

## НИЗКОЧАСТОТНАЯ ЛАЗЕРНАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ ЧЕТЫРЕХФОТОННОГО РАССЕЙЯНИЯ СВЕТА В ГИДРАТНЫХ ОБОЛОЧКАХ БИОПОЛИМЕРОВ И УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБОК

А.Ф.Бункин, С.М.Першин

Институт общей физики РАН, 119991, ул.Вавилова, 38, Москва, Россия, [abunkin@orc.ru](mailto:abunkin@orc.ru); [pershin@orc.ru](mailto:pershin@orc.ru)

### ВВЕДЕНИЕ

В связи с развитием био- и нанотехнологий в последнее время пристальное внимание уделяется изучению состояния вещества на границах, разделяющих воду и биомолекулы, воду и гидрофильные/гидрофобные наночастицы, нанок капли масла, 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 воды в остальном объеме. Это представление было развито в теоретических работах [1,2,7], а также в последнее время нашло экспериментальное подтверждение в работах 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, лактоза, структурируют молекулы воды в гидратном слое, создавая структуры, аналогичные гексагональному или кубическому льду при комнатной температуре [11-13]. Этим свойством, в частности, обладают белки, входящие в состав хитинового покрытия насекомых [11,12]. По этой причине насекомые легко переносят многократное замораживание/размораживание, т.к. вода в их хитиновых панцирях всегда имеет структуру гексагонального льда [11]. 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 исследования 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 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 и чувствительные приемники для осуществления ИК и микроволновой спектроскопии. С другой стороны, успешному применению спонтанного комбинационного рассеяния (КР) препятствует низкая интенсивность резонансных линий, относящихся к межмолекулярным колебаниям [15], и высокий уровень засветок вблизи возбуждающей линии, вызванных упругим рассеянием зондирующего лазерного излучения. Дополнительным препятствием для использования ИК и микроволновой спектроскопии является необходимость использования тонких слоев водных растворов с неустраняемым влиянием границы раздела воздух-жидкость в свободно истекающей струе либо жидкость-стенка в кювете. Кроме этого спектроскопия поглощения (ИК и микроволновая) всегда сопровождается неконтролируемым нагревом образца.

Для решения задач такого типа и принципиального исключения влияния рассмотренных факторов может быть эффективно использована лазерная спектроскопия четырехфотонного рассеяния (ЧФР) света [16-18]. Эта нелинейно-оптическая спектроскопия дает возможность существенно повысить отношение сигнал/шум, в частности, в низкочастотной области спектра за счет фазирования в макроскопическом объеме атомных и молекулярных движений с помощью двух лазерных волн с частотами  $\omega_1$  и  $\omega_2$ , разность которых  $(\omega_1 - \omega_2)$  сканируется в широкой области спектра от ближнего ИК до сантиметрового диапазона без изменения схемы измерения. 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 когерентных состояний, описываемым коллективными квантовомеханическими переменными [20].

В наших работах [16-18] в области  $0-100 \text{ см}^{-1}$  с помощью этого подхода был обнаружен вращательный спектр молекул  $\text{H}_2\text{O}$  и  $\text{D}_2\text{O}$  в легкой и тяжелой воде, соответственно, частоты которого совпадали в пределах ошибки  $\pm 0.2 \text{ см}^{-1}$  с вращательными резонансами этих молекул в газовой фазе. В водных растворах перекиси водорода [16] при тех же частотных отстройках наблюдалось существенное (на порядок) усиление вклада вращательных резонансов молекул воды в сигнал четырехфотонного рассеяния. Существенно, что аналогичный эффект увеличения интенсивности линий вращательных переходов наблюдался при повышении температуры воды [21], что было ожидаемо и согласуется с термодинамикой. Значит, обнаруженные резонансы действительно отражают вращательное движение свободных молекул  $\text{H}_2\text{O}$  в воде.

### ОРТО И ПАРА-СПИН ИЗОМЕРЫ $\text{H}_2\text{O}$ В ВОДЕ

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- спин-изомеры молекулы воды, в которых суммарный спин атомов водорода равен либо 1 (орто - молекулы) либо 0 (пара - молекулы). Молекулы орто- и пара- изомеров  $\text{H}_2\text{O}$  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, происходит 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].

Предполагается, что наблюдаемое селективное связывание спин-изомеров объясняется тем, что непрерывно вращающиеся орто-изомеры молекулы воды обладают большей подвижностью, тогда как пара-молекулы характеризуются большей способностью к образованию комплексов, поскольку в основном состоянии часть молекул не вращается. При этом первый уровень орто-изомеров смещен от нулевого уровня на  $23.8 \text{ см}^{-1}$ , поэтому в свободном состоянии эти молекулы вращаются всегда. Механизм образования и существования, а также спектроскопические проявления орто- и пара-изомеров воды в жидкой фазе остаются пока до конца неясными. Не было установлено также, существует ли какая-либо селективность спин-изомеров при межмолекулярных взаимодействиях в водных растворах.

Целью экспериментов, описанию которых посвящена данная работа, являлась регистрация спектров ЧФР в диапазоне  $\pm 250 \text{ см}^{-1}$  с высоким спектральным разрешением в дистиллированной воде, в растворах и суспензиях различных биополимеров и углеродных нанотрубок. В указанном спектральном диапазоне сосредоточены вращательные переходы основного электронного состояния молекул  $\text{H}_2\text{O}$  и  $\text{H}_2\text{O}_2$ , а также резонансы продольных и поперечных межмолекулярных колебаний молекул  $\text{H}_2\text{O}$  в воде. Сравнение вращательных спектров орто- и пара-изомеров молекулы  $\text{H}_2\text{O}$  в дистиллированной воде и в водных растворах обычных и денатурированных молекул ДНК, в молекулах белков позволили обнаружить селективность взаимодействия данных молекул и пара-изомеров молекулы  $\text{H}_2\text{O}$ . Сопоставление спектров водных растворов и суспензий биополимеров и углеродных нанотрубок, с одной стороны, и водных растворов перекиси водорода, с другой, позволили впервые в прямом эксперименте по спектральным линиям установить факт образования молекул  $\text{H}_2\text{O}_2$  на поверхности некоторых биополимеров и наночастиц в водной среде, ранее наблюдавшихся по косвенным признакам [25].

Изучение ЧФР лазерного излучения в области  $\pm 3 \text{ см}^{-1}$  показало значительное отличие спектров водных суспензий гидрофобных и гидрофильных примесей, позволяющее предположить существование льдоподобных структур на границе гидрофильная частица/вода, а также разреженного слоя на границе воды с гидрофобной частицей.

В данном разделе мы остановимся только на основных, наиболее характерных результатах, иллюстрирующих различные аспекты взаимодействия наночастиц и биомолекул с молекулами воды в гидратных слоях, обнаруженные с помощью спектроскопии четырехфотонного рассеяния света. Основное внимание будет уделено экспериментальным аспектам, методике измерений, возможным приложениям и интерпретации полученных результатов. Будут представлены результаты измерений спектров ЧФР лазерного излучения в водных растворах ДНК, денатурированной ДНК и белка  $\alpha$ -химотрипсин в диапазонах  $\pm 10 \text{ см}^{-1}$  и  $70\text{--}100 \text{ см}^{-1}$ . Измерение спектров водных суспензий одностенных углеродных нанотрубок, проведенные нами в диапазонах  $\pm 10 \text{ см}^{-1}$  и  $100\text{--}250 \text{ см}^{-1}$ , позволили с одной стороны, впервые в прямом оптическом эксперименте наблюдать существование разреженного слоя воды на границе воды с гидрофобной частицей (в данном случае с углеродной нанотрубкой), с другой стороны, впервые наблюдать дыхательные моды углеродных нанотрубок в водной суспензии и прямо измерить кубическую нелинейность соответствующих резонансов КР, путем сравнения линий КР дыхательных мод, вращательных линий молекулы  $\text{H}_2\text{O}$ , возникающих в гидратном слое нанотрубок, и резонанса Бриллюэна, нелинейную восприимчивость которого можно оценить, пользуясь табличными значениями для дистиллированной воды.

### ЭКСПЕРИМЕНТ

Эксперименты проводились на установке, изображенной на рис. 1а, б и подробно описанной в [27].

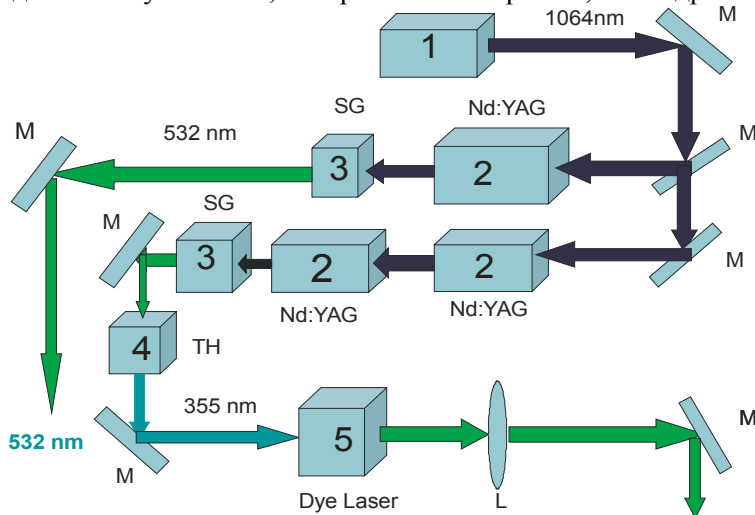


рис.1а

**Рис.1а.** Схема экспериментальной установки. Лазерная часть: (1)- одночастотный Nd:YAG лазер, (2) – многопроходные квантовые усилители на Nd:YAG, (3)- генераторы второй гармоники, (4) – генератор третьей гармоники, (5) – перестраиваемый по длине волны лазер на красителе, (M) – зеркала, (L)- линза. Стрелками показаны лазерные лучи.

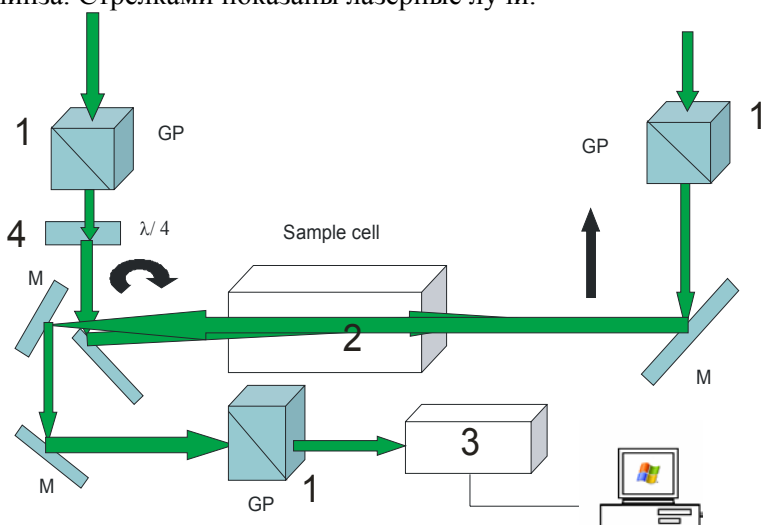


рис.1б

**Рис.1б.**Схема экспериментальной установки. Измерительная часть: (1) – поляризаторы (призмы Глана), (2) – кювета с исследуемой жидкостью, (3) – система регистрации, (4) – четвертьволновая пластинка, (M) – зеркала.

Две встречные волны  $E^{(1)}$  и  $E^{(2)}$  с частотами  $\omega_1$  и  $\omega_2$  распространялись в кювете с изучаемой жидкостью. Входное и выходное окна кюветы изготовлены из плавленого кварца и имели низкий уровень деполяризации 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 [19] в сигнале, определяемом нелинейностью (1), отсутствует нерезонансный вклад от электронной подсистемы среды.

Поскольку орты поляризации волны сигнала на частоте  $\omega_s$  и волны  $E^{(2)}$  неколлинеарны, а их направления распространения совпадают, сигнал выделялся призмой Глана. Ширина аппаратной функции спектрометра ( $\sim 0.12 \text{ см}^{-1}$ ) и спектральный диапазон (от  $-1200$  до  $300 \text{ см}^{-1}$ ) 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  $\omega_2$  производилось усреднение сигнала по 10-30 отсчетам, затем частота лазера перестраивалась автоматически с шагом  $\sim 0.119 \text{ см}^{-1}$ . Нулевая частотная отстройка привязывалась с точностью до  $0.02 \text{ см}^{-1}$  по резонансам Бриллюэна, дальнейшая перестройка длины волны контролировалась по модам интерферометра Фабри-Перо с базой 7мм. Максимальная ошибка амплитуды сигнала ЧФР задавалась программно в начале каждого измерения и обычно не превышала 10%. Точность измерения частот резонансов определялась шириной аппаратной функции спектрометра ( $0.12 \text{ см}^{-1}$ ) и остаточным люфтом механической системы поворота дифракционной решетки лазера на красителе, поэтому на частотных отстройках  $\sim 100 \text{ см}^{-1}$  расхождение измеряемых и табличных частот резонансов могло достигать  $0.3 \text{ см}^{-1}$ .

Эксперименты проводились в дважды дистиллированной воде, в водных растворах белка  $\alpha$ -химотрипсин (концентрации 10 и 17 мг/мл), нативной и денатурированной ДНК (15мг/мл), в 3% водном растворе перекиси водорода ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), в водной суспензии одностенных углеродных нанотрубок с концентрацией менее 0.1 мкг/мл (оценочно менее  $10^9$  волокон нанотрубок в зондируемом объеме). Денатурация ДНК вызывалась нагревом раствора до  $90^\circ\text{C}$  с последующим охлаждением до комнатной температуры. Образцы помещались в термостабилизированную при комнатной температуре кювету длиной 100 мм. Сигнал четырехфотонного рассеяния возникал в области пересечения волн накачки длиной  $\sim 5 \text{ м}$ . Дополнительная дегазация изучаемых жидкостей не проводилась.

Процедура получения ДНК описана в [28]. Концентрация ДНК определялась спектрофотометрически. Углеродные нанотрубки синтезировались в электрическом дуговом разряде в атмосфере гелия при давлении 650 Торр по методике, изложенной в [29]. Предварительное изучение морфологии образцов нанотрубок с помощью сканирующего электронного микроскопа обнаружило, что высушенный образец содержит волокна длиной до 500 нм, состоящих из 5 – 10 нанотрубок диаметром 1-2 нм.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТОВ

На начальном этапе экспериментов был подробно изучен спектр ЧФР в дважды дистиллированной воде в диапазоне  $0\text{-}250 \text{ см}^{-1}$ . Целью этих экспериментов являлось выявление воспроизводимости спектров, а также их корреляция с известными данными [30] по спонтанному комбинационному рассеянию и ИК поглощению в жидкой воде в низкочастотном спектральном диапазоне. Известно, что в воде в области  $180 \text{ см}^{-1}$  расположен широкий максимум, вызванный колебаниями молекул  $\text{H}_2\text{O}$  вдоль водородной связи. Этот максимум легко обнаруживается в спектрах ЧФР в дважды дистиллированной воде (см. рис.2), где приведен спектр ЧФР низкого разрешения, полученный из экспериментального спектра сглаживанием в текущем окне размером  $5 \text{ см}^{-1}$ .

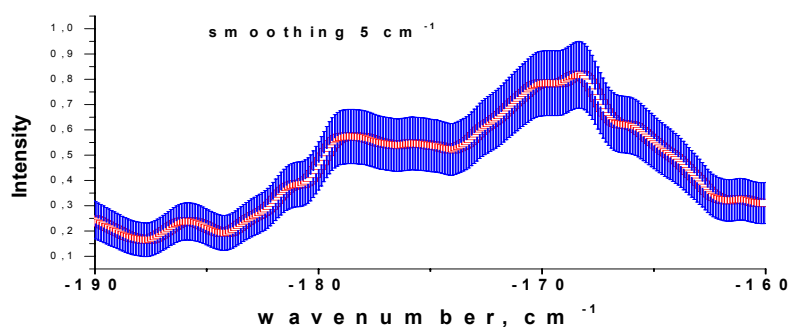
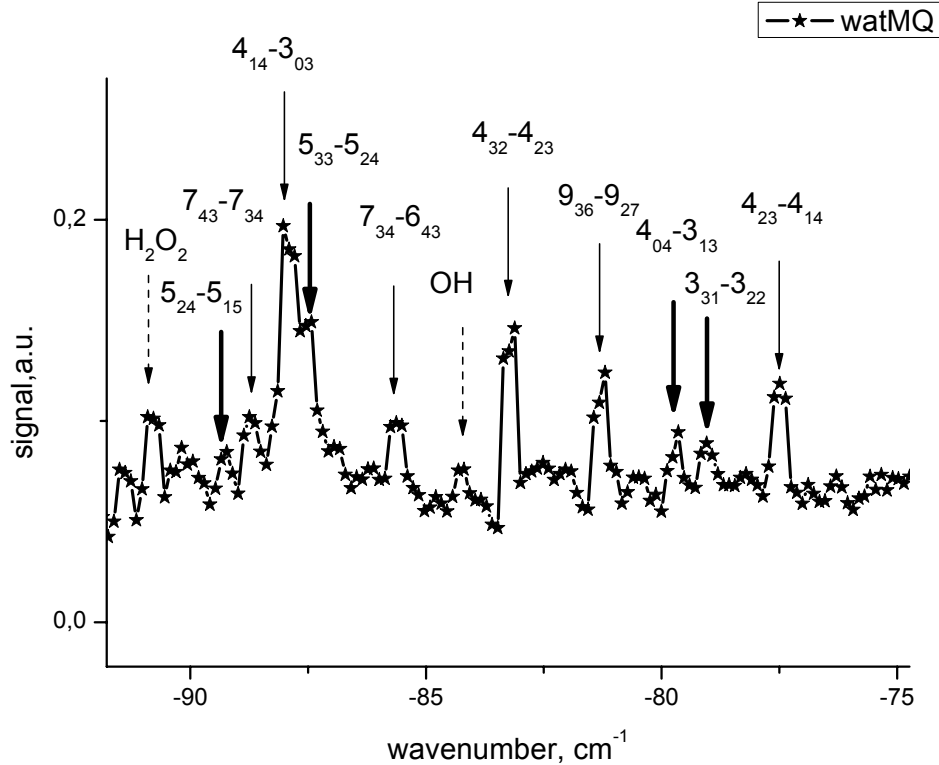


Рис.2.

Видно, что спектр ЧФР имеет выраженный максимум на  $\sim 170 \text{ см}^{-1}$  в хорошем соответствии с данными [30]. Остальные спектры ЧФР, приведенные в этом разделе, получены со спектральным разрешением  $0.12 \text{ см}^{-1}$ , что намного превосходит существующие в настоящее время возможности классической спектроскопии конденсированных сред в низкочастотной области.

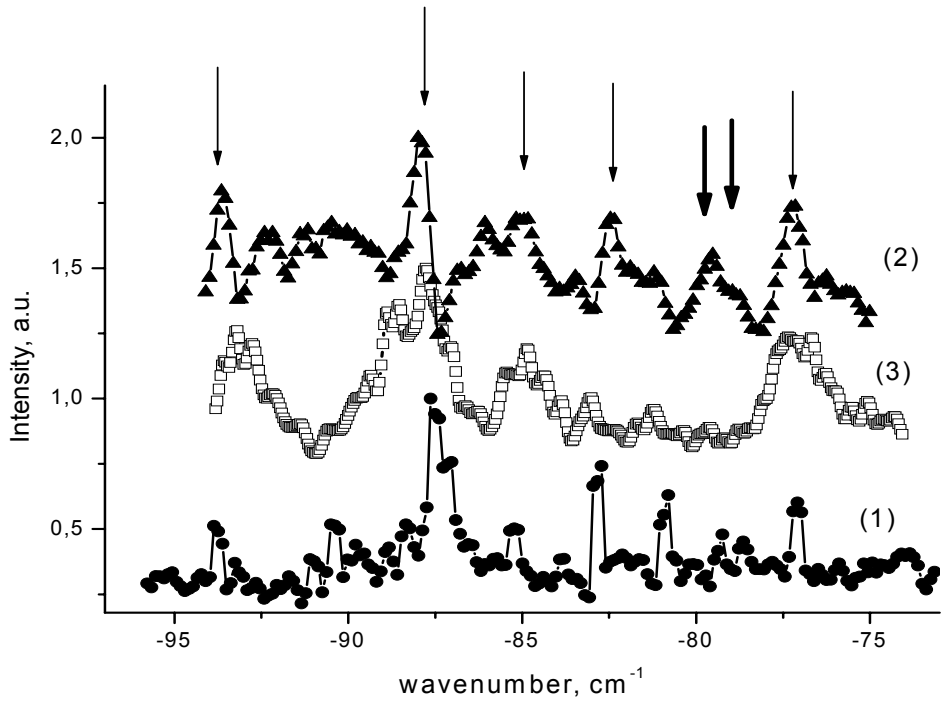
На рис.3 приведен спектр четырехфотонного рассеяния в диапазоне от  $-75$  до  $-90 \text{ см}^{-1}$  в воде, полученной из дважды дистиллированной воды путем пропускания через фильтры с отверстиями диаметром  $\sim 300 \text{ нм}$ .



**Рис.3.** Спектр четырехфотонного рассеяния би-дистиллированной воды в диапазоне  $-75 -90 \text{ см}^{-1}$ . Тонкими (толстыми) стрелками обозначены резонансы орто- (пара-) изомера  $\text{H}_2\text{O}$ , над стрелками указаны вращательные квантовые числа  $J, K_a, K_c$  начального и конечного уровней соответствующих переходов основного изотопа молекулы  $\text{H}_2\text{O}$ , пунктирными стрелками обозначены резонансы  $\text{H}_2\text{O}_2$  и  $\text{OH}$ .

В спектре отчетливо видны резонансы, относящиеся по данным [22] к наиболее сильным вращательным переходам основного колебательного состояния пара- и орто- спин-изомеров молекул  $\text{H}_2\text{O}$ , а также к вращательным переходам молекул  $\text{H}_2\text{O}_2$  и  $\text{OH}$ , которые могут образовываться в воде при флеш-фотолизе под действием лазерного излучения [31, 32]. Совпадение частот резонансов с табличными значениями [22] для всех переходов находится в пределах  $0.3 \text{ см}^{-1}$ , что сравнимо с аппаратной функцией используемого спектрометра. Такое расхождение выглядит приемлемым, поскольку частотное положение многих линий вращательного и колебательно-вращательного спектров молекул воды в разных таблицах варьируется в пределах 2-3 десятых  $\text{см}^{-1}$ . Резонансы обозначены стрелками разного вида, на рис.3 над стрелками указаны вращательные квантовые числа  $J, K_a, K_c$  начального и конечного уровней соответствующих переходов основного изотопа молекулы  $\text{H}_2\text{O}$ .

На рис.4 представлены спектры ЧФР в водных растворах белка  $\alpha$ -химотрипсин (концентрация  $17 \text{ мг/мл}$ ) (2), ДНК ( $15 \text{ мг/мл}$ ) (3) в том же спектральном диапазоне и для сравнения приведен спектр дважды дистиллированной воды (из рис.3), умноженный в  $\sim 8$  раз (1). Резонансы орто- (пара-) спин-изомеров  $\text{H}_2\text{O}$  обозначены так же, как на рис.3. Из рис.4 видно, что спектры растворов обоих биополимеров и дважды дистиллированной воды содержат многочисленные вращательные резонансы орто- (пара-) молекул воды, обозначенные толстыми и тонкими стрелками. В спектрах обоих растворов биополимеров наблюдается существенный рост (в  $\sim 8$  раз) вклада вращательного спектра в сигнал четырехфотонного рассеяния, по сравнению с дважды дистиллированной водой.



**Рис.4.** Спектры четырехфотонного рассеяния в дважды дистиллированной воде (1), водных растворах белка  $\alpha$ -химотрипсин (концентрация 17 мг/мл) (2) и ДНК (15мг/мл) (3) в диапазоне  $-75 -90 \text{ см}^{-1}$ . Резонансы обозначены так же, как на рис. 1.

Было проведено сравнение спектров биополимеров в некоторых узких диапазонах. На рис.5a,b приведены фрагменты спектров в диапазонах  $-86 -90 \text{ см}^{-1}$  (рис.5a) и  $-77 -81 \text{ см}^{-1}$  (рис.5b), где содержатся характерные линии орто- и пара- спин-изомеров  $\text{H}_2\text{O}$ , отмеченные тонкими и толстыми стрелками. Видно (рис. 5a), что резонансы орто- спин-изомеров  $\text{H}_2\text{O}$  (тонкие стрелки) присутствуют как в спектре дважды дистиллированной воды, так и в спектрах водных растворах обоих биополимеров, тогда как вклад резонансов пара- спин-изомеров  $\text{H}_2\text{O}$  (толстые стрелки) в спектры белка и ДНК подавлены.

На рис.6 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  $\text{H}_2\text{O}$ , а также молекул  $\text{H}_2\text{O}_2$ , обозначенные так же как на рис.3-5. Видно, что денатурация ДНК в водном растворе приводит к существенной модификации соответствующего спектра ЧФР. В частности, происходит примерно трехкратное уменьшение интенсивности вращательных линий молекулы  $\text{H}_2\text{O}$ . Кроме этого, вблизи  $-80$  и  $-79 \text{ см}^{-1}$  на спектрах дважды дистиллированной воды (1) и денатурированной ДНК (2) отчетливо видны вращательные линии пара- спин-изомеров  $\text{H}_2\text{O}$ , тогда как в спектре «живой» ДНК вклад этих линий существенно подавлен. В спектре денатурированной ДНК (2) также заметен рост вращательных линий  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Мотивацией изучения спектров ЧФР лазерного излучения в водных суспензиях углеродных нанотрубок вызвано необходимостью создания новых нано- и био- технологий с участием этих объектов, в частности новых поколений биосенсоров [34]. Ясно, что для развития этих работ нужно создать методики, позволяющие изучать параметры нанотрубок и характер их взаимодействия с окружающими молекулами в нативной среде, каковой является вода и водные растворы. Таким образом, задача состоит из двух частей: 1. измерение характеристик нанотрубок в водной суспензии; 2. изучение спектров воды в гидратной оболочке нанотрубок.

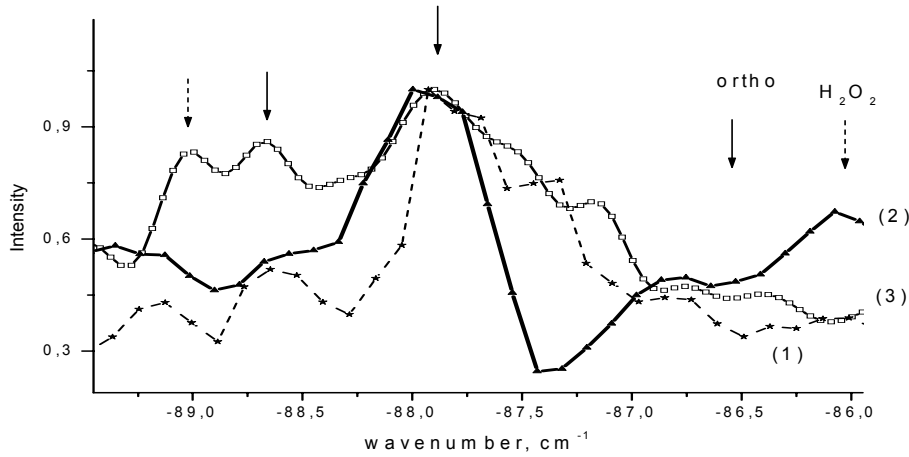


рис.5a

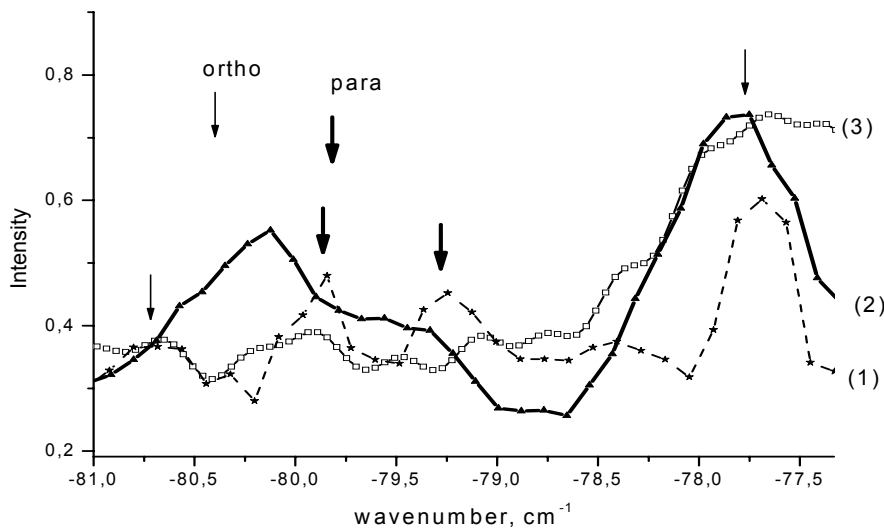
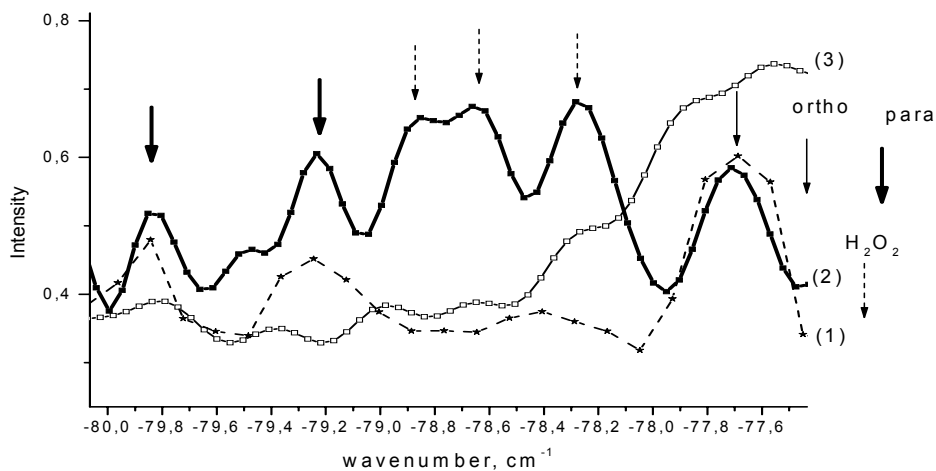


рис.5b

**Рис.5.** Фрагменты спектров рис.4 в диапазонах  $-86 -90 \text{ cm}^{-1}$  (рис.5a) и  $-77 -81 \text{ cm}^{-1}$  (рис.5b) в дважды дистиллированной воде (1) и в водных растворах белка  $\alpha$ -химотрипсина (концентрация 17 мг/мл) (2) и нативной ДНК (15мг/мл) (3). Тонкими (толстыми) стрелками обозначены резонансы орто- (пара-) изомера  $\text{H}_2\text{O}_2$ .



**Рис.6.** Спектры ЧФР в дважды дистиллированной воде (1) и в водных растворах денатурированной ДНК (2) и ДНК (3). Вблизи  $-80$  и  $-79 \text{ cm}^{-1}$  на спектрах (1) и (2) видны вращательные линии пара-спин-изомера  $\text{H}_2\text{O}$ .

Для определения геометрических характеристик нанотрубок необходимо измерять частоты их радиальных дыхательных мод (РДМ),  $\omega_{RBM}$ , [35], однозначно связанных [36] с диаметром трубок:

$$\omega_{RBM} = C_1/d_t + C_2 \quad (2)$$

где  $d_t$  – диаметр нанотрубок, а эмпирические константы  $C_1=218 \text{ нм/см}^{-1}$  и  $C_2=17 \text{ см}^{-1}$  или  $C_1=223 \text{ нм/см}^{-1}$   $C_2=10 \text{ см}^{-1}$  соответствуют металлическим или полупроводниковым типам трубок.

На рис.7 а,b,c изображены 3 участка спектров четырехфотонного рассеяния в водной суспензии углеродных нанотрубок в диапазоне  $100 - 250 \text{ см}^{-1}$ , где были выявлены наиболее сильные отличия от спектра воды. Кривые (1) на рис.7 а-с изображают спектры ЧФР водной суспензии нанотрубок, кривые (2) – вода. Пунктирные стрелки на рис.7 а-с изображают обнаруженные дыхательные моды (РДМ), тонкие и жирные стрелки (рис.7 а) показывают вращательные линии КР, соответствующие орто- и пара- спин-изомерам молекулы  $\text{H}_2\text{O}$ .

Спектры на рис.7 а-с показывают, что РДМ четко регистрируются с высоким отношением сигнал/шум в водных суспензиях нанотрубок при их сравнительно низкой концентрации (менее  $0.1 \text{ мкг/мл}$ ). Наблюдаются три группы РДМ (вблизи  $118 \text{ см}^{-1}$ ,  $165 \text{ см}^{-1}$  и  $235 \text{ см}^{-1}$ ), каждая группа состоит из 3-4 пиков РДМ, расположенных через  $\sim 1.5 \text{ см}^{-1}$ . Такая структура РДМ может объясняться переплетением нанотрубок в волокна, что ранее наблюдалось в сухих образцах [37]. Простые оценки по (2) диаметров нанотрубок показывают, что в изучаемом образце присутствуют нанотрубки диаметрами  $d_t \sim 2 \text{ нм}$  ( $\omega_{RBM}/2\pi C=118 \text{ см}^{-1}$ , рис.7а),  $\sim 1.5 \text{ нм}$  ( $\omega_{RBM}/2\pi C=165 \text{ см}^{-1}$ , рис.7б) и  $\sim 1 \text{ нм}$  ( $\omega_{RBM}/2\pi C=235 \text{ см}^{-1}$ , рис.7с), что находится в хорошем согласии с данными по морфологии образцов, полученными ранее на сканирующем электронном микроскопе.

На рис.8а, б; 9а, б; и 10а, б, с изображены результаты экспериментов по наблюдению спектров ЧФР в водной суспензии нанотрубок, а также в водных растворах белка  $\alpha$ -химотрипсин и ДНК в диапазоне  $\pm 10 \text{ см}^{-1}$ .

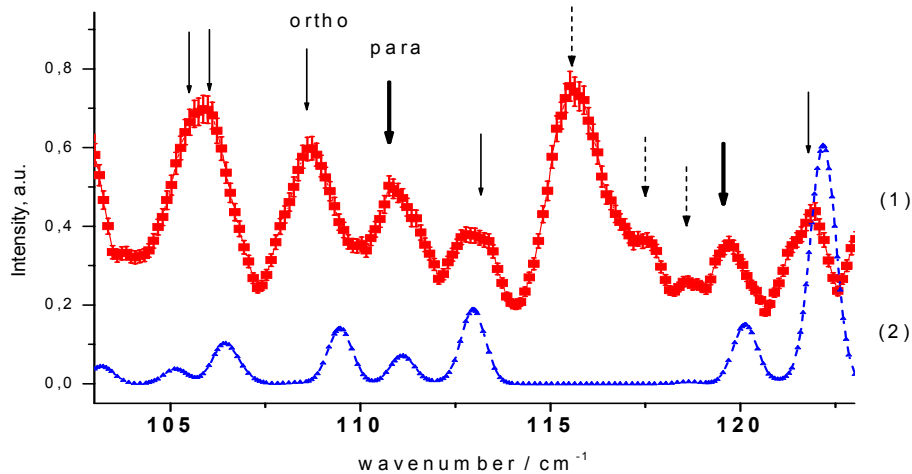


рис.7а

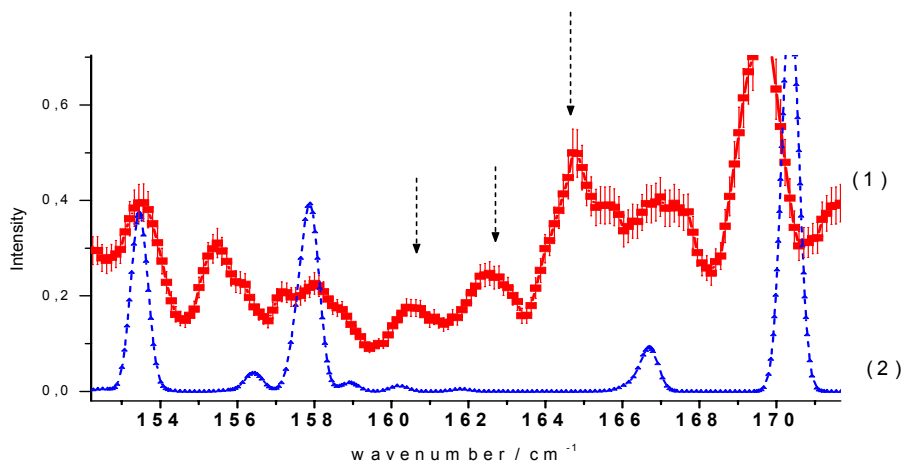


рис.7б



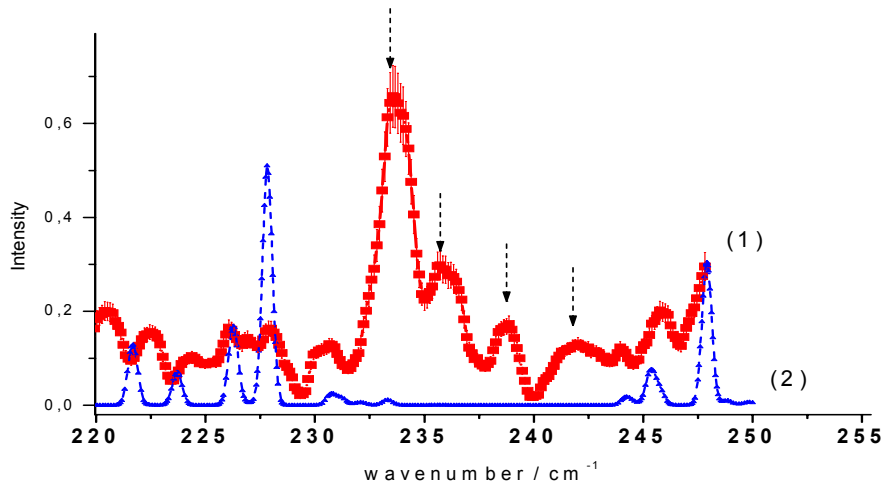
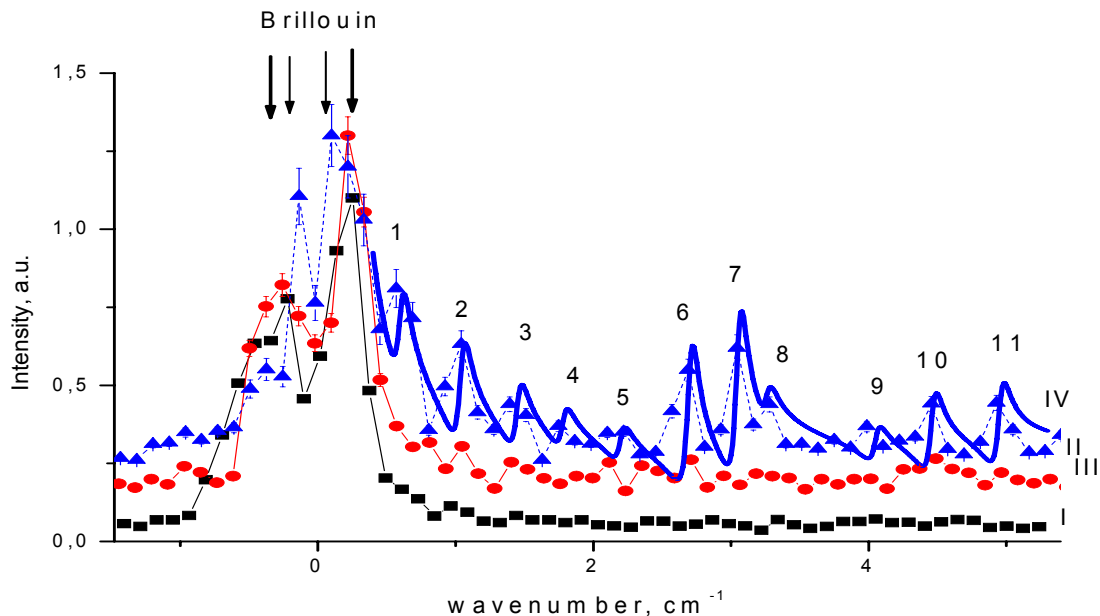


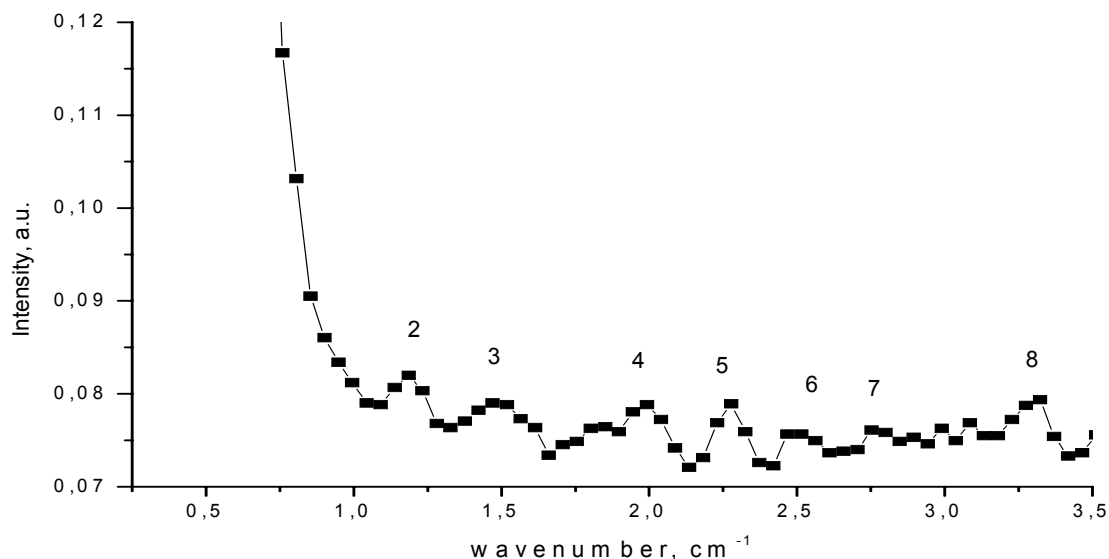
рис.7с

**Рис.7.** Фрагменты спектров четырехфотонного рассеяния света в суспензии углеродных нанотрубок (1) и дважды дистиллированной воде (2) в диапазонах  $100-120\text{ см}^{-1}$  (а),  $150-170\text{ см}^{-1}$  (б) и  $220 - 250\text{ см}^{-1}$  (с). Пунктирные стрелки отмечают радиальные дыхательные моды нанотрубок, тонкие и толстые стрелки отмечают вращательные резонансы КР орто- и пара- спин-изомеров молекулы  $\text{H}_2\text{O}$ , соответственно.

На рис.8а изображены полученные при сходных экспериментальных условиях спектры ЧФР дважды дистиллированной воды (кривая I, квадраты), суспензии нанотрубок (кривая II, треугольники) и 3% водного раствора перекиси водорода (кривая III, круги). Каждая экспериментальная точка накапливалась по 30 лазерным выстрелам с шагом  $\sim 0.12\text{ см}^{-1}$ . На рис. 8а изображен также рассчитанный спектр ЧФР (сплошная кривая IV). Расчеты велись по процедуре, описанной в [18].



**Рис.8а** Спектры четырехфотонного рассеяния света в дважды дистиллированной воде (кривая I, квадраты), водной суспензии нанотрубок (кривая II, треугольники) и 3% водный раствор перекиси водорода (кривая III, круги). Каждая спектральная точка накапливалась по 30 лазерным вспышкам с шагом  $\sim 0.12\text{ см}^{-1}$ . Кривые III и II сдвинуты по оси ординат на 0.1 и 0.2 относительные единицы, соответственно. Тонкими и толстыми стрелками отмечены резонансы Бриллюэна суспензии нанотрубок и би-дистиллированной воды, соответственно. Цифры I-III отмечают различные вращательные резонансы КР молекул  $\text{H}_2\text{O}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$ . Сплошная кривая (IV) отмечает расчетный спектр водной суспензии нанотрубок.



**Рис.8b.** Спектр четырехфотонного рассеяния света в дважды дистиллированной воде, растянутый по оси ординат в 10 раз. Цифры 2-8 отмечают вращательные резонансы КР молекул  $\text{H}_2\text{O}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$ .

Для удобства рассмотрения спектры III и II на рис.8а сдвинуты по оси ординат на 0.1 и 0.2 относительные единицы, соответственно. Тонкими и жирными стрелками здесь отмечены пики резонансов Бриллюэна в суспензии нанотрубок и дважды дистиллированной воды. Символами 1-11 на рис.8а отмечены вращательные резонансы КР молекул  $\text{H}_2\text{O}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$ , наблюдаемые как в суспензии нанотрубок, так и в водном растворе перекиси водорода. Символами 2, 3, 4, 6, 7, 10, 11 отмечены вращательные резонансы молекулы  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $2_{11-1_{01}}$ ) ( $1.25 \text{ cm}^{-1}$ ), ( $8_{27-9_{19}}$ ) ( $1.47 \text{ cm}^{-1}$ ), ( $10_{19-9_{27}}$ ) ( $1.8 \text{ cm}^{-1}$ ), ( $7_{07-7_{17}}$ ) ( $2.75 \text{ cm}^{-1}$ ), ( $9_{09-9_{19}}$ ) ( $3.06 \text{ cm}^{-1}$ ), ( $16_{016-16_{116}}$ ) ( $4.65 \text{ cm}^{-1}$ ), ( $4_{13-3_{03}}$ ) ( $4.8 \text{ cm}^{-1}$ ), а цифры 1, 5 ( $6_{16-5_{23}}$ ) ( $0.74 \text{ cm}^{-1}$ ), ( $4_{14-3_{21}}$ ) ( $2.26 \text{ cm}^{-1}$ ) и 8, 9 ( $4_{40-5_{33}}$ ) ( $3.21 \text{ cm}^{-1}$ ), ( $2_{20-3_{13}}$ ) ( $4.0 \text{ cm}^{-1}$ ) отмечают вращательные резонансы орто- и пара- спин-изомеры молекулы  $\text{H}_2\text{O}$ . Здесь, в скобках указаны вращательные квантовые числа  $J$ ,  $K_a$ ,  $K_c$ , и волновые числа соответствующих переходов КР согласно классификации [22]. Лучшее соответствие расчетных (сплошная кривая IV) и экспериментальных спектров рис.8а наблюдалось для концентрации 15% молекул  $\text{H}_2\text{O}_2$  в гидратном слое суспензии нанотрубок в воде. На рис.8b показан спектр ЧФР дважды дистиллированной воды, растянутый в 10 раз по оси ординат, где также хорошо видны резонансы, соответствующие вращательным переходам в молекулах  $\text{H}_2\text{O}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$ , присутствующие также на спектрах рис.8а. Амплитуды пиков вращательных резонансов в дважды дистиллированной воде примерно на порядок меньше, чем в водной суспензии нанотрубок.

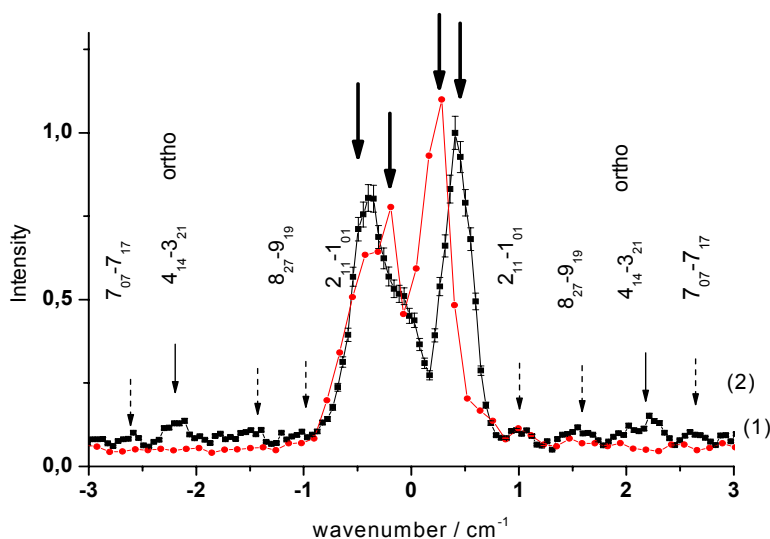
Таким образом, спектры ЧФР, изображенные на рис.8а, b показывают следующее: (1) спектры водной суспензии нанотрубок, водного раствора перекиси водорода и дважды дистиллированной воды содержат одинаковый набор резонансов, соответствующих вращательным переходам молекул  $\text{H}_2\text{O}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$ , при этом добавление в воду нанотрубок (при концентрации 0.1 мкг/мл) увеличивает на порядок по сравнению с дважды дистиллированной водой сигнал ЧФР, вызванный вращательными переходами; (2) сравнение кривых II и III на рис.8а показывает, что в спектре водной суспензии нанотрубок происходит существенный рост вклада вращательных линий  $\text{H}_2\text{O}_2$ , что, очевидно, свидетельствует о возникновении молекул перекиси водорода на границах углеродных нанотрубок и воды. Отметим, что генерация перекиси водорода в водных суспензиях фуллеренов косвенно обнаруживалась ранее по окислению специальных реагентов [38], однако прямые наблюдения отсутствовали. Другое важное обстоятельство, вытекающее из экспериментов, результаты которых представлены на рис.8а и 8b, заключается в дополнительном экспериментальном подтверждении существования слоя воды пониженной плотности вблизи гидрофобной поверхности наночастиц, который наблюдался ранее по рассеянию рентгеновских лучей [8,9] и предсказанный в теоретических работах [1,2,7]. Вклад вращательного спектра молекул  $\text{H}_2\text{O}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$  в сигнал ЧФР растет с ростом размера гидратного слоя и пропорциональным ростом концентрации молекул в этом слое. При этом основная часть молекул воды не дает вклада во вращательный спектр, будучи связанной в молекулярные комплексы за счет водородной связи.

Из спектров, представленных на рис. 7, 8 следует, что спектроскопия ЧФР позволяет в рамках единой методики измерений получать спектры рассеяния Бриллюэна в водной суспензии нанотрубок ( $\pm 0.2 \text{ см}^{-1}$ ), вращательных резонансов молекул  $\text{H}_2\text{O}$  в гидратном слое нанотрубок, лежащих в спектральном диапазоне от 1 до  $250 \text{ см}^{-1}$  и радиальных дыхательных мод нанотрубок в области от 100 до  $250 \text{ см}^{-1}$ . Это позволяет провести оценку кубической нелинейной восприимчивости дыхательных мод нанотрубок, путем сравнения величин соответствующих резонансных пиков нанотрубок и резонанса Бриллюэна, восприимчивость которого может быть рассчитана из первых принципов с использованием известных макроскопических параметров дистиллированной воды. В этом случае амплитудная привязка резонансов разной природы, лежащих в разных спектральных диапазонах ( $\pm 0.2 \text{ см}^{-1}$  и  $100 - 250 \text{ см}^{-1}$ ) может быть проведена по вращательным резонансам молекулы  $\text{H}_2\text{O}$ , существующим во всем диапазоне измерений  $0-250 \text{ см}^{-1}$ . Отметим, что такая возможность отсутствует в других методах оптической спектроскопии (ИК поглощение, спонтанное КР), применяемых для изучения оптических характеристик нанотрубок в сухих образцах.

Для решения этой задачи мы использовали резонанс орто- спин-изомера молекулы  $\text{H}_2\text{O}$  ( $6_{16} - 5_{23}$ ) ( $0.74 \text{ см}^{-1}$ ), величина которого легко сравнивается с резонансом Бриллюэна водной суспензии нанотрубок (см. рис. 8а). В свою очередь, нелинейная Бриллюэновская восприимчивость воды может быть пересчитана из точно измеренной резонансной Бриллюэновской восприимчивости  $\text{CS}_2$ , равной  $6.5 \cdot 10^{-12} \text{ СГСЭ}$  ( $\text{см}^3/\text{эрг}$ ) [39]. Простые оценки, с учетом аппаратной функции используемого в наших измерениях спектрометра, показывают, что пиковое значение резонансной Бриллюэновской кубической восприимчивости суспензии нанотрубок для концентрации, используемой в наших экспериментах составляло  $\sim 1.2 \cdot 10^{-14} \text{ СГСЭ}$ . Сравнение пиков Бриллюэна и орто- спин-изомера молекулы  $\text{H}_2\text{O}$  ( $6_{16} - 5_{23}$ ) ( $0.74 \text{ см}^{-1}$ ) позволяют оценить соответствующую резонансную восприимчивость как  $\sim 1 \cdot 10^{-15} \text{ СГСЭ}$ .

Далее можно оценить резонансную восприимчивость линии  $\text{H}_2\text{O}$  с центральной частотой  $108 \text{ см}^{-1}$ , отмеченной на рис. 7а тонкой стрелкой:  $\sim 1 \cdot 10^{-11} \text{ СГСЭ}$ . Для этой оценки мы использовали отношение матричных элементов вращательных переходов с частотами  $108 \text{ см}^{-1}$  and  $0.74 \text{ см}^{-1}$ , равное ( $\sim 10^4$ ). Сравнивая величины пиков КР вращательной линии молекулы  $\text{H}_2\text{O}$  с центральной частотой  $108 \text{ см}^{-1}$  и радиальных дыхательных мод с частотами  $118 \text{ см}^{-1}$ ,  $165 \text{ см}^{-1}$  и  $235 \text{ см}^{-1}$  можно оценить их пиковую кубическую нелинейность как  $\sim 1 \cdot 10^{-11} \text{ СГСЭ}$ , а соответствующую гиперполяризуемость (т.е. нелинейность одной нанотрубки, учитывая их оценочную плотность в исследуемом объеме) как  $\sim 1 \cdot 10^{-20} \text{ см}^6/\text{эрг}$ . Отметим, что это довольно высокое значение, учитывая, что типичное значение резонансной кубической гиперполяризуемости атомов и молекул составляет  $\sim 1 \cdot 10^{-29} \text{ см}^6/\text{эрг}$ . Однако, эта величина качественно соответствует единственному известному нам результату измерений резонансной кубической поляризуемости углеродных нанотрубок, проведенных недавно с помощью вынужденного КР в сухих образцах [40].

На рис.9, изображены спектры ЧФР дважды дистиллированной воды и водного раствора белка  $\alpha$ -химотрипсин в концентрации  $10 \text{ мг/мл}$  в диапазоне  $\pm 3 \text{ см}^{-1}$  ( $\pm 90 \text{ ГГц}$ ). Каждая экспериментальная точка накапливалась по 30 лазерным вспышкам с шагом  $\sim 0.12 \text{ см}^{-1}$ .



**Рис.9** Фрагмент спектра ЧФР в дважды дистиллированной воде (кривая 1, круги) и в водном растворе белка  $\alpha$ -химотрипсин в концентрации  $10 \text{ мг/мл}$  (кривая 2, квадраты). Две линии в середине каждого спектра (отмеченные жирными стрелками) являются резонансами Бриллюэна. Тонкие и пунктирные стрелки показывают вращательные линии КР ( $4_{14} - 3_{21}$ ) ( $\pm 2.26 \text{ см}^{-1}$ ) орто- спин-изомера  $\text{H}_2\text{O}$  и ( $2_{11}-1_{01}$ ) ( $\pm 1.25 \text{ см}^{-1}$ ), ( $8_{27}-9_{19}$ ) ( $\pm 1.47 \text{ см}^{-1}$ ), ( $10_{19}-11_{04}$ ) ( $\pm 2.5 \text{ см}^{-1}$ ) вращательные резонансы  $\text{H}_2\text{O}_2$ , соответственно.

Две линии в середине каждого спектра на рис.9 (отмеченные жирными стрелками) являются резонансами Бриллюэна. Тонкие и пунктирные стрелки показывают вращательную линию ( $4_{14} - 3_{21}$ ) ( $\pm 2.26 \text{ см}^{-1}$ ) молекулы  $\text{H}_2\text{O}$  (орто- спин-изомер) и линии ( $2_{11}-1_{01}$ ) ( $\pm 1.25 \text{ см}^{-1}$ ), ( $8_{27}-9_{19}$ ) ( $\pm 1.47 \text{ см}^{-1}$ ), ( $5_{05}-5_{15}$ ) ( $\pm 2.5 \text{ см}^{-1}$ ) молекулы  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Классификация линий совпадает с проведенной ранее для рис. 8а, б.

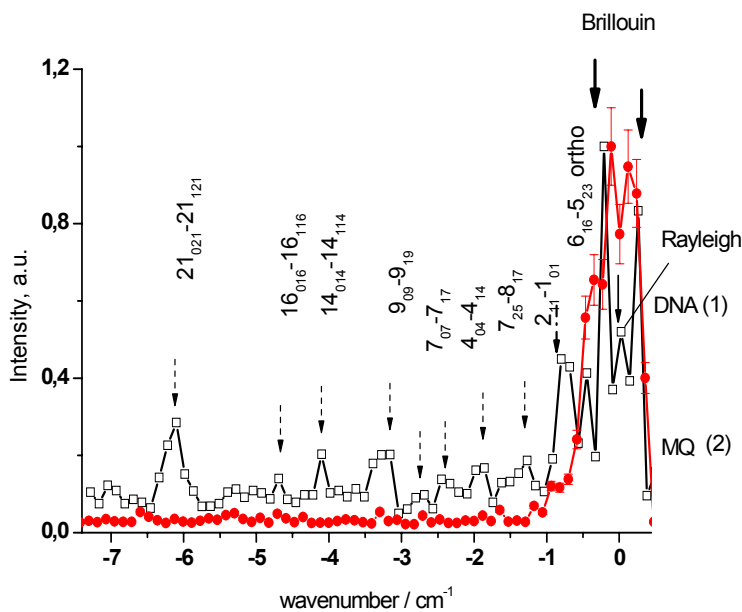
Появление вращательных линий молекулы  $\text{H}_2\text{O}_2$  в спектрах ЧФР водных растворов биополимеров четко прослеживается также на рис.10а, б, с, где изображены спектры в диапазоне от 1 до  $-7 \text{ см}^{-1}$  для водного раствора ДНК (квадраты) при концентрации 15 мг/мл, и дважды дистиллированной воды (круги) и денатурированной ДНК рис.10с. На рис.10 б показаны экспериментальный (квадраты, тонкая линия) и расчетный (жирная линия) спектры ЧФР водного раствора ДНК. На рис. 10а, б жирными и тонкими стрелками отмечены резонансы Бриллюэна и Рэля исследованных образцов, пунктирные и штрихпунктирные стрелки отмечают различные вращательные линии молекул  $\text{H}_2\text{O}$  и  $\text{H}_2\text{O}_2$ , наблюдаемые в водном растворе ДНК. Из спектров ЧФР на рис.10а, б ясно следует, что при использованных в нашем эксперименте концентрациях ДНК в исследуемом растворе наблюдается шестикратный рост сигнала от молекул  $\text{H}_2\text{O}_2$ , что, по-видимому, означает соответствующее увеличение концентрации перекиси водорода в гидратном слое ДНК.

Для расчетов спектров ЧФР водных растворов ДНК мы использовали стандартные формулы [19]:

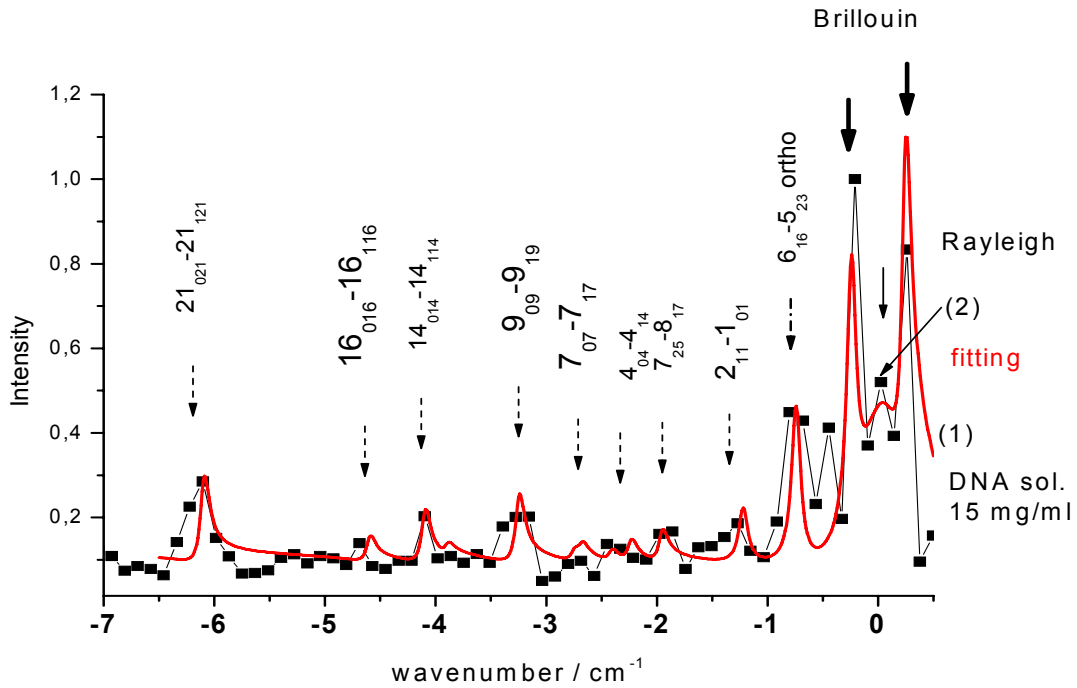
$$\chi^{(3)} = \chi^{NR} + \chi^B / (-i + (\Delta \pm \Omega_b) / \Gamma_{ap}) + \chi^R / (-i + \Delta / \Gamma_R) + \sum_n \chi_n^{rot} / (-i + (\Delta \pm \Omega_n) / \Gamma_{ap})$$

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

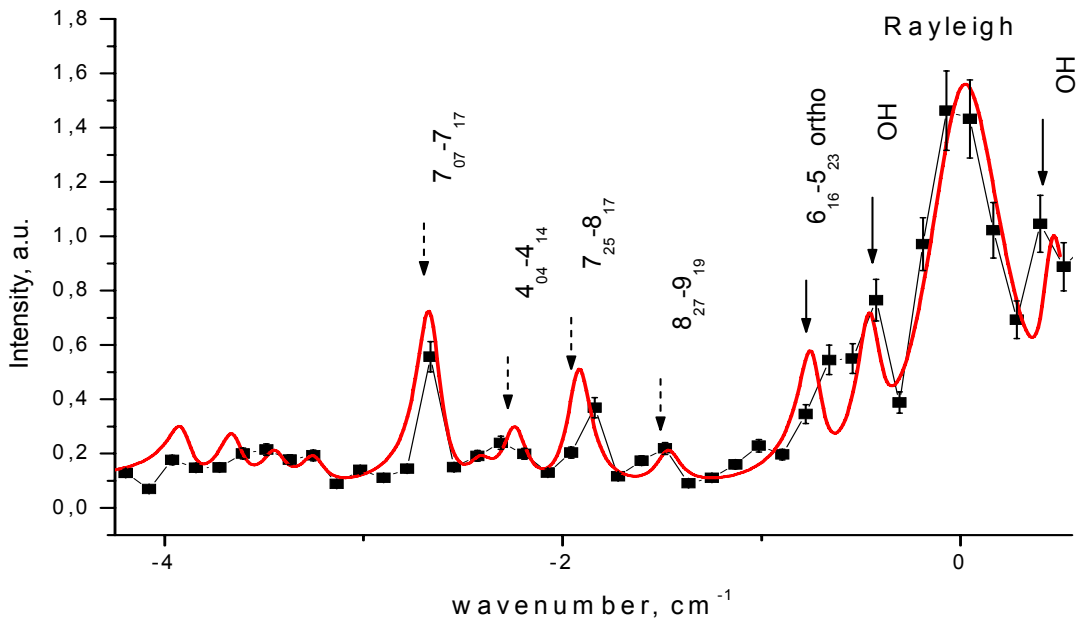
Здесь  $2\Gamma_{ap}$  - спектральное разрешение нашей установки ( $0.12 \text{ см}^{-1}$ ),  $\Gamma_R$  - полуширина крыла линии Рэля (подгоночный параметр),  $i$  - мнимая единица,  $\chi_n^{rot}$  и  $\Omega_n$  - нелинейная оптическая восприимчивость и центральная частота (в  $\text{см}^{-1}$ ) вращательных переходов молекул  $\text{H}_2\text{O}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\Omega_b$  - частота резонанса Бриллюэна водного раствора ДНК, измеренная экспериментально по спектрам ЧФР (см. рис. 10а, б),  $\Delta = (\omega_1 - \omega_2) / 2\pi c$  - частотная отстройка в  $\text{см}^{-1}$  (изменяемый параметр),  $\chi^B$ ,  $\chi^R$  и  $\chi^{NR}$  - нелинейные кубические восприимчивости резонансов Бриллюэна и Рэля, а также нерезонансная восприимчивость исследуемого раствора, соответственно. Спектроскопические характеристики молекул  $\text{H}_2\text{O}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$  были взяты из [22]. Относительная концентрация молекул  $\text{H}_2\text{O}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$  в гидратном слое ДНК была подгоночным параметром. Из рис.10 б, с видно, что описанная процедура позволяет достичь хорошего согласия экспериментальных и расчетных спектров ЧФР водных растворов ДНК. Сравнение подгоночных параметров для ЧФР спектров, изображенных на рис.10б и 10с показывает, что интенсивность вращательных резонансов  $\text{H}_2\text{O}_2$  в растворе ДНК после денатурации возрастает в  $\sim 3$  раза.



**Рис.10а.** Спектр четырехфотонного рассеяния света в водном растворе ДНК (квадраты, кривая 1) и дважды дистиллированной воде (круги, кривая 2). Толстые и тонкая стрелки отмечают резонансы Бриллюэна и Рэля, соответственно. Пунктирные стрелки показывают линии КР  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $2_{11}-1_{01}$ ) ( $\pm 1.25 \text{ см}^{-1}$ ), ( $7_{25}-8_{17}$ ) ( $\pm 1.92 \text{ см}^{-1}$ ), ( $4_{04}-4_{14}$ ) ( $\pm 2.41 \text{ см}^{-1}$ ), ( $7_{07}-7_{17}$ ) ( $\pm 2.75 \text{ см}^{-1}$ ), ( $9_{09}-9_{19}$ ) ( $\pm 3.06 \text{ см}^{-1}$ ), ( $14_{014}-14_{117}$ ) ( $\pm 4.12 \text{ см}^{-1}$ ), ( $16_{016}-16_{116}$ ) ( $\pm 4.65 \text{ см}^{-1}$ ), ( $21_{021}-21_{121}$ ) ( $\pm 6.16 \text{ см}^{-1}$ ). Штрихпунктирные стрелки отмечают линию КР  $\text{H}_2\text{O}$  ( $6_{16} - 5_{23}$ ) ( $\pm 0.74 \text{ см}^{-1}$ ), относящуюся к орто- спин-изомеру.



**Рис.10b.** Экспериментальный (точки, тонкая кривая) и расчетный (сплошная кривая) спектры ЧФР водного раствора ДНК (15 мг/мл).



**Рис.10с** Экспериментальный (точки, тонкая кривая) и расчетный (сплошная кривая) спектры ЧФР водного раствора денатурированной ДНК. Пунктирные и тонкие стрелки изображают вращательные переходы молекул  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{OH}$  и  $\text{H}_2\text{O}$  соответственно. Толстые стрелки отмечают резонансы Бриллюэна.

На рис.8, 9 обращает на себя внимание тот экспериментальный факт, что в разных водных растворах частотное положение резонансов Бриллюэна заметно отличается. Например, для водной суспензии нанотрубок (рис.8 а) частотный интервал между максимумами Бриллюэна  $\Delta f_B$  равно  $\Delta f_B \cong \pm 0.12 \text{ см}^{-1}$  (тонкие стрелки на рис.8 а), для раствора белка  $\alpha$ -химотрипсин  $\Delta f_B = \pm 0.4 \text{ см}^{-1}$ , для дважды

дистиллированной воды  $\Delta f_B = \pm 0.25 \text{ см}^{-1}$  (см. рис.8а). Известно [41], что величина  $\Delta f_B$  определяется как:

$$\Delta f_B = V_S (2n \sin \varphi/2)/C \lambda \quad (4)$$

где  $n$  – показатель преломления,  $\lambda$  – длина волны зондирующего излучения,  $\varphi$  – угол между падающей и рассеянной волнами,  $C$  – скорость света в вакууме,  $V_S$  – скорость звука в зондируемой среде. Для дистиллированной воды при комнатной температуре и нормальном давлении:  $n=1.33$ ,  $V_S=1490 \text{ м/с}$ . Учитывая, что для нашего эксперимента  $\lambda=532 \text{ нм}$  и  $\varphi= \pi$ , получаем  $\Delta f_B = \pm 0.25 \text{ см}^{-1}$  в дважды дистиллированной воде, в точном соответствии с измерениями на рис. 8, 9. Причина обнаруженных в данных экспериментах отличий  $\Delta f_B$  для раствора белка и водной суспензии нанотрубок заключается в различной локальной адиабатической сжимаемости данных жидкостей, поскольку, как известно [41]:

$$(V_S)^2 = (\rho K_S)^{-1} \quad (5)$$

где  $K_S$  – адиабатическая сжимаемость и  $\rho$  – плотность жидкости. Обнаруженные существенные отличия величины  $\Delta f_B$  в образцах, содержащих нанотрубки и белок от  $\Delta f_B$  дважды дистиллированной воды, могут быть объяснены только локальным изменением  $K_S$  – адиабатической сжимаемости в гидратационных слоях белка и нанотрубок.

Отметим, что использование формул (4) и (5) является не вполне корректным для интерпретации результатов по четырехфотонному рассеянию света на решетке гиперзвуковых волн, возбуждаемых двумя лазерными лучами в локально-неоднородной среде, что имеет место в наших экспериментах. Наблюдаемый на рис.8-10 сдвиг резонансов Бриллюэна отражает вариацию локальных скоростей распространения флуктуаций плотности в среде, состоящей из биополимеров или углеродных нанотрубок, взвешенных в воде, а не скорости во всем макроскопическом образце. Возбуждаемая гиперзвуковая волна локально затухает, успевая, тем не менее, провоздействовать с лазерным излучением, что приводит к появлению резонансов Бриллюэна, изображенных на рис.8-10.

## ОБСУЖДЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Известно, что вода – сильно ассоциированная жидкость. Каждая молекула воды способна образовать до четырех водородных связей со своими соседями. Среднее координационное число водородных связей при комнатной температуре равно 3.5 [15]. Однако проведенные нами эксперименты показывают, что в спектрах четырехфотонного рассеяния лазерного излучения в воде и водных растворах возникают узкие резонансы, частоты которых с точностью до ширины аппаратной функции спектрометра совпадают с частотами вращательных переходов основного электронного и колебательного состояния молекулы  $\text{H}_2\text{O}$  (рис.3). При этом в спектре отдельно идентифицируются линии относящиеся как к орто- так и к пара- модификациям основного изотопа молекулы  $\text{H}_2\text{O}$ . Отметим, что подобная картина возникает при регистрации колебательно-вращательных спектров молекул  $\text{H}_2\text{O}$  в нанокляпях жидкого гелия [42] и в матрицах твердого аргона [43], где также наблюдаются переходы, соответствующие орто- пара- спин-изомерам и их частоты с точностью до ширины аппаратной функции совпадают с частотами переходов газовой фазы.

Причина возникновения вращательных линий молекул  $\text{H}_2\text{O}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$  в наблюдаемых нами спектрах из жидкой фазы заключается, очевидно, в физических свойствах воды, гидратированной на поверхности микропримесей и вблизи растворенных ионов [44-46]. Известно [45, 46], что гидратация гидрофильных примесей приводит к структурированию молекул воды в сольватной оболочке примеси. Возникающие топологические ограничения в этом случае препятствуют образованию новых водородных связей между молекулами воды. В результате, среднее число водородных связей приходящихся на одну молекулу заметно снижается, увеличивая вероятность появления свободных молекул и вызывая рост флуктуаций плотности молекул  $\text{H}_2\text{O}$  в сольватной оболочке. Последнее обстоятельство подтверждается расчетами молекулярной динамики [45] и экспериментами по рентгеноструктурному анализу [44]. С другой стороны, согласно недавно опубликованным теоретическим [1, 2, 47, 48] и экспериментальным [8,9] результатам, вблизи гидрофобных поверхностей макромолекул и наночастиц в водных растворах образуется слой воды пониженной плотности, имеющий физические свойства водяного пара, что также приводит к появлению свободных молекул воды и возникновению вращательных резонансов КР в спектре четырехфотонного рассеяния света.

Вращательные линии с усилением почти на порядок наблюдаются (рис.4, 5) в спектрах водных растворов биологических макромолекул (белок, ДНК), что свидетельствует о способности молекул

биополимеров существенно увеличивать эффективную концентрацию квазисвободных молекул воды в сольватной оболочке макромолекулы. Это обстоятельство свидетельствует также в пользу того, что наблюдаемые в эксперименте линии вращательного спектра молекул  $H_2O$  не связаны с пузырьками воздуха, которые могут присутствовать в исследуемых образцах.

Соотношение интенсивности линий вращательного спектра орто и пара изомеров воды при добавлении в раствор ДНК или белка увеличивается не пропорционально. Интенсивность вращательного спектра орто- изомеров существенно превосходит интенсивность вращательного спектра пара изомеров в присутствии использованных в наших экспериментах молекул биополимеров (рис.6). Отметим, что ранее [24] наблюдалась селективная сорбция пара-изомеров молекул воды из газовой фазы при их пропускании над поверхностью образцов ДНК, лизоцима и каллагена.

Возможно, указанная селективность взаимодействия орто- пара- спин-изомеров воды с биологическими макромолекулами связана с обнаруженной недавно в модельных расчетах [45, 46] резкой зависимостью характера гидратации (притягивания или отталкивания молекул  $H_2O$ ) от флуктуаций поляризуемости комплекса молекула  $H_2O$  – молекула примеси. Эта характеристика может быть различной для орто- и пара- спин-изомеров  $H_2O$ .

При денатурации ДНК селективность взаимодействия уменьшается (рис.7). Учитывая, что энергия гидратации является заметным фактором в предпочтительности той или иной конформации макромолекулы в растворе, очевидно, что изменение орто/пара отношения молекул воды в клетке может существенно влиять на равновесные значения концентраций функционально важных состояний макромолекул *in vivo*, и, следовательно, на функционирование клеток.

Образование молекул  $H_2O_2$  и  $OH$  в гидратных слоях углеродных нанотрубок и биополимеров, обнаруженное в наших экспериментах спектроскопически (рис.8-10), качественно подтверждает результаты ранее проведенных экспериментов [25], в которых наблюдалось окисление малых примесей люминофоров в водных растворах фуллеренов.

Спектры четырехфотонного рассеяния лазерного излучения в водных растворах биополимеров (белок, ДНК, денатурированная ДНК) и в дважды дистиллированной воде обнаруживают резонансы вращательных переходов орто- и пара-изомеров основного изотопа молекулы  $H_2O$ , а также молекул  $H_2O_2$  и  $OH$ .

Резонансный вклад вращательного спектра молекул  $H_2O$  в сигнал четырехфотонного рассеяния существенно возрастает при переходе от воды к растворам биополимеров. Механизм этого явления до конца неясен, однако можно предположить, что присутствие молекул биополимеров приводит к нарушению исходной топологии сетки водородных связей в гидратной оболочке, увеличивая концентрацию слабо связанных и свободных молекул  $H_2O$ .

Обнаружено, что нативные молекулы белка и ДНК в растворе селективно взаимодействуют с пара-изомерами  $H_2O$ . При денатурации ДНК селективность взаимодействия не обнаружена. Не обнаружена она и в водных суспензиях углеродных нанотрубок.

Представленные в данной работе результаты также показывают, что спектроскопия ЧФР света в водных суспензиях нанотрубок позволяет измерять кубическую нелинейность их радиальных дыхательных мод (рис.7), сравнивая вклады в сигнал резонансов Бриллюэна (рис.8), дыхательных мод и вращательных линий воды в гидратном слое. Относительные измерения такого типа потенциально более эффективны, чем другие, ныне известные [40], поскольку сравнение происходит с рассчитанными из первых принципов резонансами Бриллюэна, амплитуда которых зависит только от макроскопических характеристик среды.

Дальнейшая работа может развиваться в нескольких направлениях: 1. Изучение динамики образования перекиси водорода в водном растворе ДНК при денатурации; 2. Выяснение динамики изменения отношения орто/пара спин-изомеров воды при вариациях концентрации биополимеров в водных растворах; 3. Детальное изучение величины наблюдаемого в спектрах ЧФР бриллюэновского сдвига от концентрации биополимера в растворе.

Работа выполнялась при частичной поддержке грантов РФФИ 09-02-01173, 08-02-00008 и гранта поддержки научных школ РФ (No. NSh-8108.2006.2).

## Литература

1. S. Garde, G. Hammer, A.E. Garcia, M.E. Paulaitis, and L.R. Pratt, Phys. Rev. Lett. 77, 4966 (1998).
2. T.F. Miller, E. Vanden-Eijnden, and D. Chandler, Proc. Natl. Acad. Sci. 104, 14559, (2007).
3. P. Liu, X.H. Huang, R.H. Zhou and B.J. Berne, Nature (London) 437, 159 (2005).
4. Y. Zhu, and S. Granick, Phys. Rev. Lett. 88, 106102 (2002).
5. Y. Levy, and J.N. Onuchic, Proc. Natl. Acad. Sci. 101, 3325 (2004).

6. F.H. Stillinger, J. Solution Chem. **2**, 141 (1973).
7. A.P. Willard, and D. Chandler J. Phys. Chem. B **112**, 6187 (2008).
8. Poynor, L. Hong, I.K. Robinson, S. Granick, Z. Zhang, and P.A.Fenter, Phys. Rev. Lett. **97**, 266101, (2006).
9. M. Mezger, H. Reichert, S. Schöder, J. Okasinski, H. Schröder, H. Dosch, D. Palms, J. Ralston, and V. Honkimäki, Proc. Natl. Acad. Sci. **103**, 18401 (2006).
10. Z. Ge, D.G. Cahill, and P.V. Braun, Phys. Rev. Lett. **96**, 186101, (2006).
11. Y.-C. Liou, A. Tocilj, P.L. Davies, Z. Jia, *Nature* 2000; **406**: 322.
12. S.P. Graether, M.J. Kuiper, S.M. Gagne, V.K. Walker, Z. Jia, B.D. Sykes, P.L. Davies, *Nature* 2000; **406**: 325.
13. U. Heugen, G. Schwaab, E. Brundermann, M. Heyden, X. Yu, D.M. Leitner, M. Havenith, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 2006; **103**: 12301.
14. S.Ebbinghaus, S.J.Kim, M. Heyden, X. Yu, M.Gruebele, D.M. Leitner, M. Havenith, J.Am.Chem.Soc. 2008, **130**, 2374-2375.
15. D.Eisenberg, and W.Kauzmann, *The Structure and Properties of Water*, (Clarendon Press, Oxford, 2005).
16. А.Ф. Бункин, С.М.Першин, А.П.Горчаков, А.А. Нурматов, *Письма в ЖТФ*, **32**, 20 (2006).
17. А.Ф. Бункин, А.А. Нурматов, С.М. Першин, *УФН*, **176**, 883 (2006).
18. A.F. Bunkin, and S.M. Pershin, 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. L. Rothman, D. Jacquemart, A. Barbe, D.C. Benner, M. Birk, L.R. Brown, M.R. Carleer, C. Chackerian, Jr.K. Chance, L.H. Coudert, V. Dana, V.M. Devi, J.M. Flaud, R.R. Gamache, A. Goldman, J.M. Hartmann, K.W. Jucks, A.G. Maki, J.Y. Mandin, S.T. Massie, J. Orphal, A. Perrin, C.P. Rinsland, M.A.H. Smith, J. Tennison, R.N. Tolchenov, R.A. Toth, V.J. Auwera, P. Varanasi, G. Wagner, J. Quant. Spectr. Radiant. Transfer. **96**, 139 (2005). [www.elsevier.com/locate/jqsrt](http://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. E. Nakamura, and H. Isobe, Accounts of Chemical Research, **36**, 807 (2003).
26. A.F. Bunkin, and S.M. Pershin, Laser Physics Letters v.4, #4, 270-274, 2007.
27. Bunkin A.F., Nurmatov A.A. *Laser Physics*, **13**, 328, (2003).
28. А.Ф.Бункин, А.А.Нурматов, С.М.Першин, Р.С.Хусаинова, С.А.Потехин Квантовая электроника, т.37, №10 941-945 (2007)
29. J.H.J. Scott, S.A. Majetich, *Phys.Rev.* 1995; B **52**: 12564.
30. G. E. Walrafen, in *Water: A Comprehensive Treatise*, edited by F. Franks (Plenum, New York, 1972), Vol. 1; G. E. Walrafen, J. Phys. Chem. **94**, 2237 (1990); E. W. Castner, Y. J. Chang, Y. C. Chu, and G. E. Walrafen, *ibid.* **102**, 653 (1995).
31. Брусков В.И., Масалимов Ж.К., Черников А.В. *Доклады РАН (биофизика)*, **384**, 821 (2002).
32. Бенсассон Р., Ленд Э., Праскот Т. *Флеш-фотолиз и импульсный радиолиз*, М., Мир, 1987, 398 с.
33. Bunkin A.F., Nurmatov A.A., Pershin S.M, *Laser Phys.Lett.*, **3**, 275 (2006).
34. Y.Xu, P.E.Pehrsson, L.Chen, R.Zhang, W.Zhao, J.Phys.Chem. C 2007, **111**, 8638-8643.
35. Dresselhaus M.S., Dresselhaus G., Eklund P.S. *Science of Fullerenes and Carbon Nanotubes*. Academic Press: New York, 1996; 1.
36. Fantini C, Jorio A, Souza M, Strano M.S, Dresselhaus M.S, Pimenta M.A. *Phys. Rev. Lett.* 2004: **93**: 147406.
37. O'Connell M.J., Sivaram S, Doorn S.K. *Phys.Rev. B* 2004: **69**: 235415.
38. E. Nakamura, and H. Isobe, Accounts of Chemical Research, **36**, 807 (2003).
39. Jacobson A.G, Shen Y.R. *Appl.Phys.Lett.* 1979: **34**: 464.
40. Zhang B.P, Shimazaki K, Shiorawa T, Suzuki M, Ishibashi K, Satio R. *Appl.Phys.Lett.* 2006; **88**: 241101.
41. Fabelinskii I.L *Physics – Uspekhi.* 1994; **37**: 821.
42. Frochtenicht R., Kalodis M., Koch M., Huisken F. *J. Chem. Phys.*, **105**, 6128 (1996).
43. Redington R.L., Milligan D.E. *J. Chem. Phys.*, **37**, 2162 (1962).
44. «Вода: структура, состояние, сольватация» под ред. А.М.Кутепова, М., «Наука», 2003г., 400с.
45. Yamaguchi T., Chong S.-H., Hirata F. *J. Chem. Phys.*, **119**, 1021 (2003).
46. Yamaguchi T., Matsuoka T., Koda S. *J. Chem. Phys.*, **120**, 7590 (2004).
47. Chandler D. *Nature* 2007; **445**: 831.
48. Willard A.P, Chandler D. *J. Phys. Chem. B* 2008; **112**: 6187.