

УДК 541.64.542.954

СИНТЕЗ ПОЛИФЕНИЛЕНОКСИДОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПЕРОКСИДАЗЫ ХРЕНА¹

© 2002 г. Г. П. Власов, Г. А. Панкова, И. Е. Ильина, Е. Н. Власова,
Б. З. Волчек, А. В. Грибанов, М. И. Гойхман

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

Поступила в редакцию 24.04.2001 г.
Принята в печать 01.11.2001 г.

Разработан ферментативный синтез полифениленоксидов из ванилиновой кислоты с использованием пероксидазы хрена. Показано, что при изменении условий синтеза возможно регулирование структуры полимера и его молекулярно-массового распределения. Полученные полимеры являются разветвленными (растворимая фракция) и сильно разветвленными (нерас растворимая фракция) полифениленоксидами.

ВВЕДЕНИЕ

Превращения, катализируемые ферментами в водных и органических растворителях, уже достаточно давно используют для синтеза разнообразных органических и природных соединений, таких как пептиды [1], олигонуклеотиды и полинуклеотиды [2, 3]. Значение фермент-кatalитических превращений в недалеком будущем значительно возрастет в связи с получением абзимов, моноклональных антител, способных осуществлять специфические каталитические реакции [4, 5]. В последние годы ферменты начали применять для получения полимеров, в частности для полимеризации циклических мономеров [6, 7]. Описаны также примеры использования ферментов для деполимеризации синтетических и природных полимеров [3, 8].

Полифенолы, в том числе фенол-формальдегидные полимеры, находят широкое применение в промышленности. Однако серьезным недостатком последних является необходимость использования на стадии их получения токсичного формальдегида. В последние годы делаются попытки использовать для синтеза полимеров фенольного типа ферментные системы на основе ферментов пероксидазы хрена и сои, а также лактазы [9, 10].

¹ Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований ("Научные школы РФ", код проекта 00-15-97318).

E-mail: gpvlasov@hq.macro.ru (Власов Геннадий Петрович).

Реакция получения полимеров проходит в водно-органической среде в присутствии перекиси водорода как субстрата, генерирующего свободные радикалы. Однако многие особенности получения полиарomaticких полимеров в присутствии оксидоредуктаз остаются неизученными.

В настоящей работе мы сообщаем о синтезе ароматических полимеров исходя из ванилиновой кислоты с использованием фермента оксидоредуктазы – пероксидазы хрена (**ПОХ**) и о влиянии на выход полимера и его строение природы перекисных соединений, среды и температуры.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При изучении особенностей ферментативного синтеза полимеров на основе ванилиновой кислоты (4-гидрокси-3-метокси-бензойной кислоты) мы рассмотрели влияние ряда факторов на выход полимера и его структурные особенности, в частности на степень его разветвленности. Синтез полимеров проводили в водно-органической среде, состоящей из смеси фосфатного (рН 7.2) или фосфат-цитратного (рН 5.0) буфера с диоксаном в различном соотношении. Концентрация ванилиновой кислоты в пределах 1–2% не оказывала заметного влияния на выход полимера. В то же время из сравнения данных по выходу полимера в зависимости от природы среды видно, что соотношение диоксан–буфер заметно влияет на выход полимера (табл. 1, опыты 1 и 2). Значительное влияние оказывает также рН. При сравнении данных опытов 1,

Таблица 1. Влияние растворителей и pH раствора на выход полимера (концентрация ванилиновой кислоты 2%, H_2O_2 0.4%, ПОХ 0.5 мг/мл, температура реакции комнатная, время 24 ч)

Опыт, №	Диоксан, %	Натрий-фосфатный буфер (pH 7.2), %	Фосфат-циратный буфер (pH 5.0), %	Выход полимера, %
1	75	25	—	—
2	40	60	—	9
3	40	—	60	47

Таблица 2. Выход полимеров при проведении процесса в диоксан-фосфат-циратном буфере (соотношение 40 : 60) при комнатной температуре (концентрация ванилиновой кислоты 2%, ПОХ 0.5 мг/мл)

Опыт, №	Концентрация перекиси водорода, %	Время реакции, ч	Выход полимера, %
1	0.2	24	27
2	0.4	24	47
3*	0.4	24	48
4	2	24	10
5	0.4	4	43
6	0.6	6	42
7	0.8	6	20

* [ПОХ] = 1.0 мг/мл.

2 и 3 следует, что фосфат-циратный буфер, позволяющий проводить синтез полимера в слабо кислой среде, оказывается более предпочтительным.

При проведении ферментативных процессов с использованием оксидоредуктаз особое влияние на выход целевого продукта наряду с концентрацией фермента оказывает также концентрация субстрата фермента, как источника свободных радикалов. Обычно в качестве субстрата при использовании оксидоредуктаз для получения полимеров применяли перекись водорода. В табл. 2 представлены данные по влиянию на выход полимера концентрации перекиси водорода, как субстрата фермента, генерирующего при взаимодействии с ферментом свободные радикалы, которые в свою очередь инициируют полимеризацию ванилиновой кислоты. Из табл. 2 следует, что оптимальной является концентрация перекиси водорода 0.4% при концентрации фермента 0.5 мг/мл. При этом выход более 40% полимера достигается уже за 4 ч. Обращает на себя внимание также то, что повышение количества перекиси водорода до 0.8–2.0% (табл. 2, опыты 4 и 7) приводит к уменьшению выхода полимера.

В ходе синтеза практически всегда наряду с растворимой мы получали не растворимую в органических растворителях фракцию, что может быть обусловлено реакционной способностью субстрата фермента. В табл. 3 приведены данные по влиянию химической структуры перекисного соединения на общий выход полимера и на ММ

Таблица 3. Влияние химической структуры, концентрации перекиси и температуры реакции на выход полимера и его ММ (условия синтеза: система диоксан-фосфат-циратный буфер (40 : 60), концентрация ванилиновой кислоты 2%, [ПОХ] = 0.5 мг/мл)

Опыт, №	Перекись	Концентрация перекиси, %	Время реакции, ч	T, °C	Выход полимера, %	$M \times 10^{-3}$
1	HOON	0.4	24	20	47	160–190
2	HOON	0.6	6	40	48	400–500*
						20–30*
						3–5*
3	HOON	0.2	24	4	3	160–190*
4	(C ₆ H ₅ CO ₂) ₂	0.4	24	20	0	–
5	(C ₆ H ₅ CO ₂) ₂	0.2	6	40	2	200–300*
						20–30*
6	(t-C ₄ H ₉ -O) ₂	0.4	24	20	0	–
7	(t-C ₄ H ₉ -O) ₂	0.2	6	40	6	20–300*
						100–150*
						10–30*

* Значения ММ фракций полимеров, соответствующих максимумам на гель-хроматограммах (рис. 1).

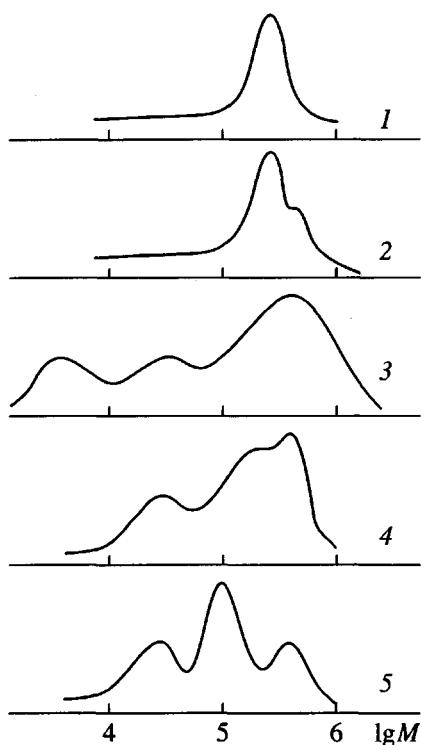


Рис. 1. Гель-хроматограммы полифениленоксидов, полученных в присутствии систем ПОХ + + перекись при 4 (1), 20 (2) и 40°C (3–5). 1–3 — H_2O_2 , 4 — перекись бензоила, 5 — перекись *трет*-бутила.

растворимых фракций. Как видно, относительный выход полимера падает при переходе от перекиси водорода к другим перекисям; при этом при комнатной температуре в случае использова-

ния перекиси бензоила и ди-*трет*-бутилперекиси образования полимера не наблюдается. Таким образом, перекись водорода представляется наиболее оптимальным субстратом. Молекулярная масса полимера, полученного с использованием перекиси водорода, достигает, по данным ГПХ (4–5) $\times 10^5$, что превосходит ММ полимеров, полученных с использованием других инициаторов. В случае синтеза полимера при повышенной или при комнатной температуре с использованием перекиси водорода образуются две фракции — растворимая в органическом растворителе и не растворимая в нем. В зависимости от температуры реакции количество нерастворимой фракции варьируется и достигает 30% от общего выхода полимера. Из данных ГПХ следует также, что при повышении температуры растворимая фракция приобретает бимодальное или тримодальное ММР (рис. 1).

Изучение строения полученных полимеров методом ИК-спектроскопии (рис. 2) показало, что полимеры являются разветвленными (растворимая фракция) и сильно разветвленными (нерастворимая фракция) и практически не содержат сложноэфирных связей, поскольку в спектрах отсутствует полоса поглощения 1730 – 1700 см^{-1} [11, с. 258]. В то же время в ИК-спектрах растворимой и нерастворимой фракции имеются полосы, соответствующие колебаниям простых эфирных связей [11, с. 165] и 1,3,4-замещенных ароматических колец (1186, 1140 и 1010 – 1030 см^{-1} соответственно [11, с. 97]). Это указывает на протекание полимеризации с сохранением позиций замещения в исходном аро-

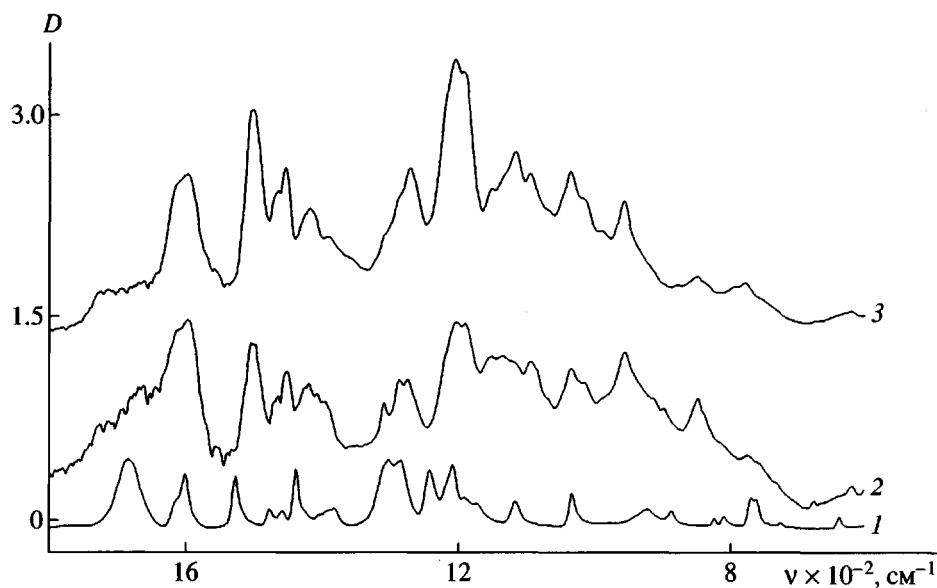


Рис. 2. ИК-спектры: 1 — ванилиновая кислота, 2 — нерастворимая, 3 — растворимая фракции полимера.

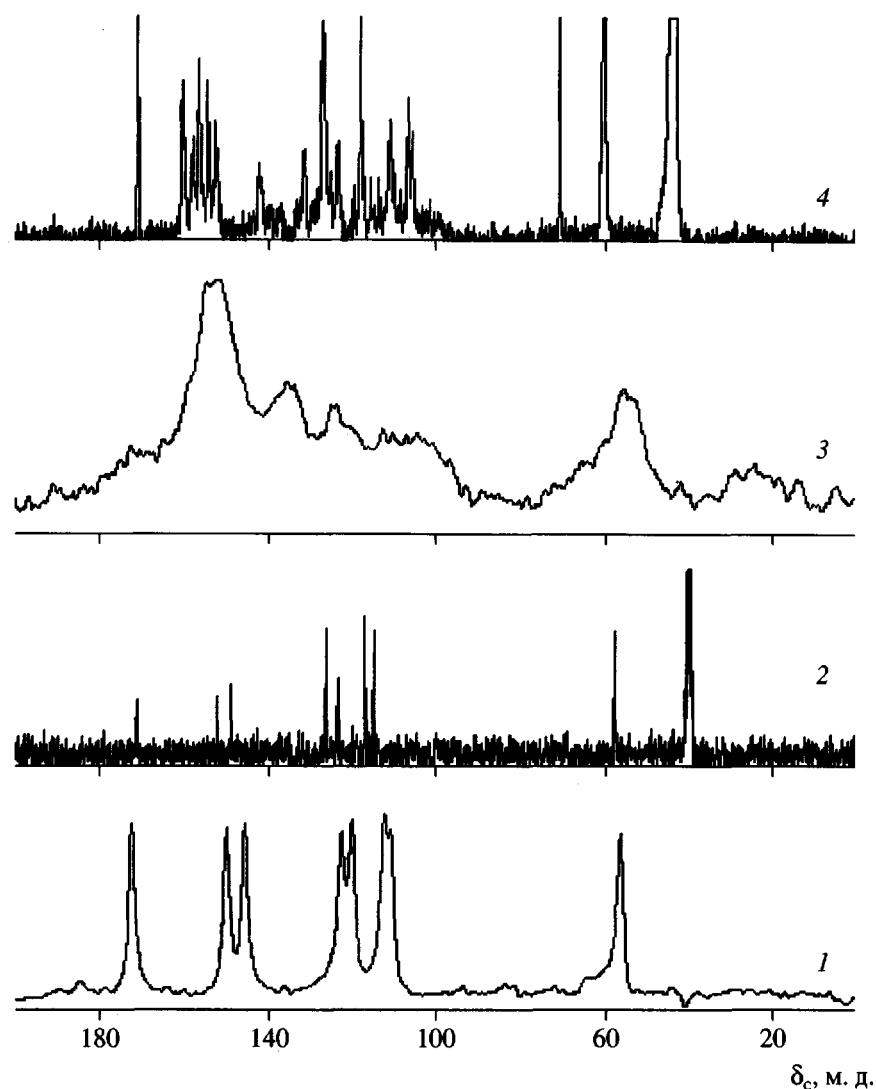


Рис. 3. Спектры ЯМР ^{13}C ванилиновой кислоты (1, 2) и полифениленоксида (3, 4): 1 – в твердой фазе, 2 – в ДМСО, 3 – нерастворимая (в твердой фазе), 4 – растворимая в ДМСО фракции полимера.

матическом кольце. Кроме того, в спектрах растворимой и нерастворимой фракций появляются полосы в области $850\text{--}840\text{ cm}^{-1}$, что соответствует 1,3,4,5-тетразамещенным ароматическим кольцам [12]. В результате этого можно предположить, что вероятнее всего разветвление происходит по пятому положению исходного ароматического кольца, причем доля разветвления значительно выше в нерастворимом полимере. В то же время доля карбоксильных групп (полоса 1689 cm^{-1}) – фактически “концевых” групп полимера – мала в растворимой фракции полимера и несколько возрастает в случае нерастворимой фракции.

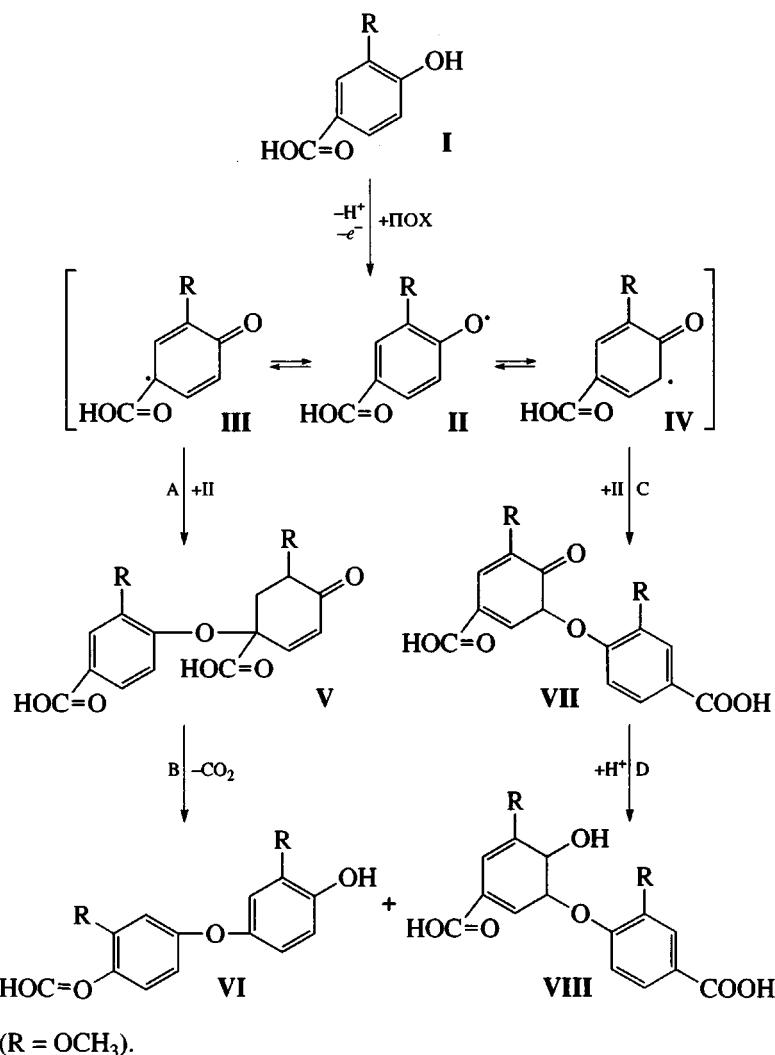
Структура полученных полимеров была подтверждена также спектрами ЯМР ^{13}C (рис. 3).

Рассмотрение соотношения сигналов карбонильного (174 м. д.) и метоксильного атомов углерода (55 м. д.) позволяет оценить степень разветвленности полимеров. В спектре исходной ванилиновой кислоты оно практически равно 1 : 1, что соответствует структурной формуле соединения. В полученных полимерах сигнал карбонильной группы можно отнести к сигналу “концевых” карбоксильных групп. Принимая во внимание ММ растворимой части полимера и то, что соотношение сигналов равно 1 : 7, можно допустить, что в растворимой части полимера между точками “ветвления” находятся линейные фрагменты полимерной цепи, состоящие из 14–15 ароматических циклов. Для нерастворимой части полимера,

как следует из результатов деконволюции спектров, это соотношение равно 1 : 1.5–2.0, что свидетельствует о более высокой степени разветвленности полимера.

На основании полученных данных можно предположить, что в растворимой и нерастворимой фракции полимера ароматические звенья связаны между собой через кислородный мостик, и свободные карбоксильные группы присутствуют только на концах разветвленной полимерной цепочки. Ниже приведен предполагаемый механизм полимеризации ванилиновой кислоты.

На основании полученных данных можно предположить, что в растворимой и нерастворимой фракции полимера ароматические звенья связаны между собой через кислородный мостик, и свободные карбоксильные группы присутствуют только на концах разветвленной полимерной цепочки. Ниже приведен предполагаемый механизм полимеризации ванилиновой кислоты.

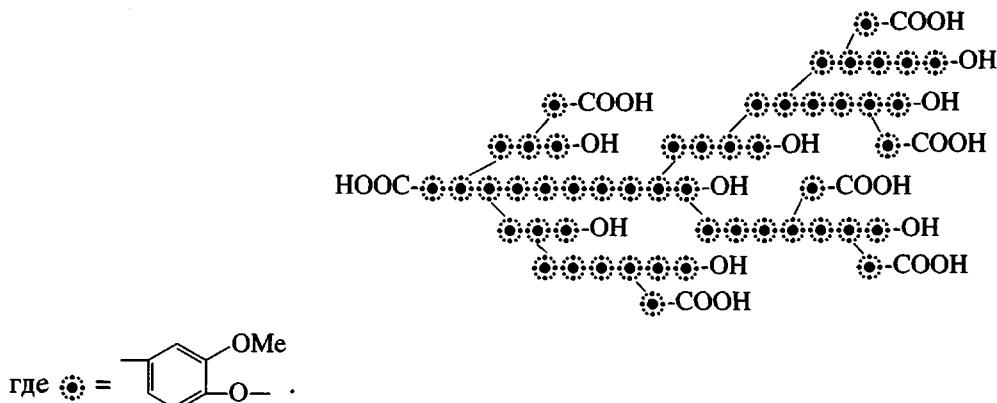


Образование подобных полимеров можно объяснить, если предположить, что радикал HO[·], получающийся при взаимодействии перекиси водорода с пероксидазой хрена, в результате реакции с ванилиновой кислотой I дает феноксильный радикал II, который при прохождении реакции по пути A → B, изомеризуется в радикал III. Взаимодействие последнего с радикалом II приводит к появлению соединения V, которое стабилизируется в результате реакции декарбоксилирования. Дифенилоксидное соединение VI при реакции с радикалом HO[·] вновь может превращаться в со-

ответствующий радикал, аналогичный радикалу III. Это направление реакции ведет к росту полимерной цепи без разветвления. Подобный механизм был недавно рассмотрен на примере ферментативного превращения под действием пероксидазы хрена другого мономера – 3,5-диметокси-4-окси-бензойной кислоты [10]. Авторы не сообщают об образовании нерастворимых разветвленных полимеров. Разветвление полимерной цепочки в нашем случае можно объяснить прохождением реакции по пути C → D при атаке феноксильным радикалом II пятого положения

ароматического кольца в радикале IV с образованием соединения VII и далее соединения VIII. “Объединение” этих двух направлений реакции,

т.е. A → B и C → D и приводит к сильно разветвленному, нерастворимому полимеру, структура которого представлена ниже.



Разветвленность полимеров на основе подобных ароматических соединений – скорее правило, чем исключение. Эту проблему обсуждали ранее на примерах синтеза ряда полимеров из фенолов и ароматических аминов с использованием оксидоредуктаз [9, 13]. Разветвленностью полимеров в нашем случае можно объяснить, по-видимому, как относительно высокие значения ММ подобных полимеров, так и образование нерастворимых фракций.

Таким образом, синтезированные полимеры представляют собой полифениленоксидные соединения, содержащие карбоксильные группы только на концах полимерной цепочки. Полученные полимеры являются разветвленными системами, и разветвленность полимеров значительно возрастает у нерастворимой фракции.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реактивы

В работе использовали ванилиновую кислоту (Sigma-Aldrich), перекись водорода (Реахим, Россия) и пероксидазу хрена, выделенную по методу [14]. Очищенный фермент имел величину RZ 3.2. Растворители перед использованием перегоняли.

Молекулярные массы растворимых фракций полученных полимеров определяли методом гель-хроматографии на колонке с TSK-гелем (TSK-GEL, Toyopearl HW-55 Fine), калиброванной полистиролами с $M = (3.6-470) \times 10^3$. (“Waters Associates”). Элюент ДМФА.

Методы исследования

ИК-спектры регистрировали на ИК-Фурье спектрометре “Bruker IFS-88”. Образцы для снятия спектров готовили измельчением полимеров с KBr и последующим прессованием таблеток.

Спектры ЯМР ^{13}C растворимой фракции полимеров регистрировали на спектрометре “Bruker DRX-300” с рабочей частотой 75 МГц по ядрам ^{13}C при комнатной температуре. В качестве растворителя использовали ДМСО. Все хим. сдвиги рассчитывали по отношению к сигналам ДМСО. Твердофазные спектры нерастворимых фракций полимеров снимали на спектрометре “Bruker CXP-100” с рабочей частотой 25 МГц вращением под “магическим” углом со скоростью 3.5 кГц и передачей поляризации от протонов. Хим. сдвиги рассчитывали по внешнему стандарту – гексаметилбензолу. Спектры ванилиновой кислоты снимали в растворе ДМСО и в твердой фазе. Они были практически идентичны.

Синтез полифениленоксидов

К раствору ванилиновой кислоты в диоксане при перемешивании добавили пероксидазу хрена, растворенную в соответствующем буферном растворе. Затем ввели соответствующее перекисное соединение (перекись водорода – 35%-ный водный раствор, перекись бензоила или другие перекиси в виде 20%-ного раствора в диоксане). После завершения реакции выпавший осадок полимера отделяли центрифугированием, промывали буферным раствором, водой, метанолом и растворяли в ДМФА. Нерастворимую фракцию отделяли, из раствора полимер осаждали метанолом, отфильтровывали и сушили. Нерастворимую фрак-

цию промывали ДМФА и метанолом и сушили под вакуумом.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kullman W. // Enzymatic Peptide Synthesis, Boca Raton: CRC Press, 1987.
2. Шабарова З.А., Богданов А.А. Химия нуклеиновых кислот и их компонентов. М.: Химия, 1978.
3. Платонова Г.А., Суржик М.А., Тенникова Т.Б., Власов Г.П., Тимковский А.Л. // Биоорган. химия. 1999. Т. 25. № 3. С. 189.
4. Yoon S.S., Oli Y., Sweet E., Schultz P.G. // J. Am. Chem. Soc. 1996. V. 118. № 46. P. 11686.
5. Harserodt J., Janda K., Lerner R. // J. Am. Chem. Soc. 1996. V. 118. № 46. P. 11654.
6. Kirpal F. // Macromolecules. 1997. V. 30. № 9. P. 2705.
7. Knani D. // J. Polym. Sci., Polym. Chem. 1993. V. 31. № 9. P. 1228.
8. Dordick J., Marletta M.A., Klibanov A.M. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. № 24. P. 6255.
9. Akkara J.A., Senegal K.J., Kaplan D.L. // J. Polym. Sci., Polym. Chem. 1991. V. 29. № 11. P. 1561.
10. Uyama H., Ikeda R., Sugihara J., Kabayashi S. // Polym. Prepr. Div. Polym. Chem. Am. Chem. Soc. 1998. V. 39. № 1. P. 106.
11. Беллами А. Инфракрасные спектры сложных молекул. М.: Изд-во иностр. лит., 1983.
12. Большаков Г.Ф. // Инфракрасные спектры аренов. Новосибирск: Наука, 1989. С. 26.
13. Schmitt M.M., Schüler E., Braun M., Häring D., Schreier P. // Tetrahedron Lett. 1998. V. 39. № 25. P. 2945.
14. Shannon L.M., Kay E., Lew J.Y. // J. Biol. Chem. 1966. V. 241. № 3. P. 2166.

Synthesis of Poly(phenylene oxides) Using Horse-Radish Peroxidase

**G. P. Vlasov, G. A. Pankova, I. E. Il'ina, E. N. Vlasova, B. Z. Volchek,
A. V. Gribanov, and M. I. Go'khman**

*Institute of Macromolecular Compounds, Russian Academy of Sciences,
Bol'shoi pr. 31, St. Petersburg, 199004 Russia*

Abstract—The enzymatic synthesis of poly(phenylene oxides) from vanillic acid using horse-radish peroxidase was elaborated. It was shown that varying the conditions of synthesis makes it possible to control the polymer structure and its molecular mass distribution. The resulting polymers are branched (a soluble fraction) and strongly branched (an insoluble fraction) poly(phenylene oxides).