

УДК 541.64:532.77:547.29

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ
НА СВОЙСТВА ЖИДКОКРИСТАЛЛИЧЕСКИХ РАСТВОРОВ
ПОЛИ-(γ -БЕНЗИЛ-L-ГЛУТАМАТА)

Б. З. Волчек, А. В. Грибанов, А. И. Кольцов,
А. В. Пуркина, Г. П. Власов, Л. А. Овсянникова

Методами ИК- и ЯМР-спектроскопии показано, что жидкокристаллическое состояние растворов поли-(γ -бензил-L-глутамата) сохраняется в растворах этого полимера в присутствии как слабой монохлоруксусной (МХУК), так и сильной дифторхлоруксусной кислот (ДФХУК). Свообразие хода расщепления сигналов ЯМР от концентрации кислоты и различия, наблюдаемые для МХУК и ДФХУК, объяснены механизмом связывания этих кислот с молекулами полимера. Исследован вопрос о строении жидкокристаллических полимерных доменов. На основании зависимости величины расщепления сигналов ЯМР от концентрации полимера в растворе, а также совпадения предельных степеней связывания молекул кислоты с полимером в разбавленных и концентрированных растворах, определенных по ИК-спектрам, сделан вывод о равномерном распределении молекул растворителя и полимера в жидкокристаллическом полимерном домене.

Известно, что переход спираль — клубок в полипептидах в смешанных растворителях, содержащих трифторуксусную (ТФУК) или дихлоруксусную (ДХУК) кислоты, носит кооперативный характер, т. е. совершается в узком интервале концентраций этих кислот в растворе. Показано [1, 2], что в случае поли-(γ -бензил-L-глутамата) (ПБГ) до концентраций ТФУК 13, а ДХУК 75% не происходит каких-либо изменений в спиральной структуре. Различными методами [3, 4] установлено, что в «спиралеобразующих» растворителях, таких, как хлороформ, дихлорметан (ДХМ), диметилформамид, растворы ПБГ находятся в жидкокристаллическом состоянии. Так как критическая концентрация, необходимая для образования жидкокристаллического состояния, зависит только от структурных особенностей полимера [5], то и в растворах ПБГ, содержащих денатурирующие кислоты (ТФУК, ДХУК и др.), до их концентраций, обусловливающих переход спираль — клубок, жидкокристаллическое состояние должно полностью сохраняться. В работах [6, 7] методом ЯМР исследовано влияние денатурирующей кислоты (ТФУК) на жидкокристаллическое состояние раствора ПБГ в ДХМ. Уменьшение степени расщепления сигналов протонов ДХМ по мере увеличения концентрации ТФУК интерпретировалось или как полное уничтожение жидкокристаллического состояния, или как проявление локальных нарушений α -спирали под действием ТФУК. Прoverка этих предположений имеет принципиальное значение как для уточнения закономерностей образования жидкокристаллических растворов полимеров, так и для исследования механизма перехода спираль — клубок в полипептидах под действием денатурирующих агентов. Настоящее исследование проведено методами ИК-спектров поглощения и ЯМР-спектроскопии.

Исследовали нефракционированные образцы ПБГ молекулярной массы (75–100) · 10⁶, полученные конденсацией соответствующего N-карбоксиангидрида в бензole с триэтиламином в качестве инициатора. Растворители – дихлорметан, дифторхлорускую кислоту (ДФХУК) очищали и перегоняли непосредственно перед приготовлением раствора. В работе использовалиmonoхлорускую кислоту (МХУК) марки х.ч. Спектры ПМР регистрировали на приборе C-60HL фирмы «Jeol», спектры F¹⁹ – на приборе «Bruker HX-90» на частоте 84,67 МГц. ИК-спектры поглощения регистрировали на приборе UR-20. Образцы готовили в ампулах диаметром 5 мм и выдерживали их 7–30 дней. Концентрация ПБГ во всех исследованных образцах была равной 24 вес. (об.) %. Спектры ЯМР растворов полимеров записывали без вращения образца. Ориентацию молекулярных цепей полимера фиксировали по расщеплению Δν сигналов ЯМР молекул растворителя. Для получения равновесных значений этого расщепления образцы выдерживали в магнитном поле спектрометра не менее 12–24 час. При измерении интенсивностей полос поглощения в ИК-спектрах учитывали пристенный эффект ориентации стенками кюветы.

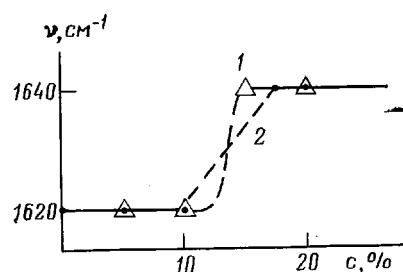


Рис. 1

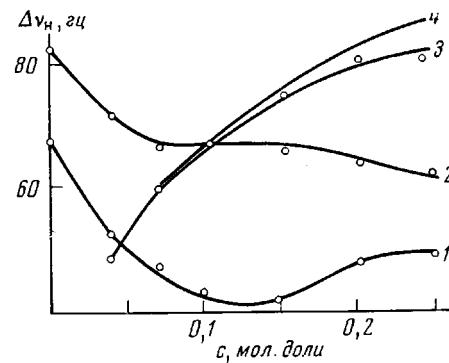


Рис. 2

Рис. 1. Зависимость значений частоты полос амид 1 в ИК-спектре ПБГ от концентрации ТФУК (1) и ДФХУК (2) в растворе

Рис. 2. Зависимость равновесной величины расщепления протонов ДХМ в системе ДХМ – МХУК (1), ДХМ – ТФУК (2), МХУК в системе ДХМ – МХУК (3) и МХУК (рассчитанная) (4) от концентрации кислоты

Существование жидкокристаллического состояния полимерных растворов фиксируется методом ЯМР по ориентации молекул растворителя, вызываемой ориентацией жидкокристаллических доменов под действием магнитного поля спектрометра. Наиболее удобно изучать ориентацию молекул растворителя, если они содержат пару эквивалентных магнитных ядер. Поэтому в качестве денатурирующей кислоты в этом исследовании мы применили дифторхлорускую кислоту. Как видно из рис. 1, переход спираль – клубок ПБГ, определенный методом ИК-спектроскопии [8] в смешанных растворителях ДХМ – ТФУК, ДФХУК происходит при одном и том же содержании этих кислот в растворе, т. е. денатурирующие свойства таких кислот одинаковы. Применение системы ДХМ – ДФХУК позволило оценивать жидкокристаллическое состояние раствора ПБГ в смешанном растворителе, содержащем денатурирующую кислоту, как по расщеплению сигналов ядер протонов ДХМ, так и ядер F¹⁹ ДФХУК. Для сравнения нами была исследована и вторая система ДХМ – monoхлорусканская кислота, которая не вызывает конформационного перехода при любой ее концентрации в растворе. Возможные изменения жидкокристаллического состояния системы ДХМ – МХУК фиксировали по расщеплению ядер протонов ДХМ и МХУК.

На рис. 2 приведены зависимости равновесной величины расщепления сигналов протонов ДХМ и МХУК от концентрации МХУК в растворе. По мере повышения концентрации МХУК в растворе наблюдается падение величины расщепления сигналов протонов ДХМ, что означает снижение средней степени ориентации его молекул, вытесняемых кислотой из обла-

сти контакта с полимерной цепью. При этих же концентрациях МХУК в растворе происходит увеличение расщепления сигналов протонов кислоты, что в общем случае означает увеличение ее средней степени ориентации в тех же условиях. На рис. 3 приведены зависимости равновесной величины расщепления сигналов протонов ДХМ и сигналов F^{19} в зависимости от концентрации ДФХУК в растворе. Для сравнения на этом же рисунке приведен ход зависимости расщепления сигналов протонов ДХМ по мере повышения концентрации в растворе ТФУК. Из сравнения кривых 1 и 2 видно, что действие указанных кислот на жидкокристаллическое состояние ПБГ одинаково. Резкое падение расщепления, наблюдаемое как для сигналов протонов ДХМ, так и для сигналов F^{19} , свидетельствует об одновременном уменьшении средней степени ориентации как для молекул

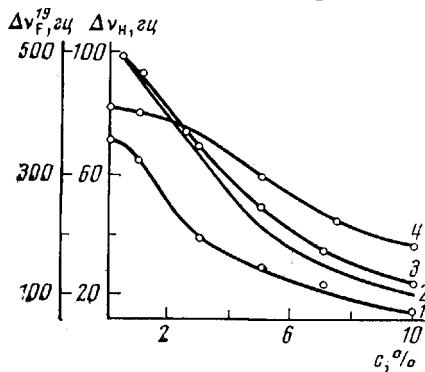


Рис. 3

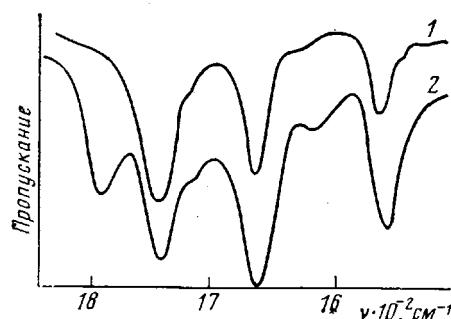


Рис. 4

Рис. 3. Зависимость равновесной величины расщепления сигналов протонов ДХМ в системах ДХМ — ДФХУК (1) и ДХМ — ТФУК (4); ядер F^{19} (рассчитанная) (2) и ядер F^{19} в системе ДХМ — ДФХУК (3) от концентрации кислоты

Рис. 4. ИК-спектры поглощения растворов ПБГ (концентрация полимера 24 вес. (об.) %) в смеси ДХМ — МХУК (1) и ДХМ — ДФХУК (2)

ДХМ, так и молекул ДФХУК в этих условиях. В наиболее простой модели взаимодействия полипептида с растворителем в жидкокристаллическом состоянии, предложенной в работе [6], рассматриваются два состояния молекул растворителя: ориентированные, находящиеся в непосредственной близости от полимера, и полностью неориентированные — все остальные молекулы. Увеличение концентрации кислот в растворе, согласно [6], приводит к замещению молекул ДХМ, находящихся вблизи молекул полипептида, на молекулы соответствующей кислоты. Тогда в условиях быстрых переходов молекул между связанным и свободным состоянием расщепление сигналов ЯМР данного типа молекул растворителя определяется выражением $\Delta v = \Delta v^0 f$, где f — мольная доля связанных молекул растворителя, а Δv^0 — расщепление их сигналов. Так как при повышении концентрации МХУК в растворе, при любых константах связывания МХУК с ПБГ величина f падает, наблюдаемое увеличение расщепления сигналов протонов МХУК при увеличении концентрации ее в растворе свидетельствует или о сложном механизме взаимодействия МХУК с полимером, или об изменении жидкокристаллического состояния раствора. В случае жидкокристаллических растворов ПБГ, содержащих ДФХУК или ТФУК, наблюдаемое одновременное падение расщепления протонов ДХМ и сигналов F^{19} не дает возможности определить, происходит или не происходит какое-либо изменение жидкокристаллического состояния раствора. Дискриминация этих двух случаев может быть выполнена только при количественном анализе наблюдаемых расщеплений сигналов ЯМР. Таким образом, само изменение расщепления сигналов соответствующих ядер в спектрах ЯМР полимерных жидкокристаллических систем, содержащих как слабую, так и сильную кислоты, не может быть непосредственно сопо-

ставлено с изменением жидкокристаллического состояния раствора ПБГ с исследованием механизма взаимодействия соответствующих кислот с макромолекулой ПБГ. Такое исследование проведено нами с помощью метода ИК-спектров поглощения.

Как было показано нами ранее [8, 9], взаимодействие ТФУК и ДХУК с молекулами ПБГ в разбавленных растворах в области концентраций этих кислот, не приводящих к конформационному переходу, идет путем образования водородных связей между кислотой и С=О-связями пептидных групп в «дефектных» местах спирали и С=О-группами боковой цепи. Как видно из рис. 4, взаимодействие МХУК и ДФХУК с полипептидной цепью качественно идет по одному механизму: сопровождается образованием

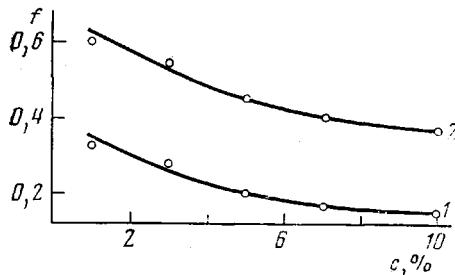


Рис. 5

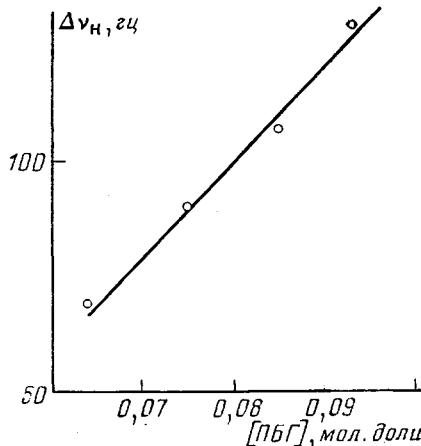


Рис. 6

Рис. 5. Зависимость доли связанный ДФХУК $f_{осн}^k$ (1) и f_6^k (2) от концентрации кислоты

Рис. 6. Зависимость равновесной величины расщепления протонов ДХМ от концентрации ПБГ в растворе

водородных связей как по С=О-связям пептидной группы, так и С=О-связью боковой цепи. Предположим, что основной вклад в расщепление сигналов ЯМР вносят молекулы кислот, включенные в водородную связь с полипептидной цепью. Тогда расщепление сигналов ЯМР Δv_k при данной концентрации кислоты в растворе может быть записано как

$$\Delta v_k = \Delta v_{осн}^0 f_{осн}^k + \Delta v_6^0 f_6^k, \quad (1)$$

где $\Delta v_{осн}^0$ и Δv_6^0 — предполагаемое расщепление сигналов ЯМР при полном связывании молекул кислоты с С=О-связью пептидной группы или С=О-связью боковой цепи, $f_{осн}^k$ и f_6^k — доля связанных молекул кислоты по этим центрам связывания при данной концентрации кислоты. $f_{осн}^k$ и f_6^k могут быть вычислены из оптических плотностей полос 1650 см^{-1} (амид I), 1630 см^{-1} (С=О амидной группы — OH кислоты) и 1730 см^{-1} (С=О эфирных групп боковой цепи) и 1715 см^{-1} (С=О эфирных групп — OH кислоты) (рис. 5). Значения $\Delta v_{осн}^0$ и Δv_6^0 могут быть вычислены при двух любых концентрациях кислоты в растворе из выражения (1) при известных значениях $f_{осн}^k$ и f_6^k . Эти значения для МХУК оказались равными: $\Delta v_{осн}^0 = 5000$, $\Delta v_6^0 = -2000$. На рис. 2 (кривая 4) представлены значения Δv_k , вычисленные для этих значений. Как видно, рассчитанные значения Δv_k для МХУК при различных ее содержаниях в растворе хорошо совпадают с экспериментально наблюдаемыми. На рис. 3 (кривая 2) приведена зависимость Δv_k ядер F¹⁹, полученная аналогичным образом. Значения $\Delta v_{осн}^0$ для этой кислоты равны 1500, а $\Delta v_6^0 = -900$. Как видно, вы-

численные значения $\Delta\nu_{\text{к}}$ ядер F¹⁹ и экспериментально найденные хорошо совпадают между собой. Отметим, что различие знаков $\Delta\nu_{\text{осн}}^0$ и $\Delta\nu_b^0$ связано с различным направлением C=O-групп основной и боковой цепи по отношению к магнитному полю спектрометра, что согласуется с геометрическим расположением этих групп по отношению к оси спирали. Следует отметить, что полученное из экспериментальных данных соотношение между значениями $\Delta\nu_{\text{осн}}^0$ для протонов МХУК и ядре F¹⁹, равное 3,3, находится в согласии с теоретическим значением 2,3, полученным из уравнения

$$\frac{\Delta\nu_{\text{H}}^0}{\Delta\nu_{\text{F}}^0} \simeq \frac{\mu_{\text{H}}}{\mu_{\text{F}}} \cdot \frac{r_{\text{F-F}}^3}{r_{\text{H-H}}^3}, \quad (2)$$

где μ_{H} и μ_{F} — магнитные моменты ядер водорода и фтора, $r_{\text{F-F}}$ ($r_{\text{H-H}}$) — расстояния между ядрами F¹⁹ (или протонами) в молекулах кислоты.

Таким образом, из приведенных данных видно, что увеличение содержания в растворе как слабой МХУК, так и сильной ДФХУК до концентраций, соответствующих еще упорядоченному состоянию полипептида, не приводит к каким-либо заметным изменениям жидкокристаллического порядка полимерного раствора. При неизменной степени ориентации молекулярных цепей в таких растворах своеобразие хода расщепления сигналов ЯМР от концентрации кислоты, а также различия, наблюдавшиеся для МХУК и ДФХУК, полностью определяются механизмом связывания этих кислот с молекулами полимера. Полное сохранение жидкокристаллического состояния в смешанном растворителе, содержащем денатурирующую кислоту (ДФХУК), указывает на то, что взаимодействие этой кислоты с полимерной цепью не приводит к структурным изменениям в ПБГ вплоть до концентраций ДФХУК, обеспечивающих переход полимера из упорядоченного в неупорядоченное состояние. Совпадение экспериментальных и расчетных данных по расщеплению соответствующих сигналов ядер МХУК и ДФХУК указывает на то, что основной вклад в расщепление этих сигналов вносят молекулы растворителя, непосредственно связанные с полипептидной цепью. Это означает, что ориентация молекул растворителя при ориентации жидкокристаллических доменов полимера, вероятно, в основном происходит только в непосредственной близости от полимерной цепи. Полученные результаты показывают, что применение в качестве критерия жидкокристаллического состояния хода и степени ориентации растворителя обязательно должно учитывать механизм его взаимодействия с полимерной цепью.

Данные по исследованию механизма взаимодействия полипептидной цепи с ДФХУК могут быть использованы для выяснения вопроса о строении жидкокристаллических полимерных доменов. Несмотря на то, что имеется известная зависимость между концентрацией полимера в растворе и величиной межплоскостного расстояния d [7], вопрос о распределении молекул растворителя и молекул полимера в жидкокристаллических полимерных доменах достаточно сложен. Так, в случае полипептидов хорошо известно явление агрегации их макромолекул даже в разбавленных растворах хлороформа.

В настоящей работе мы применили два способа оценки степени «равномерности» распределения молекул растворителя и полимера в жидкокристаллических растворах. Первый основан на зависимости величины расщепления сигналов протонов ДХМ в спектрах ЯМР от концентрации полимера в жидкокристаллическом состоянии. Если рассматривать полимерный жидкокристаллический раствор как равномерную смесь молекул полимера и растворителя, то увеличение концентрации полимера в растворе должно приводить к приблизительно пропорциональному увеличению расщепления сигналов ЯМР соответствующих ядер. Впервые данные по зависимости расщепления от концентрации были получены в работе [10].

Однако низкие абсолютные значения величины расщепления протонов ДХМ, приведенные в этой работе, а также немонотонный характер зависимости свидетельствуют, вероятно, о неравновесном растворении ПБГ. Для получения равновесных значений расщепления протонов ДХМ в жидкокристаллических системах ДХМ – ПБГ мы выдерживали исследуемые образцы 30 суток с периодическим вращением ампул. На рис. 6 приведена полученная нами зависимость расщепления протонов ДХМ в таких жидкокристаллических системах. Как видно, зависимость расщепления протонов ДХМ от концентрации ПБГ в жидкокристаллическом растворе прямолинейна, что может свидетельствовать о равномерном распределении молекул растворителя и молекул ПБГ в жидкокристаллических доменах. Второй способ оценки строения жидкокристаллических доменов основывался на исследовании доступности молекул кислоты ДФХУК и ТФУК к молекулам ПБГ. Как известно, предельное количество «дефектных» мест спиральных участков связано только с химическим строением полипептида. Именно на эти места происходит посадка молекул кислоты [8]. Мы исследовали предельную степень связывания «дефектных» мест спирали молекулами ТФУК, ДФХУК в зависимости от концентрации ПБГ в растворе. При всех концентрациях растворов ПБГ от разбавленных (1–3%) до концентрированных (12–24%), когда существует жидкокристаллическое состояние, предельная степень связывания с кислотой С=О-групп пептидных связей постоянная и равна ~20%. Учитывая, что жидкокристаллическое состояние в системах ПБГ – смешанных растворителях, содержащих кислоты ТФУК и ДФХУК, – не изменяется, полное связывание «дефектных» мест α -спирали ПБГ в жидкокристаллических растворах свидетельствует о полной «доступности» молекул растворителя к молекулам полимера. Это означает, что с достаточной степенью точности можно рассматривать жидкокристаллический полимерный домен как равномерную смесь молекул полимера и растворителя.

Институт высокомолекулярных соединений
АН СССР

Поступила в редакцию
25 VI 1976

ЛИТЕРАТУРА

1. G. D. Fasman, In Poly- α -amino Acids, N. Y., 1967, Ch. 2.
2. K. J. Liu, S. J. Lignowski, Biopolymers, 9, 739, 1970.
3. M. Panar, W. D. Phillips, J. Amer. Chem. Soc., 90, 3880, 1968.
4. P. Doty, J. H. Bradbury, A. M. Holtzer, J. Amer. Chem. Soc., 78, 947, 1956.
5. P. J. Flory, Proc. Roy. Soc., A234, 60, 1956.
6. P. Laszlo, A. Paris, E. Marchal, J. Phys. Chem., 77, 2925, 1973.
7. A. V. Tobolsky, In Liquid Crystals, N. Y., 1970, p. 2.
8. Б. З. Волчек, А. В. Пуркина, Высокомолек. соед., A14, 551, 1972.
9. Б. З. Волчек, А. В. Пуркина, Высокомолек. соед., A11, 1563, 1969.
10. S. Sobajima, J. Phys. Soc. Japan, 23, 1070, 1967.