

**ИССЛЕДОВАНИЕ ПОЛИМЕРОВ МЕТОДОМ ЯДЕРНОГО
МАГНИТНОГО РЕЗОНАНСА**

**III. ХИМИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ В РАСТВОРЕ
ПОЛИ- γ -БЕНЗИЛ-L-ГЛЮТАМАТА В ТРИФТОРУКСУСНОЙ КИСЛОТЕ**

М. В. Волькенштейн, А. И. Кольцов, Ж. Маршаль

Введение

Известно, что конформации полипептидных цепей в растворах зависят от природы растворителя. В частности, различными физическими методами (оптическая активность, характеристическая вязкость, ИК-спектроскопия, светорассеяние и др.) было показано, что молекулы поли- γ -бензил-L-глутамата (ПБГ) и поли-L-глутаминовой кислоты (ПГК) в дихлоруксусной (ДХК) и трифторуксусной кислоте (ТФК) являются статически свернутыми клубками, в то время как в ряде других растворителей (бензол, хлороформ, дихлорэтilen и др.) они представляют собой жесткие стержнеобразные спирали [1—4].

Если к раствору ПБГ, например в дихлорэтилене, постепенно прибавлять ДХК, то при объемной концентрации последней 76% происходит переход спираль — клубок, т. е. переход молекул ПБГ из спирального в статистически свернутое состояние [3]. Если после этого обогащать растворитель дихлорэтиленом, происходит обратный переход. Область перехода тем уже, чем выше молекулярный вес полипептида.

Бови [5] изучал спектры ЯМР высокого разрешения ПБГ в смеси трихлорэтилен — ТФК. В чистом трихлорэтилене спектральные линии ПБГ являются настолько уширеными, что их невозможно наблюдать в обычном диапазоне магнитных полей (то же самое мы наблюдали в растворе ПБГ в хлороформе). Однако добавление 2—10% ТФК сильно понижает вязкость раствора, и в этих условиях появляется разрешенный спектр ПБГ. Бови объясняет это тем, что ТФК разрушает межмолекулярные водородные связи, приводит к распаду малоподвижных ассоциаций молекул полипептида, но не нарушает спиральной конформации отдельных молекул. Дальнейшее добавление ТФК не меняет спектра, и спектры ПБГ в смеси, содержащей лишь несколько процентов ТФК, и в чистой ТФК не отличаются друг от друга. Таким образом, переход спираль — клубок не проявляется в спектрах протонного магнитного резонанса.

Целью настоящей работы было более подробное исследование поведения макромолекул ПБГ в растворах. В обширной литературе, посвященной переходам спираль — клубок, обычно не отмечаются какие-либо затруднения в наблюдении этого явления. Между тем, в принципе, возможны и побочные эффекты, определяемые химическим взаимодействием полипептида с растворителем. Если такие эффекты существуют, то они должны обнаруживаться методом ЯМР высокого разрешения.

Экспериментальная часть

Были изучены спектры ЯМР ПБГ (средний молекулярный вес 150 000), растворенного в смеси бензол — ТФК. Работу проводили на спектрометре ЯМР высокого разрешения (10^{-8}) типа JNM-3 на частоте 40 мег. Величины химических сдвигов (δ) выражены в единицах $[(H - H_0)/H_0] \times 10^7$ (H и H_0 — резонансные значения магнитного поля соответственно для данной и эталонной линий ЯМР поглощения). Этalonной принята линия группы — COOH ТФК. При расшифровке спектров использовали работу Чемберлена [6].

Спектр ПБГ не меняется с ростом объемной концентрации ТФК до 80% и остается таким же, как и в чистом бензоле. Однако при дальнейшем добавлении ТФК раствор мутнеет, а в спектре при этом появляется и пастет-

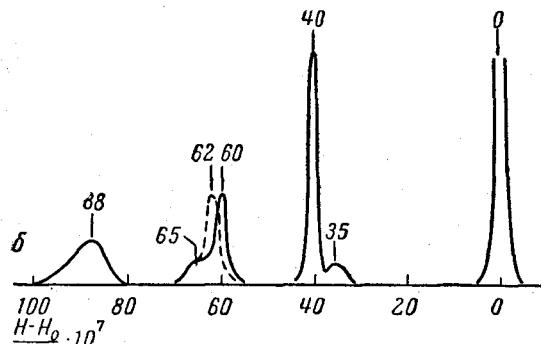
новая линия ($\delta = 60$), в то время как интенсивность линии метиленовой группы ПБГ, связанный с фенилом ($\delta = 62$), падает.

То же самое происходит в растворе ПБГ в чистой ТФК, чего Бови [5] не наблюдал. Свежеприготовленный раствор прозрачен, и спектр его не отличается от спектра в чистом бензole (рис. 1, пунктирная линия). За-

Рис. 1. Спектр ЯМР 10%-ного раствора ПБГ в ТФК.

Пунктирная линия — спектр свежеприготовленного раствора. Сплошная линия — спектр, записанный через сутки после приготовления.

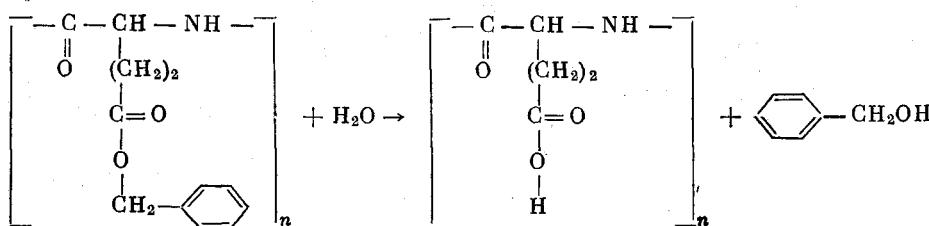
Спектр содержит линии следующих функциональных групп, начиная слева: $(\text{CH}_2)_2$ (88), СН (65), СН₂-группы ПБГ, связанный с фенилом (62), СН₂-группы эфира (60), C_6H_5 — в ПБГ и в эфире (40), NH (35) и COOH в ТФК (0). В скобках указаны значения δ



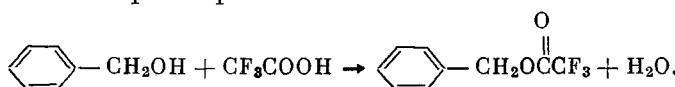
тем раствор начинает мутнеть и в течение суток становится совершенно непрозрачным (осаждение не происходит). Линия метиленовой группы полностью исчезает, но появляется новая линия ($\delta = 60$), равная первой по площади (рис. 1, сплошная линия)

Обсуждение результатов

Для интерпретации полученных данных мы предположили, что в растворе ПБГ в ТФК происходит гидролиз ПБГ, инициируемый примесной водой, после того как молекулы утратили жесткую спиралевидную форму.

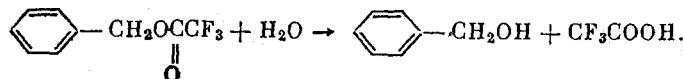


Возникающая в результате гидролиза ПГК остается в растворе, а бензиловый спирт образует, реагируя с ТФК, сложный эфир в виде эмульсии, взвешенной в вязком растворе.



Для проверки высказанного предположения было сделано следующее. Записан спектр свежеприготовленного 5%-ного раствора бензилового спирта в ТФК (рис. 2, пунктирная линия). Через полчаса раствор помутнел. Соответствующий спектр представлен на рис. 2 сплошной линией. Спектральные линии бензилового спирта исчезли, но появились линии сложного эфира, причем положение линии метиленовой группы эфира в спектре совпадает с положением новой линии, появляющейся в спектре раствора ПБГ в ТФК. Интенсивность этой линии возрастает при добавлении бензилового спирта к раствору ПБГ в ТФК. Таким образом, этерификация бензилового спирта в среде ТФК действительно происходит. Показано также, что одним из конечных продуктов реакций, протекающих в растворе ПБГ в ТФК, является сложный эфир ТФК и бензилового спирта.

Оказалось, что раствор бензилового спирта в ТФК, выдержаный в течение часа при комнатной температуре (его спектр изображен на рис. 2 сплошной линией), становится более прозрачным, при добавлении $\sim 5\%$ хлороформа. При этом в спектре появляются линии бензилового спирта. Это свидетельствует о том, что хлороформ вызывает омыление эфира.



Если хлороформ добавить к раствору ПБГ в ТФК, выдержанному при комнатной температуре в течение суток, раствор также становится прозрачным, а в его спектре появляются линии бензилового спирта.

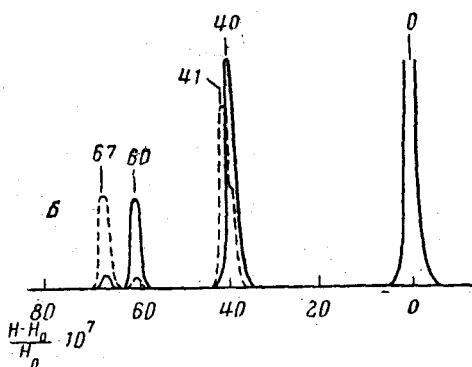


Рис. 2. Спектр ЯМР 5%-ного раствора бензилового спирта в ТФК.

Пунктирная линия — спектр свежеприготовленного раствора.
Сплошная линия — спектр, записанный через 30 мин. после приготовления. Расшифровка спектра слева направо: CH_2 -группа бензилового спирта (67), CH_2 -группа эфира (60), C_6H_5 — в бензиловом спирте (41), C_6H_5 — в эфире (40).

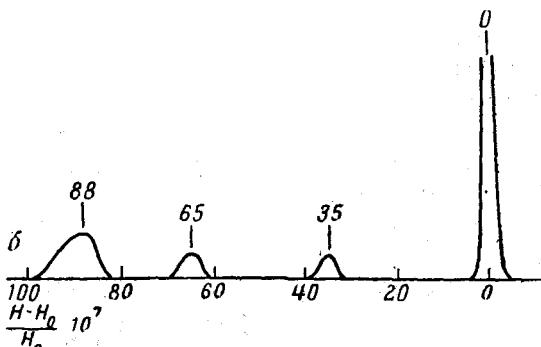
Записан спектр поли-L-глютаминовой кислоты (ПГК), растворенной в ТФК (рис. 3). Спектр на рис. 1 (сплошная линия) является точной графической суммой спектров ПГК и эфира (рис. 2, сплошная линия).

Все это дает основание считать справедливым сделанное выше предположение о гидролизе ПБГ под действием воды в среде ТФК с последующей этерификацией бензилового спирта.

Скорость гидролиза, во-видимому, зависит от концентрации примесной воды. Следует при этом отметить, что согласно [7], из ПБГ можно получить ПГК в среде ТФК, используя в качестве инициатора НВг. Отсутствие линий бензилового спирта в спектре раствора ПБГ и ТФК объясняется

Рис. 3. Спектр ЯМР 10%-ного раствора ПГК в ТФК.

Расшифровка спектра слева направо: $(\text{CH}_2)_2$ (88), CH_2 (65) и NH (35)



тем, что скорость гидролиза ПБГ гораздо меньше, чем скорость последующей этерификации бензилового спирта.

Был также получен ЯМР-спектр раствора ПБГ в ДХК. Раствор не потерял прозрачности в течение месяца. Анализ этого спектра затруднителен, так как очень интенсивная линия растворителя группы CHCl_3 маскирует наиболее интересную часть спектра ПБГ.

Выводы

Методом ЯМР высокого разрешения показано, что под действием примесной воды ПБГ гидролизуется в среде ТФК с образованием ПГК и бензилового спирта, из которых ПГК остается в растворе, а бензиловый спирт, соединяясь с ТФК, переходит в соответствующий сложный эфир, взвешенный в растворе в виде эмульсии.

Институт высокомолекулярных соединений
АН СССР

Поступила в редакцию
29 VIII 1961

ЛИТЕРАТУРА

1. P. Doty, A. M. Holtzer, J. H. Bradbury, F. R. Blout, J. Amer. Chem. Soc., **76**, 4493, 1954.
2. P. Doty, J. H. Bradbury, A. M. Holtzer, J. Amer. Chem. Soc., **78**, 947, 1956.
3. P. Doty, Jen Tsi Yang, J. Amer. Chem. Soc., **78**, 48, 1956.
4. P. Doty, A. Wada, Jen Tsi Yang, E. R. Blout, J. Polymer Sci., **23**, 104, 1951, 1957.
5. F. A. Bovey, G. V. D. Tiers, G. Filipovich, J. Polymer Sci., **38**, 133, 73, 1959.
6. Н. Ф. Чемберлен, Успехи химии, **28**, 1352, 1959.
7. E. R. Blout, M. Idelson, J. Amer. Chem. Soc., **78**, 497, 1956.

NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE STUDIES OF POLYMERS. III. CHEMICAL REACTIONS IN A SOLUTION OF POLY- γ -BENZYL-L-GLUTAMATE IN TRIFLUOROACETIC ACID

M. V. Wolkenstein, A. I. Koltsov, J. Marchal

S u m m a r y

With the aid of the NMR method it has been shown that poly- γ -benzyl-L-glutamate in trifluoroacetic acid solution containing traces of water hydrolyzes with the formation of poly-L-glutamic acid and benzyl alcohol. Benzyl alcohol forms the corresponding ester with trifluoroacetic acid which precipitates from the solution in the form of an emulsion.