

ЧЕТЫРЕХФОТОННАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ СПИН-ИЗОМЕРОВ ВОДЫ В ГИДРАТНОЙ ОБОЛОЧКЕ БИОПОЛИМЕРОВ

А.Ф. Бункин

*Научный центр волновых исследований института общей физики
им. А.М.Прохорова*

abunkin@rambler.ru

Поступила 28.11.2011

С помощью нового метода нелинейной лазерной спектроскопии - низкочастотной спектроскопии четырехфотонного рассеяния (ЧФР) лазерного излучения был обнаружен существенный рост концентрации молекул орто- спин-изомеров H_2O и молекул H_2O_2 в гидратном слое на границе воды с молекулами ДНК, денатурированной ДНК и белка α -химотрипсин. Были получены спектры вращательных резонансов орто- и пара- спин-изомеров молекул H_2O в водных растворах различных биополимеров и в дистиллированной воде в диапазоне $0-100\text{ см}^{-1}$ со спектральным разрешением $0.05-0.1\text{ см}^{-1}$. Численный анализ спектров ЧФР показал, что концентрация молекул H_2O_2 в гидратном слое молекулы ДНК выросла в 3 раза после денатурации. Кроме того, были получены спектры ЧФР водных растворов белка α -химотрипсин в спектральном диапазоне $\pm 7\text{ см}^{-1}$ и концентрациях от 0 до 20 мг/см^3 . Обнаружено, что скорость гиперзвука водного раствора белка, измеряемая по сдвигу компонент Мандельштама-Бриллюэна (МБ) в спектре рассеяния, растет и имеет кубическую зависимость от концентрации.

УДК 539.19

Введение

В связи с развитием био- и нанотехнологий в настоящее время пристальное внимание уделяется изучению состояния вещества на границах, разделяющих воду и биомолекулы, а также воду в микро- и нано- капиллярах [1-5]. Физическое состояние воды в гидратной оболочке существенно зависит от характера взаимодействия молекулы H_2O и гидратируемой наночастицы. Так, еще в 1973 г. было высказано предположение [6],

что на границе воды и гидрофобной частицы должен образовываться слой, плотность которого существенно меньше плотности объемной воды, отстоящей от границы на расстояние более 3-5 размеров молекулы H_2O (1-1.5 нм). Это представление впоследствии было развито в теоретических работах [1, 2, 7], а также в последнее время нашло подтверждение в экспериментах по рассеянию рентгеновского излучения на границах воды и мономолекулярных слоев гидрофобных полимеров [8, 9], в исследованиях теплопроводности пограничных слоев воды и гидрофобных наночастиц [10].

С другой стороны, к настоящему времени накоплен обширный экспериментальный материал, убедительно показывающий, что гидрофильные биомолекулы, в частности, многие белки, структурируют молекулы воды в гидратном слое, создавая структуры, аналогичные гексагональному или кубическому льду при комнатной температуре [11-13]. Основные исследования в этой области проводятся по рассеянию рентгеновского излучения [11, 12] и медленных нейтронов. Существуют несколько работ по терагерцовой спектроскопии гидратных оболочек гидрофильных биомолекул [13, 14], полученных в тонких водяных пленках.

Основная трудность изучения гидратных слоев биомолекул и наночастиц с помощью оптической спектроскопии состоит в малом количестве молекул, входящих в гидратный слой, сигнал от которых нужно выделить на фоне сигнала молекул воды, расположенных вне этого слоя. Поэтому, применяемый метод должен быть неразрушающим, достаточно чувствительным (т.е. иметь высокое отношение сигнал – шум), он должен давать возможность проводить измерения в той спектральной области, где оптический спектр максимально зависит от межмолекулярных взаимодействий. Для воды этой областью является диапазон от единиц до $\sim 200 \text{ см}^{-1}$, где расположены трансляционные ($\sim 180 \text{ см}^{-1}$) и поперечные ($\sim 60 \text{ см}^{-1}$) межмолекулярные колебания.

Исследования в указанной области с помощью оптической спектроскопии являются трудноосуществимыми, поскольку, с одной стороны, в настоящее время отсутствуют эффективные, перестраиваемые в широкой области источники микроволнового излучения для терагерцовой спектроскопии. С другой стороны, успешному применению спонтанного комбинационного рассеяния (КР) препятствует слабость резонансов, относящихся к межмолекулярным колебаниям [15], и высокий уровень засветок вблизи возбуждающей линии, вызванных упругим рассеянием зондирующего лазерного излучения. Дополнительным препятствием для использования ИК спектроскопии является неконтролируемый нагрев образца и необходимость использования тонких слоев водных растворов, что приводит к возможному влиянию стенок кюветы.

Для решения указанных выше задач в наших работах [16-18, 21] была впервые использована спектроскопия четырехфотонного рассеяния (ЧФР) света, которая дает возможность существенно повысить отношение сигнал/шум, в частности, в низкочастотной области спектра, за счет фазирования в макроскопическом объеме молекулярных движений с помощью двух лазерных волн с частотами ω_1 и ω_2 , разность которых ($\omega_1 - \omega_2$) сканируется в широкой области спектра от ближнего ИК до микроволнового диапазона и может иметь знак плюс или минус (Стоксова или Анти-Стоксова области спектра). Измеряемым параметром служит интенсивность излучения на частоте $\omega_s = \omega_1 - (\omega_1 - \omega_2)$, прошедшего поляризационный анализатор, скрещенный с поляризацией волны $E^{(2)}$, нелинейный источник которого [19]:

$$P_i^{(3)} = 6\chi_{ijkl}^{(3)}(\omega_s; \omega_1; \omega_2; -\omega_1) E_j^{(1)} E_k^{(2)} E_l^{(1)*} \quad (1)$$

Здесь $\chi^{(3)}$ – кубическая восприимчивость среды, $E^{(1)}$ и $E^{(2)}$ – амплитуды взаимодействующих полей, интенсивность регистрируемого сигнала $I_s \propto |\chi^{(3)}|^2 I_1^2 I_2$. При настройке разности частот ($\omega_1 - \omega_2$) на частоту какого-либо колебательного или вращательного молекулярного резонанса на этом переходе в исследуемой среде возникает ансамбль коге-

рентных состояний, описываемым коллективными квантовомеханическими переменными [20].

Другой важной задачей, возникающей в физике жидкого состояния, и, в частности, в физике воды, является понимание особенностей водородной связи в средах, молекулы которых отличаются ядерным спином атомов водорода. Примером таких молекул являются орто- и пара- изомеры молекул воды, в которых суммарный спин атомов водорода равен либо 1 (орто - молекулы) либо 0 (пара - молекулы). Молекулы орто- и пара-изомеров H_2O в равновесных условиях существуют в концентрации 3:1. Они отличаются вращательным спектром [22] и хорошо идентифицируются в газовой фазе [23]. Ранее было обнаружено, что при пропускании водяного пара через пористый материал с развитой поверхностью, может происходить обогащение паров воды молекулами орто-изомеров [23]. Сорбция спин-изомеров на поверхности органических (ДНК, белок лизоцим) и неорганических соединений также происходит с различной скоростью [24].

Целью данной работы является регистрация и анализ спектров четырехфотонного рассеяния света в наиболее трудной для оптической и микроволновой спектроскопии области $0-100\text{ см}^{-1}$ в водных растворах ДНК, и белка. Основное внимание было уделено выделению в спектрах вращательных линий молекулы H_2O_2 и орто/пара спин-изомеров молекулы H_2O .

Эксперимент

Эксперименты проводились на установке, описанной в [25]. Две встречные волны $E^{(1)}$ и $E^{(2)}$ с частотами ω_1 и ω_2 распространялись в кювете с изучаемой жидкостью. Входное и выходное окна кюветы изготовлены из плавленого кварца и имели низкий уровень деполяризация проходящего лазерного излучения. Волна $E^{(1)}$ (излучение второй гармоники $Nd:YAG$ лазера, работающего на одной продольной моде) имела круговую поляризацию, перестраиваемая по частоте волна $E^{(2)}$ была линейно поляризована. При такой поляризации взаимодействующих волн в сигнале, определяемом нелинейностью (1), отсутствует нерезонансный вклад от электронной подсистемы среды [19].

Поскольку орты поляризации волны сигнала на частоте ω_s и волны $E^{(2)}$ неколлинеарны, а их направление распространения совпадает, сигнал четырехфотонного рассеяния выделялся призмой Глана. Ширина аппаратной функции спектрометра ($\sim 0.10\text{ см}^{-1}$) и возможный спектральный диапазон измерений (от -1200 до 300 см^{-1}) определялись выходными характеристиками лазера на красителе, который накачивался излучением третьей гармоники $Nd:YAG$ лазера и обеспечивал перестройку по частоте волны $E^{(2)}$ по программе, задаваемой в компьютере. Для каждого значения частоты ω_2 производилось усреднение сигнала по 10-30 отсчетам, затем частота лазера перестраивалась автоматически с шагом $\sim 0.119\text{ см}^{-1}$. Нулевая частотная отстройка привязывалась до 0.02 см^{-1} по резонансам Мандельштама-Бриллюэна, дальнейшая перестройка длины волны контролировалась по модам интерферометра Фабри-Перо с базой 7 мм. Ошибка измерения амплитуды сигнала четырехфотонного рассеяния задавалась программно и обычно не превышала 10%. Точность измерения частот резонансов определялась шириной аппаратной функции спектрометра (0.1 см^{-1}).

Измерения проводились в дважды дистиллированной воде, водных растворах белка α -химотрипсин (концентрация до 20 мг/мл), ДНК (15 мг/мл), денатурированной (нагреванием) ДНК, в 5% водном растворе перекиси водорода (H_2O_2). Сигнал четырехфотонного рассеяния возникал в области пересечения волн накачки длиной ~ 5 мм. Дополнительная дегазация изучаемых жидкостей не проводилась.

Результаты экспериментов

На рис.1 представлены спектры четырехфотонного рассеяния в диапазоне $-77 - 81\text{ см}^{-1}$ в водных растворах белка α -химотрипсин (концентрация 17 мг/мл) (2), ДНК

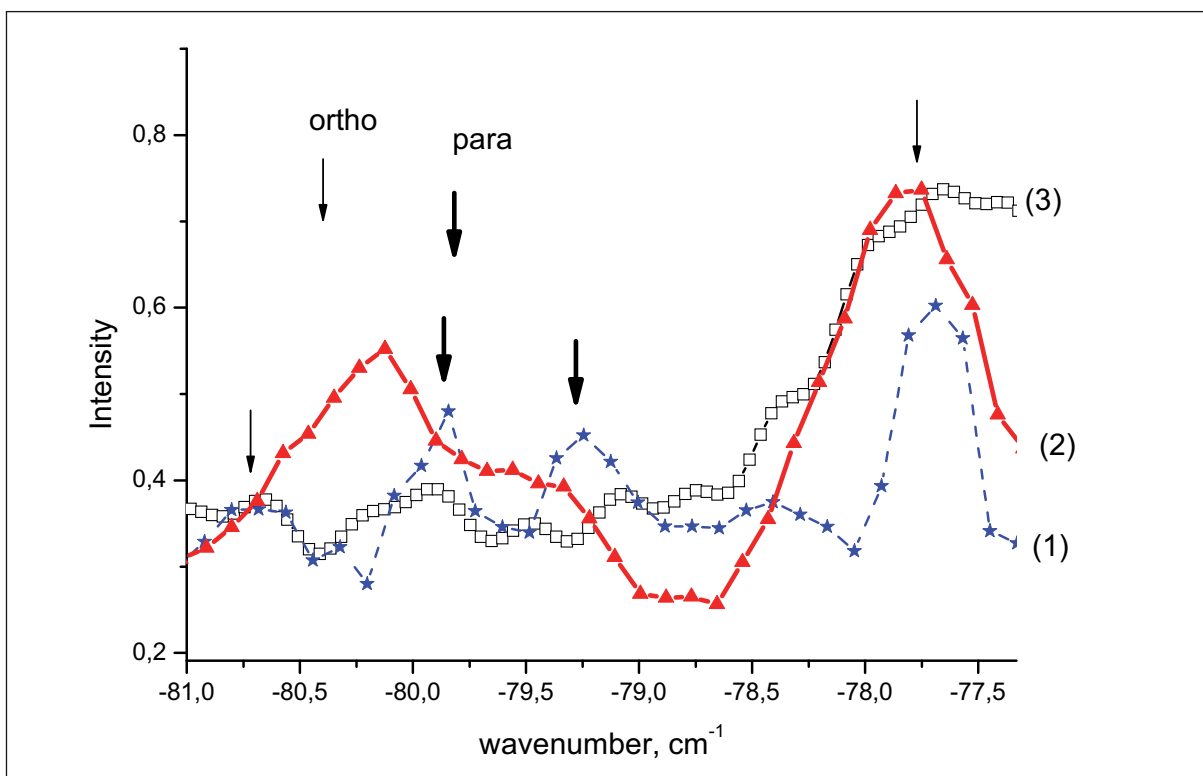


Рис.1. Спектры четырехфотонного рассеяния лазерного излучения в дважды дистиллированной воде (1), водных растворах белка α -химотрипсин (концентрация 17 мг/мл) (2) и ДНК (15мг/мл) (3) в диапазоне $-77 - 81 \text{ см}^{-1}$. Тонкие стрелки обозначают резонансы орто- спин-изомеров H_2O , эти резонансы присутствуют как в спектре дважды дистиллированной воды, так и в спектрах водных растворах обоих биополимеров. Толстые стрелки обозначают резонансы пара- спин-изомеров H_2O . Видно, что вклад пара- спин-изомеров H_2O подавлен в спектрах белка и ДНК.

(15мг/мл) (3) и для сравнения приведен спектр бидистиллированной воды, умноженный в ~ 8 раз (1). Резонансы орто- (пара-) спин-изомеров H_2O обозначены стрелками разного вида. Видно, что резонансы орто- спин-изомеров H_2O (тонкие стрелки) присутствуют как в спектре дважды дистиллированной воды, так и в спектрах водных растворах обоих биополимеров, тогда как вклад резонансов пара- спин-изомеров H_2O (толстые стрелки) в спектры белка и ДНК подавлены. В спектрах обоих растворов наблюдается существенный рост (в ~ 8 раз) вклада вращательного спектра в сигнал четырехфотонного рассеяния, по сравнению с дистиллированной водой.

На рис.2 изображены спектры четырехфотонного рассеяния водных растворов нативной ДНК (15мг/мл) и денатурированной ДНК через 2 часа после нагревания. (умноженный в 2.5 раза). В спектрах видны вращательные резонансы орто- и пара- спин-изомеров молекулы H_2O , а также молекул H_2O_2 , обозначенные так же как на Рис.1. Видно, что денатурация ДНК в водном растворе приводит к существенной модификации вращательного спектра молекул H_2O . В частности, происходит примерно трехкратное уменьшение интенсивности вращательных линий. В отличие от водного раствора «живой» ДНК, в растворе денатурированной ДНК вращательные резонансы пара- спин-изомеров H_2O хорошо видны. Вблизи -80 и -79 см^{-1} на спектрах бидистиллированной воды (1) и денатурированной ДНК (2) отчетливо видны вращательные линии пара- спин-изомеров H_2O , тогда как в спектре «живой» ДНК вклад этих линий существенно подавлен. В спектре денатурированной ДНК (2) также заметен рост вращательных линий H_2O_2 .

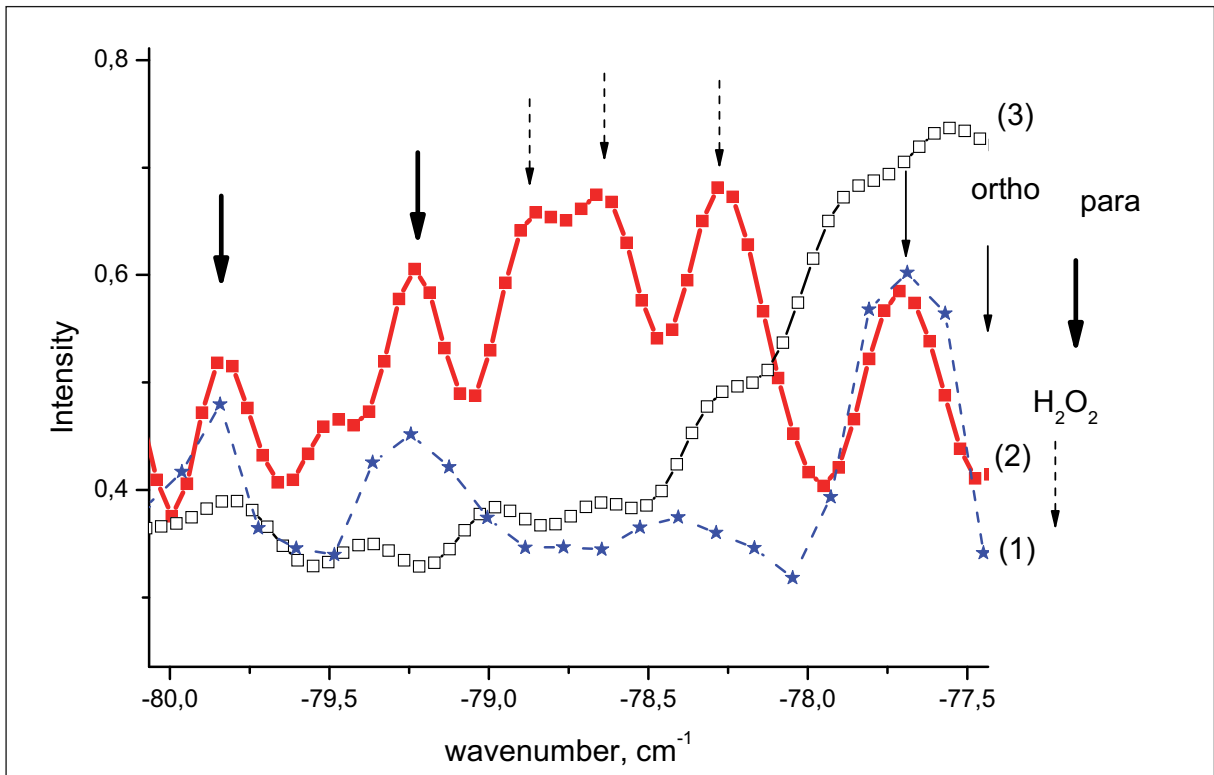


Рис.2. Спектры четырехфотонного рассеяния в дважды дистиллированной воде (1) и в водных растворах денатурированной ДНК (2) и ДНК (3). Вблизи -80 и -79 cm^{-1} на спектрах (1) и (2) видны вращательные линии пара- спин-изомеров H_2O .

На рис. 3 изображены спектры ЧФР дважды дистиллированной воды и водного раствора белка α -химотрипсин в концентрации 10 mg/ml в диапазоне ± 3 cm^{-1} (± 90 ГГц). Каждая экспериментальная точка накапливалась по 30 лазерным вспышкам с шагом ~ 0.12 cm^{-1} .

Две линии в середине каждого спектра на рис. 3 (отмеченные жирными стрелками) являются резонансами Мандельштама-Бриллюэна. Тонкие и пунктирные стрелки показывают вращательную линию ($4_{14} - 3_{21}$) (± 2.26 cm^{-1}) молекулы H_2O (орто- спин-изомер) и линии ($2_{11} - 1_{01}$) (± 1.25 cm^{-1}), ($8_{27} - 9_{19}$) (± 1.47 cm^{-1}), ($7_{07} - 7_{17}$) (± 2.5 cm^{-1}) молекулы H_2O_2 . Здесь, в скобках и над стрелками указаны вращательные квантовые числа J , K_a , K_c , начального и конечного уровней соответствующих переходов основного изотопа молекул H_2O и H_2O_2 , а также волновые числа соответствующих переходов КР согласно классификации [22]. Из Рис. 3 видно, что сдвиг резонанса Мандельштама-Бриллюэна относительно нулевой частоты в водном растворе белка существенно превосходит этот сдвиг в дистиллированной воде, что свидетельствует о росте продольной скорости звука в водном растворе белка.

Рис. 4 демонстрирует рост смещения резонанса МБ от концентрации белка в водном растворе. Мы обнаружили, что сдвиг МБ резонанса в водном растворе при изменении относительной концентрации белка $\Delta\nu_B$ может быть аппроксимирован следующей зависимостью:

$$\Delta\nu_B = 0.25 + (5 \cdot 10^{16}) P^3 \quad (2)$$

где P – относительная концентрация белка в водном растворе. На рис. 4 сплошная кривая – подгонка по (2), точки – эксперимент.

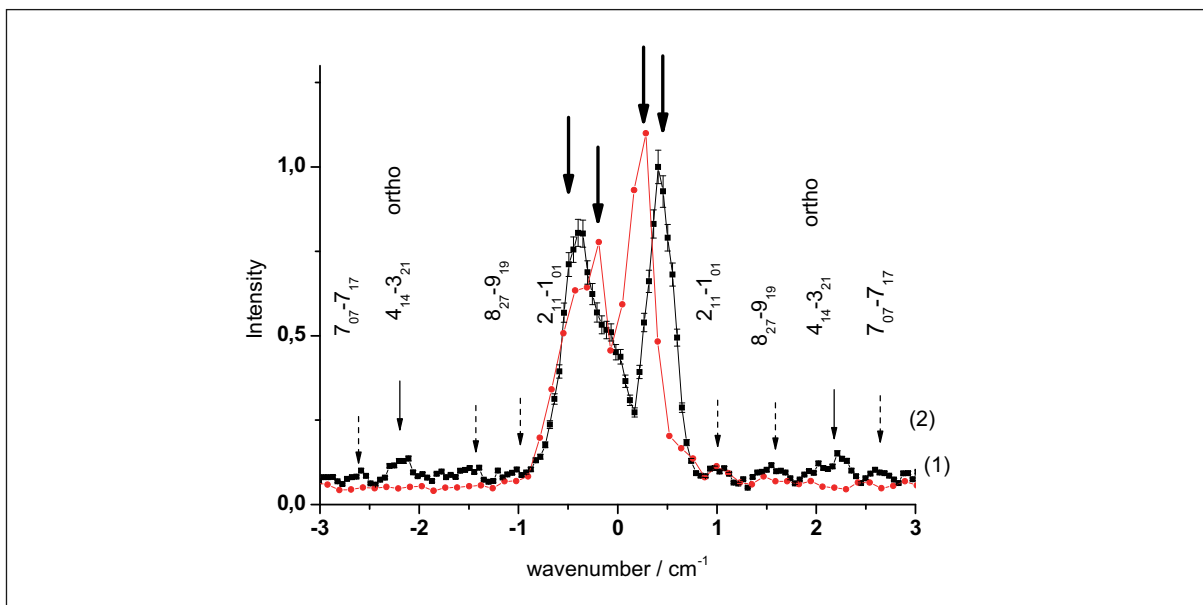


Рис.3. Фрагмент спектра четырехфотонного рассеяния в дважды дистиллированной воде (кривая 1, круги) и в водном растворе белка α -химотрипсин в концентрации 10мг/мл (кривая 2, квадраты). Две линии в середине каждого спектра (отмеченные жирными стрелками) являются резонансами Мандельштама- Бриллюэна. Тонкие и пунктирные стрелки показывают вращательные линии КР ($4_{14}-3_{21}$) ($\pm 2.26 \text{ см}^{-1}$) орто- спин-изомера H_2O и ($2_{11}-1_{01}$) ($\pm 1.25 \text{ см}^{-1}$), ($8_{27}-9_{19}$) ($\pm 1.47 \text{ см}^{-1}$), ($7_{07}-7_{17}$) ($\pm 2.5 \text{ см}^{-1}$) вращательные резонансы H_2O_2 , соответственно.

Сдвиг частоты МБ резонанса определяется [26]:

$$\Delta\nu_B = V_S (2n \sin \varphi/2)/C\lambda \quad (3)$$

Здесь n – показатель преломления, λ – длина волны падающего лазерного излучения, φ – угол между падающим и рассеянным излучениями, V_S – продольная скорость звука в исследуемом веществе, C – скорость звука в вакууме. Для дистиллированной воды при комнатной температуре: $n=1.33$, $V_S=1490 \text{ м/с}$ и для условий нашего эксперимента $\lambda=532 \text{ нм}$ и $\varphi=\pi$ согласно (3) $\Delta\nu_B = 0.25 \text{ см}^{-1}$. Известно, что скорость звука V_S зависит от адиабатической сжимаемости K_S вещества [26]:

$$(V_S)^2 = (\rho K_S)^{-1}, \quad (4)$$

где ρ – плотность вещества. Заметный рост $\Delta\nu_B$ (в 1.6 раз) по сравнению с водой, означающий соответствующий рост скорости звука при увеличении концентрации белка в водном растворе (рис. 4) свидетельствует о снижении сжимаемости (повышении упругости) воды после внесения молекул белка α -химотрипсин. Этот факт свидетельствует о возникновении льдоподобных структур в гидратном слое молекул белка, т.к. $\Delta\nu_B$ в гексагональном льду в 2.7 раза больше, чем в дистиллированной воде.

На рис. 5 показаны спектры ЧФР в диапазоне от 1 до -7 см^{-1} в водном растворе ДНК, 15 мг/см^3 , (квадраты) и в дважды дистиллированной воде (круги), где толстые и тонкие стрелки обозначают резонансы Мандельштама-Бриллюэна и Рэлея, соответственно. Для удобства анализа спектры нормированы на амплитуду компоненты Мандельштама-Бриллюэна. Пунктирные и штрихпунктирные стрелки обозначают различные вращательные переходы молекул H_2O и H_2O_2 по аналогии с обозначениями на рис.1-3. На рис. 5 ясно видно, что вклад в сигнал ЧФР от вращательных резонансов мо-

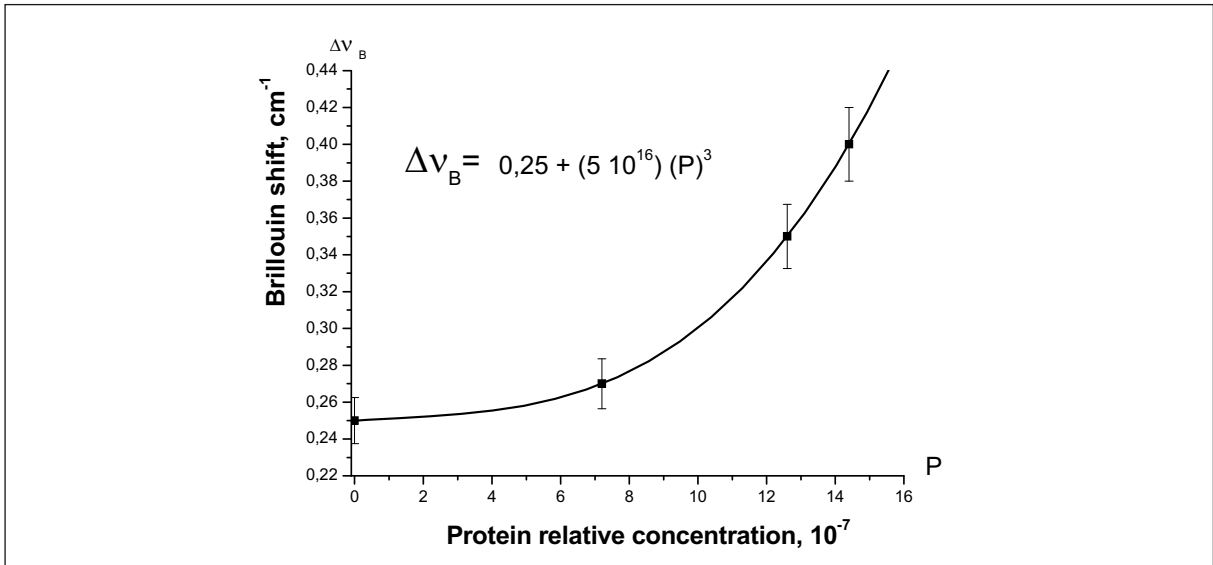


Рис.4. Зависимость сдвига МБ резонанса в водном растворе от концентрации белка в диапазоне от 0 до 1.5 млн⁻¹.

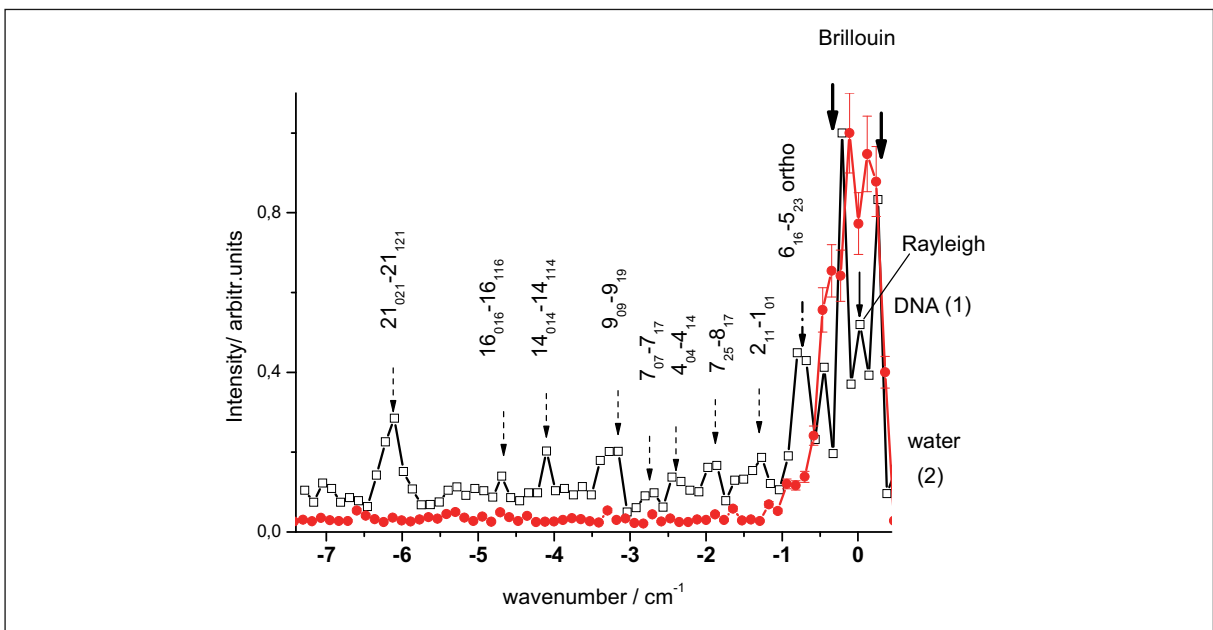


Рис.5. Спектры ЧФР водного раствора ДНК (квадраты, кривая 1) и дважды дистиллированной воды (круги, кривая 2). Толстые и тонкие стрелки обозначают резонансы МБ и Рэлея, соответственно. Пунктирные стрелки обозначают различные вращательные резонансы молекулы H_2O_2 . Штрихпунктирная стрелка обозначает резонанс $(6_{16} - 5_{23}) (\pm 0.74 \text{ см}^{-1})$ орто- спин изомера молекулы H_2O .

лекул H_2O и H_2O_2 существенно растет в спектре водного раствора ДНК (1) по сравнению со спектром дважды дистиллированной воды (2).

На рис.6 показаны экспериментальный (1) (квадраты, тонкая кривая) и расчетный (2) (пунктирная кривая) спектры ЧФР в водном растворе ДНК (15 мг/см^3), а также экспериментальный (3) (треугольники) и расчетный (4) (сплошная кривая) спектры ЧФР водного раствора денатурированной ДНК при той же концентрации. Для расчета спектров ЧФР использовались стандартные выражения [19]:

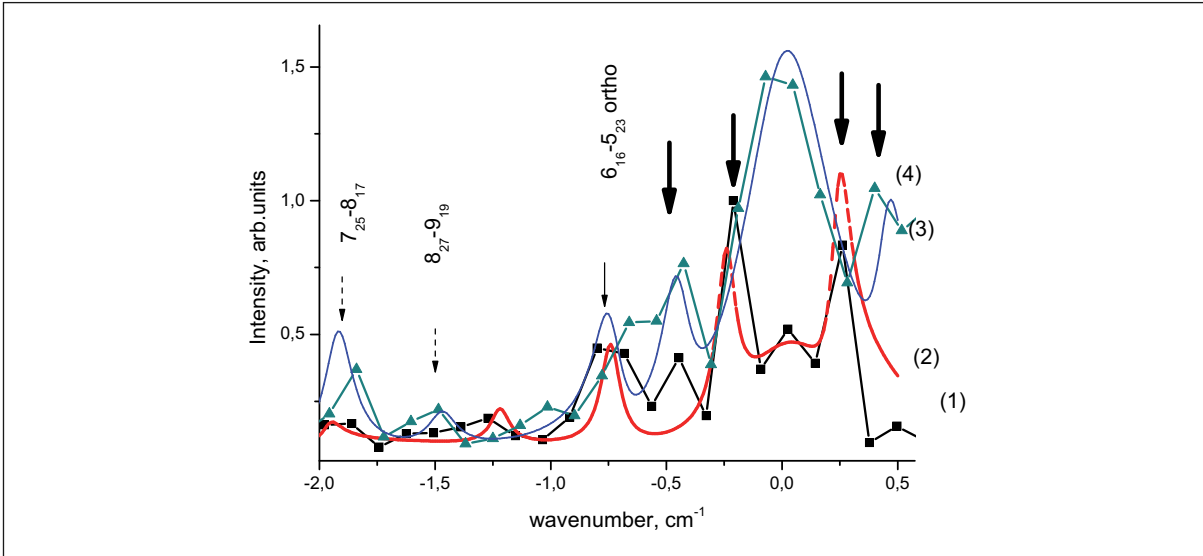


Рис. 6. Экспериментальный (1) (квадраты, тонкая кривая) и расчетный (2) (пунктирная линия) ЧФР спектры водного раствора ДНК (15 мг/см^3), а также экспериментальный (3) (треугольники) и расчетный (4) (сплошная кривая) спектры ЧФР водного раствора денатурированной ДНК при той же концентрации. Пунктирные и тонкая стрелки обозначают вращательные резонансы молекул H_2O_2 и H_2O , толстые стрелки обозначают резонансы МБ.

$$\chi^{(3)} = \chi^{NR} + \chi^B / (-i + (\Delta \pm \Omega_b) / \Gamma_{ap}) + \chi^R / (-i + \Delta / \Gamma_R) + \sum_n \chi_n^{rot} / (-i + (\Delta \pm \Omega_n) / \Gamma_{ap})$$

$$I_s \propto |\chi^{(3)}|^2 I_1^2 I_2 \quad (5)$$

где $2\Gamma_{ap}$ – спектральное разрешение спектрометра ЧФР, равное в наших экспериментах (0.10 см^{-1}), Γ_R – полуширина крыла Рэля исследуемого раствора (подгоночный параметр), i – мнимая единица, χ_n^{rot} и Ω_n резонансная нелинейная восприимчивость и частота вращательного резонанса в (см^{-1}) для молекул H_2O_2 и H_2O , Ω_b – частота резонанса Мандельштама-Бриллюэна для водных растворов ДНК и денатурированной ДНК, измеряемые экспериментально, $\Delta = (\omega_1 - \omega_2) / 2\pi C$ – частотная отстройка (в см^{-1}), χ^B , χ^R и χ^{NR} – нелинейные восприимчивости резонансов Мандельштама-Бриллюэна и Рэля, а также нерезонансная нелинейная восприимчивость раствора, соответственно. Спектроскопические параметры резонансов молекул H_2O_2 и H_2O взяты из [22]. Относительная концентрация молекул H_2O_2 и H_2O в этих расчетах являлась подгоночным параметром. Рост концентрации перекиси водорода при денатурации ДНК оценивался путем сравнения параметров подгонки спектров ЧФР для растворов ДНК (кривая 2, Рис.6) и денатурированной ДНК (кривая 4, Рис.6). Из Рис.6 видно, что расчетные и экспериментальные спектры находятся в удовлетворительном согласии. Сравнение спектроскопических параметров линии $7_{25}-8_{17}$ (1.93 см^{-1}) H_2O_2 для расчетных ЧФР спектров нативной (2) $\chi^{rot}/\chi^B=0.4$ и денатурированной (4) $\chi^{rot}/\chi^B=1.3$ ДНК показывает, что концентрация H_2O_2 вблизи молекул ДНК растет при денатурации более чем в 3 раза.

Обсуждение

Описанные здесь эксперименты показывают, что в спектрах четырехфотонного рассеяния лазерного излучения в водных растворах биополимеров возникают узкие резонансы, частоты которых с точностью до ширины аппаратной функции спектрометра совпадают с частотами вращательных переходов основного электронного и колеба-

тельного состояния молекул H_2O и H_2O_2 . Рост резонансного вклада вращательных переходов молекул H_2O и H_2O_2 при растворении в воде молекул ДНК и при денатурации ДНК в водном растворе отражает тот факт, что на границе вода/биополимер образуется слой воды, имеющий свойства, отличные от свойств воды в объеме, и эти свойства испытывают дальнейшие изменения при денатурации ДНК [2, 17, 18].

Также известно [27, 28], что гидратация биомолекул может приводить к структурированию молекул воды гидратной оболочки в ансамбли, подобные кристаллической решетке гексагонального льда. Это свойство качественно подтверждается в наших экспериментах ростом сдвига МБ резонанса и соответствующим уменьшением сжимаемости раствора при увеличении концентрации белка в водном растворе (рис. 4). Аналогичный рост сдвига МБ резонанса наблюдается при денатурации ДНК (рис. 6).

Спектры ЧФР водных растворов биополимеров демонстрируют существенный рост резонансного вклада в сигнал ЧФР от вращательных переходов молекул H_2O и H_2O_2 по сравнению со спектром дистиллированной воды (рис. 1, 2, 5). Этот факт позволяет заключить, что молекулы биополимеров позволяют существенно увеличить эффективную концентрацию свободных молекул H_2O и H_2O_2 в растворе. Отметим, что подобное явление недавно наблюдалось в водных суспензиях углеродных нанотрубок [16] с гидрофобной поверхностью.

Кубическая зависимость величины сдвига Бриллюэновских компонент от концентрации белка в водном растворе (рис. 4) косвенно указывает на то, что гидратный слой формируется в объеме вокруг всей молекулы белка. В противном случае, если бы формирование слоя происходило вдоль выделенного направления или плоскости, то концентрационная зависимость сдвига имела бы меньшее значение показателя степени. Возможно, именно этот фактор (толщина гидратного слоя) ограничивает растворимость белков в воде и определяет концентрацию насыщения при данной температуре. Очевидно, что повышение температуры будет сопровождаться «расплавлением» гидратного слоя, уменьшением его толщины, что приведет к повышению концентрации насыщения.

Выводы

Таким образом, четырехфотонная спектроскопия воды и водных растворов белков и ДНК показала, что формирование гидратной оболочки биомолекул сопровождается значительной перестройкой структуры сетки водородных связей молекул воды. Часть молекул H_2O в окрестности, по-видимому, гидрофильных остатков биомолекул образует льдоподобную структуру, что проявляется в увеличении сдвига компонент Бриллюэна. При этом другая часть молекул H_2O в процессе разрыва и образования новых водородных связей испытывает свободное вращение, по-видимому, в окрестности гидрофобных остатков биомолекул, поскольку в суспензии гидрофобных углеродных нанотрубок наблюдается рост интенсивности вращательных линий молекулы H_2O [16].

Эти выводы согласуются с данными спектроскопии объемной воды методом малоуглового рассеяния рентгеновских пучков [29], в которых одновременно наблюдался характерный пик тетрагональных кластеров и свободных молекул. Кроме этого, недавно [30] в огибающей ОН полосы валентных колебаний в спектре комбинационного рассеяния импульсов второй гармоники *Nd:YAG* лазера в объемной воде мы наблюдали характеристические компоненты (3320 см^{-1}) гексамерных (льдоподобных) и тетрамерных (3450 см^{-1}) кластеров. Существенно, что при нагревании воды до $99\text{ }^{\circ}\text{C}$ положение этих частот сохранялось, а амплитуды изменялись в противофазе: вклад гексамерных кластеров уменьшался, а малоразмерных – увеличивался, как и в работе [29].

Данная работа частично поддержана грантами РФФИ 11-02-00034, 11-02-01202 и программой РАН «Оптическая спектроскопия и стандарты частоты».

Литература

1. *Garde S., Hammer G., Garcia A.E., Paulaitis M.E., Pratt L.R.*, Phys. Rev. Lett. **77**, 4966 (1998).
2. *Miller T.F., Vanden-Eijnden E., Chandler D.*, Proc. Natl. Acad. Sci. **104**, 14559, (2007).
3. *Liu P., Huang X.H., Zhou R.H., Berne B.J.*, Nature (London) **437**, 159 (2005).
4. *Zhu Y., Granick S.*, Phys. Rev. Lett. **88**, 106102 (2002).
5. *Levy Y., Onuchic J.N.*, Proc. Natl. Acad. Sci. **101**, 3325 (2004).
6. *Stillinger F.H.*, J. Solution Chem. **2**, 141 (1973).
7. *Willard A.P., Chandler D.* J. Phys. Chem. B **112**, 6187 (2008).
8. *Poynor A., Hong L., Robinson I.K., Granick S., Zhang Z., Fenter P.A.*, Phys. Rev. Lett. **97**, 266101, (2006).
9. *Mezger M., Reichert H., Schöder S., Okasinski J., Schröder H., Dosch H., Palms D., Ralston J., Honkimäki V.*, Proc. Natl. Acad. Sci. **103**, 18401 (2006).
10. *Ge Z., Cahill D.G., Braun P.V.*, Phys. Rev. Lett. **96**, 186101, (2006).
11. *Liou Y.-C., Tocilj A., Davies P.L., Jia Z.*, Nature 2000; **406**: 322.
12. *Graether S.P., Kuiper M.J., Gagne S.M., Walker V.K., Jia Z., Sykes B.D., Davies P.L.*, Nature 2000; **406**: 325.
13. *Heugen U., Schwaab G., Brundermann E., Heyden M., Yu X., Leitner D.M., Havenith M.*, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 2006; **103**: 12301.
14. *Ebbinghaus S., Kim S.J., Heyden M., Yu X., Gruebele M., Leitner D.M., Havenith M.*, J. Am. Chem. Soc. 2008, **130**, 2374.
15. *Eisenberg D., Kauzmann W.*, The Structure and Properties of Water, (Clarendon Press, Oxford, 2005).
16. *Бункин А.Ф., Першин С.М., Горчаков А.П., Нурматов А.А.*, Письма в ЖТФ, **32**, 20 (2006).
17. *Бункин А.Ф., Нурматов А.А., Першин С.М.*, УФН, **176**, 883 (2006).
18. *Bunkin A.F., Pershin S.M.*, Journal of Raman Spectroscopy, **39**, 726 (2008).
19. *Ахманов С.А., Коротеев Н.И.* Методы нелинейной оптики в спектроскопии рассеяния света (М.: Наука, 1981).
20. *Андреев А.В., Емельянов В.И., Ильинский Ю.А.* Кооперативные явления в оптике (М.: Наука, 1988).
21. *Bunkin A.F., Nurmatov A.A., Pershin S.M.*, Laser Phys. **17**, 22 (2007).
22. *Rothman L., Jacquemart D., Barbe A., Benner D.C., Birk M., Brown L.R., Carleer M.R., Chackerian C., Chance Jr.K., Coudert L.H., Dana V., Devi V.M., Flaud J.M., Gamache R.R., Goldman A., Hartmann J.M., Jucks K.W., Maki A.G., Mandin J.Y., Massie S.T., Orphal J., Perrin A., Rinsland C.P., Smith M.A.H., Tennyson J., Tolchenov R.N., Toth R.A., Auwera V.J., Varanasi P., Wagner G.*, J. Quant. Spectr. Radiant. Transfer. **96**, 139 (2005). www.elsevier.com/locate/jqsrt
23. *Tikhonov V.I., Volkov A.A.*, Science **296**, 2363, (2002).
24. *Potekhin S.A., Khusainova R.S.*, Biophysical Chemistry **118**, 79, (2005).
25. *Bunkin A.F., Nurmatov A.A.* Laser Physics, **13**, 328, (2003).
26. *Fabelinskii I.L.* Physics – Uspekhi. 1994; **37**: 821.
27. *Yamaguchi T., Chong S.-H., Hirata F.* J. Chem. Phys., **119**, 1021 (2003).
28. *Yamaguchi T., Matsuoka T., Koda S.* J. Chem. Phys., **120**, 7590 (2004).
29. *Huanga H. C., Wikfeldt K. T., Tokushimac T., Nordlunda D., Haradac Y., Bergmanna U., Niebuhra M., Weissa T. M., Horikawac Y., Leetmaab M., Ljungberg M. P., Takahashif O., Lenzg A., Ojama`eg L., Lyubartsev A. P., Shinc S., Petterssonb L. G. M., Nilsson A.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **106**(36), 15214 (2009), www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0904743106.
30. *Першин С.М., Бункин А.Ф., Лукьянченко В.А.*, Квант. электроника, 2010, **40** (12), 1146.

FOUR-PHOTON SPECTROSCOPY OF WATER SPIN-ISOMERS IN BIOPOLYMERS HYDRATION SHELL

A.F. Bunkin

Wave Research Center, Prokhorov General Physics Institute of Russian Academy of Sciences

abunkin@rambler.ru

Received 28.11.2011

The novel method of nonlinear laser spectroscopy – low frequency four-photon spectroscopy (FPS) has been applied to detection of considerable growth of H₂O ortho- spin isomer and also H₂O₂ molecules concentration in α -chymotrypsin protein, DNA and denatured DNA hydration shells in aqueous solutions. The sharp spectra of rotational resonances of H₂O molecule ortho- and para- spin isomers have been observed in different biopolymers aqueous solutions and also in distilled water in the range from zero to 100 cm⁻¹ with the spectral resolution 0.05-0.1 cm⁻¹. The fitting of four-wave mixing spectra shows notable growth of the H₂O₂ concentration and rotational line's amplitude by a factor of ~3 in DNA solutions due to denaturizing. Besides, we studied the FPS spectra of α -chymotrypsin protein aqueous solutions at the protein concentrations between 0 and 20 mg/cm³ in the range ± 7 cm⁻¹. We found that the sound velocity of protein aqueous solution obeys a cubic dependence on the protein concentration and reach a value of about 3 000 m/s at 20 mg/ cm³