

## ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ

Том (A) X

## СОЕДИНЕНИЯ

№ 2

1968

УДК 678.746:678.01:54

**ПРОДУКТ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ПОЛИ-4-ВИНИЛПИРИДИНА  
С 2-(2'-ХЛОРЕТИЛ)ПИРИДИНОМ  
КАК МОДЕЛЬ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОГО ФЕРМЕНТА**

*Ю. Э. Кириш, В. А. Кабанов, В. А. Каргин*

Моделирование ферментов сравнительно простыми синтетическими полимерами способствует выяснению природы ферментативной активности и может привести к созданию эффективных синтетических катализаторов, действующих по принципу ферментов.

В этой статье описана одна из таких моделей — четвертичная соль поли-4-винилпиридида (поли-4-ВП) и 2-(2'-хлорэтил)пиридина (ХЭП), содержащая небольшое количество незамещенных 4-винилпиридиновых звеньев (полимерный катализатор — ПК) которая, как оказалось, обладает исключительно высокой по сравнению с низкомолекулярными аналогами катализитической активностью в реакции гидролиза сложно-эфирной связи.

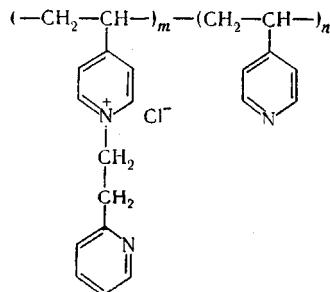
**Экспериментальная часть**

Поли-4-ВП получали полимеризацией 4-винилпиридина (4-ВП), предварительно перегнанного на колонке высотой 40 см (т. кип. 65° при 15 мм,  $n_D^{20} = 1,5520$ ) в нитрометане с 25%-ной концентрацией мономера в присутствии  $3 \cdot 10^{-2}$  моль/л азо-бис-изобутиронитрила при 50° в отсутствие воздуха. Полимер осаждали и промывали эфиrom и сушили при комнатной температуре. Молекулярный вес, вычисленный по данным вискозиметрических измерений ( $[\eta] = 1,2 \cdot 10^{-4} \cdot M^{0,73}$  в 92%-ном этаноле при 25° [1]), составлял 21 000 (средняя степень полимеризации ~ 200).

ХЭП получали из 2-(2-оксиэтилпиридина) обработкой хлористым тионилом [2].

Для получения полимерной четвертичной соли 0,2 г поли-4-ВП растворяли в 5 мл смеси перегнанного и тщательно осуженного нитрометана и абсолютного метанола (2 : 1), добавляли 0,35 мл ХЭП и нагревали при 65° в течение 40 часов. По окончании реакции продукт осаждали смесью эфира и триэтиламина, промывали эфиrom, а затем высушивали в вакууме. Для окончательной очистки водный раствор полимера пропускали через колонку с сефадексом G-75. Содержание 4-винилпиридиновых звеньев, не вступивших в реакцию, не превышало 4% ( найдено Cl — 13,9%, т. е. 96% от теоретич.)

Таким образом, строение продукта взаимодействия поли-4-ВП с ХЭП можно представить формулой:



где величина отношения  $n / (m + n)$  не превышает нескольких сотых.

Аналогично получали 4-этил-N-{1'[2'-(2"-пиридинил)этил]} пиридинийхлорид (ЭПЭПХ) — четвертичную соль 4-этилпиридина (4-ЭП) и ХЭП. УФ- и ИК-спектры полимера и мономерного аналога совпадали в области основных частот.

*n*-Нитрофенилацетат (НФА), использовавшийся в качестве субстрата, получали обычным методом из *n*-нитрофенола и уксусного ангидрида [3].

Гидролиз НФА изучали в водном растворе полимерного катализатора (ПК) в присутствии 0,01 M буфера из *трис*-(оксиметил)аминометана и HCl. НФА вводили в реакционную систему в виде раствора в ацетонитриле. К 3 мл раствора катализи-

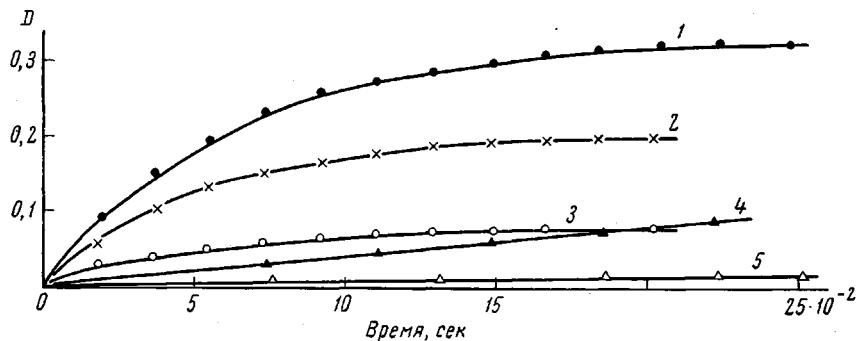


Рис. 1. Кинетика гидролиза НФА полимерным катализатором [ПК], 4-ЭП и ЭПЭПХ

Условия реакции: 25°, pH = 8,0; концентрация буфера *трис*-HCl · 10<sup>-2</sup> моль/л; ионная сила · 10<sup>-2</sup> моль/л; [ацетонитрил] = 0,2 об.%; [НФА] = 5 · 10<sup>-5</sup> моль/л; 1 — [ПК] = 14,5 · 10<sup>-4</sup> моль/л; 2 — [ПК] = 8,2 · 10<sup>-4</sup> моль/л; 3 — [ПК] = 2,85 · 10<sup>-4</sup> моль/л; 4 — [4-ЭП] = 3,6 · 10<sup>-3</sup> моль/л; 5 — [ЭПЭПХ] = 10<sup>-1</sup> моль/л

тора добавляли 0,2 об.% раствора субстрата определенной концентрации. Ионную силу раствора варьировали добавлением NaCl. Скорость гидролиза определяли по выделению нитрофенола (НФ), за образованием которого следили по нарастанию оптической плотности раствора при 405 мкм, если опыты проводили в области pH = 7 и выше, или при 320 мкм, если опыты проводили в области pH < 7, при помощи двухлучевого регистрирующего спектрофотометра «Хитачи» против соответствующего раствора НФА, не содержащего катализатора. Кинетические измерения проводили в термостатированной кварцевой кювете. Температуру поддерживали с точностью ± 0,2°.

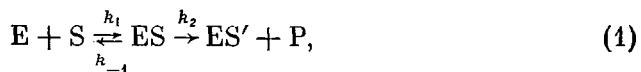
### Обсуждение результатов

На рис. 1 изображены типичные кинетические кривые гидролиза НФА под действием ПК (кривые 1, 2, 3). Там же для сравнения приведены кинетические кривые гидролиза НФА в присутствии 4-ЭП (кривая 4) и ЭПЭПХ (кривая 5), моделирующие оба типа звеньев ПК. Ниже даны значения начальных скоростей гидролиза, отнесенные к концентрациям катализаторов и субстрата ( $k_{II}$ ): \*

$$k_{II} (\text{л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{сек}^{-1}): \text{ПК} * \quad \text{ЭПЭПХ} \quad 4\text{-ЭП} \\ 5 \cdot 10^{-1} \quad 3 \cdot 10^{-5} \quad 8,3 \cdot 10^{-3}$$

Эти результаты демонстрируют поразительное отличие в поведении ПК, «валовая» каталитическая активность которого оказывается на несколько порядков выше, чем у его мономерных аналогов.

Другая особенность ПК — резкое замедление гидролиза и прекращение реакции при глубинах превращения < 100 %. Такая кинетика, как известно, характерна, в частности, для ферментативных процессов, в которых активный центрочно блокируется одним из продуктов реакции. Кинетическая схема с учетом ингибиции продуктом записывается в виде:



\* Для катализатора расчет сделан на основной моль кватернизованных звеньев.

где  $E$  — активный центр катализатора;  $S$  — субстрат;  $ES$  — комплекс активного центра с субстратом, обратимо образующийся и распадающийся соответственно с константой скорости  $k_1$  и  $k_{-1}$ ;  $ES'$  — блокированный активный центр;  $P$  — один из продуктов гидролиза (в нашем случае *n*-нитрофенол), образующиеся с константой скорости  $k_2$ . В стационарном приближении:

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1 [E][S] - k_{-1}[ES] - k_2[ES] = 0, \quad (2)$$

$$\frac{d[P]}{dt} = k_2[ES] = -\frac{d[E]}{dt}. \quad (3)$$

Решение системы уравнений (2) и (3) в предположении, что в каждом акте гидролиза ингибитируется один активный центр, для случаев, когда начальная концентрация субстрата  $[S]_0$  много больше начальной концентрации активных центров  $[E]_0$ , приводит к уравнению:

$$\ln \left\{ \frac{[E]_0}{[E]_0 - [P]} \right\} = k't, \quad (4)$$

$$k' = \frac{k_2[S]_0}{K_m + [S]_0} \text{ или } \frac{1}{k'} = \frac{K_m}{k_2} \frac{1}{[S]_0} + \frac{1}{k_2}$$

уравнение Михаэлиса — Ментен, в котором  $K_m = (k_{-1} + k_2) / k_1$  — константа Михаэлиса, практически (при  $k_2/k_1 \ll 1$ ) характеризующая способность катализатора связывать субстрат. Из уравнения (4) следует, что начальная концентрация активных центров равна предельной концентрации выделившегося нитрофенола ( $[P]_\infty$ ). Значения  $[P]_\infty$ , вычисленные по данным рис. 1, приведены в табл. 1. Следовательно, на каждые 100 звеньев полимерного катализатора приходится в среднем всего около 1,5 активных центров. Эта величина по порядку соответствует содержанию незамещенных 4-ВП звеньев в ПК.

Таблица 1  
Значение  $[P]_\infty$  по данным рис. 1

$[S]_0 \cdot 10^5, \text{ моль/л}$	$[PK] \cdot 10^4, \text{ моль/л}$	$[P]_\infty \cdot 10^4, \text{ моль/л}$	$\frac{[E]_0}{[PK]}$	Среднее число центров на 100 звеньев PK
5	2,85	4,8	0,0168	
5	8,2	12,2	0,015	
5	14,8	20,0	0,014	1,5

вии с уравнением Михаэлиса — Ментен  $k'$  стремится к пределу при высоких значениях  $[S]_0$ , что соответствует насыщению активных центров субстратом. Количественное подчинение этой зависимости уравнению (5) демонстрируется прямой рис. 3, б, построенной в координатах Лайнусвера — Берка  $1/k' - 1/[S]_0$  [4]. В табл. 2 приведены константы  $k_2$  и  $K_m$ , определенные из рис. 3, б, которые сопоставлены с соответствующими величинами, найденными при изучении гидролиза НФА в присутствии  $\alpha$ -химотрипсина [5].

Таким образом, ПК обладает способностью сильнее связывать субстрат, чем  $\alpha$ -химотрипсин. Расщепление сложноэфирной связи (в случае фермента — это ацилирование активного центра молекулой сложного эфира), ско-

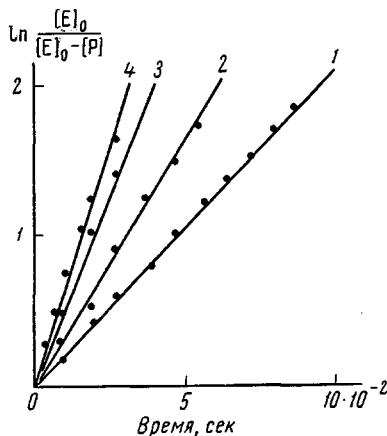


Рис. 2. Типичные кривые гидролиза НФА, построенные в координатах уравнения первого порядка

Условия реакции, см. рис. 1;  $[PK] = 3 \cdot 10^{-4} \text{ моль/л}; [S]_0 = 1 - 5 \cdot 10^{-5}; 2 - 1,2 \cdot 10^{-4}; 3 - 4,3 \cdot 10^{-4}; 4 - 8 \cdot 10^{-4} \text{ моль/л}$ .

рость которой характеризуется величиной  $k_2$ , на активных центрах ПК происходит на два порядка медленнее, чем на активных центрах фермента. Энергия активации реакции гидролиза НФА в присутствии ПК, определяемая по изменению эффективной константы  $k'$  от температуры, равна 10 ккал/моль. Замечательно, что кинетическое поведение ПК полностью

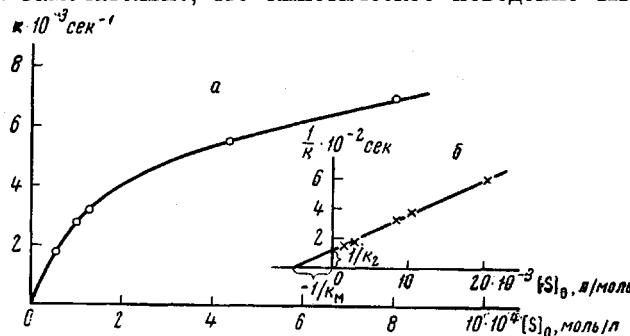


Рис. 3. Зависимость эффективной константы скорости  $k$  от концентрации субстрата  $[S]_0$ :

а — в обычных координатах; б — в координатах Лайнунгера (по оси ординат вместо  $1/k \cdot 10^{-2}$  сек следует читать  $1/k' \cdot 10^{-2}$  сек; по оси абсцисс —  $1/[S]_0$ , л/моль)

имитирует поведение ферментов, работающих в условиях отравления продуктом реакции.

Для выяснения природы центров ПК, ответственных за катализ, существенно знать их константу основности. Эту величину можно определить из кинетических данных по зависимости скорости гидролиза от pH среды. Действительно, если учесть возможность связывания активных центров

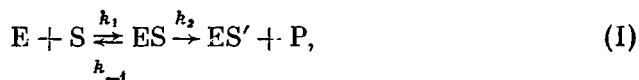
Таблица 2

Константы  $k$  и  $K_M$  при 25°

Катализатор	$K_M$ , моль/л	$k_1$ , сек <sup>-1</sup>	$k' = \frac{k_2}{K_M}$	Условия реакции	
				pH	$c_{\text{буф}}^*$ , моль/л
ПК	$1,95 \cdot 10^{-4}$	$8,4 \cdot 10^{-3}$	43	8	$10^{-2}$
α-Химотрипсин	$1,2 \cdot 10^{-3}$	4	3400	7,8	$10^{-1}$

\*  $c_{\text{буф}}$  — концентрация буфера из трис-(оксиметил)-аминометана и HCl.

ионами водорода, то схему процессов, протекающих в присутствии ПК, следует записать в виде:



где  $K_a$  — константа диссоциации протонированного активного центра, связанная с его константой основности  $K_b$  известным соотношением  $K_a \cdot K_b = 10^{-14}$ . Протонирование активного центра выводит его из строя, т. е. ионы водорода выступают в роли конкурентного ингибитора.

При  $[S]_0 \gg [E]_0$  в стационарном приближении:

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1 \{[E]_0 - [ES] - [EH^+] - [P]\} [S]_0 - k_{-1} [ES] - k_2 [ES] = 0. \quad (6)$$

Если скорость установления равновесия по схеме (II) гораздо больше скорости гидролиза, в любой момент времени в системе практически существует равновесие, описываемое уравнением:

$$\frac{[H^+]\{[E]_0 - [ES] - [EH^+] - [P]\}}{[EH^+]} = K_a. \quad (7)$$

Выразив  $[EH^+]$  из уравнения (7) и подставив в (6), после несложных преобразований получаем:

$$[ES] = \frac{[S]_0 K_a ([E]_0 - [P])}{K_M [H^+] + K_M \cdot K_a + [S]_0 K_a}. \quad (8)$$

Следовательно,

$$\frac{dP}{dt} = k_2 [ES] = \frac{k_2 [S]_0 ([E]_0 - [P])}{K_M \left( 1 + \frac{[H^+]}{K_a} \right) + [S]_0}. \quad (9)$$

Интегрируя уравнение (8), получаем уравнение, по форме аналогичное уравнению (4), в котором, однако,

$$k' = \frac{k_2 [S]_0}{K_M \left( 1 + \frac{[H^+]}{K_a} \right) + [S]_0} \text{ или}$$

$$\frac{k_2}{k_1} = \left( \frac{K_M}{[S]_0} + 1 \right) + \frac{K_M [H^+]}{[S]_0 K_a}. \quad (10)$$

Определив из экспериментальных кинетических кривых зависимость  $k'$  от pH (рис. 4, а), построив зависимость  $k_2/k'$  от  $[H^+]$  (рис. 4, б) и зная величины  $K_M$  и  $k_2$  (табл. 2), при помощи уравнения (10) находим, что активные центры ПК характеризуются величинами  $K_a = 3 \cdot 10^{-7}$  и  $K_b = 3,3 \cdot 10^{-8}$ .

На рис. 5 представлена зависимость степени диссоциации протонированного ПК и его приведенной вязкости от pH раствора. Из этих данных видно, что протонизация остатков 2-этилпиридина, присутствующих в большинстве звеньев ПК, и связанное с этим возрастание вязкости благодаря появлению дополнительных положительных зарядов на цепи происходит при существенно меньших значениях pH, чем отравление активных центров протонами (для остатков 2-этилпиридина в цепи ПК  $K_b = 6 \cdot 10^{-12}$ , т. е. сильно отличается от  $K_b$  активных центров). Это значит, что каталитическая активность ПК не связана с нуклеофильностью звеньев поли-4-ВП, алкилированных ХЭП. Остается предположить, что активными центрами ПК служат немногочисленные свободные 4-замещенные пиридиновые ядра, не вступившие в реакцию при обработке поли-4-ПВ ХЭП и сохранившие неподеленную пару электронов у атома азота, к которым с обеих сторон примыкают достаточно длинные последовательности N-алкилированных звеньев;

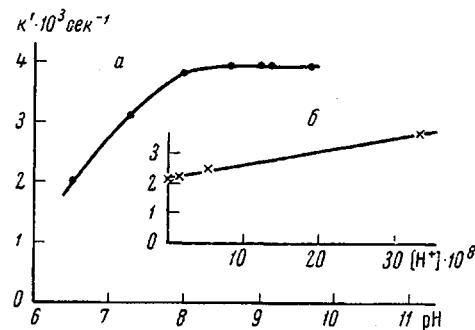
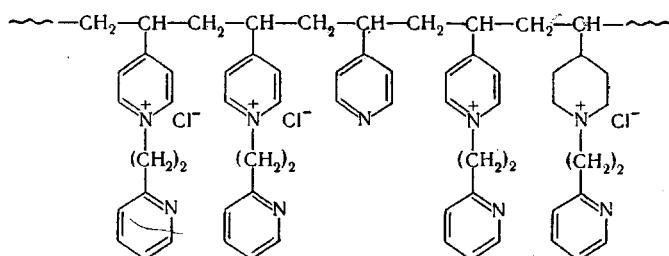


Рис. 4. Зависимость эффективной скорости  $k'$  от pH (а) и  $k_2/k'$  от концентрации ионов водорода  $H^+$  (б). Условия реакции см. рис. 1  
 $[PK] = 4 \cdot 10^{-4}$  моль/л;  $[HFA] = 1,5 \cdot 10^{-4}$  моль/л

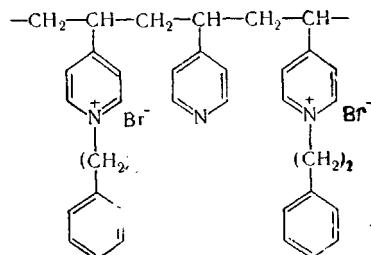


Это подтверждается совпадением по порядку величин констант основности активных центров ПК и молекул 4-ЭП ( $3,3 \cdot 10^{-8}$  и  $1,1 \cdot 10^{-8}$  [6] соответственно).

Вместе с тем сопоставление катализитической активности 4-ЭП, моделирующего активный центр ПК, с катализитической активностью ПК в расчете на моль активных центров показывает, что последняя более, чем на 3 порядка выше (!):

$$\begin{array}{ll} \text{ПК} & 4\text{-ЭП} \\ k_{\text{ПК}} (\text{л}/\text{моль}\cdot\text{сек}) & 43 \quad 8,3 \cdot 10^{-3} \end{array}$$

Неучастие 2-этилпиридиновых остатков в катализическом акте подтверждается и тем, что полимер, полученный из поли-4-ВП и 1-бром-2-фенилэтана, строения:



также вызывает гидролиз НФА, причем константы  $k_2$  и  $K_m$  практически совпадают с таковыми для ПК, приготовленного из поли-4-ВП и ХЭП.

Следовательно, 4-замещенное пиридиновое ядро в полимерной цепи становится несоизмеримо активнее такого же ядра, принадлежащего низкомолекулярной модели. Причиной этого может быть образование в макромолекулярном

клубке ПК «активных полостей», образованных с участием гидрофобных 2-этилпиридинильных подвесков. Каждая полость содержит в качестве нуклеофиле неалкилированное пиридиновое кольцо. Молекулы субстрата благодаря гидрофобному взаимодействию «всасываются» в «активные полости» и быстро претерпевают катализическое превращение. В настоящее время имеется ряд данных, свидетельствующих о важной роли гидрофобного взаимодействия в ферментативном катализе [7]. Не исключено, что в данном случае аналогичный эффект проявляется на примере синтетического полимерного катализатора.

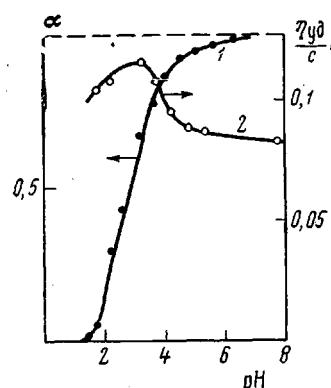


Рис. 5. Зависимость степени диссоциации протонированного полимерного катализатора ( $\alpha$ -спектрофотометрическое титрование) (1) и приведенной вязкости (2) от pH раствора; температура 25°

личество центров, осуществляющих катализ при практическом постоянстве константы  $k'$ , характеризующее скорость гидролиза в расчете на один центр. Можно полагать, что уплотнение полимерного клубка приводит к тому, что часть неалкилированных пиридиновых ядер становится недоступной для молекул субстрата, т. е. часть «активных полостей» ПК фактически оказывается «замурованной». Особенностью исследованного ПК является прекращение гидролиза НФА, вероятно, вследствие ингибирования

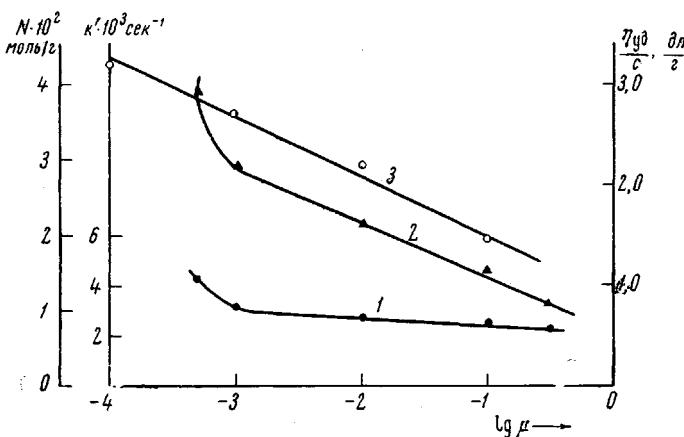


Рис. 6. Зависимость константы скорости  $k'$  (1) удельного числа центров ( $N$ ) полимерного катализатора (ПК) (2) и приведенной вязкости (3) от ионной силы

Условия реакции: концентрация буфера  $\text{трис-HCl}$   $10^{-3}$  моль/л;  $25^\circ$ ;  $\text{pH} = 7,8$ ;  
 $[\text{НФА}] = 1 \cdot 10^{-4}$  моль/л;  $[\text{ПК}] = 3 \cdot 10^{-4}$  моль/л

образующейся уксусной кислотой, которая, по-видимому, «застревает» в «активных полостях». В этом существенное отличие между поведением ПК и нативного фермента.

### Выводы

1. На основе поли-4-винилпиридина и 2-(2'-хлорэтил)пиридина синтезирован полимерный катализатор, активность которого в реакции гидролиза *n*-нитрофенилацетата оказалась на несколько порядков выше активности мономерных моделей.

2. Установлены кинетические аналоги в поведении синтезированного катализатора и протеолитических ферментов, работающих в условиях отравления продуктом.

3. Активный центр катализатора представляет собой неалкилированное 4-замещенное пиридиновое кольцо, окруженное с обеих сторон достаточно длинными последовательностями 4-замещенных пиридиновых колец, N-алкилированных 1'-[2'(2"-пиридил)]этилхлоридом.

4. Высказаны соображения о том, что высокая активность полимерного катализатора обусловлена возникновением гидрофобных «активных полостей» в макромолекулярном клубке.

Московский государственный университет  
им. М. В. Ломоносова

Поступила в редакцию  
5 III 1967

### ЛИТЕРАТУРА

1. A. G. Boyes, U. P. Strauss, J. Polymer Sci., 22, 463, 1956.
2. W. S. Gump, E. J. Nikanitz, пат. США 2553243; Chem. Abstrs, 45, 4271, 1951.
3. F. D. Chataway, J. Chem. Soc., 1931, 2495.
4. H. Linewiver, D. Burk, J. Amer. Chem. Soc., 56, 658, 1934.
5. M. L. Bender, G. E. Clement, F. J. Kezdy, J. Amer. Chem. Soc., 86, 3680, 1964.
6. Физические методы химии гетероциклических соединений, Под. ред. А. Р. Катрицкого, изд-во «Химия», 1966.
7. J. Kallos, K. Avantis, Biochem., 5, 1979, 1966.

**PRODUCT OF REACTION OF POLY-4-VINYLPYRIDINE WITH  
2-(2'-CHLOROETHYL) PYRIDINE AS MODEL OF PROTEOLYTIC  
ENZYME**

*Yu. E. Kirsh, V. A. Kabanov, V. A. Kargin*

**S u m m a r y**

Polymer catalyst with activity in hydrolysis of *p*-nitrophenylacetate by some orders higher than that of monomeric models has been synthesised coming from poly-4-vinylpyridine and 2-(2'-chloroethyl) pyridine. Similar kinetic behavior of the synthesized catalyst and proteolytic enzymes working under conditions of poisoning with the reaction products has been established. Active center of the catalyst is nonalkylated 4-substituted pyridine ring surrounded at both sides with long enough sequences of 4-substituted pyridine rings N-alkylated with 2-(2'-chloroethyl)pyridine. High activity of the polymer catalyst is proposed to be related to rising of hydrophobic cavity in the macromolecular coil.

---