

УДК 541.64:537.226

ДИЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА РАСТВОРОВ МАКРОМОЛЕКУЛ
СИНТЕТИЧЕСКИХ ПОЛИПЕТИДОВ
В СИЛЬНЫХ ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТАХ

B. И. Фролов, Л. Л. Бурштейн

В диапазоне частот внешнего электрического поля $f=5 \text{ кгц} - 5 \text{ Мгц}$ измерены диэлектрическая проницаемость ϵ' и проводимость G_f растворов для восьми синтетических полипептидов (СПП) с различным боковым радикалом различной степени полимеризации z в сильных органических кислотах — дихлоруксусной (ДХУ) и трифторуксусной (ТФУ). Во всех случаях обнаружена единственная область дисперсии с удельным диэлектрическим инкрементом $\Delta\epsilon_0'/c_2$ (c_2 — концентрация полимера в растворе) и критической частотой f_{kp} , зависящими от z образца. Значения $\Delta\epsilon_0'/c_2$ растворов и их зависимость от степени полимеризации указывают на то, что существенный вклад в значение среднего квадрата дипольного момента макромолекулы дают фиксированные на полипептидной цепи заряды, появившиеся в результате взаимодействия с кислотой (главным образом протонизация N-концевой аминогруппы NH_3^+). Этот вклад определяется силой кислоты, диэлектрической проницаемостью растворителя и зависит от z . Сопоставление абсолютных значений $\Delta\epsilon_0'/c_2$ и f_{kp} для растворов исследованных СПП позволяет установить у макромолекул, некоторых из них в ДХУ, существование неразрушенной вторичной структуры.

Применение диэлектрического метода к исследованию полярных полимерных молекул дает возможность изучать диэлектрически активные формы тепловой подвижности в системе и, в принципе, позволяет охарактеризовать ориентацию индивидуальных полярных групп, а также распределение заряженных групп в макромолекуле [1, 2].

Макромолекулы синтетических полипептидов (СПП) содержат амидные группы, жестко связанные с остовом, при этом продольная составляющая дипольного момента последовательных монозвеньев образует неальтернирующую (по направлению) последовательность. В результате для клубообразных полипептидных цепей (как и для макромолекул α -спиральной конформации) вращательная диффузия макромолекул как целого является диэлектрически активной [3], и для растворов наблюдается низкочастотная область дисперсии с удельным диэлектрическим инкрементом и критической частотой, зависящими от молекулярной массы [4, 5].

Ранее мы исследовали диэлектрические свойства разбавленных растворов клубообразных макромолекул СПП поли- ϵ , N-карбобензокси- L -лизина (ПКБЛ) и поли- γ -бензил- L -глутамата (П- γ -БГ) различной молекулярной массы в смешанных растворителях на основе дихлоруксусной кислоты (ДХУ) [5]. Нами, в частности, была предложена интерпретация наблюдаемых значений удельных диэлектрических инкрементов растворов ($\Delta\epsilon_0'/c_2 = (\epsilon_0' - \epsilon_\infty')/c_2$) (где c_2 — концентрация полимера в растворе). Эта интерпретация включает представление об образовании устойчивого водородно-связанного комплекса амидная группа + молекула ДХУ в каждом монозвене СПП, а также наличие вклада в дипольный момент полипептидной цепи фиксированных зарядов, появившихся в результате взаимодействия макромолекулы с кислотой.

Для установления общности наблюдаемых явлений и получения дополнительных свидетельств в пользу последней гипотезы в настоящей работе исследовали диэлектрическое поведение разбавленных растворов СПП с различным боковым радикалом в ДХУ и в более сильной трифторуксусной кислоте (ТФУ) (или в смесях на их основе).

Исследовали отдельные образцы П- γ -БГ, ПКБЛ, поли- β -бензил-*L*-аспартата, (П- β -БА), поли- γ -метил-*L*-глутамата (П- γ -МГ), поли-*D,L*-фенилаланина (П-*D,L*-ФА), поли-*D,L*-аланина (П-*D,L*-А), поли-*D*-аланина (П-*D*-А). Большая часть образцов синтезирована Власовым в ИВС АН СССР. Молекулярную массу СПП определяли вискозиметрически в ДХУ или ТФУ. Характеристическая вязкость $[\eta]$ и степень полимеризации z СПП наряду с диэлектрическими характеристиками их растворов приведены в таблице. Растворители

Диэлектрические характеристики растворов синтетических полипептидов в органических кислотах

СПП	Растворитель	z	$[\eta]$, $\text{дл}/\text{г}$	$\Delta\epsilon'/c_2$, $\text{дл}/\text{г}$	$f_{\text{кр}}$, кгц	Примечание
П- γ -БГ	ДХУ+гентан (0,9:0,1)	500	0,6	0,3	30	Клубок
ПКБЛ	ДХУ+хлороформ (1:1)	300	0,8	0,28	70	»
П- β -БА	ДХУ	635	1,2	0,45	40 60	Широкое ММР
П- γ -МГ	»	2000	— м-крезол	0,40	20	Клубок, широкое ММР
П- <i>D,L</i> -ФА	ДХУ+хлороформ (0,3:0,2)	470	1,2	0,65	15	Агрегация и спираль (несколько %)
П- <i>D,L</i> -А	ДХУ	300	0,8	0,94	250	Сpirаль (несколько %)
П- <i>L</i> -А	»	25	0,3	0,2	1000	Сpirаль (несколько %) или β -структуры
П- <i>D</i> -А	»	700	2,48	1	20	α -Сpirаль
П- γ -БГ	ТФУ	700	0,8	1,1	280	Клубок
		400	0,5	0,95	350	»
		100	0,15	0,3	1000	»
ПКБЛ	»	300	—	1,3	1500	»
П- β -БА	»	635	0,85	1,2	250 600	»
П- γ -МГ	»	2000	2,4	0,68	450	Клубок, широкое ММР
П- <i>D,L</i> -А	»	300	0,4	1,25	1000	Клубок

ДХУ, ТФУ, хлороформ и гентан сушили стандартными способами и подвергали фракционной перегонке. Растворы для диэлектрических измерений имели концентрацию 0,3—0,8 $\text{г}/\text{дл}$. Опыты проводили сразу же после растворения, чтобы избежать возможной деструкции СПП под действием кислоты.

Измерения диэлектрической проницаемости ϵ' и проводимости G_f при частоте f внешнего электрического поля проводили в диапазоне 5 кгц — 5 Мгц в термостатируемой титановой ячейке цилиндрической формы с собственной емкостью $C^*=32,6 \text{ пФ}$ при $25\pm0,1^\circ$. Паразитный эффект приэлектродной поляризации, существенный при частотах ниже 20—100 кгц (в зависимости от сквозной проводимости раствора G_0), и влияние последовательной индуктивности вводов ячейки на измеряемую емкость (при частотах выше 2 Мгц) учитывали описанным ранее методом [6].

Сквозная омическая проводимость G_0 растворов, определяемая экстраполяцией при $f \rightarrow 0$, составляла $3 \cdot 10^{-5}$ — $3 \cdot 10^{-3} \text{ ом}^{-1}$ в зависимости от растворителя, образца и концентрации СПП. Критическую частоту $f_{\text{кр}}$ диэлектрической дисперсии определяли как частоту, при которой диэлектрический инкремент $\Delta\epsilon' = \epsilon' - \epsilon'_\infty$ равен половине своего статического значения, т. е. когда $\Delta\epsilon' = (\epsilon_0' - \epsilon_\infty')/2$ (ϵ_0' и ϵ_∞' — статическая и высокочастотная диэлектрическая постоянная соответственно). Однако в некоторых случаях $f_{\text{кр}}$ была получена и из кривой диэлектрического поглощения по частотному расположению ее максимума.

В таблице суммированы результаты изучения диэлектрического и вязкостного поведения растворов различных СПП в ДХУ (или смесях на ее основе) и ТФУ. Растворы всех исследованных СПП как с полярным, так

и с неполярным боковым радикалом в растворителях на основе ДХУ или ТФУ в используемом диапазоне частот обнаруживают единственную область диэлектрической дисперсии. При этом в общем случае для растворов макромолекул значение удельного статического диэлектрического инкремента $\Delta\epsilon_0'/c_2$ в первом приближении пропорционально отношению среднего квадрата дипольного момента макромолекул к их молекулярной массе, т. е. $\Delta\epsilon_0'/c_2 \sim \langle \mu^2 \rangle / M$. Критическая частота дисперсии f_{kp} , в данном случае диэлектрически активной вращательной диффузии макромолекул как целого, дает непосредственно их константу вращательной диффузии \bar{D} ($f_{kp} = \bar{D}/\pi$).

Макромолекулы П- γ -БГ, ПКБЛ, П- β -БА и П- γ -МГ в ДХУ и смесях на ее основе (таблица) находятся в клубообразной форме, и наблюдаемая область дисперсии растворов для $z=700-300$ имеет значение $f_{kp}=20-70$ кгц. При этом, в согласии с ранее опубликованными результатами [5] и с ожидаемым для диэлектрически активной вращательной диффузии макромолекул как целого, полученные значения f_{kp} определяются молекулярной массой образца и вязкостью растворителя η_0 в соответствии с соотношением $\tau=(2\pi f_{kp})^{-1}=1,21 M \eta_0 [\eta]/RT$ [7-9]. Удельные диэлектрические инкременты растворов упомянутых СПП $\Delta\epsilon_0'/c_2=0,3-0,4$ дл/г (концентрация СПП c_2 в растворе выражена в г/дл). Указанные значения $\Delta\epsilon_0'/c_2$ соответствуют значениям эффективных дипольных моментов в расчете на монозвено $\mu_{\text{эфф}}=\langle \mu^2 \rangle/z^{1/2}=(7-9)D$ [5], что в свою очередь согласуется с представлением о существовании устойчивого комплекса амид + ДХУ в каждом монозвене с дипольным моментом $\mu_0=(7-8)D$ и некоторого дополнительного вклада в значение среднего квадрата дипольного момента $\langle \mu^2 \rangle$ макромолекул, обусловленного главным образом заряжением N-концевой аминогруппы (NH_3^+). (При этом не исключена протонизация некоторой части амидных групп полипептидного остова, так что асимметрия их распределения относительно центра инерции также должна давать дополнительный вклад в $\langle \mu^2 \rangle$.) Этот вклад естественно зависит от молекулярной массы СПП и в данном случае составляет от 10 до 50% (для $z=100-1000$) [5].

Растворы в ДХУ остальных четырех СПП (П-*D*L-ФА, П-*D*L-А, П-*D*-А и П-*L*-А) обнаруживают аномальные диэлектрические характеристики ($\Delta\epsilon_0'/c_2$ и f_{kp}), что указывает на особенности в конформационном строении макромолекул в этих условиях. Эти результаты обсуждаются ниже. Растворы в ТФУ (которая является более сильной кислотой, чем ДХУ) всех СПП с $z=300-700$ (за исключением П- γ -МГ) имеют в 3-4 раза большие значения $\Delta\epsilon_0'/c_2=0,9-1,3$ дл/г по сравнению с таковыми для растворов в ДХУ. Указанные значения $\Delta\epsilon_0'/c_2$ соответствуют значениям $\mu_{\text{эфф}}=(12-15)D$ /монозвено. (Оценки выполнены по модифицированной формуле Онзагера [10], как это было проделано нами ранее [5].) Последнее отражает увеличение вклада в $\langle \mu^2 \rangle$ фиксированных на макромолекуле зарядов, появившихся в результате взаимодействия с более сильной ТФУ. Средний квадрат дипольного момента $\langle \mu^2 \rangle$ клубообразных полипептидных цепей в сильных органических кислотах (ДХУ, ТФУ) содержит два вклада: один, обусловленный векторным суммированием дипольных моментов амидных групп последовательных монозвеньев, образующих устойчивый водородно-связанный комплекс с молекулами кислоты, и другой, обусловленный присутствием на макромолекуле зарядов, появившихся в результате взаимодействия с кислотой N-концевых аминогрупп (NH_3^+), и, возможно, в результате протонизации некоторой незначительной части амидных групп полипептидного остова. Действительно, асимметрия в распределении относительно центра инерции макромолекулы зарядов даже одного знака (в данном случае положительного) приводит к появлению у нее дипольного момента [11, 12] с эффективным отрицательным зарядом, располагающимся в центре макромолекулы, значение которого определяемое силой кислоты и диэлектрической проницаемостью растворите-

ля, естественно, зависит от молекулярной массы (размеров) полипептидной цепи.

Значения f_{kp} растворов в ТФУ ($f_{kp}=250-1000 \text{ кг} \cdot \text{с}$) в среднем на порядок превышают таковые для растворов в ДХУ в соответствии с уменьшением вязкости растворителя (при $25^\circ \eta_0=6,4$ и $0,6 \text{ см}^2 \text{ для ДХУ и ТФУ соответственно}$). Обращает на себя внимание существенное уменьшение значения $\Delta\epsilon_0'/c_2$ растворов П- γ -БГ при уменьшении степени полимеризации z ($\Delta\epsilon_0'/c_2=1,1 \text{ дм}^3/\text{г}$ при $z=700$ и $\Delta\epsilon_0'/c_2=0,3 \text{ дм}^3/\text{г}$ при $z=100$). Этот факт служит еще одним подтверждением существенного вклада фиксированных на макромолекуле зарядов (в первую очередь, зарядов N-концевых аминогрупп $-\text{NH}_3^+$) в их дипольный момент. Действительно, в этом случае при увеличении z расстояние между NH_3^+ -группой и центром инерции макромолекулярного клубка (где располагается эффективный отрицательный заряд диполя) возрастает.

Анализ полученных диэлектрическим методом результатов (по $\Delta\epsilon_0'/c_2$ и f_{kp}) для растворов в ДХУ различных полиаланинов (П-DL-ФА, П-DL-А, П-L-А, П-D-А) позволяет получить дополнительную информацию об особенностях конформационного строения их макромолекул в данном растворителе.

Растворы П-DL-ФА с $M=7 \cdot 10^4$ ($z \approx 470$) в смеси ДХУ – хлороформ (0,3 : 0,2) обнаруживают завышенные значения $\Delta\epsilon_0'/c_2$ и заниженные f_{kp} (0,65 $\text{дм}^3/\text{г}$ и 15 $\text{кг} \cdot \text{с}$ соответственно). Это может быть обусловлено наличием микроблоков α -спиральной структуры (из D- или из L-остатков) в клубкообразных макромолекулах, а также наличием агрегатов макромолекул, имеющих некоторую долю спиральной структуры [12]. Характеристическая вязкость раствора в этом растворителе также несколько завышена ($[\eta]=1,2 \text{ дм}^3/\text{г}$), превышая ожидаемое значение для клубкообразных цепей данной степени полимеризации. Заметим, что П-DL-ФА в чистой ДХУ нерастворим, а в хлороформе имеет α -спиральную конформацию. Результаты для П-DL-А ($z=300$) в ДХУ показывают, что макромолекулы данного СПП имеют конформацию, существенно отличающуюся от клубкообразной. Действительно, большие значения $\Delta\epsilon_0'/c_2 \approx 0,94$ и $f_{kp} = 250 \text{ кг} \cdot \text{с}$ для растворов показывают, что макромолекулы в этих условиях при большой компактности их структуры (о чем свидетельствует большое значение константы вращательной диффузии $D=\pi f_{kp}$) характеризуются большей полярностью ($\Delta\epsilon_0'/c_2 \sim \langle \mu^2 \rangle$), чем клубкообразные макромолекулы сравнимой степени полимеризации. Это можно представить, допустив существование микроблоков α -спиральной структуры (например, из D- или L-остатков), разделенных клубкообразными участками (Действительно, короткие α -спиральные сегменты должны приводить к большей компактности макромолекулы, поскольку характеризуются проекцией остатка на ось 1,5 Å, тогда как для клубков эта величина равна 3,8 Å [13]). Значения $\Delta\epsilon_0'/c_2$ и f_{kp} (1,25 $\text{дм}^3/\text{г}$ и 1000 $\text{кг} \cdot \text{с}$ соответственно) для растворов в ТФУ, где макромолекулы П-DL-А клубкообразны, находятся в согласии с предполагаемой структурой в ДХУ. При отсутствии у макромолекул в ДХУ какой-либо вторичной структуры переход от ДХУ к ТФУ привел бы к увеличению константы вращательной диффузии $D=\pi f_{kp}$ в 10 раз (соответственно уменьшению вязкости растворителя). Наблюдаемое лишь четырехкратное возрастание f_{kp} указывает на существование в ДХУ более компактной, чем клубок, структуры. Представление о существовании микроблоков спиральной структуры в СПП, синтезированного из смеси D- и L-аминокислот, не противоречит данным по кинетике полимеризации [14]. Вместе с тем другие авторы не наблюдали для П-DL-А (при сравнимых значениях z) присутствия заметной доли спиральности [15]. Указанное различие может быть обусловлено как различием в структуре исследованных образцов, так и меньшей чувствительностью их методов к присутствию малой доли α -спиральной структуры.

Для низкомолекулярного ($z=25$) образца П-L-А в ДХУ эксперимен-

тально получены значения $\Delta\epsilon_0'/c_2=0,2$ д.л./г и $f_{kp}=1000$ кгц. Этих данных недостаточно, чтобы сделать вывод о типе макромолекулярной структуры. Требуются специальные исследования диэлектрических свойств растворов СПП низкой степени полимеризации. Заниженные значения f_{kp} для клубкообразного П- β -БА в ДХУ и ТФУ (20 и 250 кгц соответственно) по сравнению с ожидаемыми для набухших полипептидных клубков данной степени полимеризации (оцененными по формуле $\tau=1,21[\eta]\eta_0 M/RT$) обусловлены присутствием в ММР образца значительного низкомолекулярного «хвоста» и способом определения f_{kp} из кривых дисперсии. Значения же f_{kp} , полученные из кривых поглощения $\epsilon''(\lg f)$ по частотному положению максимума, равны 60 и 600 кгц соответственно. Аналогично, завышенные значения f_{kp} для П- γ -МГ в ДХУ и ТФУ (20 и 450 кгц соответственно) обусловлены присутствием в ММР значительного высокомолекулярного «хвоста» и способом определения f_{kp} из кривых дисперсии, а не из кривых поглощения.

Полученные в настоящей работе результаты, во-первых, показывают, что существенный вклад в дипольный момент клубкообразных макромолекул СПП (а следовательно, и в наблюдаемые значения $\Delta\epsilon_0'/c_2$ растворов) в сильных органических кислотах дают фиксированные на макромолекуле заряды, образовавшиеся в результате взаимодействия с кислотой; во-вторых, они показывают, что диэлектрический метод позволяет получить важную информацию об особенностях конформационного строения индивидуальных макромолекул СПП в сильных органических кислотах и смесях на их основе и, в частности, наличие спирализованных участков в клубкообразной макромолекуле.

Институт высокомолекулярных
соединений АН СССР

Поступила в редакцию
21 IV 1975

ЛИТЕРАТУРА

1. C. J. Böttcher, Theory of Electric Polarisation, Amsterdam, 1952.
2. C. P. Smith, Dielectric Behaviour and Structure, N. Y., 1955.
3. W. H. Stockmayer, M. E. Baur, J. Amer. Chem. Soc., 86, 3486, 1964.
4. E. Marchal, C. Dufour, Internationale Symposium on Macromolecular Chemistry, Toronto, 1968.
5. Л. Л. Бурштейн, В. И. Фролов, Высокомолек. соед., A17, 234, 1975.
6. Л. Л. Бурштейн, В. И. Фролов, Ж. органич. химии, 8, 452, 1972.
7. B. H. Zimm, J. Chem. Phys., 24, 260, 1956.
8. W. H. Stockmayer, Pure Appl. Chem., 15, 539, 1967.
9. T. W. Bates, K. J. Ivin, G. Williams, Trans. Faraday Soc., 63, 1964, 1967.
10. P. Maurel, L. Galzigna, Biophys. J., 11, 6, 1971.
11. W. Kuhn, J. Kuhn, Helv. chim. acta, 27, 493, 1944.
12. H. Watanabe, K. Yoshioka, A. Wada, Biopolymers, 2, 91, 1964.
13. П. Флори, Статистическая механика цепных молекул, «Мир», 1971, гл. 7.
14. A. Wada, J. Molec. Biol., 3, 507, 1961.
15. A. Takahashi, L. Mandelkern, R. E. Glik, Biochemistry, 8, 1673, 1969.