

ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ

Том (A) XXI

СОЕДИНЕНИЯ

№ 12

1979

УДК 541(64+183.12):539.199

ОСОБЕННОСТИ КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЯ И КОНФОРМАЦИОННЫХ ПРЕВРАЩЕНИЙ МАКРОМОЛЕКУЛ ПОЛИ-Н-ВИНИЛЛАКТАМОВ В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ

*Кириш Ю.Э., Сусъ Т.А., Карапутадзе Т.М., Кобяков В.В.,
Синицина Л.А., Островский С.А.*

При изучении комплексообразования поливинилкапролактама и поливинилпирролидона с флуоресцентным соединением 1-анилинонафталин-8-сульфонатом магния в водном растворе показано, что с увеличением температуры для поливинилкапролактама происходит уменьшение константы диссоциации полимерных комплексов от отличие от поливинилпирролидона, для которого наблюдается ее увеличение. Предложено объяснение этому различию. Изучено локальное окружение и доступность для соударений флуорофора в комплексе с макромолекулами полимеров.

Для выяснения механизмов связывания малых молекул полимерными молекулами в водных растворах необходимо установление связи между комплексообразующей способностью и конформационными изменениями макромолекулы. Известно, что конформационные превращения гибких цепей существенно отражаются на ряде физико-химических свойств, в частности на вязкости [1], кислотно-основных свойствах функциональных групп цепи [1—4] и сорбционных эффектах [4, 5].

Особый интерес для развития этого направления представляет исследование макромолекул, способных к конформационным превращениям от рыхлого статистического клубка к более компактному клубку в водном растворе и изменяющих при этом комплексообразующую способность.

В данной работе проведено изучение влияния различных факторов (температура, природа растворителя) на конформационные изменения макромолекул поливинилпирролидона (ПВП) и поливинилкапролактама (ПВК) и их сорбционные свойства. Сделана попытка оценить локальное окружение флуоресцентного соединения 1-анилинонафталин-8-сульфоната магния в комплексе с этими макромолекулами в водном растворе.

Мономеры. Для полимеризации использовали N-винилпирролидон, перегнанный при 86° при 8 *тор*, $n_D^{25} = 1,5120$. Синтез N-винилкапролактама осуществляли реакцией ацетилена с капролактамом при температуре 135—140° в автоклаве [6]. В качестве катализатора использовали калиевую соль капролактама (5 вес. %). Реакцию проводили в течение 2—3 час. Выход N-винилкапролактама после перегонки при 81—83° и 1,5 *тор* составляет 50—55 %. Содержание основного вещества в мономере, определенное методом ГЖХ (ЛХМ-8), 98 %.

Полимеры ПВП и ПВК получали радикальной полимеризацией соответствующих мономеров в изобутаноле в присутствии азо-бис-изобутиронитрила при 60°. Получение полимеров с различной молекулярной массой достигалось путем варьирования концентрации мономера в изобутаноле, который выступает в качестве передатчика цепи [7].

Выделение фракций ПВП производили гель-хроматографическим способом, как описано в работе [8]. Использовали фракцию ПВП с $M_n = 50 \cdot 10^3$. Характеристическую вязкость ПВК измеряли с помощью вискозиметра Уббелоде. Спектры флуоресценции используемого флуорофора — 1-анилинонафталин-8-сульфоната магния (АНС) — определяли с помощью спектрофлуориметра «Aminco» с термостатированными кюветами. Время жизни возбужденного состояния флуорофора в комплексе с ПВП устанавливали на импульсном флуориметре, сконструированном на кафедре химической кинетики химического факультета МГУ.

Комплексообразование. Ранее было показано [9], что флуоресцентная метка АНС образует комплекс с ПВП и в этом комплексе имеет повышенную интенсивность флуоресценции $I_{\text{фл}}$ по сравнению с флуоресценцией метки в основном из-за частичной ее дегидратации. Известно, что флуоресценция указанного и подобных соединений чувствительна в наибольшей степени к водному окружению, чем к изменению диэлектрической проницаемости среды, и резко увеличивается при их переносе в дегидратирован-

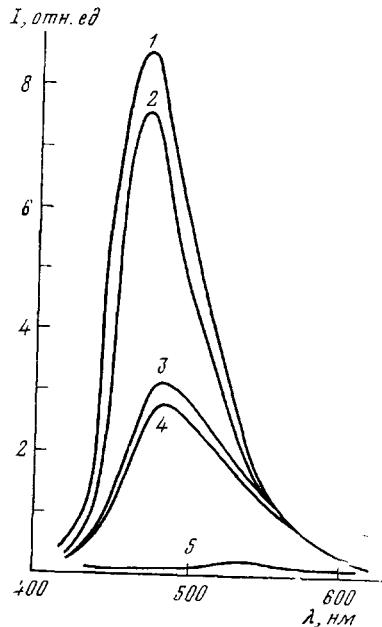


Рис. 1

Рис. 1. Спектры флуоресценции АНС в присутствии ПВК (1, 2) и ПВП (3, 4) при температуре 19° (2, 3) и 33° (1, 4), в отсутствие полимеров (5). Условия измерения: [ПВП]=[ПВК]= $5 \cdot 10^{-2}$ моль/л, [АНС]= 10^{-5} моль/л, $\lambda_{\text{возб}}=365$ нм

Рис. 2. Влияние температуры на характеристическую вязкость водных растворов ПВК (1) и ПВП (2) и интенсивность флуоресценции АНС в присутствии ПВК (1') и ПВП (2'). Условия измерения: [ПВП]=[ПВК]= $5 \cdot 10^{-3}$ моль/л, [АНС]= 10^{-5} моль/л

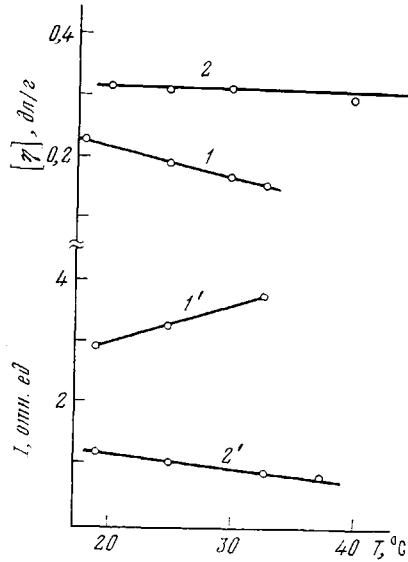


Рис. 2

ванные области белков [10, 11], ферментов [12], мембран [13, 14] и в органические растворители [15, 16].

На рис. 1 представлены спектры флуоресценции АНС при введении в водный раствор одинакового количества ПВП и ПВК в интервале температур 25—33°. Видно, что добавление ПВК в значительно большей степени, чем ПВП, увеличивает $I_{\text{фл}}$, а также приводит к большему смещению максимума флуоресценции (от 510 нм для свободного флуорофора до 470 нм в комплексе), чем ПВП ($\lambda_{\text{макс}}=480$ нм).

Другая особенность изменения $I_{\text{фл}}$ комплексов для разных полимеров (рис. 1 и 2) заключается в том, что с увеличением температуры $I_{\text{фл}}$ падает для ПВП и возрастает для ПВК. Поскольку $I_{\text{фл}}$ АНС в комплексе значительно больше $I_{\text{фл}}$ свободного флуорофора, то наблюдаемые эффекты с температурой можно связать с изменением их комплексообразующей способности. Ниже приведены эффективные константы диссоциации $K_{\text{дис}}$ для полимеров при различных температурах.

$T, ^\circ\text{C}$	25	27	30	33
$K_{\text{дис}} \cdot 10^3$ ПВП	4,00	4,13	4,25	4,70
$K_{\text{дис}} \cdot 10^3$ ПВК	1,50	1,42	1,28	1,08

Они рассчитаны из данных по интенсивности флуоресценции при варьировании концентрации полимера и постоянной концентрации флуорофора по уравнению $I_{\text{макс}}/I_{\text{набл}} = 1 + K_{\text{дис}}/c$, где c — концентрация полимера, $I_{\text{набл}}$ — наблюдаемая интенсивность флуоресценции при соответствующей концентрации полимера, $I_{\text{макс}}$ — максимальная интенсивность флуоресценции АНС, полностью связанного в комплекс. $K_{\text{дис}}$ для ПВК уменьшается с повышением температуры, т. е. связывание растет; в случае ПВП она увеличивается при тех же условиях, т. е. связывание ухудшается.

Таким образом, увеличение $I_{\text{фл}}$ для ПВК с ростом температуры (рис. 1 и 2) определяется увеличением числа комплексов на макромолекуле. В то

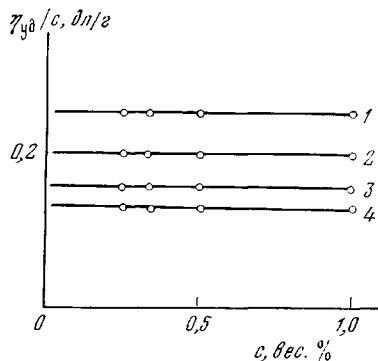


Рис. 3. Влияние температуры на приведенную вязкость ПВК при 19 (1), 25 (2), 30 (3) и 33° (4)

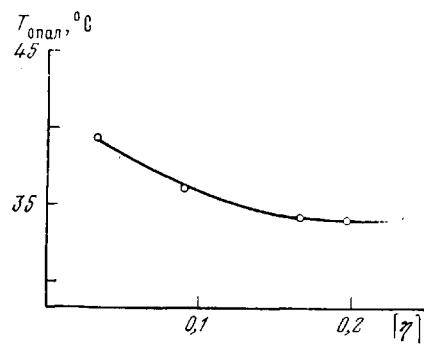


Рис. 4. Зависимость температуры опалесценции растворов ПВК от их характеристической вязкости $[\eta]$, $[PVC] = 5 \cdot 10^{-2} \text{ моль/л}$

же время эти результаты свидетельствуют о существовании различных механизмов комплексообразования для исследуемых макромолекул, приводящих к противоположным эффектам в связывании АНС при изменении температуры раствора.

Для того чтобы выявить факторы, вызывающие усиление связывания малых молекул макромолекулами ПВК с повышением температуры, были изучены конформационные превращения макромолекулы при различных температурах.

Конформационные превращения ПВК. На рис. 2 отражено изменение характеристической вязкости $[\eta]$ полимеров по мере повышения температуры от 15 до 33°. Видно, что нагревание раствора, которое слабо влияет на гидродинамическое состояние макромолекул ПВП, заметно снижает вязкость ПВК. Величина $[\eta]$ для одного из изученных образцов падает от 0,25 до 0,16 дЛ/г при увеличении температуры всего на 15° (от 18 до 33°). Важно отметить, что приведенная вязкость ПВК при различных концентрациях полимера в растворе в интервале используемых температур не изменяется, указывая на внутримакромолекулярный характер сжатия клубка (рис. 3).

Следовательно, усиление комплексообразующего свойства ПВК коррелирует с уменьшением значения $[\eta]$, т. е. с уплотнением его клубка (рис. 2). Чем плотнее становится клубок, тем сильнее связываются малые молекулы в нем.

Далее следует остановиться на другом интересном свойстве водных растворов, характеризующем специфику конформационного состояния макромолекулы ПВК. Обнаружено, что нагревание раствора ПВК с $[\eta] = 0,20 \text{ дL/g}$ (1%-ный раствор) до 34° не влияет на мутность раствора (он остается прозрачным и гомогенным). При температуре 34,5° ($T_{\text{опал}}$) в растворе возникает опалесценция, т. е. происходит выделение полимера в отдельную фазу. В то же время нагревание раствора ПВП с $M_n = 50 \cdot 10^3$ до

температуры кипения воды (100°) не приводит к таким изменениям в растворе. При охлаждении ниже 34° раствор ПВК снова становится гомогенным. Такие переходы обнаружены для водных растворов синтетических полипептидов: поли-*L*-пролина ($T_{\text{опал}}=45^\circ$) и поли-*L*-оксипролина ($T_{\text{опал}}=90^\circ$), содержащих пятичленное кольцо [17]. Молекулярная масса ПВК влияет на $T_{\text{опал}}$ раствора (рис. 4). В области высоких ММ, т. е. в интерва-

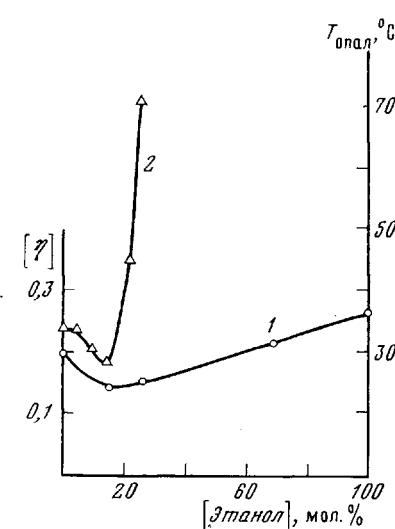


Рис. 5

Рис. 5. Влияние состава смеси вода – этанол на характеристическую вязкость $[\eta]$ (1) и температуру опалесценции (2) ПВК. Условия измерения: 25° , $[\text{ПВК}] = 1 \text{ г}/\text{дл}$, $M_n = 27 \cdot 10^3$.

Рис. 6. Влияние состава смеси вода – α -метилпирролидон на относительное увеличение интенсивности в максимуме флуоресценции АНС к интенсивности флуоресценции АНС в чистой воде (1) и смещение длины волны максимума флуоресценции (2). Условия измерения: 25° , $[\text{АНС}] = 10^{-5} \text{ моль}/\text{л}$

Рис. 7. Влияние концентрации тушителя КІ на интенсивность флуоресценции АНС в комплексе с ПВК (1) и ПВП (2). Условия измерения: 25° , $[\text{АНС}] = 10^{-5} \text{ моль}/\text{л}$, $[\text{ПВК}] = [\text{ПВП}] = 5 \cdot 10^{-2} \text{ моль}/\text{л}$

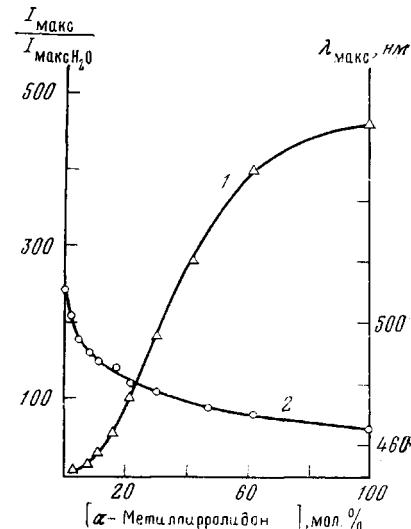


Рис. 6

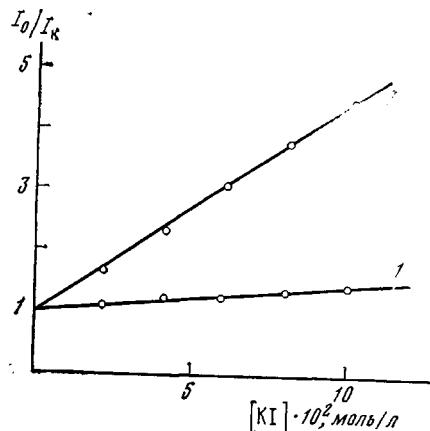


Рис. 7

ле $[\eta]$ от 0,17 до 0,24 $\text{дл}/\text{г}$, она практически не зависит от ММ и начинает возрастать при уменьшении молекулярной массы полимера со значениями $[\eta] < 0,17$. Независимость $T_{\text{опал}}$ от ММ в области высоких значений свидетельствует о существенной роли предшествующих выпадению внутримакромолекулярных локальных конформационных превращений в клубке макромолекулы. Последующее осаждение при нагревании обусловлено межмолекулярными гидрофобными взаимодействиями неполярных групп уплотненных макромолекул.

Действительно, добавление этанола, разрушающего эти взаимодействия, резко повышает $T_{\text{опал}}$. Этот эффект наблюдается после того, как содержание этанола достигает 20 мол. % (рис. 5). Примечательно, что увеличение $T_{\text{опал}}$ на 40° (от 30 до 70°) происходит в указанном интервале состава смеси (от 20 до 25 мол. %).

Следует обратить внимание на появление минимума на зависимостях $[\eta]$ и $T_{\text{опал}}$ от состава растворителя. Он наблюдается при содержании этанола 14 мол.%. При таком составе растворителя происходит падение как $[\eta]$, так и $T_{\text{опал}}$ по сравнению с чистой водой. Из этого следует, что клубок в смеси становится более свернутым, чем в воде и этаноле (рис. 5) и более чувствительным к межмолекулярным взаимодействиям, вероятно, из-за изменения растворяющей способности смеси. Именно при этом составе обнаружены особенности растворения большого числа неорганических солей [18], которые объясняются максимальной стабилизацией структуры воды, образующей единый каркас с молекулами спирта. Другими словами, в нашем случае происходит частичная десольватация полимерной цепи при содержании этанола в водном растворе 14 мол.% и усиление внутримакромолекулярных взаимодействий, приводящее к сжатию клубка. Дальнейшее добавление этанола приводит к монотонному увеличению $[\eta]$ и соответственно сольватного слоя вблизи цепи ПВК, включающего все большее число молекул этанола.

Таким образом, сравнительное исследование комплексообразования и конформационных изменений макромолекул ПВП и ПВК показало, что присутствие двух метиленовых групп в семичленном кольце звена ПВК по сравнению с пятичленным звеном ПВП является основным фактором, вызывающим значительные различия в поведении двух макромолекул. Подобного рода эффекты установлены также для полимеров другого строения, различающихся лишь метильной группой, на примере полиметакриловой и полиакриловой кислот [2–5].

Мы полагаем, что выявление таких факторов, которые изменяют конформационные состояния синтетических макромолекул (переход от статистического к более компактному клубку и далее – к глобулярному состоянию, сходному с состоянием биополимеров в водном растворе) представляет значительный интерес в плане конструирования моделей белков и ферментов. В результате сворачивания клубка можно осуществить конформационное сближение функциональных групп и создать области с адсорбционной активностью.

Локальное окружение малой молекулы в полимере. Рассмотрим механизм образования комплекса малой молекулы с гибкой цепью в растворе. Молекула, попадая в область с повышенной локальной концентрацией звеньев вблизи цепи [19], образует комплекс, в котором участвует ~10–12 звеньев в случае ПВП для ароматических соединений [20] и для АНС [8]. Эти звенья окружают малую молекулу, изменяя ее гидратное состояние.

На примере исследуемых макромолекул ПВП и ПВК удается оценить окружение из звеньев и молекул воды и время жизни указанных образований.

С этой целью были измерены $I_{\text{фл}}$ АНС в растворе, состоящем из 2-метилпирролидона и H_2O и моделирующим окружение флуорофора на цепи поливиниллактамов. Были установлены зависимость отношения $I_{\text{фл}}$ в максимуме флуоресценции к $I_{\text{фл}}$ АНС в воде и изменение $\lambda_{\text{макс}}$ флуоресценции от состава смеси 2-метилпирролидон : H_2O (рис. 6). Из сравнения этих данных, а также данных, полученных для комплексов ПВК – АНС и ПВП – АНС ($I_{\text{макс}}/I_{\text{фл АНС}} \approx 170$ и 70; $\lambda_{\text{макс}} = 470$ и 480 нм соответственно) было оценено количество молекул воды на одно звено, окружающее флуорофор в комплексе ($N_{\text{H}_2\text{O}} \approx 2$ для ПВК и ≈ 5 для ПВП). Тогда среднее число молекул воды в образовании из ~10 звеньев, окружающее молекулу флуорофора в комплексе, составит ~20 молекул для ПВК и ~50 для ПВП. Полученные оценки подтверждают тот факт, что комплекс с ПВК менее гидратирован и более компактен, чем комплекс ПВП – АНС.

О значительном различии в компактности этих образований свидетельствуют данные по тушению флуоресценции АНС в комплексе с полимерами низкомолекулярным тушителем. Обнаружено, что добавление в раствор

вор КІ, анион которого выступает в качестве тушителя, уменьшает более значительно $I_{\text{фл}}$ флуорофора в комплексе с ПВП по сравнению с ПВК (рис. 7). По известному уравнению Штерна — Фольмера $I_0/I_t = 1 + K_t \cdot [T]$, где $[T]$ — концентрация тушителя, была рассчитана константа K_t . Найдено, что K_t составляет 35 M^{-1} для ПВК и $4,2 \text{ M}^{-1}$ для ПВП (рис. 7).

Поскольку $K_t = k_d \cdot \tau_0$ (k_d — константа скорости бимолекулярных столкновений, τ_0 — время жизни возбужденного состояния в отсутствии тушителя), зная времена жизни τ_0 для АНС в комплексах с полимерами и k_d , можно рассчитать константу Штерна — Фольмера K'_t для случая, когда флуорофор связан с цепью, например, ковалентно, и доступен для столкновения. В этом случае k_d в ~ 2 раза меньше диффузионной константы [21] для нашего случая и составляет $\sim 4 \cdot 10^9 \text{ м}^{-1} \cdot \text{сек}^{-1}$ (25° , $\eta_{\text{раств}} = 1 \text{ cP/аз}$). Значение τ_0 для ПВП — АНС в воде, измеренное на импульсном флуориметре, равно $3,6 \text{ нсек}$. Для ПВК — АНС использовали значение $\tau_0 \approx 7,0 \text{ нсек}$, установленное для АНС в белках и линидах, для которых, как и для ПВК, наблюдается также смещение $\lambda_{\text{макс}}$ (470 нм) и практически такое же возрастание интенсивности (~ 20 раз) [10, 13]. Рассчитанные значения констант $K'_t = 15 \text{ M}^{-1}$ для ПВП и 30 M^{-1} для ПВК.

Сравнивая опытные значения K_t и рассчитанные K'_t для случая диффузионного столкновения молекулы тушителя со звеном-флуорофором цепи, следует отметить, что K_t в 2 раза выше K'_t для ПВП и в 7 раз меньше K'_t для ПВК. Последний эффект может возникнуть лишь в том случае, когда молекулы АНС, включенные в образования из звеньев ПВК, становятся недоступными в течение времени жизни возбужденного состояния, не сталкиваясь с молекулами тушителя. Другими словами, такой комплекс «живет» не менее 7 нсек . Превышение величины K_t , полученной из экспериментальных данных, над K'_t , рассчитанной для случая динамического тушения флуоресценции флуорофора, связанного с цепью малой молекулой — тушителем, равномерно распределенным в растворе, свидетельствует о повышенной локальной концентрации анионов Γ^- вблизи цепи.

Для макромолекулы ПВП обнаруживается повышенная эффективность тушения по сравнению с комплексом ПВК.

Таким образом, механизм комплексообразования гибкой цепи с малыми молекулами на примере поливиниллактамов и исследуемого флуорофора можно представить следующим образом. В процессе связывания за счет ион-дипольных и гидрофобных сил возникают образования из звеньев цепи, включающие сорбированные малые молекулы. Этот процесс сопровождается вытеснением молекул H_2O из гидратных слоев малой молекулы и звеньев. Сравнительное изучение особенностей комплексообразования и конформационных превращений макромолекул ПВК и ПВП позволяет заключить, что характер этих локальных образований на цепи, время их жизни, число молекул воды в образованиях, доступность для столкновений определяются в основном внутримакромолекулярными взаимодействиями звеньев.

Всесоюзный научно-исследовательский
институт технологии кровезаменителей
и гормональных препаратов

Институт органической химии
АН СССР

Поступила в редакцию
3 XI 1979

ЛИТЕРАТУРА

1. Г. Моравец, Макромолекулы в растворе, «Мир», 1967.
2. Y. C. Leyte, M. Mandel, J. Polymer Sci., A2, 1879, 1969.
3. Т. М. Бирштейн, Е. В. Ануфриева, Т. Н. Некрасова, О. Б. Птицын, Т. В. Шевелева, Высокомолек. соед., 7, 372, 1965.
4. Е. В. Ануфриева, Т. М. Бирштейн, Т. Н. Некрасова, О. Б. Птицын, Т. В. Шевелева, J. Polymer Sci., C16, 372, 1965.
5. F. E. Trelor, Chimica Scripta, 10, 219, 1976.

6. Н. Ф. Кононов, С. А. Островский, Л. А. Устинюк, Новая технология некоторых синтезов на основе ацетилена, «Наука», 1972.
7. Х. С. Баэдасарьян, Теория радикальной полимеризации, Изд-во АН СССР, 1959.
8. Ю. Э. Кирш, Т. А. Сусь, Т. М. Карапутадзе, Высокомолек. соед., А19, 2774, 1977.
9. Ю. Э. Кирш, Т. А. Сусь, В. В. Кобяков, В. П. Панов, Высокомолек. соед., А18, 388, 1976.
10. G. Weber, L. B. Yong, J. Biol. Chem., 239, 1415, 1964.
11. C. W. Parker, C. K. Osterland, Biochemistry, 9, 1074, 1970.
12. D. P. Blozham, Biochemistry, 12, 1602, 1973.
13. Y. Tasaki, E. Carbone, K. Siseo, Y. Singer, Biochem. Biophys. Acta, 323, 220, 1973.
14. J. Yguerabide, L. Stryer, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 68, 1217, 1971.
15. G. R. Penzer, Europ. J. Biochem., 25, 218, 1972.
16. O. Takenake, J. Nishimura, A. Takenaka, K. Shibata, Biochem. Biophys. Acta, 207, 1, 1970.
17. D. S. Crark, J. J. Dechter, L. Mandelkern, Biopolymers, 17, 1381, 1978.
18. К. П. Мищенко, Г. М. Полтарацкий, Вопросы термодинамики и строения водных и неводных растворов электролитов, «Химия», 1968, стр. 250.
19. Ю. Я. Готлиб, Н. Р. Павлова, Ю. Э. Кирш, В. А. Кабанов, Высокомолек. соед., А19, 1150, 1977.
20. P. Molynex, H. P. Frank, J. Amer. Chem. Soc., 83, 3169, 1961.
21. Ю. Э. Кирш, Н. Р. Павлова, В. А. Кабанов, Europ. Polymer J., 11, 495, 1975.

PECULIARITIES OF THE COMPLEXES FORMATION
AND CONFORMATIONAL TRANSITIONS OF POLY-N-VINYLLACTAMS
IN AQUEOUS SOLUTIONS

*Kirsh Yu. E., Sus' T. A., Karaputadze T. M., Kobyakov V. V.,
Sinttina L. A., Ostrovskii S. A.*

Summary

The formation of the complex of polyvinylcaprolactam and polyvinylpyrrolidone with fluorescent magnesium 1-anilinenaphthalene-8-sulfonate in aqueous solution has been studied. It was shown, that for polyvinylcaprolactam the increase of the temperature resulted in the decrease of the dissociation constant of polymer complexes, while for polyvinylpyrrolidone the constant was increased. The explanation of this fact was proposed. The nearest environment and the accessibility for the impacts of fluorophore in a complex with macromolecules of polymers under consideration were studied.
