



УДК 541.128 + 577.15.02 + 577.156.3

## ИССЛЕДОВАНИЕ ГИДРОЛИЗА *n*-НИТРОФЕНИЛОВЫХ ЭФИРОВ НА АЛКИЛИРОВАННОМ ПОЛИЭТИЛЕНИМИНЕ— ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНОМ КАТАЛИЗАТОРЕ— АНАЛОГЕ $\alpha$ -ХИМОТРИПСИНА

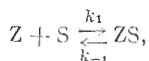
II. ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ НА КИНЕТИКУ ГИДРОЛИЗА

*Ишежецкий В. С., Лукьянова А. П., Кабанов В. А.*

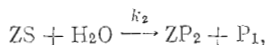
*Московский государственный университет  
им. М. В. Ломоносова*

Исследована температурная зависимость константы Михаэлиса и константы скорости ( $k_2$ ) в реакции гидролиза *n*-нитрофениловых эфиров масляной, капроновой и каприловой кислот на катализаторах — полиэтиленiminaх, содержащих бутильный, гептильный, додецильный и гексадецильный радикалы. Установлено, что связывание субстратов сопровождается конформационной перестройкой макромолекул полимеров. Это подтверждается опытами по седиментации полимеров в отсутствие и присутствии структурных аналогов субстратов *n*-нитроанилидов. Возрастание  $k_2$ , происходящее при увеличении длины радикала в эфире и полимере, обусловлено ростом предэкспоненты (в  $10^2$  раз) при практически неизменной энергии активации ( $E_a$  13—16 ккал/моль), равной  $E_a$  гидролиза этих же эфиров при катализе низкомолекулярными аминами — диэтиламином и триэтиламином.

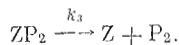
В предыдущем сообщении [1] были изложены результаты исследования кинетики гидролиза ряда нитрофениловых эфиров жирных кислот на катализаторах — алкилсодержащих полиэтиленiminaх линейного строения (ПЭИ- $n_n^*$ ). Как было установлено ранее [2], гидролиз *n*-нитрофениловых эфиров на алкилированных ПЭИ протекает по трехстадийной схеме: адсорбция субстрата (S) в активном центре (Z)



гидролиз субстрата по механизму общесосновного катализа



где  $P_1$  — *n*-нитрофенол,  $ZP_2$  — кислота, сорбированная в активном центре; освобождение активных центров



Установлено также, что константа скорости гидролиза ( $k_2$ ,  $s^{-1}$ ) увеличивается с возрастанием длины алифатических радикалов как в эфирах, так и в полимерах. Полученные данные указывают на формирование реак-

\*  $n_n$  — число атомов углерода в радикале полимера, а  $n_s$  — в молекуле субстрата.

ционного комплекса катализатор — субстрат в процессе их взаимодействия. В формировании этого комплекса решающее значение имеет длина цепи и структура радикала. Для ПЭИ, несущих этильный радикал, равный двум углеродным атомам, скорость реакции становится чрезвычайно малой. Представлялось интересным выяснить, с изменением каких кинетических параметров (энтропии или энергии активации  $E_a$ ) связан рост  $k_2$  при переходе к полимерам и субстратам с более длинными радикалами. Для решения этого вопроса мы исследовали температурную зависимость скорости гидролиза *n*-нитрофениловых эфиров масляной ( $n_s = 3$ ), капроновой ( $n_s = 5$ ) и каприловой ( $n_s = 7$ ) кислот и ПЭИ линейного строения, содержащих бутильные ( $n_{п} = 4$ ), гептильные ( $n_{п} = 7$ ), додецильные ( $n_{п} = 12$ ) и гексадецильные ( $n_{п} = 16$ ) радикалы.

Прежде всего существенно было выяснить, соответствуют ли зависимости скорости реакции от концентрации субстрата и катализатора в исследуемом температурном интервале (10—40°) уравнениям кинетики вида:

$$v = \frac{k_2[Z][S]}{K_m + [S]} \text{ при } [S] > [Z], \quad (1)$$

$$v = \frac{k_2[Z][S]}{K_m + [Z]} \text{ при } [S] < [Z]. \quad (2)$$

Уравнения (1) и (2) использовались ранее для определения  $k_2$  и  $K_m$ . На рис. 1, а, б в координатах Лайнуйвера-Берка представлены зависимости  $v_0$  от  $[S]_0$  и  $v_0$  от  $[Z]_0$  при гидролизе *n*-нитрофенилкапроната, катализируемого ПЭИ-12. Из рис. 1 видно, что уравнения (1) и (2) выполняются во всем температурном интервале. Аналогичные зависимости получены и для других исследованных катализаторов и субстратов. Температурный ход констант, характеризующих элементарные стадии связывания и гидролиза на катализаторе ПЭИ-12, представленный на рис. 2 и 3, указывает на применимость уравнений Вант-Гоффа и Аррениуса для вычисления термодинамических и активационных параметров связывания и гидролиза как для  $[S] > [Z]$ , так и для  $[S] < [Z]$ . В табл. 1 представлены значения  $E_a$  и  $k_0$ , характеризующие стадию, описываемую константой скорости

$$k_2 = k_0 \exp \left[ - \frac{E_a}{RT} \right]$$

при гидролизе *n*-нитрофениловых эфиров масляной, капроновой и каприловой кислот на четырех полимерных катализаторах, а также на низкомолекулярных аналогах активных центров в полимерах — диэтиламине и триэтиламине. Из данных табл. 1 следует, что  $E_a$  гидролиза эфиров не выходит за пределы 13—16 ккал/моль (54,5—67 кДж/моль) как для полимерных, так и для низкомолекулярных аминов. По данным работы [3]  $E_a$  щелочного гидролиза сложных эфиров равна 15,8—16,1 ккал/моль (66,5—67,5 кДж/моль). Из приведенных данных следует, что аминогруппы в полимерных цепях в реакции гидролиза ведут себя аналогично низкомолекулярным аминам и что определяемая  $E_a$  характеризует величину энергетического барьера элементарного акта гидролиза.

В условиях  $[S] < [Z]$  наблюдается сильно выраженная зависимость величины  $k_0$  от длины радикала в полимере. Следовательно, чем больше  $n_{п}$ , тем больше вероятность формирования переходного комплекса в данной реакции. С увеличением длины алифатического радикала возрастает его конформационная лабильность, что должно благоприятствовать образованию переходного состояния при адсорбции субстрата (ориентационный эффект). Этот эффект не проявляется в условиях  $[S] > [Z]$ , что, по видимому, можно связать с взаимодействием между молекулами субстрата при адсорбции их на активном центре. При малых  $[S]$  вероятность соударения молекул субстрата при их адсорбции на катализаторе мала и основной эффект, обусловленный длиной радикала, проявляется в наиболь-

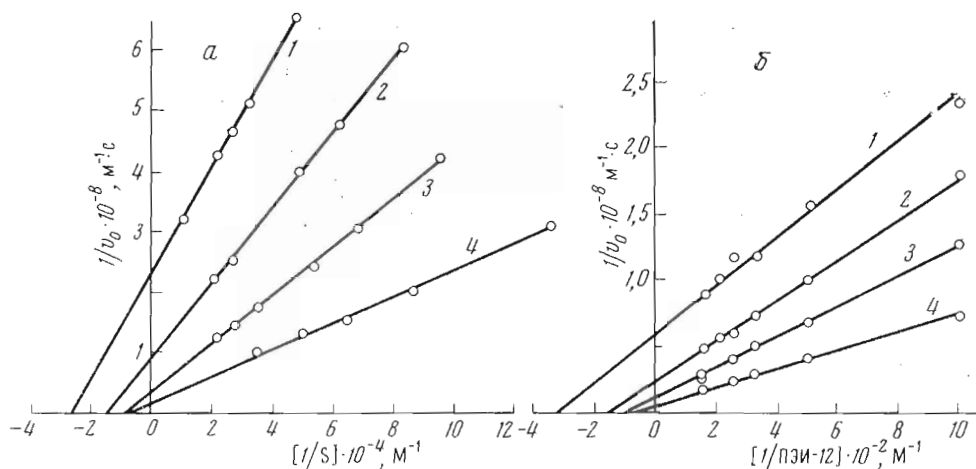


Рис. 1. Зависимость скорости гидролиза *n*-нитрофенилакрилата, катализируемого ПЭИ-12 от концентрации субстрата (а) и концентрации полимера (б): а — [ПЭИ-12] =  $5 \cdot 10^{-6}$  М; б — [S] =  $2,7 \cdot 10^{-8}$  М, температура: 1—10°, 2—20°, 3—30°, 4—40° (0.01 н. трис-НСI буфер, рН 8,3)

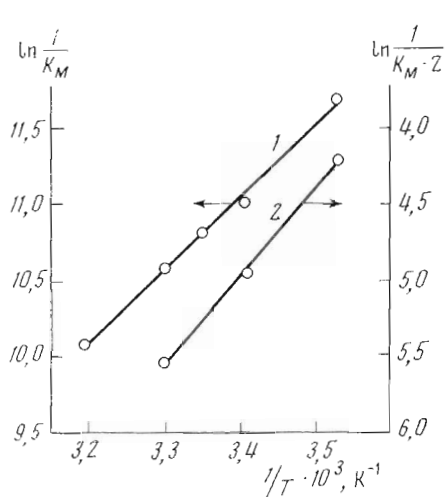


Рис. 2

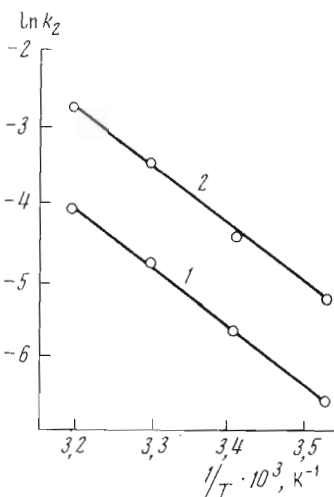


Рис. 3

Рис. 2. График Вант-Гоффа для связывания *n*-нитрофенилакрилата на катализаторе ПЭИ-12: 1 — [S] > [Z], 2 — [S] < [Z] (условия эксперимента указаны в подписи к рис. 1)

Рис. 3. График Аррениуса для константы скорости гидролиза *n*-нитрофенилакрилата на ПЭИ-12: 1 — [S] > [Z], 2 — [S] < [Z] (условия эксперимента указаны в подписи к рис. 1)

шей степени. При больших [S], когда [S] > [Z], взаимодействия между молекулами субстрата могут препятствовать их адсорбции на активных центрах и особенности, связанные с длиной алифатического радикала полимера, проявляется уже в гораздо меньшей степени или пропадают полностью.

Рассмотрим, какие величины свободной энергии, энтальпии и энтропии характеризуют стадию связывания субстратов на исследовавшихся катализаторах. Приведенные в табл. 2 данные относятся к условиям [S] > [Z] и [S] < [Z]. Абсолютные значения  $\Delta F$ , вычисленные из  $\Delta H$  и  $\Delta S$ , растут при переходе от менее гидрофобного субстрата к более гидрофоб-

Таблица 1

Субстрат	Катализатор	[S] > [Z]		[S] < [Z]	
		$E_a^*$ , ккал/моль	$k_0 \cdot 10^4$ , с <sup>-1</sup>	$E_a^*$ , ккал/моль	$k_0 \cdot 10^4$ , с <sup>-1</sup>
<i>n</i> -Нитрофенилбутират	ПЭИ-4	14,3	0,45	13,0	0,01
	ПЭИ-7	14,0	0,64	13,2	0,36
	ПЭИ-12	14,0	0,54	13,8	1,3
	ПЭИ-16	14,0	0,64	13,5	2,0
	Диэтиламин	13,0	—	—	—
	Триэтиламин	15,0	—	—	—
<i>n</i> -Нитрофенилкарбонат	ПЭИ-4	14,2	0,4	15,2	0,2
	ПЭИ-7	14,5	0,5	15,8	20
	ПЭИ-12	15,0	3,2	16,0	43
	ПЭИ-16	—	—	16,1	65
	Диэтиламин	16,0	—	—	—
	Триэтиламин	12,5	—	—	—
<i>n</i> -Нитрофенилкарбонат	ПЭИ-4	16,2	7,6	—	—
	ПЭИ-7	16,2	22	—	—
	ПЭИ-12	15,7	26	—	—
	ПЭИ-16	15,7	26	—	—

\* 1 ккал = 4,184 дж. Ошибки в определении  $E_a$  составляют  $\pm 0,5$  ккал/моль;  $\Delta \ln k_0 = \pm 0,75$ .

Таблица 2

Субстрат	Катализатор	$\Delta F$ , ккал/моль (10°)	[S] > [Z]		[S] < [Z]		
			$\Delta H$ , ккал/моль	$\Delta S$ , кал/ моль·град	$\Delta F$ , ккал/моль (10°)	$\Delta H$ , ккал/моль	$\Delta S$ , кал/ моль·град
<i>n</i> -Нитрофенилбутират	ПЭИ-4	-4,5	0	15,9	-1,60	7,5	32,2
	ПЭИ-7	-4,5	0	15,8	1,9	1,5	12
	ПЭИ-12	-4,5	0	16,0	-1,8	0,5	8,5
	ПЭИ-16	-4,75	0	16,8	-1,95	0	6,8
<i>n</i> -Нитрофенилкарбонат	ПЭИ-4	-5,1	0	18,0	-2,3	6,5	31
	ПЭИ-7	-6,1	-2,8	11,4	-3,1	-8,1	-17,5
	ПЭИ-12	-6,5	-8,5	-7,0	-3,2	-11,5	-29,2
	ПЭИ-16	—	—	—	-3,3	-12,4	-32,1
<i>n</i> -Нитрофенилкарбонат	ПЭИ-4	-6,45	-5,8	+2,3	—	—	—
	ПЭИ-7	-6,7	-7,5	-2,6	—	—	—
	ПЭИ-12	-6,8	-8,8	-7,0	—	—	—
	ПЭИ-16	-6,9	-11,0	-14,4	—	—	—

Точность в определении  $\Delta H = \pm 0,5$  ккал/моль,  $\Delta S = \pm 1,5$  кал/моль·град. Расчет сделан на моль звена полимера, а не на моль активных центров. Доля последних от числа мономерных звеньев при [S] > [Z] в ПЭИ составляет 0,03–0,05, при [S] < [Z] доля работающих активных центров может быть ниже.

ному. Увеличение  $|\Delta F|$  для каждого из субстратов наблюдается также в ряду ПЭИ-4—ПЭИ-16. Эти результаты согласуются с уравнением, связывающим константу сорбции субстрата на полимерах от длины радикалов в субстрате и полимере [1]:

$$1/K_m = an_s \exp [+bn_d/RT].$$

Численные величины  $\Delta H$  и  $\Delta S$ , относящиеся к разным соотношениям между [S] и [Z], различаются друг от друга. Однако тенденция в изменении этих параметров, наблюдающаяся при переходе от систем с меньшими  $n_s$  и  $n_n$  к системам, в которых  $n_s$  и  $n_n$  больше, одинакова.

Связывание молекулы нитрофенилбутирата, обладающей низкой гидрофобностью, характеризуется нулевым тепловым эффектом с положи-

тельным изменением энтропии ( $[S] > [Z]$ ). Именно такие величины  $\Delta H$  и  $\Delta S$  типичны для гидрофобного связывания белками низкомолекулярных органических молекул типа детергентов [4]. Положительная энтальпия характеризует связывания этого эфира при  $[S] < [Z]$ . Обычно положительные  $\Delta H$  и  $\Delta S$  относят к эффектам, связанным с разупорядочением структурированных сольватных оболочек растворителя (воды).

Связывание *n*-нитрофенилкапроната и *n*-нитрофенилкаприлата, более гидрофобных эфиров по сравнению с *n*-нитрофенилбутиратом, характеризуется отрицательными энтальпией и энтропией. Величины по абсолютной величине больше в случае ПЭИ, содержащих более длинные радикалы. При  $[S] < [Z]$  можно наблюдать изменение знака энтальпии связывания при переходе от ПЭИ-4 к полимерам с ( $n_p = 7, 12$  и  $16$ ). Аналогично изменению знака энтальпии меняется и знак энтропии связывания. Следует учесть, что отрицательная энтропия характерна только для наиболее гидрофобных полимеров и субстратов. Можно предположить, что связывание субстрата приводит к более структурированному состоянию системы по сравнению с исходным за счет конформационных изменений в активных центрах и, возможно, в прилегающих к активным центрам областях макромолекулы. Движущими силами таких конформационных изменений являются гидрофобные взаимодействия радикала субстрата с радикалами полимера и последних друг с другом. Молекулы субстрата способствуют осуществлению внутримолекулярных взаимодействий углеводородных радикалов в макромолекуле. Таким образом, вокруг связанного субстрата изменяются локальные конформации макромолекулы, которые в конечном счете приводят к изменению ее конформации в целом. Если это так, то связывание субстрата может приводить к изменению макроскопических свойств растворов макромолекулярных катализаторов. Естественно, что, когда число сорбировавшихся молекул субстрата относительно невелико, эффект, отнесенный к одной молекуле, больше, чем при больших концентрациях субстрата. Связывание субстрата, сопровождающееся изменением структуры макромолекулы, не может осуществляться, когда гидрофобность радикалов как в полимере, так и в субстрате недостаточна для того, чтобы энергия их взаимодействия превысила бы проигрыш в конформационной энтропии.

Для проверки предположения о влиянии адсорбции субстрата на конформацию ПЭИ- $n_p$  были проведены измерения коэффициента седиментации этих полимеров в отсутствие ( $s_p$ ) и в присутствии структурных аналогов субстратов ( $s_{p+ан}$ ) — *n*-нитроанилидов масляной (*n*-НМК) и каприловой кислот (*n*-НКК). Результаты этих измерений представлены в табл. 3.

Таблица 3

Полимер	$s_p, S$	$s_{p+ан}/s_p$	
	без добавки	в присутствии <i>n</i> -НМК	в присутствии <i>n</i> -НКК
ПЭИ-4	0,77	—	1,05
ПЭИ-12	3,4	0,96	1,15
ПЭИ-16	5,1	1,06	1,10

Условия эксперимента:  $\omega = 56000$  об/мин,  $20^\circ$ ; концентрации, %: ПЭИ — 0,6, *n*-НМК — 0,09, *n*-НКК — 0,018, ДМСО — 3.

Из данных табл. 3 видно, что связывание мало гидрофобного субстрата практически не изменяет коэффициент седиментации, в то время как связывание более гидрофобного субстрата приводит к возрастанию  $s$  на 15%. Принимая во внимание, что количество связанного субстрата мало и не вызывает увеличения молекулярного веса седиментирующих частиц ( $M$ ),

все изменения  $s$  следует отнести за счет уменьшения коэффициента трения поступательного движения ( $f$ ), который связан с  $s$  уравнением Сведберга:

$$f = \frac{(1 - \bar{V}\rho_0)M}{N_A s}, \quad (3)$$

где  $\bar{V}$  — удельный парциальный объем полимера;  $\rho_0$  — плотность растворителя;  $N_A$  — число Авогадро. При небольших изменениях  $\bar{V} f \sim (\bar{h}^2)^{1/2}$  [5]. Таким образом, наблюдаемое при сорбции  $n$ -НКК возрастание  $s$  полимеров можно считать следствием уменьшения размеров их глобул, т. е. связывание субстрата в активных центрах макромолекул сопровождается и конформационными изменениями. Сопоставляя результаты исследования температурной зависимости констант связывания и седиментации, можно заключить, что когда связывание субстрата не приводит к конформационным изменениям в полимере или они незначительны, то это соответствует  $\Delta H \geq 0$  и  $\Delta S > 0$ . Когда же изменения конформации полимера более значительны, это соответствует  $\Delta H < 0$  и  $\Delta S < 0$ .

Резюмируя изложенное, следует подчеркнуть, что удлинение алифатических радикалов в молекулах субстратов и полимерных катализаторов на несколько  $\text{CH}_2$ -групп приводит не только к увеличению константы адсорбционного равновесия катализатор — субстрат за счет повышения гидрофобности обоих компонентов реакции, но и обуславливает рост предэкспоненциального члена в выражении для константы скорости гидролиза более чем в  $10^2$  раз. Это означает, что в результате алкилирования макромолекул ПЭИ в них образуются активные центры, которые при связывании субстрата принимают конформацию, благоприятную для катализа. В этом отношении эти высокомолекулярные катализаторы имеют общее с ферментами, у которых конформационные изменения в активном центре при связывании субстрата или кофермента играют существенную роль в катализе.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Пшежецкий В. С., Лукьянова А. П., Кабанов В. А. (1975) Биоорг. химия, 1, № 7, 950—957.
2. Pshezhetskij V. S., Murtazaeva G. A., Kabanov V. A. (1974) Eur. Polym. J., 9, 891—896.
3. Smith H. A., Levenson H. S. (1939) J. Amer. Chem. Soc., 61, 1172—1175.
4. Polet H., Steinhardt J. (1968) Biochemistry, 7, 1348—1351.
5. Цветков В. Н., Эскин В. Е., Френкель С. Я. (1964) Структура макромолекул в растворах, «Наука», стр. 441.

Поступила в редакцию  
28.II.1975

### HYDROLYSIS OF *p*-NITROPHENYL ESTERS ON THE ALKYLATED POLYETHYLENEIMINE-HIGH MOLECULAR SYNTHETIC CATALYST-ANALOG OF $\alpha$ -CHYMOTRYPSIN. II. TEMPERATURE DEPENDENCE OF THE KINETICS OF HYDROLYSIS

PSHEZHETSKII V. S., LUKJANOVA A. P., KABANOV V. A.

Department of Chemistry, M. V. Lomonosov State University, Moscow

The temperature dependence of the Michaelis constant and rate constant ( $k_2$ ,  $\text{s}^{-1}$ ) was studied for the hydrolysis of *p*-nitrophenyl esters of butyric, caproic and caprylic acids catalyzed by *N*-alkyl substituted polyethyleneimine with butyl, heptyl, dodecyl, and hexadecyl radicals. The substrate binding is accompanied by changes in the macromolecule conformation. This fact was confirmed by the sedimentation experiments conducted with or without *p*-nitroanilides, the structure analogs of the substrates. The increase in the  $k_2$  values which takes place with the increase of the radical length both in the substrate and in polymer is due to the predexponent increase by  $10^2$ , the energy of activation being practically constant and equal to that for the hydrolysis of the same esters on low molecular amines: diethylamine and triethylamine, analogs of the active centres in alkylated polyethyleneimines.