

УДК 541.64:539.199

ПЕРЕХОД КЛУБОК-ГЛОБУЛА В МАКРОМОЛЕКУЛАХ С АНТРАЦЕНСОДЕРЖАЩИМИ ЗВЕНЬЯМИ

© 2001 г. Е. В. Ануфриева, А. Б. Кирпач, М. Г. Краковяк, Т. Д. Ананьева, В. Б. Лушник

Институт высокомолекулярных соединений Российской академии наук
199004 Санкт-Петербург, Большой пр., 31

Поступила в редакцию 11.05.2000 г.
Принята в печать 28.12.2000 г.

Подвижность боковых цепей макромолекул в условиях перехода клубок-глобула исследована на примере сополимеров, включающих небольшое количество (0.1–0.2 мол. %) антраценсодержащих звеньев. Времена релаксации определены путем анализа спада анизотропии свечения разбавленных (0.01%) растворов при импульсном возбуждении люминесценции синхротронным источником радиации. Обнаружено, что подвижность антраценсодержащих боковых цепей при формировании глобулярной структуры макромолекул растет, уменьшается или остается неизменной в зависимости от строения полимера. Поведение этих цепей, таким образом, может быть чувствительным индикатором структуры глобулы и ее функциональных свойств.

Интерес к изучению структурных внутримакромолекулярных переходов типа клубок-глобула, связанный с наиболее общими проблемами молекулярной биологии и физической химии полимеров, стимулировал развитие теоретических и экспериментальных исследований в данной области. При этом теоретические представления о конформационных переходах развивались преимущественно для обобщенного образа макромолекулы [1, 2], а объектами экспериментальных исследований являлись макромолекулы различного химического строения, обладающие индивидуальными особенностями [3–5]. Еще более сложные объекты – разнозвездные макромолекулы, конформационные превращения которых, как и особенности структуры образующихся при этом глобул, могут представлять особый интерес (например, при исследовании проблемы структурной самоорганизации белков).

Задача настоящей работы состояла в том, чтобы установить, каким образом конформационные превращения клубка в глобулу влияют на “инородные” звенья при их низком содержании (~0.1 мол. %) в макромолекуле.

Одной из основных трудностей, осложняющих экспериментальные исследования мономакромо-

лекулярного структурного перехода, является межмолекулярная ассоциация, развивающаяся под действием тех же факторов, которые вызывают усиление внутримолекулярных взаимодействий и, в конечном счете, глобулизацию макромолекулы. Чтобы предельно уменьшить вероятность межмолекулярных взаимодействий, следует проводить исследования при как можно более низких концентрациях полимеров в растворе. При этом используемый экспериментальный подход должен позволять в условиях очень разбавленных (~0.01%) растворов не только надежно фиксировать все стадии конформационного превращения макромолекулы в целом, но и избирательно следить за поведением малых количеств (~0.1–0.2 мол. %) “инородных” звеньев, встроенных в макромолекулы.

Для проведения настоящего исследования был выбран метод, основанный на измерении спада анизотропии люминесцентного свечения люминесцентно меченых макромолекул. Этот выбор основан на следующих соображениях.

1. Измеряемая методом поляризованной люминесценции наносекундная динамика макромолекул отражает изменения структурной организации макромолекулы, начиная от образования локальных структурированных участков и вплоть до глобулизации макромолекулярного клубка [5].

E-mail: polar@imc.macro.ru (Ануфриева Елизавета Викторовна).

2. С помощью импульсного возбуждения люминесценции синхротронным источником радиации можно изучать наносекундную динамику люминесцентно меченых макромолекул при низкой концентрации полимеров в растворе ~0.01% [6–8].

3. “Меточный” подход позволяет избирательно измерять динамические характеристики тех фрагментов макромолекулы, которые выделены ковалентным присоединением люминесцирующей группы, в частности боковых цепей.

4. Люминесцирующие группы в боковых цепях участвуют не только в движениях данных цепей, но и во внутримолекулярной подвижности участка основной цепи и в броуновском движении макромолекулы как целого. Это позволяет, используя один и тот же полимер, оценить времена релаксации, характеризующие подвижность боковых цепей $\tau_{бц}$, основной полимерной цепи $\tau_{оп}$ и макромолекулы как целого $\tau_{цел}$. Следует отметить, что формирование глобулярной структуры сопровождается значительным уменьшением внутримолекулярной подвижности (ростом $\tau_{оп}$) и увеличением подвижности макромолекулы как целого (уменьшением $\tau_{цел}$). Уменьшение подвижности боковых цепей (увеличение $\tau_{бц}$) может указывать на включение этих цепей в формирующуюся компактную структуру.

Для исследования влияния перехода клубок-глобула на взаимодействие антраценсодержащих боковых цепей с макромолекулярным окружением были выбраны полимеры, для которых уже изучено влияние этого перехода на подвижность основной цепи [8, 9]. В частности, объектами исследования были образцы ПММА с $M = 4.8 \times 10^5$ и 1.6×10^5 . В молекулах ПММА переход клубок-глобула происходит при добавлении осадителя (октана) к раствору ПММА в толуоле при 25°C; доля октана, необходимая для достижения одних и тех же структурных изменений, растет с уменьшением молекулярной массы ПММА. Для ПММА с $M = 4.8 \times 10^5$ при этом не только наблюдается рост $\tau_{оп}$, но и четко проявляется подвижность глобулы как целого, характеризуемая временем $\tau_{цел}$. Значение $\tau_{цел}$ совпадает с временем релаксации $\tau_{теор}$, рассчитанным для глобулы с $M = 4.8 \times 10^5$ по формуле [10]

$$\tau_{теор} = \frac{1.2[\eta]M\eta}{RT}, \quad (1)$$

где характеристическая вязкость раствора полимерных глобул $[\eta]$ принята равной 3 см³/г, как для

раствора глобулярного белка [11], T и η – температура и вязкость растворителя.

Для установления влияния химического строения “инородных” боковых цепей на их взаимодействие с макромолекулярным окружением в процессе перехода клубок-глобула были исследованы образцы ПММА одинаковой M (1.6×10^5) с антраценсодержащими боковыми цепями различной длины.

Наряду с ПММА объектами исследования были также водорастворимые термочувствительные полимеры поли-*N*-изопропилметакрилатамида и поли-*N-n*-пропилметакрилатамида с “инородными” боковыми цепями. Переход клубок-глобула наблюдается при нагревании водных растворов этих полимеров, причем изменение изомерного строения пропильных радикалов приводит к изменению типа образующихся структур [9]. Так, в макромолекулах поли-*N*-изопропилметакрилатамида формируется компактная мономолекулярная структура типа глобулярной, в случае же поли-*N-n*-пропилметакрилатамида также образуется компактная глобулярная структура, но не мономолекулярная, а бимолекулярная двутяжевая. Исследование этой пары объектов направлено на установление влияния особенностей глобулярной структуры на взаимодействие “инородных” боковых цепей с макромолекулярным окружением.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Синтез мономеров метакрилового ряда, содержащих антраценовые группы на концах боковых радикалов варьируемой длины

Для получения (ко)полимеров метакрилового ряда с люминесцирующими метками обычно используют антраценсодержащие мономеры того же ряда, в частности 9-антрилметилметакрилат [5]. Однако образующиеся в этом случае люминесцирующие метки содержат относительно легко расщепляемую 9-антрилметилкарбоксилатную сложнозэфирную связь. Поэтому для исследования полимеров в водных растворах нами был разработан способ получения другого мономера метакрилового ряда – *N*-(9-антрилметил)метакрилатамида (соединение III на схеме 1), структура которого включает более гидролитически устойчивую систему связей [12]. Этот способ был основан на много-

стадийной последовательности реакций (схема 1, путь I → II → III).

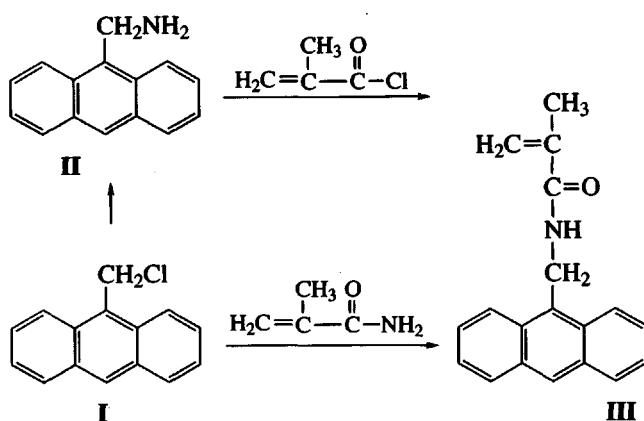


Схема 1

9-Хлорметилантрацен (I) обрабатывали гексаметилентетрамином, образующуюся четвертичную соль подвергали кислотному гидролизу (реакция Делепина), получая 9-антрилметиламин (II). Ацилирование амина II хлорангидридом метакриловой кислоты приводило к образованию цевлевого соединения – мономера III.

В настоящем исследовании нами использован более рациональный одностадийный метод синтеза мономера III, основанный на использовании того же исходного соединения I (схема 1, путь I → III).

Реакционную смесь, содержащую 3.8 мл свежеперегнанного ДМФА, 225 мг (1 ммоль) 9-хлорметилантрацена (фирмы "Fluka"), 425 мг (5 ммоля) очищенного кристаллизацией метакриламида и 285 мг (5 ммоля) порошкообразного KOH, перемешивали в течение 5 ч при 40°C. Полученную суспензию фильтровали, фильтрат постепенно прибавляли к 40 мл воды. Образовавшуюся желтую суспензию оставляли на ночь. Затем осадок отделяли, фильтрат несколько раз промывали бензолом, бензол отгоняли, выделенное твердое вещество добавляли к основному осадку и сушили в вакууме до постоянной массы, выделяя 250 мг сырого продукта (90% от теоретического выхода III) с температурой плавления $T_{\text{пл}} = 156-160^{\circ}\text{C}$. После двух кристаллизаций из бензола получали 130 мг светло-желтых игольчатых кристаллов (48% от теоретического выхода) с $T_{\text{пл}} = 171.5-173^{\circ}\text{C}$. Полученное соединение по температуре плавления, элементному составу и спектральным характеристикам в ИК- и в УФ-областях спектра полностью идентично N-(9-антрилметиламиду, синтезированному по описанному ранее способу [12].

Синтез длинноцепного антраценсодержащего мономера метакрилового ряда – 9-антрилметилового эфира N-метакрилоил- ω -аминокапроновой кислоты IV осуществляли по схеме

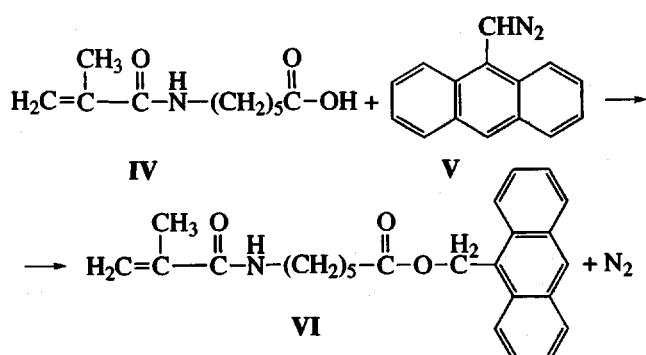


Схема 2

N-Метакрилоил- ω -капроновую кислоту IV получали взаимодействием ω -капроновой кислоты с метакрилоилхлоридом по методике [13]. Для ее превращения в 9-антрилметиловый эфир VI использовали 9-антрилдиазометан V, который синтезировали при окислении гидразона 9-антральдегида желтой окисью ртути [14]. Реакцию 9-антрилметилирования осуществляли следующим образом.

К перемешиваемому раствору 570 мг (2.9 ммоля) кислоты IV в 5 мл свежеперегнанного ДМФА по каплям прибавляли раствор 500 мг (2.3 ммоля) 9-антрилдиазометана V в 10 мл ДМФА, приготовленный непосредственно перед проведением реакции. Реакция сопровождалась выделением пузырьков азота и изменением окраски реакционного раствора от вишневой до светло-оранжевой. Через 2 ч реакционную смесь выливали в 250 мл воды, выпавший осадок отделяли, тщательно промывали водой и сушили в вакууме до постоянной массы, получали 790 мг (88.3% от теоретического выхода VI) сырого продукта с $T_{\text{пл}} = 87-91^{\circ}\text{C}$. После нескольких перекристаллизаций из этанола получали эфир VI в виде желтых кристаллов с $T_{\text{пл}} = 97.5-100^{\circ}\text{C}$.

Найдено, %: C 76.89; H 6.83; N 3.63.

Для $C_{25}H_{27}O_3N$

вычислено, %: C 77.09; H 6.99; N 3.60.

В ИК-спектре полученного соединения содержатся полосы поглощения при 1620 и 1535 cm^{-1} , характерные для соединений с амидной группой, при 1730 cm^{-1} (сложноэфирная группа) и полоса при 1655 cm^{-1} , свидетельствующая о наличии

двойной углерод-углеродной связи. УФ-спектр раствора полученного соединения в толуоле в области 330–420 нм по форме и положению полос поглощения идентичен спектрам растворов соединений 9-алкилантраценового ряда.

Синтез антраценсодержащих (ко)полимеров

Мономеры N-изопропилметакриламид и N-н-пропилметакриламид синтезировали традиционным способом – ацилированием пропиламинов при действии метакрилоилхлорида.

Полимеры получали радикальной сополимеризацией основных мономеров (ММА, N-пропилметакриламиды) с антраценсодержащими мономерами структуры III или VI, содержание которых составляло ~0.1 мол. %. Полимеризацию проводили в заполненных аргоном стеклянных ампулах, используя в качестве растворителей очищенный ДМФА (в случае N-пропилметакриламидов) или толуол (ММА), а в качестве инициатора – ДАК. Реакцию вели при 60°C в течение 20–24 ч. Полимеры выделяли, осаждая их из реакционного раствора, и тщательно очищали от низкомолекулярных люминесцирующих примесей многократными пересаждениями, контролируя процесс очистки методами спектрофотометрии и поляризованной люминесценции.

Содержание антраценовых групп в полученных (ко)полимерах определяли с помощью УФ-спектроскопии, ММ оценивали вискозиметрическим методом.

Определение наносекундных времен релаксации

Времена релаксации, характеризующие подвижность основной полимерной цепи $\tau_{\text{оп}}$ и боковых цепей $\tau_{\text{бц}}$, определяли методом поляризованной люминесценции при импульсном возбуждении свечения. Для этого измеряли и анализировали спад анизотропии люминесценции, используя специальную процедуру восстановления реальных релаксационных данных из данных эксперимента. Истинный спад анизотропии люминесценции представляли в виде суммы двух экспонент. Более подробно методика обработки данных описана в наших статьях [8, 15]. Все значения времен релак-

сации τ приведены к значениям вязкостей η используемых растворителей в соответствии с соотношением

$$\tau^{\text{пр}} = \tau \eta^{\text{пр}} / \eta \quad (2)$$

Для возбуждения люминесценции использовали синхротронный источник радиации (Daresbury, UK), длина волны возбуждающего света 365 нм, длина волны люминесценции 420 нм [6–8, 15]. Исследования проводили при концентрации полимера в растворе $c_n = 0.1$ мг/мл.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для характеристики взаимодействия “инородных” антраценсодержащих боковых цепей макромолекул с макромолекулярным окружением изучалась наносекундная подвижность этих цепей в зависимости от доли осадителя в растворителе для ПММА или от температуры водных растворов для поли-N-пропилметакриламидов (рис. 1, 2). Данные о переходе клубок-глобула в макромолекулах исследуемых полимеров представлены в работах [8, 9].

Наносекундная подвижность боковых цепей характеризует взаимодействия этих цепей с макромолекулярным окружением, поскольку длительность межмолекулярных контактов соизмерима с наносекундным интервалом времен релаксации. На рис. 1 показано, как меняется подвижность антраценсодержащих боковых цепей в макромолекулах ПММА различной ММ в толуоле при добавлении октана. Для характеристики структурных изменений макромолекул ПММА в этих условиях приводятся также зависимости времени релаксации $\tau_{\text{оп}}$ от доли октана в растворителе, отражающие изменение подвижности основной цепи полимера [8]. Рост $\tau_{\text{оп}}$ при увеличении содержания октана сменяется падением из-за проявления в релаксационном спектре подвижности глобулы как целого $\tau_{\text{цеп}}$. Из данных рис. 1 следует, что при образовании глобулы в случае высокомолекулярного ПММА ($M = 4.8 \times 10^5$) боковые цепи становятся высоко подвижными. В процессе формирования глобулы в узком интервале изменения содержания октана в растворе ($c_{\text{окт}} = 27–37$ мас. %) $\tau_{\text{бц}}$ уменьшается от 10 до 2 нс. При образовании глобулы в

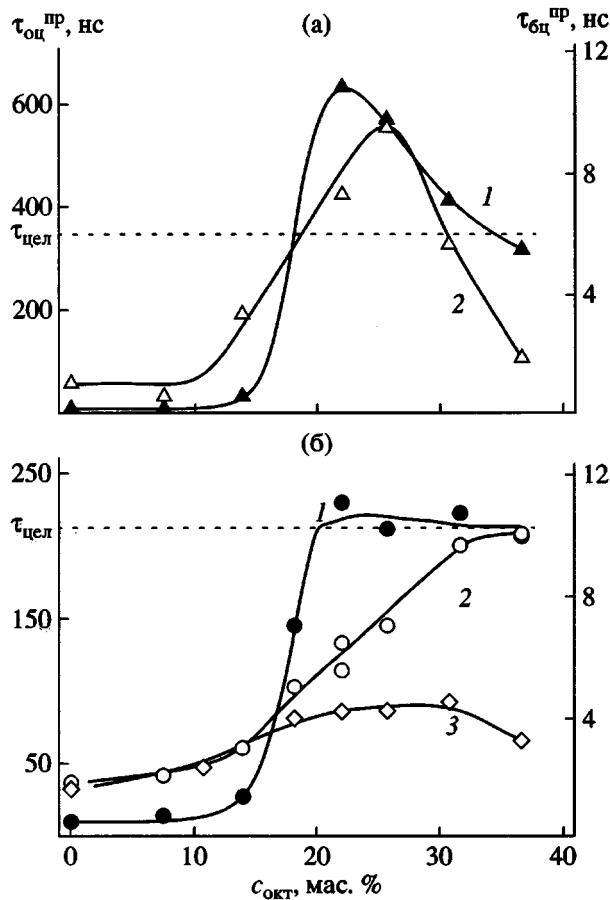


Рис. 1. Зависимости $\tau_{\text{оп}}^{\text{пр}}$ (1) [8] и $\tau_{\text{бц}}^{\text{пр}}$ (2, 3) от доли октана $c_{\text{окт}}$ в толуольном растворе для ПММА с $M = 4.8 \times 10^5$ (а) и 1.6×10^5 (б) в случае коротких (2) и длинных (3) боковых цепей. $T = 25^\circ\text{C}$, $\eta^{\text{пр}} = 0.51 \text{ сП}$. Штриховой линией показано время релаксации $\tau_{\text{цел}}$, характеризующее вращение глобулы как целого [8].

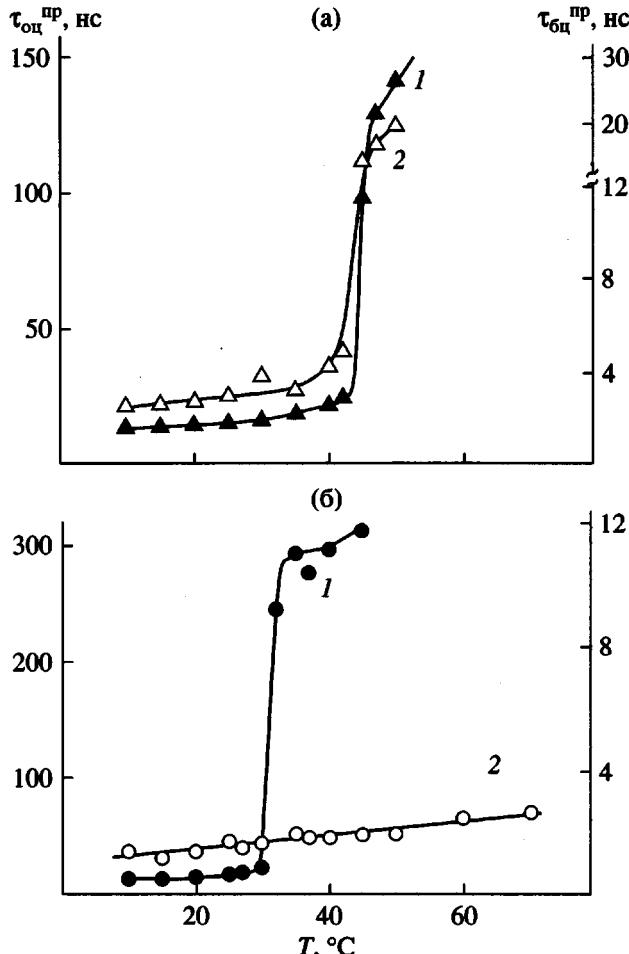


Рис. 2. Температурные зависимости $\tau_{\text{оп}}^{\text{пр}}$ (1) и $\tau_{\text{бц}}^{\text{пр}}$ (2) для поли-*N*-изопропилметакриламида (а) и поли-*N*-*n*-пропилметакриламида в водном растворе. $\eta^{\text{пр}} = 0.89 \text{ сП}$. $M = 8.3 \times 10^4$ (а) и 1.6×10^5 (б).

молекулах ПММА меньшей молекулярной массы ($M = 1.6 \times 10^5$) боковые цепи остаются заторможенными, $\tau_{\text{бц}} = 10 \text{ нс}$. Представленные данные показывают, что “инородные” боковые цепи при формировании глобулярной структуры макромолекул ПММА выталкиваются из глобулы ($M = 4.8 \times 10^5$) или остаются внутри глобулы ($M = 1.6 \times 10^5$) в зависимости от ММ полимера. Возможно, это различие в поведении “инородных” боковых цепей при формировании глобулярной структуры макромолекул указывает на различную структурную организацию макромолекулярных глобул.

Рассмотренные данные относятся к “инородным” боковым цепям небольшой длины. При уве-

личении длины этих цепей их подвижность в глобулярной структуре несколько возрастает даже в молекулах ПММА невысокой ММ (1.6×10^5). Таким образом, рост длины “инородных” боковых цепей и повышение ММ полимера увеличивают вероятность выхода данных цепей из макромолекулярного окружения при формировании глобулы.

Взаимодействие “инородных” антраценсодержащих боковых цепей с макромолекулярным окружением приобретает большую значимость для водорастворимых термочувствительных полимеров при повышении температуры водного раствора, т.е. при усилении гидрофобных взаимодействий неполярных групп полимера и антраценового ядра, расположенного на конце боковой цепи. Оказа-

лось, что в макромолекулах поли-*N*-изопропилметакриламида ($M = 8.3 \times 10^4$) при формировании мономолекулярной глобулы заторможенность "инородных" боковых цепей растет и остается высокой ($\tau_{бц} = 20$ нс) в глобулярной структуре (рис. 2а). Это значит, что боковые цепи остаются внутри глобулы. Точнее говоря, они взаимодействуют с макромолекулярным окружением в глобулярной структуре. Однако такой результат не является следствием образования гидрофобных контактов антраценового ядра с макромолекулярным окружением. Те же самые "инородные" боковые цепи с антраценовым ядром на конце при формировании глобулярной бимолекулярной структуры в водных растворах поли-*N*-*n*-пропилметакриламида остаются высоко подвижными ($\tau_{бц} = 3$ нс), т.е. не взаимодействуют с макромолекулярным окружением даже при высоких (70°C) температурах (рис. 2б). Этот результат означает, что образование бимолекулярных глобулярных структур в разбавленных водных растворах поли-*N*-*n*-пропилметакриламида не влияет на взаимодействие "инородных" боковых цепей с основными звеньями полимера ни на начальных, ни на более поздних стадиях структурообразования.

Полученные результаты позволили сделать ряд интересных заключений об аномальном поведении "инородных" боковых цепей, т.е. об их выходе из макромолекулярного окружения при формировании глобулярной структуры макромолекул и о факторах, способствующих проявлению этих аномалий. К таким факторам относятся повышение ММ полимера, увеличение длины "инородных" боковых цепей и переход от мономолекулярной глобулы к глобуле, представляющей собой бимолекулярную двутяжевую структуру. Так, обнаружено, что подвижность антраценсодержащих боковых цепей при формировании глобулярной структуры макромолекул в зависимости от строения полимера растет, уменьшается или остается неизменной. Поведение этих цепей может быть чувствительным индикатором особенностей структуры глобулы и ее функциональных свойств.

Авторы выражают благодарность The Royal Society за финансовую поддержку этой работы в форме Research Fellowship (для А.Б.Кирпача), проф. I. Soutar и L. Swanson за предоставленную возможность в проведении данного исследования,

а также Central Laboratory of The Research Councils за предоставление времени в режиме "одиночного пучка" на синхротронном источнике радиации (Daresbury, UK).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кузнецов Д.В., Бирштейн Т.М., Гросберг А.Ю. // Высокомолек. соед. Б. 1987. Т. 29. № 12. С. 951.
2. Гросберг А.Ю., Хохлов А.Р. Статистическая физика макромолекул. М.: Наука, 1989.
3. Meewes M., Richka J., de Silva M., Nyffenegger R., Binkert Th. // Macromolecules. 1991. V. 24. № 21. P. 5811.
4. Ptitsyn O.B. // J. Molec. Biology. 1998. V. 278. № 3. P. 2.
5. Anufrieva E.V., Gotlib Yu.Ya. // Adv. Polym. Sci. 1981. V. 40. № 1. P. 1.
6. Soutar I., Swanson L., Christensen R.L., Drake R.C., Phillips D. // Macromolecules. 1996. V. 29. № 14. P. 4931.
7. Soutar I., Swanson L., Imhof R.E., Rumbles G. // Macromolecules. 1992. V. 25. № 17. P. 4399.
8. Ануфриева Е.В., Кирпач А.Б., Краковяк М.Г., Лущик В.Б., Soutar I., Swanson L. // Высокомолек. соед. А. 2000. Т. 42. № 10. С. 1704.
9. Ануфриева Е.В., Краковяк М.Г., Громова Р.А., Лущик В.Б., Ананьев Т.Д., Шевелева Т.В. // Докл. АН СССР. 1991. Т. 319. № 4. С. 895.
10. Цветков В.Н., Эскин В.Е., Френкель С.Я. Структура макромолекул в растворах. М.: Наука, 1964. С. 1.
11. Tanford Ch. Physical Chemistry of Macromolecules. New York; London: Wiley, 1961. P. 394.
12. Ануфриева Е.В., Паутов В.Д., Лущик В.Б., Мирзахидов Х.А., Мусаев У.Н., Краковяк М.Г. // Высокомолек. соед. Б. 1989. Т. 31. № 10. С. 772.
13. Drobnič J., Kopecek J., Labsky J., Reimárová P., Exner J., Sandek V., Kalal J. // Makromol. Chem. 1976. B. 177. № 10. S. 2833.
14. Krakovyak M.G., Anufrieva E.V., Lushchik V.B., Shelekhov N.S., Skorokhodov S.S. // J. Macromol. Sci., Chem. 1978. V. 12. № 6. P. 789.
15. Кирпач А.Б., Ануфриева Е.В., Soutar I., Swanson L. // Высокомолек. соед. А. 2000. Т. 42. № 10. С. 1657.

A Coil-to-Globule Transition in Macromolecules with Anthracene-Containing Units

E. V. Anufrieva, A. B. Kirpach, M. G. Krakovyak, T. D. Anan'eva, and V. B. Lushchik

*Institute of Macromolecular Compounds, Russian Academy of Sciences,
Bol'shoi pr. 31, St. Petersburg, 119004 Russia*

Abstract—The mobility of the side chains of macromolecules under the conditions of the coil-to-globule transition was studied for copolymers bearing a small amount (0.1–0.2 mol %) of anthracene-containing units. Relaxation times were determined by analyzing the emission anisotropy decay of dilute (0.01%) solutions with the aid of pulsed luminescence excited by a synchrotron radiation source. It was shown that, upon the formation of the globular structure of these polymers, the mobility of anthracene-containing side chains increases, decreases, or remains invariable as dependent on the polymer structure. Thus, the behavior of such chains may serve as a sensitive indicator of the structure of a globule and its functional properties.