

Ю. Э. КИРШ, член-корреспондент АН СССР В. А. КАБАНОВ

ХИМИЧЕСКАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ ПОЛИ-4-ВИНИЛПИРИДИНА, ЧАСТИЧНО АЛКИЛИРОВАННОГО 4(5)-ХЛОРМЕТИЛИМИДАЗОЛОМ, В ГИДРОЛИЗЕ СЛОЖНЫХ ЭФИРОВ

В предыдущих статьях сообщалось о возможности синтеза аналогов гидролизующих ферментов на основе поли-4-винилпиридина (поли-4-ВП), алкилированного гидрофобными соединениями (1).

Данная работа посвящена изучению гидролитических свойств полимерного катализатора (ПК) несколько иного типа, содержащего в качестве N-заместителей в поли-4-ВП менее гидрофобные 4(5)-имидазолилметилеполевые радикалы. Последние, как известно, входят в состав молекул α -аминокислоты — гистидина, остатки которой функционируют в активных центрах многих ферментов (2).

Получение поли-4-ВП описано в работе (1). Фракционирование полимера проводили методом гелефильтрации на колонке ($57 \times 2,5$ см) с сефадексом Г-75 в 0,1 N уксусной кислоте. Молекулярный вес фракции, определенный вискозиметрически (3), составлял 20000. Солянокислый 4(5)-оксиметилимидазол был синтезирован по методике (4) (т. пл. 108°C , по лит. данным $107-108^\circ$ (4)). Путем его реакции с хлористым тианилом получали солянокислый 4(5)-хлорметилимидазол (ХМИ) (т. пл. 138° , по лит. данным $140-142^\circ$ (5)). Алкилирование поли-4-ВП солянокислым ХМИ проводили в отсутствие кислорода в смеси нитрометана с метанолом при 70° в течение 5 час. Степень алкилирования (β), определенная по содержанию хлора в полимере, равна 46%. Присутствие имидазольного кольца подтверждается также реакцией Паули (6).

Субстраты: *n*-нитрофенилацетата (НФА), *n*-нитрофенилтриметилацетата (НФТМА) и *n*-нитрофенилциннамат (НФЦ) синтезировали, как описано в (1). 4-Ацетокси-3-нитробензойная кислота (АНБК), приготовленная для нас В. Я. Стацевич, имела т. пл. 152° (по лит. данным 152° (7)). Методика изучения кинетических закономерностей гидролиза в присутствии ПК и определения кинетических констант приведена в работе (1).

На рис. 1 показаны типичные кинетические кривые гидролиза различных субстратов при 25° в присутствии ПВ-имидазолил-П. Оказалось, что этот полимер обладает высокой каталитической активностью, превышающей активность всех полученных ранее ПК (1), 4-этилпиридина (4-ЭП) и имидазола (ИМ).

При гидролизе НФА (рис. 1а) реакция прекращается задолго до исчерпания субстрата, что указывает на «отравление» ПК в ходе гидролиза. Как было показано ранее (1), подобный вид кинетических кривых характерен

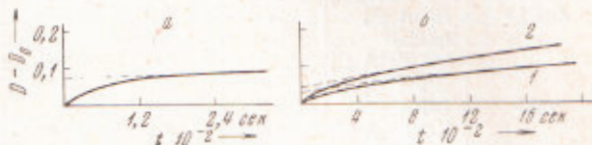


Рис. 1. Кинетические кривые гидролиза *n*-нитрофенилацетата (НФА) (а), *n*-нитрофенилтриметилацетата (НФТМА) и 4-ацетокси-3-нитробензойной кислоты (АНБК) (б) полимерным катализатором (ПК). Условия реакции: 25° , pH 7,6 [трис-HCl] 10^{-2} мол/л, ионная сила 10^{-2} мол/л [ацетонитрил] $0,2 \div 0,5$ об.%; [ПК] — $2 \cdot 10^{-4}$, [НФА] — $1,8 \cdot 10^{-4}$ мол/л (а); [НФТМА] — $4 \cdot 10^{-4}$, [ПК] = $5,5 \cdot 10^{-4}$ мол/л (б); [АНБК] — $5,3 \cdot 10^{-4}$, [ПК] = $3 \cdot 10^{-4}$ мол/л (2)

для гидролиза НФА в присутствии поли-4-ВП, частично алкилированного бутил-, изобутил- и изоамилбромидами. Явление было объяснено тем, что молекулы сложных эфиров «экстрагируются» в «активные полости» макромолекулы, недоступные в этих случаях для молекул воды, и, реагируя с неалкилированными пиридиновыми кольцами, образуют N-ацетилпиридиный и нитрофенол. Близкие значения констант скоростей расщепления НФА (k_2) ПВ-имидазолил-II ($2 \cdot 10^{-2}$ сек $^{-1}$) и ПВ-изоамил-II ($1 \cdot 10^{-2}$ сек $^{-1}$) (1) свидетельствуют о том, что «активными» нуклеофилами в первом ПК,

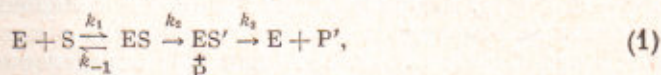
Таблица 1

Катализатор	Субстрат	v , %	$k_2 \cdot 10^4$, сек $^{-1}$	$K_M^1 \cdot 10^4$, мол/л	$k_2 \cdot 10^4$, сек $^{-1}$	$k'' = k_2/K_M$ или k_{HH} , л·моль $^{-1}$ ·сек $^{-1}$	k''/k_{HH}
ПВ-имидазолил-II ²	НФА	0,57	20	2,5	~0	80	5000
	АНБК	0,5	3,2	0,33	0÷7,5	~100	25000
	НФТМА	0,3	4,0	0,8	5,2	50	150000
	НФЦ	~0	~0	?	~0	~0	~0
α -Химотрипсин ³	НФА (9)	—	4000	12	80	3320	6640
	НФТМА (10)	—	370	16	1,5	230	31000
	Эластаза ⁴	—	77	5,0	25	154	21000
	4-ЭП ⁵	—	—	—	—	1,6·10 $^{-2}$	—
ИМ ⁵	АНБК	—	—	—	—	4·10 $^{-3}$	—
	НФТМА (1)	—	—	—	—	3,5·10 $^{-3}$	—
	НФЦ (1)	—	—	—	—	3,0·10 $^{-3}$	—
	НФА (12)	—	—	—	—	0,5	—
	НФТМА (12)	—	—	—	—	7,4·10 $^{-3}$	—
		—	—	—	—	—	—

¹ K_M — константа Михаэлиса ($K_M = (k_{-1} + k_2)/k_1$). * Условия гидролиза: 25°, pH 7,8, трис-НСI, ионная сила (μ) 10 $^{-2}$ мол/л, [ацетонитрил] — 0,2÷0,5 об. %; ² (НФА) 25°, pH 7,1, [ацетонитрил] — 1,5 об. %, трис-НСI; (НФТМА) 25,2°, pH 8,0, $\mu = 0,06$ мол/л, [ацетонитрил] — 0,3÷1,6 об. %; ³ 25°, pH 7,3, $\mu = 0,05$, трис, [ацетонитрил] — 0,8 об. %; ⁴ 25°, $\mu = 1,0$ мол/л, имидазольный буфер, [диоксан] — 1,64%.

как и в ранее исследованном втором, служат свободные пиридиновые группы.

При гидролизе НФТМА п отрицательно заряженного субстрата АНБК кинетические кривые имеют другую форму (рис. 16). Четко различаются два участка: предстационарный и стационарный. Подобные кинетические закономерности, как известно, характерны для ряда ферментов. Они описываются трехстадийной схемой (8):



где E — активный центр полимера, S — субстрат, ES — комплекс активного центра с субстратом, обратимо образующийся и распадающийся с константами скоростей k_1 и k_{-1} соответственно, ES' — ацилполимер, P и P' — продукты реакции: спирт и кислота, образующиеся с константами k_2 и k_3 соответственно. НФЦ в отличие от двух предыдущих субстратов вообще не гидролизуются в присутствии ПВ-имидазолил-II.

Совокупность полученных данных свидетельствует об определенной специфичности активных центров ПВ-имидазолил-II. Кинетические константы и величины каталитической эффективности, показывающие, какая доля от общего числа неалкилированных пиридинов в ПК образует активные центры, приведены в табл. 1. Здесь же для сравнения приведены некоторые кинетические характеристики ферментов: α -химотрипсина и эластазы, относящиеся к гидролизу соответствующих (неспецифических для них) субстратов, а также константы скорости гидролиза этих субстратов в присутствии низкомолекулярных нуклеофилов (НН): 4-ЭП и ИМ. Пер-

вый НН моделирует нуклеофильный центр ПК, второй входит в состав гистидина- α -аминокислоты, звено которой участвует в образовании активного центра α -химотрипсина (⁶, ¹³) и эластазы (¹¹).

Прежде всего обращают на себя внимание малые значения каталитической эффективности (v), указывающие на то, что активна только небольшая часть незамещенных пиридинов в ПК. Расчеты показывают, что в каждой макромолекуле со степенью полимеризации 190 образуется в среднем один активный центр.

Факт высокой избирательности ПК следует из сравнения эффективных констант скоростей расщепления сложноэфирной связи ($k' = k_2 / K_M$) с

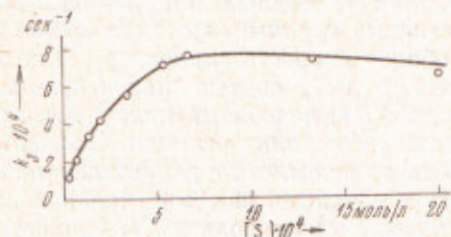


Рис. 2. Зависимость константы скорости (k_2) образования кислотного продукта от концентрации 4-ацетокси-3-нитробензойной кислоты (АНБК). Условия реакции те же, что в рис. 1

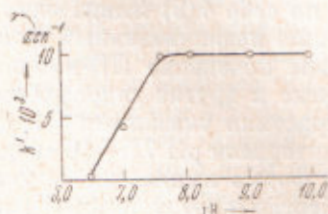


Рис. 3. Зависимость эффективной константы скорости k' образования p -нитрофенола от pH раствора. [НФА] = $1.8 \cdot 10^{-4}$, [ПК] = $2.0 \cdot 10^{-6}$ моль/л; 25°

константами скоростей второго порядка (k_{HH}), характеризующих гидролиз тех же субстратов 4-ЭП в близких условиях. Из данных табл. 1 видно, что отношение k'/k_{HH} изменяется от ~ 0 (в случае НФЦ) до $15 \cdot 10^3$ (в случае НФТМА). Аналогичная специфичность обнаружена ранее при гидролизе субстратов в присутствии ПВ-бензил-П (поли-4-ВП, мол. вес 45500, бензилхлорид) (¹). Она, по-видимому, связана со степенью структурного соответствия их активных полостей и кислотных остатков субстратов. Интересно отметить, что k_{HH} гидролиза НФТМА в 500 раз меньше k_{HH} гидролиза НФА. В то же время k_2 гидролиза НФТМА в присутствии ПВ-бензил-П и ПВ-пимидазол-П меньше k_2 гидролиза НФА этими же ПК всего в 1,5 (¹) и в 5 раз соответственно. Последний результат указывает на дополнительную активацию нуклеофильного центра ПК по отношению к НФТМА, связанному в комплекс Михаэлиса, ибо, как было показано ранее (¹⁴), свободные энергии активации расщепления сложноэфирной связи в НФА 4-ЭП и пиридиновым остатком, присоединенным к цепочке ПК, не различаются. Этот факт пока трудно интерпретировать однозначно. Однако не исключено, что его можно рассматривать как некоторое свидетельство в пользу индуцирующего влияния субстрата на активный центр ПК, вызывающего локальные конформационные перестройки активной полости. Подобные перестройки, вероятно, обуславливают увеличение константы скорости k_2 , характеризующей скорость гидролиза промежуточного N-ацилполимера (см. табл. 1). В связи с последним обстоятельством большой интерес приобретает сравнение зависимостей константы k_2 от концентрации различных субстратов. В случае заряженного субстрата АНБК k_2 растет с увеличением его концентрации и достигает предела (рис. 2). В то же время k_2 гидролиза НФТМА не зависит от концентрации последнего. Данные рис. 2, по-видимому, также свидетельствуют о локальных перестройках в активном центре под влиянием АНБК.

Обращает внимание, что константа Михаэлиса (K_M) при гидролизе АНБК, отличающегося от НФА только наличием карбоксильной группы, почти в 10 раз меньше, чем K_M для НФА. Этот факт обусловлен присутствием в ПК положительных зарядов в достаточной близости от активных

центров, дополнительно притягивающих анионы АНБК. Отмеченное выше увеличение k_2 гидролиза АНБК, вероятно, вызвано изменением состояния полиэлектролитного клубка, а вместе с ним и активной полости в присутствии анионного субстрата.

С целью выяснения роли имидазольных групп в катализе ПК была изучена кинетика гидролиза НФА при различных рН (рис. 3). Из рис. 3 видно, что изменение рН не влияет на эффективную константу k' ($k' = V_0 / [E]_0$) в интервале от 10 до 7,5. При рН < 7,5 происходит резкое падение k' . Последнее может быть связано с протонированием имидазольных боковых групп ($pK_a \approx 7,0$), заряджение которых приводит к разрушению активных полостей, включающих свободные пиридиновые ядра. Сами по себе 4(5)-имидазолметиленовые группы, как нуклеофилы вносят лишь незначительный вклад в общую скорость гидролиза ПК: кинетическое поведение ПВ-имидазол-II и ПК, содержащих бензильные, этильные и другие гидрофобные группы (¹), подобно, а кинетические характеристики указанных ПК совпадают по порядку величин. Постоянство k' в интервале рН 7,5—10 свидетельствует о том, что в данном случае анионная форма имидазола не участвует в катализе, как это предположили Овербергер и соавторы (¹⁵) применительно к гидролизу НФА поли-4(5)-винилимидазолом. Основная функция 4(5)-имидазолметиленовых групп, как и алкильных групп, связанных с пиридиновыми звеньями ПК, по-видимому, состоит в формировании активных полостей, притягивающих субстрат и ориентирующих его в непосредственной близости от свободных пиридиновых ядер, которые выполняют роль нуклеофилов в катализе.

Далее, из данных табл. 1 видно, что значения $k'' / k_{\text{нн}}$ для ПК почти совпадают (НФА) и даже превосходят таковые (НФТМА) для ферментов в тех случаях, когда последние действуют на неспецифические для них субстраты. Поэтому можно полагать, что причина высокой активности ПК, так же как и указанных ферментов при гидролизе неспецифических субстратов, заключается в эффекте сближения (образование комплекса Михаэлиса) и в эффекте ориентации (правильное расположение нуклеофила в активной полости по отношению к атакуемой группе C=O эфира).

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
25 V 1970

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Ю. Э. Кирш, В. А. Кабанов, В. А. Каргин, Высокомолек. соед., **10A**, 349 (1968). Ю. Э. Кирш, С. К. Плужнов и др., Высокомолек. соед., **A12**, 186 (1970).
- ² L. Cunningham, Comprehensive biochemistry, **16**, Amsterdam, 1965. ³ A. G. Boyes, U. P. Strauss, J. Polymer Sci., **22**, 463 (1956). ⁴ Синтезы органических препаратов, **3**, ИЛ, 1952, стр. 472. ⁵ N. F. Albertson, S. Archer, J. Am. Chem. Soc., **67**, 308 (1945). ⁶ J. P. Greenstein, M. Winitz, Chemistry of the Amino Acids, **2**, 3, London, 1961. ⁷ C. G. Overberger, T. St. Pierre et al., J. Am. Chem. Soc., **87**, 296 (1965). ⁸ H. Gutfreund, J. M. Sturtevant, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., **42**, 719 (1956). ⁹ M. L. Bender, G. E. Clement et al., J. Am. Chem. Soc., **86**, 3680 (1964). ¹⁰ M. L. Bender, B. Zerner, G. K. Schonbaum, J. Am. Chem. Soc., **84**, 2562 (1962). ¹¹ M. L. Bender, T. H. Marshall, J. Am. Chem. Soc., **90**, 201 (1968). ¹² J. B. Milstein, T. H. Fife, J. Am. Chem. Soc., **90**, 2164 (1968). ¹³ D. M. Blow, J. J. Birktoft, B. S. Hartley, Nature, **221**, 337 (1969). ¹⁴ С. К. Плужнов, Ю. Э. Кирш и др., ДАН, **185**, 843 (1969). ¹⁵ C. G. Overberger, T. St. Pierre et al., J. Am. Chem. Soc., **85**, 3513 (1963).