

УДК 541.64:543.422.25:539.199

© 1992 г. Р. А. Задиханов, В. Д. Федотов, И. Спевачек,
Я. Страка

**'Н И ¹³С ЯДЕРНАЯ МАГНИТНАЯ РЕЛАКСАЦИЯ
И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ДВИЖЕНИЯ В ТВЕРДЫХ
ГОМОПОЛИПЕПТИДАХ**

Проведен совместный анализ ¹Н и ¹³С ЯМР-релаксационных данных для поликристаллических полиглицина, поли-*L*-аланина и поли-*L*-валина и получена информация о локальных движениях в этих полипептидах. Описаны три типа движения, каждое из которых характеризуется широким распределением времен корреляции. Эти движения есть вращения групп CH₃ вокруг своих осей с энергией активации 10–15 кДж/моль, маломагнитудные (10–15°) индивидуальные колебания групп основной и боковых цепей с энергией 25–30 кДж/моль и низкочастотные крупномасштабные локальные движения с более высокими энергиями активации (45–55 кДж/моль для поли-*L*-аланина) и амплитудами 20–25° и более. Характерные времена корреляции этих движений при комнатной температуре лежат в диапазонах 10⁻¹¹–10⁻¹⁰, 10⁻⁹–10⁻⁸ и 10⁻⁷–10⁻⁶ с соответственно.

Изучение молекулярных движений в белках является одной из основных задач физики белка. Получение достоверной информации о динамике даже таким селективным методом, как ЯМР, в значительной степени осложнено гетерогенностью первичной и вторичной структур белков [1–5]. Исследование в качестве моделей белка более простых биополимеров — гомо- и гетерополипептидов несколько упрощает ситуацию и допускает сравнительно однозначную интерпретацию экспериментальных данных.

ЯМР-исследования динамики твердых гомополипептидов проводятся в течение длительного времени с использованием различных экспериментальных методик [4–9]. Среди них ¹Н ЯМР-широких линий, ¹Н-релаксация в широком интервале температур и при различных резонансных частотах, ¹Н-релаксация в циклических полях, ¹³С-селективная релаксация.

В настоящей работе приведены результаты исследования динамики твердых гомополипептидов при помощи ¹Н- и ¹³С-селективной ЯМР-релаксации. Такой подход с использованием двух различных ядер позволил нам количественно описать сразу несколько типов молекулярных движений для каждого полимера и обсудить механизмы этих движений.

В данной работе сообщается об исследованиях полиглицина (ПГ) и поли-*L*-валина (ПВ), ($[-\text{NH}-\text{CHR}-\text{CO}-]_n$, где R = H и CH—(CH₃)₂ соответственно), при этом используются также некоторые данные для поли-*L*-аланина (ПА, R = —CH₃), из нашей предыдущей статьи [9]. Анализ набора экспериментальных данных проведен в рамках так называемого безмодельного подхода, подробно изложенного в работе [10] и использовавшегося в работах [1, 9] для описания динамики твердых лизоцима и

ПА. Помимо полученных нами экспериментальных результатов к анализу привлекались данные работ [6, 7].

^1H ЯМР-релаксацию измеряли на изготовленном в лаборатории автоматизированном релаксометре с резонансными частотами 10,8 и 27 МГц (длительность 90° импульса 1,5 мкс, время парализации 10 мкс, точность измерения температуры $\pm 1^\circ$) и на спектрометре «Bruker CXP-100» на частоте 90 МГц в диапазоне температур 100–360 К.

Времена спин-решеточной релаксации протонов в лабораторной T_1 и дипольной T_{1d} системах (ЛСК и ДСК) измеряли с помощью последовательностей инверсия — восстановление и Джинера — Брокарта [11]. Восстановление ядерной намагниченности в ЛСК было экспоненциальным в пределах ошибки во всем температурном интервале [7, 8], за исключением небольшой неэкспоненциальности в низкотемпературных минимумах ПА и ПВ. Что касается дипольной релаксации, то компонента кривой восстановления, представляющая собственно релаксацию в ДСК, экспоненциальная в пределах ошибки для ПГ и слегка неэкспоненциальная в остальных случаях. Времена T_1 и T_{1d} определяли по начальному участку спадов в диапазоне амплитуд от 1,0 до 0,5.

Времена спин-спиновой релаксации протонов T_2 и вторые моменты σ получали из анализа ССИ, состоящего из единственной гауссовой компоненты.

T_1 , T_2 измеряли с точностью $\pm (5\text{--}10)\%$, T_1 — $\pm (10\text{--}15)\%$.

^{13}C ЯМР-спектры с кросс-поляризацией и вращением под магнитным углом (КП/ВМУ) твердых образцов записывали на спектрометре «Bruker MSL-200» на частоте 50,3 МГц при комнатной температуре (ПГ при 30°) в Al_2O_3 -роторе. Количество сканов 120–1800, частота вращения 4 кГц, мощность генератора развязки по протонам в единицах частоты ($\gamma H_2/2\pi$) 60 кГц, контактное время 1 мс, время повтора 2–10 с, ширина спектра 20 кГц, время регистрации 13–26 мс. ^{13}C спин-решеточную релаксацию в ЛСК измеряли по методу Торчия [12] с кросс-поляризацией, во вращающейся системе (ВСК) — с применением спин-локинга и кросс-поляризации [13]. При анализе углеродной спин-решеточной релаксации в ВСК мы полагали, что измеренные спады определяются главным образом спин-решеточной релаксацией [14].

Полученные ^{13}C КП/ВМУ ЯМР-спектры практически совпадают со спектрами этих полипептидов, опубликованными в работах [15, 16]. По данным этих работ определены вторичные структуры исследованных нами ПА, ПВ и ПГ — α -спираль, β -слой и (β_1 -спираль + β -слой) соответственно.

Исследовали поликристаллические образцы ПА, ПВ и ПГ («Sigma») со степенями полимеризации $n = 330$, 70 и 180 соответственно. Для ^1H -экспериментов 150–250 мг образцов откачивали при давлении не более 0,1 ПА и температуре 50–70° (ПГ 100°) в течение 6–12 ч и запаивали в стеклянных ампулах. ^{13}C -эксперименты проводили с высушенными образцами при комнатной температуре.

Температурные зависимости протонных времен T_1 при резонансных частотах 90, 27, 10,8 МГц и 60, 30 МГц из работы [7], а также T_{1d} для ПГ, ПА и ПВ показаны на рис. 1. (Измеренные нами времена T_1 для ПГ несколько короче приведенных в работе [8]. Как показал анализ наших и литературных данных, значения микродинамических параметров движений оказываются достаточно близкими. Основное отличие заключается в несколько большей величине усредняемого второго момента, что может быть вызвано некоторым количеством парамагнитных примесей, оставшихся в образце после откачки. По этой причине данные для ПГ из работы [8] к анализу не привлекались. Достоверная величина усредняемого второго момента получена нами из температурной зависимости σ .) Температурные зависимости вторых моментов представлены на рис. 2. Спады ^{13}C -намагниченности для некоторых линий спектров показаны на рис. 3.

^1H -релаксация. Как видно из рис. 1 и 2, для всех исследованных полипептидов характерно наличие нескольких минимумов на температурных зависимостях времен T_1 и T_{1d} , а также нескольких областей с различным наклоном на температурных зависимостях второго момента. Это означает, что в данных системах существуют разные молекулярные движения со

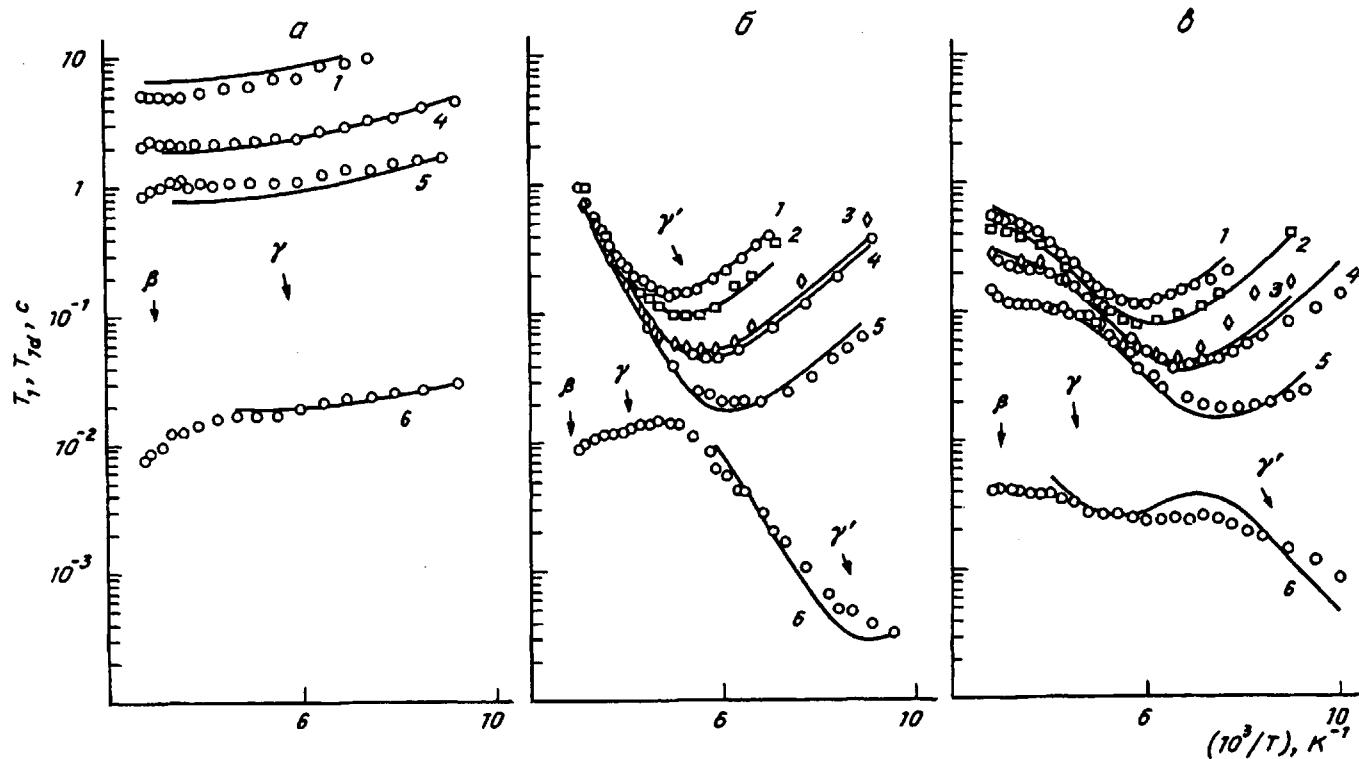


Рис. 1. Температурные зависимости времен ^1H ЯМР спин-решеточной релаксации T_1 и T_{1d} в ПГ (а), ПА (б) и ПВ (с). T_1 при резонансных частотах 90 (1), 60 (2), 30 (3), 27 (4) и 10,8 МГц (5), 6— T_{1d} . Данные для ПА и ПВ при 60 и 30 МГц взяты из работы [7]. Здесь и на рис. 3 — сплошные линии — расчетные кривые с параметрами, взятыми из таблицы

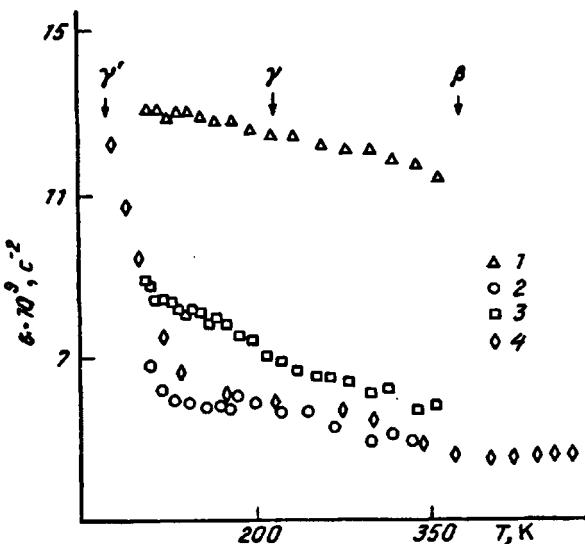


Рис. 2. Температурные зависимости второго момента протонов. 1 — ПГ, 2 — ПА, 3 — ПВ, 4 — данные для ПА из работы [6]. Зависимость для ПВ сдвинута вверх на одну единицу шкалы

своими характерными частотами, или в терминах физики полимеров — обнаруживаются несколько релаксационных переходов. Отметим основные особенности этих экспериментальных результатов.

1. На температурных зависимостях T_1 и T_{1d} ПА и ПВ имеются глубокие низкотемпературные минимумы. В то же время аналогичные минимумы на зависимостях T_1 и T_{1d} ПГ отсутствуют. Можно полагать, что они обусловлены вращением групп CH_3 [7].

2. Температурные зависимости T_1 и T_{1d} ПГ характеризуются наличием крайне широких минимумов, причем времена релаксации в минимуме сравнительно велики. Аналогичные минимумы наблюдаются и для остальных полипептидов, но там они в той или иной степени скрыты другими процессами. Например, для ПА этот минимум проявляется только в T_{1d} .

3. Для всех зависимостей спин-решеточной релаксации выше комнатных температур (за исключением T_1 в ПА) характерно резкое уменьшение времен T_1 и T_{1d} .

4. Все температурные зависимости второго момента (рис. 2) имеют одинаковый характер: на довольно протяженном участке с ростом температуры вторые моменты несколько уменьшаются, далее около комнатных температур следует более резкое уменьшение второго момента. Как показывают экспериментальные данные для ПА и поли-*L*-лейцина, полученные в работе [6], при температурах ниже 100 К наблюдается резкое увеличение второго момента, обусловленное вращением групп CH_3 .

Таким образом, сопоставив температурные зависимости времен T_1 и T_{1d} и вторых моментов для различных гомополипептидов и отметив их некоторые общие черты наряду с характерными особенностями, можно прийти к выводу, что во всех исследованных образцах проявляются три различных релаксационных перехода, имеющих общую природу, они обозначены нами как γ' - γ - и β -процессы по мере повышения температуры перехода.

Так, γ' -процесс, обнаруживающийся для полипептидов с метильными группами в боковых цепях, проявляется во всех температурных зависимостях при низких температурах (обусловленное этим процессом уменьшение второго момента происходит при температурах ниже нашего температурного диапазона) (рис. 1, 2). γ -Процесс, несмотря на то, что на температурных

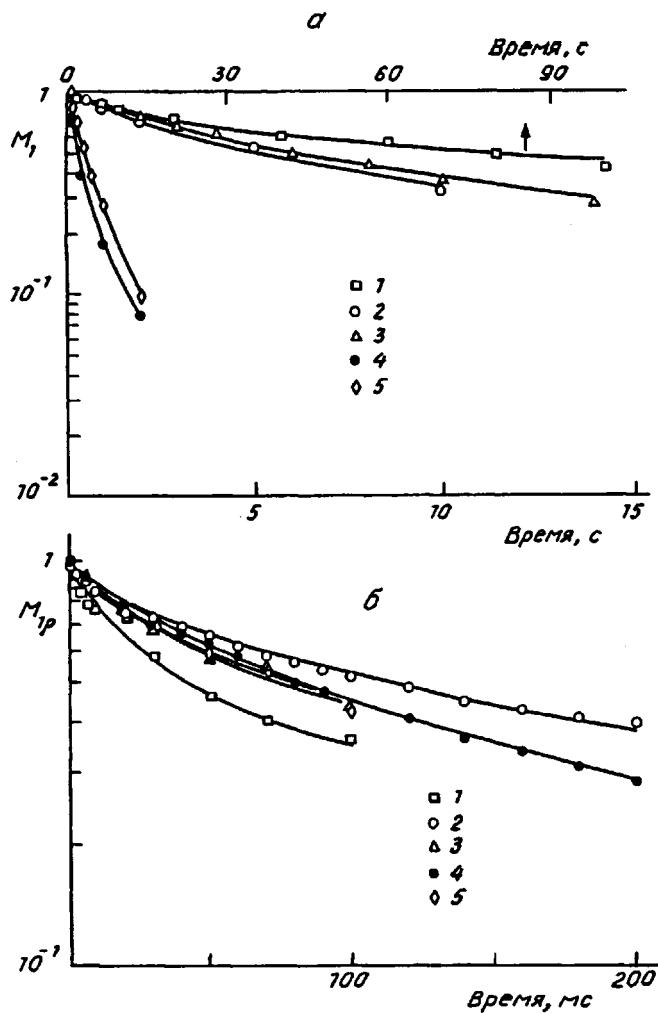


Рис. 3. Спады ^{13}C намагниченности углеродов αC (1—3) и CH_3 -групп (4, 5) в ЛСК (α) и ВСК (β). 1 — ПГ; 2, 4 — ПА; 3, 5 — ПВ

зависимостях времен спин-решеточной релаксации он наиболее ярко выражен для ПГ, имеет место и в остальных полимерах, что видно из температурных зависимостей второго момента. β -Процесс также присущ всем полипептидам при высоких температурах и наблюдается практически во всех зависимостях.

^{13}C -релаксация. Кратко отметим характерные особенности данных, представленных на рис. 3.

1. Спады намагниченности отдельных линий в ЛСК и ВСК имеют явно неэкспоненциальный вид. Мы полагаем, что такая форма спадов вызвана широким распределением времен корреляции молекулярных движений, свойственным движениям всех атомных групп.

2. Спады намагниченности αC - и CH_3 -групп ПА и ПВ в ЛСК и ВСК лишь незначительно отличаются друг от друга (рис. 3).

3. Судя по начальным участкам спадов, скорость релаксации α -углеродов в ЛСК максимальна в ПА и ПВ и минимальна в ПГ (рис. 3, α). Для скоростей релаксации этих углеродов в ВСК наблюдается обратная зависимость (рис. 3, β).

Количественный анализ экспериментальных результатов проводился в

рамках так называемого безмодельного подхода [1, 9, 10]. При этом основной целью являлось описание всей совокупности экспериментальных данных некоторым числом формальных микродинамических параметров, характеризующих молекулярные движения. Проведенный анализ для ПА подробно описан в работе [9].

Поскольку ядра ^1H и ^{13}C имеют спин $1/2$, основным механизмом релаксации является диполь-дипольное взаимодействие, которое может усредняться благодаря движению ядер. Каждый независимый тип движения может быть описан корреляционной функцией общего вида

$$\Phi(t) = \sigma[(1 - q^2) + q^2\Phi'(t)], \quad (1)$$

где q^2 — параметр анизотропии ($0 \leq q^2 \leq 1$), характеризующий ограниченность движения и который может быть связан с амплитудой этого движения, $\Phi'(t)$ — корреляционная функция, усредняющая часть второго момента $q^2\sigma$ до нуля. При наличии нескольких типов движений общая корреляционная функция есть произведение функций (1). В общем случае $\Phi'(t)$ может иметь неэкспоненциальный вид и быть представлена суммой отдельных экспонент

$$\Phi'(t) = \int_0^\infty \rho(\tau) \exp(-t/\tau) d\tau, \quad (2)$$

здесь $\rho(\tau)$ — функция распределения времен корреляции, описываемая наивероятнейшим временем τ_0 и параметрами ширины распределения α и β в несимметричной функции распределения Шнайдера [10] или δ в симметричном распределении Фуосса — Кирквуда ($\delta = \alpha$ при $\alpha = \beta$).

Значения микродинамических параметров движения протонов в γ' -, γ - и β -процессах получены путем анализа хорошо известных выражений для времен спин-решеточной релаксации протонов в ЛСК и ДСК и температурных зависимостей вторых моментов с учетом наличия распределения времен корреляции [10, 17].

Области температурных зависимостей T_1 и T_{1d} ПА и ПВ, относящиеся к γ' -процессу, а для ПГ, относящиеся к γ -процессу, подгонялись на компьютере с варьируемыми параметрами $q_{\text{H}}^2 \cdot \sigma_{\text{H}}, \alpha, \beta, \tau_0$, причем

$$\tau_0 = \tau_0' \exp(E_a/RT) \quad (3)$$

В случае ПГ использовалось симметричное распределение времен корреляции, т. е. $\alpha = \beta = \delta$. Кроме того, для ПВ одновременно с подгонкой части температурных зависимостей, относящейся к γ' -процессу, проводилась подгонка части температурных зависимостей, относящейся к γ -процессу, с параметрами $q_{\text{H}}^2 \cdot \sigma_{\text{H}}, \delta, \tau_0', E_a$. Типичные среднеквадратичные отклонения $\approx 15\text{--}18\%$. Графически результаты подгонки показаны на рис. 1 сплошными линиями.

Что касается микродинамических параметров β -процесса, то из-за недостатка экспериментальных данных невозможно точно охарактеризовать это движение во всех полипептидах. Для ПВ и ПГ проведены оценки времен корреляции при температурах, когда второй момент начинает усредняться этим движением. Для ПА параметры β -процесса оказалось возможным вычислить, поскольку известна величина высокотемпературного плато второго момента [6].

Значения микродинамических параметров движения атомов углерода при комнатной температуре (для ПГ при $+30^\circ$) получены путем компьютерной подгонки одновременно двух спадов намагниченности в ЛСК и ВСК. Неэкспоненциальные спады намагниченности ядер ^{13}C описывались так

Параметры молекулярных движений в твердых гомополипептидах

| Релаксация | Полимер | q^2 | $\delta(\alpha, \beta)$ | $\tau_0, c(T, K)$ | $E_a, \text{ кДж/моль}$ | $\tau_0', \text{ с}$ |
|-----------------------------|---------|---------------|-------------------------|---------------------------------------|-------------------------|-----------------------|
| ¹ H-эксперимент | | | | | | |
| γ' -Процесс | ПА | 0,6 — 0,75 | (0,9; 0,4) | $100 \cdot 10^{-12} \text{ (295)}$ | 14 — 15 | $3 \cdot 10^{-13}$ |
| | ПВ | 0,6 — 0,75 | (0,65; 0,55) | $50 \cdot 10^{-12} \text{ (295)}$ | 11 — 13 | $3 \cdot 10^{-13}$ |
| γ -Процесс | ПГ | 0,08 | 0,08 | $1,5 \cdot 10^{-9} \text{ (295)}$ | 25 — 27 | $4 \cdot 10^{-14}$ |
| | ПА | 0,06 | 0,1 | $10^{-5} — 10^{-7} \text{ (200—250)}$ | — | — |
| | ПВ | 0,15 | 0,4 | $4 \cdot 10^{-9} \text{ (295)}$ | 22 — 24 | $3 \cdot 10^{-13}$ |
| β -Процесс | ПГ | >0,07 | — | 10^{-5} (280) | — | — |
| | ПА | 0,24 | 0,11 — 0,15 | 10^{-8} (333) | 45 — 55 | $10^{-16} — 10^{-14}$ |
| | ПВ | >0,17 | — | $1,5 \cdot 10^{-5} \text{ (240)}$ | — | — |
| ¹³ C-эксперимент | | | | | | |
| αC | ПА | 0,06 | 0,4 | $25 \cdot 10^{-9} \text{ (295)}$ | | |
| | ПВ | 0,06 | 0,45 | $30 \cdot 10^{-9} \text{ (295)}$ | | |
| | ПГ | 0,001 — 0,003 | 0,05 — 0,1 | $1,5 \cdot 10^{-9} \text{ (295)}$ | | |
| | | 0,007 — 0,01 | 0,2 — 0,3 | $(2,5—6) \cdot 10^{-7} \text{ (295)}$ | | |
| CH_3 | ПВ | 0,9 | 0,75 | $30 \cdot 10^{-12} \text{ (295)}$ | | |
| | | 0,002 — 0,004 | 0,15 — 0,3 | $(2 — 8) \cdot 10^{-7} \text{ (295)}$ | | |
| βC | ПВ | 0,15 | 0,5 | $25 \cdot 10^{-9} \text{ (295)}$ | | |

$$M_{1,1\rho}(t) \sim \alpha \int_0^{\infty} \rho(\tau) \exp(-t/T_{1,1\rho}(\tau)) dt, \quad (4)$$

где выражения для скоростей углеродной спин-решеточной релаксации хорошо известны [14, 18].

Подгонка ^{13}C -спадов в основном проводилась по трем варьируемым параметрам q_{C}^2 , τ_0 , δ , за исключением спадов CH_3 -групп ПА и ПВ (такая подгонка невозможна) и спадов обеих групп ПГ (значительное расхождение с ^1H -результатами). Для последних спадов проведена подгонка по двум наборам параметров, допуская, что здесь играют роль два независимых типа движения

$$M_{1,1\rho\text{эксп}}(t) = M_{1,1\rho\text{быстр}}(t)M_{1,1\rho\text{медл}}(t) \quad (5)$$

При подгонке использовалось значение второго момента $\sigma_c = 2,05 \cdot 10^{10} \text{ с}^{-2}$ для С—Н расстояния 1,08 Å. Типичная точность подгонки кривых 3—6 %. Графически результаты анализа представлены на рис. 3 сплошными линиями.

Значения микродинамических параметров, полученных из описанного выше анализа данных, помещены в таблице.

Перейдем к обсуждению этих данных. Как уже упоминалось, ^1H -эксперименты позволяют различить в исследованных полипептидах три типа релаксационных процессов, связанных с различными типами молекулярных движений — γ' -, γ - и β -процессы. Движения, описанные с помощью ^{13}C -экспериментов, также можно разделить по их частотным областям: быстрое движение CH_3 -групп относится к пикосекундному диапазону, движение всех атомных групп основной и боковых цепей — к наносекундному диапазону, медленные движения остова ПГ и CH_3 групп — к микросекундному диапазону.

Отмечая близкое соответствие параметров анизотропии q^2 (амплитуд), частот и ширин спектров, можно соотнести пико-, нано- и микросекундные движения с γ' -, γ - и β -процессами соответственно.

Низкие энергии активации γ' -процесса (12—15 кДж/моль), его сравнительно узкий спектр и времена корреляции около сотни пикосекунд при комнатной температуре позволяют заключить, что это движение есть вращение CH_3 -группы вокруг ее оси симметрии. Достаточно близкие микродинамические параметры вращения CH_3 -группы были получены в работе [7].

Малые параметры q_{H}^2 и q_{C}^2 для γ -процесса наряду с крайне широким спектром времен корреляции ($\delta \approx 0,1$) позволяют заключить, что γ -процесс есть главным образом колебания атомов. Энергии активации этих движений составляют 25—30 кДж/моль и их частоты при комнатных температурах лежат в области 10^{-9} — 10^{-8} с. В модели случайных колебаний внутри конуса [10] с полууглом θ колебания с $q^2 = 0,06$ — $0,10$ имеют амплитуды $\vartheta = 10$ — 15° .

Что касается β -процесса, то, как уже упоминалось, невозможно охарактеризовать это движение подробно для всех полипептидов. Так, для ПА энергия активации такого движения составляет 45—55 кДж/моль, времена корреляции при комнатной температуре приблизительно равны $(0,5$ — $1,5) \cdot 10^{-7}$ с. В модели случайных колебаний внутри конуса [10] параметр $q^2 = 0,24$ соответствует $\vartheta = 25^\circ$. Как и γ -процесс, это движение имеет широкий спектр распределения времен корреляции. Таким образом, можно утверждать, что β -процесс есть низкочастотные крупномасштабные локальные движения основных и боковых цепей с высокими энергиями активации и временами корреляции от долей до единиц микросекунд вблизи комнатной температуры.

В заключение следует отметить, что все три типа движений, наблюдавшихся

у ряда исследованных нами гомополипептидов, относятся к ограниченным локальным движениям групп остава и боковых цепей. Крупномасштабные (сегментальные) движения остава, связанные с процессом стеклования (α -процессом) в нашем температурном интервале не наблюдаются.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fedotov V. D., Obuchov N. P., Spěváček J., Straka J.//Makromol. Chem., Makromol. Symp. 1990. V. 34. P. 249.
2. Colnago L. A., Valentine K. G., Opella S. J.//Biochemistry. 1987. V. 26. P. 847.
3. C. Leo G., Colnago L. A., Valentine R. G., Opella S. J.//Biochemistry. 1987. V. 26. P. 854.
4. Kimmich R., Winter F., Nusser W., Spohn K.-H.//J. Magn. Res. 1986. V. 68. P. 263.
5. Nusser W., Kimmich R., Winter F.//J. Phys. Chem. 1988. V. 92. P. 6808.
6. Kail J. A., Sauer J. A., Woodward E. A.//J. Phys. Chem. 1962. V. 66. P. 1292.
7. Andrew E. R., Gaspar R., Wennart W.//Biopolymers. 1978. V. 17. P. 1913.
8. Andrew E. R., Bryant D. J., Cashell E. M., Gaspar R., Meng Q. A.//Polymer. 1981. V. 22. P. 715.
9. Fedotov V. D., Zadihanov R. A., Spěváček J., Straka J.//Makromol. Chem. 1992 (in press).
10. Fedotov V. D., Schneider H. Structure and Dynamics of Bulk Polymers by NMR Methods, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 1989. P. 19.
11. Jeneer J., Broekaert P.//Phys. Rev. 1967. V. 157. P. 232.
12. Torchia D. A.//J. Magn. Res. 1978. V. 30. P. 613.
13. Schaefer J., Stejskal E. O., Buchdahl R.//Macromolecules. 1977. V. 10. P. 384.
14. Lyerla J. R.//High Resolution NMR Spectroscopy of Synthetic Polymers in Bulk/Ed. by Komoroski R. A. Deerfield Beech. 1986. P. 63.
15. Muller D., Kricheldorf H. R.//Polym. Bull. (Berlin). 1981. V. 6. P. 101.
16. Kricheldorf H. R., Muller D.//Macromolecules. 1983. V. 16. P. 615.
17. Pom Г.-К., Келлер Ф., Шнайдер Х. Радиоспектроскопия полимеров. М., 1987. С. 275.
18. Komoroski R. A.//High Resolution NMR Spectroscopy of Synthetic Polymers in Bulk/Ed. by Komoroski R. A. Deerfield Beech, 1986. P. 121.

Институт биологии
Казанского научного центра
Российской академии наук

Поступила в редакцию
01.02.92

Институт макромолекулярной химии,
АН ЧСФР, Прага

R. A. Zadikhanov, V. D. Fedotov, I. Spevachek, Ya. Straka

¹H AND ¹³C NUCLEAR MAGNETIC RELAXATION AND MOLECULAR MOTIONS IN SOLID HOMOPOLYPEPTIDES

S u m m a r y

¹H and ¹³C NMR-relaxation data for polycrystalline polyglycine, poly-L-alanine and poly-L-valine have been analysed in the framework of the model-free approach and some information about the local motions in these polypeptides has been obtained. Three types of motion characterized by the wide distribution of correlation times are described including the rotations of CH₃ groups around their axes with the activation energy being equal to 10–15 kJ/mol, small-amplitude (10–15°) particular vibrations of groups of main and side chains with the energy being equal to 25–30 kJ/mol and low-frequency large-scale local motions with higher activation energies (45–55 kJ/mol for poly-L-alanine) and amplitudes (above 20–25°). Characteristic times of correlation for these motions at room temperature correspond to 10^{–11}–10^{–10}, 10^{–9}–10^{–8} and 10^{–7}–10^{–6} s ranges.