодействовать с растворителем. С другой стороны, если в ИЖ будут присутствовать даже следовые (десятки миллионных долей!) количества воды, то ее система водородных связей может сильно измениться, что существенно повлияет на физико-химические свойства. Кроме того, всегда возникает вопрос: присущи ли наблюдаемые неоднородности в ИЖ именно ей или они являются следствием пребывания в ней молекулы-гостя?

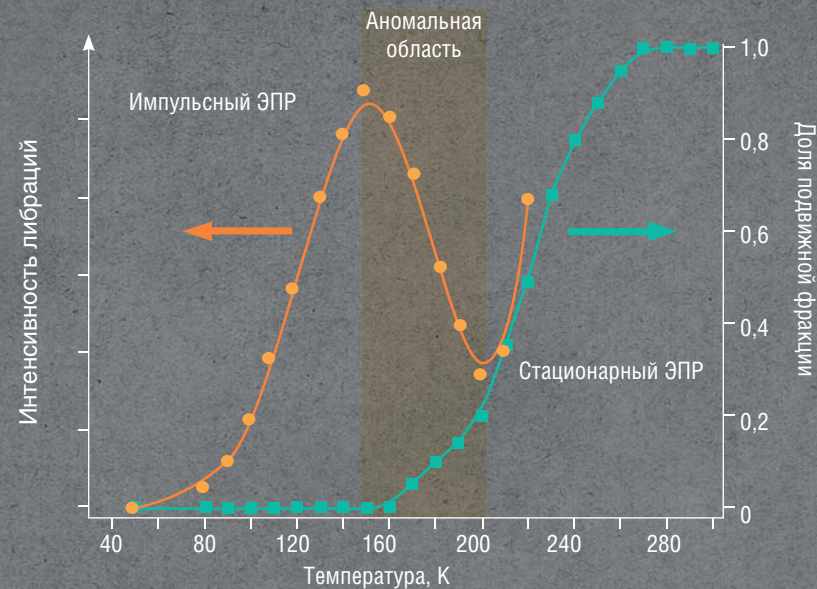
Однако поскольку в любом случае большинство приложений ИЖ так или иначе связано с их ролью в качестве растворителя, то взаимодействия в паре «растворитель–растворенное вещество» вполне естественны. В этом смысле применение спектроскопических методов с использованием молекул-зондов вполне оправданно, а подбирая структуру зонда, можно моделировать реальные взаимодействия ИЖ с конкретными веществами. По этой причине в лаборатории ЭПР-спектроскопии для исследования гетерогенной структуры ИЖ были применены три варианта ЭПР-методик с использованием спиновых зондов.

Методом *стационарного ЭПР* анализировались спектры зондов, в роли которых выступали стабильные радикалы. Оказалось, что для серии ИЖ в температурном диапазоне 170–270 К экспериментальному спектру соответствует суперпозиция двух разных фракций молекул спинового зонда с принципиально разной моделью движения. Одна фракция состоит из вращающихся молекул, другая – из малоподвижных. Это говорит о том, что размягчение и плавление ИЖ на молекулярном уровне является достаточно плавным процессом.

магнита в отсутствие внешнего магнитного поля уже на уровне отдельно взятой молекулы. И в этом МММ принципиально отличаются от классических ферромагнетиков, у которых намагниченность, как уже упоминалось выше, является кооперативным свойством.

Так как МММ бистабильны, т. е. могут существовать в двух равнозначных состояниях, то одна молекула способна хранить один бит информации и служить единичным блоком устройств сверхплотного хранения информации, спиновых транзисторов и элементов квантовых компьютеров.

Как работает МММ? При помещении такой молекулы во внешнее магнитное поле спины ее неспаренных электронов ориентируются по направлению внешнего поля, поскольку именно такая ориентация является наиболее



В методе ЭПР с временным разрешением в качестве спиновых зондов использовали фотовозбужденные молекулы, такие как порфирины или фуллерены. Их основное состояние является диамагнитным, однако при облучении светом они переходят в долгоживущие *триплетные состояния**, которые можно обнаружить с помощью ЭПР.

Оказалось, что в ИЖ такие молекулы-зонды находятся в виде нескольких разных фракций с различным микроокружением и, соответственно, физическими свойствами. Можно предположить, что такая гетерогенность связана с формированием в ИЖ наноразмерных полостей, подобных мицеллам. Кроме того, было отмечено существенное увеличение времени жизни спиновой поляризации (неравновесной заселенности энергетических уровней) в ИЖ по сравнению с традиционными растворителями, что может быть полезно для некоторых приложений.

Импульсный ЭПР предполагает использование импульсного СВЧ-поля и применяется в разных вариантах, с использованием специфических импульсных последовательностей, часто в комбинации с дополнительным радиочастотным возбуждением образца. В лаборатории этим методом анализировались случайные молекулярные либрации (малоугловые «дрожания») стабильных радикалов, используемых в качестве спиновых зондов, – такие движения эффективно укорачивают время спиновой релаксации.

В частности, с использованием такого подхода была впервые обнаружена аномалия плотности для стеклообразных ИЖ. Оказалось, что в температурном диапазоне 150–200 К подвижность молекул зонда

Метод ЭПР с использованием нитроксильных зондов позволяет изучать проявления гетерогенности в ионных жидкостях. На рисунке показан нитроксильный спиновый зонд в «мицеллоподобном» микроокружении ИЖ, сформированном алкильными цепями ее катионов. Соответствующие результаты ЭПР получены с помощью двух методов: импульсного (измеряется интенсивность либраций (дрожаний) зондов-радикалов) и стационарного (рассчитывается доля их подвижной фракции). В аномальной области интенсивность либраций падает с ростом температуры

прогрессивно уменьшается с ростом температуры, что противоречит всем известным тенденциям.

Такое поведение можно описать наноразмерными структурными перестройками, в ходе которых ансамбль радикалов в матрице ИЖ распадается на две подгруппы. Радикалы, расположенные в области пониженной плотности матрицы ИЖ, начинают испытывать диффузионное вращение, которое детектируется с помощью стационарного ЭПР, а локализованные в других областях, с повышенной плотностью, – с помощью импульсного ЭПР. И хотя средняя плотность ИЖ при этом остается постоянной, благодаря селективности методик удается обнаружить локальные неоднородности плотности, которые меняются с изменением температуры вплоть до фазового перехода в точку стеклования.

* Подробнее в статье «Хрусталик: солнечное затмение». С. 6–13.

Интересно, что подобные аномалии наблюдаются не только в чистых ИЖ, но и в их смесях с водой, что может быть важно, к примеру, при разработке новых типов криопротекторов.

В порах и каркасах

Пористые среды, такие как цеолиты, сегодня активно используются в различных областях химии, особенно в гетерогенном катализе. В последние два десятилетия умы исследователей занимает новый тип пористых сред – *металлоорганические каркасы* (МОК), способные удерживать внутри своей структуры атомы и молекулы различных веществ.

МОК могут быть легко получены на основе координационных соединений, которые образуются путем самоорганизации ионов металлов и органических лигандов. Этот класс материалов обладает широкими возможностями «тонкой настройки» структуры и функций каркаса под конкретную задачу путем изменения размера пор и структуры активного металлоцентра. Эти потенциальные «материалы будущего» можно использовать для связывания и хранения углекислого и других газов, улавливания вредных примесей из воздуха и воды, преобразования солнечной энергии и даже «адресной» доставки лекарственных препаратов в организме.

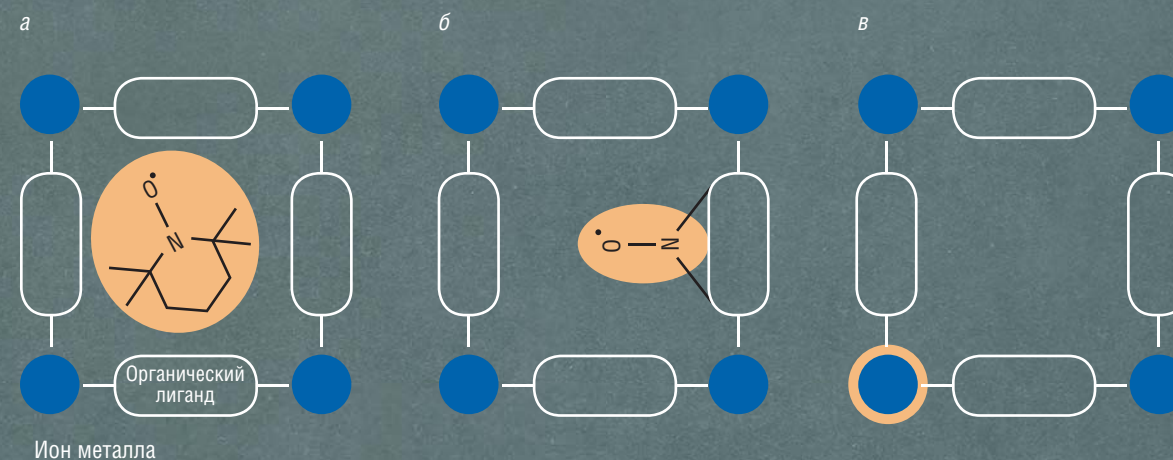
С этой точки зрения дизайн МОК выглядит крайне привлекательным, однако с его реализацией дело обстоит не так просто. Наиболее трудно определить, как те или иные изменения в процессе «настройки» МОК повлияют на его свойства.

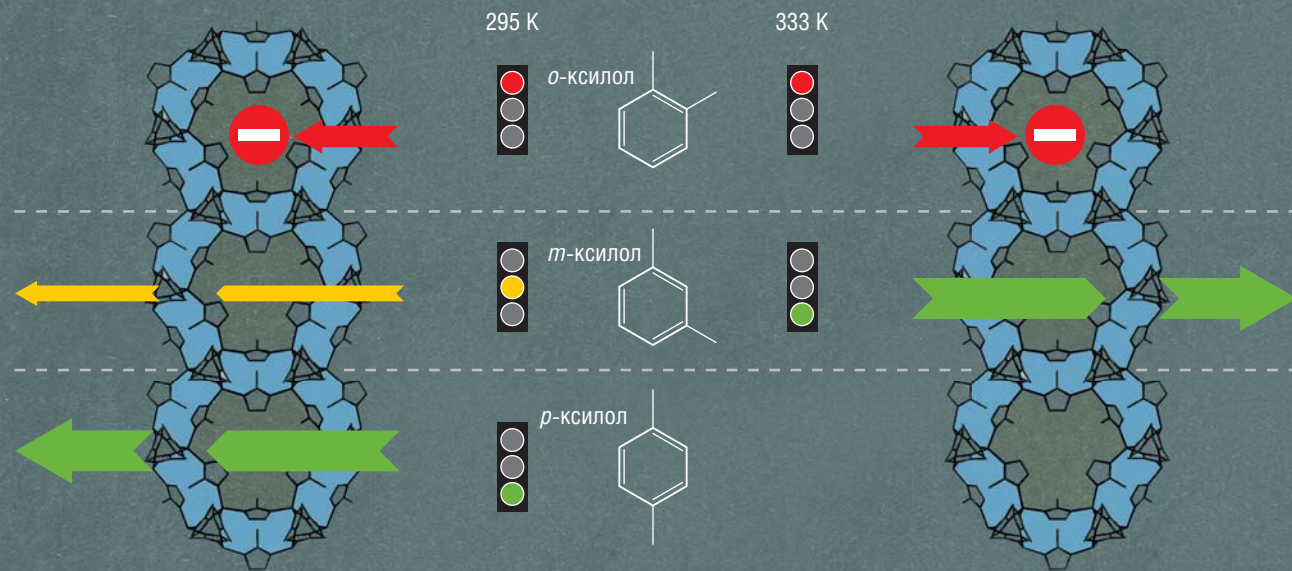
Особенно сложно учесть влияние степени подвижности («гибкости») структурных элементов каркаса на его способность поглощать различные молекулы. Представьте, что мы проектируем гараж для транспортного средства и выбираем размеры балок и ворот таким образом, чтобы машину было удобно парковать. И вдруг выясняется, что в зависимости от температуры воздуха размер дверного проема может уменьшаться чуть ли не вдвое. Разумеется, в таком случае нам совершенно необходимо точно знать, как именно размер проема зависит от внешних условий. Аналогичные ситуации часто встречаются при практических приложениях гибких МОК.

Большинство МОК являются диамагнитными, поэтому, как и в случае ИЖ, при их изучении с помощью ЭПР возникает необходимость использования парамагнитных спиновых зондов. Ими могут быть такие молекулы, которые способны поместиться внутри каркасной структуры, не внося в нее существенных возмущений (например, органический радикал или ион парамагнитного металла).

Недавно в лаборатории ЭПР-спектроскопии был разработан способ введения парамагнитного спинового зонда в полость гибкого МОК ZIF-8. Этот широко известный среди специалистов каркас состоит из больших полостей, соединенных «окнами» меньшего размера, и благодаря набору уникальных свойств является перспективным материалом для сорбции и разделения

Типичные структуры металлоорганических каркасов: с парамагнитным зондом-гостем (а), лигандом (б) и с ионом металла (в) (подсвечены оранжевым фоном)





различных веществ. Пример – разделение смеси пропана и пропилена, что является важной технологической задачей, так как пропилен используют для производства широко востребованного полиэтилена. Высокая эффективность такого разделения обеспечивается тонкой подстройкой размера окон полости ZIF-8. Однако о реальном «действующем» размере этих окон полости до недавних пор было известно немного.

При анализе спектров ЭПР спинового зонда, находящегося внутри полости ZIF-8, выяснилось, что он крайне чувствителен к кислороду воздуха, заполняющему поры. Погружая каркас в жидкость, можно наблюдать, как происходит его заполнение, а варьируя растворители – определить, какие из них входят в полости, а какие – нет. Кроме того, на основе данных о скорости заполнения полостей можно оценить скорости диффузии молекул внутрь каркаса.

В результате с использованием серии растворителей удалось определить реальный размер окон полости ZIF-8 и к тому же выяснить, что он довольно сильно зависит от температуры. При температурах около 90 °С размер окон резко увеличивается, что принципиально меняет проницаемость этого МОК для молекул.

В результате на примере разделения смеси трех ксилолов (важной технологической задачи, поскольку один из ксилолов является исходным мономером для производства полиэтилентерефталата (ПЭТ) – популярного термопластика) был разработан подход, позволяющий выделить каждый из компонентов смеси, варьируя температуру сорбента.

Металлоорганические каркасы можно использовать для эффективного разделения веществ. Пример – разделение ксилолов с помощью МОК ZIF-8. При комнатной температуре (295 К) сквозь «окна» каркаса хорошо проходит только один изомер – *p*-ксилол. Диффузия *m*-ксилола очень замедлена, а *o*-ксилола – вообще запрещена. Однако при температуре 60 °С (333 К) окна МОК слегка расширяются и *m*-ксилол также начинает эффективно проходить сквозь них, в то время как *o*-ксилол все еще задерживается. Последовательным пропусканием смеси трех изомеров ксилола через МОК при двух разных температурных условиях можно сначала выделить наиболее ценный *p*-ксилол, а затем, повысив температуру, разделить оставшиеся два компонента. По: (Polyukhov et al. 2019)

В случае МОК встречаются ситуации, когда один из его структурных элементов (ион металла либо лиганд) сам является парамагнитным. Тогда метод ЭПР может быть применен к изучению его свойств напрямую.

Так, в случае парамагнитного лиганда можно изучить взаимодействия «гостевых» молекул с самим каркасом, а парамагнитного металла – геометрию его локального окружения в каркасе, а также провести идентификацию и измерить расстояния до соседних атомов. Такой подход одинаково эффективен как для изучения изменения структуры МОК при внешних воздействиях, так и для оценки эффективности адсорбции промышленно важных газов (водорода, диоксида углерода и т. д.).

Метки для белка и ДНК

ЭПР является мощным экспериментальным методом для исследования структуры и функциональных свойств биомолекул. Большинство биополимеров также диамагнитны, поэтому в них требуется селективно ввести спиновую метку (т.е. в четко заданную позицию) ввести спиновую метку с ненулевым магнитным моментом, например тот же нитроксильный радикал. Если таких меток будет две, то между спинами возникнет диполь-дипольное взаимодействие, величина которого определяется расстоянием между метками, и его можно измерить с использованием импульсных методов ЭПР.

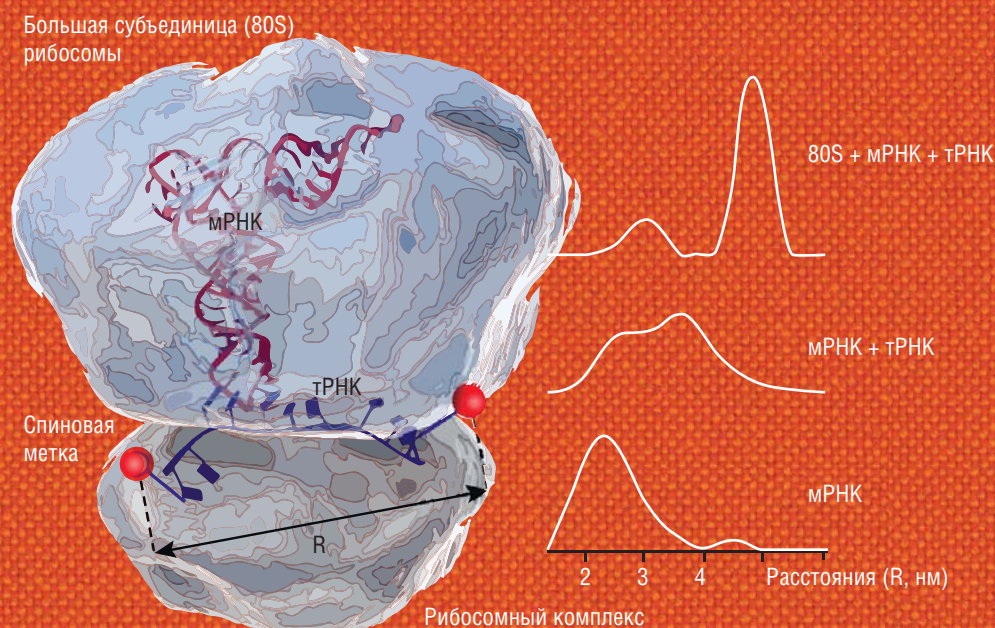
В отличие от широко используемого рентгеноструктурного анализа, ЭПР-спектроскопия не требует кристаллизации исследуемого объекта, поэтому биомолекулы можно изучать в их естественном состоянии. Поскольку такой метод позволяет получить информацию не только о среднем расстоянии между метками, но и о точном характере распределения этого параметра, можно исследовать системы с «подвижной» пространственной конфигурацией и отслеживать структурные переходы, возникающие в ней в зависимости от тех или иных условий.

Структурные ЭПР-исследования сложных биомолекул удалось провести благодаря тесному сотрудничеству лаборатории с другими институтами СО РАН: Новосибирским институтом органической химии им. Н. Н. Ворожцова и Институтом химической биологии и фундаментальной медицины.

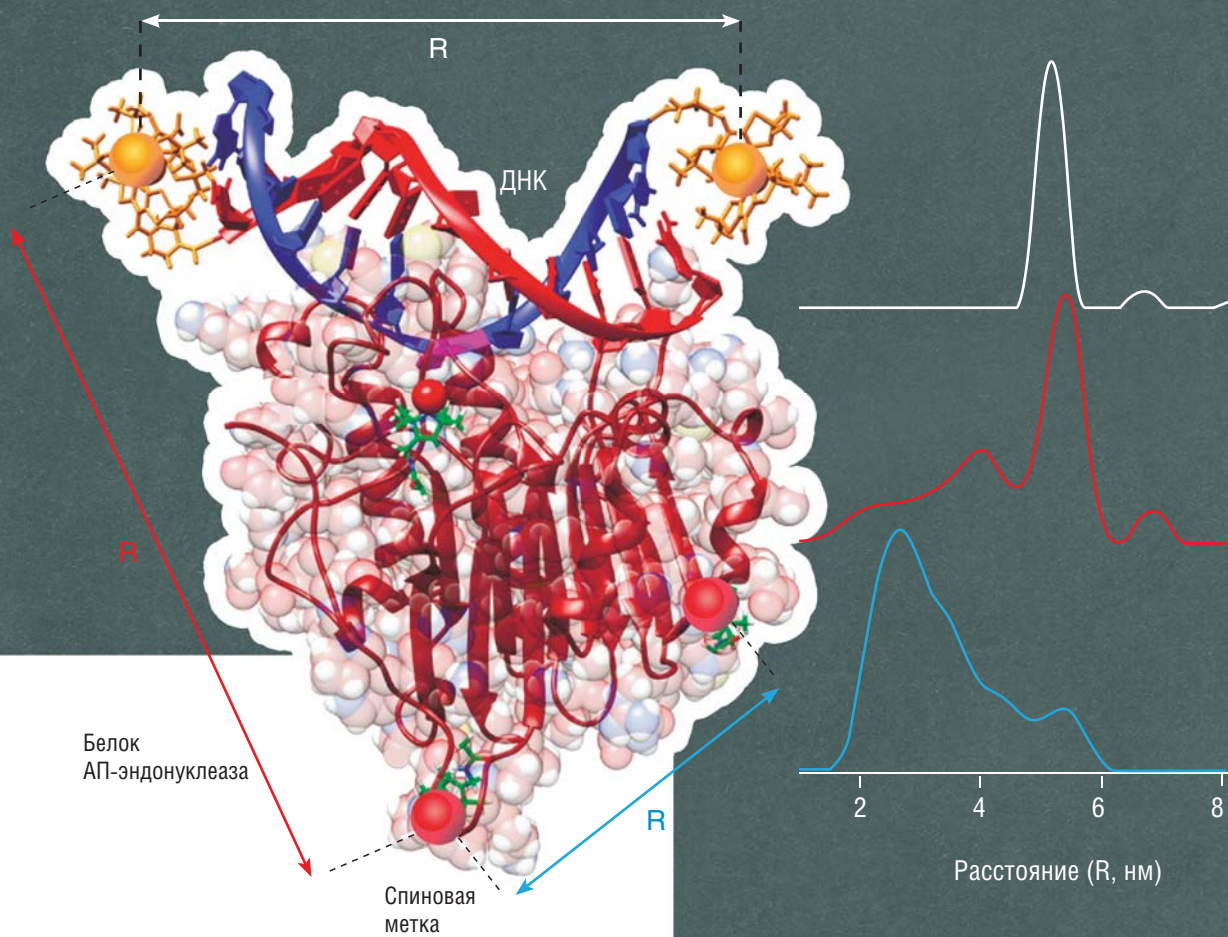
Примером таких работ может служить задача исследования конформационных перестроек, происходящих при связывании регуляторного участка РНК (IRES) вируса гепатита С с *рибосомой* («белковой фабрикой») зараженной клетки человека.

Все известные к тому времени методы введения спиновых меток в нужное место на цепочке РНК были неприменимы к длинным природным молекулам РНК. По этой причине в ИХБФМ СО РАН был разработан оригинальный подход для поиска и «распознавания» целевого участка молекулы, основанный на принципе *комплементарности*, как и в случае формирования двойной спирали ДНК. Так впервые удалось измерить расстояния между спиновыми метками в участке IRES вирусной РНК, которая включает более 330 нуклеотидов и имеет сложную вторичную и третичную структуру.

С помощью ЭПР можно исследовать биополимеры любого размера, а также структурные ансамбли, которые могут быстро изменяться, как, например, комплексы человеческих рибосом с двумя молекулами РНК: *матричной*, по которой собирается белок, и *транспортной*, доставляющей на «фабрику» отдельные аминокислоты. Исследования с помощью ЭПР таких ансамблей, моделирующих этапы синтеза белков у млекопитающих, выявили высокую лабильность комплексов матричной РНК с рибосомами, которые легко распадаются и поэтому не могут быть визуализированы методами рентгеноструктурного анализа и криоэлектронной микроскопии.



Методами импульсного ЭПР с использованием спиновых меток можно отслеживать структурные перестройки в биомолекулах и их многокомпонентных комплексах. Примером может служить измерение распределения расстояний в сложном комплексе из большой субъединицы рибосомы и транспортной и матричной РНК, которые взаимодействуют в процессе синтеза белка.



С помощью двух различных спиновых меток можно одновременно измерять сразу три расстояния между разными частями биомолекул, как в этом комплексе ДНК с ферментом АП-эндонуклеазой, участвующей в репарации («ремонте») ДНК.
По: (Krumkacheva et al., 2019)

Использование *ортогональных* меток (меток различной природы, например, радикалов с разными магнитно-резонансными параметрами) позволяет одновременно измерять несколько расстояний в одном и том же спин-меченом объекте.

Этот подход применим к сложным многокомпонентным биологическим комплексам, где важно отслеживать структурные перестройки как отдельных частей, так и всего ансамбля в целом. Его перспективность доказало исследование структурных особенностей сложного белково-нуклеинового комплекса, участвующего в *репарации* («ремонте») ДНК. Введение ортогональных меток позволило одновременно отслеживать изменения структуры ДНК при ее связывании с белком и перестройки внутри самого белка, сопровождающие образование комплекса, а также определять степень связывания и взаимное расположение белка и ДНК.

Методология спектроскопии ЭПР в приложении к биополимерам продолжает развиваться, в том числе в направлении преодоления существующих ограничений метода. Так, до последнего времени в исследуемые объекты вводились пары спиновых меток на основе

нитроксильных радикалов, с относительно невысокой стоимостью и высокой стабильностью – для них разработано множество схем селективного введения в биополимеры. Однако нитроксильные радикалы имеют ряд недостатков, и один из самых важных – это не слишком высокая чувствительность метода из-за достаточно большой ширины спектра ЭПР.

Увеличить этот параметр удалось благодаря использованию спиновых меток на основе *триарилметильных радикалов* (ТАМ). ТАМ-метки имеют микросекундные времена релаксации в широком температурном диапазоне, «компактный» интенсивный спектр ЭПР и высокую химическую стабильность даже в живых клетках, что делает эти парамагнитные соединения крайне перспективными для изучения биологических систем

в естественных условиях. К примеру, в лаборатории ЭПР-спектроскопии с использованием ТАМ-меток удалось впервые провести измерение расстояния в двойной спирали ДНК при физиологической температуре (37 °С), рекордно высокой для подобных исследований.

Принципиально новым направлением в области ЭПР биологических систем является идея использовать в качестве спиновой метки долгоживущие фотовозбужденные молекулы, которые, как упоминалось выше, уже применяются в качестве спиновых зондов.

В основном состоянии эти молекулы диамагнитны и обладают нулевым спином $S = 0$, но под воздействием лазерного импульса могут эффективно переключаться в возбужденное триплетное состояние со спином $S = 1$. В такой молекуле наблюдается неравновесная поляризация электронных уровней, причем разница в их заселенности на один-два порядка превышает таковую в случае стандартных нитроксильных радикалов. В результате при использовании таких фотоиндуцированных молекул интенсивность регистрируемого сигнала ЭПР многократно выше.

К примеру, с помощью фотовозбужденной фуллереновой метки можно почти в 1000 раз ускорить измерение расстояний методом ЭПР по сравнению с типичными нитроксильными радикалами, что позволяет достичь рекордно высокой чувствительности.

В наши дни ЭПР-спектроскопия является динамично развивающимся методом как в идейном плане (развитие новых методологий), в том числе в направлении преодоления существующих ограничений метода, так и в технологическом (разработка новых технических решений для повышения чувствительности).

Постоянно расширяется и круг задач, к решению которых может быть привлечен метод ЭПР в качестве основного или вспомогательного метода. Перечисленные в публикации примеры являются далеко не полным перечнем исследований, которые проводят ЭПР-спектроскописты новосибирского МТЦ СО РАН. Диапазон задач, решаемых с помощью ЭПР в мире, гораздо шире.

Развитие новых областей применения ЭПР требует смелости и новаторских подходов. При этом, как и повсеместно в современной науке, значимые прорывы часто возникают на пересечении разных научных областей, поэтому в обозримом будущем этот метод не только останется востребованным, но и будет активно применяться для решения все более широкого круга задач. ЭПР *forever*...

Литература
Babaylova E. S., Malygin A. A., Lomzov A. A. et al. Complementary-addressed site-directed spin labeling of long natural RNAs // *Nucleic Acids Reseach*. 2016. V. 44. P. 7935–7943.

Ivanov M. Yu., Fedin M. V. Nanoscale heterogeneities in ionic liquids: insights from EPR of spin probes // *Mendeleev Commun*. 2018. V. 28. P. 565–573.

Krumkacheva O. A., Shevelev G. Yu., Lomzov A. A. et al. DNA complexes with human purinic/apurimidine endonuclease 1: structural insights revealed by pulsed dipolar EPR with orthogonal spin labeling // *Nucleic Acids Research*. 2019. V. 47. P. 7767–7780.

Krumkacheva O. A., Timofeev I. O., Politanskaya L. V. et al. Triplet Fullerenes as Prospective Spin Labels for Nanoscale Distance Measurements by Pulsed Dipolar EPR // *Angew. Chem. Int. Ed*. 2019. V. 58. P. 13271–13275.

Malygin A. A., Graifer D. M., Meschaninova M. I. et al. Structural rearrangements in mRNA upon its binding to human 80S ribosomes revealed by EPR spectroscopy // *Nucleic Acids Res*. 2018. V. 46. P. 897–904.

Polyukhov D. M., Poryaev A. S., Gromilov S. A., Fedin M. V. Precise Measurement and Controlled Tuning of Effective Window Sizes in ZIF-8 Framework for Efficient Separation of Xylenes // *Nano Letters*. 2019. V. 19. P. 6506–6510.

Poryaev A. S., Polyukhov D. M., Gjuzi E. et al. Radical-Doped Metal–Organic Framework: Route to Nanoscale Defects and Magnetostructural Functionalities // *Inorg. Chem*. 2019. V. 58. P. 8471–8479.

Shevelev G. Yu., Krumkacheva O. A., Kuzhelev A. A. et al. Physiological-Temperature Distance Measurement in Nucleic Acid using Triarylmethyl-Based Spin Labels and Pulsed Dipolar EPR Spectroscopy // *J. Amer. Chem. Soc*. 2014. V. 136. P. 9874–9877.

Fedin M. V., Veber S. L., Bagryanskaya E. G., Ovcharenko V. I. Electron paramagnetic resonance of switchable copper-nitroxide-based molecular magnets: An indispensable tool for intriguing systems // *Coord. Chem. Rev*. 2015. V. 289–290. P. 341–356.

Veber S. L., Tumanov S. V., Fursova E. Yu. et al. X-band EPR setup with THz light excitation of Novosibirsk Free Electron Laser: goals, means, useful extras // *J. Magn. Reson*. 2018. V. 288. P. 11–22.

Автор и редакция благодарят Казанский (Приволжский) федеральный университет и лично и Ф.Р. Вагапову за предоставленные фотоматериалы из архива Е.К. Завойского