

УДК 543.424; 577.1

## СПЕКТРОСКОПИЯ КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ МОЛЕКУЛ \*

Л. Л. Кёниг

В настоящем обзоре впервые систематизированы данные по спектрам лазерного комбинационного рассеяния (КР) пептидных соединений. Рассмотрена взаимосвязь между особенностями спектров КР и структурой пептидов в твердом состоянии и растворах. Обсуждаются колебательные свойства полипептидов в зависимости от их конформационного состояния. Обзор предназначен для специалистов, занимающихся изучением структуры и конформационным анализом пептидных соединений.

Библиография — 39 наименований.

### ОГЛАВЛЕНИЕ

I. Введение	1109
II. Аминокислоты, иминокислоты и родственные соединения	1111
А. Структура аминокислот в водных растворах	1111
Б. Структура аминокислот в твердом состоянии	1113
В. Идентификация аминокислот	1118
Г. Структура иминокислот в растворе	1118
Д. Спектры комбинационного рассеяния иминокислот в водном растворе	1118
III. Спектры комбинационного рассеяния олигопептидов	1119
А. Спектральные различия, зависящие от длины пептида в твердом состоянии	1119
Б. Структура олигопептидов в твердом состоянии	1124
В. Конформация олигопептидов в водном растворе	1126
IV. Спектры комбинационного рассеяния синтетических полипептидов	1127
А. Колебательная спектроскопия $\alpha$ -спиральной конформации	1127
Б. Колебательная спектроскопия $\beta$ -конформации	1139
В. Колебательная спектроскопия других спиральных форм полипептидов	1151
Г. Колебательная спектроскопия неупорядоченной конформации	1158
Д. Гидратированные формы полипептидов	1161
Е. Спектры комбинационного рассеяния полипептидов в водных растворах	1162
Ж. Структурные изменения при растворении в воде	1163

### I. ВВЕДЕНИЕ

Большинство биологов и биохимиков хорошо знакомы с ИК-спектроскопией, применяемой для изучения структуры и конформации биологических молекул, однако сравнительно немногие из них знакомы со спектроскопией комбинационного рассеяния (КР) — «другой половиной» колебательного спектра. Тем не менее в последние годы прогресс в исследовании биологических молекул методом спектроскопии КР достиг такого состояния, когда биологи и биохимики при решении научных проблем должны принимать во внимание спектроскопию КР.

В ранних работах по спектроскопии КР, использовавших в качестве источников света ртутную дугу, требовались значительные затраты времени на фотографическое детектирование при низком соотношении сигнал — шум. С развитием современных лазерных источников, высококачественные спектры КР получают фотоэлектрическим методом за

\* Macromolecular Reviews, 6, part D, 5a (1972), перев. с англ. В. М. Тульчинского.

минуты. Классическая спектроскопия КР требует значительных количеств исследуемых веществ, тогда как современная спектроскопия КР — минимум. Классические методы получения спектров КР часто приводят к разрушению образца в результате длительных экспозиций и воздействия высоких температур, тогда как современная спектроскопия делает возможным изучение биологических реакций со сравнительно коротким временем полупревращения. Спектроскопия КР с появлением лазера переживает возрождение; и биология, и биохимия находятся среди наук, которые первыми могут извлечь из этого пользу.

Комбинационное рассеяние — это неупругое рассеяние фотонов при взаимодействии лазерного луча и молекулы. При этом основное распределение энергии осуществляется между колебательными уровнями молекулы. Неупруго рассеянные фотоны различаются по энергии от упруго рассеянных фотонов, и это различие характеризует рассеивающую молекулу, являясь, подобно ИК-спектру поглощения, ее характерным «отпечатком пальцев». Действительно, многие частоты, наблюдаемые в ИК-спектре молекулы, могут быть также обнаружены в спектре КР. Экспериментально спектр КР может быть измерен в области примерно от 10 до 400  $\text{см}^{-1}$  с помощью одного прибора. Тем не менее КР- и ИК-спектры отображают два различных физических процесса. Инфракрасное поглощение возникает, когда при колебательном движении происходит изменение постоянного дипольного момента молекулы, тогда как спектр КР возникает при колебательном движении, приводящем к появлению индуцированного дипольного момента, или к изменению поляризуемости молекулы. Полярные химические группировки, обладающие дипольными моментами, обычно сильно поглощают в ИК-спектрах. Неполарные группы в молекулах часто легко поляризуемы, что приводит к появлению КР от этих групп.

Основные применения спектроскопии КР те же, что и в случае ИК-спектроскопии. Спектры КР можно использовать для идентификации индивидуальных веществ, чистых или в смесях, не задаваясь целью установления их строения. Спектроскопия КР может быть применена для доказательства структурных различий между сходными соединениями или изомерами. Можно изучать влияние на спектры КР меж- и внутримолекулярных взаимодействий и наблюдать структурные изменения в молекуле, вызванные изменениями в среде, такими как рН, ионная сила или температура. Наконец спектроскопия КР может быть применена для установления структуры биологических молекул в твердом и жидком состояниях или в растворах.

Спектроскопия КР имеет некоторые преимущества в сравнении с ИК-спектроскопией. Спектры КР можно получить от очень небольших количеств образца, поскольку лазерный луч фокусируется в малом объеме. При этом можно исследовать и вещества, которые трудно превратить в порошок. В спектроскопии КР могут быть использованы стеклянные кюветы, так как собственное КР стекла мало. Образцы для КР не обязательно должны быть прозрачными, так как эффект КР основан на рассеянии, а не на пропускании. При этом размер и форма образца могут быть разнообразными. Образец не обязательно превращать в порошок или пасту.

Жидкая вода мало мешает наблюдению спектров КР, что является основным преимуществом этого метода, по сравнению с ИК-спектроскопией в биологических исследованиях.

Область колебательного спектра 2000—200  $\text{см}^{-1}$  вполне доступна для исследования в присутствии как  $\text{D}_2\text{O}$ , так и  $\text{H}_2\text{O}$ . Это позволяет изучать изомерию, водородные связи, спаривание оснований и таутомерные рав-

новесия в водных растворах биологических систем. Во многих случаях можно исследовать соединения именно в том состоянии, в котором они находятся, и, если образец не поглощает лазерное излучение, спектральные измерения могут быть проведены без опасения за возможные изменения в структуре образца.

В общем, достоинства спектроскопии КР в приложении к биологии заключаются, главным образом, в следующем: возможность работы в водных средах, удобство изучения низкочастотных полос, особенно чувствительных к изменениям конформации, и чувствительность к таким гомоядерным связям как S—S, N—N, C—C, C=C и ароматическим группировкам. Главное ограничение спектроскопии КР заключается в появлении сильной фоновой люминесценции в спектрах некоторых образцов. Иногда это фоновое излучение может быть сильнее, чем КР и может полностью закрывать спектр. Источник этого фона неясен, но очистка образца обычно приносит успех при снятии паразитного фона.

Вообще отношение сигнал — шум в спектрах КР уменьшается; с ростом молекулярного веса образца. Это обусловлено чувствительностью спектров КР к плотности образца и релеевского (или упругого) рассеяния к объему молекулы. Кроме того, биологические молекулы являются большими и сложными и поэтому их спектры содержат много колебаний, которые нельзя разделить. Наблюдаемый максимум на самом деле может быть результатом наложения нескольких соседних максимумов. Интенсивность линий в спектрах КР линейно зависит от концентрации рассеивающих частиц, поэтому низкие концентрации примесей или группировки, содержащиеся в малых количествах, обычно не искажают спектров основных компонентов.

Экспериментальные аспекты спектроскопии КР, так же как и многие общие соображения относительно спектров полимерных веществ, обсуждались ранее в литературе<sup>1</sup>. Этот материал не рассматривается вновь в настоящем обзоре.

Таким образом, спектроскопия КР полезна для изучения разнообразных классов биологических молекул. Ниже эти классы обсуждены по отдельности.

## II. АМИНОКИСЛОТЫ, ИМИНОКИСЛОТЫ И РОДСТВЕННЫЕ СОЕДИНЕНИЯ

Спектроскопия КР играет определенную роль в понимании структуры аминокислот в водных растворах. Классическая работа Эдсола<sup>2</sup> создала предпосылки для интерпретации спектров аминокислот. Спектры двадцати аминокислот при разных рН получил Лорд<sup>3</sup>, применивший лазерное возбуждение. Спектры были скорректированы с учетом приборных эффектов. Эти спектры аминокислот были использованы для идентификации присутствия соответствующих аминокислотных остатков в белках<sup>3</sup>.

### А. Структура аминокислот в водных растворах

Эдсол первый наблюдал высокочастотное смещение валентного колебания карбонила в неионизованной карбоксильной группе при растворении жирных кислот в воде. Предполагалось, что сдвиг линии КР от 1670 до 1720  $\text{см}^{-1}$  характерен для карбоксила, так как он не наблюдается в случае эфирных и кетонных карбонильных групп<sup>2</sup>. Эдсол обнаружил также возрастание частоты колебаний группы  $\text{COOH}$  до 1739  $\text{см}^{-1}$  под влиянием группы  $\text{NH}_3^+$  в спектрах аминокислот, по срав-

нению с частотой  $1720\text{ см}^{-1}$  для жирных кислот. При ионизации кислоты линия в рассматриваемой области спектра исчезает <sup>4</sup>.

К тому же Эдсол заложил основы для понимания колебаний аминокислотной группы и первым использовал данные по поляризации линий в спектрах КР для интерпретации спектров аминокислот. Изучая спектры модельных аминов он установил, что симметричному валентному колебанию группы  $\text{NH}_2$  отвечает сильная поляризованная линия  $3320\text{ см}^{-1}$ , а антисимметричному валентному колебанию — слабая и деполаризованная линия  $3380\text{ см}^{-1}$ . Заряженные группы  $-\text{NH}_3^+$ ,  $-\text{NH}_2^+$  или  $-\text{NH}^+$  не дают линий в спектре КР в области  $3300\text{ см}^{-1}$  <sup>5</sup>. Отсутствие линий КР в области  $3300\text{ см}^{-1}$  для свободных аминокислот глицина и аланина подтвердило, что аминокислотная группа в изоэлектрической аминокислоте несет положительный заряд и что эти молекулы существуют как биполярные ионы (или цвиттерионы)  $^+\text{H}_3\text{NRCOO}^-$  <sup>6</sup>. Незаряженной аминокислотной группе для анионов аминокислот отвечают две линии в спектрах КР — одна средней интенсивности вблизи  $3370\text{ см}^{-1}$  (антисимметричное валентное колебание), другая — более высокой интенсивности вблизи  $3305\text{ см}^{-1}$  (симметричное валентное колебание). При замещении атома водорода на дейтерий частоты этих колебаний смещаются до  $2500$  и  $2435\text{ см}^{-1}$  соответственно. Отношение частот  $\text{NH}$  и  $\text{ND}$  составляет  $1,35\text{--}1,36$  <sup>5, 7</sup>. В спектрах биполярных форм и катионов, содержащих  $-\text{ND}_3^+$ -группу, имеется широкая слабая линия в области  $2175\text{--}2200\text{ см}^{-1}$ , линия от  $\text{NH}_3^+$ -группы ожидается вблизи  $2970\text{ см}^{-1}$ , но перекрывается более четкими и интенсивными линиями колебаний  $\text{C—H}$ -групп.

Ионизованной карбоксильной группе отвечают два основных валентных колебания: антисимметричное валентное колебание с частотой в области  $1570\text{--}1600\text{ см}^{-1}$  и симметричное валентное колебание — вблизи  $1400\text{ см}^{-1}$ . Линия при  $1400\text{ см}^{-1}$  очень интенсивна в спектрах всех аминокислот, находящихся в анионной и биполярной формах, она практически не изменяет своего положения и интенсивности при ионизации или дейтерировании аминокислотной группы. Антисимметричное валентное колебание ионизованной ( $\text{COO}^-$ ) группы особенно легко обнаруживается в спектрах растворов в  $\text{D}_2\text{O}$  и появляется вблизи  $1565\text{ см}^{-1}$  для всех анионных аминокислот <sup>7</sup>. Частоты колебаний, наблюдаемые в спектрах различных форм глицина приведены в табл. 1 <sup>8</sup>.

Методом спектроскопии КР изучали водные растворы некоторых комплексов глицина <sup>8</sup>. При низких значениях pH глицин образует монодентатные комплексы с ионами цинка, кадмия и бериллия через атомы кислорода карбоксильной группы. При pH 2,0 спектры КР растворов с различным молярным соотношением нитрата цинка и глицина практически идентичны и указывают на присутствие свободного лиганда. Основное различие между спектрами растворов нитрат цинка — глицин и биполярным ионом глицина заключается в смещении линии при  $896\text{ см}^{-1}$  для биполярного иона до  $902\text{ см}^{-1}$  для растворов нитрат цинка — глицин. Кривая зависимости интенсивности этой линии от молярного соотношения глицина и цинка, имеющая широкий перегиб при молярном соотношении равном 2 показывает, что глицин координирован ионом металла. Слабая линия при  $395\text{ см}^{-1}$  отнесена к валентному колебанию связи  $\text{Zn—O}$ . Когда значения pH растворов нитрат цинка — глицин повышаются от 3 до 8, частота валентного колебания  $\text{C—C}$  изменяется до  $915\text{ см}^{-1}$ . Кроме того появляется новая поляризованная линия при  $445\text{ см}^{-1}$ , которая отнесена к валентному колебанию связи  $\text{Zn—N}$ . Слабая линия при  $395\text{ см}^{-1}$  (валентное колебание связи  $\text{Zn—O}$ ) сохраняется в спектрах растворов с более высоким значением pH. В зависимости от молярного соотношения  $\text{Zn}^{2+}$ : глицин, при более высоких

ТАБЛИЦА 1

## Спектры КР различных форм глицина

Частоты $\text{см}^{-1}$			Отнесение
$\text{H}_2\text{NCH}_2\text{COO}^-$	$+\text{H}_3\text{NCH}_2\text{COO}^-$	$+\text{H}_3\text{NCH}_2\text{COOH}$	
507 ср.	502 ср.	494 ср.	$\text{CO}_2^-$ маятник., $\text{NH}_3^+$ крут.
575 сл.	577 сл.		$\text{CO}_2^-$ веер.
	665 сл.	644 сл.	$\text{CO}_2^-$ ножнич.
899 ср.	896 с.	869 с.	$\text{C}-\text{C}$ вал.
968 сл.			$\text{CH}_2$ маятник.?
	1027 ср.	1042 ср.	$\text{C}-\text{N}$ вал.
1100 ср.	1118 ср.	1123 сл.	$\text{NH}_2^+$ крут., $\text{NH}_2^+$ маятник.
1169 сл.			$\text{CH}_2$ крут.
1315 ср.			$\text{NH}_2$ веер.?
1343 с.	1327 с.	1308 с.	$\text{CH}_2$ веер.
1407 оч. с.	1410 с.		$\text{CO}_2^-$ сим. вал.
1400 пл.	1440 ср.	1433 ср.	$\text{CH}_2$ ножнич.
1611 оч. с.	1615 с.	1644 оч. с.	$\text{CO}_2^-$ антисим. вал.
		1744 с.	$\text{C}=\text{O}$ вал.
	2879 сл.		$\text{CH}_2$ вал.
2935 оч. с.	2968 с.	2975 оч. с.	$\text{CH}_2$ вал.
	3011 ср.	3011 с.	$\text{CH}_2$ вал.
3320 ср.			$\text{NH}_2$ вал.
3385 ср.			$\text{NH}_2$ вал.

Примечание: Интенсивность полос оценена во всех таблицах по условной шкале; оч. с.—очень сильная, с.—сильная, ср. средняя, сл.—слабая, оч. сл.—очень слабая, пл.—плечо.

pH могут образовываться три разных комплекса. В действительности частота валентного колебания  $\text{Zn}-\text{N}$ -связи изменяется от  $445 \text{ см}^{-1}$  для комплекса состава 1 : 1, до  $430 \text{ см}^{-1}$  для комплекса 1 : 2 и до  $425 \text{ см}^{-1}$  для комплекса 1 : 3. Исследования комплексов с  $\text{Cd}^{2+}$  вместо  $\text{Zn}^{2+}$  привели почти к таким же результатам<sup>8</sup>.

Цистеин имеет три кислотных группы (карбоксильную, аммониевую и сульфгидрильную) и ионизация каждой группы может быть обнаружена по спектрам КР<sup>9</sup>. Валентное колебание связи  $-\text{S}-\text{H}$  проявляется в КР вблизи  $2575 \text{ см}^{-1}$ , а деформационное колебание этой же связи — при  $864-880 \text{ см}^{-1}$ ; обе эти линии исчезают, когда сульфгидрильная группа ионизована. В спектре раствора при pH 5,7—7,4, где присутствует катион цистеина, наблюдается очень интенсивная линия при  $2575 \text{ см}^{-1}$ , однако, при pH 9,36 ее интенсивность снижается приблизительно наполовину, а при pH 11,93 линия полностью исчезает. Таким образом, при pH 9,36 приблизительно половина сульфгидрильных групп в растворе ионизована.

## Б. Структура аминокислот в твердом состоянии

Биполярный ион глицина существует в трех кристаллических формах, известных как  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -глицин. Структуры индивидуальных молекул весьма сходны, но их упаковка значительно отличается в различных кристаллах.  $\alpha$ -Глицин кристаллизуется при комнатной температуре из водного раствора и принадлежит к моноклинному центросимметричному классу.  $\beta$ -Глицин получается при добавлении в раствор глицина спирта и также принадлежит к моноклинному классу. Спектр КР  $\alpha$ -глицина описан в работе<sup>10</sup>. Отсутствие линий КР в области выше  $3145 \text{ см}^{-1}$

ИК-спектры и спектры КР *L*-пролина,  $\text{см}^{-1}$ 

ТАБЛИЦА 2

Хлоридрат			Биполярный ион			Натриевая соль		
ИК	КР (твёрдый)	КР (раствор)	ИК	КР (твёрдый)	КР (раствор)	ИК	КР (твёрдый)	КР (раствор)
1	2	3	4	5	6	7	8	9
			3055 оч. с.					
	3027							
			3004				3006 ср.	
	2982 пл.	2993 оч. с.	2982 ср.	2997 оч. с.	2992		2999 оч. с.	2981
				2976 с.	2971 пл.			
2960 оч. с.	2960 оч. с.	2969 с.			2962 пл.	2967	2963 ср.	
		2948 пл.	2955 пл.	2942 с.	2941 с.		2945 с.	2936
			2925	2926 пл.			2917 сл.	
				2901				
		2887 ср.			2887 ср.	2878 ср.	2883 ср.	2885
				2864			2861 ср.	
							2846 ср.	
			2800					
2740 ср.			2775			2750 ср.		
			2500					



ТАБЛИЦА 2 (продолжение)

Хлоридрат			Биполярный ион			Натриевая соль		
ИК	КР (твердый)	КР (раствор)	ИК	КР (твердый)	КР (раствор)	ИК	КР (твердый)	КР (раствор)
1	2	3	4	5	6	7	8	9
	1224 с.			1235 с.	1241 ср.		1239 с.	1238 ср.
						1200 ср.		
1171 оч. с.		1185 ср.		1176 ср.	1182 ср.		1181 с.	1187 ср.
			1162 ср.					
1088 сл.	1080 ср.	1090 сл.	1078 ср.	1082 ср.	1090 сл.	1089 сл.	1086 ср.	1083 сл.
	1064 ср.							
1041 ср.	1055 оч. с.	1043 с.	1045 пл.	1055 с.	1041 ср.	1037 ср.	1039 ср.	
			1028 ср.	1029 с.			1023	
984 ср.		992 ср.	975 ср.	985 ср.	990 ср.	979 ср.	985	982 ср.
943 ср.	945 ср.		940 ср.	947 ср.			943	
	878 ср.						924	
868 сл.	867 с.	906 с.	906 ср.	915 с.	910 с-	915 сл.	918	917 с.
				901 оч. с.				
		861 сл.	895 сл.	867 сл.	863 ср.		880	



	824 с.		873 сл.	888 с.					845	
816 ср.			841 ср.					817 ср.	830	
			787 ср.	793 ср.-сл.				779 сл.		787 ср.
	756 сл.									
	737 ср.	744 ср.-с.				745 ср.-сл.	730 пл.			
659 ср.		675 сл.	684 сл.			677 сл.	690			
	623 сл.		634 ср.	639 ср.		626 сл.	625 сл.	631		
		559 оч. сл.	574 сл.	573 ср.		565 оч. сл.	570 ср.		577 оч. сл.	
441 ср.	438 с.	452 с.	449 ср.	446 ср.		453 ср.	449 ср.	448	454 ср.	
			367 с.	371 ср.-сл.				345	357 ср.	
	326 ср.	342 ср.				338 ср.				
	251 ср.		280 сл.	294 сл.						

указывает на отсутствие трехвалентного азота, а отсутствие частот групп  $\text{CO}$  в области выше  $1700\text{ см}^{-1}$  указывает на отсутствие неионизованной карбоксильной группы. Ряд низкочастотных колебаний ( $53, 74, 90, 109, 164, 199\text{ см}^{-1}$ ) отнесен к шести, активным в спектре КР, либрационным колебаниям молекулы глицина в кристалле<sup>10</sup>.

Спектры КР монокристаллов хлоргидрата диглицина, бромгидрата и нитрата диглицина описаны в<sup>11</sup>. Некоторые различия в частотах между спектрами разных соединений отнесены за счет влияния водородных связей различной прочности. Для групп  $\text{CH}_2$  и  $\text{COO}^-$  наблюдали также расщепление линий под влиянием кристаллического поля<sup>11</sup>.

### В. Идентификация аминокислот

Спектры КР серина, треонина, пролина, оксипролина, валина, лейцина, изолейцина, лизина, аргинина, креатина и метионина в их различных кристаллических формах описал Гарфинкел<sup>12</sup>. Важно определить какие из этих отдельных аминокислот могут быть однозначно обнаружены в водных растворах белков. Первым, наиболее простым, шагом в этом направлении является спектроскопический анализ индивидуальных аминокислот. Были обнаружены существенные различия в спектрах аминокислот, однако качество спектров, полученных с помощью ртутной лампы, было неудовлетворительным. Качество спектров, полученных при лазерном возбуждении, позволяет определять большинство аминокислотных остатков<sup>3</sup>, и эти данные были использованы для анализа спектров КР белков.

### Г. Структура иминокислот в растворе

Спектры КР пролина показывают, что иминокислота в твердом состоянии существует в виде цвиттериона<sup>13</sup>. Колебания  $\text{NH}_2^+$ -группы найдены при  $3920, 3055$  и  $1055\text{ см}^{-1}$ , и в спектре отсутствуют линии, указывающие на наличие неионизованной карбоксильной группы<sup>12</sup>. Частоты спектров КР различных форм пролина приведены в табл. 2. Пролиновое кольцо имеет плоскую конформацию, на что указывает сравнение числа и частот колебаний кольца и метиленовых групп со спектром пирролидина. Спектры КР оксипролина указывают, что в твердом состоянии он существует как цвиттерион<sup>13</sup>. Для оксипролина частоты колебаний метиленовых групп и кольца значительно отличаются от пролина и пирролидина. Деформационное колебание группы, обнаруженное в спектрах пирролидина и пролина при  $1445 \pm 4\text{ см}^{-1}$ , значительно слабее по интенсивности и появляется при  $1432\text{ см}^{-1}$  в спектре оксипролина. Рентгеноструктурные данные указывают, что в оксипролине пирролидиновое кольцо имеет неплоское строение.

### Д. Спектры комбинационного рассеяния иминокислот в водном растворе

Частоты спектров водных растворов различных форм пролина приведены в табл. 2. Конформация пролинового кольца в водном растворе, в сравнении с твердым состоянием, не изменяется, так как в спектре наблюдается только одна сильная линия при  $910\text{ см}^{-1}$ , отнесенная к колебанию кольца биполярного иона в растворе. Частоты колебаний кольца пролина в спектре водного раствора скорее подобны тем же частотам в спектре жидкого пирролидина, чем твердого пролина, и отражают подобие этих двух структур.

Спектры КР водного раствора оксипролина показывают значительные изменения в частотах колебаний кольца в сравнении с пирролидином. Так, например, интенсивная линия колебаний кольца при  $890\text{ см}^{-1}$  в пирролидине, в спектре оксипролина наблюдается как дублет в области  $850\text{—}875\text{ см}^{-1}$ . Расщепление, вероятно, обусловлено введением ОН-групп в кольцо. Состояние ионизации легко определить по линии при  $1239\text{ см}^{-1}$  неионизованной карбоксильной группы в спектре хлоргидрата аминокислоты и по линии при  $1395\text{ см}^{-1}$  ионизованной карбоксильной группы в спектре натриевой соли.

### III. СПЕКТРЫ КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ ОЛИГОПЕПТИДОВ

#### А. Спектральные различия, зависящие от длины пептида, в твердом состоянии

Первые спектры КР дипептидов были описаны в работе<sup>14</sup> для глицилглицина и аланилаланина, где впервые обнаружена в спектрах обоих дипептидов интенсивная линия в области  $1000\text{—}1050\text{ см}^{-1}$ , подтверждающая

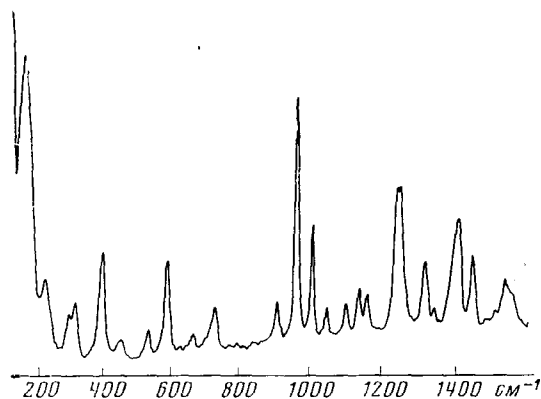


Рис. 1. Спектр КР диглицина

тем самым предположение, что полоса  $1012\text{ см}^{-1}$  в ИК-спектре характерна для диглицильного остатка.

Лазерные спектры КР ди-, три-, тетра- и пентаглицинов в твердом состоянии<sup>15</sup> показаны на рис. 1—4. Эти спектры очень чувствительны к длине цепи и интенсивная линия в области  $1109\text{—}938\text{ см}^{-1}$  для всех олигомеров (вероятно скелетное колебание) может быть использована для идентификации разных олигомеров. При возбуждении ртутной лампой в спектрах КР *LL*- и *DL*-форм аланилаланина были замечены лишь незначительные различия в области скелетных колебаний<sup>14</sup>. Лазерные спектры КР ди-, три-, тетра- и пента-*L*-аланина в твердом состоянии<sup>16</sup> приведены на рис. 5—8. Все олигомеры (особенно димер) аланина показывают некоторые спектральные различия, однако они становятся очень небольшими с ростом длины пептидной цепи. Это обычный результат, если спектральные изменения обусловлены различиями во взаимодействии скелетных колебаний, так как величина изменений уменьшается, когда возрастает длина цепи. В спектрах всех олигомеров имеется некоторое сходство из-за присутствия одинаковых концевых и метильных групп. В твердом состоянии олигомеры существуют в биполярной форме,

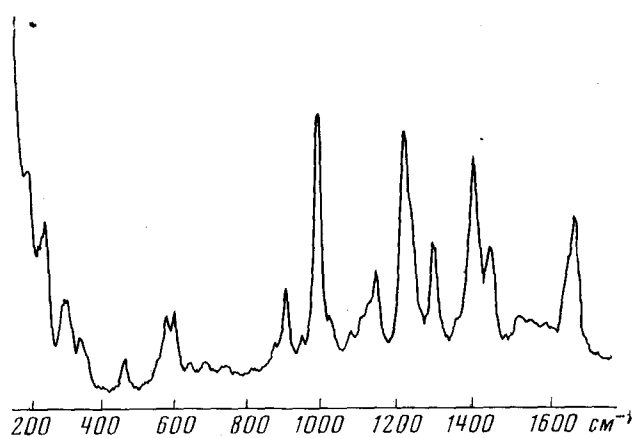


Рис. 2. Спектр КР триглицина

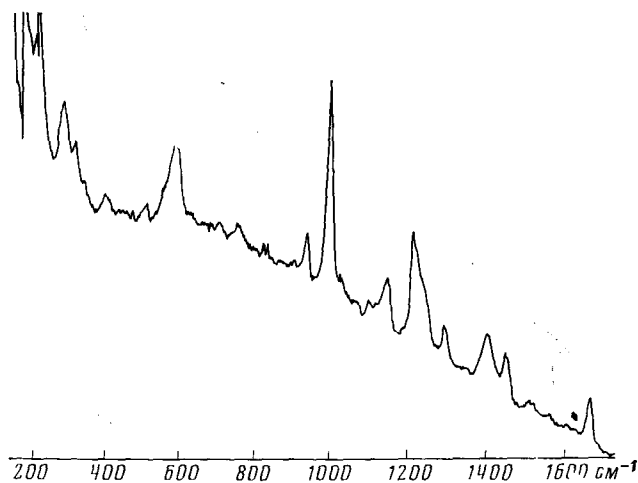


Рис. 3. Спектр КР тетраглицина

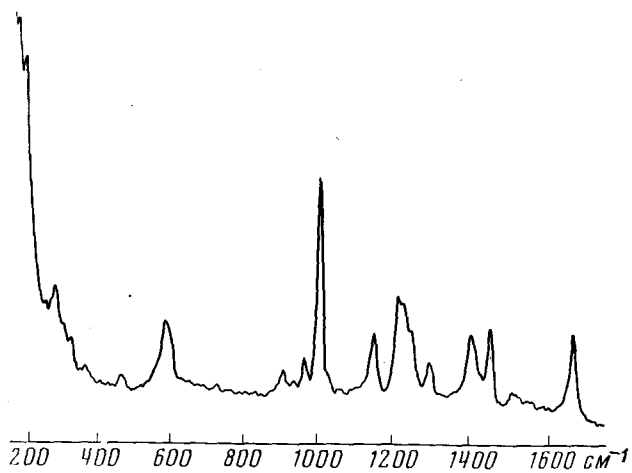
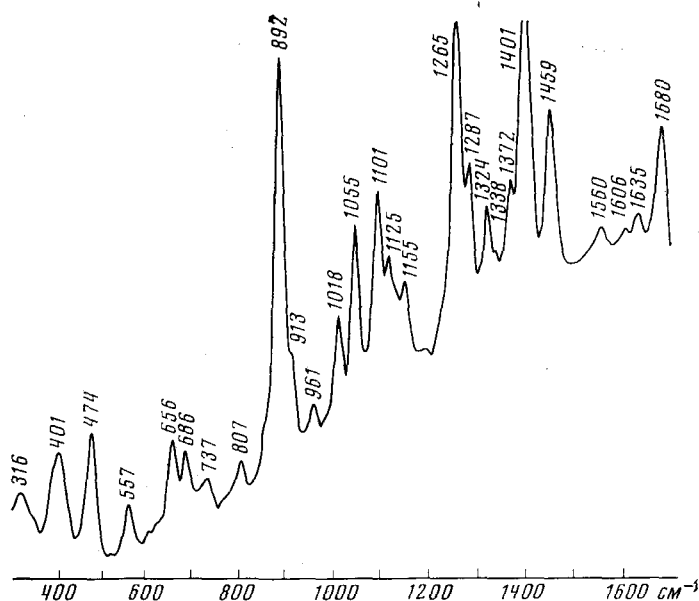
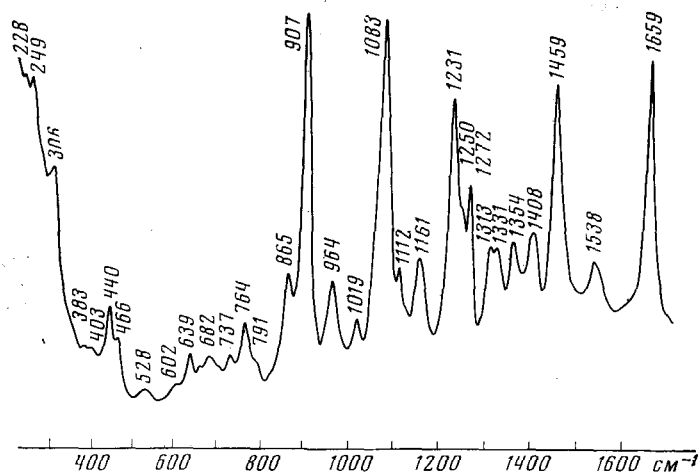


Рис. 4. Спектр КР пентаглицина

Рис. 5. Спектр КР ди-*L*-аланинаРис. 6. Спектр КР три-*L*-аланина

что доказывается присутствием в спектрах колебаний линий концевых  $\text{COO}^-$  и  $\text{NH}_3^+$ -групп. Интенсивность этих линий уменьшается, как и ожидалось, с ростом длины цепи. Для боковых метильных групп характерны колебания с частотами 1459 и 961  $\text{cm}^{-1}$ , которые нечувствительны к конформационному состоянию пептидной цепи и могут служить отличительным признаком аланинового остатка.

Спектры КР получены для ряда пролиновых олигомеров в высушенном твердом состоянии и для твердых образцов, полученных из водного раствора путем лиофилизации<sup>17</sup>. Различия в спектрах разных олигомеров

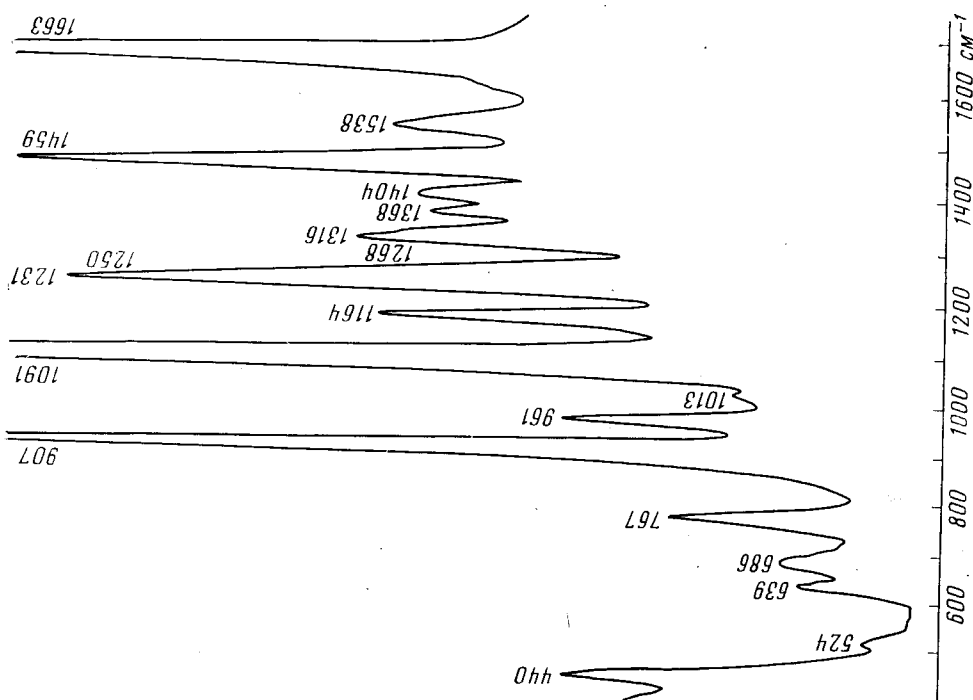


Рис. 8. Спектр КР пента-L-аланина

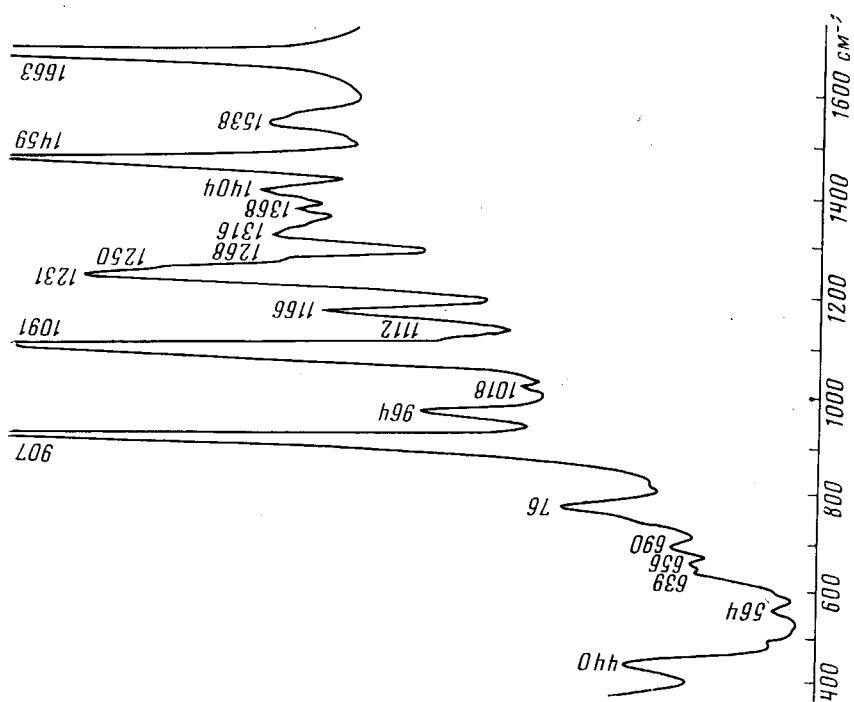


Рис. 7. Спектр КР тетра-L-аланина

этого ряда, не такие большие, как в рядах глицина и аланина. Спектры высушенных твердых олигомеров пролина (рис. 9) указывают на некоторые спектральные различия, особенно между тримером и тетрамером, которые зависят от длины олигомера, однако, эти различия частично исчезают в спектрах лиофилизированных олигомеров. В частности, наблюдается уширение линий в области  $1650$  и  $1180\text{ см}^{-1}$ . Эти различия объяснили присутствием «кристаллизационной воды» в лиофилизированных

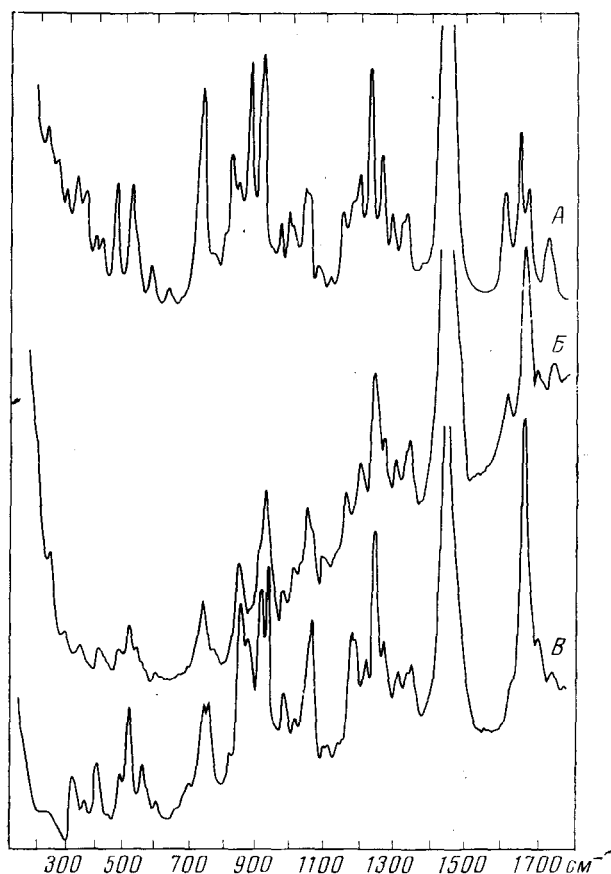


Рис. 9. Спектры КР высушенных *трет*-амилоксикарбонилпролилпролилпролина (А), *трет*-амилоксикарбонилпролилпролилпролилпролилпролина (Б) и *трет*-амилоксикарбонилпролилпролилпролилпролилпролина (В) в твердом состоянии

образцах. Основные спектральные различия твердых образцов наблюдаются в области скелетных колебаний. Тример имеет слабую линию при  $880\text{ см}^{-1}$ , тогда как тетрамер имеет две линии в этой области — при  $880$  и  $871\text{ см}^{-1}$ . Наконец, пентамер имеет только одну линию при  $869\text{ см}^{-1}$  со слабым плечом при  $880\text{ см}^{-1}$ . В спектре полимера наблюдается линия при  $869\text{ см}^{-1}$  (подобно спектру пентамера), а для мономера соответствующие линии отсутствуют, что и указывает на принадлежность этих линий скелетным колебаниям.

### Б. Структура олигопептидов в твердом состоянии

Спектры КР олигопептидов могут быть использованы для определения структуры олигопептидов в твердом состоянии после того как было установлено, что определенные линии в спектрах КР являются характерными для отдельных структур. Первые попытки в этом направлении были предприняты на олигомерах глицина и аланина. Инфракрасные спектры олигомеров глицина наводят на мысль, что олигомеры находятся в антипараллельной вытянутой форме, так как в спектрах наблюдаются характерные для такой структуры полосы при 1685 и 1630  $\text{см}^{-1}$  (амид I) и при 1520  $\text{см}^{-1}$  (амид II)<sup>18</sup>. В области колебания амид I в спектрах КР три-, тетра- и пентаглицинов наблюдается новая линия при 1665  $\text{см}^{-1}$ , вместо полос при 1685 и 1630  $\text{см}^{-1}$  в ИК-спектрах. Эти первоначальные результаты подтвердили ожидаемые различия в

ТАБЛИЦА 3

Частоты амидных колебаний ( $\text{см}^{-1}$ ) в спектрах аланиновых пептидов в неупорядоченной  $\beta$  и  $\alpha$ -спиральной конформациях\*

Отнесение	Ди- <i>L</i> -Ала		Гекса- <i>L</i> -Ала*		Поли- <i>L</i> -Ала	
	КР	ИК	КР	ИК	КР	ИК
	1681 оч. с.	1680 ср.		1690 сл.		
C=O вал. } амид I }			1663 оч. с.	1650 сл. 1623 оч. с.	1654 оч. с.	1651 оч. с.
NH пл. деф. + CN вал. } амид II }	1560 сл.		1556 } 1538 } ср.	1530 оч. с.	1549	1555 сл. 1537 оч. с.
		1505 оч. сл.		1504 оч. сл.		
NH пл. деф. + C—C } вал. } амид III }	1287 ср. 1265 оч. с.	1280 ср. 1253 с.	1258 ср. 1250 оч. сл.	1259 оч. сл. 1235 сл.		
		1228 с.	1231 с.	1212		
NH непл. деф. } амид V }	686 сл. 656 ср.		688 оч. сл.	690 с	698 с.	690 сл. 656 ср.
		645 с.	643 ср.	605 сл.		615 сл.

\* Значения частот амид III взяты из спектров пента-*L*-аланина.

интенсивностях одних и тех же колебаний в ИК-спектрах и спектрах КР. Теория предсказывает, что в рассматриваемой области должны наблюдаться четыре колебания и все они должны быть активны в спектрах КР, тогда как в ИК-спектрах активны три колебания. Фактически наблюдаются только два колебания в ИК-спектрах и третье — в спектрах КР, тогда как четвертое колебание не обнаружено. В области колебания амид II также имеются значительные различия в интенсивности колебаний в спектрах КР и ИК; в спектрах КР в этой области нет сильных линий. Из анализа спектров следует, что спектр КР согласуется с антипараллельной вытянутой формой.



В спектрах олигоаланинов амидные колебания очень чувствительны к различиям в конформации олигомеров. Заметные спектральные различия наблюдаются между дипептидом и другими олигомерами; между высшими олигомерами и полимером. Эти различия приведены в табл. 3. Линия при  $1663\text{ см}^{-1}$  в спектрах тримера, тетрамера, пентамера и гексамера соответствует линии при  $1665\text{ см}^{-1}$  в спектрах глициновых олигомеров и свидетельствует о том, что олигомеры находятся в конформации антипараллельный складчатый слой. В спектре КР ди-*L*-аланина наблюдается интенсивная линия при  $1681\text{ см}^{-1}$ , тогда как линия при  $1663\text{ см}^{-1}$  отсутствует. На основании спектральных данных предполагается, что дипептид имеет неплоскую структуру, отличающуюся от  $\beta$ -формы или  $\alpha$ -конформации и, вероятно, может быть моделью для неупорядоченной структуры поли-*L*-аланина.

Конформационные различия существуют между олигомерами пролина и зависят от того, как получены твердые образцы — высушиванием или лиофилизацией водных растворов. Характерные только для спектра КР формы II полипролина линии при  $400$  и  $1000\text{ см}^{-1}$  наблюдаются и в спектрах всех трех лиофилизированных олигомеров — три-, тетра- и пентапролина. Форма II полипролина представляет собой левую спираль с пептидными связями в *транс*-конфигурации, тогда как форма I соответствует правой спирали с *цис*-пептидными связями. Анализ спектров КР предполагает, что все три олигомера имеют *транс*-конфигурацию пептидных связей<sup>17</sup>.

Роте<sup>19</sup> сообщил, что спиральная конформация реализуется начиная с трипролина, и, вероятно, только для гексапептида можно выделить форму I. Спектры высушенных образцов указывают на то, что стабильная спиральная форма образуется начиная с тетрамера.

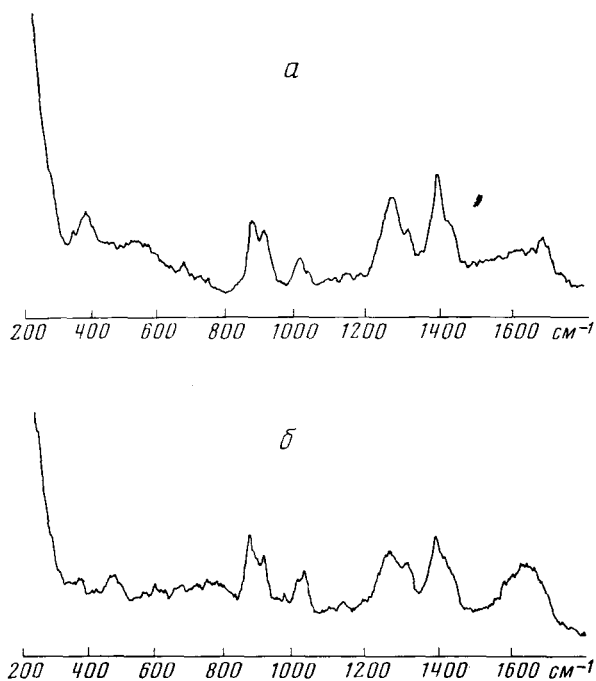


Рис. 10. Спектры КР диглицина (а) и триглицина (б) в водном растворе

### В. Конформация олигопептидов в водном растворе

Как видно из рис. 10, спектры КР водных растворов и твердых ди- и триглицинов имеют значительные различия<sup>16</sup>. Высшие олигомеры недостаточно растворимы в воде для получения спектров КР, а в спектрах ди- и триглицинов наблюдаются лишь наиболее интенсивные линии. Колебания метиленовых групп проявляются в области от  $1446\text{ см}^{-1}$  для твердых образцов до  $1420\text{ см}^{-1}$  для растворов, и эти изменения приписаны образованию в водном растворе поворотного изомера, который отличается от изомера в твердом состоянии<sup>16</sup>.

Несмотря на спектральные различия между ди- и триаланином в твердом состоянии, их спектры КР 10% изоэлектрического водного рас-

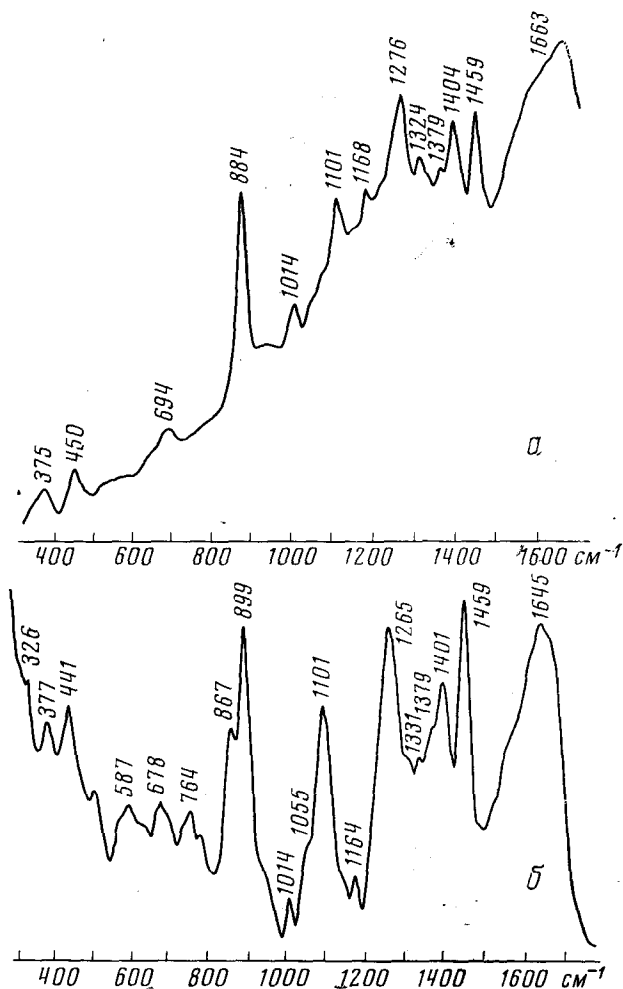


Рис. 11. Спектры КР ди-*L*-аланина (а) и три-*L*-аланина (б) в водном растворе

творы очень сходны (рис. 11). В случае дипептида было отмечено небольшое различие между спектрами твердого образца и его водного раствора. Рассмотренные спектральные результаты предполагают существование в водном растворе общей для ди-*L*-аланина и три-*L*-аланина неплоской структуры<sup>16</sup>.

Спектры КР олигомеров пролина в водном растворе крайне незначительно отличаются от спектров в твердом состоянии, по сравнению с изменениями, наблюдаемыми для глицинов и аланинов. Спектральные различия сводятся, главным образом, к уширению спектральных линий с очень небольшими изменениями в частотах (рис. 12). Спектры КР по-

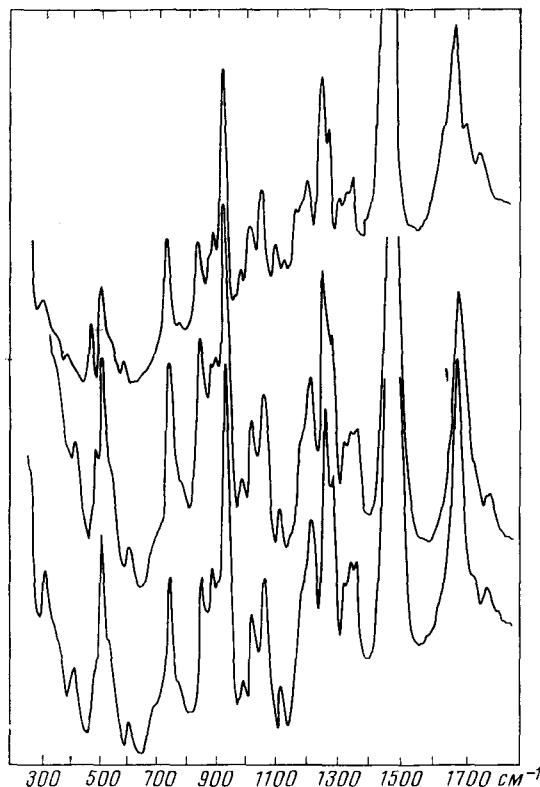


Рис. 12. Спектры КР водных растворов *трет*-амилоксикарбонилпролилпролилпролина (а), *трет*-амилоксикарбонилпролилпролилпролилпролина (б) и *трет*-амилоксикарбонилпролилпролилпролилпролилпролилпролина (в)

казывают, что олигомеры пролина не испытывают конформационного перехода при растворении в воде и имеют в растворе ту же конформацию, что и в твердом состоянии<sup>17</sup>. Для тримера спектральные различия несколько больше, чем можно было ожидать.

#### IV. СПЕКТРЫ КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПОЛИПЕПТИДОВ

##### А. Колебательная спектроскопия $\alpha$ -спиральной конформации

###### 1. Теоретическое рассмотрение

Установлено, что многие полипептиды и белки существуют в  $\alpha$ -спиральной конформации. В  $\alpha$ -спирали на пять оборотов приходится восемнадцать пептидных групп и, кроме того, найдены внутримолеку-

лярные водородные связи попарно каждой группы с третьей от нее. Фактор-группа симметрии для спирали —  $C_{18/5}$ . Характеристики представлений для фактор-группы  $C_{18/5}$  приведены в табл. 4. ИК-активные колебания принадлежат к представлениям  $A$  и  $E$ , отвечающим фазовой разности 0 и  $2\pi/3, 6$ , соответственно. Колебания  $A$  и  $E_1$  являются поляризованными, соответственно, параллельно и перпендикулярно оси спирали.

Для  $\alpha$ -спирали были получены тензоры поляризуемости<sup>20</sup>. Активные в спектрах КР колебания принадлежат к представлениям  $A$ ,  $E_1$  и  $E_2$ . Колебания  $A$  поляризованы в спектрах КР, тогда как колебания  $E_1$  и  $E_2$  деполаризованы. Для ориентированной спирали с использованием поляризованного излучения возможно выделить вклады каждого из колебаний  $A$ ,  $E_1$  и  $E_2$ .

Поляризационные измерения в спектрах КР условно обозначают  $X(zx)Y$ . Первая прописная буква перед скобками ( $X$ ) обозначает направление излучения вдоль спирали. Последняя прописная буква ( $Y$ ) обозначает направление наблюдения рассеянного света. Первая буква в скобках ( $z$ ) обозначает поляризацию падающего лазерного луча, тогда как вторая буква в скобках ( $x$ ) — поляризацию рассеянного света. При спектральных измерениях  $X(zz)Y$  проявляются колебания  $A$ , тогда как при спектральных измерениях  $X(zx)Y$  и  $X(yx)Y$  — колебания  $E_1$  и  $E_2$ , соответственно. При измерении  $Z(xx)Y$  проявляются колебания  $A$  и  $E_2$ . Такие измерения были сделаны в спектрах КР поли- $L$ -аланина<sup>20</sup>.

Поли- $L$ -аланин является простейшим полипептидом, имеющим  $\alpha$ -спиральную конформацию, так как полиглицин принимает другие спиральные конформации. Для того чтобы понять спектроскопические данные, необходимо рассмотреть колебательные свойства  $\alpha$ -спирального полипептида более детально.

Колебательные свойства  $\alpha$ -поли- $L$ -аланина были исследованы методом ИК-спектроскопии<sup>21, 22</sup>, спектроскопии КР<sup>20, 23, 24</sup> и с помощью расчетов колебательных спектров<sup>24–26</sup>.

Возможно рассчитать полный колебательный спектр полимерной цепи, как это было впервые предложено Хигсом<sup>27</sup>. Имеются детальные обзоры по расчетам полимеров<sup>28, 29</sup>. Используется матричный метод Вильсона<sup>30</sup>, соответствующим образом усовершенствованный для приложения к полимерным молекулам. Предполагается, что полимер представляет собой бесконечную спиральную цепь, построенную из соединенных между собой одинаковых повторяющихся элементов без структурных нерегулярностей. Любой элемент может быть переведен в элемент, удаленный на  $s$  единиц с помощью операции  $H_v^s(\Psi, l)$ , заключающейся в повороте на угол  $s\Psi$  вокруг от спирали и трансляции  $sl$  вдоль этой же оси. Если имеется  $P$  повторяющихся элементов в  $q$  витках спирали, то угол поворота ( $\Psi$ ) на каждый повторяющийся элемент дается выражением:

$$\psi = 2\pi q/P$$

Декартовы координаты  $n$ -го повторяющегося элемента могут быть преобразованы в координаты  $(n+s)$ -го элемента по формуле:

$$X_{n+s} = H_v^s(\psi, l) X_n$$

Характеры представлений для фактор-группы  $C_{18}/_6$

ТАБЛИЦА 4

$C_{18}/_6$	$E$	$C_{18}/_6$	$C_{18}/_6$	$C_{18}/_6$	...	$C_{18}/_3$	$C_{18}/_3$	UK	КР
$A$	1	1	1	1		1	1	$z$	$x^2; x^2 + y^2 - i(xy - yx),$ $x^2 + y^2 + i(xy - yx)$
$e_1$	1	$e^{i5\pi/9}$	$e^{i10\pi/9}$	$e^{i15\pi/9}$	...	$e^{i80\pi/9}$	$e^{i85\pi/9}$	$x + iy$	$(xz + iyz, zx + izy)$
$e_2$	1	$e^{i10\pi/9}$	$e^{i20\pi/9}$	$e^{i30\pi/9}$	...	$e^{i100\pi/9}$	$e^{i170\pi/9}$		$[x^2 - y^2 + i(xy + yx)]$
$e_3$	1	$e^{i15\pi/9}$	$e^{i30\pi/9}$	$e^{i45\pi/9}$	...	$e^{i240\pi/9}$	$e^{i255\pi/9}$		
$\vdots$	$\vdots$	$\vdots$	$\vdots$	$\vdots$		$\vdots$	$\vdots$		
$B = e_9$	1	$e^{i45\pi/9}$	$e^{i90\pi/9}$	$e^{i135\pi/9}$		...			
$\vdots$	$\vdots$	$\vdots$							
$e_3^* = e_{15}$	1	$e^{i75\pi/9}$	$e^{i150\pi/9}$	$e^{i225\pi/9}$	...				
$e_2^* = e_{16}$	1	$e^{i80\pi/9}$	$e^{i160\pi/9}$	$e^{i240\pi/9}$	...				$[x^2 - y^2 - i(xy + yx)]$
$e_3^* = e_{17}$	1	$e^{i85\pi/9}$	$e^{i170\pi/9}$	$e^{i255\pi/9}$	...			$x - iy$	$(xz - iyz; zx - izy)$
$A$	1	1	1	1				$z$	$z^2(x^2 + y^2; xy - yx)$
$E_1$	2	$2 \cos(5\pi/9)$	$2 \cos(10\pi/9)$	$2 \cos(15\pi/9)$	...			$x, y$	$(xz, zx; yz, zy)$
$E_2$	2	$2 \cos(10\pi/9)$	$2 \cos(20\pi/9)$	...					$(x^2y^2; xy + yx)$
$E_3$	2	$2 \cos(15\pi/9)$	$2 \cos(30\pi/9)$	...					
$\vdots$	$\vdots$	$\vdots$							
$E_3$	2	$2 \cos(40\pi/9)$	$2 \cos(80\pi/9)$	...					

и аналогично внутренние координаты —

$$R_{n+s} = H_{\sigma}^s(\psi, l) R_n$$

Нормальные координаты бесконечной цепи могут быть выражены как функции фазового угла  $\theta$  между соседними повторяющимися элементами. Это означает, что элементы совершают одинаковое колебательное движение в пространстве, но оно может отличаться по фазе на угол  $\theta$ . Координаты симметрии определяются выражением<sup>27</sup>:

$$R(\theta) = \sum_n R_n e^{in\theta}$$

а матрицы  $B$  и  $F$  имеют вид:

$$B(\theta) = \sum_n B_n e^{in\theta}$$

$$F(\theta) = \sum_n F_n e^{in\theta}$$

где  $B_n$  и  $F_n$  матрицы  $B$  и  $F$  для  $n$ -го повторяющегося элемента. Вековое уравнение приобретает вид:

$$|B^+(\theta) F(\theta) B(\theta) - \Lambda(\theta) E| = 0$$

после соответствующего преобразования из комплексных чисел в их действительные эквиваленты<sup>30</sup>. Однако это преобразование вдвое увеличивает порядок векового уравнения и получается удвоенное число собственных значений, хотя существует только  $3p$  различных элементов  $\Lambda(\theta)$  для каждого  $\theta$ . Частота  $K^{20}$  колебания  $\nu_k(\theta)$  определяется выражением:

$$\nu_k(\theta) = \left( \frac{\lambda_k(\theta)}{4\pi^2 C_0^2} \right)^{1/2} \quad k = 1, 2, 3, \dots, 3p$$

где  $\lambda_k(\theta)$  —  $K$  элемент  $\Lambda(\theta)$ . Частота  $\nu_k(\theta)$  — периодическая функций с периодом  $2\pi$ , симметричная относительно  $\theta = \pi$  и дисперсионного отношения для ветви  $K$ .

Оптические частоты представляют собой частоты для определенных значений  $\theta$  на фононной дисперсионной кривой, где  $\theta$  — разность фаз между колебаниями эквивалентных атомов в соседних повторяющихся элементах. Частоты колебаний активных для  $\alpha$ -спирали появляются при  $\theta = 0^\circ$  ( $A$  симметрия);  $\theta = 100^\circ$  ( $E_1$  симметрия) и  $\theta = 200^\circ$  ( $E_2$  симметрия). При  $\theta = 160^\circ$  проявляются  $E_2$  колебания из-за периодичности зоны Бриллюэна. Фононная дисперсионная кривая для  $\alpha$ -спирали показана на рис. 13 и 14<sup>24</sup>. Пересечения с вертикальными линиями при  $\theta = 0, 100$  и  $160^\circ$  обозначают теоретические частоты, которые должны соответствовать частотам в спектрах ИК и КР.

Дисперсность кривых является признаком взаимодействия определенных нормальных колебаний с соседними элементами цепи. Когда частотные кривые как функция  $\theta$  становятся прямыми, это означает, что колебания локализованы в химическом повторяющемся элементе, т. е. колебания соседнего элемента не влияют на значение частоты. Обычно такие колебания соответствуют валентным или деформационным колебаниям боковых групп полимера. Эти колебания расположены в высокочастотной области спектра. Внешние колебания, т. е. те, которые за-

висят от фазового угла, обычно представляют собой скелетные колебания полимерной цепи и проявляются в области более низких частот.

Хорошо известно, что колебания *транс*-CONH-группы в высокой степени локализованы и имеют характеристические полосы: 3280  $\text{см}^{-1}$  (амид А), 3090 (амид В), 1650 (амид I), 1560 (амид II), 1300—1250 (амид III), 627 (амид IV), 725 (амид V), 600 (амид VI) и 206 (амид VII). Частоты колебаний амид А и В возникают при резонансе Ферми между первым обертоном колебания амид II и валентным колебанием N—H. В спектрах КР линии амид А и В обычно перекрываются линиями воды и валентных колебаний ароматических C—H-групп. Лорд и Ю<sup>3</sup> показали, что линию амид А можно наблюдать в спектрах водных

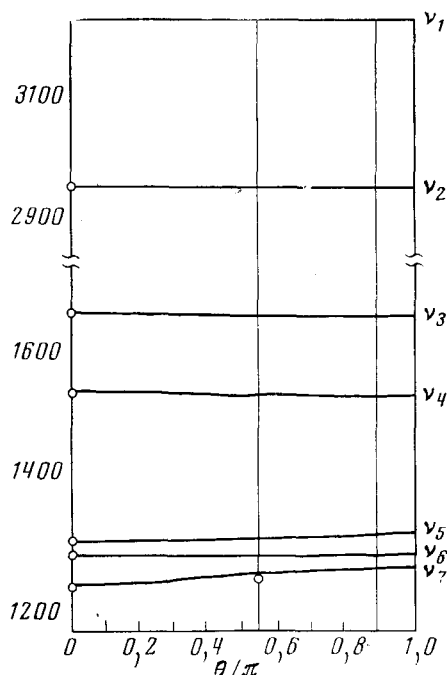


Рис. 13

Рис. 13. Дисперсионные кривые для поли-*L*-аланина (область высоких частот)

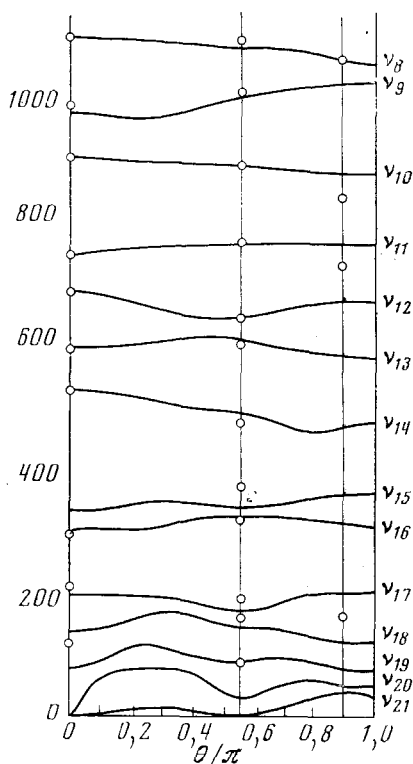


Рис. 14

Рис. 14. Дисперсионные кривые для поли-*L*-аланина (область низких частот)

растворов белков, если спектр получают непосредственно после растворения белка в  $\text{D}_2\text{O}$ , так как обмен пептидных водородов проходит медленно.

Колебание амид I обусловлено, в основном, валентным колебанием  $\text{C}=\text{O}$  (80%) с некоторыми вкладами валентного колебания  $\text{C}-\text{N}$  и плоского деформационного колебания  $\text{N}-\text{H}$ . Колебание амид I в спектре  $\alpha$ -спирали показывает очень небольшое расщепление компонентов  $A$  и  $E_1$ ; экспериментально эти компоненты не разрешаются в спектрах КР и наблюдается только одна линия при 1651  $\text{см}^{-1}$ . В ИК-спектрах в

поляризованном свете поли- $\gamma$ -бензил-*L*-глутамата наблюдается параллельная полоса при  $1650\text{ см}^{-1}$  и перпендикулярная — при  $1652\text{ см}^{-1}$ .

Колебание амид II обусловлено, в основном, плоским деформационным колебанием N—H (65%) с участием валентного колебания C—N. Это колебание в ИК-спектрах  $\alpha$ -спирали дает интенсивную перпендикулярно поляризованную полосу при  $1545\text{ см}^{-1}$ , однако, в спектрах КР амид II проявляется в виде слабой широкой линии при  $1549\text{ см}^{-1}$ . Расчет указывает на очень слабое расщепление частот колебаний амид II, однако, было высказано предположение, что параллельная полоса  $1515\text{ см}^{-1}$  в ИК-спектре поли- $\gamma$ -бензил-*L*-глутамата является А компонентой колебания амид II.

Теоретически полоса колебания амид III в спектре *N*-метилацетамида должна наблюдаться при  $1305\text{ см}^{-1}$ , а в спектре  $\alpha$ -PLA при  $1328$  ( $A$ ),  $1333$  ( $E_1$ ) и  $1340$  ( $E_2$ ). Фанкони с сотр.<sup>24</sup> в спектре КР поли-*L*-аланина к колебанию амид III отнес линию при  $1339\text{ см}^{-1}$ , тогда как Кёниг и Суттон<sup>23</sup> — линию при  $1310\text{ см}^{-1}$ . При *N*-дейтерировании обе линии исчезают. Кроме того, рассматриваемая область спектра усложнена присутствием деформационных колебаний  $C^{\alpha}H$ -групп.

Колебание амид IV представляет собой плоское деформационное колебание угла  $O=C-N$ , а колебания амид V, VI, VII — неплоское деформационное N—H, плоское деформационное  $C=O$  и крутильное вокруг связи C—N колебания, соответственно. Все эти колебания проявляются в спектрах КР в виде слабых линий.

Остальные колебательные частоты классифицировать сложнее, так как в них принимают участие несколько внутренних координат, которые сильно взаимодействуют между собой. Линии при  $909$  и  $889\text{ см}^{-1}$  можно отнести к валентному колебанию C—CH<sub>3</sub>, которое должно быть весьма локализованным. В спектрах КР большинства пептидов в рассматриваемой области обычно наблюдается интенсивная линия.

Низкочастотные нормальные колебания (ниже  $500\text{ см}^{-1}$ ) являются, главным образом, скелетными колебаниями и сильно зависят от фазового угла. Эти колебания обнаруживают высокую чувствительность к конформационному состоянию полимера, однако они зависят также и от вида аминокислотного остатка, так что четкие конформационные отнесения кажутся маловероятными. Фанкони с сотр.<sup>24</sup> отнес линии при  $371$  и  $378\text{ см}^{-1}$  в спектре КР  $\alpha$ -PLA к колебаниям, характеризующим  $\alpha$ -спираль, однако в спектре КР поли-*L*-лейцина в этой области линии не были обнаружены. Это различие в спектрах аланина и лейцина иллюстрирует чувствительность рассматриваемых колебаний к химическому строению.

## 2. Спектры КР $\alpha$ -спиральных полипептидов (амидные колебания)

Описаны спектры КР четырех полипептидов в  $\alpha$ -спиральной конформации: поли-*L*-аланина ( $\alpha$ -PLA)<sup>23</sup>, поли- $\gamma$ -бензил-*L*-глутамата ( $\alpha$ -PBG)<sup>32</sup>, поли-*L*-лизина HCl ( $\alpha$ -PLL·HCl)<sup>33</sup>, поли-*L*-лейцина ( $\alpha$ -PLL)<sup>32</sup>. Интенсивная линия при  $1652\text{ см}^{-1}$  в спектрах  $\alpha$ -PLL,  $\alpha$ -PBLG,  $\alpha$ -PLL·HCl и  $\alpha$ -PLA отнесена к колебанию амид I. Так как линия, отвечающая этому колебанию экспериментально не разрешается, колебания  $A$ ,  $E_1$  и  $E_2$ , очевидно, имеют одинаковые значения частоты —  $1652\text{ см}^{-1}$ .

В области колебания амид II найдена слабая широкая линия при  $1547\text{ см}^{-1}$  в спектре  $\alpha$ -PLL, при  $1549\text{ см}^{-1}$  в спектре  $\alpha$ -PLA, а в спектре  $\alpha$ -PBLG в этой области обнаружено только широкое диффузное рас-



сеяние. Эта слабая линия, вероятно, соответствует колебанию типа А, так как в ИК-спектрах в поляризованном свете этих полимеров вблизи  $1540\text{ см}^{-1}$  найдена интенсивная перпендикулярная полоса. Таким образом, трудно заметить различия между частотами в спектрах ИК и КР в области колебания амид II.

В области колебания амид III наблюдается линия при  $1320\text{ см}^{-1}$  для  $\alpha$ -PLL и  $\alpha$ -PLL·HCl, при  $1336\text{ см}^{-1}$  для  $\alpha$ -PBLG и две линии при 1339 и  $1310\text{ см}^{-1}$  для  $\alpha$ -PLA. Как ранее упоминалось, в области  $1200$ — $1300\text{ см}^{-1}$  предполагается также присутствие деформационных колебаний C—H-групп.

Оставшиеся низкочастотные амидные колебания (амид, IV, V, VI, VII) в спектрах КР отнести сложно из-за их слабой интенсивности и присутствия интенсивных линий, отвечающих колебаниям C—C-связей скелета  $\alpha$ -спирали.

### 3. Поли-L-аланин

Спектр КР поли-L-аланина приведен на рис. 15, а отнесение частот нормальных колебаний дано в табл. 5<sup>24</sup>. Колебания метильных групп легко идентифицируемы и в некоторых случаях они совпадают с ана-

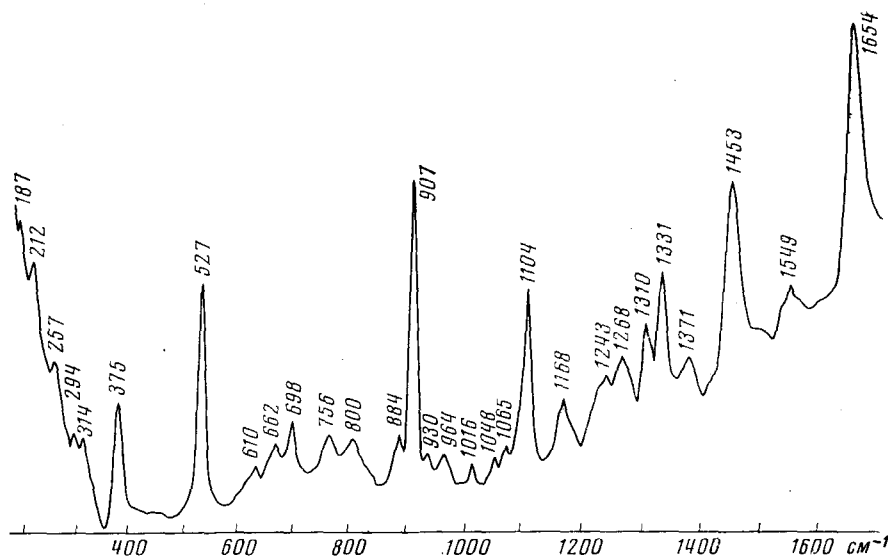


Рис. 15. Спектр КР поли-L-аланина

логичными колебаниями, наблюдаемыми в спектрах ИК и КР поли-L-валина. Ожидаемый дублет в области колебаний метильных групп (колебания А и Е) наблюдается редко, что указывает на слабые взаимодействия метильных групп внутри цепи.

ТАБЛИЦА 5

Наблюдаемые и рассчитанные частоты колебаний  $\alpha$ -поли-L-аланина

Фонон- ная кривая	Частоты, $\text{см}^{-1}$			Отнесение*
	КР	ИК	рассч.	
1	3308		3184 ( $A, E_1 E_2$ )	NH вал. (96)
	2998	2998		CH <sub>3</sub> вал., антисим.
	2950	2938		CH <sub>3</sub> вал., скм.
2	2892	2883	2939 ( $A, E_1 E_2$ )	CH вал. (100)
3			1657 ( $A$ )	C=O вал. (72), C+N вал. (18)
3	1659	1657 ( $\parallel$ )		
			1655 ( $E_1 E_2$ )	C=O вал. (72), CN вал. (18)
	1587			
	1563			
4			1545 ( $A$ )	N—H пл. деф. (65), C—N вал. (38)
4	1543	1545	1542 ( $E_1$ )	N—H пл. деф. (69), C—N вал. (32)
4			1541 ( $E_2$ )	N—H пл. деф. (68), C—N вал. (33)
	1528			
	1462	1457 ( $\parallel$ )		CH <sub>3</sub> деф. антисим.
	1405			
	1390	1384 ( $\perp$ )		CH <sub>3</sub> деф., сим.
5			1340 ( $E_2$ )	C—C вал (34), C—N вал (25), N—H пл. деф. (20)
5	1339	1330 ( $\parallel$ )	1333( $E_1$ )	C—C вал (24), C—N (17), CCH деф (16) NH пл. деф (17)
5			1328 ( $A$ )	CC'H деф (37), NC'H деф (16), C=O вал (14) NH пл. деф (10)
6	1309	1308 ( $\parallel$ )	1309 ( $A, E_1, E_2$ )	MC'H днф. (57), NC'H деф. (41)
7			1290( $E_2$ )	CC'H деф. (57), MC'H деф. (35)
7	1275	1274 ( $\perp$ )	1282( $E_1$ )	CC'H деф. (46), MC'H деф. (20), C—C' вал. (15)
7	1262	1262 ( $\parallel$ )	1266 ( $A$ )	C'S вал (32), CC'H деф- (28), C—N вал. (20)

ТАБЛИЦА 5 (продолжение)

Фонон- ная кривая	Частоты, $\text{см}^{-1}$			Отнесение*
	КР	ИК	рассч.	
	1167	1167 ( $\parallel$ )		$\text{CH}_3$ маятник
8			1112 ( $A$ )	$\text{C}'\text{—N}$ вал. (61), $\text{C}'\text{—C}$ вал. (20)
8	1106	1107 ( $\perp$ )	1093 ( $E_1$ )	$\text{C}'\text{—N}$ вал. (48), $\text{C}'\text{—C}$ вал. (12)
8	1072		1076 ( $E_2$ )	$\text{C}'\text{—N}$ вал. (45), $\text{C—N}$ вал. (10)
	1058	1050 ( $\perp$ )		$\text{CH}_3$ деф.
9			1034 ( $E_2$ )	$\text{C—N}$ вал (17), $\text{C—C}'$ вал. (15), $\text{C=O}$ вал (10)
9	1017		1012 ( $E_1$ )	$\text{C—C}$ вал (18), $\text{C}'\text{—N}$ вал (16)
9	994		984 ( $A$ )	$\text{C=O}$ пл. деф (19), $\text{C}'\text{—C}$ вал (13), $\text{C—C}$ деф (12), $\text{C—N}$ вал (10)
10	909	906 ( $\parallel$ )	911 ( $A$ )	$\text{C}'\text{—M}$ вал (64)
10	889	893 ( $\perp$ )	896 ( $E_1$ )	$\text{C}'\text{—M}$ вал (50), $\text{C=O}$ непл. деф (14) $\text{CC}'\text{M}$ деф (10)
10	842		883 ( $E_2$ )	$\text{C}'\text{—M}$ вал (57), $\text{CC}'\text{M}$ деф (15)
11		772	771 ( $E_1$ )	$\text{N—H}$ непл. деф. (28), $\text{C}'\text{—M}$ вал (24), $\text{C=O}$ непл. деф. (20)
11	757		752 ( $A$ )	$\text{N—H}$ непл. деф (44), $\text{C=O}$ непл. деф (18)
11	728		769 ( $E_2$ )	$\text{N—H}$ непл. деф (34), $\text{C=O}$ непл. деф (30) $\text{C—M}$ вал (10)
12	695	686	691 ( $A$ )	$\text{C=O}$ непл. деф (29), $\text{CC}'\text{N}$ деф (17), $\text{NCC}'$ деф (13)
12			673 ( $E_2$ )	$\text{C=O}$ пл. деф (38), $\text{N—H}$ непл. деф (11)
12	662	653	652 ( $E_1$ )	$\text{C=O}$ пл. деф (28), $\text{N—H}$ непл. деф (12)
13	610	610	611 ( $E_1$ )	$\text{N—H}$ непл. деф (30), $\text{C=O}$ непл. деф (29)
13		595	599 ( $A$ )	$\text{N—H}$ непл. деф (31), $\text{C=O}$ непл. деф (15) $\text{C—N}$ крут. (13)
13			583 ( $E_2$ )	$\text{C=O}$ непл. деф (26), $\text{N—H}$ непл. деф (24), $\text{C—N}$ крут. (11)
14	531	526	530 ( $A$ )	$\text{C=O}$ пл. деф (36), $\text{C}'\text{—M}$ вал (15), $\text{NCM}$ деф (10)
14			493 ( $E_1$ )	$\text{C=O}$ пл. деф (21), $\text{NCM}$ деф (15), $\text{C—N}$ крут. (10)

ТАБЛИЦА 5 (продолжение)

Фонон- ная кривая	Частоты, $\text{см}^{-1}$			Отнесение *
	КР	ИК	рассч.	
14	469		472 ( $E_2$ )	C=O непл. деф (25), N—H непл. деф (20)
15			363 ( $E_2$ )	NC'M деф (26)
15			339 ( $E_1$ )	C=O пл. деф (19), MC'S деф (16), C'NC деф (16)
	378	371		
15			334 (A)	MC'S деф (35), C'NC деф (12), C=O непл. деф (12)
16		325	324 ( $E_1$ )	NC'M деф (45), MCC деф (16)
16	314		313 ( $E_2$ )	C'NC деф (20), C=O пл. деф (21), CCN деф (17)
16	294	287	304 (A)	NC'M деф (35), MC'S деф (22), CC'N деф (11)
17			201 ( $E_2$ )	MC' деф (41), NC'S деф (16)
	214			
17			200 (A)	CC'N деф (28), C—N крут (10), C—C' крут (15)
17	194	190	173 ( $E_1$ )	MM'S деф (20), NCC деф (13)
18	165	167	147 ( $E_1$ )	C'NC деф (19), CC' крут (15), NCC' деф (12)
18	156		125 ( $E_2$ )	C'N крут (34), C—N крут (16) N—H непл. деф (13)
18		120	137 (A)	NCC' деф (20), C'NC деф (19), NC'M деф (15)
19			90 ( $E_1$ )	CC' крут (26), C'N крут (23), CC'N деф (14)
19			80(A)	CC' крут (31), C'—N крут (23), CC'N деф (14)
19			79 ( $E_2$ )	CC' крут (19), CCN деф (12)
20			53 ( $E_2$ )	CC' крут (47), N—H...O вал (10)
20			40 ( $E_2$ )	N—H...O вал (34), C—N крут (21) CC крут
20			26 ( $E_1$ )	CC' крут (33), C—N крут (18), C—N крут (14)

\* Цифры в скобках обозначают распределение потенциальной энергии между диагональными элементами силовой матрицы.

#### 4. Поли- $\gamma$ -бензил-*L*-глутамат (PBLG)

Спектр КР PBLG приведен на рис. 16, а отнесение частот нормальных колебаний дано в табл. 6<sup>32</sup>. В спектре преобладают интенсивные линии, отвечающие колебаниям бензольного кольца. Линии при 1610, 1033, 1006 и 627  $\text{см}^{-1}$  отнесены к колебаниям монозамещенного бензольного кольца. Линии при 1730 и 1164  $\text{см}^{-1}$  указывают на присутствие в молекуле эфирной группы. Линия при 1183  $\text{см}^{-1}$  отнесена к веерному колебанию  $\text{CH}_2$ -групп. Расщепления полос в дублеты, связанного с взаимодействием колебаний внутри цепи спирали в спектрах не наблюдается.

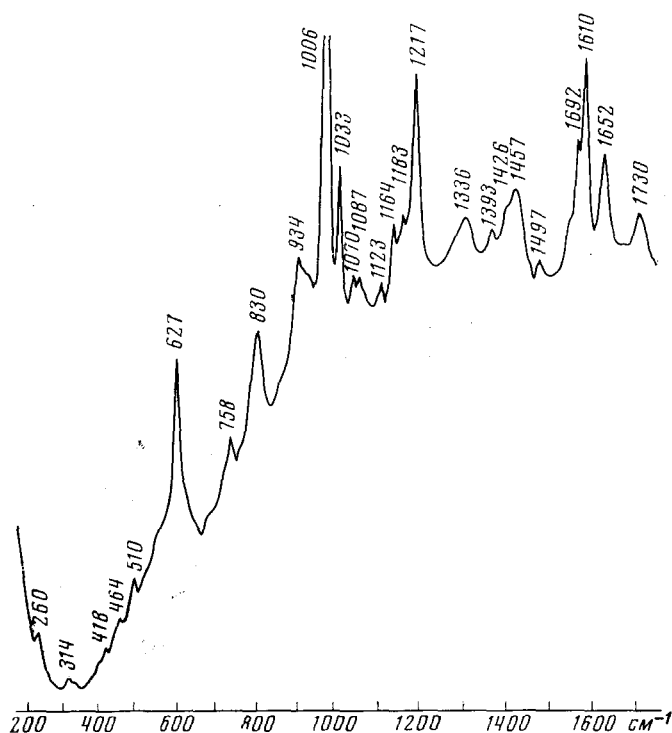


Рис. 16. Спектр КР поли- $\gamma$ -бензил-*L*-глутамата в  $\alpha$ -спиральной конформации

#### 5. Поли-*L*-лейцин

Спектр КР поли-*L*-лейцина дан на рис. 17 и частоты в табл. 7<sup>32</sup>. Из-за наличия гем-диметильной группы все линии, отвечающие колебаниям метильных групп должны быть расщеплены в дублеты. При этом одна из линий дублета, отвечающая колебанию двух метильных групп в фазе обычно более интенсивна в спектре КР, тогда как антифазные колебания более интенсивны в ИК-спектрах. Частоты колебаний метильных групп в спектре КР поли-*L*-лейцина соответствуют частотам этих групп в спектре КР 2,4-диметилгексана, являющегося модельным соединением для алифатической боковой цепи поли-*L*-лейцина. Интенсивная линия при 869  $\text{см}^{-1}$ , вероятно, наиболее удобна для характеристики гем-диметильной группы. Дополнительные линии, характери-

ТАБЛИЦА 6

Частоты колебаний в спектрах КР и ИК поли- $\gamma$ -бензил-L-глутамата,  $\text{см}^{-1}$ 

КР	ИК	Возможное отнесение	Примечание *
1730 с.	1736 оч. с.	$\text{C}=\text{O}$ вал. эфир. гр.	Б. Ц.
1652 с.	1653 с.	$\text{C}=\text{O}$ вал. (амид I)	
1610 оч. с.			
1592 ср.		$\text{C}-\text{C}$ вал.	Б. Ц.
	1550 оч. с. 1520 оч. с.	$\text{N}-\text{H}$ пл. деф. + $\text{C}-\text{N}$ вал. (амид II)	
1497 оч. сл. 1457 с.	1499 сл. 1453 оч. с.	$\text{CH}_2$ деф.; $\text{C}-\text{C}$ вал	Б. Ц.
1426 оч. сл.	1418 сл.		
1393 ср.	1393 с. 1358 оч. сл.	$\text{C}_\alpha-\text{H}$ деф.; $\text{N}-\text{H}$ пл. деф. + $\text{C}_\alpha-\text{C}$ вал. + + $\text{N}-\text{C}$ вал. (амид III)	
1336 ср.	1330 ср. 1280 оч. сл. 1256 ср.		
1217 оч. с.	1214 с.		Б. Ц.
1183		$\text{CH}_2$ веерн.	Б. Ц.
1164 ср.	1167 оч. с.	$\text{C}-\text{O}-\text{C}$ вал. асим., эфир. гр.	Б. Ц.
1123 ср.	1120 ср.		
1087 ср.	1082 ср.		
1070	1068 сл.		
1033 с.	1029 оч. сл.	$\text{C}-\text{H}$ пл. деф.	Б. Ц.
1006 оч. с.	1003 ср.	$\text{C}-\text{C}$ деф.	Б. Ц.
	967 ср.		
934 ср.			
	918 оч. сл.		
	868 оч. сл.		
	844 оч. ол.		
830 ср.	826 оч. сл.		
	796 ср.		

ТАБЛИЦА 6 (продолжение)

КР	ИК	Возможное отнесение	Примечание *
758 ср.		CH <sub>2</sub> маятник; CH веерн. синфазн.	Б. Ц.
	748 оч. с.		
	736 оч. сл.		
	697 оч. с.	C—C непл. деф.	Б. Ц.
627 с.		C—C пл. деф.	Б. Ц.
	614 с.	N—H непл. деф. (амид V)	
	578 оч. сл.		
	563 оч. сл.	деф.	О. Ц.
510		деф.	О. Ц.
	502 ср.	деф.	О. Ц.
464 сл.		деф.	О. Ц.
	453 ср.	C—C непл. деф.	Б. Ц.
418 оч. сл.		C—C непл. деф.	Б. Ц.
314 260		деф.	О. Ц.

\* Б. Ц. — колебания групп в боковой цепи полимера; О. Ц. — колебания основной цепи полимера.

зующие боковую цепь найдены при 1459, 1342, 1231, 1172, 1052, 964, 869, 830 и 452  $\text{см}^{-1}$ . Большинство из них характерно также и для боковых цепей поливалина.

#### 6. Поли-L-лизин (PLL·HCl)

Спектр КР  $\alpha$ -PLL·HCl приведен на рис. 18, а частоты колебаний в табл. 8<sup>33</sup>. Линии колебаний метиленовых групп весьма интенсивны. Деформационные колебания проявляются при 1450  $\text{см}^{-1}$ , а крутильные при 1216  $\text{см}^{-1}$ . Сильно полярная аминогруппа проявляется в спектре КР линиями очень слабой интенсивности, но линия при 1150  $\text{см}^{-1}$  может быть отнесена к маятниковому колебанию группы  $\text{NH}_3^+$ .

### Б. Колебательная спектроскопия $\beta$ -конформации

#### 1. Теоретическое рассмотрение

Другим общим типом конформации полипептидной цепи является так называемая  $\beta$ -конформация, в которой полипептидная цепь почти полностью вытянута. Структура антипараллельного складчатого слоя предполагает образование системы водородных связей.

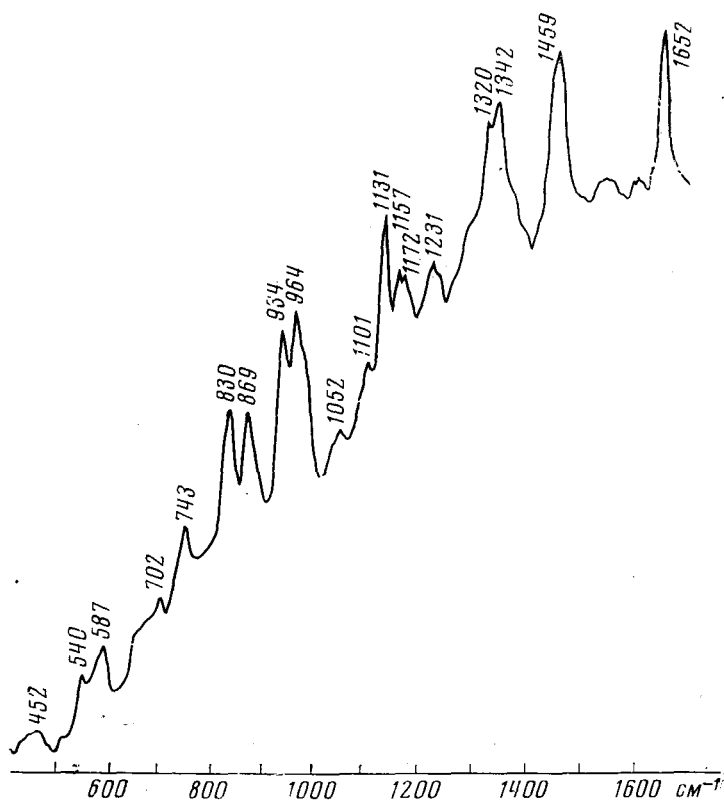
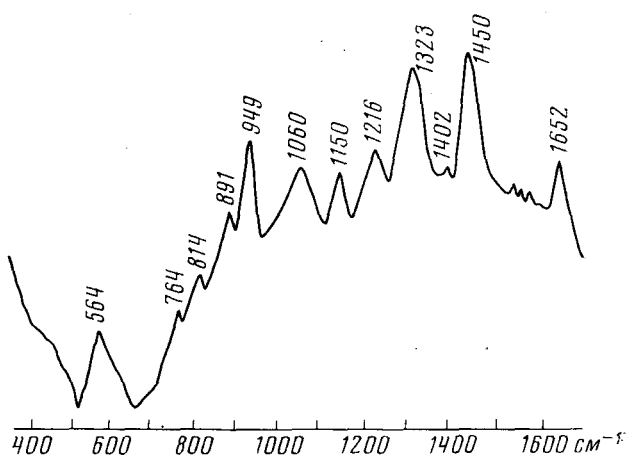
Рис. 17. Спектр КР поли-*L*-лейцинаРис. 18. Спектр КР хлоргидрата поли-*L*-лизина



ТАБЛИЦА 7

Частоты колебаний в спектре КР и ИК-спектре поли-*L*-лейцина.

КР, см <sup>-1</sup>	ИК, см <sup>-1</sup>	Возможное отнесение	Примечание
1652 оч. с.	1650 оч. с.	C=O вал. (амид I)	
1547 оч. сл.	1540 оч. с. 1506 оч. сл. 1500 оч. сл.	N—H пл. деф. (амид II)	
1459 оч. с.	1466 ср. 1449 сл.	CH <sub>3</sub> деф. асим. CH <sub>2</sub>	Б. Ц. Б. Ц.
	1446 вл. 1382 ср. 1364 с.	CH <sub>3</sub> деф. сим.	Б. Ц.
1342 оч. с.	1344 оч. с.	C—H деф.	Б. Ц.
1320 оч. с.	1291 сл.	C <sub>α</sub> —H деф. N—H пл. деф. + C—C <sub>α</sub> вал. + + N—C вал., (амид III)	
	1253 ср.		
1231 ср.			Б. Ц.
	1218 ср.		
1172 ср. 1157 ср.	1168 с.	CH <sub>3</sub> маятник. антифазн. асим. CH <sub>3</sub> маятник. синфазн. асим.	Б. Ц. Б. Ц.
1131 с.	1122 с.	C <sub>γ</sub> —(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> сим., A, E симметрия	Б. Ц.
1101 оч. сл.			Б. Ц.
	1094 ср.		
1052 сл.	1042 сл.	C <sub>γ</sub> —(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> сим., E симметрия	Б. Ц.
	1020 сл.		
	973 сл.		
964 оч. с.		CH <sub>3</sub> маятник. сим. синфазн.	Б. Ц.
934 ср.	936 оч. с.	CH <sub>3</sub> маятник. сим., антифазн.	Б. Ц.
	920 оч. сл.		
869 с.	869 с.	CH <sub>2</sub> маятник.	Б. Ц.
830 с.	829 сл.		Б. Ц.
	772 сл.		
743 ср.		деф.	О. Ц.

ТАБЛИЦА 7 (продолжение)

КР, см <sup>-1</sup>	ИК, см <sup>-1</sup>	Возможное отнесение	Примечание
702 сл.		деф.	О. Ц.
	694 ср. 657 оч. сл. 614 ср. }	N—H непл. деф. (амид V)	
587 ср.	582 сл.	деф.	О. Ц.
540 оч. сл.		деф.	О. Ц.
	471 с.	деф.	О. Ц.
452 сл.			Б. Ц.
	390 сл.	деф.	О. Ц.
249 оч. сл.		деф.	О. Ц.
216 оч. сл.		деф. C—N крут. (амид VIII)	О. Ц.

Рассмотрим в качестве примера  $\beta$ -конформации полиглицин I. Согласно рентгеноструктурным исследованиям молекула полиглицина I принадлежит к фактор-группе  $C_{2v}$ . Поэтому двадцать шесть нормальных колебаний цепи распределяются по следующим типам симметрии:  $9A$  (поляризованные КР и ИК),  $4A_2$  (КР),  $9B$  (КР и ИК) и  $4B_2$  (КР и ИК). Кристалл полиглицина I имеет симметрию  $D_2$ . Из-за наличия межцепочечных водородных связей предполагается расщепление каждого из внутренних колебаний молекулы полиглицина I на два колебания (см. табл. 9) <sup>34</sup>.

В структуре антипараллельный складчатый слой, элементарная ячейка состоит из четырех пептидных групп (две группы из одной цепи и две из соседней цепи). В этом случае соседние цепи могут двигаться синфазно или антифазно ( $\delta' = 0, \pi$ ), аналогично внутримолекулярному соотношению фаз ( $\delta = 0, \pi$ ).

Так как колебания в спектрах ИК и КР кристалла возникают от синфазного или антифазного движения соответствующих групп в различных ячейках, более удобно и легче понять природу расщепления частот, исходя из внутри- и межцепочечных взаимодействий. Миядзава <sup>18</sup> вывел соответствующие уравнения:

$$v(0, 0) = v_0 + D_1 + D'_1$$

$$v(0, \pi) = v_0 + D_1 - D'_1$$

$$v(\pi, 0) = v_0 - D_1 + D'_1$$

$$v(\pi, \pi) = v_0 - D_1 - D'_1$$

где  $D_1$  и  $D_2$  — члены уравнений, соответственно, учитывающие внутри- и межцепочечные взаимодействия колебаний. Эти уравнения используются при проведении отнесений частот нормальных колебаний в спектре  $\beta$ -конформации.

ТАБЛИЦА 8

Частоты колебаний поли-ε-карбобензоксиполи-L-лизина, поли-L-лизина HCl и 10% изоэлектрического водного раствора поли-L-лизина HCl, см<sup>-1</sup>

PCLL		PLL · HCl		PLL · HCl в H <sub>2</sub> O	Возможное отнесение	Примечание
КР	ИК	КР	ИК	КР		
1	2	3	4	5	6	7
	1724 сл.				C=O вал., эфирн. гр.,	Б.Ц.
	1691 сл.					
1650 ср.	1645 с.	1652 с.	1650 с.	1667	C=O вал., (амид I)	
1606					C—C вал.	Б.Ц.
1590 оч. сл.	1594 сл.		1605 оч. сл.		C—C вал.	Б.Ц.
	1560 оч. сл.				N—H пл. деф. + + C—N вал. (амид II)	
1534 оч. сл.	1530 с.		1540 с.			
	1505 оч. сл.		1507 оч. сл.		NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> деф.	Б.Ц.
1450 с.	1450 с.	1450 с.	1457 сл.	1446 с.	CH <sub>2</sub> деф.	Б.Ц.
	1433 сл.					
	1402 ср.	1402 сл.		1392		
1370 ср.	1365 ср.			1385 с.		
1320 ср.	1320 ср.	1323 с.		1320 ср.	C—H деф., N—H пл. деф. + C—C <sup>α</sup> вал., + + N—C вал. (амид III)	
			1307 оч. сл.			
			1286 ср.			
			1263 ср.			
1250 сл.	1250 с.			1243 ср.	CH <sub>2</sub> круг.	Б.Ц.
			1235 ср.			
1216 с.		1216 ср.			CH <sub>2</sub> круг.	Б.Ц.
1183 сл.					CH пл. деф.	Б.Ц.
1162 сл.	1166 сл.				CH пл. деф., C—O—C вал.	Б.Ц.
		1150 ср.	1154 с.	1174 ср.	NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> маятник	Б.Ц.
	1120 ср.		1127 с.			
1093 сл.	1094 сл.		1095 ср.			

ТАБЛИЦА 8 (продолжение)

1	2	3	4	5	6	7
	1074 сл.				СН пл. деф.	Б.Ц.
		1060 с.	1057 сл.	1059 с.		
	1046 сл.		1042 ср.			
1038 ср.					С—С пл. деф.	Б.Ц.
	1018 ср.		1015 ср.		С—С пл. деф.	Б.Ц.
1006 оч. с.						
953 сл.		949 с.	949 ср.	955 ср.		
	934 сл.		934 сл.			
	906 ср.					
	894 оч. сл.	891 сл.	894 сл.	895 сл.		
			874 с.			
830 с.	834 сл.					
	818 ср.	814 оч. сл.	810 сл.			
	762 ср.	764 оч. сл.				
748 ср.	744 сл.			744 оч. сл.	N—H веер., CH <sub>2</sub> непл. деф.	Б.Ц.
	730 ср.		731 с.		CH <sub>2</sub> маятник.	Б.Ц.
	691 ср.					Б.Ц.
			690 сл.		N—H непл. деф. (амид V)	
			650 сл.			
627 с					С—С пл. деф.	Б.Ц.
	606 ср.		610 оч. сл.		N—H непл. деф. (амид V)	
	574 сл.		578 оч. сл.			
568 ср.		564 ср.	558 оч. сл.			
	484 ср.		490 ср.			
	452 ср.				С—С непл. деф.	Б.Ц.
	396 ср.		414 ср.			
			370 сл.			

Хотя все четыре частоты в области амид I должны быть активны в спектрах КР, на опыте для олигомеров полиглицина найдена только одна линия при  $1665\text{ см}^{-1}$ .

Одинокрая линия при  $1674\text{ см}^{-1}$  найдена в области амид I и в спектре КР полиглицина I, но эта частота оказывается у верхнего предела ожидаемой области в сравнении с данными других измерений<sup>35</sup>. В ИК-спектре из трех ожидаемых наблюдаются две полосы, при  $1685$  и  $1636\text{ см}^{-1}$ . Используя значения названных частот колебаний для полиглицина I могут быть рассчитаны  $\nu_0$ ,  $D_1$  и  $D_1'$ <sup>15</sup>.

Колебание амид II в спектрах КР слабое, но в спектре КР полиглицина I наблюдаются две линии при  $1564$  и  $1515\text{ см}^{-1}$  и сильная полоса при  $1517\text{ см}^{-1}$  в ИК-спектре. В спектре КР полиглицина I в области амид III наблюдаются линии при  $1252$ ,  $1234$  и  $1219\text{ см}^{-1}$ , а в ИК-спектре — слабые полосы при  $1243$ ,  $1230$  и  $1214\text{ см}^{-1}$ . Частоты  $1234$  и  $1230\text{ см}^{-1}$ ,  $1219$  и  $1214\text{ см}^{-1}$  относятся в пределах экспериментальной ошибки к одним и тем же колебаниям. Следовательно, наблюдаются все четыре колебания. Частота  $1252\text{ см}^{-1}$  отнесена к ИК неактивному колебанию  $A_1\nu(0,0)$ , так как оно относится к одному из четырех колебаний не наблюдаемых в ИК-спектре. Колебание амид III, вероятно, должно иметь различные значения частот для разных  $\beta$ -структур, так как члены, учитывающие взаимодействия колебаний, могут иметь большую область значений для этого колебания.

Спектры КР  $\beta$ -формы значительно отличаются от спектров  $\alpha$ -формы и поэтому не ожидается существенных трудностей при выборе между этими конформациями.

## 2. Спектры КР полипептидов в $\beta$ -конформации (амидные колебания)

Были получены спектры КР некоторых полипептидов в  $\beta$ -конформации, включая поли-L-валин ( $\beta$ -PLV), поли-L-серин ( $\beta$ -PLS), полиглицин (PGI) и олигомеры поли-L-аланина ( $\beta$ -PLA). В спектрах, названных соединений в области колебания амид I присутствует одна интенсивная линия: при  $1666\text{ см}^{-1}$  (для  $\beta$ -PLV),  $1665\text{ см}^{-1}$  (для PGI),  $1663\text{ см}^{-1}$  (для  $\beta$ -PLA) и  $1668\text{ см}^{-1}$  (для  $\beta$ -PLS). В пределах ошибки эксперимента все колебания амид I имеют одинаковую частоту. Весьма вероятно, что эта единственная линия отвечает колебанию  $A_1\nu(0,0)$ . В ИК-спектре полосы, характеризующие  $\beta$ -конформацию, находятся при  $1685$  и  $1625\text{ см}^{-1}$ , а в спектре КР для нее характерна линия при  $1666\text{ см}^{-1}$ .

В области колебания амид II спектра КР  $\beta$ -конформации присутствуют слабые и диффузные линии, поэтому положение их максимумов определить сложно. В ИК-спектрах вышеупомянутых полимеров появляются характеристические колебания с частотой

ТАБЛИЦА 9 Анализ $\beta$ -конформации полиглицина		
Молекула	Кристалл	Активное колебание
$i_{2\nu}$	$(\delta, \delta') D_2$	КР
$A_1$	$A_1(0,0)$ $B_1(0,\pi)$	КР, ИК КР, ИК
$B_1$	$B_2(\pi,0)$ $B_3(\pi,\pi)$	КР, ИК КР
$A_2$	$A_1(0,0)$ $B_1(0,\pi)$	КР, ИК КР, ИК
$B_2$	$B_2(\pi,0)$ $B_3(\pi,\pi)$	КР, ИК

ТАБЛИЦА 10

## Наблюдаемые и рассчитанные колебательные частоты полиглицина I

Частота, $\text{см}^{-1}$			Отнесение
КР I	ИК	рассчит.	
3301 ср.	3308 с.	3311 ( $A_1, B_1$ )	амид А
	3088 ср.		амид В
	2978 сл.		$\text{CH}_2$ вал. антисим.
2955 ср.			$\text{CH}_2$ вал. антисим.
2932 с.	2929 сл.		$\text{CH}_2$ вал. сим.
2869 ср.	2869 оч. сл.		$\text{CH}_2$ вал. сим.
1674 с.	1685 ср.	1687 ( $A_1$ )	амид I
	1636 с.	1647 ( $B_1$ )	амид I
1564 сл.		1524 ( $B_1$ )	амид II
1515 сл.	1517 с.	1516 ( $A_1$ )	амид II
1460 с.			$\text{CH}_2$ деф.
	1432 с.		$\text{CH}_2$ деф.
1410 ср.	1408 сл.		$\text{CH}_2$ веер.
1341 сл.	1338 сл.		
1295 сл.			
1255 ср.			$\text{CH}_2$ крут.
1234 с.	1236 ср.	1303 ( $A_1$ )	амид III
1220 сл.	1214 сл.	1294 ( $B_1$ )	амид III
1162 ср.			
	1112 сл.	1112 ( $A_1$ )	N—M вал., M—C вал.
	1057 сл.		
1034 сл.			
1021 оч. с.	1016 ср.	1014 ( $B_1$ )	C—N вал., N—M вал., CNM деф.
		985 ( $A_1$ )	M—C вал., MCN деф., CNM деф.
		874 ( $B_1$ )	N—M вал., M—C вал.
884 ср.	888 сл.		$\text{CH}_2$ маятник.
		737 ( $B_1$ )	амид IV

ТАБЛИЦА 10 (продолжение)

Частота, $\text{см}^{-1}$			Отнесение
КР	ИК	рассчит.	
	708 с.	703 ( $B_2$ )	амид V
		699 ( $A_2$ )	амид V
	628 сл.	614 ( $B_2$ )	амид VI
	614 ср.		
601 сл.		618 ( $A_2$ )	амид IV
	589 ср.	600 ( $A_1$ )	амид IV
		541 ( $B_1$ )	NMC деф., MCN деф.
		410 ( $B_2$ )	амид VII
		277 ( $B_1$ )	C—M деф., MC деф.
		220 ( $A_1$ )	MC деф., C—M деф., MCO деф.
207 сл.	217 сл.	231 ( $A_2$ )	амид VII
		173 ( $A_1$ )	NMC деф., CNM деф.
		146 ( $B_2$ )	крут.
		91 ( $A_2$ )	C—N крут., N—M крут., M—C крут.

1530 и  $1555 \text{ см}^{-1}$ . По-видимому, слабые и широкие линии колебаний амид II в спектрах КР мало полезны для анализа  $\beta$ -конформации.

Область колебания амид III в спектрах КР  $\beta$ -конформации изобилует линиями. В спектре  $\beta$ -PLV найдены три линии при 1291, 1276 и  $1231 \text{ см}^{-1}$ . В спектре олигомеров  $\beta$ -PLA наблюдаются линии при 1268, 1250 и  $1231 \text{ см}^{-1}$ ,  $\beta$ -пентаглицина — при 1296, 1252 и  $1234 \text{ см}^{-1}$ , PGI — при 1285, 1255, 1234 и  $1230 \text{ см}^{-1}$ . В спектре PGI Смолл, Фанкони и Петиколас отнесли линию при  $1255 \text{ см}^{-1}$  к крутильному колебанию  $\text{CH}_2$ -групп, а линии при 1234 и  $1220 \text{ см}^{-1}$  к колебанию амид III. Одна линия при  $1234 \text{ см}^{-1}$  наблюдается в спектре  $\beta$ -PLS. Несомненно, эта богатая линиями область является удобной для диагностики  $\beta$ -конформации. Из-за сильного взаимодействия колебаний частоты в области амид III слегка изменяются, однако эту область спектра КР надо рассматривать, когда предполагается образование  $\beta$ -конформации; и наиболее характерными для такой структуры представляются линии при 1230 и  $1236 \text{ см}^{-1}$ .

### 3. Полиглицин I

Отнесение частот в спектрах ИК и КР полиглицина I, проведенное Фанкони, Смоллом и Петиколасом<sup>35</sup>, показано в табл. 10. Анализ ИК- и КР-спектров дает существенные доводы в пользу межцепочечного взаимодействия колебаний метиленовых групп. Деформационные колебания метиленовых групп расщепляются в дублет с частотами 1432 и  $1460 \text{ см}^{-1}$ ,

ТАБЛИЦА 11

Частоты колебаний в спектрах КР и ИК поли-*L*-валина

Частота, $\text{см}^{-1}$		Возможное отнесение	Примечание
КР	ИК		
	1687 сл.		
1666 оч. с.		C=O вал. (амид I)	
	1625 с.		
	1555 оч. сл.	N—H пл. деф., C—N вал. (амид II)	
	1558 с.		
1462	1467 с.	CH <sub>3</sub> деф. антифаз. асим.	Б. Ц.
1455		CH <sub>3</sub> деф. синфазн. асим.	Б. Ц.
1393 сл.	1390 ср.	CH <sub>3</sub> деф. антифазн. сим.	Б. Ц.
	1368 оч. сл.	CH <sub>3</sub> деф. синфазн. сим.	Б. Ц.
1346 ср.		C <sup>β</sup> —H деф.	Б. Ц.
1316 ср.		C <sup>α</sup> —H деф.	
1291 ср.	1287	N—H пл. деф., C—C <sup>α</sup> +N—C вал. (амид III)	
1276			
1231 с.			
	1224 с.		
1168 ср.		CH <sub>3</sub> маятник. синфазн. асим.	Б. Ц.
1157 ср.	1156 с.	CH <sub>3</sub> маятник. антифазн. асим.	Б. Ц.
1127 с.	1124 оч. сл.	C—(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> вал. асим.	Б. Ц.
1097 оч. сл.			
	1087 сл.		
	1054 сл.		
1018 оч. с.		C <sub>β</sub> —(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> вал. сим.	
	979 сл.		
957 ср.	952 оч. сл.	CH <sub>3</sub> маятник. антифазн. сим.	Б. Ц.
938 оч. сл.		CH <sub>3</sub> маятник. синфазн. сим.	Б. Ц.
	906 сл.		
865 оч. с.			Б. Ц.



ТАБЛИЦА II (продолжение)

Частота, $\text{см}^{-1}$		Возможное отнесение	Примечание
КР	ИК		
	816		
756 сл.	766 сл.		Б. Ц.
	709 с.	N—H непл. деф. (амид V)	
	606 сл.		
	549 оч. сл.		
488 ср.	484 ср.		Б. Ц.
	436 ср.		
407 ср.			
	329 ср.	деф.	О. Ц.
355 сл.			
310 ср.			Б. Ц.
245 ср.			Б. Ц.
228 оч. сл.		деф.	О. Ц.
187			Б. Ц.

а для валентных колебаний СН-групп наблюдаются четыре частоты 2869, 2932, 2955 и  $2978 \text{ см}^{-1}$ .

Полосы 2869 и  $2932 \text{ см}^{-1}$  отнесены к симметричным валентным колебаниям, а 2955 и  $2978 \text{ см}^{-1}$  к антисимметричным колебаниям, так как антисимметричные колебания ожидаются при более высоких частотах.

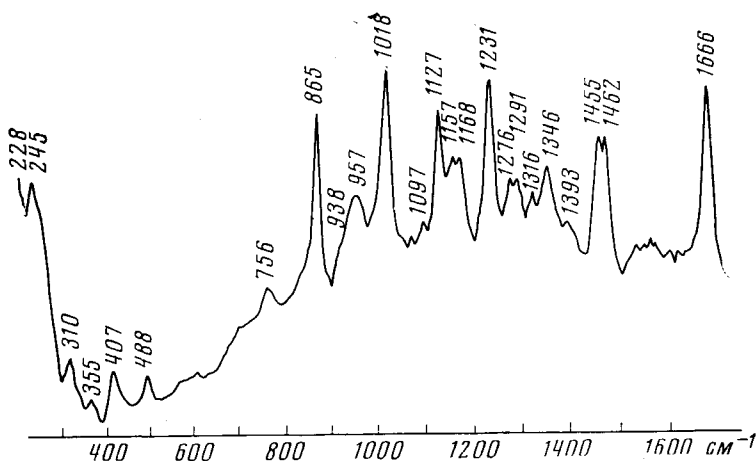


Рис. 19. Спектр КР поли-L-валина

Вполне вероятно, что веерные колебания  $\text{CH}_2$ -групп также расщеплены и проявляются при 1410 и 1341  $\text{см}^{-1}$ , а крутильные колебания этих групп проявляются при 1255 и 1295  $\text{см}^{-1}$ , хотя в работе<sup>35</sup> предложено альтернативное отнесение.

#### 4. Поли-*L*-валин ( $\beta$ -PLV)

Спектр КР поли-*L*-валина, частоты и их отнесение приведены на рис. 19 и в табл. 11<sup>32</sup>. Многие из колебаний, относящиеся к боковым за-

ТАБЛИЦА 2

Частоты колебаний в спектрах КР и ИК поли-*L*-серина

Частота, $\text{см}^{-1}$		Возможное отнесение	Примечание
КР	ИК		
	1695 сл.		
1668 оч. с.		C=O вал. (амид I)	
	1621 с.		
1531 оч. сл.	1537 сл.	N—H пл. деф. + C—H вал. (амид II)	
	1512		
1466 с.	1460 сл.	$\text{CH}_2$ деф.	Б. Ц.
1399 ср.	1397 сл.	ОН пл. деф.	Б. Ц.
	1321 оч. сл.	$\text{CH}_2$ вверх.	Б. Ц.
1304 ср.		C—H деф.	
	1288 оч. сл.		
1235 оч. с.	1235 ср.	N—H пл. деф. + C—C вал. + N—C вал. (амид III)	
	1200 сл.		
1157 ср.			
	1141 св.		
1082 с.			
1063 с.	1056 с.	первичная спиртовая группа	Б. Ц.
	936 ср.		
894 с.	894 сл.		
	861 сл.		
824 сл.			
	525 оч. сл.		

местителям и указывающие на присутствие геминальной диметильной группы имеют значения частот, подобные найденным в спектре КР поли-*L*-лейцина. Две интенсивные линии при 1462 и 1455  $\text{см}^{-1}$  иллюстрируют расщепление, возникающее от колебания метильных групп в фазе и противофазе. Другие колебания метильных групп наблюдаются

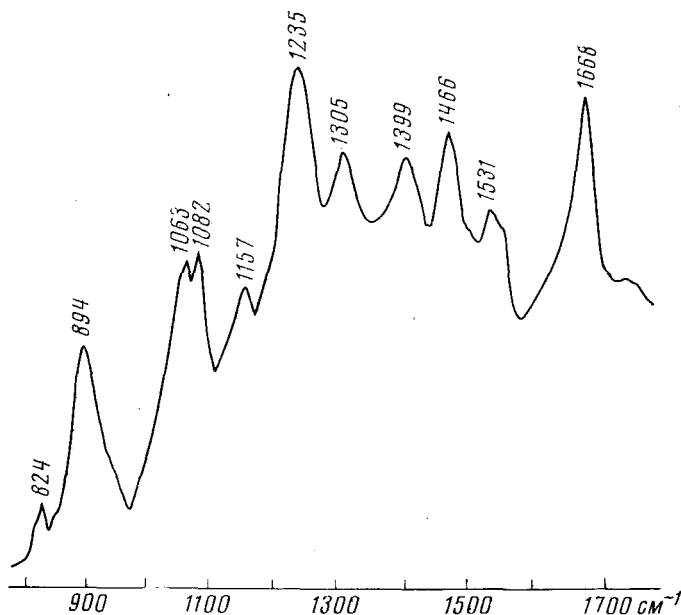


Рис. 20. Спектр КР поли-*L*-серина

при 1168, 1157, 957 и 938  $\text{см}^{-1}$ . Колебания боковых групп валина в спектрах КР хорошо согласуются с колебаниями в спектре КР 2,3-триметилгептана, который может рассматриваться как модельное соединение.

### 5. Поли-*L*-серин ( $\beta$ -PLS)

Спектр КР  $\beta$ -PLS приведен на рис. 20, а отнесение частот ИК-спектра и спектра КР в табл. 12<sup>32</sup>. Для серина характерна интенсивная линия деформационного колебания  $\text{CH}_2$ -группы, соседней с гидроксильной группой, при 1466  $\text{см}^{-1}$ . Для первичной спиртовой группы характерна линия КР при 1063  $\text{см}^{-1}$ . Деформационное колебание  $\text{OH}$ -группы наблюдается при частоте 1399  $\text{см}^{-1}$ .

## В. Колебательная спектроскопия других спиральных форм полипептидов

### 1. Полиглицин II

Для полипептидов возможны и другие спиральные конформации кроме  $\alpha$ -спирали. Полиглицин наряду с  $\beta$ -формой может иметь структуру спирали  $3_1$  (три остатка на один виток) ( $\text{PGII}$ ). Молекула в этой конформации имеет симметрию фактор-группы, изоморфной точечной груп-

ТАБЛИЦА 13

## Наблюдаемые и рассчитанные колебательные частоты полиглицина II

Частота, $\text{см}^{-1}$			Отнесение*
КР	ИК	расч.	
1	2	3	
3305 сл.	3303 с.	3342 (A, E)	N—H вал. (100)—амид A
3278 ср.			амид A
3085 ср.	3086 ср.		амид B
2979 с.	2983 сл.		CH <sub>2</sub> вал. антисим.
2940 оч. с.	2944 сл.		CH <sub>2</sub> вал. сим.
2868 сл.	2848 сл.		
2831 сл.			
2742 оч. сл.			
2652 оч. сл.			
1654 оч. сл.	1644 с.	1657 (A, E)	C=O вал. (80), C—N вал. (16) — амид I
1582 оч. сл.			
1560 сл.			
	1554 с.	1543 (E)	C—N вал. (33), N—H пл. деф. (70) — амид II
		1547 (A)	
1421 с.	1420 ср.		CH <sub>2</sub> деф.
1383 с.	1377 ср.		CH <sub>2</sub> веер.
1334 оч. сл.			
1283 ср.	1283 ср.	1281 (E)	C—N вал. (35), M—C вал. (23), N—H пл. деф. (19) — амид III
1134 ср.	1132 оч. сл.	1079 (A)	N—M вал. (70), M—C вал. (21)
1060 сл.			
1031 оч. с.	1028 ср.	1009 (E)	N—M вал. (42), C—N вал. (14), C—M вал. (15)
1017			
969 сл.	971 оч. сл.	959 (A)	C—M вал. (23), OCN деф. (17), CNM деф. (17), C=O вал. (12)
952 сл.		944 (E)	N—M вал. (35), C—M вал. (21), OCN деф. (10)
897 оч. сл.			
884 оч. сл.	901 ср.		CH <sub>2</sub> маятник.

ТАБЛИЦА 13 (продолжение)

1	2	3	4
864 сл.	862 оч. сл.		
752 оч. сл.	751 сл.	778 (A)	N—H непл. деф. (41), C=O непл. деф. (20), МС деф. (10), N—М крут. (12) — амид V
742 оч. сл.	740 ср.	741 (E)	N—H непл. деф. (43), C=O непл. деф. (10), C—N крут. (18), N—М крут. (20)
707 сл.	698 с.	665 (E)	NMC деф. (35) C=O пл. деф. (12)
673 ср.		662 (A)	M—C вал. (14), C=O пл. деф. (18), NMC деф. (14) — амид IV
		643 (E)	M—C вал. (13), C=O пл. деф. (24), C=O непл. деф. (26) — амид IV, VI
578 сл.			
566 ср.	573 с.	576 (A)	C=O непл. деф. (54), C=O пл. деф. (23) — амид IV, VI
496 ср.		460 (E)	MCN деф. (36), C=O пл. деф. (16)
424 оч. сл.		416 (A)	M—C крут. (27), CNM деф. (16) N—H непл. деф. (10). N—М крут. (10)
383 оч. сл.			
353 оч. сл.	363 с.	373 (E)	C=O пл. деф. (26). МС крут. (20), CNM деф. (15) — амид IV
340 ср.			
313 оч. сл.			
297 оч. сл.			
272 сл.		282 (A)	NMC деф. (27), C=O пл. деф. (21), CNM деф. (11), МС крут. (12)
		234 (E)	NMC деф. (35), CNM деф. (15)
217 сл.		189 (A)	MCN деф. (40), C=O пл. деф. (23), NM крут. (12)

\* Цифры в скобках обозначают распределение потенциальной энергии между диагональными элементами силовой матрицы.

ле  $C(2\pi/3)$  и колебания цепи могут быть классифицированы как симметричные ( $A: \delta=0$ ) и вырожденные антисимметричные ( $E: \delta=2\pi/3$ ). Анализ нормальных колебаний и распределения фононов для РGII выполнены в работе<sup>35</sup>. Колебания  $A$  поляризованы в спектре КР и имеют параллельный инфракрасный дихроизм, тогда как колебания  $E$  — деполаризованы и имеют перпендикулярный инфракрасный дихроизм. Основные различия между спектрами КР и ИК-спектрами полипептидов в конформации спираль  $3_1$  состоят в интенсивностях колебаний; некоторые колебания, слабые или отсутствующие в спектрах КР могут появляться в ИК-спектрах и наоборот. Симметричные колебания  $A$  проявляются в спектрах КР в виде очень интенсивных линий, тогда как колебания  $E$  дают очень интенсивные полосы в ИК-спектрах.

Спектр КР РGII изображен на рис. 21<sup>15</sup>, а отнесение частот колебаний приведено в табл. 13<sup>35</sup>. В области амид I наблюдается интенсивная линия при  $1654\text{ см}^{-1}$ , тогда как в ИК-спектре в этой области наблюдается полоса при  $1644\text{ см}^{-1}$ . Частота  $1654\text{ см}^{-1}$  отнесена к колебанию  $A$ , а  $1644$  — к колебанию  $E$ , поскольку различие частот превышает возможную ошибку эксперимента. Наблюдаемое расщепление колебаний  $A$  и  $E$  значительно большее, чем ожидалось, так как Смолл, Фанкони и Петиколас<sup>35</sup>, на основании расчета предсказали одно колебание при  $1647\text{ см}^{-1}$ . Однако Синх и Гупта<sup>36</sup> предсказали расщепление на  $6\text{ см}^{-1}$ . Смит, Уалтон и Кёниг<sup>15</sup> не наблюдали линий в области колебаний амид II в спектре КР РGII. Смолл, Фанкони и Петиколас<sup>35</sup> наблюдали очень слабые линии при  $1560$  и  $1582\text{ см}^{-1}$ , которые, однако, не исчезают при N-дейтерировании и поэтому не могут быть отнесены к колебанию амид II. В ИК-спектрах, в отличие от спектров КР в области амид II, наблюдается очень интенсивная полоса при  $1554\text{ см}^{-1}$ .

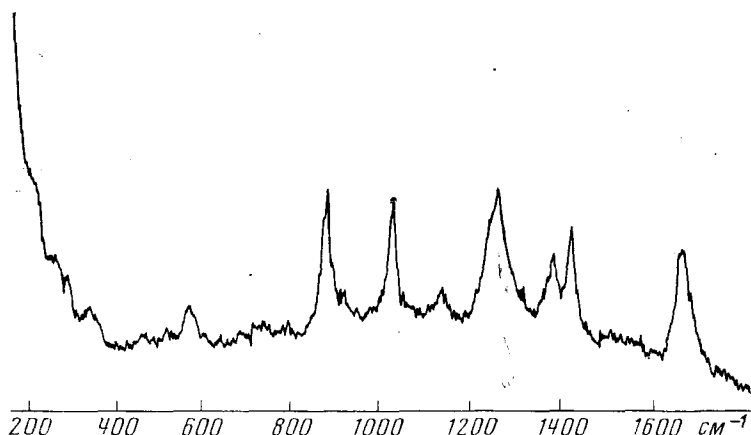


Рис. 21. Спектр КР полиглицина II

В области  $1200$ — $1300\text{ см}^{-1}$  в спектре КР имеется группа линий при  $1247$ ,  $1259$  и  $1281\text{ см}^{-1}$ . Линия при  $1259\text{ см}^{-1}$ , вероятно, относится к крупному колебанию  $\text{CH}_2$ -групп, проявление которого ожидается в спектре КР, но которое, по-видимому, не наблюдается в ИК-спектре из-за слабой интенсивности. Расчетные значения частоты колебания амид III  $1281\text{ см}^{-1}$  ( $E$ ) и  $1244\text{ см}^{-1}$  ( $A$ ) соответствуют наблюдаемым частотам  $1281$  и  $1247\text{ см}^{-1}$ , соответственно.

В области валентных колебаний С — Н-групп в спектре КР наблюдаются четыре линии при 2979, 2940, 2868 и 2831  $\text{см}^{-1}$ , а в ИК-спектре — полосы при 2977, 2935, 2850 и 2805  $\text{см}^{-1}$ . Столь большое количество частот свидетельствует либо о присутствии обертонов и комбинационных тонов, либо о наличии неэквивалентных метиленовых групп с различным окружением. С другой стороны, сильные межцепочечные водородные связи могут приводить к смешиванию внутренних и внешних колебаний. Природа колебаний для РGII неясна и требует более детальной работы.

Линии при 3305 и 3278  $\text{см}^{-1}$  отнесены к валентным колебаниям N — Н-групп на основании их исчезновения при N-дейтерировании. Степень расщепления этих колебаний слишком велика, чтобы их можно было приписать колебаниям типа А и Е спирали. Возможно, что эти два колебания объясняются наличием двух типов групп NH с разным окружением атома водорода.

Эти различия могут возникать при образовании водородных связей типа  $\text{NH} \dots \text{O} = \text{C}$  между цепями, в прямом и обратном направлениях или с атомами кислорода, уже участвующими в образовании водородной связи.

## 2. Поли-L-пролин (I и II)

Поли-L-пролин (PLP) существует, по крайней мере, в двух различных конформациях. Осаждение полипептида прямо из полимеризационной смеси приводит к образованию формы I, которая соответствует пра-

ТАБЛИЦА 14

Частоты, которые могут быть использованы для различия двух форм поли-L-пролина

КР, $\text{см}^{-1}$		ИК, $\text{см}^{-1}$	
поли-L-пролин I	поли-L-пролин II	поли-L-пролин I	поли-L-пролин II
		1355	
1187	1198 1187 1176		
957	1000	960	
781			
	722		
662			670
540	530		
363	400		400

вой  $10_3$ -спирали с *цис*-пептидными связями. Форму II PLP получают, выдерживая несколько дней форму I в ледяной уксусной кислоте и затем осаждая эфиром. Форма II представляет собой левую спираль с винтовой осью третьего порядка и пептидными связями в *транс*-конфигурации. Валентные колебания групп  $\text{C} = \text{O}$  PLP I и PLP II найдены при 1647 и 1650  $\text{см}^{-1}$ , соответственно<sup>17</sup>. Значения частот находятся в пределах ошибки эксперимента. Однако если сравнить интенсивности этих линий с интенсивностями линий деформационных колебаний групп  $\text{CH}_2$  при 1446  $\text{см}^{-1}$  (рис. 22), то легко видеть, что интенсивность колебания амид I

в спектре КР формы II в значительной степени понижена. Так как интенсивность линий очень чувствительна к окружению группы, наблюдаемые изменения в спектрах КР могут отражать некоторое различие в окруже-

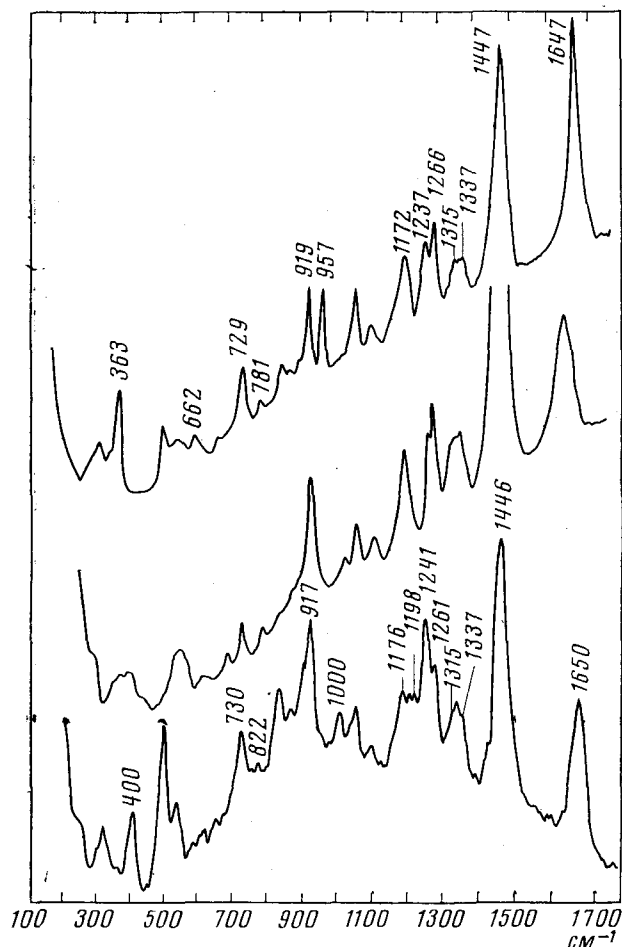


Рис. 22. Спектры КР поли-*L*-пролина I и II

нии карбонильной группы в разных конформациях. Однако имеются существенные различия в спектрах *цис*- и *транс*-форм, что видно из табл. 14<sup>17</sup>.

### 3. Поли-*L*-оксипролин

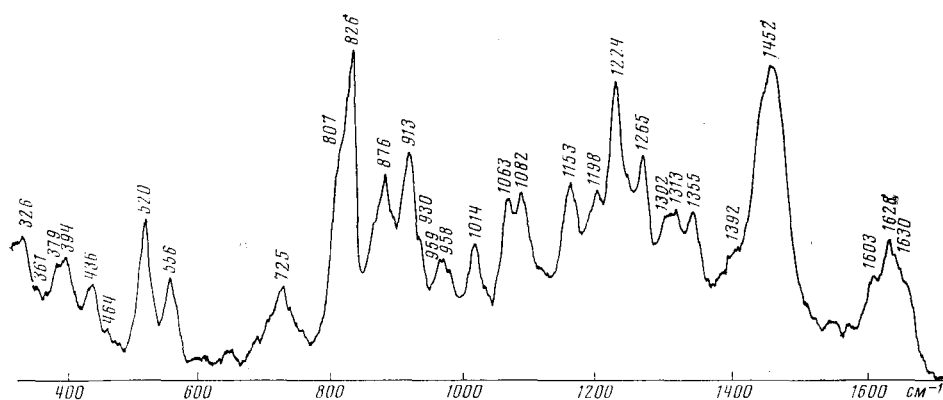
Поли-*L*-оксипролин в твердом состоянии имеет только одну устойчивую конформацию — левую *транс*-спираль, подобную спирали поли-*L*-пролина II. Спектр КР поли-*L*-оксипролина в твердом состоянии изображен на рис. 23, а частоты колебаний указаны в табл. 15<sup>35</sup>. В области валентных колебаний групп C=O как в спектрах КР, так и в ИК-спектрах наблюдаются колебания с частотами 1650, 1628 и 1603  $\text{см}^{-1}$ . Наиболее интенсивная линия КР при 1628  $\text{см}^{-1}$  отнесена к валентному колебанию групп C=O, которое имеет низкое значение частоты вследствие образования водородной связи с гидроксильной группой кольца. Колебания, обусловленные пирролидиновым кольцом весьма сходны для *L*-оксипролина и поли-*L*-оксипролина. К колебаниям групп  $\text{CH}_2$  отнесены линии



ТАБЛИЦА 15

Частоты в колебательных спектрах поли-L-оксипролина,  $\text{см}^{-1}$ 

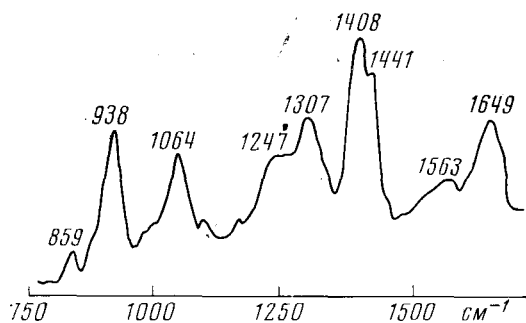
Частота, $\text{см}^{-1}$			Частота, $\text{см}^{-1}$		
ИК	КР (твердое состояние)	КР (раствор)	ИК	КР (твердое состояние)	КР (раствор)
3425 с.			1012 ср.	1014 ср.	
3263			976	968 ср.-сл.	973 сл.
2980 ср.	2976 ср.			959 пл.	
	2945 оч. с.			930 пл.	
	2874		911 ср.	913 ср.-с.	917 с.
2656 ср.				888 пл.	
1645 сл.	1650 пл.	1640	870 ср.	876 ср.-с.	878 ср.
	1628 с.			860 пл.	
1600 пл.	1603 пл.		828 сл.	826 оч. с.	826 оч.с.
		1560 оч. сл.	804 с.	807 пл.	
		1502 оч. сл.	753 сл.	754 пл.	719
1442 оч. с.	1452 оч. с.	1464 оч. с.		725 ср.	
		1451 пл.		688 сл.	
	1392 оч. сл.		554 ср.	646 сл.	
1328 с.	1335 ср.	1344 ср.	520 чл.	556	
		1326 ср.		520 ср.-с.	
1314 с.	1313 ср.		451 сл.	464 сл.	
1300 сл.	1302 сл.			438 ср.	435 ср.
1259 ср.	1265 ср.	1268 ср.	416 сл.	428 сл.	415 сл.
		1240 ср.	400 сл.	394 с.	397
1220 сл.	1224 с.			379 пл.	
1190 ср.	1198 ср.			351	
	1163 ср.	1166 ср.		326 ср.-сл.	337
1151 ср.	1153 ср.-с.			310 пл.	
	1081 ср.			278 ср.	284 сл.
1074 с.	1063 ср.	1072 ср.		253 пл.	269 ср.-сл.
1040 оч. сл.		1022 ср.			

Рис. 23. Спектр КР твердого поли-*L*-оксипролина

при 1452, 1265, 1224 и 725  $\text{см}^{-1}$ . Пирролидиновое кольцо в структуре *L*-оксипролина искажено, причем  $\text{СН}—\text{ОН}$  группировка находится вне плоскости кольца.

### Г. Колебательная спектроскопия неупорядоченной конформации

Кроме вытянутых  $\beta$ -форм и свернутых спиральных форм полипептиды могут существовать также в неупорядоченной конформации. В этой форме были получены поли- $\alpha$ -*L*-глутамат и поли-*L*-лизин. В спектре неупорядоченной конформации изменения частот колебаний, обусловленные как меж-, так и внутрицепочечными колебательными взаимодействиями, в среднем, равны нулю<sup>7</sup>, что приводит к уширению линий, подобно тому как это наблюдается при рассеянии от жидкостей. Кроме того,

Рис. 24. Спектр КР натриевой соли поли-*L*-глутамата в твердом состоянии

будут малы сдвиги частот из-за колебательного взаимодействия фрагментов с одинаковым строением и энергией. Последний эффект может привести лишь к малым изменениям в частотах, однако вызовет существенное возрастание коэффициентов экстинкции в ИК-спектрах и рассеяния в спектрах КР. Анализ ИК-спектров неупорядоченной конформации с пептидпептидными водородными связями показывает, что полоса колебания амид I находится при 1655  $\text{см}^{-1}$ , а амид II — при 1535  $\text{см}^{-1}$ . К со-

ТАБЛИЦА 16

Частота в колебательных спектрах поли-*L*-глутаминовой кислоты и поли-*L*-глутамата натрия,  $\text{см}^{-1}$

PGA ИК	КР	PGA-Na		Отнесение
		ИК	КР	
3300 с.		3430 ср.		H <sub>2</sub> O вал
		3270 с.		
3060 сл.		3075 сл.		
2950 сл.	2973 ср.	2960 ср.	2960 с.	
	2923 с.	2930 ср.		CH вал.
		2870 сл.		
1710 ср.	1734 сл.			
1650 с.	1656 с.	1660 с.	1649 с.	амид I
		1615 сл.		
1540 с.	1567 сл.	1570 с.	1563 сл.	COO <sup>-</sup> вал. антисим.
		1540 сл.		амид II
		1530 сл.		
1510 ср.		1510 сл.		
1490 сл.		1480 сл.		
1460 сл.	1451 с.	1440 сл.	1441 ср.	CH <sub>2</sub> деф.
	1422 с.			
1410 ср.				
1385 сл.		1405 с.	1408 с.	COO <sup>-</sup> вал. сим.
	1342 ср.		1340	CH <sub>2</sub> веер.
1310 сл.	1309 ср.	1310 сл.	1307 сл.	CH <sub>2</sub> крут.
1280 сл.		1280 сл.		
1260 ср.	1246 сл.	1240 сл.	1247 ср.	амид III
1210 сл.		1210 сл.		
1120 сл.		1180 сл.	1182 сл.	
1100 сл.		1120 сл.	1121 сл.	
	1071	1070 сл.	1064 с.	C—C вал. о. ц.
1030 сл.	1052 ср.	1030 сл.		

ТАБЛИЦА 16 (продолжение)

PGA	PGA-Na		Отнесение
	ИК	КР	
980 сл.			1000 сл.
	926	930 сл.	938 с.
		880 сл.	859
			С—С—N вал.
			CH <sub>2</sub> маятник.
810 ср.		825 сл.	
	745 сл.	780 сл.	
630		650 сл.	
	550 сл.		

жалению, частота рассматриваемого колебания амид I близка к частоте амид I  $\alpha$ -спиральной конформации ( $1656$  и  $1650\text{ см}^{-1}$ , соответственно), а полоса амид II слаба по интенсивности и часто совпадает с полосой, обусловленной колебанием ионизованной карбоксильной группы.

Спектр КР неупорядоченной конформации натриевой соли поли-*L*-глутаминовой кислоты в твердом состоянии приведен на рис. 24, а отнесение частот дано в табл. 16<sup>37</sup>. Колебанию амид I отвечает интенсивная линия при  $1649\text{ см}^{-1}$ . Колебание амид II в спектре КР мало интенсивно и поэтому не может быть использовано, чтобы различить неупорядоченную конформацию от  $\alpha$ -спирали. Широкая линия при  $1247\text{ см}^{-1}$  отнесена к колебанию амид III. При дейтерировании эта линия смещается в область  $1006\text{ см}^{-1}$ . Натриевая соль поли-*L*-глутаминовой кислоты (PGA) может быть обращена из  $\alpha$ -спиральной конформации в неупорядоченное состояние при уменьшении влажности, в результате чего линия амид I в спектре КР смещается от  $1656$  до  $1649\text{ см}^{-1}$ . Колебание амид III спиральной PGA менее интенсивно для твердого сухого состояния и PGA—Na. При переходе из  $\alpha$ -спиральной конформации в неупорядоченное состояние PGA в спектре КР происходит смещение частоты симметричного валентного колебания С—С—N от  $926$  до  $938\text{ см}^{-1}$ <sup>37</sup>.

По-видимому, определение неупорядоченного состояния как методом спектроскопии КР, так и методом ИК-спектроскопии не является надежным. Главные различия между спектрами неупорядоченного состояния и  $\alpha$ -спиральной конформации состоят в небольшом смещении в сторону низких частот колебания амид I и смещении в сторону высоких частот, со значительным увеличением интенсивности колебания амид III в спектре первой конформации, в сравнении со второй.

Спектры КР поли-*L*-лизина в растворе могут рассматриваться как спектры неупорядоченного состояния<sup>38</sup>. В спектре водного раствора PLL·HCl линия амид I наблюдается при  $1657\text{ см}^{-1}$ . К сожалению, при изучении водных растворов измерениям мешает слабая линия воды при  $1640\text{ см}^{-1}$ . В D<sub>2</sub>O эта трудность устраняется и пик колебания амид I наблюдается при  $1659\text{ см}^{-1}$ . Эта частота для неупорядоченного состояния совпадает в пределах ошибки эксперимента с частотой колебания амид I  $1655\text{ см}^{-1}$  в спектре  $\alpha$ -спиральной конформации. В спектрах КР водных растворов колебание амид II не наблюдается.

### Д. Гидратированные формы полипептидов

Большее количество полипептидов подвергается структурным изменениям, обусловленным присутствием или отсутствием паров воды. Контролируя степень влажности, можно вызвать переход спираль —  $\beta$ -форма в поли-*L*-лизине. Подобный эффект наблюдался и в поли-*L*-глутаминовой кислоте. Вследствие низкого рассеяния воды спектроскопия КР может быть использована для наблюдения за структурными изменениями в молекуле.

По данным спектров КР, присутствие воды вызывает в трипептиде пролина образование спиральной формы, которая в «сухом» состоянии не была обнаружена<sup>17</sup>. Спектры КР тримера, тетрамера и пентамера пролина в «сухом» состоянии представлены на рис. 9, тогда как спектры тех же веществ, полученных из водных растворов лиофилизацией, представлены на рис. 25. Если лиофилизированные образцы тщательно высушить в сушильном шкафу, то их спектры становятся похожими на спектры, представленные на рис. 9. Спектры твердых высушенных олигомеров несколько различаются между собой, но эти различия частично исчезают для лиофилизированных олигомеров. Линии при  $1650$  и  $1180\text{ см}^{-1}$  уширяются, и во всех трех спектрах наблюдаются линии при  $400$  и  $1000\text{ см}^{-1}$ , характерные для спектра полипролина II. Соотношение интенсивностей линий  $1650\text{ см}^{-1}$  и  $1446\text{ см}^{-1}$  в спектрах всех трех олигомеров указывает

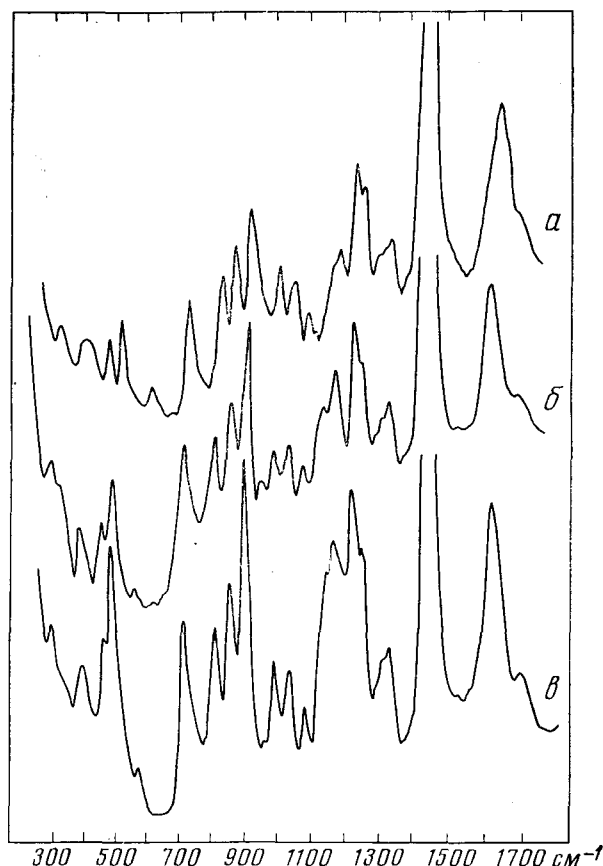


Рис. 25. Спектры КР лиофилизированных олигопролинов

на присутствие формы II. Все спектральные различия можно объяснить присутствием в лиофилизированных образцах «кристаллизационной воды». Уширение линии валентных колебаний группы  $C=O$  может быть вызвано образованием водородной связи, а образование водородной связи с растворителем может приводить к стабилизации неупорядоченной структуры тримера в структуру, подобную полипролину II<sup>17</sup>.

### Е. Спектры КР водных растворов полипептидов

О конформациях полипептидов в водных растворах известно гораздо меньше, чем об их строении в твердом состоянии. Основной причиной этого является отсутствие должной экспериментальной техники для определения конформационного состояния на молекулярном уровне. Общие размеры и форма молекулы могут быть определены с помощью техники рассеяния света и рентгеновских лучей, однако, более детальной информации не имеется. В результате многие вопросы остаются без ответа. Происходит ли изменение в структуре полипептида при растворении в воде? Какие структурные изменения вызывают различия во внешних условиях, таких как рН, ионная сила, температура и смешанные растворители?

Благодаря чувствительности спектроскопии КР к конформационным различиям и минимальному мешающему рассеянию воды можно попытаться ответить на многие из поставленных вопросов. Некоторые трудности возникают из-за того, что необходимые значения концентраций для получения качественных спектров КР обычно выше, чем те, которые встречаются в природных системах или использовались в прежних работах, а поэтому вполне оправдан вопрос о зависимости получаемых результатов от концентрации. Несмотря на это, в связи с непрерывным возрастанием мощности лазеров и улучшением техники спектрофотометрического детектирования и усиления, появилась возможность исследования полипептидов в весьма низкой концентрации и изучения влияния концентрации на структурные изменения. В то же время, спектроскопия КР представляет собой метод, позволяющий легко и быстро получать информацию о структуре биополимеров в водных растворах.

Рассеяние воды мешает получению спектра в области колебания амид I, однако, изучение растворов в  $D_2O$  позволяет избавиться от этой трудности. Так что, когда желательно изучить в спектре КР область колебания амид I, необходимо использовать в качестве растворителя тяжелую воду. Другие линии воды при 800, 450 и  $150\text{ см}^{-1}$  не создают трудностей благодаря своей низкой интенсивности.

Отношения сигнал — шум в спектрах КР водных растворов не такие высокие, как в спектрах твердых или жидких образцов. Причиной этих различий, по-видимому, являются оптические неоднородности водных растворов. Оптические неоднородности действуют как центры релеевского рассеяния, возбуждающая линия уширяется для жидкостей и высокий уровень рассеянного света в монохроматоре приводит к снижению отношения сигнал — шум. Кроме того, желание получить хорошие спектры КР при работе с минимально возможными концентрациями приводит к тому, что сигналы КР от растворов слабее и, соответственно, требуется более высокий уровень усиления.

Первый спектр КР водного раствора полипептида (поли-*L*-лизина) описан Эдсолом с сотр.<sup>14</sup> Спектр был зарегистрирован фотографически, и линии были крайне слабы. Для поли-*L*-лизина в неупорядоченной конформации конформационное изменение при переходе из твердого состояния в водный раствор отражается в изменении частоты колебания

амид III с  $1216$  до  $1243\text{ см}^{-1}$ <sup>38</sup>. Полагают, что поли-*L*-глутаминовая кислота при комнатной температуре и pH 10 принимает неупорядоченную конформацию с ионизованными боковыми карбоксильными группами и гидратированным пептидным остовом. Широкая линия амид I наблюдается при  $1665\text{ см}^{-1}$ <sup>39</sup>. В области колебания амид III Лорд и Ю<sup>39</sup> обнаружили только одну широкую линию при  $1250\text{ см}^{-1}$ .

В спектрах КР PGA в водных растворах при разных pH наблюдаются различия, указывающие на конформационные переходы<sup>37</sup>. Линия амид I в спектре D<sub>2</sub>O при *pD* 4,5 и 10,5 появляется при  $1665\text{ см}^{-1}$ . Веерные и крутильные колебания метиленовых групп, а также колебание амид III появляются с частотами  $1353$ ,  $1313$  и  $1249\text{ см}^{-1}$ , соответственно, при pH 11,4 и изменяются при уменьшении pH до  $1338$ ,  $1305$  и  $1238\text{ см}^{-1}$ . Валентное колебание связи C — C — N при уменьшении pH изменяется от  $949$  до  $931\text{ см}^{-1}$ .

### Ж. Структурные изменения при растворении в воде

Поли-*L*-пролин сохраняет свою конформацию в твердом состоянии из-за стерических факторов, а изолированная молекула в растворе не может образовать внутримолекулярную водородную связь, но, по-видимому, в водном растворе полипролин может сохранить прежнюю конформацию. Спектр КР 7,5% водного раствора полимера показан на рис. 26<sup>17</sup>. При сравнении спектров КР водного раствора и твердого поли-*L*-пролина

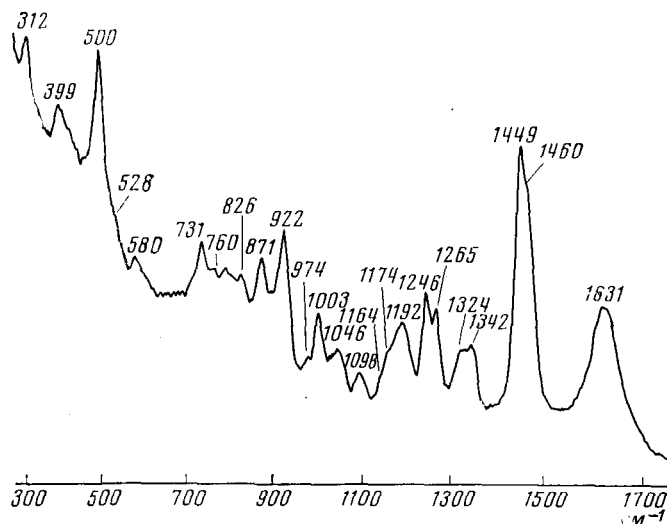


Рис. 26. Спектр КР поли-*L*-пролина II в воде

заметны только небольшие различия. Валентное колебание карбонильной группы с частотой  $1650\text{ см}^{-1}$  в спектре твердого поли-*L*-пролина изменяется до  $1631\text{ см}^{-1}$  в спектре водного раствора, что связано с образованием водородной связи между карбонильной группой и молекулой воды и не обязательно отражает конформационные изменения в полимере.

Линия при  $836\text{ см}^{-1}$  в спектре твердого полипролина смещается до  $826\text{ см}^{-1}$  в спектре водного раствора. Однако эта линия отнесена к колебанию пирролидинового кольца и, вероятно, отражает изменения в конформации кольца. Все остальные колебания в спектрах КР водных рас-

творов полипролина подобны по частоте и интенсивности тем же колебаниям в спектре твердого образца.

Деформационные скелетные и крутильные колебания, проявляющиеся ниже  $700\text{ см}^{-1}$ , должны быть чрезвычайно чувствительными к конформационным изменениям в молекуле и, тем не менее, сравнительные интенсивности и частоты этих колебаний имеют удивительное сходство в спектрах КР растворов и твердого состояния. Результаты анализа спектров КР указывают на то, что при растворении в воде полипролин не претерпевает конформационных изменений. Отсюда следует, что образование водородной связи с растворителем стабилизирует спиральную конформацию<sup>17</sup>.

Для растворимого в воде поли-*L*-оксипролина нет данных в пользу образования более одной конформации или изменения конформации при растворении. Спектр КР поли-*L*-оксипролина в водном растворе представлен на рис. 27<sup>13</sup>. В отличие от поли-*L*-пролина в спектрах КР поли-*L*-оксипролина в твердом состоянии и в водных растворах наблюдаются различия. Линия валентных колебаний группы  $\text{C}=\text{O}$  при  $1628\text{ см}^{-1}$  в спектре твердого поли-*L*-оксипролина смещается до  $1638\text{ см}^{-1}$  в  $\text{D}_2\text{O}$ . Линия при  $1452\text{ см}^{-1}$  в спектре твердого образца оказалась чувствительной к изменению рН раствора: при рН 1 она появляется при  $1466\text{ см}^{-1}$ , а при рН 13 — при  $1473\text{ см}^{-1}$ .

Различие в конформациях поли-*L*-оксипролина в твердом состоянии и в водном растворе невелики, о чем свидетельствует сходство спектров в конформационно чувствительной области  $700\text{—}150\text{ см}^{-1}$ .

Спектры КР диглицина и триглицина в твердом состоянии и в 10%-ном водном растворе различны<sup>15</sup>. Колебания амид III появляются в спектре КР в водном растворе, соответственно, при  $1266$  и  $1270\text{ см}^{-1}$  и не обнаруживаются в спектрах  $\beta$ -форм твердых образцов. Частота деформационных колебаний метиленовых групп изменяется от  $1446$  до

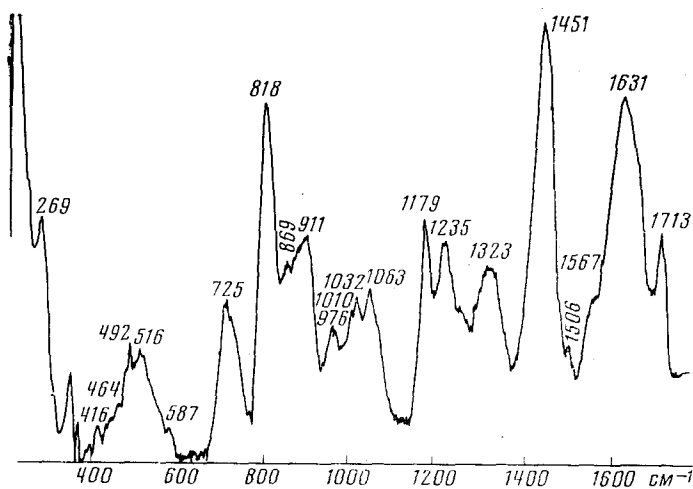


Рис. 27. Спектр КР поли-*L*-оксипролина (водный раствор)

$1420\text{ см}^{-1}$  в спектрах растворов, а частоты веерных колебаний  $\text{CH}_2$ -групп от  $1406$  до  $1391\text{ см}^{-1}$ . Эти спектральные различия являются характерным признаком образования в растворе поворотного изомера отличного от изомера, реализующегося в твердом состоянии<sup>15</sup>.



Спектры КР ди-*L*-аланина в 10-ном изоэлектрическом водном растворе и в твердом состоянии имеют небольшое различие, тогда как спектр три-*L*-аланина в растворе подобен спектру ди-*L*-аланина в твердом состоянии<sup>16</sup>. По-видимому, растворение плоского твердого три-*L*-аланина в  $H_2O$  приводит к разрушению межцепочечных водородных связей, что позволяет три-*L*-аланину принять в воде неплоскую неупорядоченную структуру. Сходство спектров ди- и трипептидов аланина в водном рас-

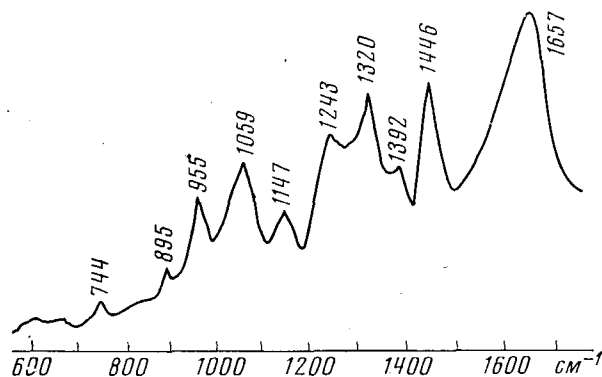


Рис. 28. Спектр КР хлоргидрата поли-*L*-лизина в водном растворе

творе указывает на то, что дипептид в твердом состоянии имеет неплоскую структуру.

Спектр КР водного раствора PLL·HCl, представленный на рис. 28 можно сопоставить со спектром этого же соединения в твердом состоянии, представленном на рис. 18<sup>38</sup>. Эти спектры уже ранее обсуждались. Спектр водного раствора свидетельствует о существовании PLL·HCl в растворе в неупорядоченной конформации<sup>38</sup>.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. L. L. Koenig, *Appl. Spec. Rev.*, **4**, 238 (1971).
2. J. T. Edsall, *J. Chem. Phys.*, **4**, 1 (1936).
3. R. C. Lord, Nai-Teng Yu, *J. Mol. Biol.*, **50**, 509 (1970).
4. J. T. Edsall, *J. Chem. Phys.*, **5**, 508 (1937).
5. J. T. Edsall, H. Scheinberg, Там же, **8**, 520 (1940).
6. J. T. Edsall, Там же, **5**, 225 (1937).
7. M. Takeda, R. E. S. Iavazzo, D. Garfinkel, I. H. Scheinberg, J. T. Edsall, *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 3818 (1958).
8. K. Krishnan, R. A. Plane, *Inorganic Chem.*, **6**, 55 (1967).
9. D. Garfinkel, J. T. Edsall, *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 3823 (1958).
10. R. S. Krishnan, K. Balasubramanian, *Proc. Ind. Acad. Sci.*, **48A**, 55 (1958).
11. K. Balasubramanian, *Proc. Ind. Acad. Sci.*, **48A**, 105 (1958).
12. D. Garfinkel, *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 3827 (1958).
13. M. J. Deveney, A. G. Walton, J. L. Koenig, *Biopolymers*, **10**, 615 (1971).
14. D. Garfinkel, J. T. Edsall, *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 3818 (1959).
15. M. Smith, A. G. Walton, J. L. Koenig, *Biopolymers*, **8**, 29 (1969).
16. P. Sutton, J. L. Koenig, Там же, **9**, 615 (1970).
17. W. B. Rippon, J. L. Koenig, A. G. Walton, *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 7455 (1970).
18. T. Miyazawa, E. R. Blout, Там же, **83**, 712 (1961).
19. M. Rothe, R. Theysohn, K. D. Steffen, H. Schneider, M. Zamani, M. Kostrzewa, *Angew. Chem.*, **8**, 919 (1969).
20. B. Fanconi, B. Tomlinson, L. A. Nafie, W. Small, W. L. Peticolas, *J. Chem. Phys.*, **51**, 3993 (1969).
21. C. H. Bamford, A. Elliott, W. E. Hamby, *Synthetic Polypeptides*, Academic Press, Inc., N. Y., 1956, Chap. 5.

22. K. Itoh, T. Nakahara, T. Shimanouchi, *Biopolymers*, **6**, 1759 (1968).
23. J. L. Koenig, P. L. Satton, Там же, **8**, 167 (1969).
24. B. Fanconi, E. Small, W. L. Peticolas, Там же, **10**, 1277 (1971).
25. K. Itoh, T. Shimanouchi, Там же, **9**, 383 (1970).
26. T. Miyazawa, K. Fukushima, S. Sugano, Y. Masuda, Academic Press, N. Y., 1967, т. II, стр. 557.
27. P. Higgs, *Proc. Roy. Soc. (London)*, Ser. A., **220**, 472 (1953).
28. G. Zerbi, *Appl. Spec. Rev.*, **2**, 193 (1969).
29. F. J. Boerio, J. L. Koenig, *Macromol. Rev.*, **C7**, 209 (1972).
30. E. B. Wilson, J. C. Decius, P. C. Cross, *Molecular Vibrations*, McGraw-Hill, N. Y., 1955.
31. M. J. Hannon, F. J. Boerio, J. L. Koenig, *J. Chem. Phys.*, **50**, 2829 (1969).
32. J. L. Koenig, P. Satton, *Biopolymers*, **10**, 89 (1971).
33. J. L. Koenig, P. Satton, Там же, **9**, 1229 (1970).
34. T. Long, T. M. Loehr, *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 21 (1970).
35. E. W. Small, B. Fanconi, W. L. Peticolas, *J. Chem. Phys.*, **52**, 4369 (1970).
36. R. D. Singh, V. D. Gupta, *Spectrochim. Acta*, **27A**, 385 (1971).
37. J. L. Koenig, B. G. Frushour, *Biopolymers*, **11**, 1871 (1972).
38. J. L. Koenig, P. L. Sutton, Там же, **9**, 1229 (1970).
39. R. C. Lord, Nai-Teng Yu., *J. Mol. Biol.*, **51**, 203 (1970).

Отделение высокомолекулярной химии  
Западного университета, Кливленд,  
Огайо, США

---