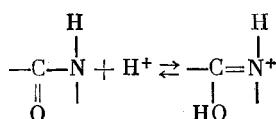


УДК 678.01:53:678.675

**ПРОТОНИЗАЦИЯ АМИДНОЙ ГРУППЫ
В РАСТВОРАХ СИЛЬНЫХ ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ**

Б. З. Волчен, А. В. Пуркина

Известно, что сильные органические кислоты, такие как дихлоруксусная (ДХУК) и трифторуксусная (ТФУК), являются сильными денатурирующими агентами для подавляющего большинства полипептидов. Денатурация или переход α -спираль — клубок, β -конформация — клубок в ранних работах Доти, Фасмана и др. [1, 2] связывалась с разрывом водородных связей полимер — полимер и образованием водородных связей полимер — растворитель. Однако взаимодействие сильных водородо-донорных растворителей с амидной группой может приводить и к полному отрыву атома водорода от растворителя и протонизации амидной группы



Клотц с сотрудниками [3, 4] исследовали N-метилацетамид (МАА) в растворе ТФУК при помощи ИК-спектров в обертонной области и спектров ЯМР. Ими было показано, что амидная группа МАА находится в протонизованном состоянии. Недавно Пивцова [5] исследовала N-метилпропионамид (МПА) методом ЯМР и ИК-спектров поглощения в области 1400—1700 cm^{-1} и показала, что при соответствующих концентрациях (МПА) в таких кислотах, как H_2SO_4 , HClO_4 происходит протонизация амидной группы. Она наблюдала уменьшение поглощение амида I и появление полосы двойной связи $\text{C}=\text{N}$.

В случае полипептидов изучение силы $\text{H}\dots\text{O}$ взаимодействия с сильными органическими кислотами затруднено. Это связано с трудностями измерения как спектров ЯМР таких растворов, так и с невозможностью наблюдения полосы образующейся связи $\text{C}=\text{N}$ в ИК-спектре из-за сильного поглощения группы $\text{C}=\text{O}$ кислоты. Измерение убывания поглощения амида I тоже практически невозможно. Однако возможно наблюдение протонизации по ИК-спектрам поглощения в таких кислотах, как ДХУК и ТФУК по частоте ионизированной группы COO^- , возникающей в растворе при переходе водорода кислоты на амидную группу. Валентные симметричное и антисимметричное колебания группы COO^- находятся в области 1300—1620 cm^{-1} [16]. Наиболее интенсивна и удобна для измерения полоса антисимметричного колебания (1550—1620 cm^{-1}).

Как видно из рис. 1, полоса COO^{-1} (1610 cm^{-1}) в спектре чистой ДХУК, применяемой в качестве растворителя*, мала по интенсивности и не мешает измерениям. На рис. 1 приведены также ИК-спектры поглощения N-метилацетамида (МАА) и N-метилвалерамида (МВА) в ДХУК.

* ДХУК (фирмы BDH, Англия) концентрация не меньше 98%.

Как видно из рис. 1, при относительной концентрации раствора МВА 0,75 (число молей растворителя на 1 моль амида) наблюдается полоса 1610—15 cm^{-1} . По данным ЯМР при тех же концентрациях происходит протонизация амида *. При уменьшении содержания кислоты на 1 моль амида полоса COO^- исчезает, что указывает на существование зависимости протонизации от концентрации раствора. Следует отметить, что на про-

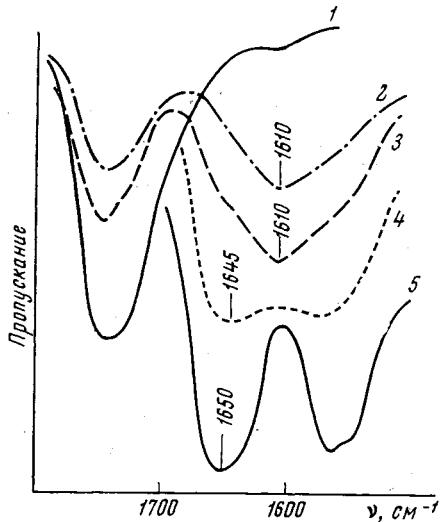


Рис. 1

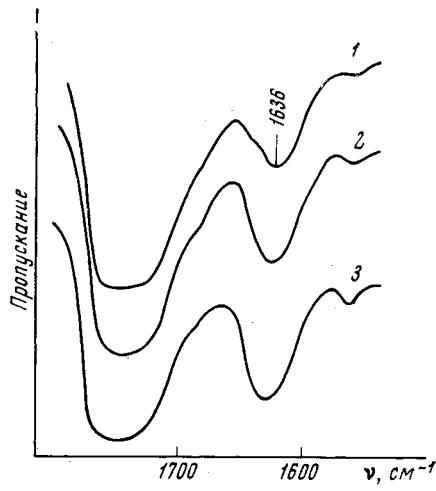


Рис. 2

1 — ДХУК, 100%; 2 — N-метилапетамида в ДХУК при относительной концентрации 0,75; 3, 4 — N-метилвалерамида в ДХУК при относительной концентрации 0,75 (3) и 0,25 (4);
5 — N-метилвалерамида, 100%

Рис. 2. ИК-спектры растворов амида дихлоруксусной кислоты в ДХУК

Концентрация амида (%): 1 — 8; 2 — 11; 3 — 22

тонизацию влияют также и свойства заместителей у амидной группы, например, в случае амида дихлоруксусной кислоты ($\text{CHCl}_2\text{CONHCH}_3$) (рис. 2) полоса COO^- не наблюдается ни при каких концентрациях. В спектре раствора этого амида в ДХУК наблюдается полоса поглощения 1636 cm^{-1} , которую можно отнести к колебанию групп C=O амида, связанных водородной связью с группами OH кислоты. Данные ЯМР также подтверждают отсутствие протонизации в этом амиде. Однако в полиамидах найлоне 6 и найлоне 3 (рис. 3) амидная группа протонизуется при любых концентрациях полиамида в таких кислотах, как ТФУК, ДХУК и муравьиная, о чем свидетельствует полоса 1615 cm^{-1} .

Из приведенных данных видно: 1) что полоса антисимметричного колебания группы COO^- может служить репером для установления протонизации амидной группы, 2) что наступление протонизации сильно зависит от концентрации вещества в растворе, замещения у амидной группы и, вероятно, от некоторых других причин. Можно думать, что сила водородной связи (включая ее крайний случай — протонизацию) специфична для разного класса веществ, содержащих амидную группу.

Нами был исследован также характер водородных связей с ДХУК и ТФУК в следующих полипептидах: поли- γ -бензил-L-глутамате (ПБГ), поликарбобензоксиметил-L-цистеине (ПКБМЦ), поли-O-ацетил-L-серине (ПАС). Первый полипептид в неполярных растворителях находится в α -спирале, два последних — в β -cross-структуре.

* Спектры ЯМР были сняты А. И. Кольцовым.

На рис. 4 представлены ИК-спектры поглощения этих полипептидов в смесях неполярного растворителя с ДХУК или ТФУК в таких отношениях, чтобы полимеры сохранили соответствующую вторичную структуру. Как видно из рис. 4, в спектре ПБГ наблюдаются полосы амид I — 1655 см^{-1} (α-спираль) и 1620 см^{-1} , в спектрах ПКБМЦ и ПАС — 1630 см^{-1} (β -структура) и 1620 см^{-1} , последняя может быть отнесена

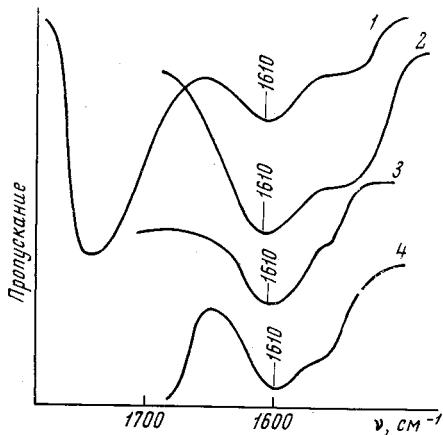


Рис. 3. ИК-спектры растворов:

1, 2 — наилона 3 в ДХУК, концентрация 12% (1) и 18% (2); 3, 4 — наилона 6 в ДХУК, концентрация 12% (3) и в муравьиной кислоте, концентрация 12% (4)

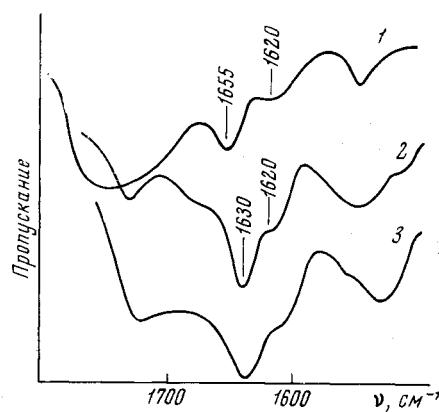


Рис. 4. ИК-спектры растворов:

1 — ПБГ в ДХУК: ДХЭ = 70 : 30; 2 — ПКБМЦ в ТФУК: CHCl₃ = 1 : 99; 3 — ПАС в ДХУК: CHCl₃ = 12 : 88

к антисимметричному колебанию группы COO⁻, возникающей вследствие протонизации амидной группы. Как видно, протонизация в указанных случаях происходит частично, и большое число амидных групп вообще не взаимодействует с кислотой, о чем свидетельствует сохранение частоты амида I. Следует отметить, что, как было показано Никитиным и Шароновой, при добавлении в раствор ПБГ в хлороформе избыточного количества фенола также не наблюдается образования водородной связи фенола с C=O амидной группы. В этом случае водородная связь образуется группой C=O в боковой цепи полипептида. Можно предполагать, что и в растворе ПБГ в ДХУК тоже происходит образование водородных связей групп C=O боковой цепи с группами OH кислоты, но наблюдать это не удается из-за сильного поглощения групп C=O кислоты. На рис. 5 представлены ИК-спектры ПБГ, ПАС и ПКБМЦ в чистой ДХУК. Как видно, наблюдается изменение положения максимума поглощения в области 1600 см^{-1} (ср. с рис. 4). По данным дисперсии оптической активности все указанные полипептиды в ДХУК находятся в клубке. Как было показано Ленорманом [7] на полиглутаминовой кислоте и подтверждено нами на поликарбоксиметил-L-цистеине [8], клубковой конформации соответствует положение амид I у 1660 см^{-1} . Как видно из рис. 5, в ДХУК эта полоса наблюдается у 1640 см^{-1} . Интересно отметить, что, во-первых, положение амид I у 1640 см^{-1} в ДХУК не зависит от первоначальной конформации полипептида (спираль или β -конформация), во-вторых, в спектре модельного тетрапептида (карбобензокситетраглицина) в ДХУК (рис. 5) наблюдается та же полоса 1640 см^{-1} , а по данным ЯМР в этом пептиде протонизации нет. Все это позволяет считать, что при переходе полипептидов из упорядоченной структуры в клубок в ДХУК происходит образование водородной связи полимер — растворитель без протонизации.

Изменение характера взаимодействия амидной группы с кислотой при переходе спираль — клубок видно и из ИК-спектра ПБГ при разных кон-

центрациях в чистой ДХУК, представленного на рис. 6. Ранее, в работе [9] методом дисперсии оптической активности было показано, что существует концентрационная зависимость перехода ПБГ из спиралей в клубок в ДХУК. При концентрации полипептида более 17% (вес/объем) даже в чистой ДХУК этого перехода не наблюдается. Как видно из рис. 6, такая же

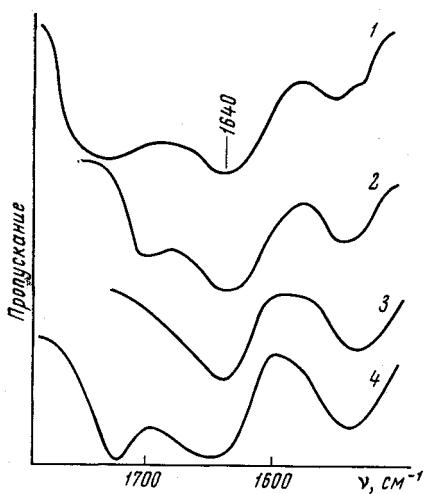


Рис. 5

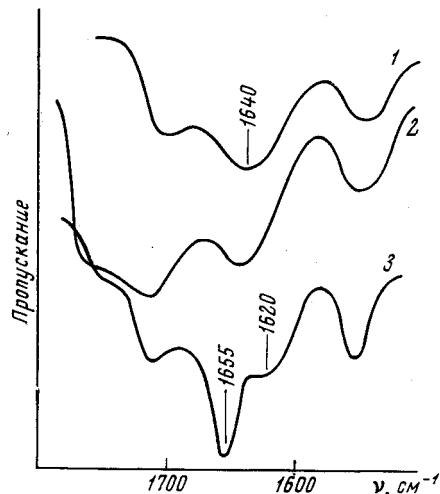


Рис. 6

Рис. 5. ИК-спектры растворов в ДХУК:

1 — карбобензоокситетраглицерина, концентрация 15%; 2 — ПБГ, концентрация 15%; 3 — ПАС, концентрация 12%; 4 — ПКБМП, концентрация 12%

Рис. 6. ИК-спектры ПБГ в ДХУК

Концентрация ПБГ (вес/объем): 1 — 10; 2 — 17; 3 — 23

концентрационная зависимость наблюдается и по ИК-спектрам. При концентрациях полипептида до 17% наблюдается полоса водородной связи 1640 cm^{-1} , причем в образовании этой связи участвуют все амидные группы. При переходе к концентрациям полипептида, большим 17%, характер взаимодействия амидной группы с кислотой меняется. Наблюдается частичная протонизация амидной группы ($\text{полоса } \text{COO}^-$), а взаимодействие ДХУК с большинством групп C=O амидной группы отсутствует.

На рис. 7 и 8 представлена температурная зависимость перехода спираль — клубок для ПБГ в смешанном растворителе, впервые обнаруженная по дисперсии оптической активности Доти и Янгом [10]. На рис. 7 изображен ИК-спектр ПБГ в 80% ДХУК и 20% дихлорэтана (ДХЭ). При таком содержании ДХУК полипептид при комнатной температуре находится в клубке, и в спектре наблюдается полоса 1640 cm^{-1} , а при 50° происходит переход клубок — α -спираль; при этом появляются полосы 1655 cm^{-1} (амид I) и полоса группы COO^- — 1620 cm^{-1} . При обратном понижении температуры характер спектра восстанавливается.

На рис. 8 приведен ИК-спектр ПБГ в растворе, содержащем 70% ДХУК и 30% ДХЭ. При таком соотношении полярного и неполярного растворителей при комнатной температуре ПБГ находится в α -спирали. Как видно из рис. 8, в спектре при комнатной температуре наблюдаются полосы 1655 и 1620 cm^{-1} . При понижении температуры до -23° появляется широкая полоса с пиком у 1640 cm^{-1} . При обратном повышении температуры в спектре вновь наблюдаются полосы 1655 и 1620 cm^{-1} .

Из приведенных экспериментальных данных следует, что характер взаимодействия полипептида с сильной органической кислотой зависит

от конформации макромолекулы в растворе. В упорядоченном состоянии происходит частичная протонизация амидной группы с образованием связи $C=N$ и присоединением водорода кислоты к $C=O$ амидной группы. В клубке происходит образование водородной связи кислота — амидная группа без отрыва атома водорода от кислоты. Экспериментальные данные, полученные нами, в некоторой степени согласуются с квантовомеханическими расчетами [11], которые показали, что система пептидного

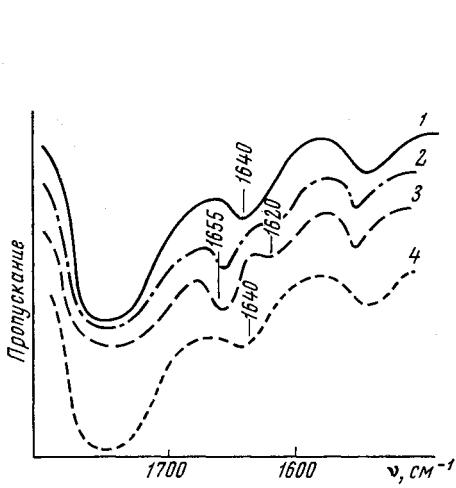


Рис. 7. Температурная зависимость перехода клубок — спираль в ПБГ в растворе 80% ДХУК — 20% ДХЭ

Температура ($^{\circ}\text{C}$): 1 — 20; 2 — 30; 3 — 50;
4 — температура 20 (охлажденный образец)

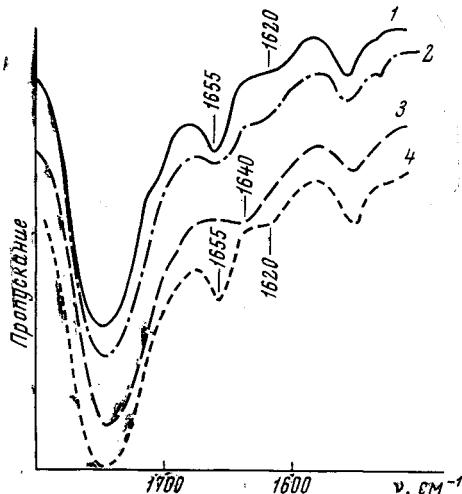


Рис. 8. Температурная зависимость перехода спираль — клубок в ПБГ в растворе 70% ДХУК — 30% ДХЭ

Температура ($^{\circ}\text{C}$): 1 — +20; 2 — -12; 3 — -23; 4 — +20 (обратный ход)

скелета обладает акцепторными свойствами, которыми не обладает единичное пептидное звено.

Пока не ясно, в каком месте спирали происходит протонизация амидной группы. Данные по измерению диэлектрических свойств полипептидов в ДХУК [12, 13] указывают на то, что протонизация происходит на концах спиральных участков полипептидной цепи. Однако число таких участков должно быть невелико и вряд ли они могут быть зафиксированы по ИК-спектрам.

Эта работа позволяет также отнести полосу 1640 cm^{-1} к полосе водородной связи полимер — растворитель, что важно при интерпретации переходов, наблюдающихся в полипептидах в сильных органических кислотах, особенно для образцов, находящихся в β -конформации.

Приносим благодарность И. С. Милевской и Ю. В. Митину за обсуждение результатов.

Выводы

- Протонизация полипептидов в сильных органических кислотах происходит тогда, когда полипептид находится в упорядоченном состоянии. В случае «клубка» происходит образование водородных связей полипептид — кислота.

- Полоса 1640 cm^{-1} относится к колебанию связи $C=O$ амидной группы, связанной водородной связью с группой OH кислоты.

ЛИТЕРАТУРА

1. P. Doty, J. T. Yang, J. Amer. Chem. Soc., **74**, 761, 1957.
2. G. D. Fasman, in «Polyaminoacids, polypeptides and proteins», Univ. Press, Wisconsin, 1962.
3. I. M. Klotz, S. F. Russo, Sue Hanlon, J. Amer. Chem. Soc., **85**, 2024, 1963.
4. I. M. Klotz, S. F. Russo, Sue Hanlon, M. A. Stake, J. Amer. Chem. Soc., **86**, 4774, 1964.
5. A. Pivcová, Collect. Czechosl. Chem. Commun., **30**, 2468, 1965.
6. Л. Беллами, Инерактивные спектры сложных молекул, Изд. иностр. лит., 1963.
7. H. Lenormant, J. Amer. Chem. Soc., **80**, 6191, 1958.
8. Н. Г. Илларионова, И. А. Болотина, Б. З. Волчек, В. И. Калихевич, Ю. В. Митин, О. Б. Птицын, А. В. Пуркина, Биофизика, **11**, 762, 1966.
9. A. R. Downie, A. Elliott, W. E. Hanby, B. R. Malcolm, Proc. Roy. Soc., **A242**, 325, 1957.
10. P. Doty, J. T. Yang, J. Amer. Chem. Soc., **78**, 498, 1956.
11. M. Suard-Sender, J. Chim. phys. et phys.-chim. biol., **62**, 89, 1965.
12. H. Watanabe, K. Yoshioka, A. Wada, Biopolymers, **2**, 91, 1964.
13. H. Watanabe, K. Yoshioka, Biopolymers, **4**, 43, 1966.

PROTONATION OF AMIDE GROUP IN SOLUTIONS OF STRONG ORGANIC ACIDS

B. Z. Volchek, A. V. Purkina

Summary

Strong organic acids such as dichloroacetid and trichloroacetic cause partial protonation of amide groups in polypeptides. In polypeptides partial protonation occurs only in the case of its ordered structure in solution. At coming to statistical coil formation of hydrogen bonds between C=O groups and on acid groups without protonation takes place.