

УСПЕХИ ФИЗИЧЕСКИХ НАУК

## НОВЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ В ИНФРАКРАСНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ \*)

Г. Сезерланд

## ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на то, что инфракрасные спектры изучаются около ста лет, приблизительно лишь с 1925 г. результаты этих исследований стали представлять интерес для химии. Когда для интерпретации молекулярных спектров была привлечена квантовая теория атомных спектров, стало ясно, что инфракрасная спектроскопия дает чисто физический метод определения структуры простых многоатомных молекул, и в период между 1920 и 1940 гг. основное внимание было сосредоточено на объяснении спектров маленьких молекул, таких, как вода, аммиак, метан, метилгаллогениды и т. д. По инфракрасным спектрам больших многоатомных молекул было относительно мало работ, поскольку спектры наблюдались от точки к точке, регистрация спектра при работе со спектрометром с высокой разрешающей способностью занимала много времени, причем получались ненадежные результаты. Кроме того, открытое в 1928 г. комбинационное рассеяние (раман-эффект) который позволяет определять за время порядка часа большинство собственных частот сложных молекул (в жидком состоянии), побудило химиков при изучении больших молекул предпочесть раман-спектроскопию инфракрасной. Действительно, огромное количество работ, сделанных за период 1930—1940 гг. по рамановским спектрам, позволили выявить большинство характеристических частот химических связей, хорошо известных сейчас. Однако рамановский спектр не дает всех характеристических частот; кроме того, получение раман-спектра газов, твердых тел или окрашенных жидкостей представляет серьезные трудности.

За время второй мировой войны в технике инфракрасной спектроскопии произошли серьезные изменения. Это было обусловлено необходимостью анализа нефтяных фракций и других продуктов химической промышленности для военных нужд. При использовании спектрометров с низкой разрешающей способностью время регистрации нужной области инфракрасного спектра было снижено с пяти часов примерно до пятидесяти минут. Это означало, что инфракрасный спектр молекулы стало легче регистрировать, чем рамановский; это позволило перейти от изучения инфракрасных спектров небольших молекул к изучению спектров больших и сложных молекул. Другая причина перехода заключается в том, что теоретические методы, применяемые при исследовании структуры

\*) Доклад, сделанный на объединенном симпозиуме Международной комиссии по спектроскопии и Комиссии по спектроскопии Академии наук СССР, состоявшемся в Москве в августе 1958 г.

В качестве дополнения к докладу помещены переводы двух статей автора, в которых более подробно излагаются работы, упомянутые в докладе. Перевод с рукописи Т. Н. Болотниковой.

многоатомных молекул инфракрасными методами, ограничены в применении к малым многоатомным молекулам, содержащим атомы водорода; поскольку межатомные расстояния для большинства из них были определены, наиболее интересные проблемы связаны либо с эффектами взаимодействия между маленькими молекулами, либо с большими молекулами. Указанные обстоятельства имели место между концом второй мировой войны и 1950 г. Начиная с 1950 г., появляются новые направления, и цель настоящей статьи — обрисовать наиболее важные из них.

## НОВЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ В ОБОРУДОВАНИИ И ТЕХНИКЕ

а) **Детекторы.** Детекторы инфракрасной радиации могут быть разделены на два класса, а именно: термо-детекторы и фотодетекторы. В первом классе — повышение температуры, обусловленное поглощением инфракрасной радиации, вызывает изменения определенных физических свойств, которые возможно измерить (например, с помощью термопары или болометра); во втором классе — падающий квант взаимодействует непосредственно с воспринимающим элементом, вызывая изменения некоторых физических или химических свойств приемника.

До 1940 г. вся инфракрасная спектроскопия использовала термодетекторы, если не учитывать ограниченного числа работ в области длин волн меньших  $1\text{ }\mu$ , где применялись фотографические пластинки. В течение последней войны успешно развивается производство полупроводников содержащих сульфид, селенид или теллурид свинца. Несмотря на то, что они чувствительны в очень ограниченной области длин волн (РbTe приблизительно до  $5,5\text{ }\mu$ ), их скорость реакции почти в 100 раз выше, чем у термодетектора, и их внедрение привело к значительному повышению разрешающей способности и скорости регистрации спектра в области их применения. В настоящее время существует постоянное стремление использовать фотопроводниковые детекторы, причем делаются попытки распространить область их применения в длинноволновую сторону. В течение последних двух лет установлено, что тонкие слои антимонита индия могут быть использованы как фотопроводниковый детектор почти до  $8\text{ }\mu$ . Скорость его реакции составляет около  $10^{-7}$  сек, т. е. значительно выше, чем у любого из ранее использовавшихся фотопроводниковых детекторов. Он, по-видимому, не столь чувствителен, как некоторые из свинцовых фотопроводниковых детекторов, но не требует охлаждения и значительно более устойчив. Кремний и германий могут быть применены как фотопроводящие детекторы за  $30\text{ }\mu$ , но они используются лишь при температуре жидкого гелия.

Эти детекторы могут использоваться в будущем при решении специальных проблем. Возможно, что в будущем также могут получить применение болометры, работающие при низких температурах. Теперь, когда стало возможным применить результаты исследования Пельтера, поддерживать низкую температуру детектора станет значительно легче.

б) **Конструкции спектрометров.** Постоянное стремление к достижению высокой разрешающей способности привело к тому, что в настоящий момент чувствительность детекторов больше не ограничивает возможностей использования инфракрасного спектрометра. Наиболее удачное и простое изменение существующих конструкций состоит в применении решеток (или призм) с многократным прохождением через них луча. При таком способе в интервале около  $2\text{ }\mu$  достигается разрешение линий, разделенных лишь несколькими сотыми волновых чисел.

Призмные спектрометры постепенно заменяются дифракционными. Это происходит потому, что сейчас решетки для инфракрасных работ

дешевле, чем призмы. Этим мы обязаны работе д-ра Сэйса и его коллег в Национальной физической лаборатории, которые удачно использовали оригинальное предложение Томаса Мертон, заключавшееся в том, что возможно получение решеток нанесением штрихов на пластмассовом покрытии точно срезанной металлической поверхности; при этом большинство погрешностей может быть устранено при помощи специального метода, известного теперь как «Мертон-метод». Хотя более тонкие решетки, производимые этим методом, до сих пор обладают невысокими качествами по сравнению с полученными обычным способом, они достаточно точны для 90% работ, выполняемых в инфракрасной области.

Решетка  $6 \times 6$  дюймов с 2500 линиями на дюйм может разрешать линии в  $0,1 \text{ см}^{-1}$  в области  $6000 \text{ см}^{-1}$ . Можно было бы добавить, что Мертон-NPL-решетки облегчают регистрацию спектра в далекой инфракрасной области, т. е. за  $150 \mu$  (ср. особенно работы Плайера).

Значительно развивается инфракрасная микроспектроскопия. При комбинациях отражательных микроскопов с инфракрасным спектрометром можно получать спектры образцов меньших, чем  $10^{-6} \text{ см}^{-1}$  и даже волокон размерами всего  $650 \mu \times 17 \mu$ .

в) Интерференционная спектроскопия. Так как по этому вопросу был сделан очень полный обзор профессором Джекинотом, я уделяю этому меньше внимания. Интерференционный метод, в котором преобразование Фурье для интенсивности, копирующее спектр, выполняется с помощью цифровой счетной машины, частично удобен в далекой инфракрасной области, где имеют дело с очень низкой энергией. Д-р Гебби из Национальной физической лаборатории создал такой спектрометр, и возможно, что этот метод может быть использован для достижения разрешающей способности большей той, которая может быть получена с помощью решетки при многократном отражении от нее луча. Этот вопрос сейчас исследуется. Очевидным фактором, который может ограничить применение такого метода, является то, что требуется цифровая счетная машина. Однако такое оборудование становится обычным в любом современном исследовательском центре. Во всяком случае, вычислительные устройства входят в инфракрасную спектроскопию. Их ценность была доказана для спектров отражения, где процесс перевода спектра отражения в спектр поглощения крайне сложен. Другое их применение имеет место при анализах сложных смесей, где наилучший результат может быть достигнут скорее при изучении всей кривой поглощения, чем при попытке сравнивать отдельные максимумы.

#### ИЗУЧЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ

Некоторые очень интересные работы все еще посвящены маленьким молекулам, но я не собираюсь обсуждать их здесь, так как мне кажется, что наиболее интересные проблемы лежат в области молекулярных взаимодействий или в области полимерных молекул. Последние составляют предмет обсуждения третьего раздела настоящей статьи. Инфракрасный анализ является очень сильным средством изучения молекулярных взаимодействий, так как слабые межмолекулярные силы вызывают легко наблюдаемые изменения колебательных частот взаимодействующих молекул. Хорошо известным примером является водородная связь, которая вызывает изменение частоты растяжения  $\text{XH}$  (валентного колебания) порядка 10% (а также интенсивности и внешнего вида), где группа  $\text{XH}$  связана водородом с третьим атомом  $\text{Y}$ . Другие примеры молекулярного взаимодействия, которые можно наблюдать спектроскопически, возникают между молекулами в кристаллическом состоянии, между молекулами

и поверхностями в адсорбированном состоянии, между молекулами газа при высоком давлении и между растворителем и растворенными молекулами в растворе.

а) Водородная связь. Образование водородной связи либо между двумя молекулами, либо внутри одной молекулы  $X-H \cdots YZ$ , сопровождается изменением в положении и внешнем виде трех частот, относящихся к связи  $XH$ , а именно — частоты растяжения и двух деформационных частот; для частоты растяжения связи  $YZ$  (и для двух деформационных частот связи  $YZ$ ) отмечаются меньшие изменения. В результате случайно может быть обнаружена новая низкая частота, соответствующая колебанию растяжения, ассоциируемому со слабой водородной связью. По этому вопросу сейчас имеется огромная литература и невозможно и не имеет смысла пытаться сделать здесь её обзор. Этот вопрос являлся предметом обсуждения Люблинской конференции в августе 1957 г., и в этом же году К. Д. Канноном был опубликован обширный обзор. Главной неразрешенной проблемой является объяснение большого уширения полос (и случайной тонкой структуры), которое связывается с колебанием растяжения и неплоскими деформационными колебаниями связи  $XH$ . Несомненно может играть роль комбинация главной частоты с более низкими частотами слабой водородной связи, но должен быть определен вклад, вносимый ангармоничностью, ферми-резонансом и даже преддиссоциацией.

б) Молекулы в кристаллах. До последнего времени большинство исследований молекулярных взаимодействий проводилось для молекул в жидкостях и газах, в настоящее время много внимания уделяется молекулам в кристаллическом состоянии. В этом случае задача теоретической интерпретации в некоторых отношениях проще, так как ориентация одной молекулы по отношению к другим обычно хорошо известна из рентгеновского анализа (исключая атомы водорода). Однако в течение последних пяти лет рентгеновские методы были уточнены и улучшены до такой степени, что в нескольких случаях известны положения атомов водорода; кроме того, положение атомов водорода иногда определяется с помощью ядерного магнитного резонанса или дифракции нейтронов. Используя поляризованное инфракрасное излучение, можно в некоторых случаях определить положение водородных атомов с помощью инфракрасного анализа, когда это невозможно сделать методом рентгеновских лучей (например, в мусковите и биотите). В процессе таких исследований в спектрах брусита были открыты «аномальные» эффекты, которые в первом приближении находились в противоречии с результатами рентгеновского анализа. Теперь показано, что эти эффекты обусловлены связью свободного движения атома водорода с колебанием растяжения  $XH$ , и анализы таких эффектов могут давать ценные сведения о потенциальном поле, в котором движется атом водорода. Другого способа для получения этих данных не существует.

Другой способ изучения сил в ионных кристаллах состоит в замещении одного из ионов молекулярным ионом и наблюдении возмущения колебаний этого молекулярного иона, вызванного кристаллическим полем. Например, в кристаллы различных щелочных галоидов на место ионов галоидов вводились такие ионы, как  $BH_4^-$ ,  $NCO^-$ ,  $NCS^-$ ,  $OH^-$ . Найдено, что значения основных частот таких чужеродных ионов зависят определенным образом от размера иона либо щелочи, либо галоида. В случае молекулярных кристаллов (например,  $HCl$  или нафталина) для объяснения тонкой структуры многих полос весьма полезно замещение водорода на дейтерий. Например, было показано, что в галоидоводородах в низкотемпературной орторомбической фазе водородные связи молекул образуют зигзагообразные цепи.

в) Другие эффекты взаимодействия. Простейший случай проявления эффекта взаимодействия в инфракрасной спектроскопии наблюдается, вероятно, при исследовании газообразного водорода при высоком давлении. Собственные частоты, которые обычно «запрещены» для такой двухатомной молекулы из одинаковых ядер, становятся активными в поглощении. Это происходит потому, что при таких условиях молекула в процессе столкновения остается поляризованной достаточно долго для того, чтобы поглотить радиацию. Такой эффект не является неожиданным (достаточно вспомнить изменение правил отбора при переходе от газовой фазы к конденсированному состоянию). Однако, когда используются два различных газа, наблюдается неожиданное явление—имеет место поглощение при частоте, являющейся суммой собственных частот двух газов. Эти одновременные переходы тоже связываются с процессом столкновения, но теперь уже двух разнородных молекул. Ван-Кранендон недавно развил теорию, объясняющую такие эффекты.

При изучении спектров молекул в растворах давно было отмечено, что частоты и интенсивность полос растворенного вещества зависят от природы растворителя. В последние годы проделано значительное количество экспериментальных работ по изучению влияния растворителя с целью выявить закономерности, связывающие изменения частот с определенными физическими свойствами растворителя (например, диэлектрической постоянной). Не удивительно, что в результате появилось убеждение, что общие свойства растворителя не могут ничего дать для этой цели. В данном случае мы имеем дело со специфическими межмолекулярными силами короткого действия и необходимо построить достаточно надежную теорию этого взаимодействия. Многообещающий шаг в этом направлении был недавно сделан Букингемом.

Молекула, адсорбированная на поверхности, может в некоторой степени искажаться под действием сил, привязывающих ее к поверхности; это возмущение должно влиять на инфракрасный спектр. Если бы эти эффекты взаимодействий наблюдались, то из них можно было бы получать сведения о природе адсорбции. Такие эффекты могут быть получены, но экспериментальные трудности очевидны и значительны. Эти наблюдения впервые были проделаны в России около десяти лет назад, но за последние пять лет значительное число работ было сделано в США и Англии. В результате стало возможным получать сведения о природе связывающих сил (аналогично водородным связям в некоторых случаях), о существовании и природе двух различных типов поверхностей адсорбции и об эффективном электрическом поле на поверхности. В случае физической адсорбции наблюдаемые изменения частот являются относительно малыми, но в хемisorбции смещения, естественно, много больше. В последнем случае было показано, что молекулы СО могут связываться в линейные или мостовидные комплексы. Так как исследовать процесс адсорбции на молекулярном уровне другими физическими способами крайне трудно, можно ожидать, что будущие исследования в инфракрасной спектроскопии окажутся очень важными, несмотря на экспериментальные трудности, которые здесь могут встретиться.

#### ИЗУЧЕНИЕ ВЫСОКОПОЛИМЕРОВ

Полимеры образуют специальный класс больших молекул, в которых повторяющееся звено часто совсем мало, и инфракрасный спектр полимера почти полностью определяется основными частотами повторяющейся группы. Значительная часть этих частот известна в результате изучения

подходящих малых молекул и соответствующие полосы легко идентифицируются в спектрах полимеров. Такие частичные анализы спектров полимеров обычно не представляют большого интереса, исключая подтверждение структуры полимера в тех нескольких случаях, когда это невозможно сделать химическим путем. Конечно, в аналитической работе часто может быть установлено присутствие и природа примесей, но структурные вопросы, такие, как природа и положение разветвлений, или конфигурация полимерных цепей, остаются невыясненными. В течение последних пяти лет было показано, что при определенных условиях конфигурация полимерной цепи может быть определена инфракрасными методами.

На этом я коротко останавлиюсь.

а) **С и н т е т и ч е с к и е   п о л и м е р ы .** Начнем с простейшего из полимеров—полиэтилена, который образован повторяющимися группами  $\text{CH}_2$ . Если одна цепь образует полностью вытянутую форму, ее можно описать как пространственный кристалл с ячейкой, состоящей из двух групп  $\text{CH}_2$ . Эти шесть атомов обладают 18 степенями свободы, из которых четыре могут быть отнесены к трем трансляционным движениям и одному вращению (вокруг оси цепи), оставшиеся 14—к вибрационным движениям. Можно показать, что в спектре такой цепи в поглощении могут быть активны лишь 5 из 14 колебаний. Это:

асимметричное растяжение	$\text{CH}_2$
симметричное растяжение	$\text{CH}_2$
изгибание	$\text{CH}_2$
раскачивание	$\text{CH}_2$
крутильное колебание	$\text{CH}_2$

Однако практически мы имеем дело не с изолированной полимерной цепью, а с группой полимерных цепей. Если мы предположим, что цепи образуют регулярную кристаллическую решетку, можно установить правила отбора. Кристаллическая структура полиэтилена была определена с помощью рентгеновского анализа; единичная ячейка для него включает две цепи, т. е. 12 атомов. Можно ожидать, что каждое из ранее упомянутых пяти основных колебаний станет двойным, так как в действительности мы слабо связали две независимых колеблющихся системы. Однако, из пяти расщепляются лишь четыре основных колебания, колебание качания сохраняется неизменным. В равной степени представляет интерес тот факт, что теперь становится активной частота закручивания отдельной группы  $\text{CH}_2$ .

Кроме того, становятся активными две новых низких частоты колебания решетки, дающие всего 12 активных основных частот. Итак, можно точно предсказать, что спектр монокристалла полиэтилена таков же, как спектр малых молекул в газовом состоянии. Полиэтилен обычно кристаллизуется лишь частично, поэтому точный отбор может быть проведен при исследовании спектров монокристалла длинных цепей парафинов. В результате облегчается исследование спектра образца частично кристаллического полиэтилена, в котором кристаллики ориентируются в результате натяжений при охлаждении. В спектре аморфной части полимера правила отбора менее строги (число запретов уменьшается) и «аморфные полосы», таким образом, легко идентифицируются. Если молекулы в аморфной части полимера полностью вытянуты и ориентированы в такой же степени, что и кристаллы, можно ожидать, что некоторые новые полосы будут очень слабы, так как разница между спектрами одной цепи и всего кристалла невелика и по крайней мере вполне определена. Если аморфные полосы сильны, это указывает на то, что, вероятно, имеется удачно получившаяся упаковка молекул в аморфной части.

Этот тип анализа в настоящее время применяется к различным синтетическим полимерам. Он проверен, как наиболее ценный способ исследования образования кристаллитов в полимерах.

б) Биологические полимеры. Для того чтобы понять сущность некоторых биологических явлений таких, как действие генов, синтез протеинов или образование антител с точки зрения молекулярного строения, необходимо в деталях установить конфигурацию протеиновых и нуклеиновых кислот. Физическим методом, который может быть столь далеко использован, является рентгеновский анализ, но успеха здесь до сих пор не достигнуто; для некоторых глобулярных протеинов все еще неизвестны атомные координаты. Инфракрасный анализ является очень ценным вспомогательным методом; часто он дает независимые подтверждения главных особенностей структуры, и случайно оказался ведущим на ранней стадии в рентгеновских исследованиях, исключив модель, которая казалась годной для предварительного анализа дифракционных данных.

Из предыдущего раздела о синтетических полимерах ясно, что точное определение структуры инфракрасными методами может быть проведено и на монокристаллах биологических полимеров. К несчастью, при наблюдении удовлетворительных спектров монокристаллов биологических полимеров встречаются огромные экспериментальные трудности. Поэтому большинство инфракрасных работ было проделано для ограниченного круга волокнистых протеинов таких, как волос, птичье перо, шелк и т. д. В этом случае важной проблемой являлось определение конфигурации полипептидной цепи, которая образует остов молекулы протеина. Существует довольно легкий способ идентификации главных полос в спектре протеина и отнесения их к колебаниям групп CO и NH пептидного звена.

Если полипептидная цепь полностью вытянута, то связи CO и NH должны быть нормальны к осям волокон и должны проявлять хорошо известный «перпендикулярный дихроизм» (т. е. это значит что оси волокон расположены параллельно щели спектрометра). Эллиот и его сотрудниками было найдено, что протеины некоторых волокон имеют спектры такого типа (например, шелк), но в других (например, птичье перо) наблюдается дихроизм «параллельный». Это должно означать, что в таких протеинах полипептидная цепь вытянута не полностью. Сначала были предложены различные формы цепей, но в настоящее время кажется, что наиболее вероятно предложенная Паулингом и Кори свернутая конфигурация.

В их свернутой  $\alpha$ -форме полипептидная цепь образует спираль с группами CO и NH почти параллельными осям полимера. Внутренние водородные связи между связями CO и NH удерживают молекулу в спиральной конфигурации.

Так как протеины этих волокон далеко не полностью ориентированы, то наблюдаемый дихроизм никогда не бывает очень велик и совершенно невозможно определить структуру, если не установлена количественно степень дезориентации. Методика для этого недавно была разработана и применена к таким протеинам, как, например, птичье перо, шерсть слона, шерсть лошади, рог, перо, внутренности шелкопряда и коллаген. Для каждого из этих протеинов было установлено семь различных структур и в большинстве случаев можно отбросить все, кроме одной или двух моделей.

Необходимо подчеркнуть, что этот метод зависит от определенных предположений, которые не всегда могут быть правильны. Эти предположения следующие:

а) Изменение электрического момента (связанное с поглощением отдельной связи) направлено относительно повторяющегося звена

полимера так же, как и определенное при инфракрасном излучении для монокристаллов малых молекул, содержащих повторяющиеся звенья.

б) Пространственное распределение полимерных цепей обладает определенной степенью симметрии.

в) Изучаемые образцы обладают одним и тем же типом структуры.

Первое предположение необходимо, так как из работ по монокристаллам малых молекул, содержащих пептидную связь, было найдено, что изменение дипольного момента при основном колебании, растягивающем связь (например, NH или CO), не точно направлено вдоль этой связи, а может образовывать с ней угол порядка  $20^\circ$ . Таким образом, направления этих связей (и соответственно молекулярная конфигурация) не могут быть определены, пока неизвестны соответствующие углы для пептидных связей в протеинах. До настоящего времени исследованы монокристаллы лишь двух различных молекул. Углы в этих двух кристаллах отличаются не больше, чем на пять градусов. Однако для того чтобы установить степень неопределенности, обусловленную этим предположением, необходима большая работа по изучению монокристаллов ряда других молекул.

Можно показать, что второе предположение является справедливым, если образец приготовлен определенным образом.

Третье предположение с первого взгляда кажется справедливым и подтверждается рентгеновскими анализами. Сомнения вызывает то, что структура большинства инфракрасных полос протеина сложна. Это связано либо с наличием двух различных конфигураций, либо с трудно определяемым различием в частотах для паракристаллического и слабо ориентированного окружения полимерных молекул. В простых синтетических полимерах таких, как полиэтилен, найдены различия в частотах для кристаллических и аморфных форм полимера. На полосы поглощения также влияет структура монокристалла, что связано с взаимодействием между соседними молекулами.

Одно время казалось, что инфракрасный анализ пригоден для дифференциации различных конфигураций молекул протеинов (особенно свернутой ( $\alpha$ -) и полностью вытянутой ( $\beta$ -) формы полипептидной цепи), даже когда полипептидные цепи не образуют сколько-нибудь упорядоченную структуру. Этот метод зависит от изменения частот поглощения связи CO в синтетических полипептидах, которые могут быть получены в любой из двух форм осаждением из соответствующего раствора. Однако имеется так много причин, способных вызвать малое изменение частот полос поглощения, что применение любого такого правила к протеинам (даже на эмпирической основе) приводит к серьезным противоречиям и трудностям. Пока причины этих изменений не выяснены для простейших соединений, использование их для определения структуры протеинов нецелесообразно.

В случае дезоксирибонуклеиновых кислот (DNA) предварительные рентгеновские анализы приводят к модели (модель Крик-Ватсона), согласно которой этот полимер состоит из двух спиральных цепей, соединенных друг с другом водородными связями между пуриновым и пиримидиновым основаниями. Инфракрасное изучение высокоориентированных пленок DNA дает независимые сведения о главных чертах модели Крик-Ватсона и приводит к такой же модификации положения фосфатных групп, что и последний наиболее точный рентгеновский анализ.

Одна из наиболее интересных особенностей модели Крик-Ватсона заключается в предположении о специфичном характере спаривания оснований (т. е. адемина с тимином и хинина с цитозином), что создает основу



для возможного механизма воспроизведения генов. До сих пор не даны доказательства этой основной особенности. Это может служить прекрасным примером проблем, которые возникают при применении инфракрасной спектроскопии к биологии.

## ДОПОЛНЕНИЕ I

ИНФРАКРАСНЫЙ И РЕНТГЕНОВСКИЙ АНАЛИЗЫ  
КРИСТАЛЛИЧЕСКИХ СТРУКТУР \*)

Рентгеновский дифракционный метод анализа кристаллических структур оказался чрезвычайно плодотворным. Начиная с простых неорганических солей таких, как хлористый натрий, были объяснены структуры таких сложных неорганических соединений, как силикаты; для простых органических соединений межмолекулярные расстояния определены с рассчитанным постоянным отклонением порядка  $0,01 \text{ \AA}$ ; теперь с помощью этого сильного аналитического средства начинают исследовать и молекулы полимеров таких, как белки и нуклеиновые кислоты. Успех рентгеновских методов в кристаллографии был так велик, что в течение последних двадцати пяти лет главное внимание в структурной инфракрасной спектроскопии уделялось простым молекулам, находящимся при комнатной температуре в газовом состоянии. Так как в течение этого периода было сделано большое число наблюдений по инфракрасным и рамановским спектрам кристаллов, то объектом исследования часто являлось определение структуры кристалла.

Исследователи обычно ограничивались кристаллом, структура которого известна из рентгеновских анализов, и показывали, что наблюдаемый вибрационный спектр согласуется со спектром, предсказанным рентгеновской моделью. Они не могли определять меядерные расстояния, но были в состоянии установить симметрию окружения легких ядер таких, как углерод, азот и кислород.

Однако при изучении кристаллов, содержащих атомы водорода, обычный рентгеновский метод явно проигрывает по сравнению с инфракрасным анализом. Рассеяние на атомах водорода столь слабо, что оно не может быть непосредственно замечено и нужно использовать специальную технику для того, чтобы положение этих атомов могло быть обнаружено с помощью дифракции рентгеновских лучей. С другой стороны, атомы водорода особенно легко обнаруживаются с помощью инфракрасного анализа, так как соответствующие водородные колебания лежат в доступной части инфракрасного спектра и широко исследованы в простых многоатомных молекулах. Конечно, линии расположения атомов водорода во многих случаях могут быть определены по данным рентгеновского анализа, если использовать данные об углах между валентными связями, почерпнутые из структурной химии. Тем не менее точное положение атомов водорода обычно остается неизвестным, а так как структурная химия является только еще развивающейся наукой, то предположенные направления валентных связей могут оказаться неверными. В определенных случаях структурная химия может лишь предположить место расположения связи (ср. борные гидриды, у которых определение положения водородов инфракрасным методом не сделано).

Может показаться, что определение положения атомов водорода не имеет очень большого значения и что, поскольку положение других атомов установлено, от присоединения атомов водорода можно извлечь немного. Встречаются определенные случаи, когда это справедливо (например, водородные атомы во многих углеводородах

\*) Nuovo Cimento, supplemento al vol. 2, serie X, стр. 635—641.

и углеводородные остатки больших молекул), однако, часто существует взаимодействие атомов водорода с непосредственными соседями, которое является главным источником сил, связывающих воедино кристалл. Особый пример этого эффекта проявляется в водородной связи, природа которой до сих пор точно не ясна, и едва ли может быть преувеличена важность ясного понимания этого явления в кристаллах биологически важных молекул (таких как белок, и нуклеиновые кислоты).

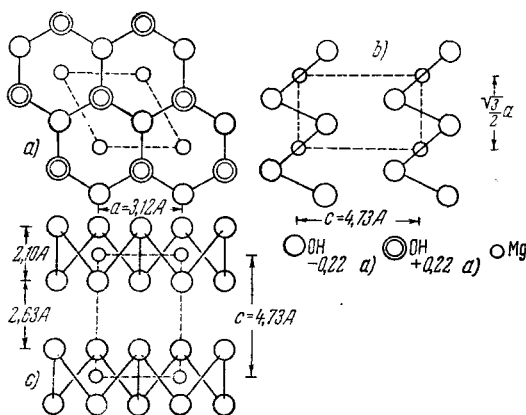


Рис. 1. Брусит  $\text{Mg}(\text{OH})_2$ , кристаллическая структура:

a—проекция на плоскость (0001), ось—с перпендикулярна плоскости рисунка; b—проекция на плоскость, нормально к плоскости (0001) и нормально к оси a; c—проекция на плоскость, нормально к плоскости (0001) и параллельно оси a.

корреляция с результатами рентгеновского анализа, а впоследствии распространить результаты на те же молекулы в жидком состоянии, аморфной форме или в растворе.

В этой статье я сделаю обзор последних работ по инфракрасным анализам кристаллической структуры, выполненных в Мичиганском университете.

Первым подходящим кристаллом, который мы выбрали для сравнения инфракрасного и рентгеновского анализов, был брусит ( $\text{Mg}(\text{OH})_2$ ). Он исследовался рентгеновским методом Аминовым<sup>1</sup> и Берналом и Мегав<sup>2</sup>. Полученная при этом структура показана на рис. 1. Вдоль оси c (нормально к плоскости расщепления) атомы кислорода образуют слои с гексагональной упаковкой. Атомы Mg расположены между слоями атомов кислорода. Положение атомов водорода не определено, но предполагается (из соображений симметрии), что они расположены на линии, соединяющей кислороды последовательных слоев и параллельной оси c. Элементарная ячейка содержит один атом Mg и две группы OH.

Из основной теории инфракрасных спектров кристаллов следует, что в инфракрасном спектре активно лишь одно колебание OH, а связанное с ним изменение электрического момента должно быть направлено вдоль оси c. На рис. 2 показан спектр монокристалла брусита, наблюдае-

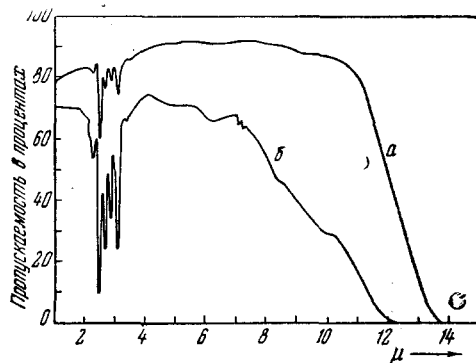


Рис. 2. Спектр брусита при луче падения, параллельном оси c:

a—толщина 15—20  $\mu$ ; б—толщина приблизительно 175  $\mu$  (NaCl).

мый вдоль оси  $c$ . Видно, что у  $3 \mu$  (где, как известно, дает поглощение нормальное колебание растяжения) имеется несколько непредвиденных максимумов. Принадлежит ли это поглощение группам  $\text{OH}$ , можно установить, приготовив дейтерированный брусит. В этом случае поглощение смещается в длинноволновую сторону. Это хорошо известный изотопический эффект на водородных колебаниях, вызванный дейтерированием. Так как расстояния между максимумами тоже уменьшаются приблизительно в два раза, то тонкая структура не может быть обусловлена комбинацией основных колебаний  $\text{OH}$  с низкочастотными колебаниями в решетке атомов  $\text{Mg}$  и  $\text{O}$ . Так как рентгеновская картина, данная кристаллом, который мы использовали, была несколько размыта, возможно, что необъясненное поглощение может быть обусловлено дефектами в кристалле.

Однако монокристалл портландита ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ), который изучался д-ром Лиэнгом, дает превосходную рентгеновскую картину, и его спектр около  $3 \mu$  фактически идентичен спектру, найденному для брусита. Структуры портландита и брусита одинаковы ( $\text{Ca}$  замещает  $\text{Mg}$ ), поэтому инфракрасная картина определенно является характеристикой группы  $\text{OH}$ . Это подтверждает данные более ранних исследований о том, что тонкая структура не может быть связана с колебаниями в решетке более тяжелых атомов.

Когда брусит исследовался при облучении под углом к оси  $c$ , проявилась новая полоса поглощения у  $2,74 \mu$  (рис. 3). Она полностью поляризована вдоль оси  $c$ . Это предвиденная полоса поглощения. Большое число наблюдений показали, что между  $2,06 \mu$  и  $3,73 \mu$  имеется 14 полос, которые в брусите связываются с группами  $\text{OH}$ . Этот вопрос будет обсужден в другом месте.

Наша задача в данном случае подчеркнуть различие между результатами рентгеновского и инфракрасного анализов для  $\text{Mg}(\text{OH})_2$  и  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ . Из инфракрасных данных можно сделать два вывода, несовместимых с результатами рентгеновского анализа:

1. Элементарная ячейка в  $\text{Mg}(\text{OH})_2$  должна содержать больше, чем две группы  $\text{OH}$ .
2. Атомы водорода не могут лежать точно на линии, соединяющей атомы кислорода, т. е. на линии параллельной оси  $c$ .

Оказывается, эти трудности могут быть устранены в случае, если атомы водорода в брусите занимают места беспорядочно, с точки зрения рентгеновского анализа. Можно предложить несколько структур такого типа, которые могли бы быть количественно рассчитаны для инфракрасных результатов. Однако какие из них правильны, пока еще трудно решить. Сейчас ведутся более детальные анализы, которые, возможно, разрешат все неясности\*).

Вторым примером, когда инфракрасный анализ дает новые сведения о положении атомов водорода, может служить слюда. Для структуры

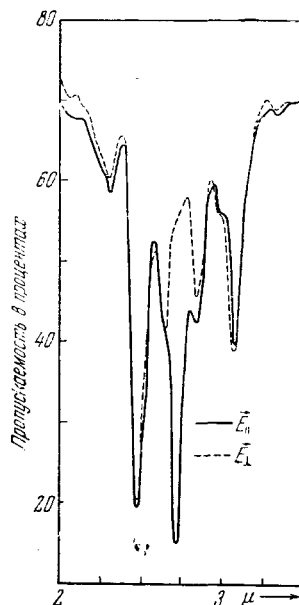


Рис. 3. Поляризованный спектр кристалла брусита с осью  $c$ , направленной под  $45^\circ$  к лучу падения, с электрическим вектором, параллельным и перпендикулярным к плоскости, образованной осью  $c$  и лучом падения ( $\text{NaCl}$ ).

\*) См. J. opt. Soc. Am. 46, 464 (1956).

слюды, известной из рентгеновского анализа, описаны положения всех атомов, за исключением атомов водорода. Общая формула для слюды  $K(Al \text{ или } Mg, \text{ или } Fe)_3(AlSi_3O_{10})(OH)_2$ , а на рис. 4 показана структура мусковита. Кристаллографическая ячейка образована двумя сдвоенными слоями, разделенными плоскостью ионов K. В каждой кристаллографической ячейке восемь групп OH (хотя некоторые из них могут быть замещены ионами F). Если пространственная группа симметрии есть группа  $^6C_{2h}$ , то элементарная ячейка Бравэ (которая является основной для инфракрасного анализа) содержит лишь четыре группы OH. Из теории группы следует, что в поглощении должны быть активны только два колебания OH. Так, можно ожидать, что мусковит имеет две полосы поглощения около  $2,75 \mu$ . Однако, возможно, что расстояние между ними будет весьма мало, так как взаимодействие вдоль плоскости ионов K должно быть очень слабо. У мусковита проявляется только один максимум поглощения  $2,7 \mu$ . Вероятно, в этом случае расщепление слишком мало для того,

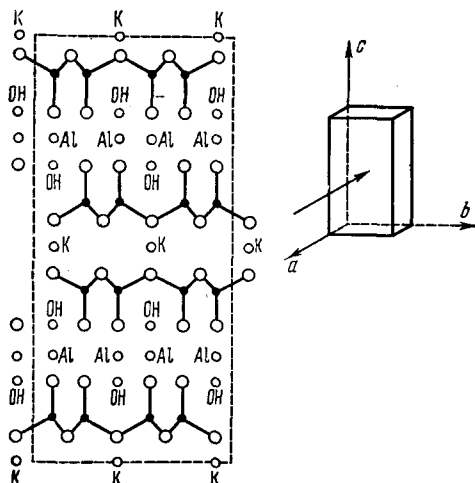


Рис. 4. Рентгеновская структура мусковита:

○ — кислород, ● — кремний.

чтобы его можно было наблюдать. Изучив дихроизм этого поглощения, можно установить направление связи СН в мусковите. Оно показано на рис. 5. У биотита, однако, найдены две полосы поглощения, обусловленные колебанием растяжения OH, одна  $2,72 \mu$  и другая —  $2,83 \mu$ . Более того, дихроизм двух этих полос очень отличается от дихроизма полосы  $2,75 \mu$  мусковита. Мы пришли к выводу, что ячейка Бравэ для биотита вдвое больше ячейки мусковита, т. е. в биотите условная кристаллографическая элементарная ячейка (содержащая 8 групп OH) идентична ячейке Бравэ и обладает пространственной симметрией  $C_{2h}^4$ . При детальном исследовании дихроизма этих двух полос для различных углов падения можно установить направление связей OH в биотите. Они совершенно отличны от направлений, найденных в мусковите. Сравнение их показано на рис. 6.

Таким образом, инфракрасный метод обнаружил очень заметную разницу между мусковитом и биотитом, которая не была отмечена при рентгеновском анализе. В настоящее время изучается причина различия в положениях водорода в этих двух случаях. Мы должны заметить, что различие не является неожиданным, если принять во внимание различие в тяжелых атомах для этих двух слюд.

Можно добавить, что по инфракрасному спектру флогопит кажется больше похожим на биотит, чем мусковит, но детально мы его еще не исследовали.

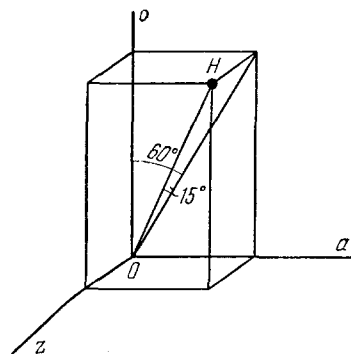


Рис. 5. Ориентация связи OH в мусковите.

В настоящее время хорошо известно, что многие важные физические свойства высокополимерных материалов зависят от степени кристалличности полимера. Кристалличность может меняться в широких пределах в зависимости от метода приготовления и последующих теплового режима или механической обработки полимера.

Когда ориентируют частично кристаллический и частично аморфный полимер, важно уметь определять степень ориентации кристаллических и аморфных областей.

С помощью рентгеновского анализа трудно различать ориентированные кристаллические и ориентированные аморфные части; поэтому точное определение степени кристалличности вызывает затруднения. В такого рода работах особое преимущество имеет инфракрасный метод. Многие полимеры, такие как каучук, неопрен, гуттаперча, нейлон, полиэтилен, терефталат и полиэтилен, проявляют заметное различие в инфракрасных спектрах при переходе от кристаллического к аморфному состоянию.

Объяснение всех этих изменений все еще не дано, но то, что различия должны существовать, легко понять из следующих соображений. В кристаллическом состоянии молекулы образуют определенные повторяющиеся группы. Это означает, что силы взаимодействия между молекулами следуют определенному закону, определяемому элементарной ячейкой. Это приводит к мультиплетной структуре полос поглощения, связанной с движением наиболее сильно взаимодействующих атомов. Степень мультиплетности зависит от числа взаимодействующих атомов в элементарной ячейке, а разрешение компонент мультиплета зависит от величины сил взаимодействия. В аморфном состоянии силы носят случайный характер, что приводит к различному — от сильного до слабого — уширению некоторых полос поглощения.

Это учитывается главным образом при определении полос кристаллической формы, не проявляющихся в аморфной форме. С другой стороны, для кристалла действуют строгие правила отбора, которые ограничивают число наблюдаемых основных частот<sup>4</sup>, а так как эти правила отбора зависят от упорядоченного расположения молекул в решетке, они не применимы к аморфной форме. Таким образом, определенные полосы поглощения могут проявляться лишь в аморфном состоянии. Кроме того, в случае изомерных форм молекулы (обусловленных заторможенным внутренним вращением), в твердом состоянии может присутствовать лишь одна из изомерных форм.

Рассмотрим в качестве примера полиэтилен. В аморфном состоянии это соединение имеет одну полосу поглощения  $721\text{ см}^{-1}$ , обусловленную крутильным колебанием группы  $\text{CH}_2$  около оси цепи. В кристаллическом веществе найдено два максимума: один  $731\text{ см}^{-1}$  и другой  $721\text{ см}^{-1}$ . По данным исследования длинноцепочечных парафинов установлено, что в кристаллической форме проявляются два равных максимума<sup>5</sup> при  $721$  и  $731\text{ см}^{-1}$ , имеющих различные поляризационные свойства<sup>6</sup>.

Таким образом, при изучении полосы  $731\text{ см}^{-1}$  ориентированного полиэтилена можно установить степень кристалличности и степень

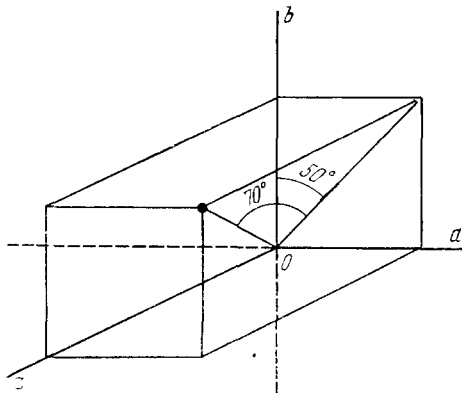


Рис. 6. Ориентация связи ОН в биотите.

ориентации. Как только это будет сделано, подобные исследования полосы  $721\text{ см}^{-1}$  (учитывая вклад, обусловленный кристаллической формой) делают возможным определение степени ориентации аморфной части<sup>6</sup>. Исследования инфракрасных полос, характеризующих кристаллические и аморфные состояния полимеров и других молекул, только начинают проводиться. Со временем станет возможным использование кристаллических полос для определения типа кристаллической структуры<sup>7</sup>. Как только будет ясна полная интерпретация таких полос, станет возможным получение данных о величинах межмолекулярных сил в кристаллах по разрешению мультиплетов в спектрах поглощения. Эти силы играют главную роль в определении макроскопических свойств полимеров, и инфракрасный анализ представляет собой один из непосредственных методов установления их природы.

Для сравнения инфракрасного и рентгеновского методов в совершенно различных областях кратко рассмотрим проблему двух форм алмаза.

Алмазы могут классифицироваться как тип I и тип II. Первый дает выразительную рентгеновскую картину и имеет инфракрасное поглощение в интервале длин волн между 5 и 3  $\mu$ . До сих пор не дано объяснения чрезвычайной отражательной способности, проявляемой алмазом типа I, но Лонсдэйль<sup>8</sup> предположил, что тип I более совершенен, чем тип II, так как последний обладает мозаичной структурой. С точки зрения спектроскопической мы пришли к прямо противоположному заключению. Алмаз не имеет инфракрасного поглощения, связанного с основными частотами, и, таким образом, алмаз типа II спектроскопически совершен. Дополнительные полосы поглощения, проявляющиеся в алмазе типа I, указывают на то, что он неправилен<sup>9</sup>. Можно показать, что большинство полос поглощения, наблюдаемых между 5 и 30  $\mu$ , относятся к решетке алмаза, но некоторые из полос носят такой характер, что они должны быть связаны с примесными центрами. Эти примесные центры могут быть действительно незначительными химическими примесями либо они могут являться дефектами решетки, обусловленные аномальными положениями атомов углерода.

Одна из полос у 6  $\mu$  с достоверностью может быть отнесена к колебанию  $C = C$ . Полное обсуждение этой работы будет сделано позже, здесь только установлено, что алмаз типа I имеет очень богатый инфракрасный спектр, так что сведения о различии между алмазами типа I и типа II, полученные из инфракрасного анализа, имеют большее значение, чем данные рентгеновского анализа. Таким образом, инфракрасным методом часто бывает очень легко обнаружить малое количество постороннего вещества, внедренного случайным образом в кристалл, что совсем невозможно сделать с помощью рентгеновского анализа.

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. G. A min off, Geol. Foren. Forh. Stock. 41, 407 (1919); Zeits. Krist. 56, 506 (1931).
2. J. D. Bernal and H. D. Megaw, Proc. Roy. Soc. A151, 384 (1935).
3. R. T. Mara and G. B. B. M. Sutherland, Journ. Opt. Soc. Am. 43, 1100 (1953).
4. C. Y. Liang, G. B. B. M. Sutherland and S. Krimm, Journ. Chem. Phys. 22, 1468 (1954).
5. R. S. Stein and G. B. B. M. Sutherland, Journ. Chem. Phys. 21, 379 (1953).
6. S. Krimm, Journ. Chem. Phys. 22, 567 (1954).
7. W. H. Cobbs and R. L. Burton, Journ. Polymer Science 10, 275 (1953).
8. K. Lonsdale, Nature 153, 669 (1944).
9. G. B. B. M. Sutherland, D. E. Blackwell and W. G. Simeral, Nature 74, 901 (1954).

ДОПОЛНЕНИЕ II  
ИНФРАКРАСНЫЙ АНАЛИЗ СТРУКТУРЫ ПРОТЕИНОВ  
И НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ \*)

П р о т е и н ы

Инфракрасные спектры всех протеинов в общем очень похожи друг на друга и различаются лишь в деталях (рис. 1). Это нужно ожидать, так как спектры некоторых протеинов содержат главным образом полосы,

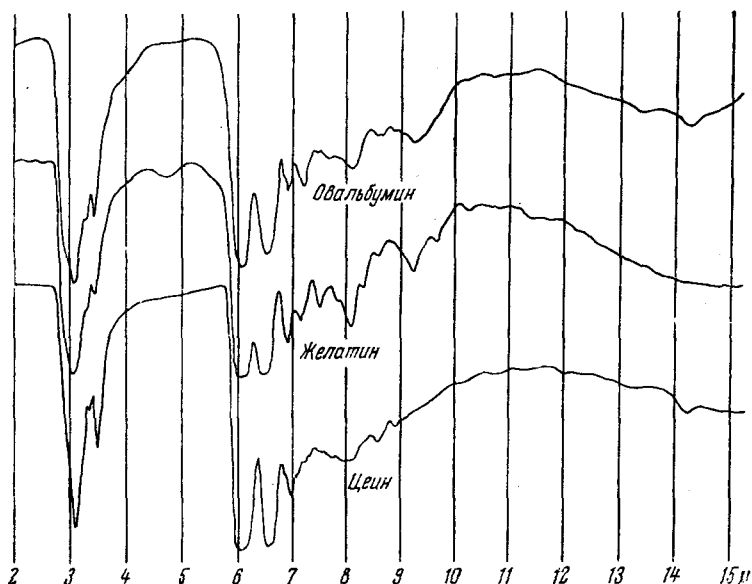


Рис. 1. Инфракрасные спектры трех типичных протеинов.

связанные с характеристическими колебаниями повторяющегося пептидного звена, тогда как полосы, связанные с различными боковыми цепями (более слабые и перекрывающиеся на значительном расстоянии) могут быть обнаружены и идентифицированы, если протеин состоит из нескольких аминокислот.

Например, для шелка возможна идентификация полос, относящихся к аланиновым и глициновым остаткам, в результате сравнения спектров шелка со спектрами полиаланина и полиглицина (Астбури, 1948).

Можно приближенно описать определенные собственные колебания пептидного звена, если предположить (что кажется очень вероятным из исследований дифракции рентгеновских лучей и ядерного магнитного резонанса), что эти группы атомов обладают плоской конфигурацией (рис. 2). Они приведены в таблице I вместе с их значениями в единицах частот ( $\text{см}^{-1}$ ) и длин волн ( $\mu$ ).

Видно, что с помощью частот, перечисленных в этой таблице (которая включает также два из собственных колебаний  $\text{C}-\text{H}$ ), описываются главные особенности спектров, приведенных на рис. 1. Если полипептидные цепи хорошо ориентированы, так что все связи  $\text{CO}$  (и  $\text{NH}$ ) имеют

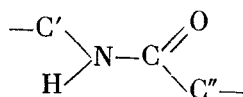


Рис. 2. Молекулярная конфигурация пептидного звена.

\*) Instituto Lombardo di Scienze e Lettere, Milano, v. 89 1955.

одинаковое направление, то последнее может быть определено при изучении дихроизма соответствующих полос в плоскополяризованной радиации.

Т а б л и ц а I  
Приближенные типы собственных колебаний  
пептидного звена

Тип	Частота в $\text{см}^{-1}$	Длина волны в $\mu$
N—H—растяжение	3280	3,1
N—H—неплоская деформация	650	15,0
{ C—N—растяжение	1250	8,0
{ N—H—плоская деформация	1550	6,45
C=O—растяжение	1650	6,05
C=N—растяжение	2900	3,45
C=N—деформация	1460	6,9

Впервые это сделано Эллиотом с сотрудниками (Амброс, 1949), которые показали, что можно различать  $\alpha$ -(свернутую) и  $\beta$ -(вытянутую) формы волокнистых протеинов, открытые Астбури, если учесть, что для  $\alpha$ -формы дихроизм связей CO и NH оказывается преимущественно параллельным направлению осей полипептидных цепей, тогда как для  $\beta$ -формы OH приблизительно перпендикулярен этим осям. В таблице II приведены

Т а б л и ц а II  
Инфракрасный дихроизм  
протеинов

Частота	$\alpha$ -форма	$\beta$ -форма
1550	⊥	
1650		⊥
3280		
4830	⊥	⊥

полосы, которые главным образом используются для этой цели. Следует отметить, что дополнительно к трем собственным частотам, отмеченным в таблице I, для подтверждения надежности эмпирических методов разделения свернутых и вытянутых форм полипептидных цепей, используется комбинационная частота  $(1550 + 3280) 4830 \text{ см}^{-1}$ .

Из таких наблюдений невозможно установить конфигурацию  $\alpha$ - и  $\beta$ -форм, а можно лишь указать их основные особенности. Это связано с тем, что наблюдаемое дихроичное отношение никогда не бывает очень велико

(самое большое около 2,5 : 1) и лежит ниже отношения, предсказанного для конфигурации, предложенной рентгеновскими исследованиями.

Имеется четыре возможных причины такого расхождения:

1. Протеины могут содержать аморфное вещество, например беспорядочно дезориентированные цепи, которые не отмечаются рентгеновской техникой, но влияют на инфракрасные спектры.

2. Степень ориентации может быть несовершенна, т. е. при растяжении кератина в  $\beta$ -форму маловероятно, что все полипептидные цепи установятся строго параллельно направлению растяжения.

3. Модели, по которым предсказывались значения отношений, могут быть неправильны.

4. Направление максимального дихроизма может быть либо строго параллельно, либо перпендикулярно направлению связи.

Чтобы устранить некоторые из этих причин, Эллиот и его сотрудники получили синтетические полипептиды, которые можно было ориентировать значительно более совершенно, чем природные волокнистые протеины. Ранее было показано (Дармон и Сезерлэнд, 1947), что спектры таких полипептидов идентичны со спектрами протеинов, так как содер-



жат пептидные частоты. В результате этой работы было показано, что простая свернутая форма, которую они предложили для  $\alpha$ -полипептидов, маловероятна, так как ее дихроизм должен быть меньше, чем дихроизм, который они наблюдали для полос  $3280$  и  $1660\text{ см}^{-1}$  — в поли  $\gamma$ -метил-*L*-глутамате.

Мы подходили к этой проблеме с различных сторон. Так как инфракрасная спектроскопия оказалась столь полезной для определения конфигурации молекул, то было предположено, что межатомные расстояния и углы между связями малых молекул могут полностью сохранять свои значения в больших молекулах. За исключением одного класса молекул-полимеров, трудности (которые здесь не будут обсуждаться) огромны. Можно показать (Лианг, Сезерлэнд и Кримм, 1954), что анализ инфракрасных спектров полимеров в принципе не сложнее, чем анализ инфракрасных спектров повторяющегося звена. Благодаря этому мы исследовали ряд спектров различных монозамещенных амидов в различных физических условиях, а именно: 1) в газовом состоянии, 2) в различных растворах таких растворителей, как  $\text{CCl}_4$ ,  $\text{CS}_2$  и  $\text{CHCl}_3$ , 3) в жидком состоянии, 4) в твердом состоянии — поликристаллическом и монокристалле.

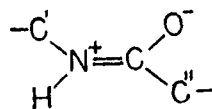
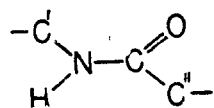


Рис. 3. Две структуры для пептидного звена.

Мы изучали также монозамещенные амиды, в которых водород аминогруппы замещался дейтерием и азот  $\text{N}^{14}$  замещался азотом  $\text{N}^{15}$ .

Исследование газа *N*-метилформамида (Кесслер, 1952) показало, что частота  $\text{CO}$  пептида в газовом состоянии больше, чем в растворе или жидком и твердом состоянии. Она составляет  $1736\text{ см}^{-1}$  для газа и  $1664\text{ см}^{-1}$  для конденсированной фазы. Эта величина очень близка к значению частоты  $\text{CO}$  для кетонов и эфиров. Низкое значение этой частоты в амидах обусловлено главным образом резонансом, существующим в пептидном звене, которое описано Паулингом, как гибрид двух форм, показанных на рис. 3. Если предположить, что резонанс стабилизирует пептидную группу в плоской форме, то это может указывать на то, что в газовом состоянии (где не имеет места взаимодействие с другими молекулами) пептидная группа может быть не плоская. Существуют независимые данные другой работы (Эванс, 1954) о том, что это вполне может быть.

Этот вопрос еще раз исследовался нами детально на новом спектрометре (Маршалл, 1954) очень высокой разрешающей способности, так как результаты предыдущей работы неубедительны из-за того, что спектры были получены при очень низкой разрешающей силе. Было установлено, что в газовом состоянии конфигурация пептидной группы не плоская, что может оказаться существенным при определении структуры протеинов, где конфигурация пептидной группы может зависеть от окружения. Поэтому вполне возможно, что в определенных протеинах или части протеинов имеются не плоские пептидные группы, что повышает гибкость молекул в соответствии с конфигурацией полипептидных цепей.

Изучение монозамещенных амидов в растворах дало нам возможность исследовать влияние водородной связи на частоты пептидных групп. Можно считать, что в протеинах фактически все пептидные группы  $\text{NH}$  связаны через водород. При исследованиях такого рода была идентифицирована частота неплоской деформации пептидной группы  $650\text{ см}^{-1}$  (Кесслер и Сезерлэнд, 1953). Этим же путем были получены другие ценные сведения о характере пептидных частот, но эти результаты слишком сложны для того, чтобы обсуждаться здесь.

Некоторые из наиболее важных данных о спектрах пептидных групп были получены Вудом (1953) при изучении монокристаллов N-метилацетамида, гексаметиленового дипропионамида и других простых соединений, содержащих пептидную группу. Здесь можно получить фактически совершенный дихроизм различных сторон монокристалла (рис. 4 и 5). Анализ этих спектров полностью еще не проделан, так как для получения основных сведений, из которых можно вывести правила отбора, сначала необходимо проделать рентгеновский анализ. Однако ясно, что изменение электрического момента для полосы  $1550\text{ см}^{-1}$  не перпендикулярно направлению изменения момента для связей CO и NH (полосы  $3280\text{ см}^{-1}$  и  $1650\text{ см}^{-1}$ ). Это подтверждает заключение, сделанное в предшествующей работе по дейтерированию о том, что полоса  $1550\text{ см}^{-1}$  не может быть отдельной частотой, связанной исключительно с колебанием атома водорода под прямым углом к связи NH. Это означает, что не имеет смысла использовать дихроизм полосы  $1550\text{ см}^{-1}$  для определения конфигурации пептидной группы, пока не будет выяснен ее характер. Эти спектры подтверждают также предположение об отнесении полосы  $650\text{ см}^{-1}$  к неполюсному деформационному колебанию связи NH. Очень непонятно, почему дихроизм такого большого числа полос N-метилацетамида одинаков для двух сторон кристалла, расположенных под прямым углом друг к другу. Если бы не было веских доказательств из данных по изучению в рентгеновских лучах и ядерным магнитным резонансом других амидов, можно было бы склониться к выводу, что в этих кристаллах амидная группа не плоская.

Когда будут полностью закончены рентгеновские работы по изучению этих кристаллов, можно будет определить направление изменения момента колебания  $1650\text{ см}^{-1}$  и будет видно, насколько оно не совпадает с направлением связи CO. То же самое относится к полосе  $3280\text{ см}^{-1}$  и колебанию растяжения NH, если положение атомов водорода будет определено дифракцией рентгеновских лучей или другим физическим методом. Такие сведения необходимы для определения конфигурации пептидных связей в протеинах с помощью инфракрасного анализа, а все предыдущие предположения по этому вопросу должны рассматриваться, как несвоевременные и ненадежные. Даже когда определенно направление изменения дипольного момента для нескольких кристаллов, его нельзя отнести к протеинам, пока не будут найдены незначительные различия между кристаллами. В этой связи наиболее важно то, что изучался монокристалл, для которого была определена спиральная конфигурация полипептидной цепи.

Описание некоторых собственных колебаний пептидной группы, данное в таблице I, является лишь первым приближением истинных собственных колебаний, которое должно быть определено до проведения окончательного анализа инфракрасных спектров протеинов. Полосы  $1550\text{ см}^{-1}$  и  $1250\text{ см}^{-1}$  объединены скобками для того, чтобы показать, что колебание, связанное с каждой полосой, есть гибрид деформации NH и растяжения C — N. Это впервые было указано Рандаллом и др. (1949) при дейтерировании амидов в процессе исследований, посвященных структуре пенициллина. Фразер и Прайс (1952) предложили для этого взаимодействия простую модель, основанную на трехатомной молекуле. Несмотря на то, что это несомненно шаг в правильном направлении, их модель является некоторым упрощением. Мы проделали подобные расчеты (Лианг и Сезерлэнд, неопубликованные данные), основанные на совершенно отличной четырехатомной модели, и они также дали хорошее соответствие с экспериментом. Это только подтверждает опасность работы с упрощенными моделями, которая может выполняться для того, чтобы

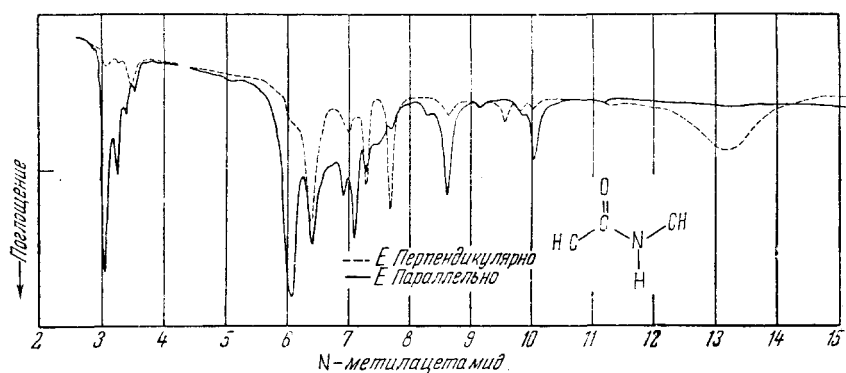


Рис. 4. Инфракрасный спектр монокристалла N-метилацетамида, показывающий очень высокий дихроизм, наблюдаемый в кристаллах.

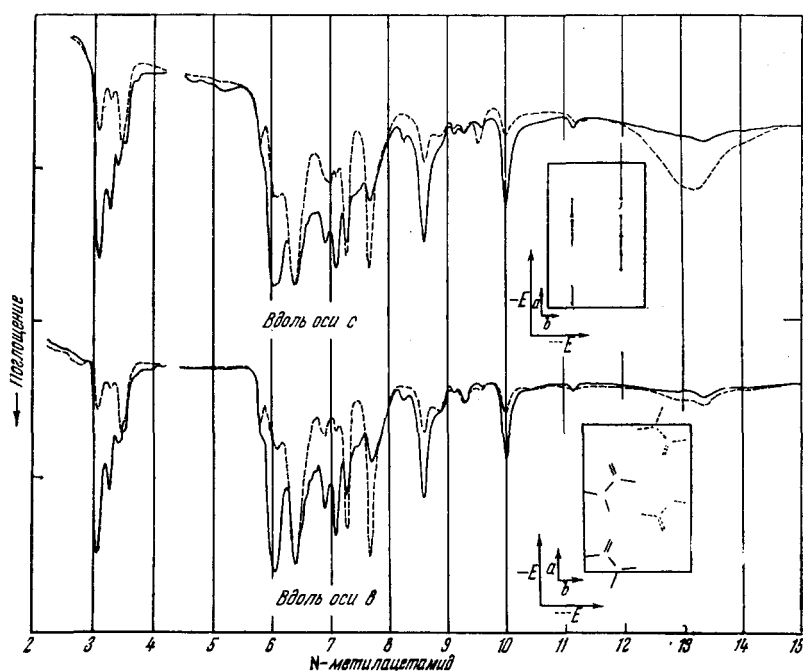
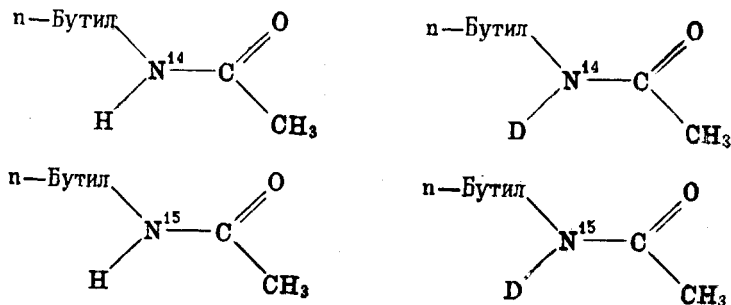


Рис. 5. Инфракрасные спектры кристаллических частей N-метилацетамида, ориентированных параллельно и перпендикулярно плоскости молекул.

дать соответствие с экспериментом путем выбора подходящих постоянных взаимодействия.

Для получения данных, которые помогли бы нам построить более совершенную модель, мы детально изучили спектры следующих четырех соединений:



Из этой работы (которая была выполнена главным образом для растворов) ясно, что фактически отделимы лишь частоты группы CH<sub>3</sub>. Все остальные частоты при изотопическом замещении меняют свое положение или интенсивность (или и то и другое вместе), дейтерирование влияет на частоту растяжения C — O. Тем не менее теперь мы в состоянии проверить более реальные модели для колебаний повторяющегося звена в структуре протеинов.

Несмотря на то, что работа по собственным частотам пептидной группы дает наиболее прямые и недвусмысленные результаты о структуре протеинов, очень важно также изучить обертоны и комбинационные частоты, лежащие между 4000  $\text{см}^{-1}$  и 8000  $\text{см}^{-1}$ . Это было сделано Вудом и Нехтом (1954) в связи с работой по монокристаллам и тонким слоям протеинов; они показали также, что полоса 5130  $\text{см}^{-1}$  может быть использована для количественного определения воды, присутствующей в соединениях, содержащих пептидное звено.

Ранее мы отмечали, что одной из причин, по которой невозможно установить структуру некристаллического протеина по данным инфракрасного анализа, является то, что наблюдаемый дихроизм всегда слишком мал из-за дезориентации вещества. Для того чтобы обойти эту трудность, мы использовали два пути. Если шелк частично дейтерировать при погружении в D<sub>2</sub>O (Кесслер, 1952), дихроизм колебания растяжения NH — 3280  $\text{см}^{-1}$  сильно возрастает, тогда как дихроизм полосы ND — 2400  $\text{см}^{-1}$  крайне низок (рис. 6). Это наводит на мысль, что дейтерирование происходит преимущественно в дезориентированной части протеина. Если это так, то дихроизм ориентированной части протеина можно измерить очень точно\*). Однако, принимая во внимание очень интересную работу Линдерстрома и Лэнга (1955) по этому вопросу, проблема оценки процесса дейтерирования должна изучаться. Инфракрасный анализ представляет собой прекрасный метод изучения этого явления.

Другой подход к этой проблеме состоит в рассмотрении влияния дезориентации на дихроизм. Беер (1955) недавно показал, что если можно сделать определенные приемлемые предположения относительно размещения дезориентированных полипептидных цепей, то дихроизм трех полос в спектре протеина может способствовать определению ориентации плоскости пептидной группы относительно оси полимера.

\*) Астбери сообщил, что подобные наблюдения были сделаны Брауном в Лидском университете при дейтерировании.

Несмотря на то, что инфракрасный анализ не может подтвердить правильность конфигурации, предположенной для полипептидных цепей в протеинах, с его помощью очень легко убедиться в неправомерности предположенной модели. Это было проиллюстрировано на примере модели, предложенной Крикком (1954) для коллагена. Баджер и Руллин (1954) и Сезерлэнд, Таннер и Вуд (1954) показали, что она совершенно несовместима с инфракрасными данными о коллагене. Было установлено, что

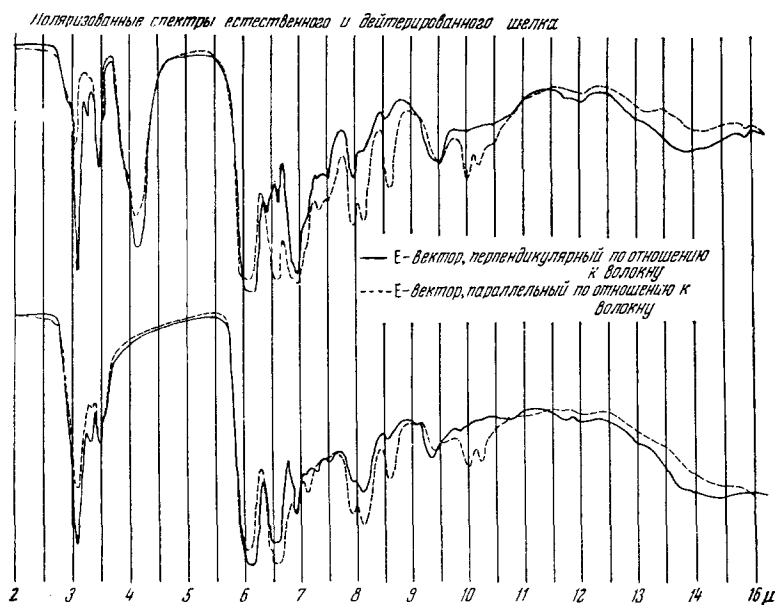


Рис. 6. Дихроичные спектры естественного и дейтерированного шелка. Верхняя кривая—дейтерированный образец; нижняя кривая—естественный образец.

инфракрасные методы могут также использоваться для изучения ионизации кислотных групп боковых цепей таких протеинов, как  $\beta$ -лактоглобулин и альбумин бычьей плазмы. Этот пример лишь подчеркивает, что в химии протеинов для инфракрасного анализа открыто поле действия много шире, чем просто определение конфигурации полипептидных цепей. Можно было бы определять степень ионизации кислотных и основных групп в боковых цепях (а возможно, даже, что и на концах цепей, при условии, что цепи не слишком длинные), в растворах и твердом состоянии.

Прежде чем закончить этот раздел о протеинах, необходимо упомянуть о критерии частот, предложенном Амброз и Эллиот (1950) для установления различия между свернутыми полимерными цепями и полностью вытянутыми. В результате работы с различными синтетическими полипептидами и несколькими протеинами они предположили различие в частотах, приведенное в таблице III. Если бы этот критерий оказался правильным, можно было бы определять, находятся полипептидные цепи в  $\alpha$ - или

Таблица III  
Критерий частот для  $\alpha$ - и  $\beta$ -форм протеинов

	Полосы у 6 $\mu$	Полосы у 6,5 $\mu$
$\alpha$ -форма	1660 $\text{см}^{-1}$	1560 $\text{см}^{-1}$
$\beta$ -форма	1630 $\text{см}^{-1}$	1530 $\text{см}^{-1}$

$\beta$ -форме (т. е. свернутой или вытянутой) без определения дихроизма инфракрасным анализом и без обращения к рентгеновскому анализу.

Мы рассмотрели этот вопрос, применяя синтетические полипептиды и большое число протеинов. В данный момент мы считаем, что этот критерий правилен в применении к определенным синтетическим полипептидам. Однако для других (например, для нейлона) и для большинства протеинов его очевидность очень спорна. У многих протеинов у 6,05 и 6,5  $\mu$  проявляются плохо очерченные полосы. Дейтерирование приводит к появлению у этих полос очень сложной тонкой структуры. То же самое относится к соответствующим полосам несложных кристаллических диамидов. Нам кажется, что точные значения этих двух частот могут меняться в довольно широких пределах, в зависимости от специфических взаимодействий, при закручивании, и пока невозможно только из числовых данных о частотах сделать реальные выводы о формах (полностью вытянутой или свернутой) для полипептидных цепей в протеинах. Тем не менее этот путь исследования может оказаться весьма плодотворным, если его развить.

### Нуклеиновые кислоты

По инфракрасным спектрам нуклеиновых кислот было опубликовано несколько работ, и целый ряд исследователей опубликовали спектры пуринов, пиримидинов, сахаров и фосфатов, но до сих пор лишь в одной работе, а именно Фразер и Фразер (1951) по дезоксирибонуклеиновой кислоте, имеется попытка интерпретировать эти данные для определения структуры молекул. Эти авторы утверждают, что их наблюдения по ориентированному DNA совместимы с моделью Фурберга (1950) для этой молекулы. Недавно в Мичиганском университете мы начали исследование инфракрасных спектров DNA и RNA и наши результаты на сегодняшний день могут представлять некоторый интерес в связи с моделью Крик-Ватсона для DNA (Сэзерлэнд и Тзубой, 1955).

Ориентированные пленки DNA (соль Na) изготавливались из очень чистого вещества. Они исследовались при различной степени влажности в специально сконструированных кюветах для поглощения. Было найдено, что дихроизм полос заметно повышается, когда влажность возрастает до 90%, после чего резко падает, а пленки, возможно, становятся слишком жидкими для того, чтобы сохранить их ориентацию. Спектры DNA при 50% относительной влажности очень похожи на спектры, опубликованные Фразер и Фразер (1951), но спектр DNA при 80% относительной влажности обладает значительно большим дихроизмом (рис. 7).

Для того чтобы интерпретировать спектр DNA, сначала полезно просмотреть спектры тумина, аденина, хинина и цитозина (рис. 8), полученные Боутом и Филдзом (1950). Из этих, а также из других спектров оснований и связанных соединений (включая воду) определенно следует, что сильная полоса в спектре DNA у 3 $\mu$  относится к колебаниям растяжения связи NH в основаниях и колебаниям растяжения OH воды основания в дипольной конфигурации. Сильная полоса у 6 $\mu$  связывается с колебаниями растяжения C=O и C=N, перекрывающимся деформационным OH-колебанием воды. Для этих двух полос наблюдается перпендикулярный дихроизм, что указывает на то, что плоскости оснований лежат скорее перпендикулярно, чем параллельно по отношению к направлению ориентации. Однако нельзя делать каких бы то ни было количественных утверждений, так как поглощение воды, возможно, не дает дихроизма, а вклад поглощения воды неизвестен.

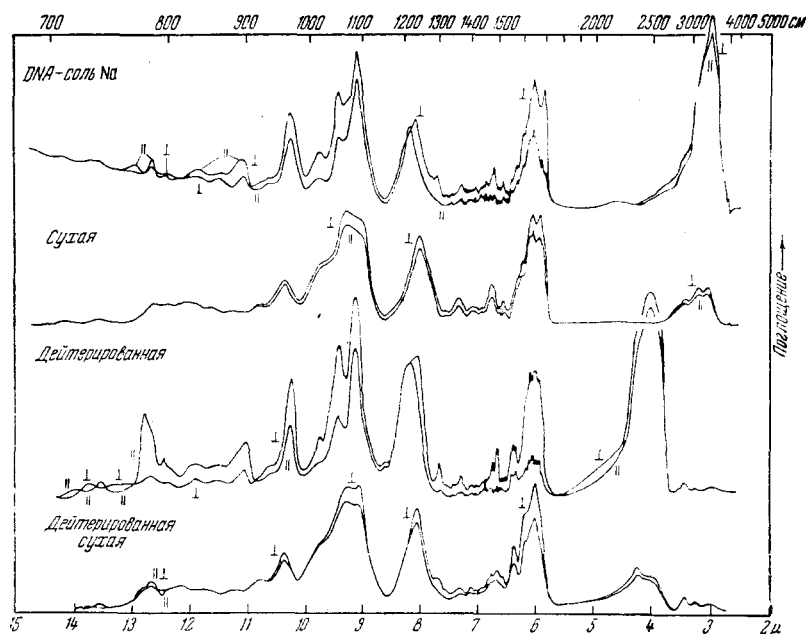


Рис. 7. Дихроичные спектры естественной и дейтерированной DNA при различной относительной влажности.

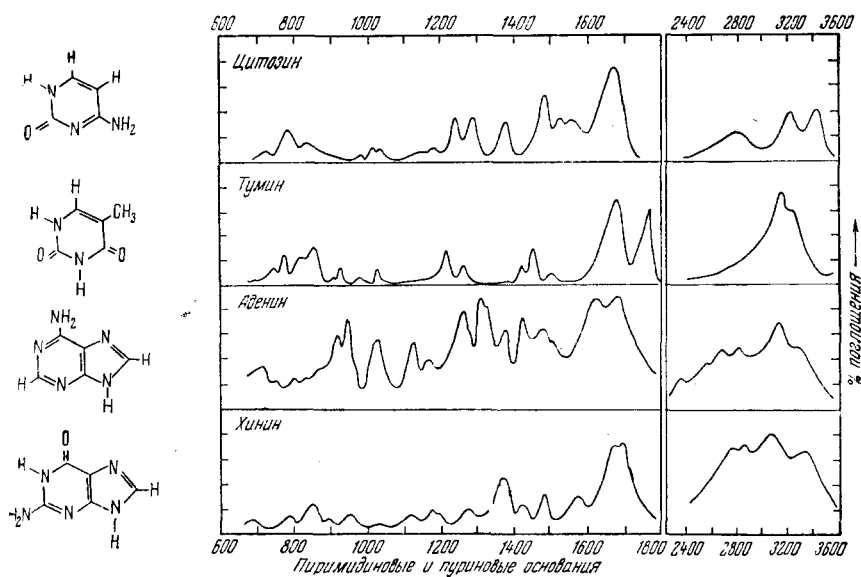


Рис. 8. Инфракрасные спектры пиримидинового и пуринового оснований.

Эту трудность можно обойти, исследуя соответствующие спектры полностью дейтерированных DNA (рис. 8), так как деформационное ОН-колебание в этом случае смещается к  $8\mu$ . При этом оказывается, что дихроизм полосы  $6\mu$  (относящейся целиком к колебаниям основания  $C=O$  и  $C=N$ ) во влажных дейтерированных DNA в соответствии с моделью Крик-Ватсона действительно очень высок. До сих пор мы не могли заниматься изменениями, которые имеют место между 70% и 90% влажности, и о которых сообщали Франклин и Гозлинг (1953), но этот вопрос в настоящее время исследуется.

Рассмотрим поглощение, обусловленное фосфатными группами. Из работы Беллами и Бахера (1953) следует, что фосфаты в кислотной форме имеют характеристическую полосу  $1220\text{ см}^{-1}$  (интерпретируемую как колебания растяжения  $P=O$ ), тогда как ионная форма дает полосу  $1170\text{ см}^{-1}$ . Так как нами исследовалась натриевая соль DNA, мы могли бы ожидать появления полосы  $1170\text{ см}^{-1}$ , но вместо нее была обнаружена сильная полоса  $1225\text{ см}^{-1}$ . Это непонятно, и на это не обратили внимания Фразер и Фразер (1951) в своем рассмотрении спектра DNA. Нам кажется возможным, что ион  $Na$  расположен достаточно близко к одной стороне иона фосфата, так что нарушается симметричная форма иона, и в солях нуклеиновой кислоты присутствует связь  $P=O$ . Если это так, то можно ожидать некоторого эффекта при замене иона на литий или калий. Этот вопрос будет изучаться в дальнейшем.

Другие сильные полосы в спектре DNA между  $960\text{ см}^{-1}$  и  $1100\text{ см}^{-1}$  относятся к колебаниям скелета, включающим звенья  $P-O-C$  и группу  $C-O-C$  в сахарных остатках. Пока не будет проделана дополнительная работа по исследованию образцовых соединений, нельзя надежно интерпретировать эти полосы. То, что все эти полосы обладают заметным перпендикулярным дихроизмом, кажется немного неожиданным, если принять во внимание ориентацию сахарных и фосфатных остатков в модели Крик-Ватсона. В соответствии с ней можно ожидать либо очень малый дихроизм, либо только параллельный. Однако пока неизвестна точная форма колебаний, ответственных за эти полосы, по ин-фракрасным данным нельзя сделать категорических утверждений о правдивости или неправдивости модели Крик-Ватсона.

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Ambrose E. J., Elliott A. and Temple R. B. (1949), *Nature* **163**, 859.
2. Ambrose E. J. and Elliott A. (1950); *Nature* **165**, 921.
3. Ambrose E. J. and Elliott A. (1951), *Proc. Roy. Soc. A* **206**, 206.
4. Astbury W. T., Dalglish C., Darmon S. E. and Sutherland G. B. B. M. (1948), *Nature* **162**, 596.
5. Badger R. M. and Pullin A. D. E. (1954), *J. Chem. Phys.* **22**, 1142.
6. Beer M. (1955), *Ohio State Symposium on Molecular Spectra*.
7. Bellamy Y. J. and Beecher L. (1953), *J. Chem. Soc. (London)*, 728.
8. Blout E. R. and Fields M. (1950), *J. Am. Chem. Soc.* **72**, 479.
9. Crick F. H. C. (1954), *J. Chem. Phys.* **22**, 347.
10. Darmon S. E. and Sutherland G. B. B. M. (1947), *J. Am. Chem. Soc.* **69**, 2074.
11. Ehrlich G. and Sutherland G. B. B. M. (1945), *J. Am. Chem. Soc.* **76**, 5268.
12. Elliott A. and Ambrose E. J. (1950), *Faraday Soc. Discussion* **9**, 246.
13. Evans J. C. (1954), *J. Chem. Phys.* **22**, 1228.
14. Franklin R. E. and Gosling R. G. (1953), *Acta Crystallogr.* **6**, 673.
15. Fraser M. J. and Fraser R. D. B. (1951), *Nature* **167**, 760.
16. Fraser R. D. B. and Price W. C. (1952), *Nature* **170**, 490.
17. Furberg S. (1950), *Acta Chem. Scand.* **4**, 751.
18. Kessler H. K., Stuart A. V., Sutherland G. B. B. M. and Tanner K. N. (1952), *Ohio State Symposium*.



19. Kessler H. K. (1952), University of Michigan Ph. D. Dissertation.
  20. Kessler H. K. and Sutherland G. B. B. M. (1953), J. Chem. Phys. 21, 570.
  21. Liang C. Y., Sutherland G. B. B. M. and Krimm S. (1954), J. Chem. Phys. 22, 1468.
  22. Linderstrom Lang G. and Hvidt A. (1955), Bioch. Biophys. Acta 16, 168.
  23. Marshall H. W. (1954), Ohio State Symposium on Molecular Spectra.
  24. Mizushima S. (1954), Adv. Protein Chem. 9, 299, New York, Academic Press Inc.
  25. Randall H. M., Fowler R. G., Fuson N. and Dangle J. R., (1949), «Infra-red Determination of Organic Structures», New York, Van Nostrand.
  26. Sutherland G. B. B. M. (1952), Adv. Protein Chem. 7, 291, New York.
  27. Sutherland G. B. B. M., Tanner K. N. and Wood D. L. (1954), J. Chem. Phys. 22, 1621.
  28. Sutherland G. B. B. M. and Tsuboi M. (1955), Ohio State Symposium on Molecular Structure.
  29. Wood D. L. (1953), Ohio State Symposium on Molecular Structure.
  30. Wood D. L. and Hecht K. (1954), Pittsburgh Conference on Spectroscopy.
-