

ционален H , поэтому он особенно велик в магнитных полях, создаваемых сверхпроводниками и достигающих 50 000 Гс и более. В обычных условиях удается получать поля до 20—30 тыс. Гс.

Относительные значения МКД различных органических соединений характеризуются следующими величинами: для порфиринов ~ 100 , аннуленов ~ 3 , пуринов $\sim 0,2$, циклогексанаона $\sim 0,00002$. Эффект Фарадея для гемсодержащих белков сильно зависит от электронных состояний гема и конформаций белка. На рис. 5.22 показаны кривые АДМВ и спектры поглощения нативного окисленного (ферри-) и восстановленного (ферро-) цитохрома c . Хорошо видна тонкая структура МОВ феррицитохрома c . В спектре поглощения ее нет. Высокая чувствительность АДМВ и МКД позволяет изучать различные цитохромы во взвешях субмитохондриальных частиц (см. § 13.2). Спектры поглощения такой возможности не дают. При очень низких температурах удается наблюдать неравновесные возбужденные конформации таких белков (Шаронов). См. также § 6.7.

§ 5.9. Колебательные спектры

Частоты, интенсивности и поляризации линий и полос в колебательных спектрах дают информацию о строении молекул. Колебательные спектры наблюдаются либо в поглощении в инфракрасной области (ИК), либо в рассеянии — спектры комбинационного рассеяния (КР). Комбинационное рассеяние было открыто в 1928 г. (Раман, Маделъштам и Ландсберг). Возможность изучать колебания молекул с помощью спектроскопии в видимой области обещала многое, но применительно к полимерам и биополимерам спектры КР оказались вначале бесплодными ввиду невозможности получения растворов в оптически чистом виде, без паразитного рассеяния. На протяжении ряда лет колебательные спектры биополимеров изучались лишь как ИК-спектры поглощения, и лишь в последнее время благодаря развитию лазерной техники ИК-спектроскопия вытесняется КР.

Теория колебательных спектров молекул детально разработана (Волькенштейн, Ельяшевич, Степанов, Грибов). Она основана на возможности раздельного рассмотрения медленных колебаний атомных ядер и быстрых электронных переходов, доказываемой теоремой Борна и Оппенгеймера. Задача о частотах колебаний ядер является классической. Она решается при непосредственном учете симметрии молекулы. Теория интенсивностей и поляризаций в ИК-спектрах и спектрах КР исходит из валентно-оптической схемы, согласно которой каждой ковалентной связи можно приписать свой дипольный момент и поляризуемость. Дипольный момент молекулы является векторной суммой дипольных моментов связей, а 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 (линейная молекула — $3N - 5$). 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 определенной ковалентной связи, атома или группы атомов значительно больше, чем остальных связей и атомов. Такое колебание *характеристично* для данной атомной группы, его частота и интенсивность ИК-полосы или линии в спектре КР мало зависят от остальных атомов в молекуле. Тем самым наличие характеристической спектральной полосы или линии свидетельствует о присутствии в молекуле соответствующей группы.

В ИК-спектрах белков и полипептидов наблюдаются полосы амидной группы, т. е. пептидной связи — $\text{CO}-\text{NH}-$. Исследование низкомолекулярных амидов, в частности, метилацетамида $\text{H}_3\text{C}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_3$, и родственных веществ, и теоретические расчеты позволили получить колебательные характеристики амидной группы (табл. 5.2).

Т а б л и ц а 5.2. Характеристики колебаний амидных групп

Полоса	Частота, см^{-1}	Характер колебания	Участие групп, в долях единицы
Амид А Амид В Амид I	3300 } 3100 } 1597—1672	$\text{N}-\text{H}(\nu)$ $\text{C}=\text{O}(\nu)$	$\text{C}=\text{O}(\nu)$ 0,8, $\text{C}-\text{N}(\nu)$ 0,1, $-\text{NH}(\delta)$ 0,1
Амид II	1480—1575	$-\text{NH}(\delta)$ в плоскости,	$-\text{NH}(\delta)$ 0,6,
Амид III	1229—1301	$\text{C}-\text{N}(\nu)$ $\text{C}-\text{N}(\nu)$, $-\text{NH}(\delta)$ в плоскости	$\text{C}-\text{N}(\nu)$ 0,4 $\text{C}=\text{O}(\nu)$ 0,1 $\text{C}-\text{N}(\nu)$ 0,3 $\text{N}-\text{H}(\nu)$ 0,3
Амид IV	625—767	$\text{O}=\text{C}-\text{N}(\delta)$ в плоскости	$\text{O}=\text{C}-\text{N}(\delta)$ 0,1 $\text{O}=\text{C}-\text{N}(\delta)$ 0,4 остальные 0,6
Амид V	640—800	$-\text{NH}(\delta)$, неплоское колебание	
Амид VI	537—606	$-\text{CO}(\delta)$, неплоское колебание	
Амид VII	200	Крутильное колебание вокруг $\text{C}-\text{N}$ -связи	

ν — обозначает валентное колебание, т. е. растяжение связей,

δ — деформационное колебание, при котором меняется валентный угол.

Формы перечисленных колебаний показаны на рис. 5.23. ИК-полосы А, В, I и II чувствительны к водородным связям, наличие которых вызывает значительное понижение 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 которого наблюдаются лишь те колебания,

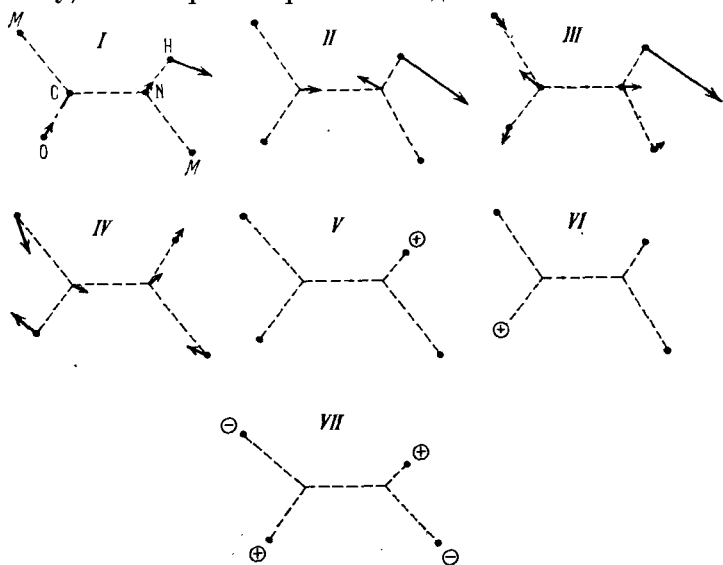


Рис. 5.23. Формы нормальных колебаний амидной группы в N-метилацетамиде (*M* — метильная группа)

которые происходят в фазе во всех элементарных ячейках. Полосы амидной группы, в частности, амид I и амид II, оказываются характеристическими для α -спирали, β -формы и неупорядоченной формы полипептидной цепи. Это показано в табл. 5.3.

Спектры растворов или неориентированных пленок не дают информации о поляризации колебаний. Напротив, при исследовании белков или полипептидов в анизотропных средах (в ориентированных пленках и волокнах) с помощью поляризованного ИК-излучения поляризация колебаний наблюдается непосредственно. Измеряется инфракрасный *дихроизм*, характеризуемый отношением коэффициентов поглощения, измеренных для излучения с направлением электрического вектора световой волны, параллельным и перпендикулярным выделенному направлению.

Таким образом, ИК-спектры могут быть применены для определения вторичной структуры белка, для изучения ионизации аминокислотных остатков и, что особенно важно, для изучения кинетики *дейтерообмена*.

ИК-спектроскопия нуклеиновых кислот менее информативна и практически не используется.

В последнее время значение ИК-спектроскопии в физике белков заметно уменьшилось. Для определения вторичной структуры другие методы (прежде всего КД) оказываются более эффек-

тивными. Напротив, лазерная спектроскопия КР позволяет получать весьма детальную информацию о строении белков и других биологически функциональных веществ. Получаются прекрасные спектры КР растворов, кристаллических и аморфных

Т а б л и ц а 5.3. Характеристики полос амид I и амид II

Конформация	Обозначения колебаний	Частота, см ⁻¹	
		амид I	амид II
Неупорядоченная	ν_0	1658	1520
Антипараллельная	$\nu_{ }$	1658 (сл.)	1530 (с.)
β -форма	ν_{\perp}	1632 (с.)	1510 (сл.)
	ν_{\perp}	1668 (о. сл.)	1550 (сл.)
Параллельная	$\nu_{ }$	1648 (сл.)	1530 (с.)
	ν_{\perp}	1632 (о. сл.)	1530 (сл.)
β -форма	$\nu_{ }$	1650 (с.)	1516 (сл.)
α -спираль	$\nu_{ }$	1650 (с.)	1516 (сл.)
	ν_{\perp}	1646 (сл.)	1546 (с.)

с. — сильная, сл. — слабая, о. сл. — очень слабая полосы в ИК-спектре, \parallel и \perp — полосы, отвечающие колебаниям дипольного момента, параллельным и перпендикулярным к полимерной цепи.

веществ, а также веществ в газовой фазе. Наиболее интересные результаты получают с помощью *резонансного комбинационного рассеяния* (РКР). В этом случае длина волны рассеиваемого лазерного света попадает в область собственного поглощения хромофора биологической молекулы. Интенсивности РКР очень велики, что позволяет изучать биологические молекулы даже при очень малых концентрациях. Методом РКР изучены гемсодержащие белки, хлорофилл, фермент-субстратные комплексы и т. д.

Если молекула не содержит хромофора, необходимого для наблюдения РКР, то хромофор в качестве метки может быть введен посредством химического или нехимического связывания.

В последнее время проведены расчеты форм и частот нормальных конформационных, т. е. крутильных, колебаний для ряда белков. Исследованы колебания доменов относительно друг друга (Левитт). Участки с различной вторичной структурой характеризуются разными областями частот: α -спирали 50—110 см⁻¹, β -слои 5—30 см⁻¹, неупорядоченные поворотные участки 5—75 см⁻¹. Колебательные линии в этих низкочастотных областях действительно удается наблюдать в спектрах КР белков. Соответствующие движения имеют коллективный характер.

§ 5.10. Спектры ядерного и электронного парамагнитного резонанса

Спектры ядерного и электронного парамагнитного резонанса (ЯМР и ЭПР) широко применяются в биофизике.

Рассмотрим сущность парамагнитного резонанса.