

НОВЫЕ ПРИБОРЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

547.963.4:543.424

**ГИГАНТСКОЕ КОМБИНАЦИОННОЕ РАССЕЯНИЕ
И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ К ИЗУЧЕНИЮ БИОЛОГИЧЕСКИХ МОЛЕКУЛ***И. Р. Набиев, Р. Г. Ефремов, Г. Д. Чуманов*

СОДЕРЖАНИЕ

1. Введение	459
2. Экспериментальные методики получения спектров гигантского комбинационного рассеяния	462
2.1. Металлические электроды в электрохимической ячейке. 2.2. Системы малых изолированных металлических частиц. 2.3. Другие системы.	
3. Основные характеристики и механизмы эффекта гигантского комбинационного рассеяния	469
3.1. Спектры возбуждения гигантского комбинационного рассеяния. 3.2. Зависимость усиления комбинационного рассеяния от расстояния между молекулой и металлом. 3.3. Электромагнитные механизмы усиления. 3.4. Молекулярные механизмы усиления.	
4. Применение гигантского комбинационного рассеяния к изучению биологических молекул	476
4.1. Аминокислоты, пептиды и модельные соединения. 4.2. Водорастворимые белки. 4.3. Светочувствительные мембранные белки и пигмент-белковые комплексы. 4.4. ДНК и ее компоненты.	
5. Заключение. Возможности и перспективы развития метода спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния	491
Список литературы	492

1. ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время накоплен обширный экспериментальный и теоретический материал по гигантскому комбинационному рассеянию (ГКР) света молекулами, расположенными вблизи поверхности металла. Существует несколько обзоров¹⁻⁶ и две монографии^{7, 8}, основное внимание в которых уделяется выяснению механизмов ГКР. По-видимому, следует считать доказанным существование двух механизмов, определяющих огромное (в ряде случаев до 10^{10}) увеличение сечения комбинационного рассеяния (КР) адсорбированных молекул — электромагнитного, связанного с увеличением локального электромагнитного поля вблизи поверхности, и молекулярного — за счет образования новых возбужденных состояний комплекса молекула — металл. В то же время появляется все больше работ, целью которых является не столько изучение физических аспектов явления ГКР, сколько практические применения метода для решения прикладных задач физики поверхности, аналитической химии, биофизики и т. д.

Одним из наиболее многообещающих приложений ГКР является изучение структурно-функциональных особенностей молекул, имеющих биологическое значение (см. обзор⁹). Всего за последние 5 лет появилось около 100 оригинальных работ, посвященных исследованию различных классов биологических молекул — аминокислот, нуклеиновых оснований, водорастворимых, мембранных и светочувствительных белков, нуклеиновых кислот

Биомолекулы, изученные методом спектроскопии ГКР

Тип соединения	Название (сокращенно)	Литература
1. Аминокислоты	Фенилаланин (Phe), тирозин (Tyr), триптофан (Trp), гистидин (His), α - и β -аланин (Ala), глицин (Gly), аспарагин (Asn), глутаминовая (Glu) и аспарагиновая (Asp) кислоты, цистеин (Cys), метионин (Met), серин (Ser)	14, 33, 49, 115-118
2. Дипептиды	Gly—Phe и Phe—Val	33, 116
3. Водорастворимые белки и полипептиды	Лейцинизолейцинивалин связывающий (ЛИВ) и лейцин специфичный, белки из периплазматического пространства <i>E. coli</i> Цитотоксин I из ядра кобры <i>Naja naja oxiata</i>	11-13 116
4. Ретинальсодержащие мембранные белки и их хромофоры	Лизоцим, бычий сывороточный альбумин Полностью транс-ретиналь Бактериородопсин в пурпурной мембране (БР) Зрительный родопсин в мембране фоторецепторного диска	9 35 19, 20, 35 21, 119
5. Порфириносодержащие вещества	Порфирины, порфины и их производные Желчные пигменты (биливердин и его производные) Металлопорфирины (Fe(III)-протопорфирин), протопорфирин IX Гем-содержащие белки (цитохромы c, c ₁ , b ₅ , гемоглобин, миоглобин) Хлорофилл-а, бактериохлорофилл-а, бактериофеофитин	18, 61-63 120-126 127, 128 15, 16, 37, 42 24
6. Флавины и флаво-белки	Профлавин, флавин-анион, рибофлавин, люмифлавин, флавин-мононуклеотид (ФМН), флавин-адениннуклеотид (ФАД), глюкоза-оксидаза, рибофлавинсвязывающий белок	26, 50, 134, 135
7. Компоненты ДНК и РНК	Азотистые основания, нуклеозиды, нуклеотиды, полинуклеотиды, рибоза, дезоксирибоза	10, 22, 31, 51, 117, 118, 136-147
8. Нуклеиновые кислоты	ДНК нативная и модифицированная, комплексы ДНК—Pt; ДНК, подвергнутая тепловой и γ -индуцированной денатурации	84, 85, 135, 147-149
9. Другие биологически важные соединения	Никотин-амид-динуклеотид (НАД ⁺), цитрат-ион, анаболические лекарственные вещества, бензойная, p-, m-аминобензойная, 2-, 3-, 4-ацетилбензойная кислоты	23, 24, 45, 53, 56-60, 69, 147, 150-160
10. Надмолекулярные комплексы	Хромосомы, клетки, фотореакционные центры бактерий и растений	17, 20, 28, 161

и надмолекулярных комплексов (см. таблицу). При применении спектроскопии ГКР к изучению сложных молекул особый интерес представляет вопрос о том, в какой мере наблюдаемое усиление сечения КР обусловлено электромагнитными, а в какой — молекулярными механизмами. При этом достаточно знать характерное расстояние от поверхности металла, на котором проявляется эффект усиления. Очевидно, что в условиях реализации дальнедействующей компоненты механизма усиления КР можно получать спектры, идентичные спектрам КР неадсорбированных молекул, но при значительно более низком пороге регистрации, тогда как при короткодействующем механизме существует возможность анализа топографии макромолекул, выяснения природы групп, имеющих возможность вступать в непосредственный контакт с поверхностью металла. Исключительно важным представляется также вопрос о сохранении конформации макромолекул при

адсорбции на поверхности металла. По-видимому, увеличение сечения КР за счет электромагнитного механизма является наиболее мягкой методикой, поскольку в этом случае хемосорбция с образованием комплекса молекула — металл не является необходимым условием, как это имеет место для молекулярного механизма. Оптимальной системой для получения спектров ГКР биомолекул при реализации дальнедействующего электромагнитного механизма усиления является металлическая поверхность с регулярными неоднородностями одинаковых размеров^{7, 8}, обеспечивающими эффективное возбуждение в металле поверхностной электромагнитной волны. Молекулярный механизм усиления преобладает при адсорбции молекул на электродах, разрыхленных анодной поляризацией в растворе электролита. Известен ряд примеров, когда в этой системе адсорбция не вызывает изменения конформационных и функциональных свойств биополимеров^{11, 12, 22, 23}, однако в каждом конкретном случае этот вопрос требует специального рассмотрения. Таким образом, наиболее существенной проблемой применения эффекта ГКР к изучению биомолекул является выбор условий избирательной реализации электромагнитной или молекулярной компонент механизма усиления.

Следует отметить, что некоторые особенности структурной организации биополимеров делают их исключительно удобным инструментом исследования механизма ГКР. Изучение белков, нуклеиновых кислот и модельных соединений с известной из рентгеноструктурного анализа трехмерной структурой позволило определить условия реализации дальнедействующего и короткодействующего (по сравнению с длиной волны возбуждающего излучения) механизмов усиления спектров КР при адсорбции. В экспериментах с молекулами ДНК и некоторых белков было убедительно показано, что при адсорбции на разрыхленных серебряных электродах и гидрозолях серебра (коагулирующих при добавлении адсорбата) механизм усиления короткодействующий — спектр ГКР исчезает при удалении изучаемой группы на расстояние свыше 5 Å от поверхности металла. При исследовании фрагментов мембран с характерным размером ~1 мкм оказалось, что адсорбция неагрегированных зольных мицелл серебра диаметром ~100 Å приводит к преимущественной реализации молекулярного, короткодействующего механизма усиления, тогда как после агрегации золя до коагулятов размером ~1000 Å вклад электромагнитного механизма резко увеличивается. Наконец, в опытах с биомембранами было обнаружено, что наиболее простой системой для преимущественной реализации электромагнитного механизма усиления является, по-видимому, «гладкий» серебряный электрод — металлическая поверхность, не разрыхленная анодной поляризацией в растворе электролита для увеличения концентрации точечных дефектов поверхности, играющих роль центров образования химических комплексов молекула — металл. Разрыхление электрода приводит к резкому увеличению вклада молекулярного механизма усиления, имеющего выраженный короткодействующий характер (см. раздел 4).

Анализ спектров ГКР биомолекул, содержащих в своем составе группы различной физической природы, позволил определить условия образования комплексов молекула — металл и выяснить химическую природу таких комплексов. Оказалось, что основную роль при адсорбции на точечных дефектах поверхности металла играют группы, обладающие развитой π -электронной системой. Существенный вклад в ГКР дают также группы, образующие с поверхностью σ -комплексы за счет неподеленных электронных пар соответствующих атомов. И, наконец, вклад электростатических взаимодействий молекулы и металла при реализации молекулярных механизмов усиления оказался исчезающе мал. Таким образом, была продемонстрирована определяющая роль хемосорбции в возникновении «молекулярного» ГКР.

Из вышесказанного следует, что метод спектроскопии ГКР обладает рядом уникальных возможностей, которые делают его весьма перспективным для исследования широкого класса биологических молекул. Прежде всего

это связано с высокой чувствительностью метода. Спектры ГКР биополимеров удалось регистрировать при концентрациях на 3—4 порядка меньших, чем в традиционной спектроскопии КР. Это преимущество носит принципиальный характер, поскольку многие биологически важные соединения доступны в ограниченных количествах и, кроме того, очень часто биополимеры не удается растворить при высоких концентрациях. Отметим также, что при концентрациях, существенно превышающих физиологические значения, может происходить агрегация биомолекул, приводящая к изменению их структуры. В отличие от других методов оптической спектроскопии, метод спектроскопии ГКР дает возможность изучения состояния отдельных групп, находящихся на поверхности биологических макромолекул и надмолекулярных комплексов. Это особенно важно, поскольку огромное число биохимических процессов в клетке протекает именно на границе раздела фаз. При определенных условиях заряженные металлические поверхности могут служить удобными моделями для исследования мембранных процессов. Кроме того, варьирование потенциала на поверхности металла позволяет контролировать состояние групп атомов биомолекул, которые меняют свои окислительно-восстановительные свойства в процессе функционирования. Имеется также возможность фиксировать электро- и фотохимические превращения некоторых биомолекул, адсорбированных на поверхностях электродов или гидрозолей, что позволяет изучать отдельные стадии функционирования таких биологических соединений в стационарных условиях.

Все это позволяет говорить о появлении в молекулярной биофизике нового метода колебательной спектроскопии. В связи с этим нам представляется целесообразным проанализировать данные по ГКР, рассмотрев физические особенности этого эффекта с точки зрения возможности получения новой спектроскопической информации о строении биологических молекул и их свойствах на поверхности металла. В разделах 2 и 3 мы кратко рассмотрим экспериментальные методики получения спектров ГКР и основные характерные черты проявления молекулярных и электромагнитных механизмов усиления, обратив особое внимание на биомолекулы как на специфический класс соединений, изучаемых методом ГКР. Раздел 4 полностью посвящен конкретным приложениям метода к исследованию биомолекул различных типов.

2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МЕТОДИКИ ПОЛУЧЕНИЯ СПЕКТРОВ ГИГАНТСКОГО КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ

Генерация интенсивного ГКР до настоящего времени наблюдалась на специально приготовленных металлических поверхностях с сильной шероховатостью⁶. Различные формы шероховатой поверхности готовят либо путем огрубления поверхности металла (например, электроды в электрохимической ячейке после проведения окислительно-восстановительного цикла (ОВЦ), металлические пленки, разрыхленные механически, химически, а также с помощью ионной бомбардировки или облучения жестким ультрафиолетом), либо посредством создания специальных типов поверхности, таких, как сферы в коллоидных суспензиях, металлические островковые пленки, дифракционные решетки, аксиально-симметричные выступы на металлическом покрытии, упорядоченные двумерные поверхности из металлических частиц, приготовленные с помощью микролитографии и других методик⁶⁻⁸. Однако тонкая структурная организация и большие размеры биомолекул существенно ограничивают число систем, в которых можно исследовать эти объекты с помощью спектроскопии ГКР. Спектры ГКР и ГРКР биологических молекул удавалось получать в электрохимических ячейках, системах малых изолированных частиц (гидрозоли металлов), а также на поверхности пленок серебра и покрытиях с регулярными неоднородностями^{7, 9, 23, 24}.

Спектры ГКР регистрируют с помощью стандартной аппаратуры для получения спектров КР. Для возбуждения используют лазерные линии в видимом диапазоне. Для предотвращения фоторазрушения образцов мощность лазерного излучения в кюветном отделении, как правило, не превышает 50 мВт. Кроме того, применяют вращающиеся кюветы, струевые методы²⁵, а также используют системы многоканальной детекции^{24, 26}.

Интересная информация, позволившая решить ряд биофизических задач, была получена при использовании микроскопа в КР-спектрометре^{27, 34}. Это позволило исследовать поверхность надмолекулярных биологических комплексов с целью обнаружения в них неоднородностей и выяснения их природы. Фокусировка лазерного луча с помощью объектива микроскопа до размера поперечного сечения 1 мкм дает возможность получать спектры ГКР очень малых объемов вещества. Лазерный луч сканируют по поверхности или же направляют в определенную точку, выбранную с помощью обычного микроскопа. При сканировании луча по поверхности двумерное пространственное распределение ГКР для каждого волнового числа получают при считывании с видеокон. Применение микроскопа в спектроскопии ГКР позволило исследовать отдельные участки хромосом²⁸. В дальнейшем эта методика, несомненно, будет широко применяться для анализа поверхности клеток и надклеточных структур.

2.1. Металлические электроды в электрохимической ячейке

На рис. 1, а приведена схема электрохимической ячейки, используемой для получения спектров ГКР биомолекул, адсорбированных на металлических электродах. Ячейку, содержащую три электрода, рабочий электрод и электрод сравнения (чаще всего серебряные) и вспомогательный (обычно из платины), включают в схему потенциостатирования. Рабочий электрод помещают в центре кюветы для уменьшения влияния процессов диффузии и электрохимических реакций. В качестве электролита используют растворы солей щелочных металлов, причем основную роль в возникновении ГКР играют анионы^{7, 29}. Величины усиления сигнала ГКР в присутствии различных анионов убывают, как правило, в следующей последовательности: $I \gg Br = Cl > SCN > HPO_4 > SO_4 > ClO_4$ ³⁰. В настоящее время разработаны электрохимические ячейки с рабочим объемом от 15 мл до 50 мкл^{31–34}. Типичная электрохимическая ячейка состоит из двух коаксиальных цилиндров, в одном из которых находятся рабочий электрод и раствор изучаемых биомолекул, а в другом — электроды сравнения и вспомогательный в растворе электролита (рис. 1, в). Шершавый шлиф на поверхности соприкосновения внутреннего цилиндра и покровного стекла обеспечивает смачивание раствором электролита и проводимость между растворами во внутреннем и внешнем цилиндрах. Угол падения лазерного луча на поверхность рабочего электрода обычно составляет 45°, а рассеянный свет собирают под углом 90°. В отдельных случаях предусматривают терморегуляцию ячейки и возможность изменения ориентации рабочего электрода по отношению к падающему лучу^{23, 24}. Для воспроизводимости результатов измерений ГКР необходимо особенно тщательно заботиться о чистоте реактивов и воды. Для приготовления растворов обычно используют би- и тридистиллированную воду, которую дегазируют пропусканием гелия или азота в течение 20–30 мин.

Перед адсорбцией биомолекул поверхность электрода механически полируют, обезжиривают и поляризуют катодным током для устранения с поверхности окислов. Для увеличения сигнала ГКР на поверхности создают шероховатости путем проведения одного или нескольких ОВЦ. При этом на рабочий электрод подают сначала положительный, а затем отрицательный потенциал относительно насыщенного хлорсеребряного электрода, что при-

водит к окислению металла с последующим восстановлением его на поверхности электрода в виде кластеров размером ~ 100 нм, что подтверждается данными растровой электронной микроскопии^{2, 8}. Механическая полировка без последующего проведения ОВЦ является гораздо менее эффективной предварительной обработкой поверхности, хотя и удавалось наблюдать спектры ГКР биомолекул при адсорбции их на «гладких» серебряных электродах³⁵.

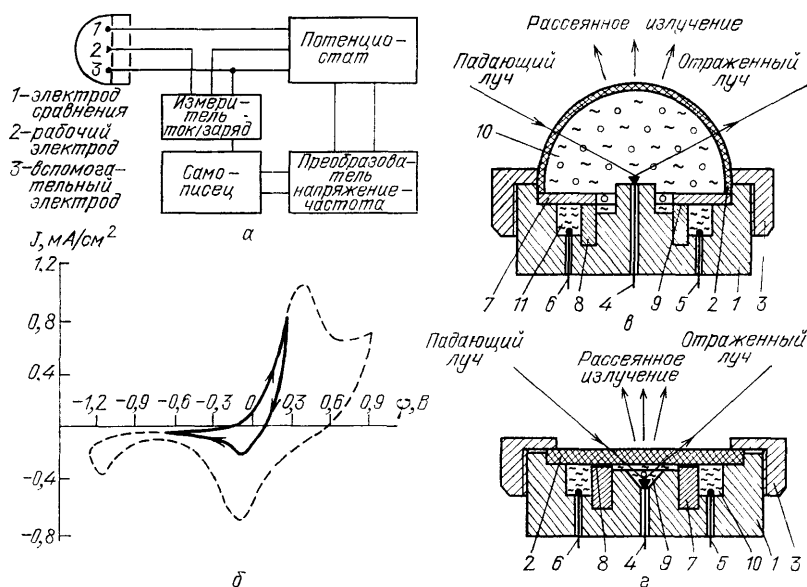


Рис. 1. *а* — Схема приставки к КР-спектрометру для получения спектров ГКР молекул на серебряных электродах в электрохимической кювете. *б* — Вольт-амперная характеристика серебряного электрода в электролите 0,1 М КС1, содержащем 0,1 % исследуемого органического соединения, записанная в электрохимической кювете с повышенной эффективностью сбора рассеянного света. *в* — Электрохимическая кювета с повышенной эффективностью сбора рассеянного излучения, предназначенная для получения спектров ГКР молекул на поверхности электродов; 1 — корпус из фторопласта; 2 — кварцевый колпак; 3 — накидная гайка; 4 — рабочий электрод; 5 — вспомогательный электрод; 6 — электрод сравнения; 7, 8 — стеклянные кольца, отделяющие рабочий объем электролита от объема со вспомогательным электродом и электродом сравнения; 9 — электрический контакт через две притертые стеклянные поверхности; 10 — рабочий объем электролита; 11 — объем со вспомогательным электродом и электродом сравнения. *г* — Электрохимическая микрокювета, предназначенная для получения спектров ГКР молекул на поверхности электродов; 1 — 7 — как на рис. *в*; 8 — электрический контакт через две притертые стеклянные поверхности; 9 — рабочий объем электролита; 10 — объем со вспомогательным электродом и электродом сравнения³³

Для предотвращения конформационных изменений биомолекул в процессе проведения ОВЦ их добавляют в электролит после разрыхления поверхности электрода анодным током.

В ряде работ было показано, что присутствие в растворе электролита определенных соединений (например, пиридина, бипиридина и др.) вызывает увеличение интенсивности сигнала ГКР исследуемых молекул за счет образования на поверхности электродов комплексов $Ag - Py(01)$ и $Ag - PyPy(01)$ ^{36, 37}.

Контроль за процессом адсорбции, изменением электродного импеданса и емкости двойного слоя, а также оценку суммарного заряда, прошедшего через электрохимическую ячейку в процессе ОВЦ, осуществляют с помощью вольтамперометрии. Типичный ОВЦ, используемый в экспериментах с биомолекулами, проводят в процессе изменения потенциала, представляющего собой треугольный импульс⁹. Скорость сканирования потенциала и пределы его изменения определяют величину прошедшего заряда. Это дает возмож-

ность контролировать степень анодирования и позволяет судить о масштабах изменения структуры поверхности^{6, 38}. Отрыв ионов Ag^+ от электрода обнаруживается по появлению тока на вольт-амперограмме (рис. 1, б). Обычно строят зависимость тока не от разности потенциалов электрод — электролит, а от разности потенциалов между рабочим электродом и насыщенным хлор-серебряным электродом (электрод имеет постоянный потенциал относительно электролита).

Параметры ОВЦ и условия его проведения, при которых наблюдается максимальное усиление сигналов КР, зависят от типа металла электрода, химической природы молекул и от используемого электролита^{8, 38}. Как было показано в работах^{36, 39}, освещение электрода лазерным лучом при проведении ОВЦ способствует разрыхлению поверхности металла и усиливает ГКР молекул адсорбата. Форма рабочего электрода может быть самой разнообразной. Так, в работе⁴⁰ для выявления небольших ($\approx 0,6 \text{ см}^{-1}$) частотных сдвигов в спектрах ГКР окисленного и восстановленного состояний протопорфина впервые применили дифференциальную спектроскопию ГКР с вращающимся дисковым электродом, одна половина которого была выполнена из серебра, а другая — из платины. Конструкция электрохимической ячейки с прессованным рабочим электродом, предложенная в⁴¹, позволяет получать спектры ГКР биомолекул в твердом состоянии. В работе⁴² с целью устранения влияния медленной диффузии адсорбата на интенсивность ГКР использовали цилиндрический вращающийся электрод, что позволило регистрировать сигнал при постоянной равновесной концентрации исследуемых молекул.

Спектры ГКР на электродах являются нестабильными во времени, что проявляется в постепенном уменьшении интенсивности всех полос, причем скорость уменьшения зависит от потенциала на электроде⁴³. Наиболее стабильные спектры получают при потенциале нулевого заряда металла электрода в данном электролите, т. е. когда поле двойного слоя минимально и электрохимические реакции отсутствуют⁵. Величина же потенциала, при котором получают наиболее интенсивные спектры ГКР, определяется химической природой молекул, типом электролита и металла электрода^{5, 8}.

Несмотря на относительную простоту получения спектров ГКР на электродах в электрохимических ячейках, эта система является не очень удобной для изучения биохимических процессов на границе раздела электрод/электролит, поскольку эффективные способы контроля микроструктуры поверхности при проведении ОВЦ отсутствуют; электрохимические процессы на границе раздела сильно затрудняют изучение и моделирование взаимодействия биомолекул с поверхностью металла. Кроме того, электрод в электрохимической ячейке считают недостаточно «чистой» системой, поскольку даже минимальные количества примесей, неизбежно присутствующих в ячейке, существенно меняют адсорбционные свойства поверхности металла.

2.2. Системы малых изолированных металлических частиц

Другой системой, в которой возможно наблюдение ГКР биомолекул, находящихся вблизи поверхности металла, является система малых (по сравнению с длиной волны света) изолированных частиц. Усиление КР в этом случае может достигать 10^6 — 10^7 . Стабильные дисперсные системы из частиц серебра, золота или меди диаметром 10—100 нм готовят восстановлением разбавленных растворов простых солей этих металлов. Полученные золи имеют один или несколько максимумов экстинкции в видимой области, длины волн которых зависят от размера и формы частиц и могут изменяться в зависимости от процедуры приготовления, а также во времени вследствие агрегации или роста частиц.

Обычно источниками серебра или золота для приготовления таких коллоидов служат соли с ионами Ag^+ или AuCl_4^- , причем используются различные восстанавливающие агенты, включая нитратные и оксалатные ионы, гидросиламин, боргидрид натрия, ионы этилендиаминтетраацетата (ЭДТА)⁴⁴⁻⁴⁸. Контроль за размерами и формой коллоидных частиц осуществляют с помощью электронной микроскопии на проходящих пучках^{7, 14} (рис. 2).

Гидрозоль золота, содержащий однородные по размеру частицы правильной сферической формы, готовят обычно путем восстановления HAuCl_4 раствором тринатриевого цитрата. При этом возникает коллоид с полосой экстинкции в области 500—550 нм, состоящий из золотых шариков диаметром около 20 нм. Меняя относительные концентрации соли металла и восстановителя, можно контролировать размеры металлических частиц в зависимости от цели эксперимента⁴⁵.

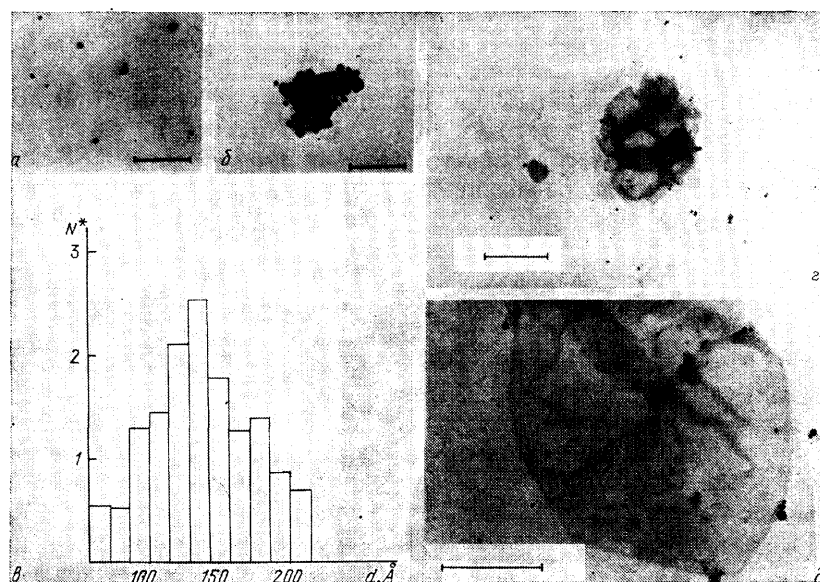


Рис. 2. Электронно-микроскопические фотографии гидрозоля серебра (а), комплекса золь—фенилаланин (б) и гистограмма распределения мицелл золя по размерам (в)¹⁴. Гидрозоль готовили по методике⁴⁶. Комплексы: золь — фоторецепторный диск (см. з)¹¹⁹ и золь — пурпурная мембрана (см. д)¹²⁰. Масштаб — 1 мкм

Гидрозоль серебра для получения ГКР биомолекул обычно готовят восстановлением нитрата серебра боргидридом натрия⁴⁶. Образуется гидрозоль с максимумом экстинкции вблизи 390 нм. Электронные микрофотографии золя и комплекса золь — адсорбат приведены на рис. 2. Характерный размер золевых мицелл при использовании описанного метода приготовления составляет 12—16 нм. При исследовании некоторых аминокислот^{49, 50} и ДНК⁵¹ гидрозоли серебра готовили путем восстановления нитрата серебра ЭДТА и солью лимонной кислоты.

В этих случаях характерные размеры металлических частиц составляли 320 и 30—150 нм соответственно. Как было показано в⁵², гидрозоль серебра можно фракционировать по размерам с помощью центрифугирования и хроматографии.

При добавлении к гидрозолью небольших по размеру биомолекул (аминокислоты и дипептиды, нуклеиновые основания и др.) происходит агрегация мицелл (см. рис. 2, б). При высоких концентрациях адсорбата коагуляция может происходить очень быстро и приводить к полному осаждению комплек-

сов, если коллоид не стабилизировать добавлением протектора (додецилсульфата натрия, желатина, поливинилового спирта, глицерина и т. д.)^{7, 42, 53, 54}.

Важным преимуществом спектроскопии ГКР коллоидных систем по сравнению с электрохимической ячейкой является простота приготовления гидрозолей, а также возможность контроля формы и размера частиц. Поскольку гидрозолы являются слабо рассеивающими свет системами, то достаточно просто получать спектры поглощения, люминесценции и кругового дихроизма, что дает возможность извлекать дополнительную информацию о структуре адсорбата, изучаемого методом ГКР. Спектры ГКР биомолекул, адсорбированных на металлических коллоидах, получают в стандартных кварцевых кюветах для жидких образцов.

Недавно удалось зарегистрировать спектры ГКР следовых количеств (10^{-10} г) органических соединений, адсорбированных на подложках силикагеля²², фильтровальной бумаге²³ и хроматографических пластинках⁵⁵, обработанных гидрозолем серебра. Без сомнения, такой способ регистрации ГКР найдет широкое применение в аналитических приложениях, особенно в хроматографии.

Недостатками метода спектроскопии ГКР на металлических коллоидах являются седиментация золя в процессе длительного хранения, недостаточно надежный контроль потенциала на поверхности мицелл (что важно для биомолекул, претерпевающих фото- и электрохимические превращения), а также зависимость формы и размеров частиц от условий хранения золя.

2.3. Другие системы

Кроме широко распространенных систем электродов в электрохимических ячейках и металлических коллоидов, спектры ГКР были зарегистрированы также для биомолекул, адсорбированных на островковых пленках серебра^{24, 56–58}, на слоях оксидов металлов в туннельных контактах^{59, 60}, на упорядоченных двумерных металлических покрытиях²³, на поверхности серебра, огрубленной осаждением CaF_2 ^{61–64}. При этом адсорбцию биомолекул и запись спектров ГКР проводили на воздухе.

Интенсивные спектры ГКР хлорофилла-а, бактериохлорофилла-а и бактериофеофитина-а, встроенных в инертные полимерные матрицы и нанесенных в виде монослоев на тонкую (≈ 5 нм) островковую пленку серебра, были получены Коттон и др.²⁴. Островковые пленки готовили в вакууме путем медленного (0,1 нм/с) осаждения серебра на очищенную стеклянную подложку, причем толщину слоя металла контролировали с помощью эллипсометрии. Диаметр полученных островков металла составлял 20–40 нм. Монослои, содержащие инертный наполнитель со встроенными биологическими хромофорами, наносили на поверхность серебра по методу Лэнгмюра — Блджетт. Для предотвращения фоторазрушения и окисления образцов приготовление монослоев и их перенос на пластинку проводили в атмосфере инертного газа на неярком свете, используя при возбуждении ГКР малые времена экспозиции. Метод дает возможность моделирования удаленности хромофора от поверхности биомолекулы или мембраны за счет нанесения различного числа монослоев.

В работе⁵⁶ зарегистрировали спектр ГКР 4-аминобензойной кислоты, адсорбированной на островковой пленке серебра, нанесенной на гемоцилиндрическую призму (Al_2O_3) для эффективного возбуждения поверхностных плазмонов. Монослойное покрытие готовили путем нанесения капель исследуемого вещества на подложку, которую затем вращали со скоростью 2000 об/мин. Толщину слоя адсорбированных молекул определяли из спектров ГКР. Чен с соавторами⁵⁷ для изучения изоникотиновой и бензойной кислот использовали золотые островковые пленки.

Для генерации интенсивного ГКР биомолекул, адсорбированных на серебряных пленках, поверхность серебра в ряде случаев огрубляли осажде-

нием CaF_2 ⁶¹⁻⁶⁴. Монослой исследуемых веществ (тетраметилпорфина⁶¹⁻⁶³ или бензойной кислоты⁶⁴) наносили путем центрифугирования из раствора на пленку Al_2O_3 , после чего создавали разделительный слой толщиной 15 нм. Огрубляющий поверхность слой CaF_2 с «массовой толщиной» 40 нм создает значительные шероховатости глубиной до 50 нм. Слой серебра (20–60 нм), осажденный на CaF_2 , воспроизводит волнистую структуру поверхности (рис. 3).

Ряд авторов^{59, 60} наблюдали спектры ГКР от молекулярных слоев *n*-аминобензойной и 4-ацетилбензойной кислот, адсорбированных на слое окисла в металлических туннельных контактах $\text{Al} - \text{Al}_2\text{O}_3 - \text{X} - \text{Ag}$,

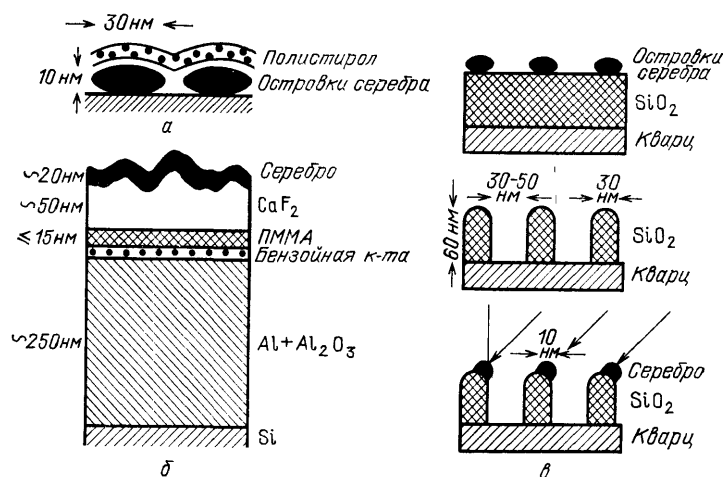


Рис. 3. Создание регулярных микроструктур на поверхности.

a, б — Эксперимент по определению зависимости усиления КР от расстояния между молекулой и металлом^{7,64}. *в* — Этапы создания регулярных неоднородностей, обеспечивавших максимальное усиление сигнала КР⁶⁶

где X — исследуемая молекула. Хотя присутствовал лишь монослой вещества и, кроме того, молекулы были отделены от падающего луча пленкой серебра толщиной 20 нм, наблюдали значительное (до $5 \cdot 10^4$) усиление КР. Образцы готовили путем осаждения пленки алюминия толщиной 40 нм на подложку при давлении 10^{-7} Торр. Геометрию поверхностных неоднородностей контролировали путем испарения через металлические маски. Пленки алюминия окислялись на воздухе, после чего осаждали слой серебра в качестве второго электрода.

Как было показано в⁶⁰, наблюдение ГКР возможно и на гладких металлических пленках толщиной 100 нм. По данным растровой электронной микроскопии размер шероховатостей на таких поверхностях не превышает 30 нм.

В последние годы в спектроскопии ГКР все большее внимание уделяется созданию металлических поверхностей, состоящих из последовательностей изолированных частиц серебра, имеющих однородную форму и субмикронные размеры^{7, 65}. Для создания таких систем используют как микролитографическую технику⁷, так и некоторые более простые методики^{23, 65}. Авторам работы²³ удалось наблюдать ГКР молекул бензойной кислоты, адсорбированных на поверхности серебра, сформированной в виде однородных полусфер с контролируемыми размерами от 40 до 1000 нм. Подложку готовили нанесением полистиролового латекса на фильтровальную бумагу с последующим центрифугированием, высушиванием и напылением слоя серебра (200 нм). Это позволило детектировать сигналы ГКР молекул, нанесенных на подложку в концентрации до 10^{-10} М. Наибольший коэффициент усиления КР был зарегистрирован при адсорбции органических молекул на поверх-

тонких подложках, состоящих из столбиков оксида кремния одинаковой формы с напыленным на них слоем серебра⁶⁵. Столбики SiO₂ на поверхности представляли собой полуэллипсоиды с осями около 60 и 30 нм, расстояние между которыми составляло 300–500 нм. Стадии процесса приготовления подложки показаны на рис. 3. Кремниевая пластинка, на которой нанесен слой SiO₂, подвергается плазменному травлению с использованием в качестве маски серебряной островковой пленки. Приготовленная таким образом поверхность аналогична микроструктурам, полученным с помощью микролитографии⁷, однако она не требует применения столь сложной технологии.

Применение спектроскопии ГКР на металлических поверхностях с искусственно созданными упорядоченными микроструктурами представляется особенно перспективным для аналитических приложений.

3. ОСНОВНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ И МЕХАНИЗМЫ ЭФФЕКТА ГИГАНТСКОГО КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ

ГКР обладает рядом особенностей, отличающих его от обычного КР. Во-первых, сечения КР для колебательных мод адсорбированных молекул увеличиваются в 10^2 – 10^6 раз и более по сравнению с аналогичными величинами для неадсорбированных молекул. Во-вторых, величина усиления зависит от частоты возбуждения и степени шероховатости подложки по специфичному для ГКР закону. При этом определяющую роль играют как шероховатости субатомного размера, так и в несколько десятков и сотен ангстрем. В-третьих, спектры ГКР многих молекул сильно отличаются от соответствующих спектров КР молекул в свободном состоянии. Это проявляется в избирательном усилении определенных колебаний, а также в появлении новых полос в спектре ГКР. Кроме того, при адсорбции молекул на поверхности металла происходит изменение люминесценции, поглощения, ряда нелинейных эффектов, а также возникновение наведенной оптической активности^{1–8}.

При рассмотрении вопроса, связанного с усилением КР адсорбированных молекул, следует учитывать два очевидных обстоятельства. Во-первых, вблизи поверхности металла падающее и рассеянное излучения будут усилены по сравнению с объемом. Это происходит за счет резонансного возбуждения поверхностных электромагнитных волн на шероховатой поверхности. Кроме того, в отдельных структурах на поверхности, а также в малых изолированных частицах будут существовать локальные резонансы, связанные с возбуждением под действием света коллективных электронных осцилляций. Это приведет к увеличению индуцированного дипольного момента молекулы, находящейся вблизи металла. Во-вторых, если в случае изолированной молекулы КР является следствием модуляции колебаниями молекулы ее электронной поляризуемости, то при адсорбции необходимо рассматривать поляризуемость системы молекула — металл, что означает появление новых возбужденных состояний, обусловленных возможностью переноса заряда, а также локальными изменениями плотности электронного заряда вблизи поверхности, возникающими вследствие химической связи, либо туннелирования электронов металла к месту расположения молекулы. В связи с этим различают два типа механизмов усиления КР при адсорбции: электромагнитные механизмы, связанные с увеличением локального электромагнитного поля вблизи поверхности, и молекулярные механизмы — за счет образования новых возбужденных состояний комплекса молекула — металл^{5, 7}.

При применении спектроскопии ГКР к изучению сложных молекул первоочередным является вопрос о том, в какой мере наблюдаемое усиление спектра КР обусловлено электромагнитными, а в какой мере — молекулярными механизмами. При этом достаточно знать степень дальнего действия каждого механизма без детального выяснения его природы. Так, дальнедействующий

шие механизмы дают возможность получать спектры КР, ничем не отличающиеся от спектров неадсорбированных молекул, но значительно большей интенсивности. Короткодействующие механизмы позволяют получать усиленные спектры КР от групп атомов, сближенных с поверхностью металла, и, таким образом, изучать топографию макромолекул.

3.1. С п е к т р ы в о з б у ж д е н и я г и г а н т с к о г о к о м б и н а ц и о н н о г о р а с с е я н и я

Практически во всех системах, в которых наблюдали ГКР, зависимость интенсивности усиленного сигнала КР от частоты возбуждающего света отличается от закона ν^4 , характерного для обычного КР. Результаты работ для разных веществ на электродах^{66–68}, в гидрозолях^{69–71}, на металлических пленках^{72, 73} и в системах с контролируемой шероховатостью⁷⁴ хорошо совпадают и указывают на резонансную зависимость интенсивности ГКР от длины волны возбуждения с максимумом, лежащим в области от 500 до 800 нм. На серебряных электродах максимум в спектре возбуждения ГКР большинства веществ лежит в области 1,8–2,5 эВ. Для медных, золотых и платиновых электродов отмечали сильный рост (более резкий, чем для серебра) интенсивности сигнала ГКР при увеличении $\lambda_{\text{возб}}$ до 670 нм^{5, 66}. Для гидрозолей металла максимум в спектре возбуждения ГКР лежит в видимой области и совпадает с максимумом в спектре поглощения комплексов. Положение максимума зависит от металла, размера и формы отдельных частиц и химической природы адсорбированной молекулы. На металлических гладких и островковых пленках, а также на синусоидальных решетках максимум возбуждения ГКР зависит от размеров шероховатости поверхности, угла падения света и диэлектрических свойств среды⁷⁵.

Зависимость спектров возбуждения от природы металла и состояния поверхности может указывать на определенный вклад в общее усиление увеличения интенсивности локальных электромагнитных полей. В некоторых случаях, например для синусоидальных решеток, можно с достаточной уверенностью говорить о том, что спектр возбуждения ГКР определяется возбуждением поверхностных электромагнитных волн.

3.2. З а в и с и м о с т ь у с и л е н и я к о м б и н а ц и о н н о г о р а с с е я н и я о т р а с с т о я н и я м е ж д у м о л е к у л о й и м е т а л л о м

Наиболее важной особенностью ГКР как для выяснения физических аспектов явления, так и для различных приложений является зависимость усиления КР от расстояния между молекулой и поверхностью металла. В⁷⁶ наблюдали спектр ГКР пиридина, адсорбированного на рыхлой поверхности, полученной при фотореакции йода на серебре. Анализируя интенсивность спектра в зависимости от экспозиции пиридина, которую находили по плотности углерода, определенной с помощью оже-спектроскопии, авторы заключили, что наблюдаемая зависимость объясняется в рамках усиления локальных электромагнитных полей. Этот вывод основан на том, что существенное нарастание сигнала ГКР наблюдали для покрытий, выходящих за область первого монослоя. Такую же зависимость наблюдали в других экспериментах⁷⁷, где дейтерированный пиридин адсорбировали на поверхности пиридина, а также в⁷⁸, где при адсорбции пиридина использовали предварительное полимерное покрытие. С другой стороны, в⁷⁹ показано, что сигнал ГКР пиридина создается главным образом первым монослоем, нанесенным на очищенные ионной бомбардировкой поликристаллические поверхности. В⁸⁰ измеряли зависимость интенсивности ГКР пиридина, адсорбированного на серебряных островковых пленках, от величины покрытия. Авторы считают, что усиление имеет место только для первого молекулярного слоя, и лишь

молекулы, адсорбированные на некоторых активных центрах, создают главную часть усиления КР. Вывод о существовании активных центров, ответственных за все усиление или по крайней мере за большую его часть, приводится также в ⁸¹. При измерении зависимости ГКР от покрытия серебряных пленок, напыленных при низких температурах, оказалось, что активные центры адсорбции являются адатомами (шероховатостями атомного размера).

В работе ⁸² изучали зависимость интенсивности ГКР от толщины покрытия поверхности монокристалла Ag (111) пиридином при слабой периодической модуляции профиля поверхности. Было выделено два типа усиления: сигнал КР физиосорбированного пиридина (10^2), связанного с возрастанием локального электромагнитного поля вблизи молекулы, и сигнал КР хемосорбированного пиридина (10^4), которое перемножается с усилением, связанным с локальным полем ⁸³.

Убедительные данные в пользу короткодействующего механизма усиления КР при адсорбции биомолекул на серебряных электродах, обработанных с помощью ОВЦ, а также на гидрозолях серебра были получены в работах ^{84, 85}. Эти данные будут приведены в разделе 4.

Создание полной теории неупругого рассеяния света молекулами, адсорбированными на поверхности металла, представляется в настоящее время достаточно сложным. Это связано в первую очередь с тем, что при адсорбции оптические свойства молекул сильно изменяются, и для их описания необходимо иметь микроскопическую модель взаимодействия молекулы с металлом. Основные трудности для теории возникают тогда, когда характерное расстояние между молекулой и подложкой становится соизмеримым с атомными размерами. В этом случае свойства металла не могут быть описаны с помощью макроскопической модели, поскольку основную роль во взаимодействии играют локальные электронные состояния поверхности ⁸⁶. Необходимо учитывать не только кристаллическую структуру металла, но и наличие на поверхности дефектов, которые в значительной мере определяют ее адсорбционные свойства. Описание молекулы должно исходить из реального распределения в ней заряда и электронной плотности, а не ограничиваться представлением в виде точечного диполя либо в другой упрощенной форме. Кроме того, микроскопическая модель адсорбции должна быть самосогласованной, т. е. учитывать взаимное влияние при адсорбции молекулы и поверхности металла. Это влияние заключается в перераспределении электронной плотности в металле и в уширении и сдвиге основного и особенно возбужденных энергетических уровней в молекуле. Взаимодействие молекулы с металлом можно разделить на два основных типа: электростатическое взаимодействие с электронами и ионами металла и специфическое электронное взаимодействие за счет перекрывания волновых функций и гибридизации электронных систем.

Следующий этап на пути создания теории ГКР заключается в полном описании взаимодействия света с адсорбированной молекулой. При этом молекулу рассматривают в электромагнитном поле, возникающем при взаимодействии света с реальной поверхностью металла. При этом на металлической поверхности при определенных условиях существуют поверхностные волны коллективных возбуждений электронной плотности, так называемые поверхностные плазмоны (ПП) ⁸⁷. Возбуждение ПП происходит в том случае, если параллельная поверхности компонента импульса падающего фотона становится равной импульсу плазмона в условиях выполнения закона сохранения квазиимпульса. Кроме того, под действием света на поверхности металла может происходить образование электронно-дырочных пар ⁸⁸. И, наконец, реальная поверхность металла покрыта шероховатостями микроскопического масштаба. Под действием света в отдельных структурных элементах рельефа могут возбуждаться колебания электронной плотности (плазменные колебания) — локальные резонансы ⁸⁹. Таким образом, теория

рассеяния света на поверхности твердого тела должна включать в себя микроскопическую модель адсорбции, а также учитывать все аспекты взаимодействия света с металлом в присутствии адсорбированных молекул.

Полной теории, способной объяснить одновременно все наблюдаемые свойства ГКР, не существует, хотя попытки такого рода и предпринимались^{90, 91}. Так, в⁹¹ методом Хартри — Фока была вычислена поляризуемость молекулы водорода, адсорбированной на поверхности металла, как функция времени, частоты света и расстояния до подложки. При таком подходе все проблемы, связанные с конечностью размера молекулы, выбором расстояния от молекулы до подложки, типом взаимодействия молекулы и металла и диэлектрическим откликом металла, решаются в рамках предложенного метода. Полученные результаты демонстрируют возможность построения микроскопических моделей методом расчета *ab initio*.

3.3. Электромагнитные механизмы усиления

Под электромагнитными механизмами следует понимать такие взаимодействия между молекулой и подложкой, которые как в присутствии, так и в отсутствие внешнего электромагнитного поля приводят к увеличению индуцированного дипольного момента молекулы в условиях, когда перекрытие электронных волновых функций молекулы и металла пренебрежимо мало либо вовсе отсутствует. На металлической поверхности существуют электромагнитные резонансы, которые могут увеличить напряженность локального поля, если параллельная поверхности компонента импульса падающего фотона становится равной импульсу ПП.

При падении света из вакуума на ровную металлическую поверхность уравнение дисперсии ПП имеет вид

$$k^2 = \left(\frac{\omega}{c}\right)^2 \frac{\epsilon}{\epsilon + 1}, \quad (1)$$

где ω — частота плазмона, совпадающая с частотой падающего света, ϵ — диэлектрическая проницаемость металла, c — скорость света⁹². В области существования поверхностного плазмона $\text{Re } \epsilon = \epsilon' < 0$

$$|k| > |k_t|,$$

откуда следует, что возбуждение ПП световой волной, падающей из вакуума на ровную металлическую поверхность, невозможно из-за невыполнения условия сохранения квазиимпульса. При наличии возмущения поверхности металла решеткой с определенным вектором q либо случайной шероховатостью, имеющей фурье-компоненту с вектором q , условие сохранения квазиимпульса удовлетворяется, и ПП может быть возбужден световой волной, что эквивалентно возрастанию действующего, т. е. локального, поля волны. Усиление локального поля происходит благодаря фокусирующему эффекту: плоские волны при падении на такую решетку сжимаются в поверхностные волны, имеющие протяженность в одном направлении. Возбуждение ПП можно осуществить при помощи призмы с определенным коэффициентом преломления⁹³ (нарушенное полное внутреннее отражение), либо создать на поверхности дифракционную решетку⁹⁴, благодаря которой параллельная поверхности компонента импульса изменится вследствие дифракции. Усиление КР за счет возбуждения ПП на поверхности дифракционных решеток теоретически исследовано в работах^{95, 96}. Расчет локального поля проводится аналогичным образом, как вывод уравнений Френеля, но с тем отличием, что к падающей, отраженной и прошедшей волнам прибавляется преломленная волна. Для вычисления амплитуд преломленных волн используют теорию возмущений, в которой величина $\xi\omega/c$ служит малым параметром (ξ — средняя высота решетки).

В результате уравнение дисперсии приобретает вид

$$\left(\frac{\omega}{c}\right)^2 \sin^2 \theta + 2 \frac{\omega}{c} \sin \theta \cdot \sin^2 \varphi \frac{2\pi n}{L} + \left(\frac{2\pi n}{L}\right)^2 = \left(\frac{\omega}{c}\right)^2 \frac{\operatorname{Re} \varepsilon(\omega)}{1 + \operatorname{Re} \varepsilon(\omega)}, \quad (2)$$

где справа стоит квадрат волнового вектора ПП, а слева — квадрат параллельной поверхности компоненты волнового вектора дифрагированного фотона. Если заданы частота лазера (ω), вещество и длина волны рельефа (L), то это уравнение может быть удовлетворено путем надлежащего выбора углов падения θ и φ . Максимальное значение локального поля пропорционально отношению $\operatorname{Re} \varepsilon(\omega_R)/\operatorname{Im} \varepsilon(\omega_R)$, следовательно, при малом значении мнимой части диэлектрической проницаемости на резонансной частоте ω_R металл становится хорошим усилителем. При наличии решетки ПП может усиливать не только падающее излучение, но и излучение диполя на стоксовой частоте⁹⁷. Все рассуждения для падающего излучения остаются в силе и для рассеянного, а интенсивность КР будет иметь резонанс при изменении угла детектирования.

ПП могут существовать не только на регулярных структурах типа решеток, но и на поверхности металла, обладающей случайной шероховатостью. Теория усиления КР за счет возбуждения ПП на поверхностях со случайной шероховатостью была развита в целом ряде работ (см. обзоры¹⁻⁸). В этом случае усиление КР будет меньше, чем на регулярных решетках, так как любая дополнительная случайная шероховатость, добавленная к синусоидальной решетке, послужит причиной затухания ПП, уширения резонанса и снижения напряженности локального поля на поверхности. Необходимо отметить, что даже на регулярных решетках коэффициент усиления КР не превышает $10^{4,3,98}$.

Если на поверхности существуют отдельные частицы металла характерного размера 5—50 нм, то ее оптические свойства нельзя описывать моделью гладкой поверхности с малыми возмущениями. Оптические свойства очень шероховатых серебряных пленок, островковых пленок и коллоидных суспензий определяются резонансами оптической проводимости или коллективными возбуждениями электронов в отдельных выступах металла — локальными резонансами (см. обзоры¹⁻⁸). Когда частота падающего света совпадает с частотой локального резонанса, то возникает значительная поляризуемость выступа, и он действует как источник электрического поля. Кроме того, усиление КР может происходить за счет возбуждения локальных резонансов на стоксовой частоте. При этом выступ играет роль антенны.

В⁹⁹⁻¹⁰¹ рассмотрено усиление КР за счет эффекта «светящегося острия» — отдельного сильно вытянутого выступа, у вершины которого находится молекула (классический диполь). Соответствующий коллективный электронный резонанс с частотой в видимой области спектра представляет собой дипольный резонанс Ми¹⁰². Когда частота падающего света находится в резонансе с дипольными плазменными осцилляциями, то $\varepsilon(\omega) = -\varepsilon_R$, где ε_R — величина, определяющая дипольный резонанс вытянутого выступа. При этом локальное электрическое поле на вершучке выступа усиливается в $(\varepsilon - 1)/(\varepsilon + \varepsilon_R)$ раз. Так, для серебра при $\lambda_{\text{возб}} = 500$ нм коэффициент усиления поля составляет ~ 30 , так что локальная интенсивность поля на поверхности вершучки выступа в 900 раз больше поля вдали от поверхности. Локальное поле на боковой поверхности выступа вдали от вершины уменьшается по амплитуде почти в $|\varepsilon|$ раз (около 10 раз для серебра при $\lambda_{\text{возб}} = 500$ нм).

Итак, электромагнитное усиление КР определяется тремя факторами: 1) классическое усиление, вызванное ПП на шероховатой поверхности; 2) локальными резонансами электронной плотности в отдельных структурных элементах поверхности; 3) эффектом «светящегося острия». Усиление за счет ПП, как уже отмечалось, наиболее эффективно на регулярных решетках и может достигать $10^{4,3,98}$.

3.4. Молекулярные механизмы усиления

Под термином «молекулярные механизмы усиления» понимают эффекты, изменяющие матричный элемент КР адсорбированной молекулы за счет перекрывания волновых функций молекулы и металла. Эти механизмы являются короткодействующими, поскольку для их эффективного проявления требуется непосредственный контакт молекулы с металлом. Усиление КР происходит вследствие образования нового резонансного перехода, связанного с переносом заряда с металла на молекулу⁴.

При кулоновском взаимодействии молекулы с металлом происходит уширение и сдвиг основного, а особенно возбужденного уровней молекулы. В результате, если в свободном состоянии молекулы имеет место обычное КР, то за счет уширения уровней в адсорбированном состоянии образуется зона состояний, между которыми возможно резонансное поглощение кванта и соответственно резонансное КР. Такая гипотеза была впервые высказана до обнаружения эффекта ГКР¹⁰³, а затем развита в работах^{104, 105}.

Наиболее простая модель усиления КР за счет переноса заряда (с объяснением увеличения сечения КР в 10^6 раз) была предложена в работе¹⁰⁶. Часть вклада электронов металла в сечение КР может быть обусловлена влиянием осцилляции ядер на перенос заряда от металла к молекуле.

Пусть V — объем металла, который может участвовать в переносе заряда, χ — восприимчивость металла. Тогда поляризуемость металла $\alpha_M = V\chi$. Изменение положения молекулы, связанной с металлом (δ_r), создаст перенос заряда $(\partial q/\partial r)\delta_r$, который вызывает изменение поляризуемости

$$\frac{\partial \alpha_M}{\partial r} \delta_r \equiv \frac{\partial (V\chi)}{\partial q} \frac{\partial q}{\partial r} \delta_r. \quad (3)$$

Восприимчивость имеет вид

$$\chi = (\varepsilon - 1)/4\pi, \quad (4)$$

где $\varepsilon = 1 - (\omega_p/\omega)^2$ (формула Друде), $\omega_p^2 = 4\pi n e^2/m$, а $n = q/V$. Изменение q влечет изменение ω_p , определяемое производной

$$\frac{\partial \omega_p}{\partial q} = \frac{4\pi e^2}{mV}.$$

Соответственно

$$\frac{\partial \alpha_M}{\partial r} \delta_r = \frac{e}{m\omega^2} \frac{\partial q}{\partial r} \delta_r. \quad (5)$$

Отсюда легко найти сечение КР¹²⁰:

$$\frac{\partial \sigma}{\partial \Omega} = \frac{1}{3} \frac{e}{m\omega^2} \left(\frac{\partial q}{\partial r} \right)^2 (\Delta r)^2, \quad (6)$$

где $(\Delta r)^2$ — квадрат матричного элемента $\langle 0 | \delta_r | 1 \rangle$, где $| 0 \rangle$ и $| 1 \rangle$ — волновые функции основного и возбужденного колебательных состояний. В этой модели перенос заряда не приводит к образованию резонансного перехода, поэтому коэффициент усиления мал (около 20).

В работе¹⁰⁷ предполагается, что перенос заряда происходит после образования комплекса, способного поглощать свет в видимой области спектра. В результате имеет место резонансное КР и коэффициент усиления может достигать 10^6 .

В большинстве моделей, в которых рассматривают микроскопическое взаимодействие молекулы с металлом (прямой перенос заряда¹⁰⁶, туннелирование электронов⁸⁸, взаимодействие с электронно-дырочными парами), рассматривается идеализированная поверхность и не учитывается наличие поверхностных дефектов. Между тем, такие дефекты понижают потенциальный барьер на поверхности металла и тем самым способствуют адсорбции (см. обзоры^{2, 4, 7}). В качестве активных центров адсорбции выступают вакан-

сии и точки выхода на поверхность, адатомы и кластеры адатомов. Эти дефекты являются и центрами фотон-электронного взаимодействия⁷. На основании исследования резонансного перехода при адсорбции молекулы через адатом предполагают^{5, 7}, что полоса поглощения комплекса возникает из-за оптического возбуждения электрона с квазиуровня атома в свободные состояния зоны проводимости металла. Если при этом молекула образует комплекс с адатомом путем частичного переноса заряда электрона адатома на адсорбированную молекулу, то становится возможной сильная модуляция — колебаниями молекулы — вероятности перехода адатом — металл, что должно проявляться в возникновении резонансного КР. Согласно^{108–110} в присутствии адатома понижается симметрия решетки, в результате чего становятся разрешенными внутризонные оптические переходы в металле, что в свою очередь обеспечивает поглощение в системе адатом — металл. Резонансное усиление КР можно записать в этом случае согласно¹⁰⁸:

$$\sigma_{\nu}(\omega) = \left| \sum \frac{\langle 0 | H_{ep} | j \rangle \langle 1, j | H_{ev} | 0, i \rangle \langle i | H_{ep} | 0 \rangle}{(\omega - \omega_{\nu} - \omega_j - iY_j)(\omega - \omega_i - iY_i)} \right|^2, \quad (7)$$

где $\sigma_{\nu}(\omega)$ — сечение рассеяния, H_{ev} — гамильтониан, описывающий взаимодействие электронов металла с колебаниями молекулы с частотой ω_{ν} , H_{ep} — гамильтониан электрон-фотонного взаимодействия, ω — частота падающего света, $|0\rangle$ — начальное состояние электрона, $|i\rangle$ и $|j\rangle$ — промежуточные состояния, Y_i, Y_j — константы затухания, $\hbar\omega_i$ и $\hbar\omega_j$ — энергии переходов $0 \rightarrow i$ и $0 \rightarrow j$ соответственно, 0 и 1 — основное и возбужденное колебательные состояния. В присутствии адатома, понижающего симметрию, становятся возможными переходы с любой энергией $\hbar\omega_i$ ¹⁰⁸.

В^{111, 112} проведено теоретическое изучение влияния адатомов на электронную структуру и оптические свойства поверхности металла. Показано, что матрица рассеяния имеет полюс при энергии электрона металла, равной энергии связанного состояния адатома. Согласно^{109, 110} поглощать свет при внутризонных переходах электроны металла могут лишь в случае несохранения импульса, что имеет место только для рассеивающихся на адатомах электронов. Вероятность рассеяния максимальна для электронов с энергиями, близкими к энергии связанного состояния адатома^{111, 112}. Поэтому в¹¹³, учитывая, что электронные состояния металла с энергией вблизи энергии квазиуровня адатома частично локализованы на адатоме, а возбужденные состояния металла могут иметь энергию выше уровня Ферми, полоса поглощения комплекса трактуется как полоса переноса заряда в системе адатом — металл. В¹¹³ были объяснены некоторые основные свойства ГКР: резонансный характер зависимости интенсивности спектра от частоты возбуждающего света ω , зависимость соотношений интенсивностей различных линий от ω , зависимость от ω отношения интенсивностей стоксовых и антистоксовых линий и т. д. Оценки коэффициента усиления КР дают значение $\sim 10^4$.

Существует еще одна группа моделей^{2, 4, 6, 7}, в основе которых лежит возбуждение падающим светом электронно-дырочных пар в металле. В¹¹⁴ рассмотрена модель, в которой адатомы являются центрами сильного фотон-электронного взаимодействия, и их возбуждения как раз и являются электрон-дырочной парой. При этом возбуждение переносится с металла на молекулу и обратно так, что в результате рекомбинации пары излучается фотон на стоксовой частоте. Как показано в², этот процесс зависит от четвертой степени константы электрон-фотонного взаимодействия.

В заключение следует отметить, что хотя молекулярные механизмы усиления КР могут обеспечить увеличение интенсивности спектров в 10^4 и более раз, их реализация требует достаточно специфичных условий: либо подходящей электронной структуры молекул (для возникновения индуцированного резонансного КР), либо наличия в достаточных количествах активных центров (для образования резонансного перехода молекула — активный центр —

металл). Поскольку в реальных экспериментах усиление КР наблюдается для молекул, обладающих различными электронными свойствами и химической природой, то, по-видимому, на основе только молекулярных механизмов невозможно создать полной теории ГКР, хотя их роль в общем эффекте может быть весьма существенной.

4. ПРИМЕНЕНИЕ ГИГАНТСКОГО КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ К ИЗУЧЕНИЮ БИОЛОГИЧЕСКИХ МОЛЕКУЛ

В таблице были приведены основные типы биологических молекул, для которых удалось получить спектры ГКР. На примере этих соединений к настоящему времени выявились основные преимущества метода и обозначился круг задач, решаемых с помощью спектроскопии ГКР. Вместе с тем оказалось, что использование биомолекул в качестве объекта исследования позволяет выяснить некоторые особенности механизма ГКР, имеющие важное значение в приложениях метода: дальное действие усиления в различных системах, роль хемосорбции, природа групп атомов, колебания которых претерпевают преимущественное усиление, и т. д. Рассмотрим основные результаты структурно-функционального изучения биомолекул методом ГКР, а также аналитические приложения метода.

4.1. Аминокислоты, пептиды и модельные соединения

Полипептиды и белки состоят из остатков аминокислот. Общая формула двадцати наиболее распространенных аминокислот имеет вид



Боковые цепи аминокислот (R) могут иметь различную химическую природу — представлять собой ароматические кольца с развитой π -электронной системой (фенилаланин, тирозин, триптофан, гистидин), незаряженные полярные группы (глицин, серин и т. д.), заряженные при нейтральных pH полярные группы (лизин, аргинин) либо неполярные группы (аланин, лейцин и т. д.). Таким образом, интерес к изучению спектров ГКР аминокислот вызывается не только необходимостью получения отнесений для анализа спектров ГКР белков и надмолекулярных комплексов, но и возможностью получения информации о природе групп, полосы колебаний которых претерпевают максимальное усиление при адсорбции.

Недавно были получены спектры ГКР аминокислот, а также некоторых дипептидов и модельных соединений^{14, 33, 115, 116}, адсорбированных на серебряных электродах и гидрозолях серебра. При адсорбции возникает низкочастотная полоса ($200-250\text{ см}^{-1}$), отвечающая колебанию химической связи молекула — металл⁷ и свидетельствующая о хемосорбции аминокислот. Квадрат частоты этого низкочастотного колебания линейно зависит от потенциала на рабочем электроде. Анализ спектров ГКР аминокислот с боковыми цепями различной химической природы позволил заключить, что хемосорбция может происходить через неподеленные электронные пары атомов азота и кислорода, а также за счет образования π -электронных комплексов молекулы с металлом^{115, 116}. Наиболее интенсивное ГКР характерно для молекул аминокислот, обладающих развитой π -электронной системой — ароматических аминокислот тирозина (Tyr), триптофана (Trp) и фенилаланина (Phe) (рис. 4). Коэффициент усиления сечения КР при адсорбции за счет неподеленных пар оказывается на несколько порядков меньшим. При изучении химически модифицированных аминокислот, заряженные группы которых нейтрализовали незаряженными группировками, оказалось, что интенсивность и вид спектров ГКР не отличаются от спектров соответствующих немодифицированных аминокислот, что свидетельствует о незначительном вкладе электростатических взаимодействий при адсорбции.

Спектры ГКР алифатических аминокислот очень сходны друг с другом (рис. 5). Проявляются только полосы колебаний карбоксильных и амино-групп, причем коэффициент усиления КР оказывается на ≈ 2 порядка ниже, чем для ароматических аминокислот. В спектрах ГКР эквимольной смеси

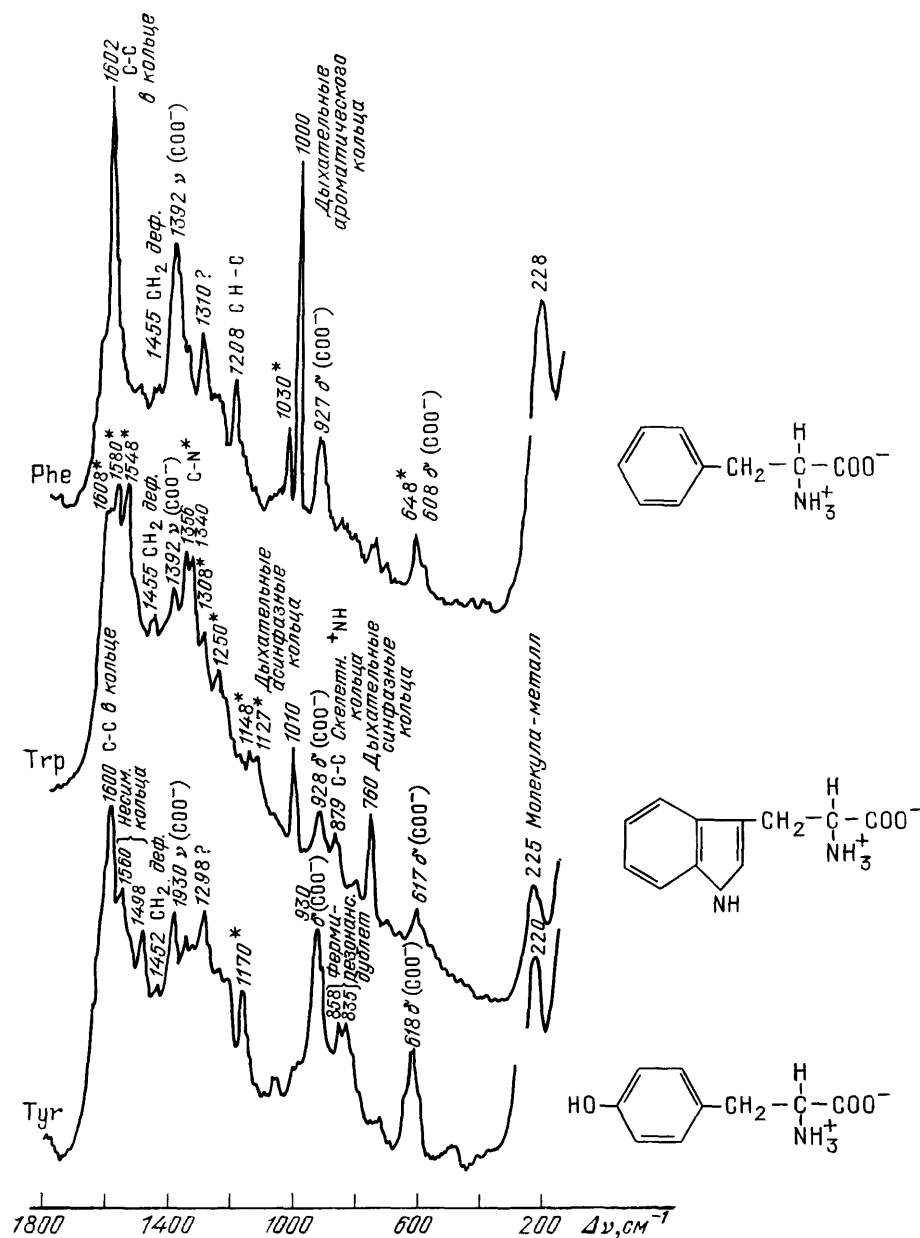


Рис. 4. Спектры ГКР ароматических аминокислот фенилаланина (Phe), триптофана (Trp) и тирозина (Tyr), адсорбированных на гидрозолях серебра¹⁴.

Справа — структурные формулы соответствующих аминокислот. Концентрация соединений — 0,1 мг/мл; $\lambda_{\text{возб}} = 514,5 \text{ нм}$

ароматической (Phe) и алифатической (Ala) аминокислот проявляются только полосы Phe, что свидетельствует о преимущественной адсорбции ароматической аминокислоты при конкурентном связывании. Аналогичным образом в спектрах ГКР дипептидов, состоящих из остатков алифатической и ароматической аминокислот, наблюдаются только полосы ароматического остатка.

Все это свидетельствует о том, что наибольшим сродством к металлу обладают π -электронные системы ароматических остатков. Взаимодействие с металлом через σ -связи с участием неподеленных электронных пар атомов азота и кислорода на несколько порядков слабее¹⁵.

В спектре поглощения комплекса гидрозоля серебра — фенилаланин (как и для комплексов всех других аминокислот) наблюдаются две полосы

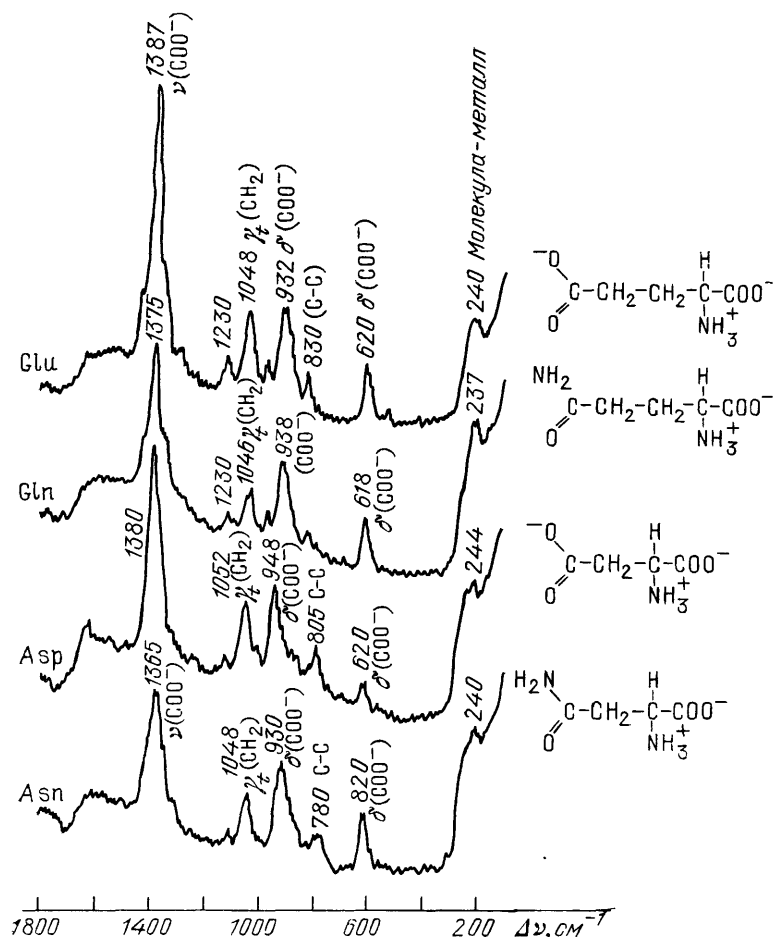


Рис. 5. Спектры ГРП алифатических аминокислот глутамина (Gln), аспарагина (Asn), глутаминовой (Glu) и аспарагиновой (Asp) кислот³³.

Справа — структурные формулы соответствующих аминокислот. Концентрация соединений — 0,3 мг/мл; $\lambda_{\text{возб}} = 514,5 \text{ нм}$

с максимумами 395 и $\approx 570 \text{ нм}$. Полоса 395 нм характерна для спектра поглощения гидрозоля серебра без адсорбата и соответствует плазменному резонансу для сферической частицы серебра диаметром $\approx 20 \text{ нм}$ ⁴⁶. Положение максимума этой полосы зависит как от типа металла, так и от размера и формы частиц. Длинноволновая полоса возникает после добавления к золю адсорбата. Положение максимума и полуширина полосы строго не определены. Со временем происходит смещение максимума в длинноволновую область и уширение полосы, причем скорость сдвига пропорциональна концентрации адсорбата. Альбрехт и Крейтон полагают⁴⁶, что эта полоса связана с рассеянием света на агрегатах серебряных мицелл специфической формы с характерным размером 100—200 нм. Такие агрегаты действительно образуются при коагуляции гидрозоля, вызванной добавлением аминокислоты (см. рис. 2, б)¹⁴. Однако коагуляцию гидрозоля можно вызвать добавлением соли и в этом случае в спектре поглощения не появляется выраженного длинно-

волнового максимума. Происходит лишь несимметричное уширение полосы с максимумом 395 нм в длинноволновую область. Выраженный максимум не появляется и при добавлении к гидрозолю аминокислоты глицина. Это однозначно свидетельствует о том, что химическая природа соединения, образующего комплекс с серебром, существенна для появления в спектре поглощения длинноволнового максимума.

В¹⁴ из анализа относительных интенсивностей стоксовых и антистоксовых полос в спектре ГКР комплекса золь — Phe были рассчитаны параметры полос поглощения нового электронного перехода, ответственного за резонансное КР комплекса, если таковое имеет место. Оказалось, что максимум такой гипотетической полосы поглощения с точностью до 1 нм совпадает

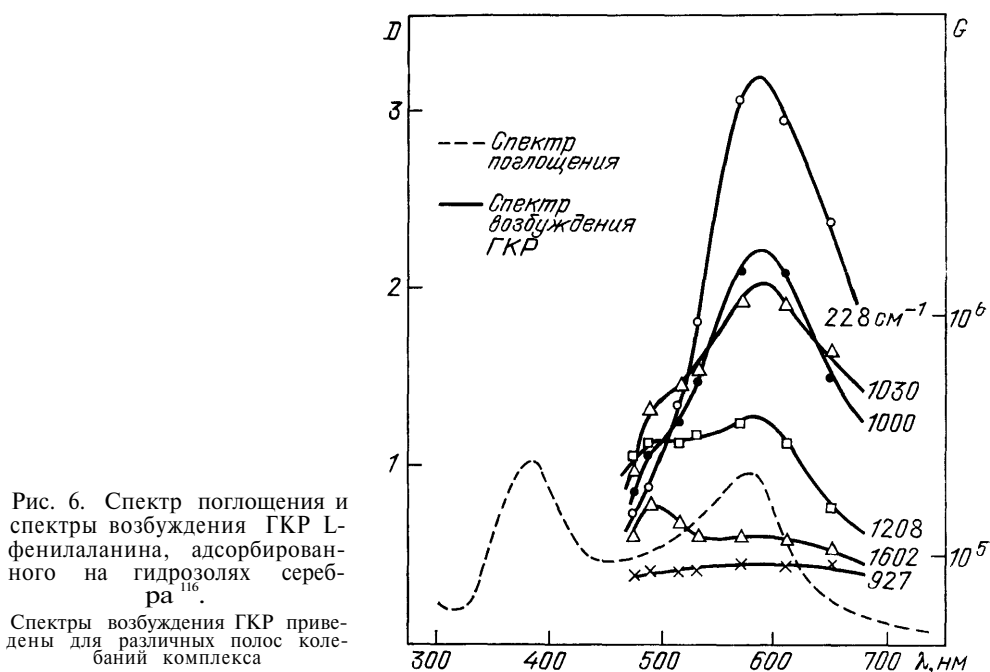


Рис. 6. Спектр поглощения и спектры возбуждения ГКР L-фенилаланина, адсорбированного на гидрозолях серебра¹⁶.

Спектры возбуждения ГКР приведены для различных полос колебаний комплекса

с максимумом длинноволновой полосы поглощения, проявляющейся при адсорбции аминокислот на гидрозоль серебра, тогда как полуширина наблюдаемой полосы в несколько раз превышает полуширину ожидаемой полосы электронного перехода.

По-видимому, возникновение длинноволновой полосы в спектре поглощения комплекса гидрозоля серебра с аминокислотами и ее параметры определяются суперпозицией следующих эффектов. Во-первых, при хемосорбции молекулы на поверхности серебра возникает электронный переход, связанный с переносом заряда с металла на молекулу. Полоса поглощения, отвечающая этому переходу, имеет максимум в видимой области спектра. Во-вторых, агрегация и связанное с ней рассеяние Ми вызывают существенное уширение полосы электронного перехода¹⁶². Кроме того, агрегация гидрозоля серебра влияет на процесс хемосорбции на поверхности отдельной мицеллы и, следовательно, на параметры полосы переноса заряда металл — молекула¹⁴.

Спектр возбуждения ГКР комплекса золь — аминокислота имеет резонансный характер с максимумом, совпадающим с максимумом длинноволновой полосы поглощения (рис. 6). Однако для различных полос колебаний в спектре ГКР зависимость величины коэффициента усиления КР от длины волны возбуждения различна. Так, для полосы 1600 см⁻¹ фенилаланина отсутствует выраженный максимум в области 500—700 нм, тогда как интенсивность полосы 228 см⁻¹ при 570 нм более чем в 10 раз превышает ее интенсивность при 488 нм.

Приведенная зависимость коэффициента усиления КР от длины волны возбуждения, а также его высокое (до $\sim 10^6$) значение указывают на наличие по крайней мере двух механизмов усиления⁷: электромагнитного (без явно выраженного резонансного характера) и молекулярного (обусловленного хемосорбцией и образованием комплекса с переносом заряда).

Спектры ГКР аминокислот, адсорбированных на серебряных электродах, интерпретировать довольно сложно вследствие появления после «активирования» электродов с помощью ОВЦ широких бесструктурных полос с максимумами около 1350 и 1590 см^{-1} , а также в области 2800 – 3000 см^{-1} . Эти полосы

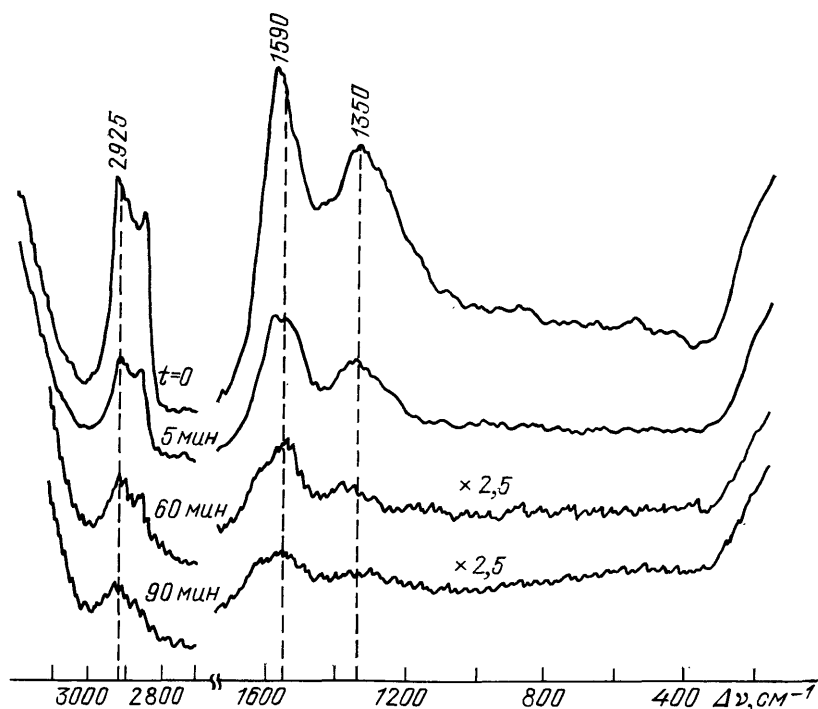


Рис. 7. Спектры ГКР графитизированного углерода на поверхности серебряного электрода, полученные в чистом электролите (0,1М КСl) и записанные через различные интервалы времени, в течение которых проводили дегазирование раствора³³

связаны с графитизацией на металле углерода, восстанавливаемого из углекислого газа, растворенного в воде¹⁶³ (рис. 7). По-видимому, графитизация углерода способствует увеличению сигнала КР, поскольку после дегазирования растворов путем пропускания гелия наряду с уменьшением интенсивности этих полос наблюдается и уменьшение сигналов ГКР изучаемых соединений¹¹⁵. Тем не менее частоты основных, характеристичных полос в спектрах ГКР аминокислот, адсорбированных на серебряных электродах, весьма близки к наблюдаемым при адсорбции на гидрозолях и могут быть использованы для отнесений при анализе спектров ГКР водорастворимых и мембранных белков.

4.2. Водорастворимые белки

Возможность применения метода спектроскопии ГКР к изучению водорастворимых белков была впервые показана для белков периплазматического пространства *E. coli*^{11, 12}. Спектры ГКР водорастворимых белков представляют собой суперпозицию спектров ГКР ароматических аминокислотных остатков, входящих в состав изучаемых молекул. Наблюдаемые отличия в частотах и относительных интенсивностях полос, а также зависимость

спектров ГКР от потенциала связаны с различной ориентацией боковых цепей аминокислотных остатков относительно поверхности электрода.

На рис. 8 представлены спектры ГКР двух водорастворимых белков — лизоцима и альбумина, адсорбированных на электродах при потенциале нулевого заряда серебра¹¹⁶. Отметим, что спектры получены при концентрациях в $\sim 10^{-3}$ раз меньших, чем минимально необходимо для записи спектров КР в растворе. На основании анализа относительных интенсивностей полос в спектрах ГКР, а также данных рентгеноструктурного анализа высокого разрешения сделан вывод о том, что усиление КР наблюдается только

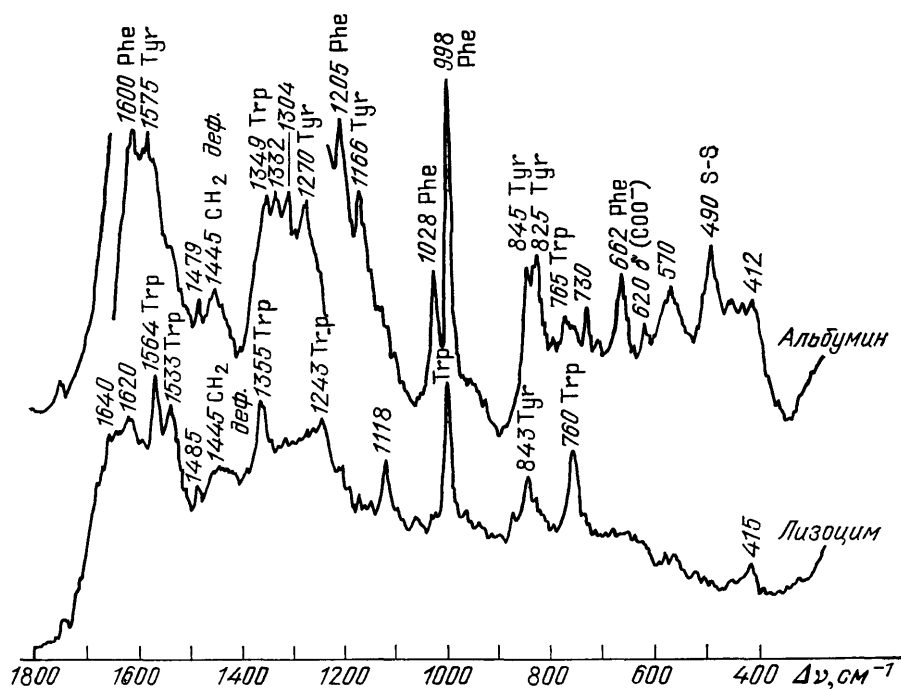


Рис. 8. Спектры ГКР лизоцима и бычьего сывороточного альбумина, адсорбированных на серебряных электродах при потенциале нулевого заряда серебра¹¹⁶. Концентрация адсорбата 10^{-3} М; $\lambda_{\text{возб}} = 514,5$ нм

для групп атомов, которые находятся на поверхности белковой глобулы и взаимодействуют с металлом³³. Это подтверждает короткодействующий характер ГКР в данных экспериментальных условиях.

В спектроскопии КР белков особой информативностью отличаются колебания пептидных групп (Амид I и Амид III)^{27, 164}. Однако обнаружить эти колебания в спектрах ГКР водорастворимых белков не удалось. По-видимому, это связано с эффектом экранировки пептидных групп боковыми цепями аминокислотных остатков, что отдаляет их от поверхности металла и препятствует эффективному усилению соответствующих колебаний.

Важное значение для спектроскопии ГКР биополимеров имеет тот факт, что при адсорбции на серебре в используемых экспериментальных условиях конформация макромолекул практически не меняется^{12-14, 134}, хотя, безусловно, в каждом конкретном случае этот вопрос требует специального рассмотрения. Так, ЛС-белок при адсорбции на серебряном электроде сохраняет способность к связыванию субстрата¹², а флавобелки, как показали Спиро и др.¹³⁴, при адсорбции на гидрозоле серебра сохраняли 86% функциональной активности, причем она возрастала до 96% после десорбции белка. Как следует из анализа спектров кругового дихроизма цитотоксина I из яда кобры *Naja naja oxiana* на гидрозоле серебра (рис. 9), конформация полипептидной цепи остается неизменной, тогда как существенные изменения в обла-

сти поглощения ароматических аминокислотных остатков свидетельствуют о непосредственном взаимодействии ароматических боковых цепей с серебром¹³. В то же время Спино и др. показали¹³⁰, что для некоторых гемсодержащих белков, адсорбированных на серебре, возможно нарушение микроокружения гемовых групп и даже расщепление связей гем—белок.

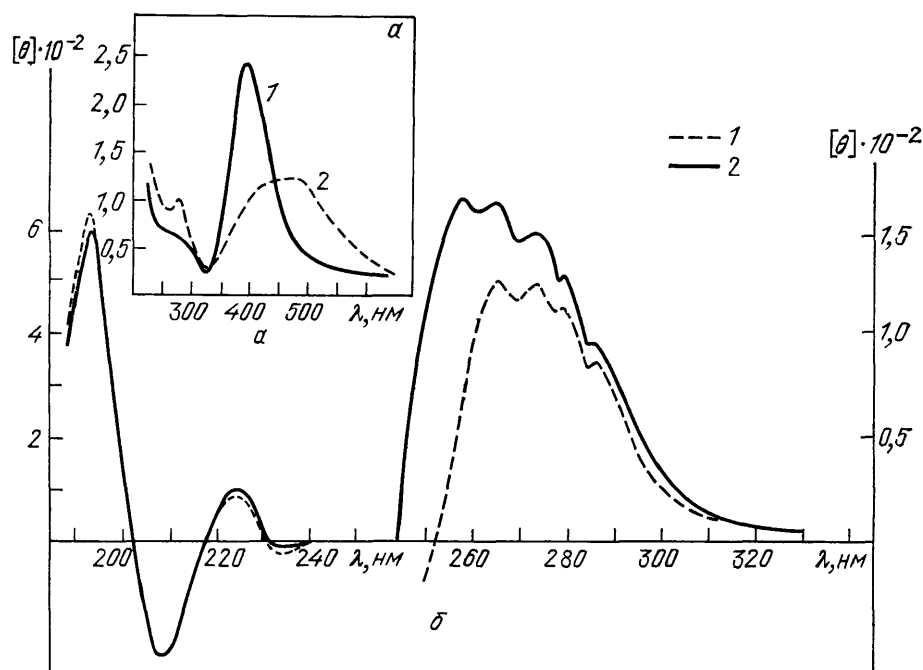


Рис. 9. *a* — Спектры поглощения гидрозоля серебра (1) и комплекса золь — цитотоксин (2). *б* — Спектры кругового дихроизма цитотоксина (1) и комплекса золь — цитотоксин (2) в пептидной (190 — 240 нм) и ароматической (340 — 240 нм) областях¹⁴.

Для сохранения конформации адсорбированных биополимеров необходимо добавлять исследуемое вещество после ОВЦ, а также строго соблюдать условия восстановления солей серебра избытком восстанавливающего агента при получении гидрозолей для устранения ионного серебра, влияющего на структуру изучаемых молекул (см. раздел «Экспериментальные методики получения спектров ГКР»).

4.3. Светочувствительные мембранные белки и пигмент-белковые комплексы

Возможности спектроскопии ГКР при изучении светочувствительных мембранных белков и пигмент-белковых комплексов лучше всего иллюстрируются на примере изучения бактериального (БР) и зрительного (Р) родопсинов^{19-21, 35, 119}.

Бактериородопсин из пурпурных мембран *Halobacterium halobium* — уникальный светочувствительный белок, осуществляющий трансмембранный перенос протонов¹⁶⁵. Для понимания молекулярного механизма функционирования БР необходимо определить топографию его хромофорного центра (положение остатка ретиналя). Метод спектроскопии ГКР был использован для установления расположения ретиналя относительно поверхности мембраны^{19, 20}. С этой целью были получены спектры ГКР пурпурных мембран, теней клеток *Halobacterium halobium*, замкнутых цитоплазматической поверхностью внутрь, и аналогов БР, адсорбированных на серебряных гидрозолях и электродах.

Пурпурные мембраны при адсорбции на электродах при потенциале нулевого заряда серебра ориентируются внутренней стороной к электроду²⁰. При этом полосы хромофора в спектре ГКР отсутствуют. Широкая бесструктурная полоса с максимумом $\approx 1600 \text{ см}^{-1}$ связана с графитизацией на поверхности металла углекислого газа, растворенного в электролите (см. раздел 4.1)¹⁶³. В то же время в спектрах ГКР теней клеток, имеющих возможность вступать в контакт с поверхностью металла только наружной стороной,

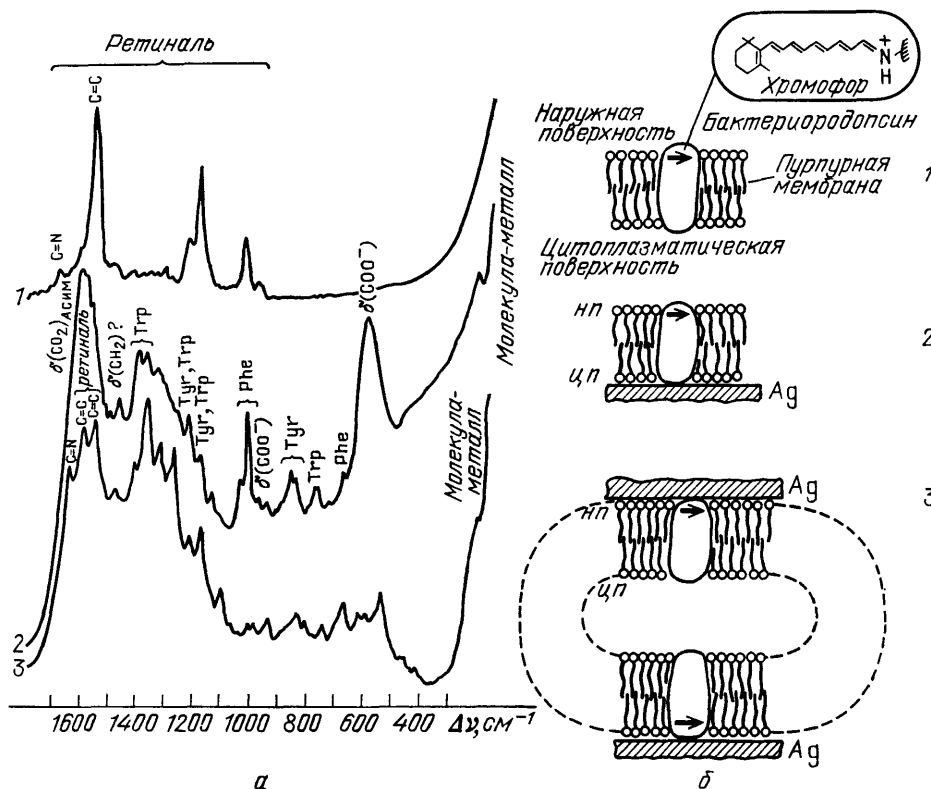


Рис. 10. *a* — Спектры РКР водной суспензии пурпурных мембран (1) и спектры ГКР пурпурных мембран, адсорбированных на серебряных электродах (2), и адсорбированных теней клеток *Halobacterium halobium* (3). *б* — Пурпурная мембрана (1), адсорбированная пурпурная мембрана (2) и адсорбированная тень клетки *Halobacterium halobium*, замкнутая цитоплазматической стороной внутрь (3)²⁰

на фоне бесструктурной полосы углерода проявляется тонкая структура, связанная с усилением полос колебаний ретиналя (рис. 10). Отсюда следует, что π -электронная система ретиналя сближена с наружной стороной пурпурной мембраны.

При адсорбции на гидрозолье серебра пурпурная мембрана может взаимодействовать с серебром как наружной, так и внутренней стороной²⁰ (рис. 11). Наличие в спектре полос колебаний хромофора подтверждает вывод о сближенности ретиналя с поверхностью мембраны. Отметим, что сходство спектров РКР и ГКР БР в области «отпечатков пальцев» ($1000\text{--}1400 \text{ см}^{-1}$) свидетельствует о том, что при адсорбции белка полиеновая цепь ретиналя сохраняет полностью транс-конфигурацию, характерную для БР в водной суспензии¹⁶⁵.

Для уточнения расстояния от ретиналя до наружной поверхности пурпурной мембраны были получены спектры ГКР аналогов БР, реконструированных из бактериоопсина, и аналогов ретиналя с различной длиной полиеновой цепи, которые занимают в белке тот же участок, что и остаток полностью транс-ретиналя в молекуле БР. Оказалось, что для наиболее коротких анало-

гов (с одной и двумя двойными связями) сигнал ГКР практически не детектируется, тогда как при увеличении числа двойных связей в полиеновой цепи аналога появляется интенсивное ГКР. Это связано с удалением π -электронных систем от поверхности металла при укорачивании аналога, а не с ослаблением π -электронной системы, поскольку для свободных аналогов ретиналя, адсорбированных на гидрозоле, интенсивный сигнал ГКР наблюдается и для

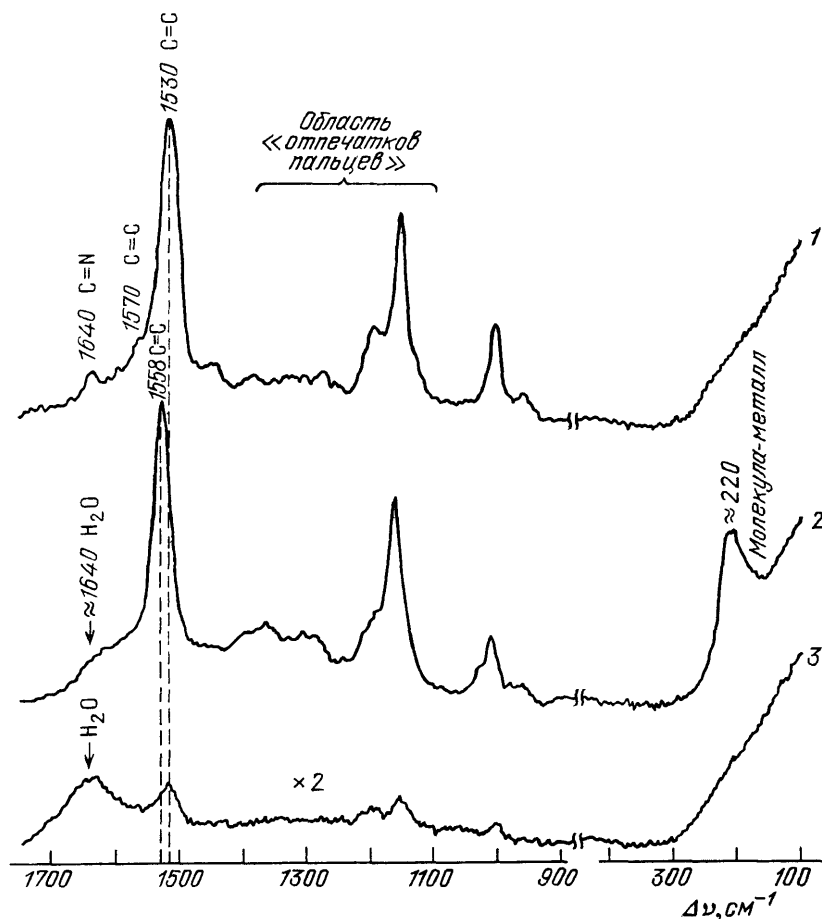


Рис. 11. Спектры РКР водной суспензии пурпурных мембран (концентрация белка 10^{-5} М) (1), ГКР пурпурных мембран, адсорбированных на серебряном гидрозоле при концентрации 10^{-7} М (2) и РКР водной суспензии мембран при концентрации 10^{-7} М (3) ²⁰.
В спектре 3 чувствительность увеличена в 2 раза

самых коротких аналогов. Мы полагаем, что для аналогов с тремя и четырьмя двойными связями часть π -электронной системы попадает в слой поверхностного усиления КР толщиной 0,5 нм, тогда как для наиболее коротких аналогов, встроенных в БР, этого не происходит. Полученные результаты позволили определить расстояние от ретиналя до поверхности мембраны ²⁰.

Тот факт, что механизм усиления КР при адсорбции мембранных белков на гидрозолях в используемых нами экспериментальных условиях имеет короткодействующий характер, был использован для определения топографии хромофора в другом светочувствительном мембранном белке—зрительном родопсине быка ^{21, 119}. Этот пигмент локализован в мембранах фоторецепторных дисков наружных сегментов палочек сетчатки глаза и играет ключевую роль в процессе зрения ¹⁶⁵. С помощью спектроскопии ГКР было показано, что остаток ретиналя в Р находится на расстоянии 0,5—1 нм от цитоплазматической поверхности мембраны, причем при адсорбции на гидрозолу серебра

хромофор сохраняет 11-цис-конфигурацию полиеновой цепи, характерную для нативного пигмента. Кроме того, при исследовании фоторецепторных дисков, замкнутых цитоплазматической поверхностью внутрь, и дисков, в которых цитоплазматическая поверхность мембраны была экранирована от металла моноклональными антителами (рис. 12), был подтвержден вывод о том, что в использованных экспериментальных условиях механизм усиления КР при адсорбции на гидрозоле серебра является короткодействующим.

Наиболее простым способом получения спектров ГКР за счет дальнедействующего (вероятно, плазменного) механизма усиления является использование «гладкого» серебряного электрода³⁵. Под «гладким» электродом понимают электрод, не разрыхленный анодной поляризацией для увеличения концентрации точечных дефектов поверхности, играющих роль адсорбционных центров. В этом случае на поверхности электрода присутствуют преимущественно макродефекты размером до 100 нм. В такой системе за счет возбуждения поверхностной электромагнитной волны может происходить усиление сигнала КР адсорбированных молекул³ (см. раздел 3.3). Величина этого усиления, конечно, не может быть очень большой в силу нерегулярности макродефектов на «гладких» электродах⁷.

Отношение сигнала к шуму в спектре ГКР БР на «гладком» электроде ~ в 50 раз выше, чем в спектре РКР водной суспензии пурпурных мембран при той же концентрации белка (рис. 13, а). Варьирование потенциала на электроде приводит к заметным изменениям спектра. Как при увеличении, так и при уменьшении электродного потенциала относительно точки нулевого заряда серебра увеличивается относительная интегральная интенсивность полосы валентного колебания $C = C$ с максимумом $\approx 1505 \text{ см}^{-1}$, отвечающей кинетическому интермедиату фотоцикла БР с максимумом поглощения 610 нм (рис. 13, б). По-видимому, существует динамическое равновесие между адсорбированными и неадсорбированными мембранами, причем при переходе через потенциал нулевого заряда серебра происходит переориентация пурпурных мембран вблизи поверхности «гладкого» электрода.

БР и Р после поглощения квантов света претерпевают фотохимические превращения, связанные с последовательными изменениями электронно-конформационного состояния хромофора и его белкового окружения. В БР подобные переходы имеют циклический характер (фотоцикл БР), тогда как в Р вызывают процесс фотолиза ретиналя¹⁶⁵. Поскольку адсорбция на гидрозол серебра связана с хемосорбцией на точечных дефектах и взаимодействием π -электронной системы ретиналя с металлом в пределах двойного электрического слоя²⁰, возникает вопрос о том, каким образом это влияет на характеристики фотохимических превращений пигментов. Оказалось, что молекулы Р, адсорбированные на гидрозол серебра, не подвергаются фотолизу¹¹⁹. Аналогичный результат был получен и для БР на гидрозол, тогда как для БР, адсорбированного на «гладком» электроде при потенциале нулевого

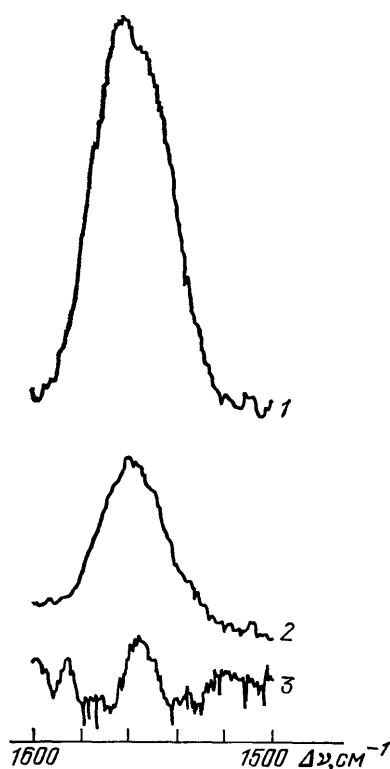


Рис. 12. Спектры ГКР фоторецепторных дисков (1) и комплексов фоторецепторный диск — моноклональное антитело к С-концу молекулы родопсина (2, 3)¹¹⁹. Отношение родопсин/антитело 1/1 для 3 и 5/1 для 2

заряда серебра, все характеристики фотоцикла сохраняются³⁵. Адсорбция на гидрозоле и разрыхленных серебряных электродах сопровождается образованием химических связей металл — адсорбат и вызывает существенное перераспределение электронной плотности в хромофоре и группах его белкового окружения¹⁹. Вследствие этого тонкие электронно-конформационные перестройки хромофорных центров становятся невозможны.

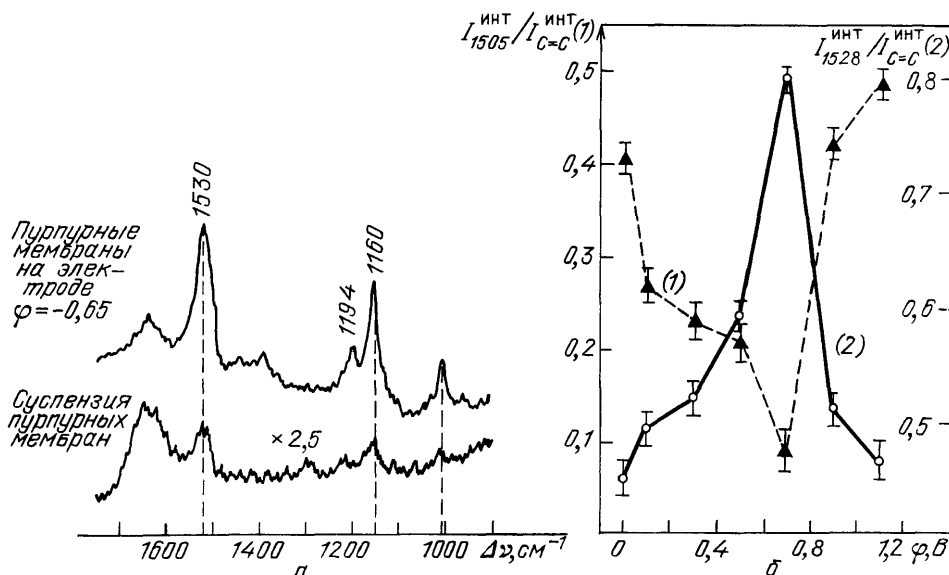


Рис. 13. *a* — Спектры РКР суспензии пурпурных мембран и ГКР пурпурных мембран, адсорбированных на «гладком» серебряном электроде при потенциале нулевого заряда серебра; в нижнем спектре чувствительность увеличена в 2,5 раза. *б* — Зависимость относительных интегральных интенсивностей полос с максимумами 1505 и 1528 см⁻¹ в спектрах ГКР пурпурных мембран на «гладком» электроде от электродного потенциала³⁵

Обнаруженный эффект обеспечивает возможность останавливать фотохимические процессы на отдельных стадиях и, следовательно, изучать промежуточные продукты светоиндуцированных превращений. Особенно перспективным этот подход представляется для зрительных пигментов, в которых под действием света происходят фотохимические изменения, связанные с утратой белком его функциональной активности.

Возможность использования спектроскопии ГКР для решения еще одного исключительно важного класса задач, связанного с проблемами фотосинтеза, была продемонстрирована в работах Коттон и др.^{17, 24}. Фотореакционные центры бактерий содержат, кроме белка, различные пигменты (бактериохлорофиллы, бактериофеофитины, хиноны), которые дают спектры РКР¹⁶⁶. Разделить колебания, отвечающие индивидуальным пигментам, при анализе спектров РКР фотореакционных центров представляется невозможным^{17, 166}. В то же время оказалось, что при адсорбции фотореакционных центров на поверхности серебряных электродов и возбуждении различными длинами волн при определенных потенциалах на электроде получают спектры, характерные для индивидуальных пигментов (рис. 14). Таким образом, ГКР позволяет изучать отдельные хромофоры в составе сложных надмолекулярных биологических структур. При этом для интерпретации спектров ГКР, а также для определения соотношения различных типов хромофоров в составе фотореакционных центров можно использовать спектры свободных пигментов. Так, Коттон и др.²⁴ удалось регистрировать спектры ГКР хлорофилла-а, бактериохлорофилла-а и бактериофеофитина, адсорбированных в виде монослоев на серебряных островковых пленках.

Необходимо отметить, что изучение пигментов, входящих в состав фотореакционных центров, с помощью спектроскопии КР бывает, как правило, сильно затруднено собственной флуоресценцией изучаемых соединений¹⁷. В то же время оказалось, что адсорбция на поверхности серебра вызывает сильное тушение флуоресценции, что позволяет регистрировать спектры ГКР при концентрациях пигментов до 10^{-7} М. Помимо пигментов фотосинтеза, этот факт был использован при изучении ряда флавинов и флавопротеидов, адсорбированных на серебряных электродах²⁶ и гидрозолях серебра^{50, 134, 135}.

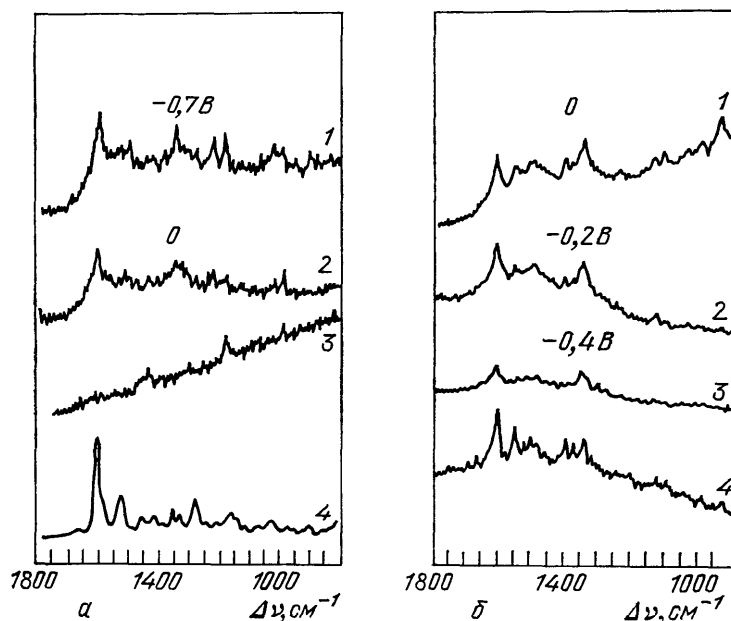


Рис. 14. *a* — Спектры ГКР реакционных центров бактерий *Rhodospseudomonas sphaeroides* в зависимости от потенциала на серебряном электроде; 1: $-0,7$ В; 2 — 0 В; 3 — буфер; 4 — бактериохлорофилл, растворенный в CH_2Cl_2 с соответствующим количеством пиридина для образования комплекса бактериохлорофилл:пиридин; $\lambda_{\text{возб}} = 457,9$ нм. *б* — Спектры ГКР реакционных центров бактерий *Rhodospseudomonas sphaeroides* в зависимости от потенциала на серебряном электроде; 1: 0 В; 2: $-0,2$ В; 3: $-0,4$ В; 4 — бактериофеофетин в CH_2Cl_2 ; $\lambda_{\text{возб}} = 530,9$ нм¹⁷

В результате этих исследований были получены новые данные о структуре флавинов и комплексов золь — флавопротеид^{26, 50, 134}, а также о механизме взаимодействия ДНК с профлавином — акридиновым красителем, обладающим сильным мутагенным действием¹³⁵.

Среди биологических хромофоров и хромопротеидов, исследованных с помощью спектроскопии ГКР, важное место занимают порфины, их производные (порфирины), а также порфирин — содержащие белки. Соединения такого типа играют ключевую роль в окислительно-восстановительных реакциях в клетке (дыхание, фотосинтез)¹⁶⁷. Спектры ГКР свободных порфинов и порфиринов, а также продуктов их распада (желчных пигментов) удалось получить на поликристаллических электродах, гидрозолях и в слоистых структурах Ag/CaF_2 ^{18, 61-63, 120-126, 128}. Оказалось, что адсорбция тетрафенил-порфина на поверхности серебряных электродов сильно зависит от электродного потенциала и ионного состояния SO_3^- - и COO^- - групп, связанных с порфириновым остовом. В зависимости от потенциала наблюдали диссоциацию или агрегацию мономеров, входящих в состав порфина, а также образование комплекса хромофора с атомами серебра. При адсорбции порфириновых хромофоров в слоистых структурах с помощью спектроскопии ГКР наблюдали реакции обмена между атомами Ni порфиринов и атомами серебра⁶¹⁻⁶³.

Отметим, что в этом случае усиливаются колебания всех групп хромофора. Это связано, видимо, с реализацией электромагнитного механизма усиления.

Металлопорфирины и гем-содержащие белки (миоглобин, гемоглобин, цитохромы c, cd_1, b_5) были изучены в работах ^{15, 16, 37, 42, 127, 129-133}. Эти белки содержат порфириновые хромофоры с атомом железа, причем в зависимости от заряда на атоме железа они вступают в различные окислительно-восстановительные биохимические реакции с участием кислорода ¹⁶⁷. При уменьшении (относительно точки нулевого заряда серебра) электродного потенциала в спектрах ГКР протопорфиринов, миоглобина и цитохрома-с наряду с уменьшением интенсивности полос колебаний Fe (III) — Ag регистрируют появление полос, отвечающих колебаниям связей Fe (II) — Ag, что свидетельствует о восстановлении на поверхности электрода Fe (III) в Fe (II). Такой переход наблюдается при потенциале $-0,6$ В, причем обратное окисление железа происходит при потенциале $-0,2$ В ¹²⁷.

Еще одним интересным применением спектроскопии ГКР при изучении порфирин-содержащих белков является возможность регистрации окислительно-восстановительных реакций на поверхности металла с участием цитохромов — важнейших белков дыхательной и фотосинтетической систем. Коттон и др. ³⁶ и Танигуси и др. ³⁷ показали, что при адсорбции этих белков на серебряных электродах в присутствии пиридина и бипиридина ускоряется перенос электрона между электродом и белком. Существенно, что при адсорбции молекула цитохрома сохраняет конформацию, характерную для нативного состояния ¹⁵.

Возможность избирательного изменения функционального состояния белков, как и описанный ранее эффект влияния потенциала на параметры фотохимических превращений БР и Р, открывает новую область применения ГКР к изучению структурно-функциональных особенностей биополимеров.

4.4. ДНК и ее компоненты

Спектры ГКР нативной и денатурированной ДНК, комплексов ДНК с платиной, модифицированной ДНК и ее компонентов были детально изучены в работах ^{9, 10, 31, 51, 84, 85, 117, 118}. Оказалось, что для ДНК, полиди- и тринуклеотидов отчетливо проявляется короткодействие механизма усиления КР при адсорбции на серебряных электродах и гидрозолях. Так, при адсорбции полиаденина на гидрозоле серебра в спектре ГКР не проявляются полосы, характерные для аденина, который, согласно данным рентгеноструктурного анализа, расположен на расстоянии около 0,5 нм от поверхности

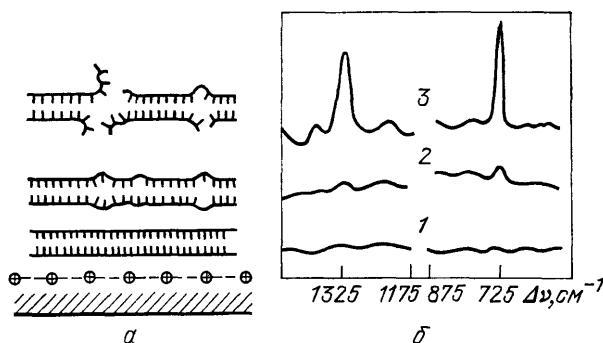


Рис. 15. Схема образования разрывов в двухцепочечной структуре ДНК при γ -облучении с помощью изотопа Co^{60} (а) и спектра ГКР (б) при дозах 0 крад (1: нативная ДНК), 10 крад (2) и 100 крад (3) ⁸⁴.

Соединения адсорбированы на серебряном электроде при потенциале $-0,1$ В

молекулы ¹⁶⁷. После γ -облучения полиаденина возникают разрывы полинуклеотидной цепи, вследствие чего аденин получает возможность вступать в непосредственный контакт с поверхностью металла. При этом возникает отчетливый сигнал в спектре ГКР, который усиливается с увеличением дозы и, следовательно, с увеличением количества разрывов (рис. 15) ⁸⁴.

Нативная ДНК дает в спектре ГКР 30–40 полос с частотами, характерными для аденина, гуанина, цитозина и тимина — нуклеотидных оснований, входящих в состав ДНК, а также для групп сахаро-фосфатного остова молекулы⁹. Оказалось, что спектроскопия ГКР является высокочувствительным методом для регистрации тонких конформационных изменений ДНК, вызванных действием ионизирующих излучений⁸⁴ (даже при такой низкой дозе, как 1 крад, можно детектировать дестабилизацию двойной спирали ДНК), мутагенных факторов¹³⁵, а также тепловой денатурации молекулы¹⁴⁸.

Для примера на рис. 16 приведены спектры ГКР ДНК до и после тепловой денатурации¹⁴⁸. Денатурация ДНК, вызывающая разрыхление двухцепочечной структуры молекулы, приводит к возникновению в спектре ГКР интенсивных сигналов, связанных с колебаниями остатков нуклеотидных оснований.

С помощью спектроскопии ГКР был проведен анализ влияния мутагенных факторов (метилирование нуклеотидных оснований, взаимодействие с красителями) на структуру ДНК^{135, 144}. Коглин и др.¹⁴⁴ регистрировали в спектре ГКР метилированной ДНК полосы, отвечающие колебаниям метилгуанина. Кроме того, при сравнении относительных интенсивностей полос нативной и модифицированной ДНК был сделан вывод о том, что метилирование нуклеотидных оснований приводит к структурным изменениям в их микроокружении.

Поскольку при адсорбции на разрыхленных серебряных электродах и гидрозолях увеличение сечения КР наблюдается только для групп атомов, удаленных на расстояние не более 0,5 нм от поверхности металла, метод спектроскопии ГКР предоставляет уникальную возможность исследования расположения хромофорных групп как в нативной ДНК, так и при ее взаимодействии с другими хромофорами. Примером служат работы по изучению связывания акридиновых красителей (сильных мутагенов)¹³⁵, а также соединений платины: $\text{cis-Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2$ и $[\text{Pt}(\text{диен})\text{Cl}]\text{Cl}$ ¹⁴⁹. Первое из указанных соединений платины обладает высоким противоопухолевым действием, в то время как второе неактивно. При связывании ДНК с $\text{cis-Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2$ спектры ГКР комплекса и свободной ДНК не отличаются друг от друга, в то время как при адсорбции на серебре комплекса $[\text{Pt}(\text{диен})\text{Cl}]\text{Cl}$ — ДНК в спектре ГКР проявляются полосы колебаний, характерных для соединения платины. Очевидно, координационное соединение платины в первом случае интеркалирует внутрь двухцепочечной молекулы ДНК, а во втором — взаимодействует с поверхностными группами. Весьма вероятно, что такой подход окажется весьма перспективным при изучении молекулярных механизмов действия мутагенов, лекарственных веществ и других агентов, специфичных к ДНК.

Особенностью метода спектроскопии ГКР является низкий коэффициент усиления сечения КР воды, что позволяет регистрировать в спектре ГКР адсор-

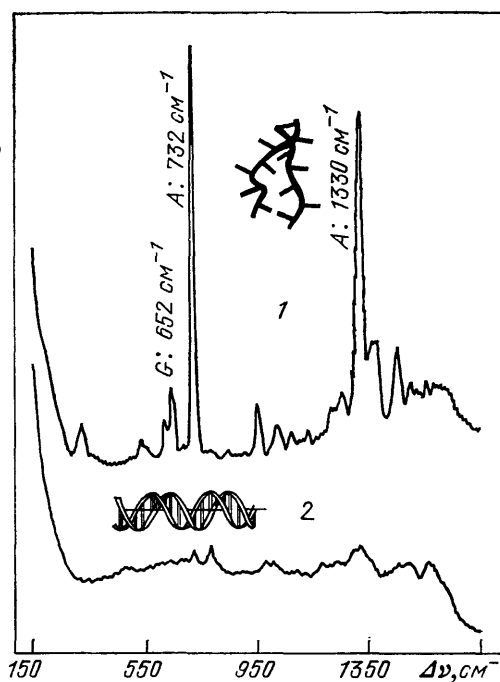


Рис. 16. Спектры ГКР ДНК, подвергнутой тепловой денатурации (1), и нативной ДНК (2)¹⁴⁸.

Соединения адсорбированы на серебряных электродах при потенциале нулевого заряда серебра. А и G — аденин и гуанин соответственно

бата полосы колебаний С — Н и С — D в области $2800\text{--}3200\text{ см}^{-1}$. В спектре КР эта область перекрывается интенсивной полосой О — Н валентных колебаний воды. Наблюдая за полосами колебаний С — Н и С — D, с помощью спектроскопии ГКР можно изучать процесс дейтерообмена в биополимерах, получая информацию о топографии и лабильности отдельных функциональных групп. В работе¹³⁷ исследовали дейтерообмен в 5'-АМФ и гуанине, адсорбированных на серебряных электродах. Оказалось, что полосы колебаний связей

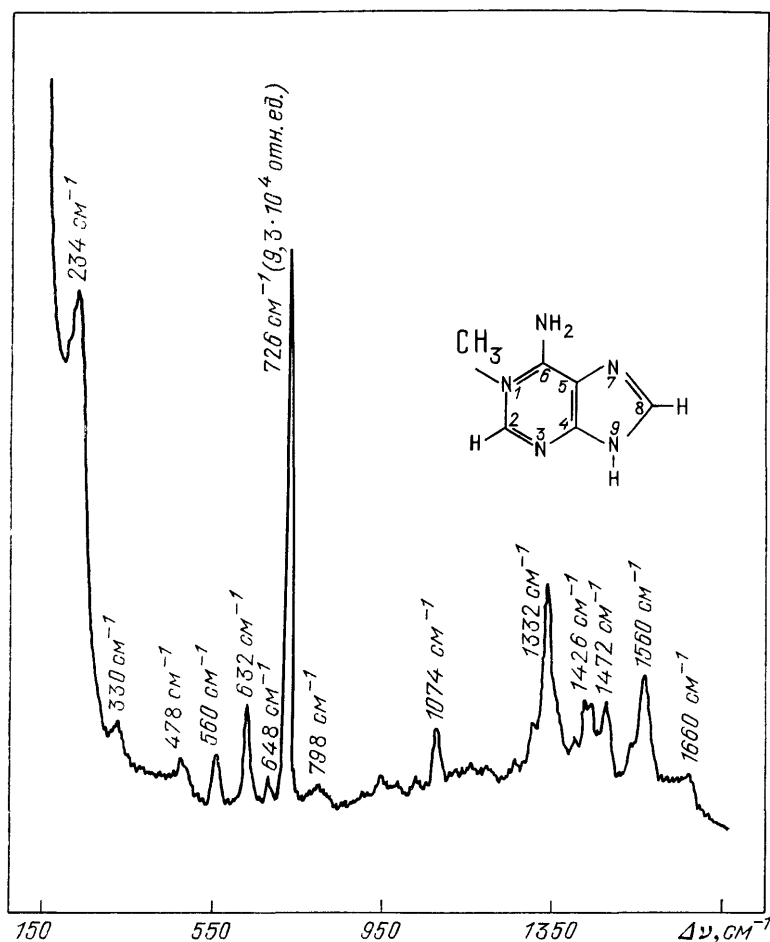


Рис. 17. Идентификация пятен на хроматограмме с помощью спектроскопии ГКР. Спектр ГКР метиладенаина. 30 нг вещества в пятне. (Э. Коглин, данные в печати)

С—Н и С—D отчетливо проявляются в спектрах ГКР лишь после проведения ОВЦ. При этом интенсивность полос С—Н и С—D существенно превосходила интенсивность полосы воды.

Недавно²⁸ удалось получить спектры ГКР хромосом, адсорбированных на серебряных электродах. Если в спектрах КР хромосом проявляются полосы, характерные как для ДНК, так и для белка, то преимущественное усиление при адсорбции претерпевают полосы, отвечающие нуклеотидным основаниям, входящим в состав ДНК хромосомы. Таким образом, с помощью спектроскопии ГКР можно проводить анализ структурных изменений хромосом, связанных с наследственными заболеваниями. Кроме того, существует возможность изучения топографии поверхности хромосом и выяснения природы групп, участвующих в связывании хромосомы с мембраной ядра в процессе деления клетки.

Исключительно интересные аналитические приложения ГКР к анализу производных нуклеотидных оснований были недавно продемонстрированы Коглином и др.^{9, 22}. Как известно, получение индивидуальных химически чистых соединений с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии является широко применяемым методом при работе с биомолекулами. Оказалось, что после обработки гидрозолем серебра силикагелевых пластинок с отдельными пятнами (диаметром 2—4 мм), соответствующими индивидуальным типам нуклеотидных оснований или им производным, возникает интенсивное ГКР, позволяющее охарактеризовать разделенные соединения. При этом удалось детектировать биомолекулы, находящиеся в количестве до 0,12 нг на пятно^{9, 22}. Наиболее интенсивные спектры ГКР получены для количеств около 30 нг на пятно (рис. 17).

Наибольший коэффициент усиления КР для биологически важных соединений был получен при адсорбции бензойной кислоты на серебряных поверхностях с искусственно созданными регулярными неоднородностями²³. Недавно ван Дайн и др.¹⁶⁸ предложили использовать в аналитических приложениях метод спектроскопии ГКР с пространственным разрешением. В предварительных экспериментах, проведенных с помощью этого метода, получили сигнал ГКР пиридина, адсорбированного на серебряном электроде в концентрации до 10^{-18} М. Использование подобных методик, несомненно, найдет широкое применение в аналитических экспресс-анализах биологических соединений.

5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ. ВОЗМОЖНОСТИ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ МЕТОДА СПЕКТРОСКОПИИ ГИГАНТСКОГО КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ

В заключение отметим, что на основании рассмотренных в настоящем обзоре работ нам представляется очевидной возможность широкого использования спектроскопии ГКР для решения весьма разнообразных биологических проблем. Получение спектров ГКР следовых количеств биомолекул (в некоторых случаях при концентрациях до 10^{-18} М) позволяет использовать этот метод в аналитических приложениях. Экспериментальные методики, в которых удастся избирательно реализовывать дальнедействующую («гладкие» серебряные электроды, островковые пленки, поверхности с регулярными макродефектами) и короткодействующую (неагрегированные гидрозоли серебра, электроды, обработанные с помощью ОВЦ) компоненты механизма ГКР, позволяют снижать предел регистрации спектров КР и изучать топографию макромолекул соответственно. Обнаруженный в экспериментах по ГКР эффект тушения люминесценции биологических хромофоров при адсорбции на поверхности серебра сделал возможным получение спектров соединений, собственная люминесценция которых существенно препятствовала этому. Функциональное состояние молекул, адсорбированных на серебряных электродах, можно изменять путем варьирования электродного потенциала, причем такое изменение является, как правило, достаточно «мягким», не меняющим конформационное состояние макромолекулы как целого. Кроме того, использование метода спектроскопии ГКР представляется актуальным в биотехнологии и медицине, где требуется проведение большого числа анализов биологических соединений. Указанный метод, помимо высокой чувствительности, обладает сравнительной простотой, так как не требует создания специальной дорогостоящей аппаратуры — для получения спектров ГКР применяют стандартные спектрометры комбинационного рассеяния.

В настоящее время спектроскопия ГКР биомолекул претерпевает очень быстрое развитие. Основное направление исследований связано с поиском новых, наиболее удобных систем, в которых преимущества этого метода (высокий коэффициент усиления сигнала КР, сохранение нативной конформации молекул при адсорбции) были бы реализованы наиболее полно. Очевидными преимуществами в этом смысле обладает поверхность серебра с предварительно нанесенными регулярными макродефектами. Необходимо

отметить также перспективность методики возбуждения КР соединений, адсорбированных на поверхности металла, пикосекундными лазерными импульсами. Этот подход дает возможность получать спектры КР от таких поверхностей, которые нельзя было бы считать пригодными для получения эффекта усиления КР⁷. Широкое распространение в спектроскопии ГКР приобретают системы многоканальной детекции спектров, использование микроскопов и систем пространственного разрешения, а также лазеров с обширным диапазоном перестраиваемых частот. Все это позволяет надеяться на то, что изложенные в настоящем обзоре данные являются лишь первым шагом и применением эффекта ГКР к изучению биологически важных молекул.

Авторы искренне благодарны В. Ф. Быстрову за поддержку при выполнении этой работы, а также д-ру Э. Коглину (Институт прикладной физической химии, Юлих, ФРГ) и проф. Т. Дж. Спиро (Принстонский университет, США) за предоставление материалов их работ до опубликования.

Институт биоорганической химии
им. М. М. Шемякина АН СССР

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Van Duyne R. P.//Chemical and Biological Applications of Lasers/Ed. C. B. Moore.— New York; San Francisco: Academic Press, 1979.— V. 4. Ch. 5.
2. Otto A.//Appl. Surf. Sci. 1980. V. 6. P. 309.
3. Емельянов В. И., Коротеев Н. И.//УФН. 1981. Т. 135. С. 345.
4. Otto A.//Light Scattering in Solids IV//Eds M. Cardona, G. Guntherodt.— Berlin; Heidelberg; New York: Springer-Verlag, 1983.— P. 289.
5. Маринюк В. В., Лазоренко-Маневич Р. М., Колотыркин Я. М.//Успехи физической химии/Под ред. Я. М. Колотыркина.— М.: Мир, 1982.— Гл. 1.
6. Moskovits M.//Rev. Mod. Phys. 1985. V. 53. P. 783.
7. Гигантское комбинационное рассеяние/Под ред. Р. Ченга, Т. Фуртака.— М.: Мир, 1984.
8. Rockrand I.//Surface-Enhanced Raman Vibrational Studies at Solid/Gas Interfaces.— Berlin; Heidelberg; New York; Tokyo: Springer-Verlag, 1984.
9. Koglin E.//Topics in Current Chemistry. 1986. V. 13. P. 1.
10. Koglin E., Squaris J. M., Valenta P.//Proc. of the 14th European Conference on Molecular Spectroscopy.— Frankfurt/M, 1979.— P. 122.
11. Nabiev I. R., Trakhanov S. D., Surin A. M., Efremov E. S., Pletnev V. Z., Vorotyntseva T. I.//Proc. of the III USSR-FRG Symposium on Peptides and Proteins Chemistry.— Mahachkala, 1980.— P. 35.
12. Набиев И. Р., Траханов С. Д., Ефремов Е. С., Маринюк В. В., Лазоренко-Маневич Р. М.//Биоорганической химии. 1981. Т. 7. С. 941.
13. Набиев И. Р., Ефремов Е. С.//Материалы III советско-шведского симпозиума по физико-химической биологии.— Тбилиси, 1981.— С. 141.
14. Nabiev I. R., Savchenko V. A., Efremov E. S.//J. Raman Spectr. 1983. V. 4. P. 375.
15. Cotton T. M., Schultz S. G., Van Duyne R. P.//J. Am. Chem. Soc. 1980. V. 102. P. 7960.
16. Cotton T. M., Timkovich R., Cork M. S.//FEBS Lett. 1981. V. 133. P. 39.
17. Cotton T. M., van Duyne R. P.//Ibidem. 1982. V. 147. P. 81.
18. Cotton T. M., Schultz S. G., van Duyne R. P.//J. Am. Chem. Soc. 1982. V. 104. P. 6528.
19. Nabiev I. R., Efremov R. G., Chumanov G. D.//J. Biosciences. 1985. V. 8. P. 363.
20. Набиев И. Р., Ефремов Р. Г., Чуманов Г. Д., Курятов А. Б.//Биол. мембраны. 1985. Т. 2. С. 1003.
21. Nabiev I. R., Efremov R. G., Chumanov G. D., Abdulaev N. G.//Proc. of the I European Conference on Spectroscopy of Biological Molecules/Eds. A. J. Alix, L. Bernard, M. Manfait.— Reims: Wiley, 1985.— P. 348.
22. Squaris J. M., Koglin E.//Analit. Chemie. 1985. T. 321. P. 758.
23. Vodinh T., Hiroamoto M. Y. K., Begun G. M., Moody R. L.//Analyt. Chem. 1984. V. 56. P. 1667.
24. Uphaus R. A., Cotton T. M., Mobius D.//Thin Sol. Films. 1985. V. 132. P. 173.

25. Kerker M., Siiman O., Bumm L. A., Wang D. S.//Appl. Opt. 1980. V. 19. P. 3253.
26. Cotton T. M., Holt R.//Spectroscopy of Biological Molecules/Eds A. J. P. Alix, L. Bernard, M. Manfait.— Chichester; New York: Wiley, 1985.— P. 38.
27. Кэри П. Применение спектроскопии КР и РКР в биохимии.— М.: Мир, 1985.
28. De Mul F. F. M., Otto C., Mud J., Greve J.//International Conference on Raman Spectroscopy.— Tokyo, 1984.— P. 29.
29. Chang R. K.//Surf. Sci. 1986. V. 158. P. 405.
30. Jeanmaire D. L., van Duynе R. P.//J. Electroanalyt. Chem. 1977. V. 84. P. 1.
31. Koglin E., Sequaris J. M., Valenta P.//J. Mol. Struct. 1980. V. 60. P. 421.
32. Otto C., van Welie A., de Jong E., de Mul F. F. M., Mud J., Greve J.//J. Phys. Ser. E. 1984. V. 17. P. 624.
33. Чуманов Г. Д. Автореферат диссертации. . канд. физ.-мат. наук— М.: МГУ, 1987.
34. Brandt E. S.//Analyt. Chem. 1985. V. 57. P. 1276.
35. Набиев И. Р., Ефремов Р. Г., Чуманов Г. Д.//Биофизика, 1986. Т. 31. С. 724.
36. Cotton T. M., Vavra M.//Chem. Phys. Lett. 1984. V. 106. P. 491.
37. Taniguchi I., Iseki M., Yamaguchi H., Yasukouchi K.//J. Electroanalyt. Chem. 1985. V. 186. P. 299.
38. Chang R. K., Laube B. L.//CRC Crit. Rev. Sol. State and Mater. Sci. 1984. V. 12. P. 1.
39. Devine T. M., Furtak T. E., Macomber S. H.//J. Electroanalyt. Chem. 1984. V. L64. P. 299.
40. Shelnutt J. A., Ginley D. S.//J. Phys. Chem. 1985. V. 89. P. 5473.
41. Bovill A. J., McConnell A. A., Nimmo J. A., Smith W. E.//Surf. Sci. 1985. V. 158. P. 333.
42. Hildebrandt P., Stockburger M.//²⁶— P. 25.
43. Baltruschat H., Rauch E., Heitbaum J.//J. Electroanalyt. Chem. 1985. V. 194. P. 1098.
44. Turkevich J., Stevenson P. C., Hillier J.//Disc. Farad. Soc. 1951. V. 11. P. 58.
45. Simman O., Bumm L. A., Callaghan R., Blatchford C. G., Kerker M.//J. Phys. Chem. 1983. V. 78. P. 101.
46. Creighton J. A., Blatchford C. G., Albrecht M. J.//J. Chem. Soc. Farad. Trans. II. 1979. V. 75. P. 790.
47. Frens G.//Nature. Phys. Sci. 1973. V. 241. P. 20.
48. Fabrikanos A., Athanassion S., Lieser K. H.//Zs. Naturforsch. 1963. Bd 18b. P. 612.
49. Picquart M., Lacrampe G., Jaffrain M.//²⁶— P. 190.
50. Lee N. S., Sheng R. S., Morris M. D., Schopfer L. M.//J. Am. Chem. Soc. 1986. V. 108. P. 6179.
51. Kneipp K., Flemming J.//J. Mol. Struct. 1986. V. 145. P. 173.
52. Sheng R. S., Zhu L., Morris M. D.//Analyt. Chem. 1986. V. 58. P. 1116.
53. Blatchford C. G., Siiman O., Kerker M.//J. Phys. Chem. 1983. V. 87. P. 2503.
54. Wetzel H., Gerischer H.//Chem. Phys. Lett. 1980. V. 76. P. 460.
55. Tran C. D.//J. Chromatography. 1984. V. 292. P. 432.
56. Dornhaus R., Benner R. E., Chang R. K.//Surf. Sci. 1980. V. 101. P. 363.
57. Chen C. Y., Davoli I., Ritchie G., Burstein E.//Ibidem. P. 363.
58. Dornhaus R.//Vibrations at Surfaces/Eds. R. Caudano, J. M. Gilles, A. A. Lucas.— New York; London: Plenum Press, 1982.— P. 445.
59. Tsang J. C., Kirtley J.//Sol. State Commun. 1979. V. 30. P. 617.
60. Tsang J. C., Avouris Ph., Kirtley J. R.//J. Electron. Spectr. 1983. V. 29. P. 343.
61. Kobayashi Y., Itoh K.//J. Phys. Chem. 1985. V. 89. P. 5174.
62. Takenaka A., Takeuchi S., Kobayashi Y., Itoh K.//Surf. Sci. 1985. V. 158. P. 359.
63. Shiratori Y., Serita M., Itoh K.//Chem. Phys. Lett. 1985. V. 118. P. 595.
64. Murray C. A., Allara D. L., Rhinewine M.//Phys. Rev. Lett. 1981. V. 46. P. 57.
65. Vo-Dinh T., Meier M., Wokaun A.//Analyt. Chim. Acta. 1986. V. 181. P. 139.

66. Loo B. H.//J. Phys. Chem. 1983. V. 87. P. 3003.
 67. Pettinger B.//Proc. of the 7th Intern. Conference of Raman Spectroscopy/Ed. M. Murphy.— Amsterdam: North-Holland, 1980.— P. 412.
 68. Lombardi J. R., Birke R. L., Sanchez L. A., Bernardt I., Sun S. C.//Chem. Phys. Lett. 1984. V. 101. P. 240.
 69. Kerker M., Siiman O., Wang D. S.//J. Phys. Chem. 1984. V. 88. P. 3168.
 70. Creighton J. A., Blatchford C. G., Campbell J. R.//J. Chem. Phys. 1982. V. 76. P. 843.
71. Lepp A., Siiman O.//J. Phys. Chem. 1985. V. 89. P. 349.
 72. Pockrand I.//Chem. Phys. Lett. 1982. V. 92. P. 514.
 73. Pockrand I., Billman J., Otto A.//J. Chem. Phys. 1983. V. 78. P. 6384.
 74. Coutaz J. L., Nevieze M., Pic E., Reinisch R.//Phys. Rev. Ser. B. 1985. V. 32. P. 2227.
 75. Knoll W., Philpott M. R., Swalen D. J., Girlando A.//J. Chem. Phys. 1982. V. 77. P. 2254.
 76. Seki H., Philpott M. R.//Ibidem. 1980. V. 73. P. 5376.
 77. Zwemer D. A., Shank S. V., Rowe J. E.//Chem. Phys. Lett. 1980. V. 73. P. 201.
 78. Rowe J. E., Shank S. V., Zwemer D. A., Murrey C. A.//Phys. Rev. Lett. 1980. V. 44. P. 1770.
 79. Eesly C. L.//Phys. Lett. Ser. A. 1981. V. 81. P. 193.
 80. Seki H.//J. Vac. Sci. and Technol. 1980. V. 18. P. 633.
81. Pockrand I., Otto A.//Sol. State Commun. 1980. V. 35. P. 861.
 82. Sanda P. N., Warlaumont J., Demuth J. E., Tsang J. C., Christmann K., Bradley J. A.//Phys. Rev. Lett. 1980. V. 45. P. 1519.
 83. Furtak T. E., Roy D.//Surf. Sci. 1985. V. 158. P. 126.
 84. Koglin E., Sequaris J. M.//J. de Phys. 1983. T. 44. P. 487.
 85. Koglin E., Lewinsky H. H., Sequaris J. M.//Surf. Sci. 1985. V. 158. P. 370.
 86. Applebaum J. A., Haman D. R.//Chemistry and Physics of Solid Surfaces/Ed. S. Y. Tong.— New York: CRC Press, 1977.— P. 137.
 87. Chen W. P., Rithie G., Burstein E.//Phys. Rev. Lett. 1976. V. 37. P. 993.
 88. Kliever K. L.//Phys. Rev. Ser. B. 1976. V. 1. P. 1412.
 89. Стреттон Дж. Теория электромагнетизма.— М.: Гостехиздат, 1948.
 90. Бродский А. М., Дайхин Л. И.//Электрохимия. 1984. Т. 20. С. 1032.
91. Pandey P. K., Schatz G. C.//Chem. Phys. Lett. 1982. V. 88. P. 193.
 92. Агранович В. М., Гинзбург В. Л. Кристаллооптика с учетом пространственной дисперсии и теории экситонов.— М.: Наука, 1979.— С. 117.
 93. Chen Y. J., Chen W. P., Burstein E.//Phys. Rev. Lett. 1976. V. 36. P. 1207.
 94. Girlando A., Philpot M. R., Heitman D., Swalen J. D., Santo R.//J. Chem. Phys. 1980. V. 72. P. 3973.
 95. Jha S. S., Kirtley J. R., Tsang J. C.//Phys. Rev. Ser. B. 1980. V. 22. P. 5187.
 96. Yamashita M., Tsuji M.//J. Phys. Soc. Japan. 1983. V. 52. P. 2462.
 97. Aravind P. K., Hood E., Metiu H.//Surf. Sci. 1984. V. 148. P. 411.
 98. Weber W. H., Fotd G. W.//Opt. Lett. 1981. V. 6. P. 122.
 99. Adrian F. J.//Chem. Phys. Lett. 1981. V. 78. P. 45.
 100. Liao P. F., Wokaun A.//J. Chem. Phys. 1982. V. 76. P. 751.
101. Efrima S.//Chem. Phys. Lett. 1983. V. 102. P. 79.
 102. Борн М., Вольф Э. Основы оптики.— М.: Наука, 1970.
 103. Philpot M. R.//J. Chem. Phys. 1975. V. 62. P. 1812.
 104. Ueba H.//Ibidem. 1980. V. 73. P. 725.
 105. Ueba H., Ishimura S.//Ibidem. 1981. V. 74. P. 3070.
 106. McCall S. L., Plazman P. M.//Phys. Rev. Ser. B. 1980. V. 22. P. 1660.
 107. Pettinger B., Wenning U., Kolb D. M.//Ber. Bunsenges. phys. Chem. 1980. Bd 82. S. 117.
 108. Persson B. N. J.//Chem. Phys. Lett. 1980. V. 45. P. 46.
 109. Otto A., Timpler J., Billman J., Pockrand I.//Phys. Rev. Lett. 1980. V. 45. P. 46.
 110. Otto A., Timpler J., Billman J., Kovac S., Pockrand I.//Surf. Sci. 1980. V. 92. P. L55.
111. Brodsky A. M., Urbakh M. J.//Phys. Stat. Sol. 1976. V. 46. P. 93.
 112. Brodsky A. M., Urbakh M. J.//Ibidem. 1977. V. 83. P. 633.

113. Маринюк В. В., Лазаренко-Маневич Р. М., Колотыркин Я. М.//*Электрохимия*. 1982. Т. 18. С. 307.
114. Billman J., Kovacs S. G., Otto A.//*Surf. Sci.* 1980. V. 92. P. 153.
115. Набпев И. Р., Чуманов Г. Д., Манькин Э. А.//*Изв. вузов. Сер. «Физика»*. 1985. № 3. С. 33.
116. Набпев И. Р., Чуманов Г. Д.//*Биофизика*. 1986. Т. 31. С. 183.
117. Venkatesan S., Erdheim G., Lombardi J. R.//*Surf. Sci.* 1980. V. 101. P. 387.
118. Suh J. S., Moskovits M.//*J. Am. Chem. Soc.* 1986. V. 108. P. 4711.
119. Абдулаев Н. Г., Набпев И. Р., Ефремов Р. Г., Чуманов Г. Д.//*Биол. мембраны*. 1986. Т. 3. С. 26.
120. Koyama T., Yamaga M., Kim M., Itoh K.//*Inorg. Chem.* 1985. V. 2. P. 4258.
121. Macomber S. H., Furtak T. E., Devine T. M.//*Surf. Sci.* 1982. V. 122. P. 556.
122. Itabashi M., Kato K., Itoh K.//*Chem. Phys. Lett.* 1983. V. 97. P. 528.
123. Itabashi M., Masuda T., Itoh K.//*J. Electroanal. Chem.* 1984. V. 165. P. 265.
124. Shoji K., Kobayashi Y., Itoh K.//*Chem. Phys. Lett.* 1983. V. 102. P. 179.
125. Kim M., Tsujino T., Itoh K.//*Ibidem*. 1986. V. 125. P. 364.
126. Lippitsch M. E.//*Ibidem*. 1981. V. 79. P. 224.
127. Sanchez L. A., Spiro T. G.//*J. Phys. Chem.* 1985. V. 89. P. 763.
128. McMahon J. J., Baer S., Melendres C. A.//*Ibidem*. 1986. V. 90. P. 1572.
129. Taniguchi I., Iseki M., Yamaguchi H., Yasukouchi K.//*J. Electroanal. Chem.* 1984. V. 175. P. 341.
130. Smulevich G., Spiro T. G.//*J. Phys. Chem.* 1985. V. 89. P. 5168.
131. Taniguchi I., Yasukouchi K.//²⁸— P. 718.
132. Hildebrandt P., Stockburger M.//*Proc. of the Xth Intern. Conference on Raman Spectroscopy/Eds W. L. Peticolas, B. Hudson.— Eugene: Oregon Univ. printing Dep., 1986.— P. 5.*
133. Pagannone M., Fornari B., Mattei G.//*Ibidem*.— P. 48.
134. Copeland R. A., Fodor S. P. A., Spiro T. G.//*J. Am. Chem. Soc.* 1984. V. 106. P. 3872.
135. Koglin E., Sequaris J. M.//*J. Mol. Struct.* 1986. V. 141. P. 405.
136. Ervin K. M., Koglin E., Sequaris J. M., Valenta P., Nurnberg H. W.//*J. Electroanal. Chem.* 1980. V. 114. P. 179.
137. Koglin E., Sequaris J. M., Valenta P.//*Zs. Naturforsch.* 1981. Bd 36a. S. 809.
138. Koglin E., Sequaris J. M., Valenta P.//*J. Mol. Struct.* 1982. V. 79. P. 185.
139. Koglin E., Sequaris J. M., Fritz J. C., Valenta P.//*Ibidem*. 1984. V. 11. P. 219.
140. Watanabe T., Kawanami O., Katoh H., Honda K.//*Surf. Sci.* 1985. V. 158. P. 341.
141. Brabec V., Niki K.//*Biophys. Chem.* 1985. V. 23. P. 63.
142. Brabec V., Niki K.//*Collect. Czech. Chem. Commun.* 1986. V. 51. P. 167.
143. Otto C., Van Den Tweel T. J. J., de Mul F. F. M., Greve J.//*J. Raman Spectr.* 1986. V. 17. P. 289.
144. Sequaris J. M., Fritz J., Lewinsky H. H., Koglin E.//*J. Colloid and Interf. Sci.* 1985. V. 105. P. 417.
145. Koglin E., Sequaris J. M.//¹³² P. 5.
146. Koglin E., Sequaris J. M.//*J. de Phys.* 1983. T. 10. Colloq. P. 487.
147. Koglin E., Sequaris J. M., Valenta P., Nurnberg H. W.//*Fresenius Zs. anal. Chem.* 1984. Bd 317. S. 112.
148. Sequaris J. M., Koglin E., Malfoy B.//*FEBS Lett.* 1984. V. 173. P. 95.
149. Sequaris J. M., Koglin E., Valenta P., Nurnberg H. W.//*Ber. Bunsenges. phys. Chem.* 1981. Bd 85. S. 512.
150. Taniguchi I., Umekita K., Yasukouchi K.//*J. Electroanal. Chem.* 1986. V. 202. P. 315.
151. Mabuchi M., Takenaka T., Fujiyoshi Y., Uyeda N.//*Surf. Sci.* 1982. V. 119. P. 150.
152. Creighton J. A.//*Springer Ser. Chem. Phys.* 1983. V. 33. P. 55.
153. Weitz D. A., Lin M. Y., Sandroff C. J.//*Surf. Sci.* 1985. V. 158. P. 147.
154. Allen C. S., van Duyn R. P.//*Chem. Phys. Lett.* 1979. V. 63. P. 455.
155. Chen C. Y., Burstein E.//*Phys. Rev. Lett.* 1980. V. 45. P. 1287.
156. Chambers J. A., Buck R. P.//*J. Electroanal. Chem.* 1982. V. 140. P. 173.

157. Seki H. J.//J. Electr. Spectr. 1983. V. 29. P. 413.
158. Shin G. S., Kim J. J.//Surf. Sci. 1985. V. 158. P. 286.
159. Birke R. L., Lombardi J. R., Gersten J. I.//Phys. Rev. Lett. 1979. V. 43. P. 71.
160. Suh J. S., DiLella D. P., Moskovits M.//J. Phys. Chem. 1983. V. 87. P. 1540.
161. Siebert M., Cotton T. M.//FEBS Lett. 1985. V. 182. P. 34.
162. Kerker M.//The Scattering of Light and Other Electromagnetic Radiation.—New York: Academic Press, 1969.
163. Cooney R. P., Mahoney M. R., Howard M. W.//Chem. Phys. Lett. 1980. V. 76. P. 488.
164. Балкин Б. Применение спектроскопии КР в химии.— М.: Мир, 1985.
165. Овчинников Ю. А.//FEBS Lett. 1982. V. 148. P. 179.
166. Lutz M.//Advances in Infrared and Raman Spectroscopy/Eds. R.J.H. Clark, R. E. Hester.— London: Wiley, 1984.— P. 211.
167. Ленинджер Дж. Биохимия.— М.: Мир, 1976.
168. Van Duynе R. P., Haller K. L., Altkorn R. J.//Chem. Phys. Lett. 1986. V. 126. P. 196.