

§ 5.9. КОЛЕБАТЕЛЬНЫЕ СПЕКТРЫ БИОПОЛИМЕРОВ

Частоты, интенсивности и поляризации линий и полос в колебательных спектрах дают информацию о строении молекул. Колебательные спектры регистрируются либо как инфракрасные (ИК) спектры поглощения, либо как спектры комбинационного рассеяния (КР). Применительно к макромолекулярным веществам ИК-спектроскопия имеет ряд преимуществ перед спектроскопией КР. Лишь в последнее время благодаря возможностям лазерной техники удалось получить четкие и выразительные комбинационные спектры полимеров и биополимеров (см. стр. 334).

Теория колебательных спектров малых многоатомных молекул хорошо разработана [189—194]. Она основана на возможности раздельного рассмотрения медленных процессов колебаний ядер и быстрых электронных переходов, доказываемой теоремой Борна и Оппенгеймера [195]. Расчет частот гармонических колебаний ядер проводится путем решения классической задачи с непосредственным учетом симметрии молекулы. Электрооптические параметры, определяющие интенсивности и поляризации в колебательных спектрах, находят при помощи теории, впервые предложенной более 30 лет назад [196] и подробно изложенной в [189, 190]. Эта теория исходит из так называемой валентно-оптической схемы, согласно которой каждой химической связи можно приписать свои собственные дипольный момент и поляризуемость (см. также [79, 197]). Дипольный момент молекулы является векторной суммой дипольных моментов связей, поляризуемость молекулы — тензорной суммой поляризуемостей связей. Интенсивность данной полосы в ИК-спектре определяется изменением дипольного момента молекулы при данном нормальном колебании, в спектре КР — изменением поляризуемости.

Молекула, состоящая из N атомов, имеет $3N - 6$ нормальных колебаний ($3N - 5$ в линейном случае). Так как атомы в молекуле связаны друг с другом, все они участвуют в каждом из этих колебаний. Возможны ситуации, в которых доля участия в данном колебании одного или нескольких атомов значительно больше, чем остальных. Такое колебание характерно для данной атомной группы, его частота (а также интенсивность спектральной полосы) мало зависит от остальных атомов в молекуле. Наличие характеристической спектральной полосы или линии свидетельствует о присутствии соответствующей группы.

В ИК-спектрах белков и полипептидов наблюдаются полосы амидной группы (пептидной связи $—CO—NH—$). Для их изучения применяются спектры модельных низкомолекулярных соединений — амидов. Экспериментальное исследование метил-

ацетамида $\text{H}_3\text{C}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_3$ и родственных веществ и теоретические расчеты позволили получить характеристики амидной группы (табл. 5.11) [198—201].

Таблица 5.11

Характеристики колебаний амидных групп¹⁾

Полосы	Частота, см^{-1}	Характер колебания	Доля участия групп
Амид А	3300 } Амид В	N—H (ν)	
Амид I	1597—1672	C=O (ν)	C=O (ν) 80%, C—N (ν) 10%, —NH (δ) 10%
Амид II	1480—1575	—NH (δ) в плоскости, C—N (ν)	—NH (δ) 60%, C—N (ν) 40%
Амид III	1229—1301	C—N (ν), —NH (δ) в плоскости	C=O (ν) 10%, C—N (ν) 30%, N—H (ν) 30%, O=C—N (δ) 10%
Амид IV	625—767	O=C—N (δ) в плоскости	O=C—N (δ) 40%, остальные — 60%
Амид V	640—800	—NH (δ) неплоское колебание	
Амид VI	537—606	—CO (δ) неплоское колебание	
Амид VII	200	Крутильное колебание вокруг C—N-связи	

¹⁾ (ν) — валентное колебание, т. е. растяжение связи, (δ) — деформационное колебание, при котором меняется валентный угол.

Полосы амид А и амид В возникают в результате расщепления валентного колебания связи N—H, частота которого совпадает с удвоенной частотой колебания полосы амид II, — явление так называемого *резонанса Ферми* (см., например, [182]). Формы перечисленных колебаний показаны на рис. 5.25.

Полосы А, В, I, II весьма чувствительны к водородным связям, наличие которых вызывает значительные понижения частот и расширение полос.

При рассмотрении спектров полимеров необходимо учесть взаимодействие колебаний в отдельных мономерных звеньях. Упорядоченный полимер подобен в этом смысле молекулярному кристаллу. В спектре наблюдаются лишь те колебания, которые происходят в фазе во всех элементарных ячейках. Общая теория, исходящая из этих представлений («приближение фактор-группы»), была предложена в работах [202, 203] (см. также [204—207]). Полимерная цепь, рассматриваемая как одномерная пространственная группа, характеризуется числом нормальных колебаний, равным $3pg - 4$, где p — число атомов в химической

повторяющейся группе, g — число таких групп в одномерной кристаллографической единичной ячейке. Так, для *транс*-цепочки полиглицина I (β -форма) $-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}-$ химическая группа содержит пять частиц (если считать CH_2 одной частицей), в кристаллическую ячейку входят две такие группы, следовательно, $3pg - 4 = 3 \cdot 5 \cdot 2 - 4 = 26$. Наблюдаются следующие колебания: $9A_1, 9B_1, 4A_2, 4B_2$ (A_1, B_1 — симметричные

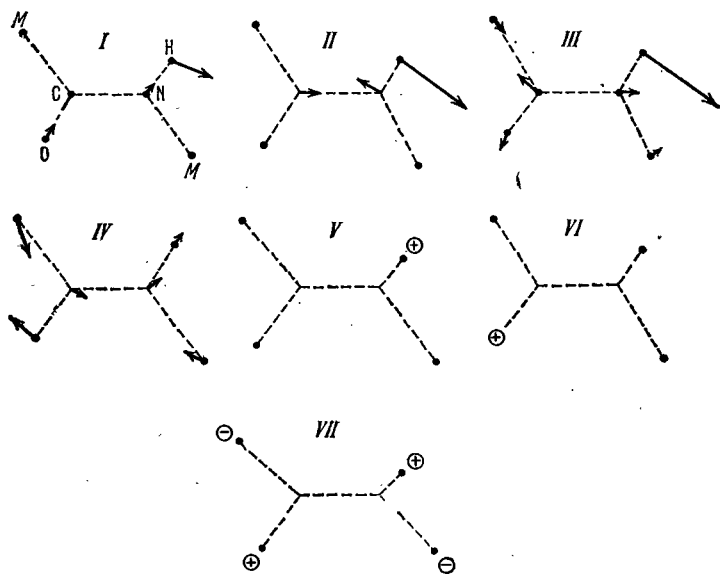


Рис. 5.25. Формы нормальных колебаний амидной группы в N-метилацетамиде (M — метильная группа).

и несимметричные плоские колебания, A_2, B_2 — неплоские). Все они активны в ИК-спектре, за исключением A_2 (см. [209, 210]).

При расчете частот колебаний и, тем самым, интерпретации колебательных спектров полипептидов и белков исходят из рассмотрения слабо связанных осцилляторов в рамках теории возмущений [198, 201, 211]. Частота колебаний выражается формулой

$$\nu(\delta, \delta') = \nu_0 + \sum_s D_s \cos(s\delta) + \sum_{s'} D_{s'} \cos(s'\delta'), \quad (5,149)$$

где ν_0 — частота невозмущенного колебания изолированной группы, δ — разность фаз между колебательными движениями аналогичных групп в цепи, D_s определяется членами взаимодействия данной группы с s -й группой цепи в выражениях для потенциальной и кинетической энергий, $D_{s'}$ и δ' относятся к меж-

цепным колебаниям и имеют смысл, аналогичный D_s и δ . Суммирование практически можно проводить только по соседним группам (см. [212, 213]).

Рассмотрим результаты таких расчетов для α -спирали, параллельной и антипараллельной β -форм. Для неупорядоченной цепи взаимодействия в среднем компенсируют друг друга и $\nu = \nu_0$. Для бесконечно длинной α -спирали ИК-поглощение возникает при колебаниях с разностью фаз δ , равной либо нулю

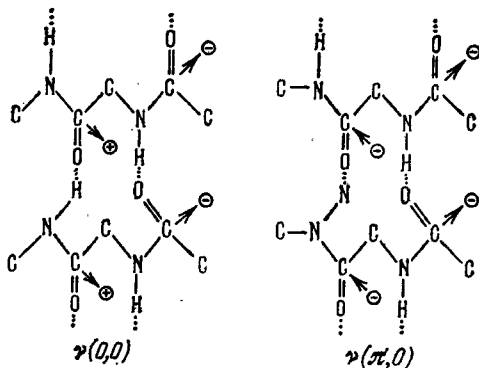


Рис. 5.26. Формы колебаний параллельной β -формы.

(«параллельная полоса», см. далее), либо θ («перпендикулярная полоса»), где θ — угол поворота вокруг оси спирали при переходе от одной пептидной группы к следующей, т. е. $\theta = 2\pi/3,6$. Получаем, учитывая три ближайших группы,

$$\left. \begin{aligned} \nu(0) &= \nu_0 + D_1 + D_2 + D_3 \quad (\parallel), \\ \nu(\theta) &= \nu_0 + D_1 \cos \theta + D_2 \cos 2\theta + D_3 \cos 3\theta \quad (\perp). \end{aligned} \right\} (5,150)$$

Таким образом, каждое колебание звена α -спирали приводит к появлению двух частот.

В параллельной β -форме $\delta = 0, \pi$ для колебаний в фазе и в противофазе. Здесь необходимо учитывать как внутри-, так и межцепные взаимодействия. Получаем два активных колебания с частотами

$$\left. \begin{aligned} \nu(0, 0)_\parallel &= \nu_0 + D_1 + D'_1 \quad (\parallel), \\ \nu(\pi, 0)_\perp &= \nu_0 - D_1 + D'_1 \quad (\perp). \end{aligned} \right\} (5,151)$$

Формы этих колебаний изображены на рис. 5.26.

Аналогичным образом для антипараллельной β -формы получаем четыре колебания с частотами

$$\left. \begin{aligned} \nu(0, 0)_a & \text{— неактивное колебание,} \\ \nu(0, \pi)_a & = \nu_0 + D_1 - D_1' \quad (\parallel), \\ \nu(\pi, 0)_a & = \nu_0 - D_1 + D_1' \quad (\perp, \text{ в плоскости}), \\ \nu(\pi, \pi)_a & = \nu_0 - D_1 - D_1' \quad (\perp, \text{ неплоское колебание}). \end{aligned} \right\} (5,152)$$

Формы этих колебаний показаны на рис. 5.27. Первое колебание

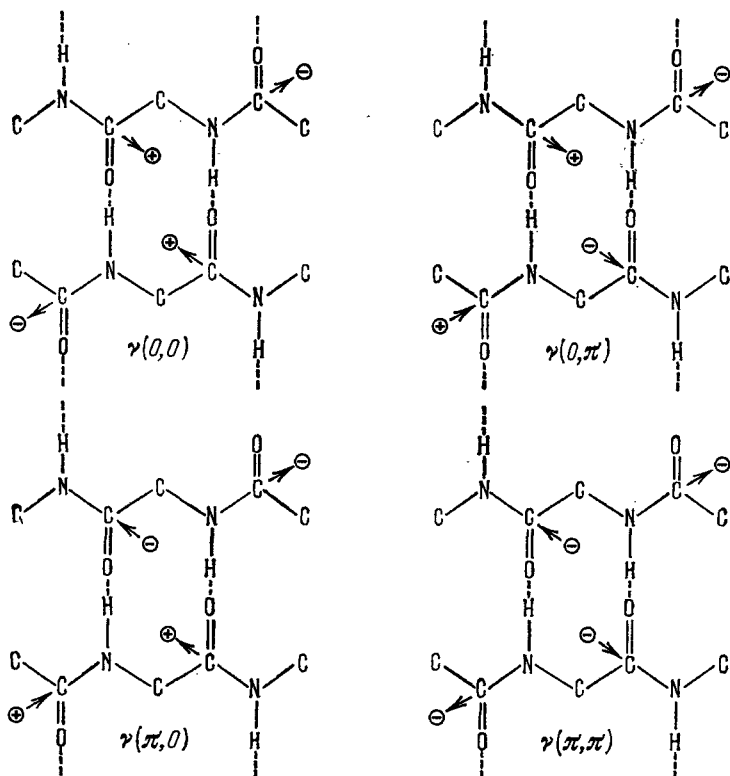


Рис. 5.27. Формы колебаний антипараллельной β -формы.

неактивно, так как оно центросимметрично и не сопровождается изменением дипольного момента.

В табл. 5.12 приведены рассчитанные Криммом характеристики соответствующих полос амид I и амид II.

Таким образом, значения наблюдаемых частот в ИК-спектре позволяют до некоторой степени судить о конформации цепи.

Таблица 5.12

Характеристики полос амид I и амид II

Конформация	Обозначения колебаний	Частота полос, см ⁻¹	
		амид I	амид II
Неупорядоченная	ν_0	1658	1520
Найлон 66	ν_N	1640	1540
Антипараллельная β-форма	$\nu_{\parallel}(0, \pi)_a$	1685 (сл) ¹⁾	1530 (с)
	$\nu_{\perp}(\pi, 0)_a$	1632 (с)	1510 (сл)
	$\nu_{\perp}(\pi, \pi)_a$	1668 (о. сл)	1550 (сл)
Параллельная β-форма	$\nu_{\parallel}(0, 0)_{\Pi}$	1648 (сл)	1530 (с)
	$\nu_{\perp}(\pi, 0)_{\Pi}$	1632 (о. сл)	1530 (сл)
α-спираль	$\nu_{\parallel}(0)_{\alpha}$	1650 (с)	1516 (сл)
	$\nu_{\perp}(\theta)_{\alpha}$	1646 (сл)	1546 (с)

¹⁾ с — сильная, сл — слабая, о. сл — очень слабая полосы в ИК-спектре.

Приводим данные, полученные для водных растворов белков (табл. 5.13) [214].

Таблица 5.13

Характеристики полос амид I и амид II в водных растворах белков

Белок	Частота, см ⁻¹		Доминирующая конформация
	амид I	амид II	
Миоглобин	1652	1545	α-спираль Антипараллельная β-форма
β-лактоглобулин	1632	1530	
β-лактоглобулин денатурированный	1656 (1570 при больших pH)		Неупорядоченная »
α-казеин денатурированный	1656		

Параллельные (||) и перпендикулярные (⊥) полосы отвечают колебаниям дипольного момента, параллельным и перпендикулярным оси полимерной цепи (рис. 5.28). Очевидно, что спектры растворов или неориентированных пленок не дают информации о поляризации колебаний. Напротив, при исследовании белков и полипептидов в анизотропных средах (в ориентированных

пленках и волокнах) с помощью поляризованного ИК-излучения поляризация колебаний находится непосредственно. Измеряется инфракрасный дихроизм, характеризуемый дихроичным отношением, т. е. отношением коэффициентов поглощения, измеренных в инфракрасной области для излучения с направлением электрического вектора, перпендикулярным и параллельным некоторому выделенному направлению. Количество поглощенной световой энергии пропорционально квадрату скалярного произведения вектора колеблющегося дипольного момента \mathbf{p} и напряженности электрического поля световой волны \mathbf{E} ($A \propto |pE|^2 \cos^2 \alpha$), и, следовательно, дихроичное отношение равно

$$R = \frac{k_y}{k_x} = \frac{n_y}{n_x} \operatorname{ctg}^2 \phi, \quad (5.153)$$

где n_y и n_x — показатели преломления среды для волны, колеблющейся вдоль оси y и оси x , ϕ — угол между осью y и вектором дипольного момента. При $\phi = 45^\circ$ имеем $k_y = k_x$, $R = 1$, и поляризации нет; при $k_x = 0$ $\phi = 0^\circ$ и $R \rightarrow \infty$, т. е. наблюдается полная поляризация (рис. 5.29). Измерение дихроизма позволяет определить направления колебаний и, тем самым, получить сведения о конформациях (вторичной структуре) белковых цепей. Теория колебательных спектров полимерных цепей конечной длины развита в [208].

В работе [278] проведен теоретический анализ взаимодействий амидных колебаний для кристалла ацетанилида и упорядоченных конформаций полипептидов: антипараллельной β -формы и α -спирали. Рассмотрены два типа резонансных взаимодействий — кинематическое и динамическое. Наблюдаемое в ИК-спектрах резонансное расщепление имеет динамический характер, оно определяется диполь-дипольным взаимодействием моментов перехода. Таким образом, теория, предложенная в [278], есть теория экситонного расщепления. Использо-

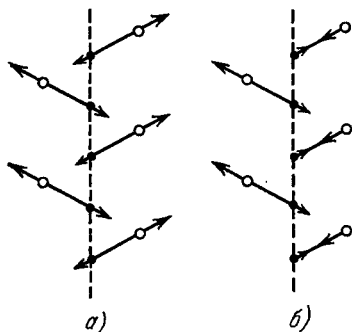


Рис. 5.28. Колебания дипольного момента в фазе, поляризованные вдоль оси цепи (а), и его колебания в противофазе, поляризованные перпендикулярно цепи (б).

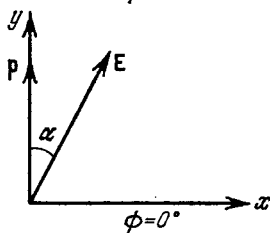
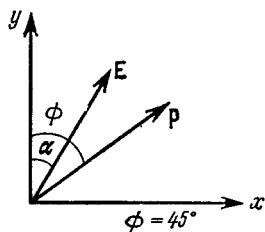


Рис. 5.29. Расположение векторов \mathbf{E} и \mathbf{p} .

зую известные из поляризационных измерений направления дипольных моментов перехода и их величины, найденные из измерений абсолютных интенсивностей полос поглощения, авторы цитируемой работы получили теоретические значения расщепления, хорошо согласующиеся с опытом.

Чиргадзе разработал метод количественного анализа вторичной структуры глобулярных белков в водных растворах, основанный на измерениях интенсивности полосы амид I [279—281]. Белок исследуется в растворе в тяжелой воде в спектральной области 1500—1800 см^{-1} . Характерные значения параметров поглощения для дейтерированной пептидной группы приведены в табл. 5.14.

Таблица 5.14

Спектральные параметры полосы амид I для дейтероформы пептидной группы

Колебание	$\nu_{\text{макс}}$ см^{-1}	Полу- ширина $\Delta\nu_{1/2}$ см^{-1}	Молярный коэффициент поглощения в максимуме $\epsilon_{\text{макс}}$ $\text{л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$	Интегральная интенсивность, $\text{л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-2}$
Антипараллельная β-форма				
Амид I $\nu(\pi, 0)$ $\nu(0, \pi)$	1620	19	1000	$5,7 \pm 0,3$
	1690	9	220	$0,7 \pm 0,2$
α-спираль				
Амид I $\nu(0)$, $\nu(2\pi/3, 6)$	1636	37	460	$4,6 \pm 0,2$
Неупорядоченная конформация				
Амид I ν_1 ν_2	1650	45	350	$4,2 \pm 0,1$
	1676	24	50	$0,3 \pm 0,1$

Метод Чиргадзе с успехом испытан на нескольких белках, структура которых была установлена рентгенографически. Метод позволяет следить за малыми конформационными изменениями белка.

Помимо определения вторичной структуры, ИК-спектры полезны при изучении ионизации аминокислотных остатков, кинетики дейтерообмена и т. д. (дальнейшие подробности об ИК-спектрах белков см. в [198, 201, 215, 277]).

ИК-спектроскопия нуклеиновых кислот менее информативна по причине большой сложности их химической структуры, недостаточной характеристичности ряда полос и т. д. Ограничимся сведениями о некоторых типичных колебаниях нуклеиновых кислот (табл. 5.15) [201].

Таблица 5.15

ИК-спектры нуклеиновых кислот

Частоты, $см^{-1}$	Обозначения колебаний ¹⁾	Отнесение колебаний
2800—3500	{ ν(OH) ν(NH) ν(CH)	H ₂ O, сахар Азотистые основания Сахар и основания
1500—1800	{ ν(C=O) ν(C=N) ν(C=C) δ(NH) δ(НОН)	Основания, смешанные колебания
~ 1200	{ ν(PO ₂ ⁻)	
1000—1100	{ ν(PO ₂ ⁻) ν(CO)	Симметричное, валентное Сахар Фосфат
700—1000	{ ν(PO) ν(CO) τ(NH)	Сахар Основания, неплоское, деформационное колебание
300—600		Скелетные деформации

¹⁾ ν — валентные, δ и τ — деформационные колебания.

Развитие лазерной техники открыло возможность получать четкие колебательные спектры комбинационного рассеяния биополимеров. В работах [216] приведены прекрасные спектры КР лизоцима и химотрипсина. Значительный интерес привлекли измерения низкочастотных полос в спектрах КР (с частотами до 50 $см^{-1}$). Эти полосы чувствительны к конформационным изменениям и, возможно, характеризуют конформационные колебания (см., например, [282]).

§ 5.10. СПЕКТРЫ ЯДЕРНОГО И ЭЛЕКТРОННОГО ПАРАМАГНИТНОГО РЕЗОНАНСА

Спектры парамагнитного резонанса эффективно применяются в исследованиях биополимеров и, в частности, ферментов. Рассмотрим сущность явления парамагнитного резонанса — ядерного (ЯМР) и электронного (ЭПР).