

УДК 548.0

РЕВОЛЮЦИЯ В КРИСТАЛЛОГРАФИИ *

У. К. Гамильтон

Обзор видного американского специалиста посвящен последним достижениям в области рентгеноструктурного анализа, связанным с автоматизацией эксперимента посредством дифрактометров и широким использованием современных электронных вычислительных машин. Эти «технические» нововведения превратили рентгеноструктурный анализ в рутинный лабораторный метод определения строения кристаллов и молекул. В настоящее время определение структур средней сложности может быть проведено за 2—3 недели, а структуры «среднего» белка — менее чем за год. Существенно, что расшифровку не очень сложных структур уже могут проводить сами химики под руководством опытного кристаллографа, тогда как раньше структурный анализ осуществлялся исключительно профессионалами. Библиография — 40 наименований.

ОГЛАВЛЕНИЕ

I. Введение	566
II. Как быстро и как дорого?	569
III. Проблема измерений	571
IV. Дифракционная геометрия	572
V. Автоматические дифрактометры	573
VI. Управляющие компьютеры	574
VII. Координатные детекторы	575
VIII. Роль вычислительной техники	579
IX. Визуальное представление структуры	581

I. ВВЕДЕНИЕ

Определение геометрии молекул нескольких белков дифракцией рентгеновых лучей и присуждение Нобелевских премий за эти исследования и определение структуры других больших молекул являются хорошо известным свидетельством особых достоинств этого метода в изучении химической связи и архитектуры молекул¹⁻⁵. Далеко не так широко известен прогресс в применении кристаллографии к определению структуры молекул малых и промежуточных размеров.

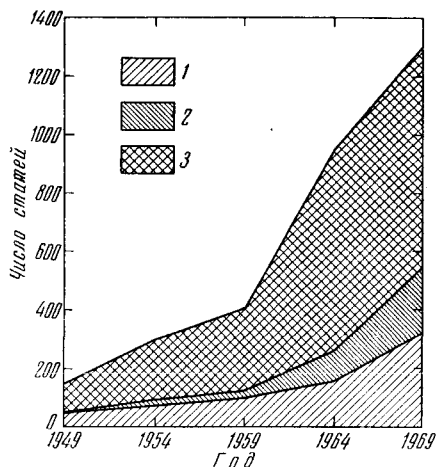
Во всех областях химии возрос интерес к трехмерной конформации молекул и к проблемам влияния конформации на равновесие и кинетику реакций. Дифракция рентгеновских лучей — лучший инструмент исследования детальной конформации молекул. Дифракционные исследования структуры сложных неорганических и металлоорганических молекул сыграли значительную роль в ренессансе неорганической химии, а рутинное применение кристаллографии в органической химии оказало огромную помощь в выяснении строения и синтезе больших молекул с интересными и полезными свойствами.

Журнал *Acta Crystallographica*, в котором публикуются многие фундаментальные работы по кристаллическим структурам, за несколько последних лет претерпел, наряду с большинством других научных журналов, феноменальное увеличение объема. Более того, в настоящее вре-

* Walter C. Hamilton, *Science*, 169, 133 (1970), перев. с англ. Ю. Т. Стручкова.

многие статьи по кристаллическим структурам публикуются в химических журналах, поскольку в большинстве случаев детали метода расшифровки структуры значительно менее интересны, чем химические проблемы, к решению которых применяется этот метод. Например, среди

Рис. 1. Рост числа дифракционных исследований монокристаллов по данным нескольких наиболее авторитетных журналов, публикующих такие работы. Общее число взято как половина числа ссылок в Chemical Abstracts в разделе «Кристаллическая структура». 1 — Acta Cryst., 2 — J. Am. Chem. Soc., J. Chem. Soc., Inorg. Chem.; 3 — другие журналы



последних выпусков журнала Inorganic Chemistry определению кристаллической структуры посвящено 20% статей (рис. 1).

Возросло не только число опубликованных статей по кристаллическим структурам, но увеличился и размер молекул, которые могут быть исследованы методом рентгеноструктурного анализа (табл. 1). Помимо

ТАБЛИЦА 1

Число независимых атомов в структурах молекул, опубликованных в журналах Acta Crystallographica и Inorganic Chemistry. Произвольные примеры, выбранные примерно из 30 структур за год

Год	Журнал	Число атомов		
		Простейшая структура	Средняя структура	Наибольшая структура
1955	Acta Cryst.	2	9	21
1959	Acta Cryst.	3	10	21
1964	Acta Cryst.	3	17	37
1969	Acta Cryst.	4	19	52
1969	Inorg. Chem.	5	27	212*

* Уточнялись параметры 14 индивидуальных атомов и 18 фенильных групп, собственная геометрия которых считалась заданной⁶.

структур нескольких белков*, одной из самых больших молекул, для которых было проведено полное структурное исследование⁵, является молекула витамина В₁₂, представленная на рис. 2, а. Определение структур, содержащих до 100 атомов в молекуле, обычно представляет собой рутинную задачу.

Приведенная статистика иллюстрирует лишь одну сторону революции в кристаллографии. Хотя эта статья посвящена определению кристалли-

* Расшифровка структуры белков требует специальных методов (главный из них — применение нескольких изоморфных кристаллов с замещением тяжелыми атомами) и обычно не приводит к уточнению положения тяжелого атома.

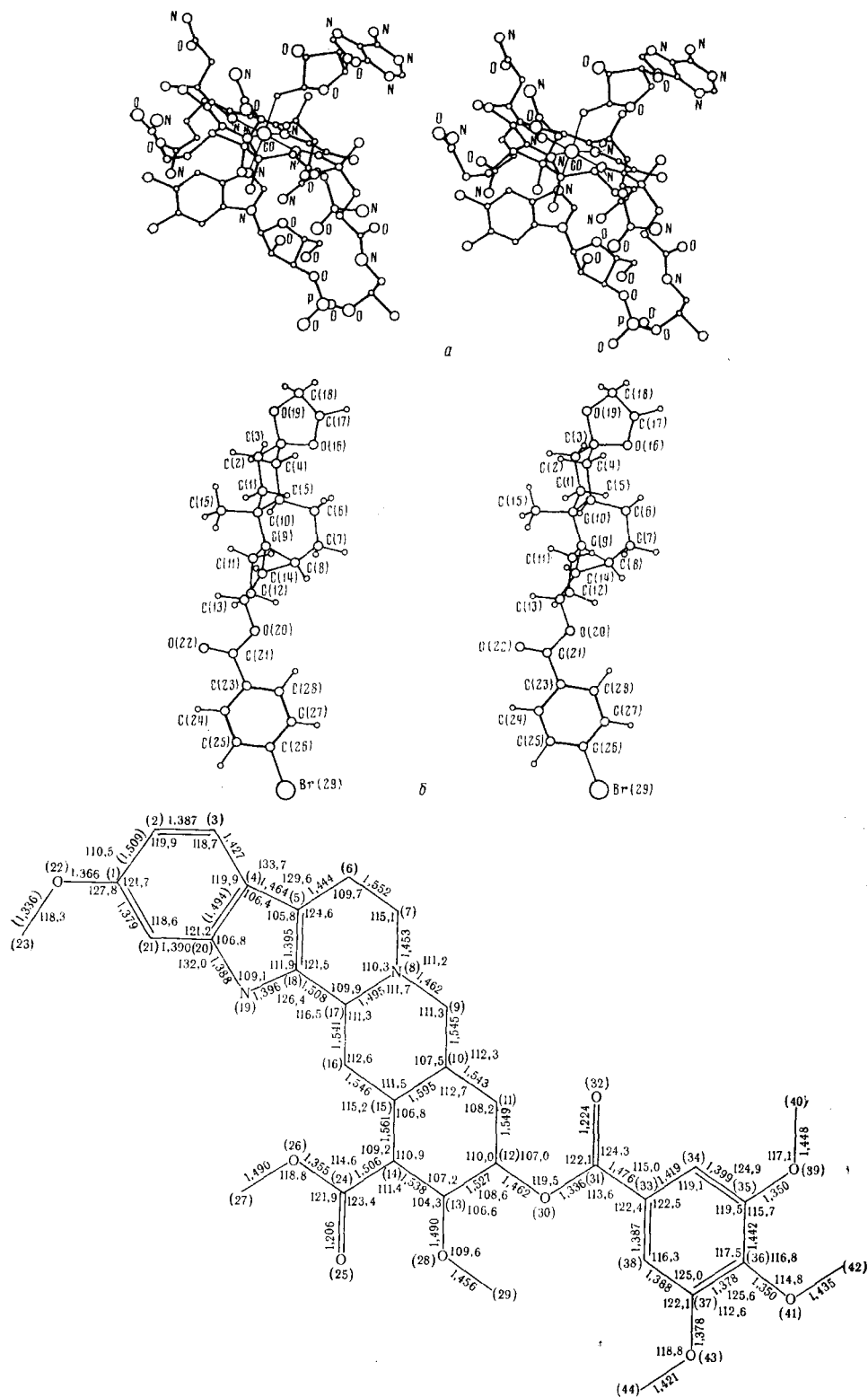


Рис. 2. Стереоскопические чертежи (кроме *в*) молекул, вычерченные компьютером (программа ORTEP, 19). Чертежи можно рассматривать через небольшой ручной стереоскоп или для многих людей невооруженным глазом. *а* — Структура витамина В₁₂, определенная рентгеноструктурным анализом, *б* — Структура аддукта карбена C₂₄H₂₀O₄Br, определенная за 10 дней в рамках проекта быстрого рентгеноструктурного анализа Калифорнийского технологического института, *в* — Структура резерпина C₃₃H₄₀N₂O₉ — одна из самых больших ацентрических структур, расшифрованная прямыми методами

ческих структур, технологические и теоретические достижения кристаллографии внесли существенный вклад в решение многих других важных проблем твердого состояния от эволюции минералов до теории фазовых превращений второго рода. Современный кристаллограф — специалист в области проблем твердого состояния и его интересы столь же широки, как вся эта область науки.

II. КАК БЫСТРО И КАК ДОРОГО?

Основная цель этой статьи показать, что структуры большого числа молекул умеренных размеров в настоящее время могут быть определены достаточно быстро и достаточно точно, так что вся геометрическая информация, необходимая для анализа сложной химической проблемы, может быть получена за разумный отрезок времени.

Каков же этот «разумный отрезок времени» и какова стоимость определения структуры молекулы среднего размера кристаллографическими методами? Под определением структуры мы понимаем нахождение положения относительно прямоугольной системы всех атомов (исключая атомы водорода) с точностью 0,01 Å (ошибка в длинах связей $\sim 1/2\%$). В результате будет известна конформация молекулы, известны и длины связей и углы с точностью, достаточной для уверенного суждения о порядке связей, напряжениях и искажениях в сравнении с ожидаемой геометрией.

Выполнить полное определение кристаллической структуры с получением химически значимых результатов можно менее чем за 2 недели. Это было показано в ряде лабораторий и являлось главной целью проекта «Быстрый анализ органической структуры» в Калифорнийском технологическом институте, где химиков-органиков обучали, как проводить определение кристаллических структур, пользуясь консультацией квалифицированного кристаллографа. Цель этого проекта хорошо описана его инициатором Борднером⁷:

«Нет оснований, почему бы химики-органики и биохимики не использовали рентгеноструктурный анализ в своих исследованиях промежуточных продуктов синтеза и небольших биологических молекул... Если рентгеноструктурный анализ следует применять как рутинный метод, он должен быть достаточно быстрым, чтобы им можно было воспользоваться в процессе проведения ряда стадий синтеза или исследования метаболических превращений. Если химик может изолировать соединение, получить его в виде кристаллов и определить его структуру за 2—3 недели, тогда информация, даваемая этим структурным анализом, безусловно будет полезной на последующих стадиях исследования соединения».

Молекула, показанная на рис. 2, б, является типичной среди тех, которые важны для решения реальных проблем органической химии и структуры которых были определены в среднем за 2 недели каждая. Результаты структурного определения, проведенного за такое короткое время, могут оказаться неполными, если основной интерес заключается в выяснении тонких деталей движения атомов и распределения электронной плотности. Но обычно полученные результаты будут достаточны для решения химической задачи, и они должны быть получены достаточно быстро, чтобы представить известный интерес для химиков.

Структуры, расшифрованные при выполнении проекта Калифорнийского технологического института, почти все относились к производным с тяжелым атомом, так что определение структуры было исключительно рутинным делом. Однако зачастую это не так, и в случае более крупных

молекул без тяжелых атомов типичный период времени, необходимый для опытного кристаллографа от выращивания кристаллов до первого сообщения о результатах, по-видимому, составит около 2 месяцев. Я не знаю кристаллографа, который «выдает» структуры с интервалом 2 недели в течение круглого года, хотя существует очень немного кристаллографов, решающих по 6 структур в год. Следует отметить, что «консультация с опытным кристаллографом» представляет важную часть проекта Калифорнийского технологического института. Кроме того, хотя расшифровка многих структур может быть рутинной, сложности, обусловленные псевдосимметрией, двойникованием, неупорядоченностью и нестабильностью кристаллов, могут привести к тому, что определение отдельной структуры превратится в серьезную исследовательскую проблему. Только высококвалифицированный кристаллограф со стажем в несколько лет может, по-видимому, достичь в среднем даже более пессимистического уровня производительности 6 структур в год.

ТАБЛИЦА 2

Оптимальные продолжительность и стоимость определения кристаллических структур *

Проблема	Человеко-месяцев	Использование компьютера (килослов×час)	Время работы дифрактометра (недели)	Стоимость (доллары)		
				Заработная плата и накладные расходы	Стоимость работы компьютера	Амортизация оборудования
<i>a</i>	1/2	150	1	2000	600	600
<i>б</i>	1	200	2	4000	800	1200
<i>в</i>	2	1000	4	8000	4000	2500

* Стоимость, которая меняется от лаборатории к лаборатории, оценивалась, исходя из следующих цифр: исследовательский человеко-год — 50 000 дол., стоимость 1 килослово-часа компьютера CDC 6600 — 4 дол., амортизация дифрактометра 30 000 долларов в год. Стоимость амортизации дифрактометра возрастает, если прибор не используется непрерывно (что вероятно в большинстве лабораторий).

а) Проект быстрого анализа Калифорнийского технологического института (29 атомов, 1 тяжелый, структура на рис. 2, б), б) структура с 28 атомами равного веса (расшифрована прямыми методами в Брукхейвене), в) структура с 55 атомами (расшифрована методом тяжелого атома в Брукхейвене).

Стоимость проведения структурного исследования зависит от многих факторов. Если структура может быть расшифрована за 2 недели, накладные расходы и заработная плата будут, разумеется, значительно ниже, чем расходы на кристаллографа, исследующего 6 или меньше структур в год. В табл. 2 представлены различные оценки стоимости определения некоторых типичных кристаллических структур. Один пример взят из программы Калифорнийского технологического института и два из практики автора в Брукхейвене. В каждом случае основное предположение состоит в том, что необходимо определить структуру, уточнить длины связей до стандартных отклонений 0,01 Å и подготовить результаты к публикации. Группа кристаллографов, проводящая только обслуживание химиков структурным анализом, вполне может приблизиться к идеалу Калифорнийского технологического института. Однако лучшие кристаллографы-структурщики, которые, вероятно, способны к указанному уровню производительности, являются не техническими работниками, но химиками или физиками, заинтересованными в конкретных химических или физических проблемах, к решению которых они прилагают свою кристаллографическую эрудицию. Выдача структур такими учеными будет относительно небольшой, однако оценка стоимости в строке *в* табл. 2, вероятно, не является неправильной для каждого исследования кристаллической структуры, которое они проводят. Хотя табл. 2

показывает, что определение кристаллической структуры оказывается не дешевым, факт остается фактом, что рентгеноструктурный анализ представляет собой доступный инструмент, который может дать самую дешевую и наиболее существенную информацию для решения любой химической проблемы, где необходимо точное знание молекулярной конфигурации. Химик может сказать: «Какой пяток структур необходим для решения этой химической проблемы?» и потом заманить сочувствующего коллегу кристаллографа в лабораторию, чтобы получить ответы.

Цель этой статьи — рассмотреть технические достижения, которые сделали возможной эту революцию в кристаллографии. Таких достижений два: автоматический дифрактометр для сбора экспериментальных данных и цифровая вычислительная машина с высокой скоростью и большой памятью для расшифровки структуры и уточнения параметров, описывающих кристаллическую и молекулярную структуру.

III. ПРОБЛЕМА ИЗМЕРЕНИЙ

Рентгеновские лучи отражаются кристаллом только в том случае, когда кристалл ориентирован таким образом, что серия плоскостей с миллеровыми индексами (h, k, l) образует угол θ как с падающим, так и с отраженным лучами; этот угол задается уравнением Брэгга

$$\sin \theta = (1/d) (\lambda/2), \quad (1)$$

где d — межплоскостное расстояние, λ — длина волны рентгеновских лучей.

Интенсивность каждого такого брэгговского отражения пропорциональна квадрату структурного фактора

$$F(h, k, l) = \sum_j f_j(h, k, l) T_j(h, k, l) \exp[2\pi i(hx_j + ky_j + lz_j)], \quad (2)$$

где сумма берется по всем атомам j в элементарной ячейке кристалла*. Каждый атом характеризуется своей атомной амплитудой рассеяния f_j , своим средним положением, определяемым радиусом — вектором \mathbf{r}_j , и фактором Дебая — Уэллера T_j , описывающим движение атома. Трансформация Фурье структурного фактора $F(\mathbf{h})$ дает рассеивающую плотность кристалла

$$\rho(\mathbf{r}) = \sum_{\mathbf{h}} F(\mathbf{h}) \exp(-2\pi i \mathbf{h} \cdot \mathbf{r}), \quad (3)$$

максимумы которой совпадают с положениями атомов**.

Объем экспериментальных данных, т. е. индивидуальных измерений $F(\mathbf{h})$ с различными \mathbf{h} , необходимый для определения кристаллической структуры, можно оценить двумя способами. Для хорошего разрешения атомов, находящихся на расстоянии 1 Å друг от друга, необходимо из-

* Можно задать вектор \mathbf{h} с компонентами (h, k, l) и вектор \mathbf{r}_j с компонентами (x_j, y_j, z_j) и переписать уравнение (2) в виде:

$$F(\mathbf{h}) = \sum_j f_j(\mathbf{h}) T_j(\mathbf{h}) \exp(2\pi i \mathbf{h} \cdot \mathbf{r}_j).$$

** Рассеивающая плотность при дифракции рентгеновских лучей — это электронная плотность, при дифракции нейтронов — ядерная рассеивающая плотность.

мерить все отражения, которые могут быть получены при использовании излучения с длиной волны $\sim 1,5$ Å. Число таких отражений равно:

$$N = (2/3)\pi(2/\lambda)^3 V_{\text{ячейки}} \approx 5V_{\text{ячейки}}, \quad (4)$$

где $V_{\text{ячейки}}$ — объем ячейки. Элементарные ячейки кристаллов с небольшими органическими молекулами имеют объемы в несколько сот кубических ангстрем. Хотя симметрия кристалла может уменьшить необходимое число отражений зачастую в 2 или 4 раза, а иногда и больше, все же для большинства молекул, представляющих химический интерес, это число будет составлять несколько тысяч. Средняя органическая молекула имеет объем ~ 10 Å³ на 1 атом, и, таким образом, необходимое число отражений должно составлять ~ 50 на 1 атом. Для грубого определения структуры может быть достаточной половина этого числа.

Другой способ оценки необходимого числа отражений основан на том, что для полного описания атома требуется 10 параметров: три позиционных параметра (координаты x_j, y_j, z_j), шесть амплитуд теплового движения (компоненты симметричного тензора второго ранга) и масштабный множитель. Чтобы при уточнении параметров методом наименьших квадратов степень переопределения была достаточной, желательно иметь по пять экспериментальных измерений на каждый уточняемый параметр. И снова мы приходим к оценке 50 отражений на атом, т. е. 2—5 отражений на единицу молекулярного веса органического соединения.

IV. ДИФРАКЦИОННАЯ ГЕОМЕТРИЯ

При описании геометрии дифракционной картины удобно рассматривать обратную решетку — геометрическую систему точек, каждой из которых отвечают миллеровы индексы (h, k, l) дифрагирующей плоскости. Условия дифракции показаны на рис. 3. Представим сферу радиуса $1/\lambda$,

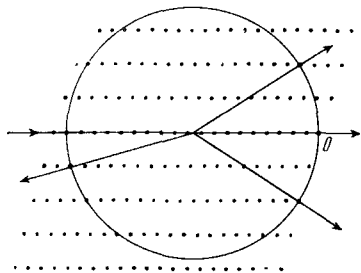


Рис. 3. Геометрия дифракционного эксперимента. Построена сфера радиуса $1/\lambda$, проходящая через начало обратной решетки O . Дифракция происходит под определенными углами (показано стрелками), когда узел обратной решетки находится на поверхности сферы. Угол между падающим лучом, проходящим через O , и дифрагированным лучом есть угол рассеяния 2θ .

называемую сферой Эвальда. Падающий луч направлен в начало O обратной решетки. Дифракция происходит только в том случае, когда точки обратной решетки лежат на сфере, а направление дифрагированного луча задается вектором, соединяющим центр сферы с точкой обратной решетки. Легко видеть, что при некотором положении кристалла возникнет лишь очень малое число дифрагированных лучей. Однако можно вращать кристалл в пространстве вокруг начала O . При этом многие точки обратной решетки будут прорезать сферу и, следовательно, приводить к появлению рентгеновских дифракционных максимумов. Это представление служит основой для рассмотрения всех методов сбора экспериментальных данных.

Большинство самых ранних структурных определений методом дифракции рентгеновских лучей было проведено Брэггами^{8,9}, которые применяли *дифрактометр*. Для измерения интенсивности дифрагированного излучения использовалась ионизационная камера, помещавшаяся на пути дифрагированного луча. Положение кристалла, а, следовательно, и положение обратной решетки относительно сферы Эвальда задавалось установкой трех эйлеровых углов. При последовательных движениях кристалла и детектора можно было измерить интенсивности всех возможных отражений (h, k, l). Именно эта схема используется в большинстве современных дифрактометров с тем исключением, что применяется сцинтилляционный счетчик с фотоумножителем*.

Установка углов ориентации кристалла и положения счетчика, проведение измерений и регистрация результатов для тысяч брэгговских отражений, необходимых для расшифровки структуры средней сложности, представляют, очевидно, трудоемкий процесс, если он осуществляется вручную. Однако в ряде лабораторий измерения в течение ряда лет проводили именно этим способом. Таким образом, рентгеновский дифрактометр был одним из первых кандидатов для полностью автоматического контроля. Именно автоматический контроль процесса измерений и обусловил в значительной степени революцию в кристаллографии.

У. АВТОМАТИЧЕСКИЕ ДИФРАКТОМЕТРЫ

Примерно 10—15 лет назад ряд лабораторий и фирм разработал автоматические дифрактометры как четырехкружные, так и других типов, имитировавшие различные удачные и традиционные приборы для регистрации дифракционной картины фотографическим способом. Различные установки углов на дифрактометре производятся моторами. Информация для установки осей моторов на заданные углы, для подготовки прибора к счету импульсов и для регистрации данных вводится в контрольное устройство дифрактометра на перфокартах или перфорированной бумажной ленте. Результаты измерений или перфорируются на этих носителях информации или их можно записывать на магнитной ленте. Исходная информация для ввода на бумажной ленте или на картах обычно вырабатывается программой для компьютера, который рассчитывает необходимые исходные данные по константам элементарной ячейки кристалла, углам, описывающим начальную ориентацию кристалла, и информации, задаваемой экспериментатором для проведения конкретной серии измерений. Результаты измерений считываются непосредственно в компьютер для обработки и расшифровки структуры.

Большинство дифрактометров, эксплуатируемых в настоящее время, действует этим способом. Благодаря автоматизации сейчас можно проводить рутинное круглосуточное измерение нескольких сотен отражений в сутки. Это значит, что набор экспериментальных данных для молекулы средних размеров может быть получен менее, чем за неделю. Исследователь освобождается для выполнения менее технической работы, а вероятность ошибок человека в процессе сбора экспериментальных данных уменьшается. Необходимо также подчеркнуть, что ошибка исследователя на стадии подготовки эксперимента и определения исходных параметров для серии измерений может иметь катастрофические последствия, поскольку в автоматизированном эксперименте нет человеческого существа, которое могло бы распознать ошибку, если она произойдет. Поскольку процесс сбора данных происходит с большой скоростью, мож-

* Превосходное специальное рассмотрение современных рентгеновских дифрактометров см.¹⁰.

но провести много дублирующих измерений и получить хорошие оценки воспроизводимости данных. Это привело к повышению точности определения кристаллических структур.

VI. УПРАВЛЯЮЩИЕ КОМПЬЮТЕРЫ

Успех автоматических дифрактометров как рутинных лабораторных приборов в значительной степени обусловлен надежностью и отсутствием необходимости обслуживания интегральных логических схем, применяемых в буферных устройствах между устройствами ввода и вывода информации и управляемыми ими механическими и электрическими устройствами. Надежность и снизившаяся стоимость таких схем в последние годы привели также к созданию недорогих и мощных цифровых компьютеров; такие компьютеры теперь широко используются для управления дифрактометрами¹¹⁻¹⁵. Эти разработки имеют несколько специфических достоинств.

Во-первых, экспериментатору необходимо ввести лишь несколько параметров в компьютер, который затем рассчитывает все установочные углы и другую информацию, необходимую для проведения серии измерений. Большие колоды карт или рулоны бумажной ленты со свойственной им возможностью механических повреждений (заминание карт, обрыв ленты) становятся ненужными. Во-вторых, если процесс сбора данных должен быть изменен, то для дифрактометра, управляемого компьютером, требуется только внести изменение в программу; в случае же дифрактометра, управляемого информацией на картах или ленте, потребуется изменение в электронной схеме. Таким образом, прибор, управляемый компьютером, обладает значительно большей гибкостью. Наблюдая за выдачей данных, исследователь может усмотреть необходимость в изменении методики сбора данных. Часто замена одного слова в памяти компьютера может быть достаточной для немедленного изменения процесса измерений. Третье преимущество — возможность обратной связи: результаты эксперимента можно использовать для управления дальнейшим процессом измерений. Это особенно ценно для наблюдения за качеством данных и для проверки стабильности отражающей способности и ориентации кристалла; эта возможность также очень важна для автоматического определения ориентации кристалла. Кристалл можно установить на дифрактометр, запустить программу компьютера, и после возвращения исследователя с лэнча будет отпечатан набор ориентационных параметров. Ограниченный объем обработки результатов измерений также можно производить в процессе работы дифрактометра: интенсивности можно исправить на фон и ввести другие поправки, необходимые для перевода наблюдаемых интенсивностей в структурные факторы.

Во многих лабораториях другим преимуществом дифрактометра, управляемого компьютером, оказалась стоимость. Если имеется компьютер, пригодный для работы в режиме разделения времени, стоимость его можно разделить между рядом экспериментов. Таким образом, каждый эксперимент может получить доступ к значительно более мощному компьютеру, чем мог бы иметь каждый из них в отдельности. В Брукхейвенской лаборатории на реакторе с мощными пучками нейтронов девять дифрактометров несколько лет управлялись одним компьютером¹¹⁻¹³. Стоимость введения в эту систему нового дифрактометра равнялась расходам на приобретение механического оборудования плюс 10 000 долларов на дополнительное буферное устройство.

VII. КООРДИНАТНЫЕ ДЕТЕКТОРЫ

Для большинства структурных исследований автоматический четырехкружный дифрактометр имеет достаточно высокую производительность, так что остается пожелать лишь немногого. Данные, необходимые для определения молекулы средних размеров с неизвестным строением, могут быть измерены за неделю. Однако для больших молекул, например белков, дело обстоит иначе. Не только число отражений, которое необходимо измерить, будет значительно больше, но возникает также проблема радиационного разрушения кристалла. Облучение интенсивным источником рентгеновских лучей в течение нескольких часов может заметно повлиять на интенсивности брэгговских отражений из-за нарушения упорядоченности кристаллической структуры. Поэтому для получения максимального возможного количества данных при заданной экспозиции необходима предельно высокая эффективность дифрактометра. Рис. 3 показывает, что в случае большой элементарной ячейки (плотное расположение узлов в обратной решетке) одновременно или почти одновременно будет возникать много брэгговских отражений, и

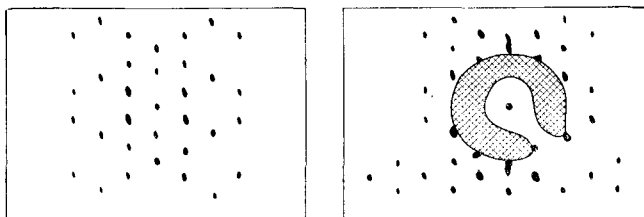


Рис. 4. Сравнение рентгенограммы и ее генерированной компьютером модели, на которой подавлен фон. Экспериментальная пленка сканировалась интегрирующим денситометром, который регистрирует на магнитной ленте оптическую плотность более чем в 1 000 000 точек. Магнитная лента обрабатывается компьютером, и результаты вычерчиваются катодно-лучевой трубкой на 35-миллиметровой пленке

это особенно справедливо для белков. Таким образом, будет возникать богатое, представляющее интерес рассеяние, которое не регистрируется одним счетчиком. В принципе необходимо иметь счетчики, окружающие кристалл со всех сторон.

Этот вывод представляет обоснование того, что было основой кристаллографических методов в течение многих лет — применения фотопленки в качестве среды счета квантов. Кусок пленки помещают вблизи кристалла (удобнее всего, чтобы эта пленка была изогнута вокруг кристалла по цилиндру). Пленка экспонируется при медленном вращении кристалла в рентгеновском пучке. При этом воспринимается и регистрируется на фотопленке все излучение, отражаемое кристаллом. Были сконструированы многие типы остроумных камер для такой регистрации. Фотографическая пленка — простейший пример того, что может быть названо *координатным* или *позиционно-чувствительным* детектором. Одновременно регистрируются *интенсивность* и *положение* дифракционного максимума.

Раньше интенсивности пятен на пленке оценивались визуальным сравнением с набором пятен стандартной интенсивности, но это опять-таки медленный и утомительный процесс. Позднее интенсивности стали измерять денситометрами, которые постепенно подвергались автоматиза-

ции. Пленка сканируется автоматически, а результаты обрабатываются компьютером; оптические плотности или записываются на магнитную ленту или вводятся непосредственно в компьютер для обработки. Результаты такой обработки пленки компьютером показаны на рис. 4*. Ряд кристаллографов, специализировавшихся на исследовании белков, считает, что применение пленки с автоматическим денситометрическим сканированием представляет предпочтительный метод измерения интенсивностей для структур с большими элементарными ячейками. Арндт рассчитал сравнительные эффективности пленки и отдельных

ТАБЛИЦА 3

Число отражений на 1° вращения кристалла для позиционно-чувствительного детектора или для пленки. Это число приблизительно характеризует увеличение производительности в сравнении с одним счетчиком. Регистрация отражений до разрешения 1,54 Å. Данные Арндта¹⁷.

Ребро ячейки (Å)	Одномерный растр счетчиков	Двумерный растр счетчиков
10	0,4	3,2
20	1,5	26
50	9,7	412
60	14	690
100	39	3194

счетчиков для элементарных ячеек различных размеров¹⁷. Эти результаты, отчетливо показывающие преимущества пленки для структур с большими элементарными ячейками, представлены в табл. 3.

Но справедливо и то, что пленка обладает рядом неудобств. Она требует обработки, линейность передачи интенсивности рентгеновских лучей удовлетворительна только в узком интервале интенсивностей, фон и зернистость делают ненадежным измерение очень слабых отражений. Поэтому продолжается поиск методов, которые заменили бы пленку в качестве координатного детектора, но не имели бы ее недостатков (рис. 5).

Одним из первых предложенных решений этой проблемы было применение так называемой искровой камеры, которая успешно использовалась в физических экспериментах с элементарными частицами**. Пленка заменяется проволоочной сеткой, находящейся в среде подходящего газа. Рентгеновский квант, проходящий через камеру, будет вызы-

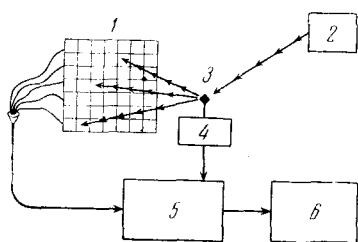


Рис. 5. Координатный рентгеновский детектор. Позиции детектируемого рентгеновского кванта регистрируются одновременно с положением кристалла. Результаты обычно вводятся непосредственно в цифровой компьютер для сортировки и обработки. 1 — растр счетчиков, 2 — рентгеновская трубка, 3 — образец, 4 — устройство кодирования ориентации, 5 — малый цифровой компьютер, 6 — устройство вывода

вать ионизацию газа, и если между сеткой и землей приложена разность потенциалов, будет возникать разряд. Положение разряда можно определить по потенциалам на концах проводников, так что этому событию будут приписаны координаты x и y . Из-за сложностей, связанных с эф-

* Сканирование пленки выполнено на приборе фирмы «Optronics International». Chelmsford, Mass. Подробное описание см.¹⁶.

** Общий обзор см.¹⁸. Рентгеновский дифрактометр, использующий эту методику, предложен Коуэнном, Томасом и Макинтайром¹⁹.

фективностью и разрешением, удачный рентгеновский дифрактометр, действующий на этом принципе, создать не удалось.

Доступность небольших твердых детекторов с хорошей чувствительностью и высоким разрешением в области киловольтовых рентгеновских лучей послужила основой для другого подхода. Набору из этих небольших детекторов можно придать любую желательную геометрическую конфигурацию, а импульсы, зарегистрированные каждым детектором, можно обрабатывать обычным способом. Этот принцип используется в дифрактометре Aesop (автоматический эквинаклонный спектрометр, оперирующий в параллельном режиме), который в настоящее время конструирует Томас и сотр. в Брукгейвенской Национальной лаборатории²⁰⁻²² (рис. 6). Кольцо из 128 твердых детекторов окружает кристалл, образуя одномерный круговой регистратор. Кристалл поворачивается один раз и измеряются все отражения, соответствующие одной плоскости обратной решетки. Число импульсов, угловое положение активного счетчика и угловое положение кристалла вводятся непосредственно в малый компьютер, который приписывает отражениям миллеровы индексы, вычисляет структурные факторы и регистрирует результаты на магнитной ленте для последующего использования. На рис. 6, б представлена диаграмма, которая показывает угловое положение брэгговского отражения в зависимости от угла поворота кристалла. Согласно табл. 3, производительность Aesop в случае кристалла с элементарной ячейкой $60 \times 60 \times 60$ Å (белок вчетверо крупнее миоглобина) должна быть в 10 раз больше, чем у прибора с одним счетчиком.

Недостатком Aesop является небольшое мертвое пространство между отдельными счетчиками. Однако это обстоятельство может учитываться управляющим компьютером: работа дифрактометра может быть запрограммирована так, чтобы избегать этих областей, или же некоторые отражения могут измеряться дважды. Более серьезным недостатком являются затраты, необходимые для превращения Aesop в двумерный детектор, который требуется для наивысшей производительности при измерении интенсивностей (табл. 3). Для этого потребуется порядка 10 000 индивидуальных детекторов-счетчиков.

Наиболее удовлетворительным подходом к созданию двумерной детекторной системы, имитирующей фотопленку, может быть использование в качестве регистрирующего устройства телевизионной камеры. Эту идею энергично разрабатывают Арнд в Медицинском исследовательском совете в Кэмбридже, а также некоторые группы в США²³⁻²⁵. Рентгеновская дифракционная картина попадает не на пленку, а на флуоресцирующий экран. Далее изображение усиливается, фокусируется на поверхности телевизионной камеры, сканируется и переводится в цифровую запись. Основные трудности связаны с чувствительностью и линейностью.

Многообещающей технологической разработкой является телевизионная камера с растром из кремниевых диодов, применяемая в системе Пикчерфон²⁶. Использование обычной телевизионной трубки ортискон основано прежде всего на преобразовании рентгеновского изображения в видимое, которое, в свою очередь, преобразуется экраном трубки в фотоэлектроны. Рентгеновские лучи генерируют заряды непосредственно на экране кремниевой трубки; затем зарядовое изображение можно сканировать и переводить в цифровой код. Разрешение, достигаемое в таких трубках, вполне достаточно для исследования рентгеновской дифракции (промышленные трубки имеют диоды диаметром 8 мк, центры которых отстоят друг от друга на 20 мк). Высокое разрешение на очень малой площади делает привлекательной возможность комби-

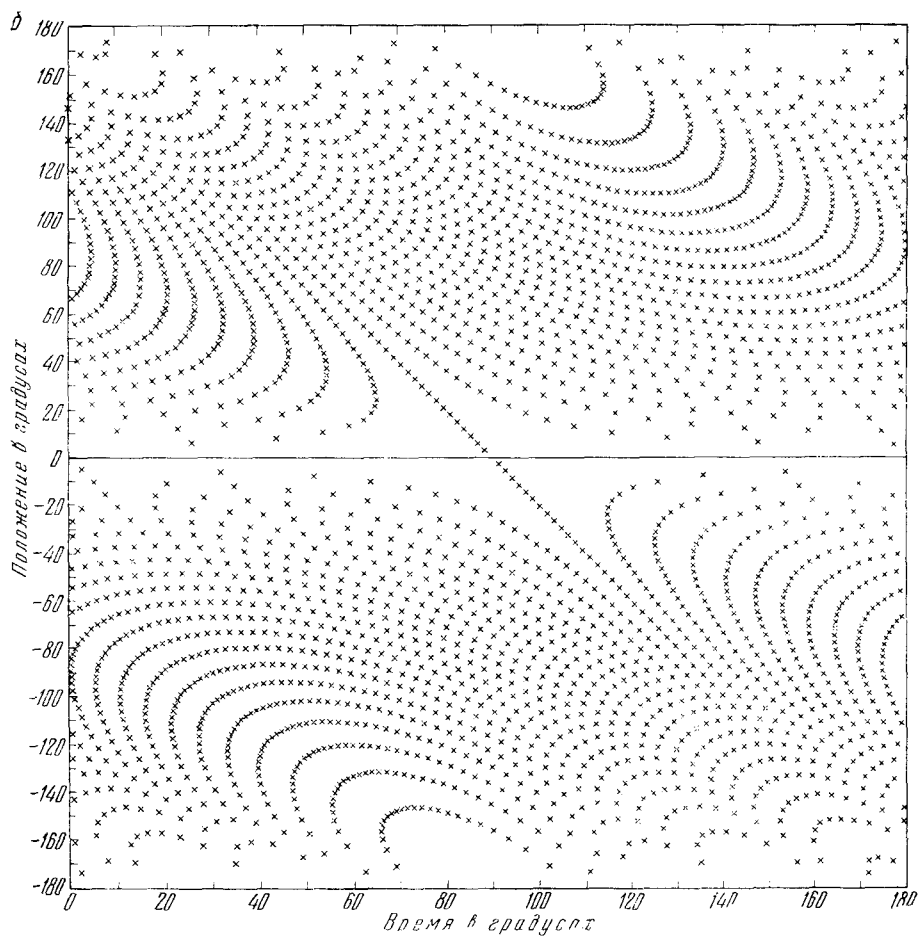
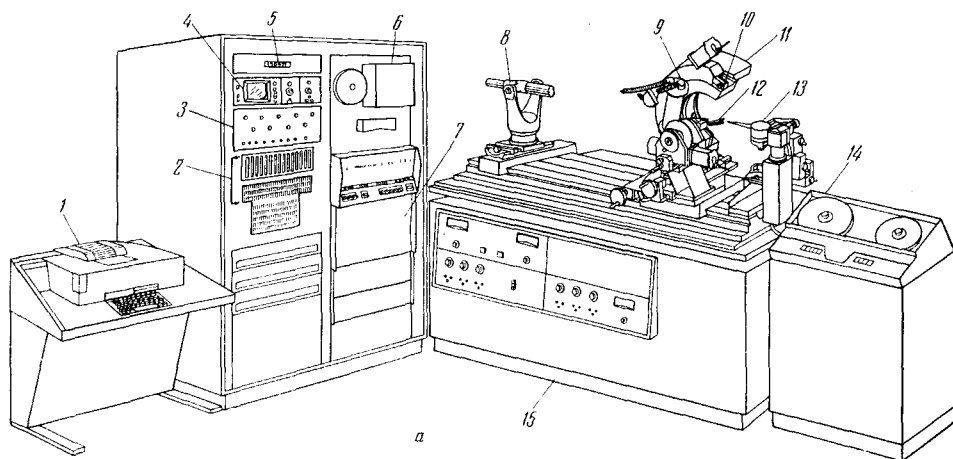


Рис. 6

нации таких детекторов с очень малыми кристаллами и микрофокусными рентгеновскими трубками с высокой интенсивностью пучка. Характеристики трубки позволяют использовать ее также на стадии ориентировки кристалла.

Резюмируя, следует сказать, что современный автоматический дифрактометр может выдавать такое количество экспериментальных данных, которое достаточно для определения структуры кристаллов с молекулами среднего размера менее чем за одну неделю. Новые технические методы по мере их развития должны существенно улучшить ситуацию с экспериментом по измерению интенсивностей для структур белков и позволят также получить полные наборы данных по интенсивностям для меньших молекул за время порядка нескольких часов, а не нескольких дней. Это ускорение в сочетании с рутинным применением вычислительной техники, описанной в следующем разделе, могло бы сократить продолжительность определения структуры настолько, что оно станет еще более рутинным лабораторным методом, чем в настоящее время.

VIII. РОЛЬ ВЫЧИСЛИТЕЛЬНОЙ ТЕХНИКИ

Автоматизация сбора данных является одной из двух причин революции в кристаллографии, а применение цифровых компьютеров в этой системе автоматизации «дифрактометр — машина» было обсуждено выше. Другая причина революции также может быть приписана компьютеру: применение высокоскоростных цифровых компьютеров с большой памятью имело огромное значение для быстрой расшифровки структур и уточнения параметров.

Большой трудностью в рутинном определении кристаллических структур всегда было определение фаз структурных факторов, которые представляют собой комплексные величины:

$$F(\mathbf{h}) = \sum_j f_j \exp[2\pi i(\mathbf{h} \cdot \mathbf{r}_j)] \equiv \sum_j f_j [\cos 2\pi(\mathbf{h} \cdot \mathbf{r}_j) + i \sin 2\pi(\mathbf{h} \cdot \mathbf{r}_j)] \equiv \\ \equiv A + iB = |F| e^{i\alpha}. \quad (5)$$

Известна только величина $|F|$, а фаза α не может быть измерена. Чтобы рассчитать карту рассеивающей плотности по уравнению (3), необходи-

Рис. 6. *а* — Схема многосчетчикового рентгеновского дифрактометра Aesop. 128 кремниевых детекторов расположены по кольцу, окружающему кристалл и находятся при температуре жидкого азота. Этот блок детекторов состоит из 22 ячеек. В каждой ячейке имеется кремниевая пластинка, на которой вытравлено шесть отдельных детекторов с диффузионным переходом, снабженных предусилителями. 1 — телетайп ввода-вывода, 2 — буферное устройство компьютера, 3 — ручное управление, 4 — запоминающий осциллограф, 5 — цифровое табло, 6 — устройство ввода-вывода на бумажной ленте, 7 — управляющий компьютер, 8 — установочная зрительная труба, 9 — охлаждение детекторов, 10 — кожух со 128 детекторами, 11 — предусилители детекторов, 12 — гониометрическая головка, 13 — монохроматор, 14 — устройство ввода-вывода на магнитной ленте, 15 — рентгеновский генератор

б. — Идея Aesop. Заданная точка на этой диаграмме имеет две координаты — время по оси абсцисс и угол рассеяния по оси ординат; эти две координаты могут быть коррелированы с двумя миллеровыми индексами — h и k (если кристалл вращается вокруг оси c). Получаемая картина идентична пленке, получаемой на рентгеногониометре Вейссенберга, где время (поворот кристалла) определяется сдвигом пленки параллельно оси вращения кристалла. Полоска справа показывает подразделение угла рассеяния 128 детекторами. Эксперимент можно представить как движение полоски параллельно самой себе по диаграмме слева направо

мо знать фазы. К счастью, мы знаем кое-что о кристаллических структурах, что оказывает некоторую помощь в оценке фаз, хотя эти оценки далеко не очевидны. Достаточно общие условия, что рассеивающая плотность всюду должна быть положительна и что между атомами имеются большие области нулевой плотности, привели к соотношениям, которым должны удовлетворять фазы²⁷⁻³². Фазы зависят от этих соотношений и от величин структурных факторов. Формулы, выводимые для фаз, являются вероятностными и могут приводить к удовлетворительному решению структуры только в том случае, если имеется большое число точно измеренных отражений. И здесь введение автоматического дифрактометра также оказалось важным, поскольку он дает большое число точно измеренных отражений. Однако более существенно, что применение формул для определения фаз оказывается очень утомительным и трудоемким, хотя в математическом отношении эти формулы часто оказываются простыми. Входящие в них комбинаторные и логические операции были с успехом включены в ряд программ для компьютеров, программ, которые могут действовать более или менее автоматически, начиная с исходного набора величин структурных факторов и кончая выдачей набора фаз.

В случае центросимметричных структур (в которых каждому атому в положении g отвечает атом в положении \bar{g}) фазы равны или 0 или π . Расшифровка таких структур стала совершенно рутинной задачей, благодаря так называемым прямым методам, с помощью которых определяются структуры с числом атомов в молекуле выше 100 (см., например, рис. 2,в). Определение нецентросимметричных структур пока еще не превратилось в столь рутинную задачу, но все же уже был расшифрован ряд таких структур с числом независимых атомов, превышающим 70.

Растущая роль прямых методов очевидна из того факта, что из 27 структур, опубликованных в сентябрьском выпуске журнала *Acta Crystallographica* за 1969 год (случайно взятый пример) 9 было расшифровано прямыми методами определения фаз, а остальные 18 — традиционными методами тяжелого атома (большинство структур) и паттерсоновскими. Цифра за тот же период 1965 год составляет 3 и 27. За последние два года отношение числа расшифровок прямыми методами к числу обычных расшифровок в работах, докладывавшихся на конференциях Американской кристаллографической ассоциации, возросло с $1/4$ до $1/1$ ³³.

При определении кристаллической структуры, разумеется, полезно, но не необходимо, знать как можно больше о химии исследуемой молекулы. Эта информация может помочь в разрешении трудностей, возникающих на стадии расшифровки структуры. Ограничения, накладываемые этой информацией, можно даже вводить автоматически в качестве части процедуры определения фаз.

Когда структура в общих чертах расшифрована, остается решить задачу определения наилучших значений параметров, описывающих структуру. Эта задача обычно решается итерационным нелинейным методом наименьших квадратов. Для структуры с 50 атомами желательно уточнить 450 параметров, чтобы достичь наилучшего совпадения между измеренными и рассчитанными значениями структурных факторов для 2000 отражений. Эта работа огромна и требует больших затрат времени даже самых больших компьютеров. Продолжительность расчета такой задачи на компьютере CDC 6600 составит около 20 минут при затратах 210 долларов на каждую итерацию. Именно эта стадия уточнения зачастую составляет львиную долю стоимости расчетов при оп-

ределении кристаллической структуры, и сомнительно, всегда ли следует доводить уточнение до конца. Если основная цель исследования заключается в определении конфигурации молекулы и системы связей между атомами, возможно нет необходимости добиваться предельно точных длин связей и тепловых параметров, даже если качество экспериментальных данных допускает это. К сожалению, среди многих кристаллографов стало традицией выжимать из своих экспериментальных данных всю информацию до последней капли, даже если эта последняя капля может оказаться в сущности неинтересной, или, по крайней мере, не стоящей произведенных на нее затрат.

Во всяком случае большой компьютер делает возможными такие уточнения, а также построение за несколько минут карт электронной плотности по ее значениям в сотнях тысяч точек, рассчитанным по тысячам структурных факторов. Эти расчеты — основа уточнения структуры — легко осуществляются на современном цифровом компьютере (табл. 2).

IX. ВИЗУАЛЬНОЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЕ СТРУКТУРЫ

По завершении определения структуры остается задача представления результатов в форме, наиболее значимой для химика. Трехмерные модели из шариков, соединенных стержнями, или модели с заполнением пространства, являются традиционными инструментами стереохимика. И снова вычислительная техника выступает на первый план в усовершенствовании этих инструментов. Чертежи молекулярных структур, представленные в этой статье (рис. 2) были вычерчены компьютером по изящной программе, которая по заданным атомным координатам и параметрам тепловых колебаний производит необходимые геометрические расчеты и графические построения, выдавая стереоскопические изображения на двухкоординатном графопостроителе³⁴. Химик может сразу же увидеть стереохимию и формы эллипсоидов колебаний без необходимости просмотра больших цифровых таблиц.

Новое достижение в графическом представлении кристаллических структур связано с изобразительными устройствами, работающими по принципу «человек — машина». В системе, разработанной в Брукхейвенской национальной лаборатории^{35–37}, структуры могут быть изображены на экране цветной телевизионной трубки. Координаты для этого изображения генерируются компьютером, а исследователь, сидящий за пультом, может немедленно изменять чертеж. Атомы можно добавлять, убирать или двигать, а всю модель можно поворачивать перед глазами. На стереоскопических чертежах этой статьи левое и правое изображения представлены раздельно: каждое из них нужно рассматривать одним глазом. В Брукхейвенской системе изображение для правого глаза проецируется на телевизионный экран в зеленом, а изображение для левого глаза — в красном цвете; для получения стереоскопического эффекта используют очки с зеленым и красным фильтрами. Система позволяет быстро работать с трехмерной моделью.

Она может быть очень полезна и на стадии определения структуры: можно манипулировать с пробными структурами и устанавливать разумность межмолекулярных контактов. Взаимодействие между человеком и компьютером очень важно и оказалось весьма полезным при построении моделей больших биологических структур в таких системах³⁸.

Хотя определение молекулярной структуры методом рентгеноструктурного анализа, по-видимому, никогда не станет столь непосредственным как съемка ИК-спектра или спектра ЯМР жидкости, мы уже достигли стадии, когда такое определение представляет существенную

часть арсенала любого химика, интересующегося молекулярной конфигурацией — а какой химик не интересуется этим? Автоматическая расшифровка структуры стала реальностью*, а по продолжительности и расходам такое определение молекулярной геометрии уже сравнимо со многими другими методами, применяемыми в химических исследованиях. Разработка более эффективных дифрактометров, дальнейшее развитие автоматических методов расшифровки структуры и усовершенствование методик выращивания кристаллов будет означать, что для любой существующей молекулы за короткое время можно будет проводить полное определение геометрической структуры. Даже определение структуры белка составляет в настоящее время лишь часть диссертации доктора философии**.

ЛИТЕРАТУРА

1. G. Kartha, J. Bello, D. Harker, *Nature*, **213**, 862 (1967).
2. C. C. F. Blake, D. F. Koenig, G. A. Mair, A. C. T. North, D. C. Phillips, V. R. Sarmá, Там же, **206**, 757 (1965).
3. J. C. Kendrew, R. E. Dickerson, B. E. Strandberg, R. G. Hart, D. R. Davies, D. C. Phillips, V. C. Shore, Там же, **185**, 422 (1960).
4. M. F. Perutz, *Science*, **140**, 863 (1963).
5. D. C. Hodgkin, J. Kamper, J. Lindsey, M. Mackay, J. Pickworth, J. H. Robertson, C. B. Shoemaker, J. G. White, R. J. Prosen, K. N. Trueblood, *Proc. Roy. Soc. London, Ser. A*, **242**, 228 (1957).
6. B. R. Davis, N. C. Payne, J. A. Ibers, *Inorg. Chem.*, **8**, 2719 (1969).
7. J. Borden (Частное сообщение).
8. W. L. Bragg, *Proc. Roy. Soc. London, Ser. A*, **89**, 468 (1914).
9. W. H. Bragg, W. L. Bragg, Там же, **89**, 277 (1914).
10. U. Arndt, B. T. M. Willis, *Single Crystal Diffractometry*, Cambridge University Press, London, 1966.
11. D. R. Beaucage, M. A. Kelly, D. Ophir, S. Rankowitz, R. F. Spinrad, R. Van Norton, *Nucl. Instr. Methods*, **40**, 26 (1966).
12. W. C. Hamilton, *J. Comput. Phys.*, **2**, 417 (1968).
13. R. J. Spinard, *Science*, **158**, 55 (1967).
14. H. Cole, Y. Okaya, F. W. Chambers, *Rev. Sci. Instr.*, **34**, 872 (1963).
15. Y. Okaya, *Acta Cryst.*, **21**, 726 (1966).
16. U. Arndt, R. A. Crowther, J. F. W. Mallett, *J. Sci. Instr., Ser. 2*, **1**, 510 (1968).
17. U. W. Arndt, *Acta Cryst.*, **B 24**, 1355 (1968).
18. A. Roberts, *Rev. Sci. Instr.*, **32**, 482 (1961).
19. J. P. Cowan, R. Thomas, W. M. MacIntyre, *Abstr. Mtg. Amer. Cryst. Ass., Catlinburg, Tennessee*, 1965.
20. R. Thomas, H. W. Kraner, W. C. Hamilton, Там же, Minneapolis, Minnesota, August, 1967.
21. R. Thomas, W. C. Hamilton, J. B. Godel, H. W. Kraner, V. Radeka, G. D. Dimmler, Там же, Buffalo, New York, August, 1968.
22. R. Thomas, W. C. Hamilton, J. B. Godel, H. W. Kraner, V. Radeka, D. Stephanl, G. Dimmler, W. Michaelson, M. Kelley, *Acta Cryst.*, **A 25**, 569 (1969).
23. U. Arndt, B. K. Ambrose, *IEEE Inst. Elec. Electron Eng. Trans. Nucl. Sci., NS*, **15**, **3**, 92 (1968).
24. U. Arndt, *Acta Cryst.*, **A 25**, 161 (1969).
25. J. Ball, T. C. Furnas, *ma.*, *Abstr. Mtg. Amer. Cryst. Ass., New Orleans, Louisiana*, March 1970.
26. A. N. Chester, T. C. Loomis, M. M. Weiss, *Bell. System Techn. J.*, **48**, 345 (1969).
27. J. Gillis, *Acta Cryst.*, **1**, 76 (1948).
28. J. Karle, H. Hauptmann, Там же, **3**, 181 (1950).

* Джонсон и соавторы³⁹ за один 19-минутный сеанс на компьютере IBM-7094 исходя непосредственно из необработанных интенсивностей, получили стереоскопический чертеж структуры фумаровой кислоты $C_4H_4O_4$ без всякого вмешательства кристаллографа и без знания состава соединения.

** Райт и соавторы⁴⁰ сообщают, что структура с разрешением 2,5 Å белка субтилизина (содержащего 275 аминокислотных остатков) была расшифрована за 6 месяцев с момента юстировки первого кристалла.

29. D. Sayre, Там же, 5, 60 (1952).
30. W. H. Zachariasen, Там же, 5, 68 (1952).
31. I. L. Karle, J. Karle, Там же, 17, 835 (1964).
32. J. Karle, I. L. Karle, Там же, 21, 849 (1966).
33. S. K. Sikka, The Phase Problem in Neutron Diffraction, Thesis, University of Bombay, Bombay, India, 1969.
34. C. K. Johnson, Oak Ridge National Laboratory, Report No 3794, 1965.
35. D. Ophir, F. J. Shepherd, R. J. Spinrad, Commun. Ass. Comput. Machinery, 12, 309 (1969).
36. E. F. Meyer, мл., Acta Cryst., A 25, S 62 (1969).
37. E. F. Meyer, мл., J. Chem. Soc., J. Appl. Cryst., (в печати).
38. C. Levinthal, Sci. Amer., 214, 42 (1966).
39. Q. Johnson, G. S. Smith, E. Kahara, Science, 164, 1163 (1969).
40. C. S. Wright, R. Alden, J. Kraut, Abstr. Mtg. Amer. Cryst. Ass. Buffalo, N. Y., August 1968.

Брукхейвенская Национальная Лаборатория
Аптон, Нью-Йорк, США
