

Бободжанов Пулат Хусейнович

Изучение структуры и молекулярной динамики хлопковой целлюлозы и глобулярных белков методом спиновых меток и зондов

02.00.06 – высокомолекулярные соединения

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора химических наук

Душанбе -- 2003

Научный консультант: Академик АН Республики Таджикистан,
доктор технических наук,
профессор **Марупов Рахим Марупович**

Официальные оппоненты: Доктор химических наук,
профессор **Кокорин Александр Ильич**

Доктор химических наук,
профессор **Халиков Ширинбек Халикович**

Доктор химических наук,
профессор **Норматов Ином Шерович**

Ведущая организация: Институт проблем химической физики АН Российской Федерации, Черноголовка

Защита диссертации состоится "16" апреля 2003 г. в 9⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета ДР 047.003.18 в Институте химии им. В. И. Никитина АН Республики Таджикистан по адресу: 734063, г. Душанбе, ул. Айни, 299/2.

E-mail: guli@academy.td.silk.org

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института химии им. В. И. Никитина АН Республики Таджикистан.

Автореферат разослан "5" марта 2003 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат химических наук



Касымова Г.Ф.

Актуальность проблемы. Одной из важнейших задач химии и биологии является получение спиновых меток и зондов на основе органических соединений нового класса – пиперидиновых и пирролидиновых нитроксильных стабильных радикалов, полученных в Институте химической физики АН СССР.

Высокая устойчивость этих радикалов к действию тепла, кислорода и других химических реагентов позволяет использовать их в технике в качестве стабилизаторов, антиоксидантов, датчиков напряжений, спин-зондов, рабочих веществ квантовых генераторов, магнитомеров и градиентомеров.

Широкое распространение получили спиновые метки и зонды для исследования структуры жидкостей, полимеров и биологических систем. Стабильные нитроксильные радикалы, ковалентно связанные с макромолекулой (спиновые метки) или введенные в исследуемые системы в небольших количествах (спиновые зонды). Они выполняют роль молекулярных датчиков и позволяют получать уникальную информацию о структуре и динамике исследуемых систем.

Использование спиновых меток и зондов основано на том, что спектры ЭПР нитроксильных радикалов зависят от их вращательной и трансляционной подвижности, ориентации, особенностей молекулярной динамики и характера распределения в белках и полимерах; эти факторы, в свою очередь, определяются структурой и подвижностью той среды, в которой зонд или метка находятся. За последние годы опубликован целый ряд обзоров, посвященных различным применениям метода спиновой метки и зонда.

Потребность в таких материалах связана, с одной стороны, с большим разнообразием их структурных и физико-химических свойств по сравнению с методами органических соединений, а с другой, с возможностью их химического использования для модификации различных групп белковых и полимерных систем.

Физико-химические свойства спиновых меток и зондов, мессбауэровских атомов и электроннорассеивающих групп, присоединившихся к определенным функциональным группам, зависят от природы и структуры соответствующих соединений. Это дает возможность по данным спектра ЭПР определять расстояния между метками и, соответственно, между функциональными макромолекулами, несущими эти метки. Физические параметры меток отражают микровязкость и жесткость биологической матрицы. Это позволяет изучать динамическую структуру белковых и полимерных систем.

Успех в применении органических стабильных нитроксильных радикалов в качестве спиновых меток и зондов обусловлен уникальной возможностью варьировать их химическую структуру без существенного изменения их парамагнитных свойств. Изменения структуры нитроксильных радикалов позволяет создавать зонды и метки, соответствующие изучаемой системе и поставленной задаче, а сохранение их парамагнитных свойств позволяет проводить исследования разных систем при одних и тех же требованиях к условиям ЭПР – эксперимента с помощью одних и тех же теорий и методов анализа спектров ЭПР.

Таким образом, метод спиновых меток и зондов существенно дополняет другие современные физические методы исследования белков и полимеров, такие как

механическая и диэлектрическая релаксация, ЯМР, ЯГР, радиотермолюминесценция, поляризованная люминесценция, масс-спектрометрия, электронный микроскоп и рентгеноструктурный анализ и позволяет расширить перечень практического применения метода спиновых меток и зондов, что представляется весьма актуальной задачей.

Цель работы заключается в синтезе свободных нитроксильных радикалов и получении на их основе спиновых меток и зондов, используемых для изучения структуры белков и полимеров.

Для достижения поставленной цели были решены следующие задачи:

- разработана методика синтеза новых спиновых меток и зондов на основе стабильных нитроксильных радикалов пиперидинового и пирролидинового рядов;
- разработана методика модификации функциональных групп хлопковой целлюлозы и глобулярных белков спиновыми метками и зондами;
- определена локализация спиновых меток и зондов в полимерных цепях хлопковых волокон и глобулярных белков;
- изучена вращательная подвижность спиновых меток в хлопковых волокнах различных селекционных сортов в зависимости от температуры и влажности;
- выяснено, какие характерные движения меток и в какой степени они коррелируют с механической прочностью хлопковых волокон различных селекционных сортов;
- исследована вращательная подвижность спиновых меток в белковых структурах с изменением конформационных свойств при действии температуры и pH среды;
- изучена структура и молекулярная динамика хлопковых волокон методами ЯМР, ЯГР и электронной микроскопии;
- изучена молекулярная подвижность спиновых меток в фиброине натурального шелка в зависимости от температуры и УФ-облучения.

Научная новизна работы. Впервые синтезированы спиновые метки и зонды пиперидинового и пирролидинового класса на основе стабильных нитроксильных радикалов, проведена химическая реакция спиновых меток с функциональными группами гемоглобина быка, сывороточного альбумина человека, лизоцима яиц и глутамат-аспартат-трансаминазы по SH, имидазольной гистидиновой и аминогруппе лизина. Впервые с использованием стабильных нитроксильных радикалов проведена модификация хлопковых волокон различных селекционных сортов, микрокристаллической целлюлозы (МКЦ) тонковолокнистых и средневолокнистых сортов хлопка, древесной МКЦ, МКЦ сахарного тростника и фиброин натурального шелка (ФНШ).

Впервые синтезирован парамагнитный зонд на основе ванадилпорфиринового комплекса (VOПК). Изучена структура хлопковой целлюлозы методом парамагнитного зонда в процессе гидролиза целлюлозы. Впервые синтезирован мессбауэровский зонд на основе порфирина, содержащего изотопы $^{57}\text{Fe}^{2+}$ и $^{57}\text{Fe}^{3+}$. Изучена структура хлопкового волокна методом мессбауэровского зонда и ксантогената целлюлозы мессбауэровской меткой путем непосредственного введения химическим способом в структуру ксантогената хлопковой целлюлозы и МКЦ изотопов $^{57}\text{Fe}^{2+}$ и $^{57}\text{Fe}^{3+}$.

Впервые изучена структура хлопкового волокна методом электронноплотных меток, полученных на основе атомов тяжелых металлов (ртуть, полимеркуриалы), веществ, эффективно рассеивающие электроны. Методом электронной микроскопии

изучена топография функциональных групп хлопковых волокон с химически присоединенной электронноплотной меткой.

Синтезировано более двадцати спиновых меток и зондов, десять из них впервые. Проведен комплексный анализ молекулярной динамики хлопковой целлюлозы и ее производных методами спиновых меток и зондов, методами ЯМР, ЯГР и электронноплотных меток. Впервые получены данные об изменении структуры целлюлозы в процессе ее биосинтеза, корреляции параметров механической прочности волокна с относительным содержанием в нем рыхлых структурных дефектов и с вращательной подвижностью спиновых меток и зондов.

Методом спиновых меток изучена структура волокон натурального шелка в широком диапазоне температур, влажности и вязкости среды. Определены средняя, по объему, и локальная концентрация спиновых меток, константы СТВ (сверхтонкого взаимодействия) и временная корреляция вращения меток. Установлена структурная микронеоднородность аморфных областей натурального шелка.

Практическое значение. Научные результаты диссертационной работы, касающиеся синтеза спиновых меток и зондов, их химических реакций с функциональными группами белков и полимеров, дополняют новыми сведениями известные механизмы реакций и модификаций белковых и полимерных систем. Исследованы структура и свойства хлопковой целлюлозы и ее производных, определяющие их основные технологические и физико-химические свойства. Проведен сравнительный анализ методом спиновых меток структуры натурального шелка и изменений конформационных свойств структуры шелка, связанных с движением различных групп, сегментов и звеньев. Разработаны способы анализа структуры хлопковой целлюлозы методом спиновых меток и парамагнитных зондов на основе ванадилпорфиринового комплекса в процессе гидролиза целлюлозы. Полученные результаты легли в основу восьми авторских свидетельств, два из которых внедрены в практику лабораторных исследований.

Публикации. Основные результаты диссертации опубликованы в 74 научных работах, среди которых 8 авторских свидетельств на изобретения.

Апробация диссертации. Материалы диссертации докладывались и обсуждались на:

Международном симпозиуме СССР – ФРГ. «Пептиды и химия протеинов» (Душанбе, 1976); Международном симпозиуме по Макромолекулярной химии (Ташкент, 1978); XIV Европейская конференция по молекулярной спектроскопии (Франкфурт-на-Майне (ФРГ), 1979); X Всесоюзной научной конференции по текстильному материаловедению (Львов, 1980); 1^{ом} Всесоюзном биофизическом съезде (Москва, 1982); 1^{ом} Международном симпозиуме СССР – Индия (Душанбе, 1982); V Всесоюзной конференции по химии и физике целлюлозы (Ташкент, 1982); II Всесоюзной конференции «Биосинтез целлюлозы и других компонентов клеточной стенки» (Казань, 1996); Всесоюзном семинаре «Микрокристаллическая и порошковая целлюлоза: получение и области использования» (Ташкент, 1986); Международной конференции по нитроксильным радикалам (Новосибирск, 1989); VI Всесоюзной конференции по физике и химии целлюлозы (Минск, 1990); V Всесоюзной конференции по химии целлюлозы и ее продуктов (Бишкек,

Чолпонота, 1991); Международном симпозиуме «Полимеры в науке и технике» (Тегеран, 1997); Научной конференции «Физика конденсированного состояния» посвященной 70-летию академика А.А.Адхамова (Душанбе, 1998); Научной конференции, посвященной развитию физической науки в Таджикистане и 90-летию С.У.Умарова (Душанбе, 1998); Международной конференции «Полимеры на стыке наук» (Ташкент, 1999).

Структура и объем работы. Диссертационная работа состоит из введения, семи глав, заключения, выводов и литературы. Диссертация изложена на 236 страницах машинописного текста, содержит 15 таблиц, 59 рисунков и перечня использованной литературы советских и зарубежных авторов, включающего 238 наименований.

СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Во введении обосновывается актуальность темы, формулируется цель работы и задачи исследования, кратко обсуждаются основные результаты работы, научная новизна и практическая ценность.

1. Нитроксильные свободные радикалы.

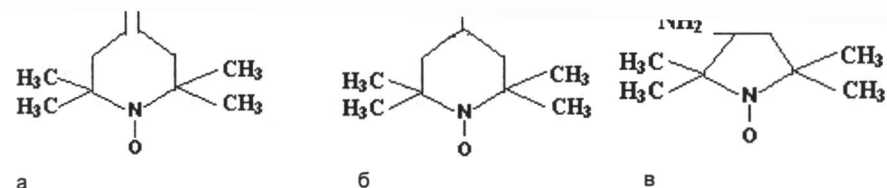
В первой главе диссертации (литературном обзоре) освещены вопросы синтеза производных нитроксильных стабильных радикалов – полупродуктов, для получения спиновых меток и зондов, химические и физические свойства радикалов, а также работы в области применения метода спиновых меток и зондов. Рассмотрены реакции без затрагивания свободной валентности (нерадикальные реакции свободных радикалов), являющиеся основным методом синтеза нитроксильных свободных радикалов. Во второй главе описаны методы синтеза спиновых меток и зондов.

2. Синтез спиновых меток и зондов.

Реальная эффективность метода спиновых меток и зондов в большей степени зависит от возможности специфического присоединения нитроксильных радикалов к определенным группам белка и полимера. Поэтому многие из применяемых меток содержат в качестве активной группы фрагменты известных реагентов, избирательность действия которых проверена на большом экспериментальном материале. В ряде случаев методы синтеза были модифицированы и улучшены, кроме того, были разработаны методы получения ряда новых спиновых меток, применение которых расширило круг белковых и полимерных групп, способных специфически реагировать с нитроксильными радикалами. Кроме того, применение спиновых меток разной длины, формы и гибкости значительно повышает достоверность выводов о структуре белка в области присоединившейся метки.

2.1. Синтез производных нитроксильных свободных радикалов

Удобным исходным объектом для получения спиновых меток по реакции без затрагивания свободной валентности служат свободные нитроксильные радикалы 2,2,6,6 – тетраметил – 4 – оксопиперидин – 1 – оксил (а); 2,2,6,6 – тетраметил – 4 – аминопиперидин – 1 – оксил (б); 2,25,5 – тетраметил – 3 аминопирролидин – 1 – оксил (в) имеющие следующие структуры:



Спектр ЭПР нитроксильных свободных радикалов в кристаллическом виде обладает синглетом, который при растворении образца в бензоле трансформировался в триплет с расщеплением между компонентами 15,5з. (Рис.1).

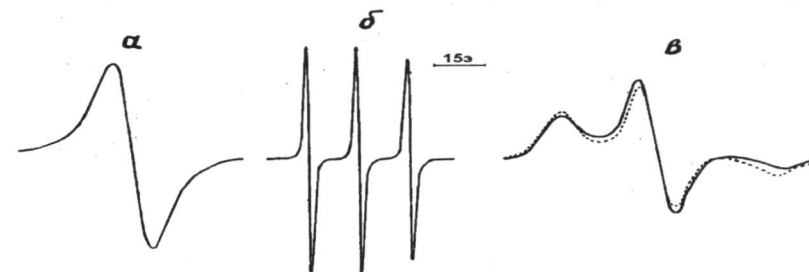
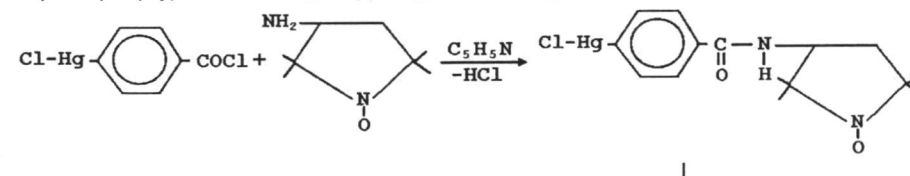


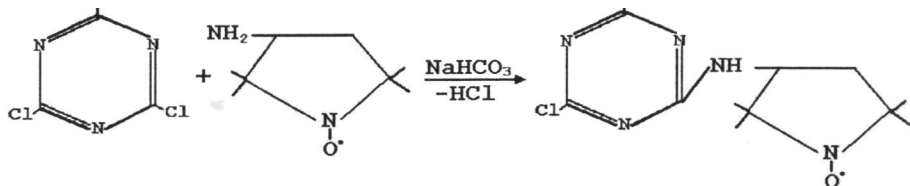
Рис.1. Спектры ЭПР спиновой метки при 30°С: а) кристаллический; б) водный, концентрация 10⁻³ м/л.; в) 50% водноглицериновая матрица (1:1 по объему), -77°К. Сплошная линия – стандартный радикал 2,2,6,6-тетраметил-4-оксопиперидин-1-оксил, в 50% водноглицериновой матрице (1:1 по объему).

Многие ферменты и функциональные белки содержат аминокислотные остатки с SH-группами, что стимулирует синтез меток, содержащих п-хлормеркурийбензоат (п-ХМБ), и является одним из самых распространенных реагентов на сульфидрильные группы. Синтез таких соединений на примере 2,2,5,5 – тетраметил – 3 – парохлормеркурий бензоамидопирролидин-1-оксил (I) нами проводился по реакции:



По этой реакции были получены 2,2,6,6-тетраметил-4-парахлормеркурий-бензоамидопиперидин-1-оксил(II); 2,2,6,6 - тетраметил - 4 - парахлормеркурий- бензо-оксопиперидин-1- оксил (III). (Таблица 1)

Кроме сульфидрильной группы, белки и многие природные полимеры содержат функциональные гидроксил- и аминогруппы. Для синтеза спиновых меток, способных ковалентно связываться с этими группами, был осуществлен синтез спин-метки с монозамещенным производным цианурхлорида по схеме:



Спиновые метки 2,2,5,5 – тетраметил – 3 – amino – (3,5 – дихлортриазинил) – пирролидин – 1 – оксил (IV); 2,2,6,6 – тетраметил – 4 – amino – (3,5 – дихлортриазинил) – пиперидин – 1 – оксил (V); 2,2,6,6 – тетраметил – 4 – окси – (3,5-дихлортриазинил) пиперидин – 1 – оксил (VI) (Таблица 1) были получены впервые.

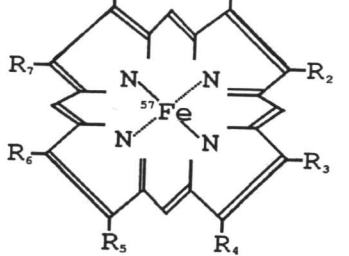
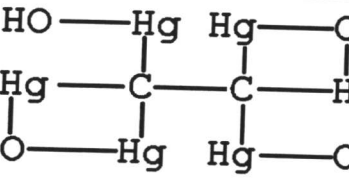
Одним из перспективных путей синтеза спиновых меток, ковалентно связывающихся с белками, является введение диазосоединения в молекулы свободных нитрокислородных радикалов, что нами осуществлялось по схеме:

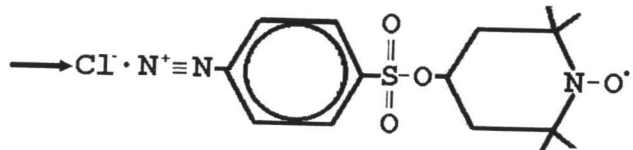
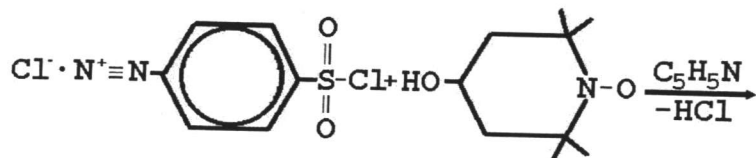
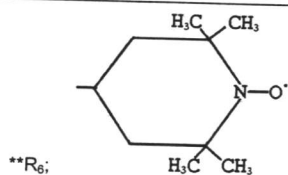
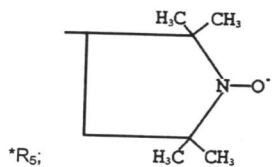
Таблица 1.

Спиновые метки и модифицируемые группы

Аминокислота, модифицируемая белковая, полимерная группа	Формула спиновых меток и зондов	Порядковый №
Цистеин, SH.		I
- - - - - - -		II
- - - - - - -		III
Лизин, гистидин, имидазольная, - OH (гидроксильная группа)		IV
- - - - - - -		V
- - - - - - -		VI

Лизин, гистидин, - OH, имидазольная, ε - NH ₂		VII
- - - - - - -		VIII
SH, цистеин, лизин, ε - NH ₂		X и XI
SH, цистеин, гистидин, OH, имидазольная		XI и XII
Лизин, ε - NH ₂ ; OH		XIII и XIV
Лизин, ε - NH ₂ ; OH		XV и XVI

SH	 $(\text{целл.} - \text{OC} \begin{matrix} \text{S} \\ \text{S} \end{matrix}) \cdot ^{57}\text{Fe}^{2+}$ $(\text{целл.} - \text{OC} \begin{matrix} \text{S} \\ \text{S} \end{matrix}) \cdot ^{57}\text{Fe}^{3+}$	XVIII XIX
SH, цистеин, гистидин, OH, лизин, ε - NH ₂		XX

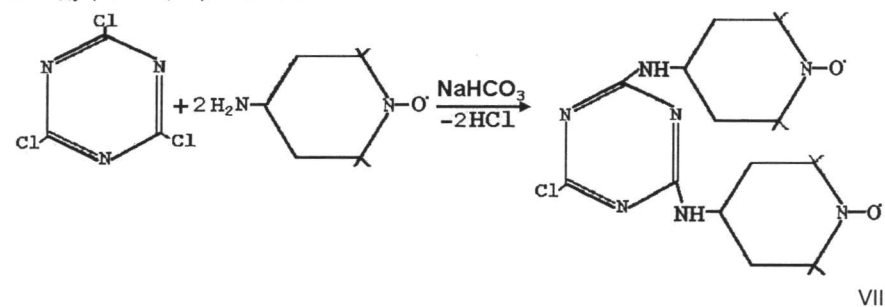


VII

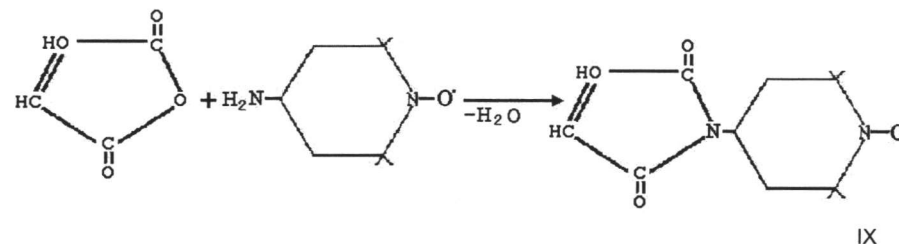
Продукт реакции *p*-хлордiazобензосульфокислого эфира-2,2,6,6-тетраметил-4-

оксипиперидин-1-оксил (VII) был очищен перекристаллизацией из этанола. (таблица 1)

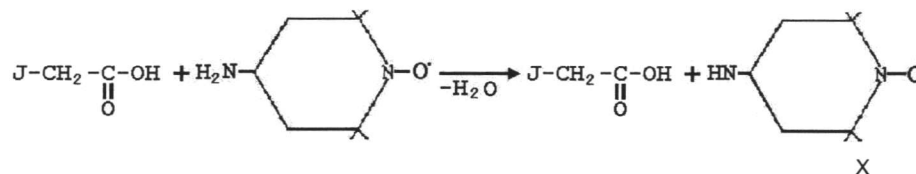
Спиновые метки нитроксильный бирадикал N,N'-бис(триазилил) пиперидины (VIII) 2,2,6,6-тетраметил-4-малеимидопиперидин-1-оксила (IX); 2,2,5,5-тетраметил-3-малеимидопирролидин-1-оксила (X); 2,2,6,6-тетраметил-4-йодацетомидопирролидин-1-оксила (XI-XII) и спиновые зонды (XIII-XIV) нами были получены по ранее описанному методу (Таблица 1) по схеме:



VIII



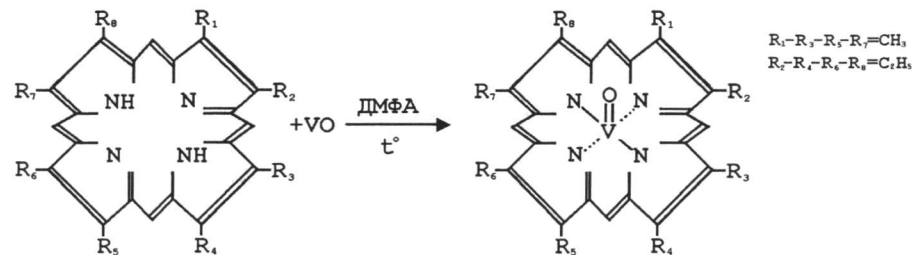
IX



X

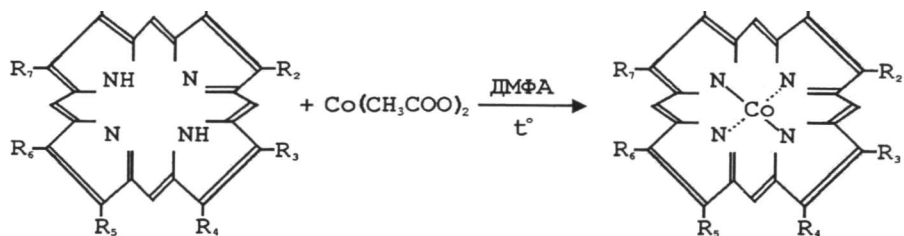
Синтезированные спин-метки VIII, IX, X реагируют с SH, amino- и гидроксильными группами белков и полимеров. (Таблица 1)

Нами впервые разработана методика получения спиновых зондов (XV и XVI) Таблица 1) на основе комплекса синтетического этиопорфирина с окисью ванадия (VO) и усуснокислового кобальта Co(CH₃COO)₂ путем переметаллирования по схеме:



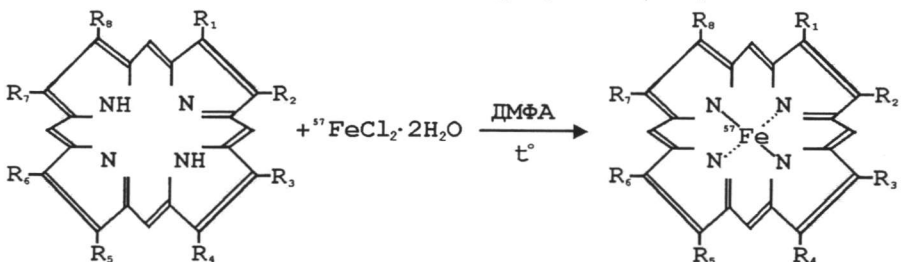
R₁-R₃-R₅-R₇=CH₃
R₂-R₄-R₆-R₈=C₂H₅

XV



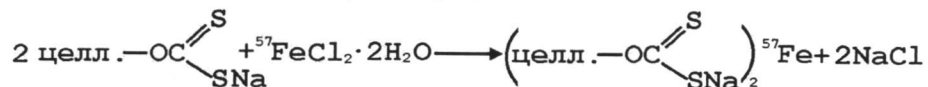
XVI

Впервые разработан и получен мессбауэровский зонд на основе этиопорфирина с изотопом $^{57}\text{Fe}^{2+}$ и $^{57}\text{Fe}^{3+}$ по следующей схеме реакций:



XVII

Получена мессбауэровская метка на основе изотопов $^{57}\text{Fe}^{2+}$ и $^{57}\text{Fe}^{3+}$ с ксантогенатом целлюлозы и МКЦ по следующей схеме:



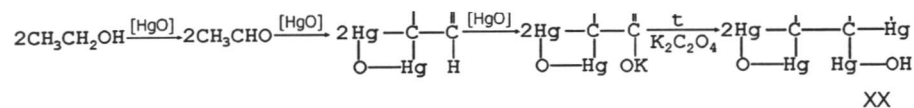
XVIII

Аналогично получен ксантогенат целлюлозы и МКЦ с изотопом железа $^{57}\text{Fe}^{3+}$. (XIX)

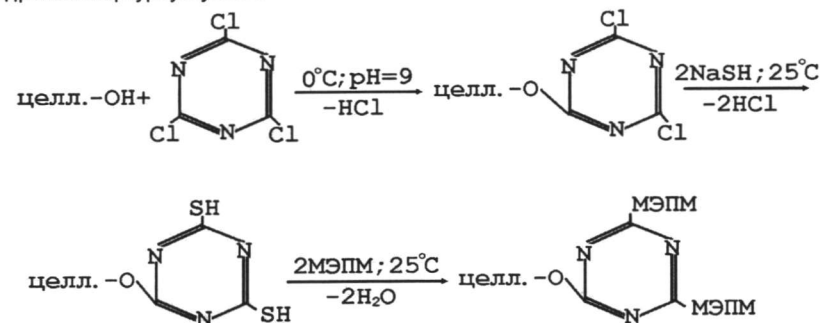
Определение топографии функциональных групп и участков сложных биологических систем является важнейшей задачей при их исследовании. Для этих целей особенно перспективным представляется метод электронно-плотных меток. Метод основан на специфической модификации избранных функциональных групп соединениями, содержащими в своем составе группировки тяжелых металлов, с последующим наблюдением модифицированных объектов с помощью электронного микроскопа.

Электронно-плотными метками могут служить соединения, обладающие свойством эффективно рассеивать электроны. Этому требованию вполне удовлетворяют атомы многоядерных металлоорганических соединений (в частности, полимеркуриалы), включающие в свою структуру группировки из нескольких близко расположенных тяжелых атомов ртути – меркарбидная электронно-плотная метка (МЭПМ).

Схема реакции следующая:



Вначале этиловый спирт окисляется окисью ртути до уксусного альдегида, который затем меркурируется в ангидрид тригидроксилюксусного альдегида. Последний окисляется второй молекулой окиси в калиевую соль тригидроксилюксусной кислоты. При нагревании двух молекул этого соединения, выделяется оксалат калия и образуется меркарбид или меркарбидная электронно-плотная метка (МЭПМ). МЭПМ (XX) способна вступать в реакции нуклеофильного замещения с гидроксил- или аминогруппами белка или полимера с образованием прочной ковалентной связи, с использованием в качестве реагента посредника цианурхлорид (2,4,6 - трихлор - 1,3,5 - триазина) по схеме: тригидроксилюксусного



Таким образом, с использованием хорошо разработанных методов органической химии нами синтезированы многочисленные спиновые метки и зонды на различные белковые и полимерные группы SH, аминогруппы лизина, гистидина и гидроксильные группы аминокислот.

2.2. Получение спин-меченых белков и ферментов.

Реакция спин-метки по SH-группе белков и ферментов.

Важной предпосылкой применения метода спиновых меток является избирательная посадка метки на определенную белковую группу без затрагивания свободной валентности. Это требует подготовки специальных методов синтеза спин-меченых препаратов.

Получение спин-меченых препаратов белков, обычно проводится в несколько стадий:

1. Стадия инкубации раствора белка с раствором метки. Обычно используют избыточную концентрацию спиновых меток. Однако в случае большой специфичности химически активного участка добавляют эквивалентное количество реагента. Это дает возможность непосредственно следить за кинетикой модификации методом ЭПР.

реагента. Наиболее удобным методом очистки является диализ и хроматография на Сефадексе.

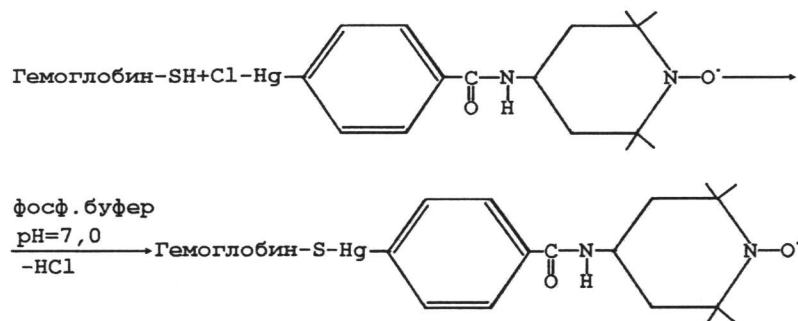
3. Определение числа (n) меток, присоединившихся к белку.

Определение (n) можно проводить путем количественного сравнения спектров ЭПР замороженных растворов меченых белков с разбавленными стандартными растворами радикалов в водноглицериновых стеклах. В том и другом случае спектры ЭПР, как правило, соответствуют индивидуальным невзаимодействующим радикалам и имеют практически идентичную форму линий. Это позволяет вычислять концентрацию радикалов по отношению линий высот сигналов.

В работе использовались высокоочищенные препараты белков гемоглобина быка, сывороточного альбумина человека, лизоцима яиц фирмы "Reanal" и фермента глутамат-аспаратат-трансаминазы из сердца свиньи, предоставленные Институтом молекулярной биологии.

Наиболее удобным объектом для модификации гемоглобина спиновыми метками является сульфгидрильная группа β -93. На разном расстоянии от SH-группы находятся функциональные другие группы, способные принимать на себя дополнительные спин-метки. Предварительное блокирование SH-группы ПХМБ препятствовало посадке метки.

Спиновые метки I, II, III, IX, X, XI, XII были использованы для модификации сульфгидрильной группы белков и ферментов по схеме:



После инкубации раствора гемоглобина быка, с меткой I, II, III при pH=7,0 в 0,05M фосфатном буфере в течении 12-15 часов при температуре 2-3°C проводилась гель-фильтрация смеси на сефадексе G=50. Анализ фракции на содержание гемоглобина спектрофотометрическим методом и на содержание радикала методом ЭПР показал, что фракции, содержащие гемоглобин, дают сигналы ЭПР, свидетельствующие о наличии слабозаторможенного радикала с частотой вращения $\tau=10^{-8}$ с. Интенсивность сигнала ЭПР была пропорциональна содержанию белка. При инкубации смеси соотношение радикала I и гемоглобина соответствовало 1:1, происходило практически количественное присоединение радикала. Кинетика процесса исследовалась методом ЭПР. Присоединившийся радикал прочно удерживался белком при хроматографировании на сефадексе и при изменении pH раствора от 4,0 до 11,0.

Аналогичным образом проводилась реакция, очистка и идентификация

продуктов реакции гемоглобина со спиновыми метками IX, XI, XII. Спектр ЭПР спин-меченого гемоглобина соответствовал сильно заторможенному радикалу, с частотой вращения $\tau=10^{-7}$ с, что свидетельствует о проникновении метки глубоко в белковую матрицу.

Влияние pH и тепловой денатурации. Опыт показал, что параметры спектров ЭПР слабо заторможенного радикала I, присоединенного к SH-группе гемоглобина, мало чувствительны к изменению pH среды, в то время как молекулярное движение сильно заторможенного радикала (IX-X) существенно зависит от степени ионизации белковых групп. В районе изоэлектрической точки гемоглобина спектр ЭПР радикала IX свидетельствует о его плотной упаковке в белковой матрице. При уменьшении pH до 5,0 и ниже, когда начинается протонизация карбоксильных ионов, сопровождающаяся распадом гемоглобина на субъединицы, молекулярное движение метки растормаживается. Особенно интересен факт увеличения интенсивности молекулярного движения при pH>7,0. В этой области обычно не наблюдается серьезных перестроек всей макромолекулы. По-видимому, изменения ЭПР спектров отражают тонкие локальные изменения конформаций гемоглобина в районе метки. По мере дальнейшего увеличения pH частота вращения метки возрастает вплоть до свободного вращения в водных растворах. Трансформация из сильнозаторможенного состояния в слабозаторможенное происходит при pH=9,0. Вид спектров ЭПР денатурированных модифицированных препаратов свидетельствует о том, что часть метки I теряет свою подвижность, вследствие того, что тепловая денатурация сопровождается образованием слипшихся запутанных полипептидных клубков (появление дополнительных линий с большими СТС расщеплениями, в то время как другая часть получает большую свободу молекулярного движения). Аналогичная картина наблюдается для гемоглобина, модифицированного меткой IX и X.

Влияние электронной структуры гемина на спин-метки. Влияние электронной структуры геминной группы на состояние спиновых меток I и XI изучалось в серии опытов, в которых изменение состояния геминного железа достигалось путем изменения его валентного состояния или посредством варьирования лигандов в координационной сфере железа.

Изменение состояния железа путем замены H_2O на O_2 или CO, которое сопровождается значительными изменениями в электронных спектрах железа, практически не оказывало влияния на спектры ЭПР присоединившихся спиновых меток. Однако, увеличение валентности железа до трех вызвало определенные изменения в спектрах ЭПР, ширина центральной и правой компонент спектра ЭПР спин-метки I и IX уменьшалась.

Наиболее вероятным объяснением наблюдаемых эффектов нам представляется предположение об аллостерическом характере воздействия изменения электронной структуры гемина на молекулярное движение свободно-радикальной метки. Это воздействие осуществляется на довольно значительном расстоянии (около 20Å). β -93 SH-группа, к которой непосредственно присоединена метка, отделена от гистидина FC-4 пятнадцатью связями, и влияние передается, по-видимому, по более короткому пути, через смежные цепи посредством кооперативного конформационного механизма.

Изучение тиоловых групп фермента глутамат-аспаратат-трансаминазы

методом спиновых меток. Известно, что тиоловые группы в аспартат-трансаминазе можно подразделить на две основные категории:

а) существенные для активности (две SH-группы в расчете на мол. вес фермента);

б) несущественные для активности SH-группы (6-8 групп на мол. вес), большая часть которых легко алкилируется или окисляется.

Спиновые метки IX и X, содержащие реактивный малеимидный остаток, реагируют при pH 5,5 с двумя тиоловыми группами, аспартат-трансаминазы. Меченый препарат фермента после отделения избытка спин-метки на колонке с Сефадексом G-25 имеет при нейтральных pH характерный спектр ЭПР, который кроме основного триплета обнаруживает уширенную компоненту в области полей низкой частоты. Спектры ЭПР меченого препарата свидетельствуют о неоднородности центров связывания. В одном из них время релаксации спин-метки имеет порядок 10^{-9} сек., в другом практически неотличимо по порядку величины от времени релаксации макромолекулы.

В соединении аспартат-трансаминазы и радикала II содержится около 6 молекул радикала на одну молекулу фермента, поэтому спектр ЭПР меченого фермента в этом случае состоит, по крайней мере, из двух налагающихся линий.

Спектры ЭПР присоединенных спин-меток претерпевают изменения при изменении pH среды. В указанных пределах pH химические свойства меток не изменяются и, следовательно, спектральные превращения могут быть отнесены за счет увеличения или уменьшения подвижности спин-метки. При сдвиге pH от нейтральных значений в кислую (pH 5,5) или щелочную (pH 9,0) область, подвижность радикала XI, присоединенного к SH-группам трансаминазы, возрастает. При переходе в кислую или щелочную среду также наблюдается уменьшение интенсивности уширенных компонент спектров ЭПР.

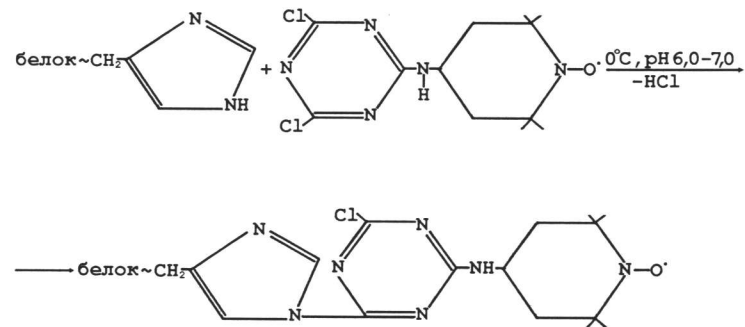
Блокирование SH-групп трансаминазы радикалом II или XI ингибирует ее ферментативную активность. Во время инкубации аспартат-трансаминазы pH 6,8 с двумя эквивалентами радикала II в расчете на 1 молекулу фермента происходило падение активности фермента по реакции 1^{го} порядка с константой скорости около 16 мин^{-1} .

Спектр ЭПР спин-метки XI на апоферменте глутамат-аспартат-трансаминазы, был практически идентичен со спектром ЭПР фермента после присоединения к глутамат-аспартат-трансаминазе кофермента пиридоксальфосфата. Это свидетельствует о том, что упаковка кофермента в белковую матрицу не меняет ее конформации в области спин-меченых SH-групп белка.

Таким образом, нами была проведена модификация гемоглобина и глутамат-аспартат-трансаминазы спиновыми метками I, II, III, IX, X, XI, XII по сульфгидрильной группе. В изученных областях выявлена высокая чувствительность спектров ЭПР спиновых меток к изменению локальной конформации белков при изменении степени ионизации pH среды, при проведении тепловой, кислотной и щелочной денатурации.

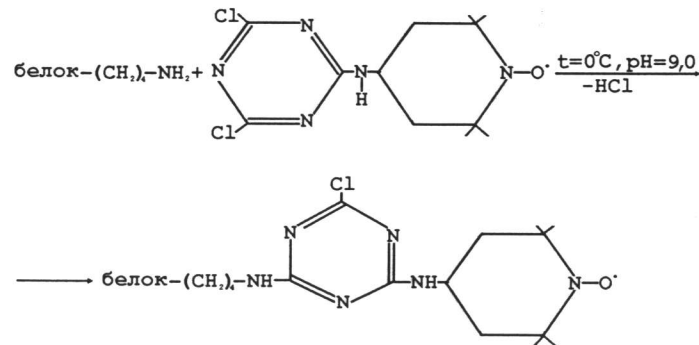
Реакция спин-метки по гистидиновой и ϵ -NH₂ группам лизина белка. Ранее было установлено, что соединения, содержащие дихлортриазинный остаток, могут присоединяться к депротонизованным формам белковых гистидиновых и лизиновых групп посредством реакции нуклеофильного замещения с выделением HCl и образованием прочной ковалентной связи. Поэтому нами были синтезированы спиновые

метки IV, V, VI, VII, химическая структура которых позволяла ковалентное присоединение к имидазольному кольцу гистидина и ϵ -NH-группы лизина белка (таблица 1). При этом имеется принципиальная возможность избирательных реакций, поскольку РК гистидиновых групп (6,5-7,5) существенно отличается от РК лизиновых остатков (9,5-10,5). В частности реакция радикала IV с сывороточным альбумином человека, гемоглобином быка и лизоцимом яиц при различных pH протекает по схеме:



В реакции лизоцима со спин-метками IV, V, VI при pH=7,0 в фосфатном буфере присоединялась только одна молекула радикала к гистидину белка, т.к. в молекуле лизоцима имеется одна единственная гистидиновая группа. Если предварительно заблокировать гистидиновый остаток лизоцима специфическим реагентом 5-амино-1-Н-тетразолий моногидратом, присоединение спин-меток к молекуле лизоцима не происходило.

Спин-меченые образцы альбумина, полученные при pH=6,0-7,0 легко присоединялись к гистидину белка. Поскольку в сывороточном альбумине, на поверхности которого находится около десяти легкодоступных гистидиновых групп, которые легко модифицировались спин-метками с получением спин-меченных препаратов альбумина и давали практически идентичные спектры ЭПР. Поскольку лизиновых групп в альбумине значительно больше, чем гистидиновых, можно предположить, что первые будут алкилироваться предпочтительнее при pH=9,0-12,0 по следующей схеме:

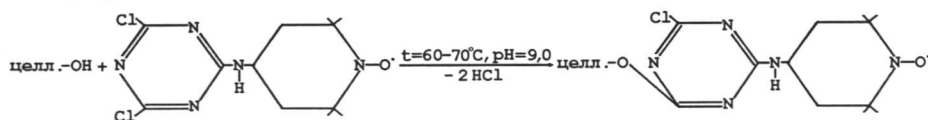


Действительно, суммарный спектр ЭПР образцов меченых при pH=9,0-12,0 должен отличаться от соответствующих спектров ЭПР при нейтральных pH, когда ε-NH₂-группы лизина закрыты протонами. Однако при повышении pH до 10,0-10,5 начиналось присоединение метки к ε-NH₂- лизиновым группам гемоглобина. Сывороточный альбумин человека и лизоцим яиц в щелочных средах также присоединял определенное количество меток к ε-NH₂- лизиновым группам.

Реакции присоединения спиновых меток к гидроксильной группе целлюлозы. Природная целлюлоза представляет собой волокнистое высокомолекулярное соединение. На основании многочисленных исследований установлено, что молекула целлюлозы состоит из большого числа остатков ангидридо-β-Д-глюкозы, соединенных между собой 1,4-β-глюкозидными связями. Структура целлюлозы и структурные изменения при любых обработках (механических, физико-химических и химических) определяют ее реакционную способность и физическое состояние.

В качестве объектов исследования использовались высокоочищенные волокна хлопка, полученные из различных селекционных сортов, а также из растений пораженных вилтом. Исследовались средневолокнистые сорта хлопка 108-Ф, «Ташкент-1», «Ташкент-2», С-4727, Cluster-2, 2421-у и тонковолокнистый сорт 5595-В, выращенные на опытной базе НИИ земледелия Госагропрома Республики Таджикистан, и образцы α-целлюлозы, полученные из хлопкового волокна путем щелочной обработки. В дальнейшем в тексте образцы волокна, полученных из растений, не пораженных вилтом, условно называются «здоровыми», а волокна из растений, пораженных вилтом – «большими».

В качестве спиновых меток и зондов использовали нитроксильные радикалы IV, V, VI, приведенные в Таблице 1, содержащие в своей группе специфические реакционно-способные фрагменты, полученные нами. Реакция присоединения спин-метки к гидроксильной группе целлюлозы проводилась при pH=9, в фосфатном буфере при температуре 60-70°C по схеме:



Спектры ЭПР образцов, модифицированных спин-метками IV-VI имеют вид, соответствующий сильно заторможенному вращению радикала. Это свидетельствует о том, что спиновая метка проникает достаточно «глубоко» в аморфную часть волокна, где движения ее затруднены. (Рис.2).

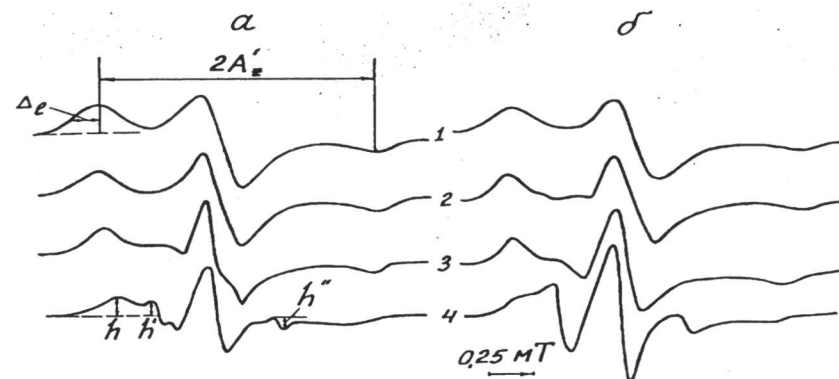


Рис.2. Спектры ЭПР спин-меченных волокон хлопка: а – сорт "5595-В", б – "Ташкент-1" (здоровый). Относительная влажность P/P_s=0,96. Температура регистрации спектров: 1) -150°C; 2) -60°C; 3) 50°C; 4) 100°C. Условия регистрации: частота ВЧ модуляции 100 КГц, амплитуда ВЧ модуляции 1,6 Гс, микроволновая мощность 2 мВт.

Таким образом, нами получены препараты ряда белков гемоглобина быка, альбумина человека, лизоцима яиц и глутамат-аспартат-трансаминазы, к функциональным группам которых, посредством ковалентной связи, присоединены спиновые метки. Всего получено более 58 спин-меченных препаратов белков и ферментов.

Впервые разработаны способы химической модификации хлопковой целлюлозы и ее производных по гидроксильной группе спиновыми метками и зондами. По спектрам ЭПР спин-меченных образцов сделано заключение, что метка проникает «глубоко» в аморфную часть волокна и вращение ее сильно заторможено.

3. Изучение структуры хлопковых волокон методом спиновых меток и спиновых зондов.

Высокая гигроскопичность исследуемых волокон хлопка требовала тщательного учета условий эксперимента для получения образцов волокон с различным содержанием влаги.

Относительную влажность образцов (P/P_s = 0,96) задавали, помещая их на 5 суток в специальную камеру, атмосфера которой сообщалась с раствором H₂SO₄ определенной плотности. Исследования температурных зависимостей спектров ЭПР спин-меченых образцов выполняли в диапазоне температур от 77 до 393°K. Температуру контролировали с точностью ±2° при помощи термпары, вставленной в образец.

Число нитроксильных радикалов, присоединившихся к образцу целлюлозных волокон определяли путем сравнения спектра ЭПР меченого волокна со спектром эталонного водно-глицеринового раствора при температуре 77° K, используя формулу:

$$R_{обр} = R_{эт} \frac{h_{обр} (\Delta H_{обр})^2}{h_{эт} (\Delta H_{эт})^2};$$

Где, R_{эт}; R_{обр} – концентрация спин-меток в эталоне и образце соответственно; h_{эт}, h_{обр} – амплитуда центрального компонента спектра ЭПР эталона и образца; ΔH_{эт};

$\Delta H_{обр}$ – ширина центральных компонентов спектра ЭПР образца и эталона.

Вращательная подвижность спиновых меток и зондов в хлопковом волокне. Параметры вращательной подвижности нитроксильных радикалов зависят от состояния и подвижности молекул окружающей среды.

В зависимости от значения времени корреляции τ (соответственно частоты ν) вращения радикала различают быстрые движения ($\nu \approx 10^{10}$ - $5 \cdot 10^8 \text{сек}^{-1}$), медленные движения ($\nu \approx 5 \cdot 10^8$ - 10^7сек^{-1}), а также сверхмедленные движения ($\nu < 10^7 \text{сек}^{-1}$). На рис.3 представлены спектры ЭПР спин-меченых волокон хлопка при различных температурах. Как видно из рисунка, спектральные параметры и характер их изменений с температурой зависят от типа полимера и степени его гидратации.

При температуре $\geq 273^\circ\text{K}$ в спектрах увлажненных образцов наблюдается уширение линий спектра при одновременном уменьшении величины параметра $2A'_z$.

Подобные эффекты вращательного уширения линий свидетельствуют о появлении движений спиновых меток, характеризующихся τ_c от $\approx 3 \cdot 10^{-6}$ до $\approx 3 \cdot 10^{-7}$ с. В сухих образцах в том же температурном интервале уширение спектральных линий не наблюдается, а уменьшение $2A'_z$ начинается при более высоких температурах.

При температурах $> 273^\circ\text{K}$ в спектрах ЭПР увлажненных образцов появляются компоненты h' и h , характерные для спектров ЭПР быстро вращающихся радикалов ($\tau_c < 10^{-8}$ с). Амплитуды этих компонентов резко возрастают при дальнейшем росте температуры. Относительную долю быстро вырастающих радикалов характеризует параметр h'/h . Как видно из рис.3, образцы хлопковых волокон разных видов существенно различаются по степени чувствительности параметра h'/h к изменению температуры.

Более детальный анализ формы линий спектров ЭПР в диапазоне температур 303 - 333°K позволил предположить, что эти спектры являются наложением двух сигналов ЭПР, соответствующим радикалам с различной подвижностью.

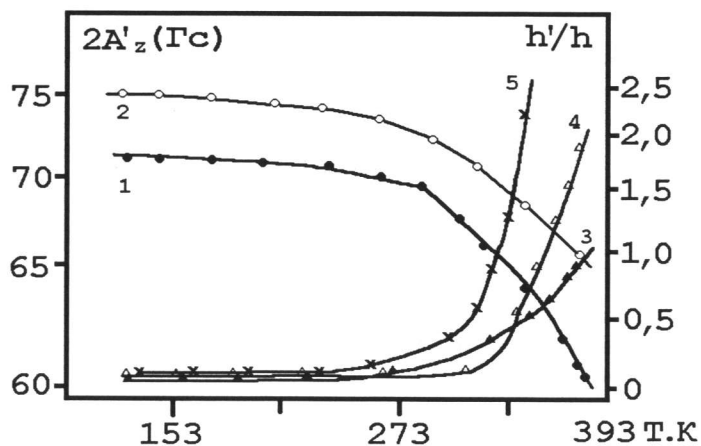


Рис.3. Графики температурных зависимостей параметров $2A'_z$ и h'/h спектров ЭПР спин-меченых

волокон хлопка при относительной влажности $P/P_s=0,96$:

$2A'_z$ – образцы "5595 – В"(1), "Ташкент-1" (здоровый) (2), h'/h – образцы "5595-В"(3), "Ташкент – 1" (здоровый) (4), "Ташкент – 1" (большой) (5).

С помощью этих зависимостей было показано, что образцы волокон хлопчатника, пораженного вилтом, отличаются от волокон здорового хлопчатника относительно большим содержанием (n) участков рыхлой фазы (структурных дефектов), в которых спиновые метки вращаются быстрее. Так, например, для волокон «большого» сорта «Ташкент-1» $n=28 \pm 2\%$, а для «здорового» $n=6 \pm 2\%$. С увеличением температуры интенсивность движений в каждой фазе («рыхлой» и «жесткой») растет, однако относительное содержание рыхлой и жесткой фазы практически не меняется с температурой. Значения эффективной энергии активации вращения спиновых меток, локализованных в рыхлой и жесткой фазах, составляют соответственно, 19,3 и 51,7 кДж/моль.

Локализация спиновых меток в волокнах хлопка и целлюлозы

Спектры ЭПР спин-меченых волокон хлопка и α -целлюлозы, как в сухом, так и в увлажненном виде при комнатной температуре близки к спектрам ЭПР для волокон хлопка. Форма спектра ЭПР свидетельствует о том, что большая часть меток вращается медленно со времени корреляции $\tau_c=10^{-8}$ с, меньше 10% меток вращаются быстрее. Сильное торможение спин-метки обусловлено тем, что метка погружена в целлюлозную матрицу.

Для сравнения структуры волокон хлопка и α -целлюлозы был использован способ анализа формы линий ЭПР спин-меченых образцов, позволяющий получать качественные данные в виде определения расстояний между метками. В качестве примера такой расчет проводился для спектров ЭПР обоих образцов, снятых при 77°K . Анализ формы линий ЭПР спин-меченого хлопка при большой концентрации радикала IV в инкубационной среде дает среднее расстояние между спинами радикалов 1-1,2 нм.

В отличие от хлопка в α -целлюлозе диполь-дипольные взаимодействия не обнаруживаются, это означает, что в α -целлюлозе радикалы находятся на расстояниях, больших 2-3 нм. При концентрации спин-метки IV в инкубационной среде $\sim 10^{-3}$ моль/л к 1 г. хлопкового волокна присоединяется $\sim 10^{18}$ молекул спин-метки. Так как молекулярная масса мономерного звена $(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_n$ равна ~ 200 , то один радикал приходится приблизительно на 3000 мономерных звеньев. Несмотря на столь малую степень модификации, радикалы присоединяются рядом, на расстоянии 1-1,2 нм друг от друга, по всей видимости, к соседним мономерным звеньям. Это можно объяснить тем, что в хлопковом волокне лишь небольшая доля мономерных звеньев ($\sim 1/300$) доступна модификации, а основная часть звеньев спрятана внутри волокон. В α -целлюлозе доступна большая, по сравнению с хлопковым волокном, доля звеньев.

На основе полученных результатов строение волокон хлопка и α -целлюлозы можно представить следующим образом. Микрофибриллы образуют толстые волокна, причем некоторые из них, не переплетаясь с другими, торчат из волокна, образуя своего рода «щетину». Эта «щетина» стерически препятствует присоединению спин-меток к гидроксильным группам, расположенным на поверхности толстого волокна. В α -целлюлозе доступна большая сравнительно с хлопком доля звеньев. По-видимому, в α -

целлюлозе доля свободных микрофибрилл больше, чем в хлопке, т.е. в α -целлюлозе волокно более расплетено.

Сопоставление молекулярно-динамических и механических свойств волокон. Основными надмолекулярными структурами в полимерных волокнах являются микрофибриллы, ориентированные как и полимерные цепи, вдоль оси волокна. Микрофибриллы состоят из чередующихся кристаллических и аморфных областей. Последние являются слабыми участками структуры, главным образом, из-за неравномерного распределения цепей по длине, и, следовательно, по нагрузкам. Наиболее короткие цепи перенапряжены, и с них начинается разрушение ориентированного полимера. Кинетика накопления разорванных связей под нагрузкой является основой механизма разрушения полимеров. Поэтому нам было интересно использовать метод спиновых меток для сопоставления с параметрами, характеризующими механическую прочность хлопкового волокна различных сортов.

Для описания механических свойств хлопковых волокон используется уравнение С.Н.Журкова

$$\tau = \tau_0 \exp[(U_0 - \gamma\delta) \cdot RT] \quad (2);$$

где τ – длительность существования полимерного волокна в напряженном состоянии до разрыва; δ – напряжение в момент разрыва волокна; T – абсолютная температура; R – универсальная газовая постоянная; U_0 – энергия активации разрушения в отсутствие напряжения; γ – структурно-чувствительная постоянная волокна; τ_0 – постоянная, принимаемая равной 10^{-13} с.

В таблице 2 приведены результаты исследования волокон методом спиновой метки, которые сопоставлены с параметрами δ_p и γ , характеризующими механическую прочность волокна. Механическая прочность образцов, характеризуемая величиной параметра δ_p , убывает в ряду «5595-В» > «Ташкент-1» здоровый > «Ташкент-1», пораженный вилтом, а величина параметра γ возрастает. В той же последовательности растут значения параметра n (доли «рыхлой» фазы) и параметра ξ характеризующего скорость прироста величины h'/h в области температур $T > 333$ К. Параметр ξ может быть использован в качестве удобного экспериментального параметра для прогнозирования механических характеристик хлопкового волокна.

Можно полагать, что механическая прочность полимера в значительной мере обусловлена наличием дефектных рыхлых областей, внутри которых происходит интенсивное молекулярное движение. При увеличении доли этих областей облегчается разрушение надмолекулярной структуры и уменьшается прочность волокна. Этот вывод соответствует современным представлениям о связи прочности полимеров с их микроструктурой.

Таблица 2.

Характеристика волокон хлопчатника по данным ЭПР
и измерений механической прочности

Тип волокна	Доля n рыхлой фазы, %	ξ (град ⁻¹)	δ_p (мн/м ²)	$\gamma \cdot 10^{-4}$ (м ³ /моль)
«5595 – В»	2 ± 0,5	0,009	280 ± 12	2,6
«Ташкент-1»	6 ± 2	0,030	180 ± 12	4,9

«Ташкент-1» (больной)	28 ± 2	0,070	150 ± 12	6,0
-----------------------	--------	-------	----------	-----

δ_p – величина напряжения разрыва волокна при 300° К; $\xi = d(h'/h)/dT$ – скорость прироста отношения h'/h с ростом температуры в области $\geq 333^\circ$ К.

Исследование структуры хлопковой целлюлозы методом ЯМР-релаксации. Значения времени релаксации T_1 и T_{2e} протонов измеряли для образцов волокон хлопка следующих селекционных сортов: 1 – «Ташкент-1 – здоровый», 2 – «Ташкент-1 – больной» и 3 – тонковолокнистый сорт 5595-В. В предварительных экспериментах было показано, что в спаде свободной индукции можно выделить начальный, быстро затухающий участок, относящийся к протонам цепей волокна, и медленно затухающий участок, относящийся к протонам адсорбированной воды. При значениях влажности до 40% релаксационные кривые имеют вид одной экспоненты, что говорит о единых временах спин-решеточной релаксации T_1 и T_{2e} протонов целлюлозы и адсорбированной воды. При всех значениях влажности величины T_1 были наибольшими для образца 1 (сорт 5595-В) и наименьшими для образца 3 (сорт «Ташкент-1 – здоровый») (рис.4).

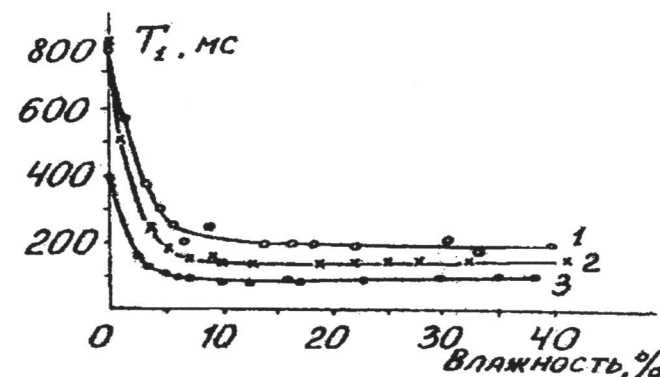


Рис.4. Зависимость времени T_1 спин-решеточной релаксации протонов в различных образцах хлопкового волокна от содержания воды при $T=298$ К. 1 – тонковолокнистый; 2 – «Ташкент-1» (больной); 3 – «Ташкент-1» (здоровый).

Как следует из рисунка 4, процент содержания воды, при котором достигается эффект насыщения по T_1 , примерно составляет 8-10%, т.е. примерно 2-3 молекулы воды на одно элементарное звено неупорядоченных областей структуры, доступных для воды. Исследуемые образцы хлопкового волокна располагаются в следующий ряд: тонковолокнистый «5595-В» < «Ташкент-1»-больной < «Ташкент-1»-здоровый.

Эти результаты коррелируют с литературными данными о степени упорядоченности волокон в разных сортах хлопка и, соответственно, с различным количеством доступных для воды центров адсорбции и замещения ОН и ОД, находящихся в неупорядоченных областях.

Таким образом, проведенное в настоящей работе комплексное исследование молекулярных, структурно-динамических свойств различных сортов хлопкового волокна с использованием спиновых и импульсных методик ЯМР позволило установить ряд общих закономерностей в этих свойствах.

Во всех исследованных образцах модификации метками и зондами подвергалась лишь незначительная часть хлопкового волокна, включающая, по-видимому, дефекты структуры. Образцы хлопковых волокон, выделенных из различных селекционных сортов хлопчатника, различаются между собой по количественным характеристикам молекулярной динамики. Общая тенденция заключается в том, что прочность волокон коррелирует с количеством рыхлых микродефектов структуры, характеризующихся временами корреляции $\tau \leq 10^{-9}$ с. По количеству дефектов исследуемые образцы располагаются в следующей последовательности: "5595-В" < "Ташкент-1"- здоровый < "Ташкент-1"- больной. Наблюдается также отличие в температурах, при которых регистрируются различные типы движений, как малоамплитудные высокочастотные вибрации, так и высокоамплитудные вращения меток. Увлажнение сухих образцов приводит к интенсификации всех видов молекулярных движений.

Полученные результаты свидетельствуют о важном значении надмолекулярной структуры в реализации механических свойств хлопкового волокна.

Применение метода ЯГР-спектроскопии в исследовании структуры хлопковой целлюлозы. Метод спиновых меток позволяет надежно регистрировать движение меток только в диапазоне частот 10^7 - 10^{10} сек⁻¹. К тому же, значительные размеры спиновых меток не позволяют непосредственно наблюдать за молекулярным движением отдельных участков групп полимера.

Метод мессбауэровских меток нашел применение для изучения молекулярно-динамических свойств биополимеров. Анализ параметров мессбауэровского спектра – величины поглощения γ -кванта без отдачи (f), пропорциональной интегральной интенсивности и ширине линии, позволяет определить амплитуду колебательных движений мессбауэровского атома в диапазоне 0,01-0,7Å и со временем корреляции - $\tau_c \leq 10^{-7}$ с.

Данная работа посвящена методическому вопросу использования мессбауэровского зонда (⁵⁷FeПК) в волокне и химической модификации хлопкового волокна мессбауэровской меткой путем образования ⁵⁷Fe-ксантогенатного комплекса.

Модификацию хлопкового волокна Мессбауэровским зондом XVI проводили следующим образом: 0,2 г хлопкового волокна обрабатывали 0,005 г раствора ⁵⁷FeПК в хлороформе. Вещество инкубировали в течении 10-12 часов при комнатной температуре, затем хлороформ отгоняли под вакуумом. На рисунке 5 приведены спектры ЯГР хлопкового волокна, модифицированного мессбауэровским зондом ⁵⁷FeПК (1) и самого зонда в кристаллическом состоянии (2).

Основные характеристики химического состояния спектра ЯГР кристаллического зонда и модифицированного хлопкового волокна при комнатной температуре практически одинаковы ($\Delta=0,60$ мм/с, и $\delta=0,37$), что свидетельствует об отсутствии влияния волокна на динамические характеристики зонда.

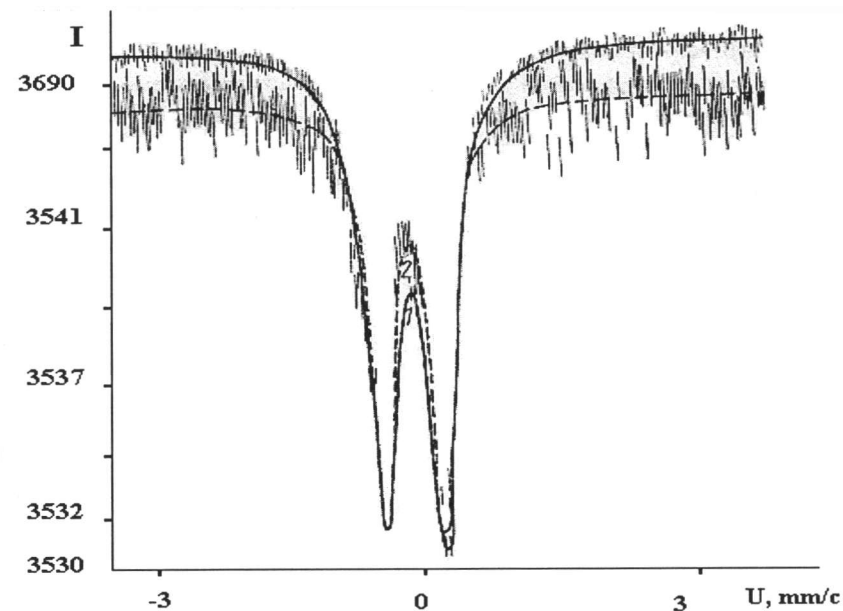


Рис.5. Спектры ЯГР модифицированного мессбауэровским ⁵⁷FeПК зондом хлопкового волокна (1) и самого зонда в кристаллическом состоянии (2) при T=25^oC. Время накопления импульсов 24 ч.

Химическую модификацию хлопкового волокна мессбауэровской меткой ⁵⁷Fe проводили по схеме, описанной в гл.2: получали ксантогенат целлюлозы, затем добавляли ⁵⁷FeCl₂·2H₂O в дистиллированной воде. Реакционную смесь оставляли на 30 минут. Затем ксантогенат целлюлозы с ионом железа ⁵⁷Fe²⁺ отжимали и тщательно промывали дистиллированной водой. Полученный продукт сушили при комнатной температуре.

Аналогично по этой схеме были проведены реакции ксантогената целлюлозы с ионом железа ⁵⁷Fe³⁺, а также ксантогената микрокристаллической целлюлозы с ионами ⁵⁷Fe²⁺, Fe и ⁵⁷Fe³⁺ в тех же условиях и при той же пропорции веществ. В качестве сравнительного эталона был получен изопропиловый ксантогенат железа ⁵⁷Fe²⁺.

Таким образом, объектами исследования являлись ксантогенаты хлопковой целлюлозы (таблица 3), меченные ⁵⁷Fe²⁺ и ⁵⁷Fe³⁺, в которых ионы ⁵⁷Fe связаны ковалентно (образцы I-III соответственно), а также изопропиловый ксантогенат железа ⁵⁷Fe²⁺ (III).

Таблица 3.

Параметры парциальных спектров ЯГР образцов целлюлозы, меченных ^{57}Fe при $T=25^\circ\text{C}$

Номер образца	Образец	Номер парциального спектра	Квадрупольное расщепление Δ , мм/с	Изомерный сдвиг δ , мм/с	Относительная площадь спектра S, %
I	Модифицированное хлопковое волокно, содержащее ксантогенат $^{57}\text{Fe}^{2+}$	1	0,53±0,029	0,60±0,03	46,6
		2	0,87±0,029	0,60±0,03	39,5
		3	1,25±0,029	0,60±0,03	13,9
II	Модифицированное хлопковое волокно, содержащее ксантогенат $^{57}\text{Fe}^{3+}$	1	0,52±0,029	0,60±0,03	52,6
		2	0,87±0,029	0,60±0,03	31,6
		3	0,96±0,029	0,54±0,03	15,8
III	Изопропилксантогенат $^{57}\text{Fe}^{2+}$	1	0,60±0,029	0,60±0,03	67,7
		2	0,87±0,029	0,63±0,03	32,3

*Указана первоначальная валентность ионов Fe при синтезе ксантогенантного комплекса

Спектры ЯГР резонансного поглощения для образцов I и II представляют собой четко выраженные дублеты с квадрупольным расщеплением и изомерным сдвигом, характерными для высокоспинового $^{57}\text{Fe}^{2+}$ и $^{57}\text{Fe}^{3+}$ (таблица 3).

Из таблицы видно, что в образце I ^{57}Fe входит в две фазы, которые соответствуют парциальным спектрам 2 и 3. Расчеты, приведенные для спектров ЯГР образцов I-II, показывают, что описание экспериментальных данных представляется возможным только при наличии трех парциальных спектров. Во всех модифицированных образцах основные фракции (1-я и 2-я) характеризуются близкими значениями параметров спектров ЯГР (Δ и δ), соответствующие параметрам модельной системы изопропилксантогената железа (образец III). Это свидетельствует о том, что, по крайней мере, большая часть ксантогенантного фрагмента мессбауэровской метки не вступает в химическое взаимодействие с функциональными группами целлюлозы. Эта фракция может служить в качестве сенсора на молекулярно-динамическое состояние хлопкового волокна в районе присоединения меток.

Таким образом, модификация хлопковой целлюлозы мессбауэровскими метками открывает перспективы непосредственного исследования динамических свойств надмолекулярной структуры хлопковой целлюлозы. Метод ЯГР-меток дает возможность определения молекулярной и конформационной подвижности окружающей среды в диапазоне частот $5 \cdot 10^6 \text{сек}^{-1}$, что обеспечивает преимущество их применения по сравнению с методом спиновых меток, который позволяет регистрировать конформационную подвижность в диапазоне $10^7 - 5 \cdot 10^{10} \text{сек}^{-1}$.

Метод электронно-плотных меток. Определение топографии функциональных групп и участков сложных биологических систем является важнейшей задачей при их исследовании. Для этих целей особенно перспективным представляется метод

электронно-плотных меток.

Метод основан на специфической модификации избранных функциональных групп соединениями, содержащими в своем составе группировки тяжелых металлов, с последующим наблюдением модифицированных объектов с помощью электронного микроскопа.

Электронно-плотными метками могут служить соединения, обладающие свойством эффективно рассеивать электроны. Этому требованию вполне удовлетворяют атомы многоядерных металлоорганических соединений (в частности, полимеркуриалы), включающие в свою структуру группировки из нескольких близкорасположенных тяжелых атомов ртути меркарбидная электронно-плотная метка (МЭПМ) с использованием в качестве реагента-посредника цианурхлорида (ЦХ) -(2,4,6-трихлор-1,3,5-триазина).

ЦХ способен вступать в реакции нуклеофильного замещения с гидроксильной группой целлюлозы с образованием прочной ковалентной связи.

Электронные микрофотографии модифицированной хлопковой целлюлозы были сняты на электронном микроскопе «Hitachi» НИ-125 Е-1 (Япония); ускоряющее напряжение – 100 кВ; увеличение – 700000.

На основании полученных данных электронной микроскопии установлено, что в модифицированной хлопковой целлюлозе видны электронно-плотные гранулы ртути размером 19-20Å, что соответствует размеру двух и трех близко расположенных молекул МЭПМ. Размер электронно-плотной метки равен приблизительно 6-7Å.

Этот результат естественно можно трактовать как следствие близкого расположения гидроксильных групп в макромолекуле хлопковой целлюлозы. Такой вывод хорошо согласуется с данными, полученными нами методом ЭПР спиновых меток.

Таким образом, приведенные выше экспериментальные данные показывают, что применение в качестве реагента-посредника ЦХ позволяет избирательно тиолировать гидроксильные группы хлопковой целлюлозы и полимеров, что дает возможность значительно расширить метод электронно-плотных меток и позволяет изучить топографию избранных функциональных групп в белках, ферментах и природных полимерах.

Исследование структуры микрокристаллической целлюлозы методом спиновых меток. В работе было проведено сравнительное исследование молекулярной структуры микрокристаллической целлюлозы (МКЦ) из средневолокнистого и тонковолокнистого хлопка, древесной целлюлозы и МКЦ из сахарного тростника, модифицированного спин-меткой IV.

На рис.6 приведены спектры спин-меченого образца МКЦ при температурах 20, 60 и 100°C. Как видно, в спектрах ЭПР при указанных температурах имеются различия быстро- и медленно вращающихся компонентов. С увеличением температуры при одинаковой влажности P/Ps=0,96 в исследуемых образцах МКЦ в суммарном спектре ЭПР наблюдается увеличение интенсивности компонентов быстро вращающихся сигналов ЭПР. На рис.6 (указаны стрелками) компонент I появляется при температуре 60°C и увеличивается вплоть до 100°C. При этом компонент II спектра ЭПР исчезает.

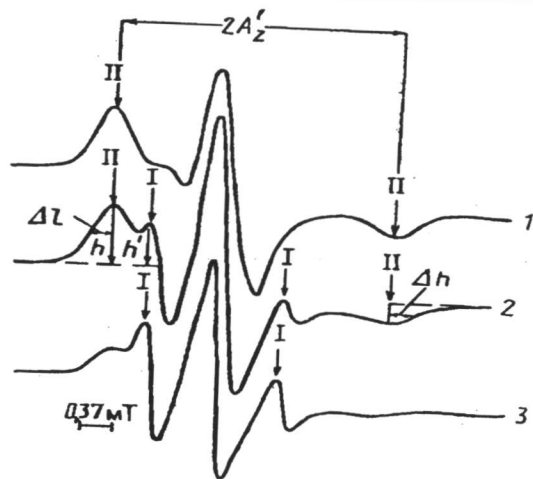


Рис.6. Спектры спин-меченой МКЦ из тонковолокнистого хлопка при температуре 20 (1), 60 (2) и 100°C (3) и относительной влажности $P/P_s=0,96$. Стрелками обозначены компоненты быстро- (I) и медленноповорачивающихся (II) радикалов.

Различия в температурных зависимостях исследуемых образцов свидетельствуют о различии в упорядоченности и степени неоднородности МКЦ. Для образца МКЦ из древесной целлюлозы в этом интервале температур компонент I не наблюдается. Однако компонент II проявляется во всем интервале температур. Эти данные свидетельствуют о том, что в МКЦ из древесной целлюлозы в местах локализации метки структура относительно однородна и метка движется со временем коррекции $\tau_c \sim 10^{-8}$ с.

Следует отметить, что сравнение набора параметров спектров ЭПР спин-меченых хлопковых волокон свидетельствует о том, что в местах локализации спиновых меток в МКЦ из сахарного тростника молекулярная подвижность среды в них существенно выше и, кроме того, в них присоединяется в 2-3 раза больше спиновых меток, чем в МКЦ из хлопкового волокна (табл.4).

Таблица 4

Характеристика спин-меченых МКЦ

№ п.п	Образец	$R \cdot 10^{18}$ Спин/г	$T_n, ^\circ\text{C}$	$\frac{d(\Delta I)}{dT}$	$T_{min}, ^\circ\text{C}$
I.	Тонковолокнистый хлопок	1,5	30	1,00	-10
II.	Средневолокнистый хлопок	5,)	0	1,52	10
III.	МКЦ из тонковолокнистого хлопка	3,0	0	1,79	30
IV	МКЦ из средневолокнистого хлопка	10,4	-60	3,71	-30
V	МКЦ из древесной целлюлозы	7,0	-30	2,50	10
VI	МКЦ из сахарного тростника	36,9	-30	1,76	20
VII	МКЦ из сахарного тростника, очищенная путем удаления гемицеллюлоз из холоцеллюлозы	25,5	-30	2,29	-

VIII	МКЦ из сахарного тростника, перегидролизованная сульфатным способом, отбеленная	38,7	-30	2,67	40
------	---	------	-----	------	----

Примечание: R – количество спиновых меток в образце.

Повышение содержания мест локализации спиновых меток в МКЦ из сахарного тростника свидетельствует о высоком содержании дефектов структуры в аморфных областях исследованных образцов. Таким образом, из этих данных можно предположить, что микроструктура МКЦ из тонковолокнистого хлопка и древесной целлюлозы более упорядочена по сравнению МКЦ из средневолокнистого хлопка и сахарного тростника.

По величине параметра $\frac{d(\Delta I)}{dT}$ (табл.4), характеризующего влияние

температуры на степень интенсификации мелкомасштабных движений с $\tau_c \geq 10^{-7}$ с, которые приводят к усреднению уширяющих линий диполь-дипольных взаимодействий нитроксильных радикалов с протонами окружающей среды, образцы МКЦ из средневолокнистого хлопка, древесной целлюлозы и сахарного тростника (IV,V и VII-VIII) отличаются большим значением $A \frac{d(\Delta I)}{dT}$. По-видимому, интенсивность этих движений

несколько выше по сравнению с соответствующими динамическими эффектами в других исследованных образцах.

Из данных табл.4 можно в порядке увеличения T_n расположить образцы следующим образом: IV<V VI VII VIII<III. Этот ряд соответствует увеличению подвижности с $\tau_c \leq 10^{-7}$ с в местах локализации метки. Однако по величине T_{min} образцы располагаются в следующем порядке: IV<V<VI<III<VIII. Этот ряд качественно соответствует более интенсивным крупномасштабным движениям с $\tau_c \leq 10^{-7}$ с в МКЦ из средневолокнистого хлопка по сравнению с МКЦ из тонковолокнистого хлопка и сахарного тростника. Таким образом, препараты МКЦ из сахарного тростника по динамическим свойствам по сравнению с МКЦ из хлопковых и древесных целлюлоз являются менее упорядоченными, что связано с особенностью формирования физической структуры в процессе биосинтеза ее макромолекул.

Применение метода ЯГР-спектроскопии для исследования структуры микрокристаллической целлюлозы. Для изучения структуры микрокристаллической целлюлозы (МКЦ) нами был использован метод ЯГР – спектроскопии. Химическую модификацию МКЦ мессбауэровской меткой путем образования $^{57}\text{Fe}^{2+}$ и $^{57}\text{Fe}^{3+}$ -ксантогенатного комплекса проводили аналогично по схеме реакции ксантогената хлопковой целлюлозы, описанной в главе 2, в тех же условиях и при той же пропорции веществ. В качестве сравнительного эталона был получен изопропиловый ксантогенат железа $^{57}\text{Fe}^{2+}$.

Таким образом, объектом исследования является ксантогенат МКЦ (таблица 5), меченный $^{57}\text{Fe}^{2+}$ и $^{57}\text{Fe}^{3+}$, в котором ионы ^{57}Fe связаны ковалентно (образец I), а также изопропиловый ксантогенат железа $^{57}\text{Fe}^{2+}$ (II).

Спектры ЯГР резонансного поглощения для образца I представляют собой четко выраженные дублеты с квадрупольным расщеплением и изомерным сдвигом,

характерными для высокоспинового $^{57}\text{Fe}^{4+}$ и $^{57}\text{Fe}^{3+}$ (таблица 5).

Таблица 5.
Параметры парциальных спектров ЯГР образца ксантогената МКЦ, меченного $^{57}\text{Fe}^{2+}$ при $T=25^\circ\text{C}$

Номер образца	Образец	Номер парциального спектра	Квадрупольное расщепление Δ , мм/с	Изомерный сдвиг δ , мм/с	Относительная площадь S , %
I	Модифицированная МКЦ, содержащая ксантогенат $^{57}\text{Fe}^{3+}$	1	0,52±0,029	0,60±0,03	57,1
		2	0,87±0,029	0,60±0,03	33,9
		3	1,05±0,029	0,60±0,03	8,9
II	Изопропилксантогенат $^{57}\text{Fe}^{2+}$	1	0,60±0,029	0,60±0,03	67,7
		2	0,87±0,029	0,63±0,03	32,3

Из таблицы видно, что образец I ^{57}Fe входит в две фазы, которые соответствуют парциальным спектрам 2 и 3. В модифицированных образцах МКЦ основные фракции (1-я и 2-я) характеризуются близкими значениями параметров спектров ЯГР (Δ и δ), соответствующие параметрам модельной системы изопропилксантогената железа (образец II). Полученные результаты свидетельствуют о том, что большая часть ксантогенатного фрагмента мессбауэровской метки не вступает в химическое взаимодействие с функциональными группами микрокристаллической целлюлозы из-за различия в упорядоченности и степени неоднородности МКЦ.

Эти данные дополняют ранее полученные результаты исследования структуры микрокристаллической целлюлозы методом спиновых меток.

Применение спиновых зондов для исследования структуры льняных волокон. Целлюлоза из льняной костры обладает определенными свойствами по сравнению с хлопковой и древесной целлюлозой. Для исследования структурной неоднородности (различной доступности) волокон льна, полученных из льносоломы и тресты различными способами приготовления, применен метод спинового зонда, который является уникальным методом обнаружения микрогетерофазности и структурной неоднородности полимера. В качестве зонда был использован нитроксильный радикал 2,2,6,6-тетраметил-4-оксиперидин-1-оксил (XXVII). Спектр ЭПР спин-зонда введенного в аморфные области стланцевого волокна льна характерен сильно заторможенному виду, что свидетельствует о жесткой структуре аморфных областей волокон льна, причем как показывают данные табл.6 наиболее жесткую структуру имеют аморфные области волокна, полученного физико-химическим способом ($\alpha=74$) и лубяного ($\alpha=77$)*.

Таблица 6

Параметры спектров ЭПР волокон льна, меченного зондом XIII

Способы выделения волокна из льна	α^*	$T \cdot 10^{-3} \text{ } ^\circ\text{C}$	$\nu \cdot 10^{-8} \text{ } ^\circ\text{C}$	Количество проникшего зонда в волокно, %
Расетил	84	1,3	0,70	3
Декортация	77	1,1	0,92	7
Мочка	80	1,1	0,90	5

Физико-химический (купл.)	74	1,0	0/96	9
---------------------------	----	-----	------	---

α^* - параметр области «медленных вращений», рассчитанный по спектрам ЭПР
 ν^{**} - величина, условно названная «частотой вращения» радикала.

По количеству проникшего в волокно спин-зонда можно сказать, что меньше всего аморфных областей содержит сланцевое волокно и больше всего волокно, полученное из тресты, приготовленной физико-химическим способом (КУПЛ). Таким образом, способ приготовления льняной тресты оказывает существенное влияние, как на химический состав, так и на структуру получаемого из нее волокна.

Изучение конформационной подвижности в хлопковой целлюлозе методом бирадикальной спиновой метки. В работе приведены результаты исследования методом ЭПР структура и конформационная подвижность хлопковой целлюлозы модифицированной нитроксильным бирадикалом триазинового ряда (XIII) (Таблица 1). Использование в качестве меток нитроксильных бирадикалов, позволяет получать информацию как о динамических особенностях среды вблизи метки, так и о влиянии окружения на расстоянии между парамагнитными центрами в бирадикальной системе.

Количество бирадикала присоединенного к хлопковой целлюлозе приходится примерно два на 1/300 мономерных звеньев, что представляет более доступной модификации макромолекулы хлопковой целлюлозы по сравнению с нитроксильным монорадикалом.

Спектры ЭПР бирадикала, химически внедренного в матрицу хлопковой целлюлозы, представляют собой заторможенные квинтиплеты (рис.7).

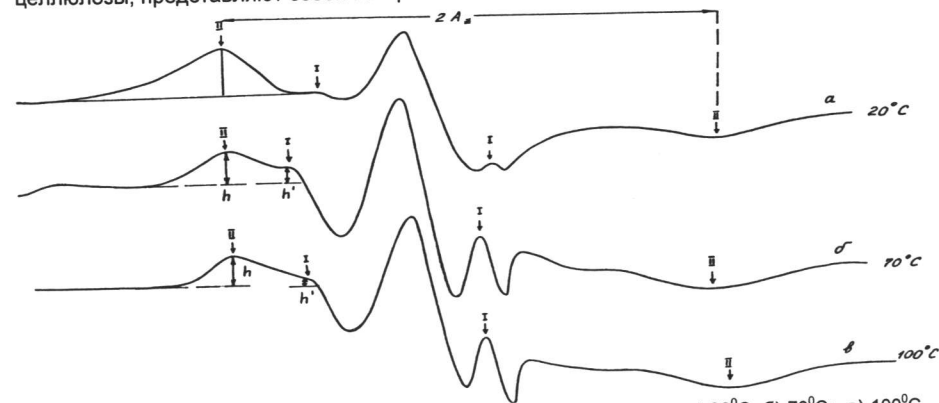


Рис.7. Спектр ЭПР бирадикала в хлопковой целлюлозе при температуре: а) 20°C; б) 70°C; в) 100°C. Влажность P/P_s=0,96.

Дополнительная информация нами получена при изучении спектров ЭПР спин-меченой хлопковой целлюлозы при температуре 20,70 и 100°C, влажности P/P_s=0,96 и замороженных образцов в жидком азоте.

При температуре 77°K в спектрах ЭПР появляется диполь-дипольное взаимодействие между неспаренными электронами, измерив величину которого, можно

рассчитать расстояние r между группами N-O^\bullet в бирадикале. При помощи легко измеряемого эмпирического параметра d_1/d , показано, что радикал в хлопковой целлюлозе находится на расстоянии $10,65 \text{ \AA}$ друг от друга.

С увеличением температуры в спектре ЭПР исследуемого образца наблюдается увеличение интенсивности компонента быстро вращающихся сигналов ЭПР (компонент I), который четко проявляется при температуре 70 и 100°C . При этом компонент II спектра ЭПР уменьшается. Изменение формы линий спектра ЭПР при повышении температуры следует объяснить, по-видимому, перестройкой структуры макромолекулы полимера, вызванной изменением системы меж- и внутримолекулярных водородных связей.

Таким образом, анализ параметров уширения и сдвига компонент спектра ЭПР бирадикала показывает, что радикал в хлопковой целлюлозе находится на расстоянии $10,65 \text{ \AA}$. При повышении температуры форма линий спектра ЭПР изменяется вследствие изменения системы меж- и внутримолекулярных водородных связей, что может дать важную информацию о механизме и молекулярном движении в хлопковой целлюлозе.

Использование ванадилпорфиринового комплекса в качестве спинового зонда для исследования структуры хлопковой целлюлозы. Ванадилпорфириновые комплексы в отличие от нитроксильных радикалов устойчивы к термическим и различным химическим воздействиям, что позволяет использовать их для изучения структуры целлюлозы в процессе гидролиза. Кроме того, наличие парамагнитного центра позволяет использовать эти соединения в качестве уширителей спектров ЭПР меток и зондов, а также в качестве гасителей флуоресценции и фосфоресценции люминесцентных меток и зондов.

Спектр ЭПР ванадилпорфиринов в хлороформе полностью соответствует наблюдаемому обычно резонансному поглощению четырехвалентного ванадия (V^{4+}), обусловленному неспаренным 3-d-электроном, присутствующим в молекуле. Поскольку ядерный спин ванадия равен $7/2$, СТС спектра V^{4+} состоит из 8 линий с одинаковыми q-факторами.

Спектр ЭПР ванадилпорфиринов, введенных в хлопковое волокно резко отличается от спектра ванадилпорфиринов в хлороформе. Он соответствует комплексу с заторможенным вращением, поэтому центральная линия имеет аномально высокую интенсивность и проявляются анизотропные члены q-тензора.

V^{4+} имеет большую константу сверхтонкой структуры (СТС). Это позволяет более точно оценивать. τ_c – время корреляции вращательной диффузии – параметр, характеризующий подвижность зонда в макромолекуле.

Для ВОПК в хлороформе $\tau_c \sim 6 \cdot 10^{-10} \text{ с}$ (табл.7), что близко к ожидаемому теоретически для частиц радиусу $4\text{-}5 \text{ \AA}$.

Хлопковая целлюлоза является очень гигроскопичной и при действии влаги изменяет конформационные свойства вследствие изменения системы водородных связей и содержания большого количества гидроксильных групп. При увеличении влажности волокна возрастает подвижность зонда, что проявляется в возрастании τ_c (табл.7). Параметры спектров ЭПР в увлажненных волокнах значительно выше по сравнению с сухими образцами.

Таблица 11
Параметры спектров ЭПР образцов хлопковых волокон, обработанных ВОПК

Образец	$2A_z$, гаусс.	ΔH_0 , гаусс	τ_c , секунд
ВОПК + CHCl_3	166	9,5	$6 \cdot 10^{-10}$
Целлюлоза + ВОПК (сухая)	280	16,0	$1 \cdot 10^{-9}$
Целлюлоза + ВОПК (влажная)	399	19,0	$1,2 \cdot 10^{-9}$

* A_z – расстояние между левой и правой компонентами спектра ЭПР.

** ΔH_0 – ширина линии центральной компоненты.

Для изучения процесса гидролиза целлюлозы ВОПК вводили в целлюлозную матрицу и гидролизовали 6N раствором азотной кислоты при 95°C в течение 3 часов и концентрированной серной кислотой в течение 2 минут.

Вид спектров ЭПР свидетельствует о том, что часть зонда теряет свою подвижность вследствие того, что гидролиз целлюлозы сопровождается распадом глюкозидных звеньев и разрушением неупорядоченных областей целлюлозы. В результате в спектре ЭПР происходит изменение в левом компоненте вследствие уширения линий, вызванного затормаживанием вращения зонда и большими константами СТС расщепления, в то же время другая часть зонда получает большую свободу молекулярного движения. Оценку показателя неупорядоченности (K) структуры проводили по соотношению интенсивностей центрального компонента (J_0) к низкочастотному компоненту (J_{+1}) спектров ЭПР.

$$A_x = \frac{J_0}{J_{+1}};$$

$A_x = 5,56$ – гидролизованный серной кислотой

$A_x = 5,0$ – гидролизованный 6 N азотной кислотой

$A_{\text{исх.}} = 3,84$ – хлопковая целлюлоза.

Отсюда следует, что показатель неупорядоченности в первом случае $K=1,44$, во втором $K=1,30$.

Таким образом, ЭПР спектр ванадилпорфиринов в хлопковом волокне чувствителен к молекулярному движению. Ванадилпорфириновые комплексы, введенные в хлопковую целлюлозу, позволяют проводить анализ ее структуры в процессе кислотного гидролиза, что представляется важным и перспективным в оценке молекулярной структуры хлопковой целлюлозы и ее производных.

4. Изучение структуры фиброина натурального шелка методом спиновых меток.

Фиброин натурального шелка обладает комплексом ценных свойств. Наличие разнообразных боковых заместителей (алкильные и аллильные ОН-группы, NH_2 -и COOH -группы), а также наличие сравнительно-подвижных H^\bullet у α -углеродного атома, дают возможность проведения разнообразных химических обработок, а также реакций прививок.

Для изучения химических процессов в полимерах важнейшую роль играют

конформационные и динамические свойства макромолекул, ее свободных и связанных сегментов, звеньев, боковых и концевых групп.

Для регистрации структурно-динамических изменений в полимерах, при физико-химических воздействиях, применяют различные методы. Наиболее распространенным и эффективным методом является метод спиновых меток и зондов. Этот метод существенно дополняет другие физические методы исследования полимеров, позволяющие получать уникальную информацию, которую невозможно получить другими методами. Это в значительной степени относится к исследованиям аморфных областей полимеров, их локальной молекулярной подвижности и структурной микронеоднородности.

Большое количество синтезированных нами спиновых меток и зондов (различной формы, структуры и размеров), позволяет осуществить выбор наиболее подходящих меток для модификации и решения конкретных физико-химических задач.

Исходные волокна натурального шелка (НШ) получали при размотке коконов тутового шелкопряда. Волокна фиброина натурального шелка (ФНШ) получали путем отварки волокон НШ от серицина. ФНШ имеет сравнительно простой аминокислотный состав: -44,5% остатков глицина, 29,3% аланина, 12,1% серина и 14,1% остатков других аминокислот.

При модификации спиновой меткой исследуемых образцов волокон ФНШ использовалась вышеописанная методика аналогичная модификации волокон хлопковой целлюлозы. В выбранных условиях модификация волокон натурального шелка местами присоединения спиновой метки может быть имидазольное кольцо гистидина и аминокислотная группа лизина в зависимости от условий реакций модификации.

Спектры ЭПР спин-меченых натурального шелка имеют сложную структуру (рис.8), которая наиболее четко проявляется при температурах выше 293°K.

При «замороженных» вращениях ($T=77^{\circ}\text{K}$), расстояние $2A'_z$ между крайними широкими пиками (КШП) спектров ЭПР для исследуемых образцов примерно одинаковое и равно $7,25 \pm 0,05$ мт. (рис.8).

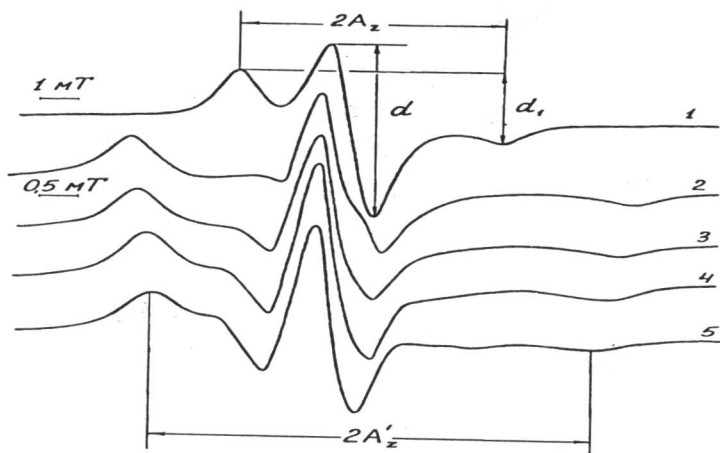


Рис.8. Спектры ЭПР спин-меченых волокон НШ при температурах T, K : 77(1), 261(2), 303(3), 333(4), 363(5).

Это свидетельствует о том, что свойства микросреждений в местах присутствия спиновых меток практически не меняются.

Параметр d_1/d —отношение суммарной интенсивности крайнего компонента d_1 замороженного спектра к интенсивности его центрального компонента (рис.8), использован для оценки локальных концентраций спиновых меток. Локальная концентрация спиновых меток (от $1,2 \cdot 10^{19}$ спин/см³ до 10^{19} спин/см³) в макромолекуле ФНШ мало меняется.

Различие в значениях локальной концентрации и средней по объему концентрации спиновых меток в волокнах НШ, а также характер изменения этих величин свидетельствует о том, что метки неравномерно распределены по образцу и, по всей вероятности, радикалы, в процессе модификации волокон, способны проникать только в аморфные области полимера. С другой стороны, наложение сигналов различного типа в наблюдаемом спектре ЭПР свидетельствует о том, распределение спиновой метки, возможно, в меж- и внутри фибриллярных участках волокон.

Вращательная подвижность спиновых меток в волокнах натурального шелка при различных температурах и влажности приведена на рисунке 8. Как видно из рисунка, основной вклад в наблюдаемый сигнал ЭПР, дают спиновые метки, находящиеся в более «жестких» (упорядоченных) областях аморфной фазы волокон натурального шелка. Для определения времени корреляции вращения этих меток τ используют спектральный параметр $2A'_z$. Результаты измерений этого параметра в температурном интервале $77+363^{\circ}\text{K}$, по экспериментальным спектрам исходного спин-меченого волокна показывают, что монотонное уменьшение $2A'_z$ от предельного значения $2A'_z$ (при $T=77^{\circ}\text{K}$) отражает поэтапное развитие молекулярных движений, так как подвижность спин-метки в полимере связана с движением различных кинетических элементов цепи (боковых групп, звеньев, сегментов).

В ИК спектрах волокон натурального шелка модифицированного спиновой меткой наблюдается увеличение интенсивности полосы в области частот валентных колебаний NH-групп ($3700-3100 \text{ см}^{-1}$), свидетельствующее об участии метки в образовании новых типов водородных связей со структурными группами шелка. При облучении УФ светом контрольного образца волокон натурального шелка (не меченого) до 45 часов не наблюдается каких-либо заметных изменений поглощения в данной области. Однако в спектрах меченых образцов наряду с изменением интенсивности полос в области $3700-3000 \text{ см}^{-1}$ происходит изменение контура(формы) и смещение максимума полосы поглощения при 3350 и 3100 см^{-1} .

Такое изменение контура полосы поглощения объясняется изменением пространственных структур макромолекулы натурального шелка, вероятно, за счет перестройки водородных связей. Сдвиг максимума полосы поглощения в области $3700-3000 \text{ см}^{-1}$ в сторону высоких частот свидетельствует о том, что УФ-облучение волокон НШ приводит к разрыву водородных связей и «разрыхлению» структуры волокна. Таким образом, присутствие спиновой метки при фотостарении волокна способствует протеканию процесса деструкции.

5. Экспериментальная часть.

Содержит описание методики синтеза стабильных свободных нитрокислых

меток и зондов. Реакции нитроксильных свободных радикалов без участия свободной валентности. Получению и очистки новых спиновых меток и зондов. Реакции спиновых меток и зондов с функциональными группами различных белков и ферментов. Реакции спиновых меток и зондов с функциональными группами природных и синтетических полимеров. Получению мессбауэровских и электронноплотных меток и реакции их с функциональными группами хлопковой целлюлозы и ее производных. Получению спинового зонда на основе ванадилпорфиринового комплекса (VOПК) для исследования структуры целлюлозы.

ВЫВОДЫ

1. Приведены способы синтеза стабильных нитроксильных радикалов пиперидинового и пирролидинового класса по реакции без затрагивания свободной валентности. Разработаны методы синтеза спиновых меток и зондов на основе стабильного нитроксильного радикала и специфического реагента на белковые и полимерные группы. Получено более двадцати спиновых меток и зондов на белковые и полимерные группы.
2. Впервые разработан и получен парамагнитный зонд на основе ванадилпорфиринового комплекса VOПК (XI) и кобальтопорфиринового комплекса CoПК (XII). Впервые разработан и получен мессбауэровский зонд на основе порфирина путем введения в структуру изотопа железа $^{57}\text{Fe}^{2+}$ и $^{57}\text{Fe}^{3+}$ (XIII). Получена мессбауэровская метка путем введения изотопа железа $^{57}\text{Fe}^{2+}$ и $^{57}\text{Fe}^{3+}$ - ксантогенатного комплекса хлопкового волокна и микрокристаллической целлюлозы (XIV). Синтезирована меркарбидная электронноплотная метка (МЭПМ) на основе полимеркуриалов, группировок, состоящих из нескольких близко расположенных тяжелых атомов ртути с использованием в качестве реагента-посредника цианурхлорида (ЦХ) 2,4,6-трихлор-1,3,5-триазина.
3. Получены препараты ряда белков гемоглобина, альбумина, лизоцима и глутамат-аспартамтрансаминазы, к функциональным группам посредством ковалентной связи присоединены спиновые метки. Всего получено более 58 спин-меченых препаратов. В изученных образцах выявлена высокая чувствительность спектров ЭПР спиновых меток к изменению локальной конформации белков при тепловой, кислотной и щелочной денатурации, при изменении степени ионизации белков.
4. Впервые разработаны способы химической модификации хлопковой целлюлозы и ее производных по гидроксильной группе спиновыми метками и зондами. По спектрам ЭПР спин-меченых волокон хлопка различных сортов сделано заключение, что метка проникает «глубоко» в аморфную часть волокна, и вращение ее сильно заторможено.
5. Методом ЭПР установлено, что в хлопковых волокнах при относительной влажности 0,96 обнаружены температурные структурные переходы в диапазоне 50-100°C, которые зависят от генетического происхождения хлопкового волокна, его влажности и степени пораженности вилтом. Показано, что параметры механической прочности коррелируют с относительным содержанием в волокне рыхлых структурных дефектов и с вращательной подвижностью в них спиновых меток со временами

волокна можно улучшить путем его модификации в сторону уменьшения в нем числа рыхлых дефектных структур и понижения внутримолекулярной подвижности в этих структурах.

6. Впервые произведена химическая модификация микрокристаллической целлюлозы (МКЦ) полученной из хлопковых волокон, из древесной целлюлозы и МКЦ, полученной из сахарного тростника. Показано, что препараты МКЦ из сахарного тростника по динамическим свойствам, по сравнению с МКЦ из хлопковой и древесной целлюлозы, являются менее упорядоченными, что связано с особенностью формирования физической структуры в процессе биосинтеза.
7. Методом ЭПР в широком диапазоне температур, влажности и вязкости среды исследованы образцы спин-меченых волокон натурального шелка. Определены средняя по объему и локальная концентрация спиновых меток, константы СТВ и временная корреляция вращения меток. Установлена структурная микронеоднородность аморфных областей натурального шелка.
8. Показано, что спин-решеточная релаксация протонов цепей целлюлозы происходит, в основном, за счет спиновой диффузии к протонам подвижных молекул адсорбированной воды. Наблюдаемые эффекты коррелируют с содержанием адсорбированной воды в неупорядоченной области макромолекулы.
9. Впервые получены препараты хлопкового волокна и целлюлозы и МКЦ, модифицированные ксантогенатным комплексом изотопа железа ^{57}Fe (мессбауэровская метка) и ^{57}Fe -порфирином (мессбауэровский зонд). Определены параметры спектров ЯГР меток и зондов, введенных в хлопковое волокно и целлюлозу, и сделано заключение о возможности использования препаратов для изучения молекулярно-динамических свойств исследуемых образцов.
10. Методом электронной микроскопии изучена топография модифицированных групп в хлопковой целлюлозе электронноплотной меткой МЭПМ. Установлено, что в хлопковой целлюлозе видны электронно-плотные гранулы ртути размером 19-20 Å, что соответствует размеру двух и трех близкорасположенных молекул МЭПМ. Размер электронно-плотной метки равен приблизительно 6-7 Å.

Основное содержание диссертации опубликовано в работах:

1. Лихтенштейн Г.И., Бободжанов П.Х., Розанцев Э.Г., Сускина В.И. Изучение аллостерических эффектов в гемоглобине методом парамагнитных меток // Молекул. биология, - 1968, т.2, С.44.
2. Лихтенштейн Г.И., Пивоваров А.П., Бободжанов П.Х., Розанцев Э.Г., Смолина Н.Б. Исследование динамической структуры белков и ферментов методами специфических люминесцентных и парамагнитных меток // Биофизика, - 1968, т.8, С.396-400.
3. Лихтенштейн Г.И., Бободжанов П.Х. Исследование структуры и локальных конформационных переходов белков и ферментов методом двойных парамагнитных меток. // Биофизика, - 1968, т.13 №5, С. 757-764.
4. Лихтенштейн Г.И., Бободжанов П.Х. Новая специфическая парамагнитная метка на

- основе трихлортриазина // Биофизика, - 1969, т.14, №4, С.741-743.
5. Лихтенштейн Г.И., Гребенчиков Ю.Б., Бободжанов П.Х., Коханов Ю.В. Исследование микроструктуры белков методом «парамагнитная метка – парамагнитный зонд». // Молекулярная биология, - 1970, 4, С. 662-667.
 6. Трошкина Т.В., Лихтенштейн Г.И., Бободжанов П.Х. Исследование структуры и конформационных переходов белков методом парамагнитных меток. // Тезисы док.2-го – Биохимического съезда, Ташкент, 1969, С.240.
 7. Бободжанов П.Х., Лихтенштейн Г.И. Получение спин-меченых препаратов хлопка, шелка и шерсти с помощью новых иминоксильных радикалов на основе трихлортриазина. // Докл. АН Тадж.ССР, 1974, т.17, №10, С.34-37.
 8. Люц В.Р., Бободжанов П.Х., Арихбаев И.К., Аширов П.М., Калонтаров И.Я. Изучение процесса малосменяемой отделки хлопковой целлюлозы метилольными производными из водных растворов и органического растворителя с помощью спиновых меток. // Докл. АН Тадж.ССР, 1975, т.18, №4, С.40-45.
 9. Бободжанов П.Х., Лихтенштейн Г.И., Поляновский О.Л. Исследование структуры и конформационной подвижности молекулы в районе сульфгидрильных групп аспарат-трансаминазы методом двойных спиновых меток. // Докл. АН Тадж.ССР, 1975, т.18, № 8., С. 23-26.
 10. Бободжанов П.Х., Лихтенштейн Г.И., Поляновский О.Л. Изучение рельефа поверхности сульфгидрильных групп аспарат-трансаминазы методом спиновых меток. // Докл. АН Тадж.ССР, 1975, т.18, №9, С. 28-31.
 11. Марупов Р., Бободжанов П.Х., Костина Н.В., Шапиро А.Б. Исследование методом спиновых меток структуры и конформационных свойств волокна хлопка, выращенного из γ -облученных семян. // Биофизика, 1976, т.21, №5, С. 825-828.
 12. Bobodjanov P.Kh., Z.A.Arikhbaeva, Y.K.Arikhbaev. Investigations of structure and conformational changes in natural silk fibroin and wool keratin by spin label method.//USSR-FRG Symposium of chemistry of peptides and proteins. 1976, Dushanbe, p.142.
 13. Бободжанов П.Х., Смотров С., Калонтаров И.Я., Аширов П.М., Вайцель Г.К. Исследование прочности фиксации фиброина натурального шелка в структурно-смешанном волокне методом ЭПР и УФ-спектроскопии. // «Шелк», 1977, № 23, С.43.
 14. Бободжанов П.Х., Шитанчаев А.Ш., Рахимов А., Адхамов А.А. // Авторское свидетельство, № 626092, от 7 июня 1978г.
 15. Соложенкин П.М., Бободжанов П.Х., Саложников Г.Н. Способ мечения животных и птиц. // Авт. Свидетельство, № 625665, 1978.
 16. Соложенкин П.М., Бободжанов П.Х., Саложников Г.Н. Новый способ мечения диких животных.//Докл. АН Тадж.ССР, 1976, т.19, №8, С.64-67.
 17. Саидов Д., Бободжанов П.Х., Марупов Р. Исследование структуры модифицированных полибутадиеннитрильных сополимеров методами ЭПР и ИК - спектроскопии. // Тезисы докл. XVIII Всесоюзного съезда по спектроскопии. Горький, 1977, 7-12 июля, С. 3-5.
 18. Марупов Р., Муинов Т.М., Кабилов З.А., Бободжанов П.Х. Исследование структуры и свойств полимеров.//«Пластические массы», 1978, №6, С. 32-34.
 19. Бободжанов П.Х., Юсупов И.Х., Марупов Р. Исследование структуры и

- конформации волоконобразующих полимеров методом спиновой спектроскопии. // «Пластические массы», 1979, № 12, С. 17-18.
20. Бободжанов П.Х., Костина Н.В. Исследование фотодеструкции фиброина натурального шелка (ФНШ) методом ЭПР и ИК-спектроскопии. // Тезисы докл. Международного симпозиума по макромолекулярной химии. Ташкент, 1978, т.4, С. 120-121.
 21. Марупов Р., Бободжанов П.Х., Юсупов И.Х., Жбанков Р.Г., Иванова И.В., Шишко А.И. Способ анализа целлюлозы. // Авт. Свид. № 731358, 1979.
 22. Бободжанов П.Х., Штанчаев А.Ш., Марупов Р. Раствор для формирования волокон и пленок. // Авт. Свид., № 761621, 1980.
 23. Марупов Р., Бободжанов П.Х., Юсупов И.Х., Мавлянов А.М., Фролов Е.Н., Лихтенштейн Г.И. Исследования температурной зависимости растительных волокон методом спиновых меток. // Биофизика, 1979, т.14, № 3, С. 519-523.
 24. Bobodjanov P.Kh., Yusupov, Marupov R. Investigation of molecular dynamics of the cotton fiber by means spin labeling. // Abstracts of contributed papers XIV European congress on molecular spectroscopy Frankfurt-Rain, FRG, 1979, p.45.
 25. Бободжанов П.Х., Юсупов И.Х., Марупов Р. Исследование молекулярной динамики хлопковых волокон средне- и тонковолокнистых сортов методом спиновых меток. //В кн: X-Всесоюзная науч. конф. по текстильному материаловедению, г.Львов, 1980, С. 13-15.
 26. Бободжанов П.Х., Штанчаев А.Ш., Рахимов А., Адхамов А.А. Исследование стабилизированных жидких кристаллов ряда азометинов. // Изв. АН Тадж.ССР, 1980, № 1, С. 80-84.
 27. Бободжанов П.Х., Костина Н.В., Штанчаев А.Ш., Рахимов А. Исследование текстурных слоев нематических жидких кристаллов методом ЭПР. // Изв. АН Тадж.ССР, 1979, № 4, С. 102-104.
 28. Корякина Н.И., Бободжанов П.Х., Буриченко В.К. Исследование конформационных переходов фрагментов N-концевой части гистона методом спиновых меток. // Биофизика, 1979, т.24, вып.5, С. 943-945.
 29. Соложенкин П.М., Зинченко З.А., Бободжанов П.Х., Швенглер Ф.А., Трегубенко Н.И. «Модельное соединение для изучения процесса флотации минералов». // Авт. Свид. № 816556 от 1 декабря 1980г.
 30. Марупов Р., Юсупов И.Х., Бободжанов П.Х., Кольтовер В.К., Лихтенштейн Г.И. Исследование молекулярной динамики хлопкового волокна методом спиновой метки. //ДАН СССР, 1981, т.256, № 2, С. 414-417.
 31. Юсупов И.Х., Бободжанов П.Х., Марупов Р. Исследование молекулярной динамики хлопковых волокон методом спиновых меток. // Тез. Докл. I Всесоюзный биофизический съезд. Москва, 1982, С. 113.
 32. Бободжанов П.Х., Юсупов Т.Ю., Марупов Р., Лихтенштейн Г.И. Изучение структуры фиброина натурального шелка методом спиновых меток. // I Всесоюзный биофизический съезд, тез.докл., М., 1982, т. 1, С. 40.
 33. Бободжанов П.Х., Юсупов И.Х., Марупов Р. Изучение продуктов частичного гидролиза хлопковой целлюлозы методом ЭПР. // I Всесоюзный биофизический съезд, тез.докл., М., 1982, т. 3, С. 240.

- ... исследование структуры и свойств хлопковой целлюлозы методом ЭПР. // Тез. докл. V Всесоюзной конф. По химии и физике целлюлозы. Ташкент, 1982, С. 11-12.
35. Бободжанов П.Х., Юсупов И.Х., Марупов Р., Исломов С., Махбубов М., Алямов А. Молекулярные свойства волокон хлопчатника различного генетического происхождения. Докл. АН Тадж.ССР, 1983, т. 26, № 9, С. 594-597.
 36. Сабуров Б., Бободжанов П.Х., Бобоев Т. Влияние стабилизатора на электрические свойства нематических жидких кристаллов. // Физическая химия, 1983, вып. 8, С. 120-123.
 37. Юсупов И.Х., Бободжанов П.Х., Марупов Р., Исломов С., Анциферова Л.И., Лихтенштейн Г.И., Кольтовер В.К. Исследование молекулярной динамики хлопкового волокна методом спиновой метки. // Высокомолекулярные соединения. Сер.А, 1984, т. 26, № 2, С. 369-374.
 38. Шишко А.М., Абранпольский И.Н., Мацкевич Д.В., Мурашкевич Т.В., Песнякевич Л.Г., Берлин С.В., Бободжанов П.Х. Химические и физико-химические изменения в волокнах льна в зависимости от способа приготовления льнотресты. // Химия древесины, 1984, № 1, С. 95-98.
 39. Бободжанов П.Х., Юсупов И.Х., Марупов Р. Изучение молекулярной динамики микрокристаллической целлюлозы (МКЦ) из хлопковой и древесной целлюлозы методом спиновой метки. // Тез. докл. III Всесоюзной конф. «Биосинтез целлюлозы и других компонентов клеточной стенки», Казань, 1990, С. 36.
 40. Юсупов И.Х., Бободжанов П.Х., Марупов Р. Влияние температуры на молекулярную структуру микрокристаллической целлюлозы (МКЦ) из сахарного тростника. // Тез. докл. III Всесоюзной конференции «Биосинтез целлюлозы и других компонентов клеточной стенки», Казань, 1990, С.102.
 41. Исломов С., Бободжанов П.Х., Лихтенштейн Г.И., Марупов Р. Формирование структуры целлюлозы в процессе ее биосинтеза. // Тез. докл. Всесоюзной конф. «Биосинтез целлюлозы», Казань, 1985, С. 28.
 42. Исломов С., Марупов Р., Жбанков Р.Г., Бободжанов П.Х., Забелин Л.В., Марченко Г.Н. Применение метода спиновых меток в исследовании структуры нитратов на основе целлюлозы льняной костры. // Тез. докл. конф. «Проблемы физики прочности и пластичности полимеров», Душанбе, 1985, С.103.
 43. Костина Н.В., Бободжанов П.Х. Изучение структуры хлопкового волокна при облучении УФ в зависимости от влажности методом спиновых меток. // Тез. докл. II Всесоюзной конф. «Биосинтез целлюлозы», Казань, 1985, С. 32.
 44. Исломов С., Бободжанов П.Х., Марупов Р., Лихтенштейн Г.И. Исследование структуры хлопковой целлюлозы в процессе ее биосинтеза методом спиновых меток. // Химия целлюлозы и технологии. Румыния, Бухарест, 1986, 20, С. 277-287.
 45. Исломов С., Марупов Р., Жбанков Р.Г., Бободжанов П.Х., Забелин Л.В., Марченко Г.Н. Исследование структурных свойств нитратов на основе целлюлозы льняной костры методом спиновых меток. // Журнал прикладной спектроскопии, 1986, т. 45, № 4, С. 633-638.
 46. Криничный В.И., Гринберг О.Я., Юсупов И.Х., Марупов Р., Бободжанов П.Х., Лихтенштейн Г.И., Лебедев Я.С. Исследование спин-меченого хлопкового волокна

методом электронного парамагнитного резонанса в спиновых метках и в растворе. 1986, т. 31, вып. 3, С. 482-485.

47. Шумм Б.А., Юсупов И.Х., Ерофеев Л.Н., Марупов Р., Бободжанов П.Х., Лихтенштейн Г.И. Спин-решеточная релаксация протонов в целях хлопкового волокна в зависимости от влажности (ЯМР - ¹H) // Докл. АН Тадж.ССР, 1986, т. 29, № 6, С. 349-351.
48. Бободжанов П.Х., Юсупов И.Х. Анализ продуктов частичного гидролиза целлюлозы методом ЭПР. // Тез. докл. Всесоюзного семинара «Микрокристаллическая и порошковая целлюлоза: получение и области использования», Ташкент, 1986, С. 46.
49. Бободжанов П.Х., Юсупов И.Х., Елисеев В.С., Кадыров А. Влияние озонолиза на структуру микрокристаллической целлюлозы. // Тез. докл. Всесоюзного семинара «Микрокристаллическая и порошковая целлюлоза: получение и области использования», Ташкент, 1986, С. 47.
50. Юсупов И.Х., Бободжанов П.Х. Изучение структуры микрокристаллической целлюлозы методом спиновых меток. // Тез. доклад Всесоюзного семинара «Микрокристаллическая и порошковая целлюлоза: получение и области использования», Ташкент, 1986, С. 37.
51. Калонтаров И.Я., Каландаров Б.Д., Гинзбург С.Ф., Бободжанов П.Х. Состояние некоторых производных фталоцианина меди на хлопковой целлюлозе. // Докл. АН Тадж.ССР, 1988, т. 31, № 8, С. 529-531.
52. Бободжанов П.Х., Бободжанова Р.В., Марупов Р., Нуманов И.У. Способ анализа структуры целлюлозы. // Авт. Свид. № 1427244 от 1.06.1988г.
53. Бободжанов П.Х., Юсупов И.Х., Саидов Д., Болибеков У. Способ пригодности яблок к длительному хранению. // Авт. Свид. № 1520438 от 8.06.1989г.
54. Bobodjanov P.Kh., Yusupov Y.Kh., Marupov R. Study of Humidity and temperature influence, on molecular structure of microcrystalline cellulose (MCC) by means of spin – label method. // Proceedings of 5-th CAC, Volume 2, Hungary, Balaton, 1989, p. 114-117.
55. Kostina N.V., Bobodjanov P.Kh., Marupov R. The significance of structural –dynamic characteristics in the determination of physic – chemical condition of photodestructured microcrystallized cellulose. // Proceedings of 5-th CAC Volume 2, Hungary, Balaton, 1989, p. 157-162.
56. Bobodjanov P.Kh., Bobodjanova R.V., Numanov Y.U. The investigation of cotton cellulose structure by the EPR method // 9-th specialized colloque ampere Magnetic Resonance in polymers, Prague, July 10-13, 1989, p.941-942.
57. Bobodjanov P.Kh., Yusupov I.Kh. The molecular dynamics study of various brands of Linen fiber by the spin – label method. // Abstracts international conference on Nitroxide Radicals. YCNR-1989, Novosibirsk, USSR, p. 61.
58. Yusupov I.Kh., Bobodjanov P.Kh. The effect of microelements of cotton fiber molecular structure by spin – label method. // Abstracts international conference on Nitroxide Radicals, Novosibirsk, 1989, p. 62.
59. Бободжанов П.Х., Юсупов И.Х., Марупов Р. Изучение молекулярной динамики МКЦ из хлопковой и древесной целлюлозы методом спиновой метки. // Тез. докл. III – Всесоюзной конф. «Биосинтез целлюлозы и др. компонентов клеточной стенки»,

- бу. Юсупов И.Х., Бободжанов П.Х., Марупов Р. Влияние температуры на молекулярную структуру микрокристаллической целлюлозы (МКЦ) из сахарного тростника. // Тез. докл. III Всесоюзной конф. «Биосинтез целлюлозы и др. компонентов клеточной стенки», Казань, 1990, С. 102.
61. Бободжанов П.Х., Юсупов И.Х., Марупов Р. Применение метода спиновой метки и спинового зонда для исследования структуры целлюлозы. // Тез. Докл. VI Всесоюзной конф. по физике и химии целлюлозы. Минск, 1990, С. 110.
62. Юсупов И.Х., Бободжанов П.Х., Марупов Р. Влияние лазерного излучения на молекулярную структуру хлопковых волокон. // Тез. докл. VI Всесоюзной конф. по физике и химии целлюлозы. Минск, 1990, С. 109.
63. Джумаев Ш.С., Ниязи Ф.Ф., Калонтаров И.Я., Арипов Х.Ш., Бободжанов П.Х. Влияние микроструктуры диацетата целлюлозы на светостабилизирующую активность добавок. // Тез. докл. VI Всесоюзной конф. по физике и химии целлюлозы, Минск, 1990, С. 239.
64. Бободжанов П.Х., Бободжанова Р.В., Марупов Р., Нуманнов И.У. Исследование структуры хлопковой целлюлозы методом ЭПР и ЯГР-спектроскопии. // Всесоюзная конф. «Химия и реакционная способность целлюлозы и ее производных», г. Чолпон-Ата, 10-16 сентября 1991г., С. 27-28.
65. Кулеков А.В., Юсупов И.Х., Бободжанов П.Х., Марупов Р., Лихтенштейн Г.И. Исследование надмолекулярной структуры хлопковой целлюлозы методом спиновых меток. // Журнал прикладной спектроскопии, 1991, т. 55, № 6, С. 961-965.
66. Бободжанов П.Х., Юсупов И.Х., Марупов Р. Исследование молекулярной динамики микрокристаллической целлюлозы методом ЭПР. // Журнал прикладной спектроскопии, 1999, т. 56, № 3, С. 424-428.
67. Бободжанов П.Х., Бободжанова Р.В., Марупов Р., Семикопный А.И., Лихтенштейн Г.И. Применение метода ЯГР – спектроскопии к исследованию структуры целлюлозы. // Журнал прикладной спектроскопии, 1992, т. 57, № 3-4, С. 310-324.
68. Бободжанова Р.В., Бободжанов П.Х., Аксенов В.С. Изучение каталитических свойств нефтяных порфириновых комплексов в реакции окисления тиоциклопентана молекулярным кислородом. // Доклад АН Тадж., Душанбе, 1997, т. 11, № 11-12, С. 27-31.
69. Бободжанов П.Х., Бободжанова Р.В., Марупов Р. Исследование структуры хлопковой целлюлозы парамагнитным зондом на основе ванадилпорфиринового комплекса. // Докл. АН Тадж., Душанбе, 1997, № 11-12, т. XI, С. 46-50.
70. Bobodjanov P.Kh., Yusupov I.Kh., Marupov R. Research of conformational movement in cotton cellulose by method of Nitroxyls Spine labels. // Proceedings polymer science and technology, Tehran, I.R. Iran, 1997, V.I, p. 202-207.
71. Юсупов И.Х., Бободжанов П.Х., Марупов Р., Махкамов К. Молекулярно-динамическая структура γ -облученной микрокристаллической хлопковой целлюлозы по данным ЭПР. Сборник, С.У.Умаров и развитие физической науки в Таджикистане, Душанбе, 1998.
72. Юсупов И.Х., Бободжанов П.Х., Марупов Р., Шукуров Т. Молекулярная структура хлопковых волокон, выращенных из семян предварительно подвергнутых

лазерному излучению. // Тез. Докл. Конф. «Физика конденсированного состояния», Душанбе, 1998, С. 15.

73. Бободжанов П.Х., Марупов Р. Модификация гидроксильной группы хлопковой целлюлозы меркаридной электроноплотной меткой (МЭПМ). // Тез. докл. на Международном симпозиуме 20-22 октября, Ташкент, 1999, С. 83-84.
74. Бободжанов П.Х., Марупов Р. Исследование структуры хлопковой целлюлозы методом спиновой, мессбауэровской и электронно-плотной метки. Изв. АН РТ, серия физика, № 1, 2001, С.87-108.