

УДК 541.64:532.77

**ИЗМЕНЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА ТИТРУЕМЫХ SH-ГРУПП
В ТИОЛПРОИЗВОДНОМ ПОЛИАКРИЛАМИДЕ
ПРИ ЗАМОРАЖИВАНИИ ЕГО ВОДНЫХ РАСТВОРОВ**

**Лозинский В. И., Головина Т. О., Вайнерман Е. С.,
Рогожин С. В.**

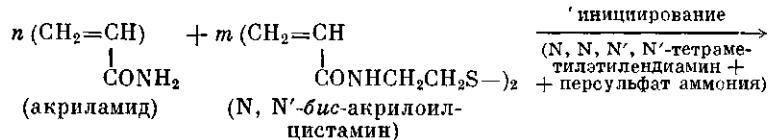
Изучена динамика изменения количества титруемых SH-групп в тиолпропизводном поликарбамиде в ходе замораживания его водных растворов при различных отрицательных температурах. В результате криогенной обработки формируются пространственно сплитые гелевые структуры (криогели), а количество титруемых SH-групп полимера уменьшается с увеличением длительности криоструктурирования. Зависимость скорости процесса от температуры имеет экстремальный характер с максимумом в области -15° .

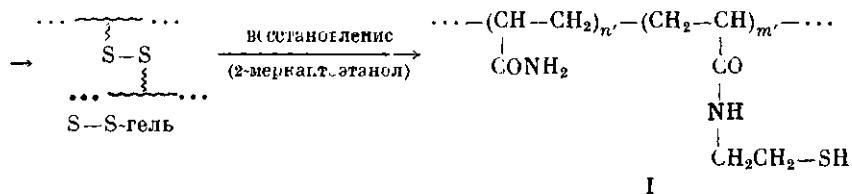
Ранее было показано [1–3], что в результате неглубокого замораживания водных растворов поликарбамида (ПАА), содержащего привитые остатки SH-аминокислоты – цистеина, происходит формирование пространственно сплитых гелевых структур, тогда как при комнатных температурах тот же раствор SH-полимера оставался жидким. Полученные после оттаивания гели (названные криогелями) можно было вновь растворить добавлением восстановливающих агентов типа 2-меркаптоэтанола или NaBH₄. Однако криогели не образовывались, если подвергаемый криогенной обработке исходный раствор был дезаэрирован или же содержал некоторое количество восстановителя. На основании этих экспериментальных данных был сделан вывод о том, что причиной гелеобразования при замораживании-оттаивании данной системы растворитель – полимер являлся окисление тиольных групп высокомолекулярного соединения растворенным в воде кислородом воздуха с замыканием межмолекулярных дисульфидных мостиков, выполняющих роль узлов сетки ковалентно спицового геля [1].

Поскольку подобное криогенное структурирование свойственно многим белковым системам, например растворам тиолсодержащих ферментов [4], растворам и пастам миофibrillлярных белков [5, 6] (а это в свою очередь приводит к значительным изменениям их энзиматической активности или функциональных свойств пищевых белков), изучение более простых, чем белки, модельных полимерных систем позволяет установить на их примере и проследить многие закономерности процессов криоструктурирования тиолсодержащих высокомолекулярных соединений.

Цель настоящей работы – исследование изменения содержания тиольных групп у такого модельного полимера (SH-производного ПАА) в ходе замораживания его водных растворов при различных отрицательных температурах вплоть до -30° .

Для выполнения экспериментов был получен водорастворимый SH-полимер, синтез которого представлен схемой





Данная схема синтеза базируется на методике, предложенной в работе [7] для формирования так называемых солюбилизируемых ПАА гелей, которые применяются при определенных видах электрофореза белков или нуклеиновых кислот.

Без дополнительной очистки в работе использовали следующие реагенты: акриламид; N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин и персульфат аммония (все фирмы «Sergva», ФРГ); N,N'-бис-акрилоилцистамин («Pierce», США); 2-меркаптоэтанол («Ferak», Зап. Берлин); 2,2'-диширилдисульфид («Fluka», Швейцария). Иодоцетамид («Calbiochem», США) был трижды перекристаллизован из сухого гептана.

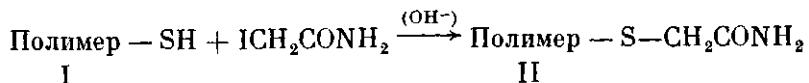
Синтез SH-полимера проводили следующим образом: смесь 998 мг акриламида в 12 мг N,N-бис-акрилоилцистамина растворяли при 50–60° в 7 мл перегнанной в токе аргона бидистиллированной воды, охлаждали раствор до комнатной температуры, прибавляли 0,39 мл N,N,N',N'-тетраметилстилендиамина, доводили объем водой до 9,9 мл и прибавляли 0,1 мл 5%-ного водного раствора персульфата аммония. Реакционную массу после перемешивания выдерживали 30 мин при комнатной температуре, а затем добавляли к образовавшемуся S–S-гелю 1,0 мл 2-меркаптоэтанола. Через 30 мин получившийся вязкий раствор полимера разбавляли в 5 раз водой и пропускали через хроматографическую колонку, заполненную 1 л молекулярно-ситового носителя «Sephadex G-25 (coarse)» («Pharmacia Fine Chemicals», Швеция), уравновешенного дезаэрированным водным 0,05 м. раствором уксусной кислоты. После отделения низкомолекулярных примесей и избытка восстановителя гель-фильтрацией раствор полимера I замораживали в жидком азоте и высушивали лиофильно. Выход целевого продукта обычно составлял 0,45–0,55 г; содержание SH-групп около 40 мкмоль на 1 г сухого полимера.

Для вискозиметрических измерений получали S-карбоксиамидированное производное (II) обработкой полимера I 40-кратным мольным избытком иодацетамида в среде 0,05 м. Na-фосфатного буфера (рН 8,3) при комнатной температуре в течение 1 ч по методике, используемой для аналогичной модификации SH-групп белков [8]. Полимер II обессоливали диализом через целлофановую мембрану против диеанизированной воды и высушивали лиофильно. В полученном препарате SH-группы не детектируются, что свидетельствует об исчерпывающем их блокировании. Характеристическую вязкость полимера II определяли с помощью капиллярного вискозиметра Убеледе в среде 1 м. водного раствора NaNO₃ при 25°. Вязкость водных растворов II измеряли с помощью реовискозиметра Хеппнера также при 25°.

Титрование SH-групп в полимере I и его гелях проводили с помощью 2,2'-дипиридилидисульфида [9] согласно методике, описанной для SH-сорбентов [10]. Фотометрический анализ осуществляли на спектрофотометре СФ-26 (СССР) при 343 нм; значение коэффициента мольной экстинкции для 2-тиоцирпиона — 8080 [11].

Процесс криоструктурирования изучали при замораживании 2%-ных водных растворов I, причем эти растворы готовили на 0,01%-ном Na-карбонатном буфере (pH 7,5), предварительно уравновешенном в течение 1 сут с воздушной средой, что обеспечивало концентрацию растворенного кислорода в жидкости при 25° порядка 0,04 г/л [12] или 1,25 мкмоль/мл. Для замораживания образцов использовали ультракриостат MK-70 (MLW, ГДР), в камеру которого помещали плотно закупоренные стеклянные флаконы, содержащие по 1 мл раствора полимера I; контрольные образцы выдерживали необходимое время в воздушном термостате при 25°. Через определенные интервалы времени замороженные препараты быстро отогревали до 10–12° и в них определялось содержание тиольных функций (скорость повышения температуры 15 град/мин); предварительно было показано, что в этих условиях за время размораживания не происходит заметного изменения SH-титра полимера. Контрольные образцы титровали через такие же промежутки времени, что и подвергаемые криогенной обработке.

Поскольку в литературе имеются указания [13, 14] на возможность механодеструкции полимерных цепей в результате замораживания-оттаивания растворов ряда полимеров, необходимо было выяснить, имеют ли место подобные процессы криолиза в изучаемой нами системе. Чтобы исключить мешающее влияние реакционноспособных тиольных группировок, они были блокированы алкилированием с помощью иодацетамида



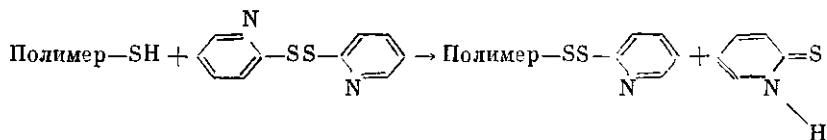
Расчет показывает, что при содержании сульфидрильных функций в полимере I около 40 мкмоль/г одна SH-группа приходится на 350 акрил-

амидных звеньев, поэтому после S-карбоксиамидирования SH-полимера модифицированный полимер II по ММ практически не изменяется в сравнении с полимером I, а по свойствам (из-за незначительного содержания звеньев второго сомономера и близкой химической природы боковых остатков после блокирования SH-групп) не должен заметно отличаться от обычного ПАА. Исходя из этих соображений и на основании данных вискозиметрии можно приблизительно оценить величину M_n полученного полимера, использовав известные из литературы [15] для линейного ПАА значения коэффициентов K и α в уравнении Марка – Куна – Хаувиника

$$[\eta] = 0,631 \cdot 10^{-3} \bar{M}_n^{0,80} \text{ (м}^3/\text{кг)}$$

Синтезированный полимер II имел $\bar{M}_n \approx 3,2 \cdot 10^5$, и ее значение практически не изменялось после замораживания 2%-ного водного раствора этого полимера, его выдерживания в замороженном состоянии в течение 1–48 ч и последующего оттаивания. Значения $[\eta]$ до замораживания и после размораживания были соответственно $0,161 \pm 0,003$ и $0,159 \pm 0,003 \text{ м}^3/\text{кг}$, а вязкость 2%-ного водного раствора полимера II до и после криогенной обработки равнялась $(8,53 \pm 0,02)$ мПа·с (образования гелевых структур на основе растворов S-карбоксиамидированного полимера при замораживании-оттаивании не происходит – система остается жидкой). Иными словами, при однократном замораживании при $-(10 - 30)^\circ$ раствора полимера II деструкции его цепей в сколько-нибудь заметной степени не наблюдается. Очевидно, что аналогичный вывод об отсутствии криолиза макромолекул можно сделать и по отношению к карбоцепному каркасу SH-полимера I.

Фотометрическое титрование сульфидильных группировок соответствующего полимера и его гелья основано на определении количества 2-тиопиридона, переходящего в раствор при взаимодействии 2,2'-дипиридилдисульфида с SH-производным



Поскольку от партии к партии полимер I имел несколько различное ($40 \pm 5 \text{ мкмоль/г}$) содержание SH-групп, для построения кинетических кривых и их соотнесения использовали не абсолютные значения SH-титров, а относительную величину – процент титруемых SH-групп по сравнению с их исходным содержанием в растворе конкретного образца полимера I.

На рис. 1 приведены характерные кривые динамики изменения количества титруемых сульфидильных функций в SH-полимере за время выдерживания его 2%-ных водных растворов при 25° , при -5° (когда из-за эффектов переохлаждения раствор не замерзал, оставаясь жидким на протяжении всего времени эксперимента) и в замороженном состоянии при -15° .

Видно, что при этих трех температурах с наибольшей скоростью процесс окисления SH-групп протекает не при самой высокой температуре в жидкой среде, а в замороженной системе на 40° ниже комнатной температуры. И если просто охлаждение раствора без замораживания приводит к вполне естественному падению скорости реакции, то замерзание реакционной массы резко повышает интенсивность процесса.

Как известно [16], одной из основных причин ускорения химических реакций в замороженных многокомпонентных растворах является концентрирование веществ в остающихся незамершими областях системы при кристаллизации большей части чистого растворителя (вымораживание растворителя). В рассматриваемом случае, кроме того, по мере охлаждения образца увеличивается растворимость в нем газов, т. е. концентрация

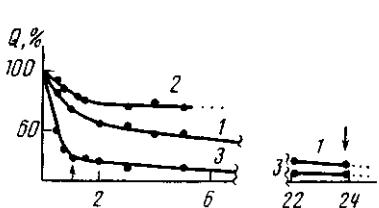


Рис. 1

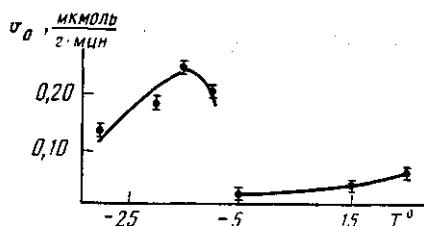


Рис. 2

Рис. 1. Кривые динамики изменения количества Q титруемых SH-групп полимера I во время выдерживания его 2%-ного водного раствора при 25 (1), -5 (2) и -15° (3). Стрелками указаны моменты появления гелевой фазы

Рис. 2. Зависимость начальной скорости изменения SH-титра полимера I от температуры процесса

кислорода (окислителя тиольных групп) возрастает еще и по этой причине¹.

При криоструктурировании эффекты концентрирования реагентов приводят также к кажущемуся снижению критических концентраций гелеобразования [3], поэтому криогели получаются при концентрациях исходных растворов гелеобразователей меньших и часто (в определенном диапазоне температур) гель-точка достигается значительно быстрее, чем в среде незамороженного жидкого растворителя. Так, в изучаемом случае гелевую fazу можно было наблюдать гораздо раньше в ходе криогенной обработки (через ~ 60 мин, показано стрелкой на соответствующей кривой рис. 1), чем при комнатной температуре (через 1 сут, также показано стрелкой), а при -5° за время опыта гель не образовался вовсе. Однако поскольку и при 25° , и при -5° SH-титр полимера I заметно снижается и без гелеобразования, можно предположить, что в жидкой среде превалируют процессы внутримолекулярного образования дисульфидных группировок и, возможно, формирования микрогелевой фракции, о чем, в частности, свидетельствует помутнение растворов полимера I в процессе их длительного выдерживания без замораживания, но при этом потеря текучести не происходит, т. е. блок геля во всем объеме образца на этих стадиях еще не образуется. Напротив, в замороженной системе за счет эффектов концентрирования межмолекулярные контакты усиливаются, поэтому криогель образуется намного быстрее.

Дальнейшие исследования показали, что зависимость скорости изменения SH-титра полимера I от температуры замораживания носит экстремальный характер с максимумом в области -15° . На рис. 2 показана такая зависимость скорости процесса (для начального прямолинейного участка кинетической кривой) от температуры криоструктурирования. Экстремальный характер указанной зависимости известен для криохимических реакций низкомолекулярных веществ, когда продуктами этих реакций были низкомолекулярные соединения [16], а также для криополимеризации винильных мономеров в среде замороженного растворителя, когда из низкомолекулярных веществ получали полимеры [17]. Для криореакций боковых цепей ВМС экстремальный характер зависимости скорости процесса от температуры впервые продемонстрирован в настоящей работе.

Причиной наличия экстремума температурно-кинетической зависимости для подобного рода реагирующих систем является конкуренция ускоряющих и замедляющих течение реакций факторов, которые уже подробно обсуждались в работах ряда авторов [16–18]. К этим факторам относятся: ускоряющие – концентрирование веществ, возникновение областей структурной и фазовой неоднородности, заметное повышение полярности незамерзшей части системы; замедляющие – снижение температуры, повышение вязкости, а в рассматриваемом случае еще и возникновение сетки сшитого геля. В результате одновременного действия этих и, возможно,

¹ К сожалению, отсутствуют доступные простые методики прямого измерения концентрации кислорода в замороженных образцах.

других еще не известных факторов оказывается, что для изучаемой системы скорость окисления SH-групп полимера I в замороженном состоянии, например при -15° , более чем в 6 раз превышает скорость реакции при 15° .

Исходя из полученных данных можно сделать важный с практической точки зрения вывод относительно ходильного хранения водных растворов SH-содержащих веществ: если в системе присутствует растворенный кислород или другие окислители, то неглубокое замораживание (до -20°) ни в коей мере не предохранит сульфидильные функции полимера, а наоборот, будет даже способствовать ускорению их окисления с образованием межмолекулярных сшивок. Следовательно, необходимо либо дезаэрировать исходные растворы, либо вводить защищающие восстановители. Но с другой стороны, с помощью приемов криоструктурирования можно формировать на основе SH-полимеров пористые гелевые текстуры без использования каких-либо дополнительных кросс-агентов, поскольку для образования дисульфидных связей достаточно количества присущего растворенного в воде кислорода воздуха.

ЛИТЕРАТУРА

1. Vainerman E. S., Lozinsky V. I., Rogozhin S. V. // Colloid and Polymer Sci. 1981. V. 259. № 12. P. 1198.
2. Лозинский В. И., Вайнерман Е. С., Рогожин С. В. // А.с. 1008214 СССР // Б. И. 1983. № 12.
3. Рогожин С. В., Вайнерман Е. С., Лозинский В. И. // Докл. АН СССР. 1982. Т. 263. № 1. С. 115.
4. Пушкарь Н. С., Белоус А. М. // Введение в криобиологию. Киев, 1975. С. 113.
5. Buttkus H. J. // J. Food Sci. 1970. V. 35. № 5. P. 558.
6. Rogožin S. V., Slonimskij G. L., Rogovina L. Z., Vainerman E. S., Pivovarov P. P. // Die Nahrung. 1981. B. 25. № 4. S. 391.
7. Hansen J. N. // Analyt. Biochem. 1981. V. 116. № 1. P. 141.
8. Crestfield A. M., Moore S., Stein W. H. // J. Biol. Chem. 1963. V. 238. № 2. P. 622.
9. Grassetto D. R., Murray J. F. // Arch. Biochem. Biophys. 1967. V. 119. № 1. P. 41.
10. Лозинский В. И., Цой И. Г., Давидович Ю. А., Рогожин С. В. // Изв. АН СССР. Сер. хим. 1979. № 6. С. 1358.
11. Stuchbury T., Shipton M., Norris R., Malthouse J. P. G., Brocklehurst K., Herber J. A. L., Suschitzky H. // Biochem. J. 1975. V. 151. № 2. P. 417.
12. Seidel A. // Solubilities of Inorganic and Metal Organic Compounds. V. 1. N. Y., 1953. P. 1353.
13. Berlin A. A., Penskaya E. A., Volkova G. I. // J. Polymer Sci. 1962. V. 56. № 164. P. 477.
14. Кухарчик М. М., Барамбийм Н. К. // Изв. вузов. Технология лег. пром-сти. 1977. № 4. С. 51.
15. Торопцева А. М., Белогородская К. В., Бондаренко В. М. // Лабораторный практикум по химии и технологии высокомолекулярных соединений. Л., 1972. С. 385.
16. Сергеев Г. Б., Батюк В. А. // Успехи химии. 1976. Т. 45. № 5. С. 793.
17. Lozinsky V. I., Vainerman E. S., Ivanova S. A., Titova E. F., Shil'man M. I., Belevtseva E. M., Rogozhin S. V. // Acta Polymerica. 1986. V. 37. № 3. S. 142.
18. Pincock R. E., Kiovsky T. E. // J. Chem. Educ. 1966. V. 43. № 7. P. 358.

Институт элементоорганических соединений
им. А. Н. Несмеянова АН СССР

Поступила в редакцию
24.VII.1987

CHANGE OF THE AMOUNT OF TITRATED SH GROUPS IN THIOL DERIVATIVE OF POLYACRYLAMIDE IN THE COURSE OF FREEZING OF ITS AQUEOUS SOLUTIONS

Lozinskii V. I., Golovina T. O., Vainerman Ye. S.,
Rogozhin S. V.

Summary

Dynamics of the change of the amount of titrated SH groups in the thiol derivative of polyacrylamide in the course of freezing of its aqueous solutions at various temperatures has been studied. The cryogenic treatment results in formation of crosslinked gel structures (cryogels), and the amount of titrated SH groups is decreased with increasing of duration of cryostructurization. The dependence of the rate of the process on temperature has the extremal character with a maximum near -15° .