

УДК 541.64:539.107

КОНФОРМАЦИОННЫЕ МОДЕЛИ МОНО- И ДИЗАМЕЩЕННЫХ ПОЛИОКСИЭТИЛЕНОВЫХ ЭФИРОВ N-БЕНЗОИЛГИСТИДИНА

*И. Н. Топчиева, С. Л. Мкртчян, Г. Ф. Пекер,
В. А. Кабанов*

Изучено электрофоретическое поведение полиоксииэтиленовых эфиров N-бензоилгистидина (ПОБГ) мол. веса 15 000 и 40 000. Показано, что в обоих случаях полимер делится на две фракции: смесь монозамещенного ПОБГ с непрореагировавшим полиоксиэтиленом (ПОЭ), обладающую низкой электрофоретической подвижностью, и дизамещенный ПОБГ с относительно высокой электрофоретической подвижностью. Изучена реакция модификации имидазольных групп моно- и дизамещенных ПОБГ этих соединений бромукусной кислотой. Показано, что имидазольные группы монозамещенных соединений не модифицируются, в то время как дизамещенные ПОБГ каталитически активны и модифицируются. Методом потенциометрического титрования определены рК имидазольных групп монозамещенных ПОБГ. Из сопоставления рК имидазола моно- и дизамещенных молекул сделан вывод о существенной роли водородных связей в стабилизации структуры монозамещенных ПОБГ.

В предыдущих работах [1, 2] были описаны каталитические свойства полиоксииэтиленовых эфиров N-бензоил-L-гистидина (ПОБГ), полученных модификацией концевых гидроксильных групп полиоксиэтилена (ПОЭ) (мол. вес 15 000 ПОБГ₁₅ и 40 000 ПОБГ₄₀) в реакции гидролиза *n*-нитрофенилацетата (НФА). ПОБГ представляет собой смесь непрореагировавшего ПОЭ, моно- и дизамещенных полиоксииэтиленовых эфиров. На основании кинетического анализа систем, содержащих ПОБГ с различными степенями замещения концевых групп, и изучения модификации имидазольных групп было показано существенное различие в каталитических и химических свойствах одно- и дизамещенных ПОБГ. В то время как имидазольные группы в дизамещенных макромолекулах катализируют гидролиз НФА и вступают в реакции химической модификации, имидазольные группы монозамещенных соединений оказались инертными как в реакции гидролиза НФА, так и в реакции модификации. Поэтому представляло интерес выделить эти соединения в индивидуальном состоянии и изучить их свойства.

Экспериментальная часть

Выделение моно- и дизамещенных ПОБГ осуществляли методом препаративного электрофореза в крахмальном блоке в уксусно-пиридиновом буфере рН 4,4. Электрофорез проводили в плоской прямоугольной кювете из органического стекла (17×12×2 см³). Приготовление носителя и образца для препаративного электрофореза осуществляли по методу [3]. Разделение проводили в течение 7–8 час. при напряжении 700–800 в при 4°. Для наблюдения за ходом разделения с крахмального блока снимали «отпечаток», прикладывая к поверхности блока смоченную буфером полоску хроматографической бумаги, которую затем проявляли реагентом Паули [4] (или Драггендорфа [5]). Напряжение снимали, когда зоны отстояли друг от друга на расстоянии 12–15 см. Соответствующие зонам части крахмального блока вырезали и элюировали буфером и водой, крахмал отделяли фильтрованием, пропусканием через биогель P-100 и последующим центрифугированием на препаративной ультра-

центрифуге Spinko-L-2 (фирмы «Beckman») в течение 90 мин. при 4° (скорость вращения ротора 30 000 об./мин). Растворы упаривали досуха на роторном испарителе, после чего полимеры сушили в вакууме.

Гель-фильтрацию растворов полимеров проводили на колонке с сефадексом G-200 (54×3,5 см). Сефадекс предварительно уравновешивали уксусно-пиридиновым буфером (рН 4,4). Для определения исключенного объема v_0 через колонку с сефадексом пропускали раствор голубого декстрана ($M=1\cdot10^6$), для определения общего объема v_t — раствор железисто-синеродистого калия и по величине оптической плотности растворов при 600 и 450 нм соответственно находили v_0 и v_t .

На прокалиброванную таким образом колонку наносили раствор полимера (400 мг) в 1—3 мл уксусно-пиридинового буфера. Элюирование полимеров с колонки проводили уксусно-пиридиновым буфером. Элюаты собирали с помощью коллектора фракций Radirac фирмы LKB (Швеция). Концентрацию ПОБГ в элюате определяли реакцией Паули. Коэффициенты распределения полимеров вычисляли по формуле

$$k = \frac{v_t - v_0}{v_t + v_0}, \quad (1)$$

где v_t — элюированный объем, v_0 — исключенный объем, v_t — общий объем.

Бромуксусную кислоту (БУК) перекристаллизовывали из эфира (т. пл. 46°). Модификацию проводили, пользуясь методом, описанным в работе [6], в фосфатном буфере, рН 7,8 при 25°. Растворы, содержащие $5\cdot10^{-3}$ — $1\cdot10^{-2}$ моль/л монозамещенного ПОБГ и $2,5\cdot10^{-2}$ — $5\cdot10^{-2}$ моль/л БУК, термостатировали при 25°, через каждые 3 часа определяли с помощью реакции Паули долю непрореагировавших имидазольных групп. (В качестве контрольного опыта проводили реакцию Паули в растворе буфера с БУК.) Долю активных имидазольных групп определяли по разности между содержанием имидазольных групп в исходном полимере и в продукте реакции с БУК. Реакцию модификации вели в течение 18—20 час.

pK имидазольных групп определяли методом потенциометрического титрования [7] на автоматическом титраторе фирмы «Radiometer» (Дания). Раствор исследуемого вещества, содержащий $2\cdot10^{-6}$ — $4\cdot10^{-6}$ моль/л имидазольных групп, подкисляли концентрированной HCl до рН 4 и титровали 0,019 н. KOH; pK определяли из кривой титрования по точке полунейтрализации.

Результаты и их обсуждение

Для разделения смеси ПОБГ использовали электрофоретический метод, так как можно было ожидать, что содержащие различное количество заряженных групп моно- и дизамещенные молекулы ПОБГ будут различаться своей электрофоретической подвижностью. Для выяснения принципиальной возможности разделения смеси был проведен электрофорез на бумаге. Вид электрофореграммы показал, что смесь делится на две фракции, однако разделение осложняется адсорбцией компонентов на целлюлозе (наличие «хвостов» у движущейся зоны). Поэтому в дальнейшем в качестве носителя нами был использован более «инертный» крахмал.

Электрофорез проводили в крахмальном блоке при использовании пиридин-ацетатного буфера при рН 4,4. В результате электрофоретического разделения ПОБГ было выделено две фракции: фракция I, обладающая низкой электрофоретической подвижностью, и фракция II, характеризующаяся более высокой электрофоретической подвижностью. Обе фракции дают окрашивание с реактивами Паули [4] и Драггендорфа [5], что свидетельствует о том, что обе они содержат полимерные цепи с имидазольными группами на концах. Отсюда естественно предположить, что фракция I представляет собой смесь монозамещенных и непрореагировавших молекул ПОЭ, а фракция II — дизамещенный ПОЭ.

Для идентификации фракций и определения степени их гомогенности проводили количественное определение содержания имидазольных групп в препаратах фракций I и II. При определении процентного содержания имидазольных групп (в расчете на один конец) реакцией Паули для фракции I, полученной в результате разделения препарата ПОБГ₁₅, содержащего 33% имидазольных групп, было получено значение 14,5%. Теоретически рассчитанная величина, полученная в предположении о статистическом замещении концевых групп ПОЭ, составляет 12,5%, что удовлетворительно согласуется с данными эксперимента. При изучении электрофорети-

ческого поведения ПОБГ₁₅ и ПОБГ₄₀ было показано, что электрофореграммы обоих препаратов аналогичны друг другу. Поэтому если рассматривать имидазольную группу как метку, позволяющую следить за конформационным состоянием макромолекул, то можно сделать вывод о том, что конформации монозамещенных полиоксиэтиленовых эфиров различных молекулярных весов однотипны. Отсутствие электрофоретической подвижности монозамещенных ПОБГ указывает на то, что заряженная имидазольная группа вместе с противоином находится внутри макромолекулярного клубка.

Естественно предположить, что вторая фракция представляет собой дизамещенный ПОБГ, содержание имидазольных групп в котором должно составлять 100%. В выделенном нами препарате процент замещения концевых групп оказался равным 84%.

В предыдущих работах на основании кинетического анализа гидролиза НФА в присутствии ПОБГ было показано, что дизамещенные цепи ПОБГ₁₅ способны к образованию каталитически неактивных ассоциатов. По-видимому, основной вклад в образование таких ассоциатов вносят неполярные взаимодействия между бензоильными группами. Не исключена возможность, что образование водородных связей между имидазольными группами также может стабилизировать конформацию ПОЭ со сближенными концами.

Рис. 1. Гель-хроматограмма ПОБГ₁₅ на колонке с сефадексом G-200 при pH 7,8 (фосфатный буфер) (1—2) и 4,4 (пиридин-ацетатный буфер) (3, 4)

1 — ПОБГ₁₅, содержащий 25% имидазольных групп (500 мг); 2 — то же (65 мг); 3 — ПОБГ₁₅, содержащий 22% имидазольных групп (650 мг); 4 — то же (100 мг)

возможность, что образование водородных связей между имидазольными группами также может стабилизировать конформацию ПОЭ со сближенными концами.

Субстрат — НФА и продукт реакции — нитрофенол (НФ) активируют полимерный катализатор (ПК), вызывая его диссоциацию на активные единичные макромолекулы. С другой стороны, при увеличении M от 15 000 до 40 000 ПК утрачивает способность к ассоциации, и введение в молекулу ПОЭ дополнительных гидрофобных групп компенсируется за счет изменения конформации дизамещенных макромолекул. НФА и НФ вызывают в этом случае конформационный переход из каталитически неактивного состояния в активное.

Исходя из представлений о структуре дизамещенных полиоксиэтиленовых эфиров, предполагающей близость имидазольных групп, можно полагать, что протонирование имидазольных групп должно вызывать конформационные изменения в макромолекуле ПК вследствие электростатического отталкивания одноименно заряженных групп. За изменением конформационного состояния ПОБГ при изменении pH среды можно проследить по изменению олигомерного состояния ПОБГ₁₅: проведением гель-фильтрации при различных pH. На гель-хроматограммах, полученных при pH 4,4, при котором проводили электрофоретическое разделение смеси ПОБГ, обнаруживается один пик независимо от концентрации полимера, нанесенного на колонку. Это означает, что при данном pH весь ПОБГ находится в «мономерной» форме. Для сравнения на рис. 1 приведены соответствующие гель-хроматограммы ПОБГ мол. веса 15 000 при pH 7,8, где отчетливо видно наличие ассоциированной формы, находящейся в равновесии с «мономерной». Таким образом, изменение pH, как и действие НФА и НФ, приводит к изменению конформационного состояния изучаемых ПК.

Сопоставляя данные по электрофоретическому поведению моно- и ди-

замещенных ПОБГ и по гель-фильтрации ПОБГ₁₅, можно сделать вывод о том, что наличие электрофоретической подвижности дизамещенных ПОЭ обусловлено периферийным расположением протонированных имидазольных групп в макромолекулах.

Из работ [1, 2] следует, что катализически активными компонентами препаратов ПОБГ₁₅ и ПОБГ₄₀ являются только дизамещенные цепи. Дополнительные данные, указывающие на различие химических свойств имидазольных групп моно- и дизамещенных ПОБГ, были получены при изучении реакции модификации этих групп в препаратах ПОБГ₁₅ и ПОБГ₄₀ бромуксусной кислотой [1]. В настоящей работе было проведено карбоксиметилирование имидазольных групп монозамещенных ПОБГ₁₅ и ПОБГ₄₀ и показано, что имидазольные группы этих соединений не вступают в реакцию. Это коррелирует с отсутствием каталитической активности этих соединений и указывает на недоступность имидазольной группы монозамещенных ПОБГ действию как субстрата, так и модификатора.

Ввиду того что реакция с БУК требует значительных количеств полимерного реагента, нам не удалось провести эту реакцию с препаратами дизамещенных ПОБГ₁₅ и ПОБГ₄₀. Тем не менее имеющиеся в нашем распоряжении данные по модификации смесей ПОБГ₁₅ и ПОБГ₄₀ и чистых препаратов монозамещенных эфиров соответствующих соединений подтверждают сделанное предположение о различии в реакционной способности имидазольных групп в моно- и дизамещенных соединениях.

Важной характеристикой функциональной группы, входящей в состав макромолекулы, позволяющей судить об ее нуклеофильности и природе окружающих групп, является константа диссоциации или рК группы. Величины рК имидазольных групп в препаратах моно- и дизамещенных эфиров, определенные методом потенциометрического титрования, оказались различными и равными 6,1 для моно- и 6,7 — для дизамещенного соединения. Для сравнения этим же методом были определены рК низкомолекулярных имидазолсодержащих соединений N-бензоилгистидина (БГ) и его метилового эфира (МЭБГ) (таблица). В таблице приведены также

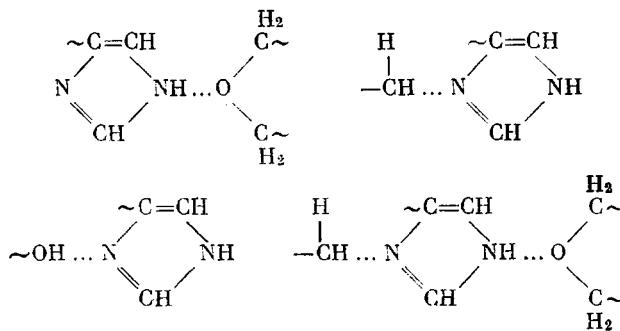
Константы диссоциации ПОБГ и их низкомолекулярных аналогов

Имидазолсодержащее соединение	рК ($\pm 0,1$)		Имидазолсодержащее соединение	рК ($\pm 0,1$)	
	потенциометрическое титрование	кинетический метод		потенциометрическое титрование	кинетический метод
ПОБГ ₁₅ (моно)	6,1	—	ПОБГ ₄₀ (ди)	—	7,0
ПОБГ ₁₅ (ди)	6,7	6,9	БГ	6,9	7,0
ПОБГ ₄₀ (моно)	6,1	—	МЭБГ	6,3	6,1

значения рК всех изученных нами соединений, определенные кинетическим методом [1]. Отметим, что значения рК имидазольных групп всех соединений, определенные обоими методами, удовлетворительно совпадают. Это позволяет считать измеренные нами величины достаточно надежными и интерпретировать различие в рК моно- и дизамещенных эфиров.

Согласно предложенной ранее [2] модели монозамещенного эфира, ближайшие звенья макромолекулы-носителя в результате взаимодействия гидрофобного N-бензоильного радикала с этиленовыми группами «обматываются» вокруг концевой группы, приводя тем самым к ее пространственной изоляции от молекул субстрата. Принимая во внимание более низкое значение рК имидазола в ПОБГ₁₅ (моно) по сравнению с ПОБГ₁₅ (ди), можно предположить, что наряду с гидрофобными взаимодействиями существенную роль играет образование водородных связей между имидазольными группами и полиоксиэтиленовой цепью, приводящее к снижению нуклеофильности азота и соответствующему сдвигу рК в область более низких значений рН.

Поскольку имидазольная группа может выступать как в роли донора, так и акцептора водородных связей, можно предположить образование следующих типов связей в молекуле ПОБГ (моно):



Таким образом, на основании имеющихся данных можно схематически представить конформационные модели ПОБГ (рис. 2).

Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что различие химических свойств имидазольных групп моно- и дизамещенных ПОБГ обусловлено различным конформационным состоянием этих полимеров.

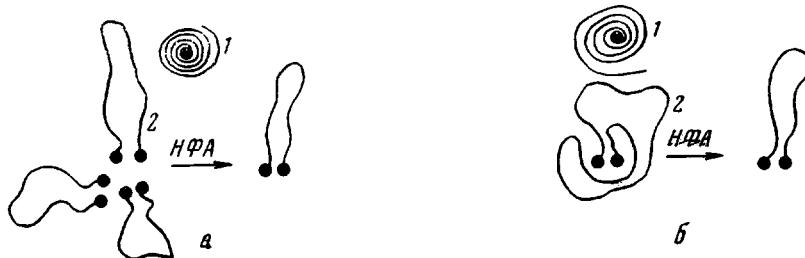


Рис. 2. Конформационные модели моно-(1) и дизамещенных (2) ПОБГ₁₅ (а) и ПОБГ₁₀ (б). Темный кружок — имидазольная группа

Авторы выражают благодарность М. Ф. Вялых за помощь при электрофоретическом разделении препаратов и Н. Ф. Казанской за помощь при определении рК.

Московский государственный
университет им. М. В. Ломоносова

Поступила в редакцию
26 X 1972

ЛИТЕРАТУРА

1. И. Н. Топчиеva, А. Б. Соловьева, В. А. Кабанов, Докл. АН СССР, 199, 1084, 1971.
2. И. Н. Топчиеva, А. Б. Соловьева, В. А. Кабанов, Высокомолек. соед., A14, 825, 1972.
3. Е. М. Самсонов, Сб. Физико-химические методы изучения, анализа и фракционирования биополимеров, «Наука», 1966, стр. 40.
4. Др. Гринштейн, М. Винци, Химия аминокислот и пептидов, «Мир», 1964, стр. 784.
5. И. М. Хайс, К. Мацек, Хроматография на бумаге, Изд-во иностр. лит., 1962, стр. 797.
6. S. Korman, H. T. Clarke, J. Biol. Chem., 221, 113, 1956.
7. А. Альберт, Е. Сержент, Константы ионизации кислот и оснований, «Химия», 1964, стр. 21.