



УДК 541.64:547 (39+466)

## О ВНУТРИМОЛЕКУЛЯРНОМ (ВНУТРИЗВЕННОМ) КАТАЛИЗЕ ГИДРОЛИЗА ПОЛИМЕРНЫХ КЕТОЕНАМИННЫХ ПРОИЗВОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ

*Копейкин В. В., Панарин Е. Ф.*

*Институт высокомолекулярных соединений Академии наук СССР, Ленинград*

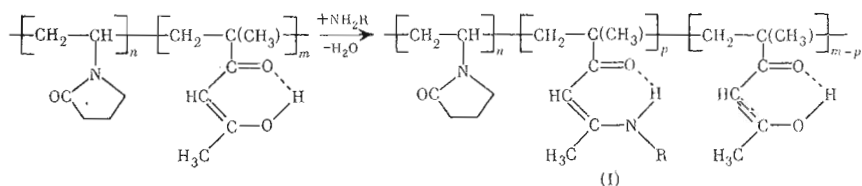
Для выяснения причин аномально быстрого гидролиза полимерных кетоенаминовых производных аминокислот в широком интервале pH изучен гидролиз водорастворимых полимерных енаминов глицина, гистидина и их эфиров. Показано, что гидролиз енаминов аминокислот включает внутримолекулярный общий основной катализ нуклеофильной атаки воды карбоксилатными группами. Этот эффект подтвержден измерениями кинетического изотопного эффекта, а также данными о влиянии структуры енаминов на их гидролиз при различных значениях pH.

Одной из важных задач в области синтеза физиологически активных полимеров является создание систем, способных в условиях организма отщеплять с заданной скоростью целевое активное вещество. В этом отношении перспективны водорастворимые полимерные енамины [1, 2], содержащие в своей структуре аминovinилкарбонильные группировки, которые имеют широкий диапазон скоростей гидролиза [3]. Ранее было показано [3], что гидролитическая устойчивость этих группировок весьма чувствительна к изменению структуры полимера-носителя [2] и присоединенного амина [3]. Аномально быстрый гидролиз отмечен у полимерных кетоенаминовых производных аминокислот, особенно у енаминов глицина. Было предположено [3], что чрезвычайно легкая гидролизуемость этих соединений обусловлена внутримолекулярным катализом гидролиза карбоксилатными группами енаминона, как и при гидролизе Шиффовых оснований аминокислот [4].

Каталитический гидролиз иминной связи широко распространен в живой природе и играет важную роль в функционировании ряда ферментов, например при реакциях биологического переаминирования. В связи с этим выявление и изучение закономерностей внутримолекулярного катализа гидролитического расщепления сравнительно простых полимерных иминов представляет несомненный интерес с точки зрения моделирования биохимических реакций.

Целью данной работы является выяснение роли карбоксильных групп при гидролизе полимерных енаминов аминокислот.

В качестве объектов исследования выбраны енамины, полученные при конденсации водорастворимого сополимера N-винилпирролидона и метакрилолацетона с глицином, гистидином и их эфирами (см. схему).



1a, R = CH<sub>2</sub>COOH  
1б, R = CH<sub>2</sub>COOC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>  
1в, R = CH(COOH)CH<sub>2</sub>Im

1г, R = CH(COOC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)CH<sub>2</sub>Im  
(Im - остаток импидазола)

Состав и спектральные характеристики полимерных енаминонов

Енаминон	Содержание, мол. %		Спектральные характеристики (этанол)	
	<i>n</i>	<i>p</i>	$\lambda_{\text{макс}}$ , нм	$\epsilon$ , л·моль <sup>-1</sup> ·см <sup>-1</sup>
(1а)	94,2	3,70	317	16 800
(1б)	94,2	1,75	318	14 700
(1с)	94,2	3,10	320	14 800
(1г)	94,2	2,45	320	21 300

Таблица 2:

Константы скорости гидролиза ( $k_{\text{эфф}} \cdot 10^3$ , л·моль<sup>-1</sup>·с<sup>-1</sup>) (А) и молярные коэффициенты поглощения ( $\epsilon_1 \cdot 10^{-3}$ , л·моль<sup>-1</sup>·см<sup>-1</sup>) (Б) при разных значениях рН (25° С)  
Погрешность измерений  $\pm 5\%$

рН	Характеристика	(1а) *	(1б)	(1с) *	(1г)	Исходный сополимер **
1,68	А	1 980 (1 710)	1 430	540 (400)	465	—
	Б	6,9 (6,1)	4,5	7,0 (6,1)	4,6	9
2,01	А	3 520	1 420	1 110	460	—
	Б	6,9	4,5	7,0	4,6	9
3,56	А	10 500	1 190	6 760	350	—
	Б	7,0	6,4	7,2	7,5	10
4,01	А	10 800	970	4 980	240	—
	Б	7,2	8,7	7,6	10,3	10
6,86	А	960 (470)	3,5	170 (60)	0,72	—
	Б	27,1 (27,3)	15,9	28,2 (28,2)	16,4	12
9,18	А	5,030	0,017	0,983	0,0034	—
	Б	29,0	16,0	30,2	16,5	210

\* В скобках приведены данные, полученные при гидролизе в тяжелой воде.

\*\* Приведен молярный коэффициент поглощения дионовых звеньев при 320 нм ( $\epsilon_2$ ).

Выбор  $\alpha$ -аминокислот обусловлен тем, что максимальная скорость гидролиза кетоенаминовых производных аминокислот достигается в тех случаях, когда карбоксильная группа отделена от расщепляемой связи лишь одним атомом углерода [3]. Характеристики полимерных енаминонов приведены в табл. 1.

Поскольку гидролиз полимерных енаминонов вплоть до 90% конверсии удовлетворительно описывается кинетическим уравнением второго порядка [3] и, следовательно, скорость гидролиза зависит от начальной концентрации, в опытах использовали растворы полимеров одинаковой молярной концентрации (в пересчете на звенья енаминона). Молярные коэффициенты поглощения и наблюдаемые константы скорости гидролиза енаминонов, рассчитанные как указано в «Экспериментальной части», представлены в табл. 2.

Замечто, что производные глицина (1а) и гистидина (1с) гидролизуются значительно быстрее енаминонов (1б) и (1г), у которых карбоксильная группа этерифицирована. Различия в скорости гидролиза возрастают с увеличением рН так, что в нейтральной и щелочной области они достигают сотен раз. Это свидетельствует о том, что ускоренное расщепление енаминонов аминокислот связано с присутствием в них карбоксильных групп.

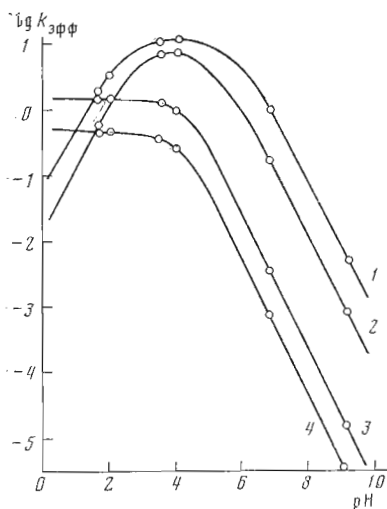


Рис. 1

Рис. 1. pH-зависимость скорости гидролиза полимерных енаминов: 1 — (1а), 2 — (1б), 3 — (1б), 4 — (1г). Точки — экспериментальные значения, сплошные линии — теоретические кривые, проведенные в соответствии с уравнениями (1) и (3). Величины  $k$ ,  $K_a$  и  $K_a'$ , использованные в расчетах, приведены в табл. 3

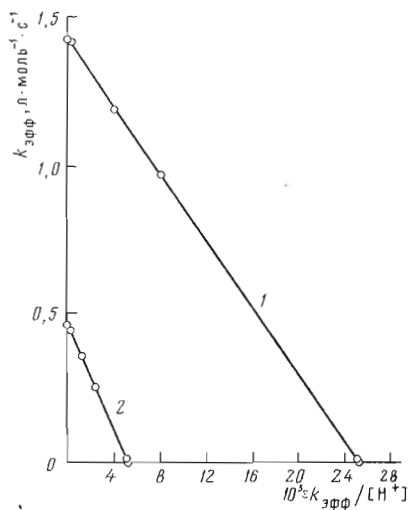
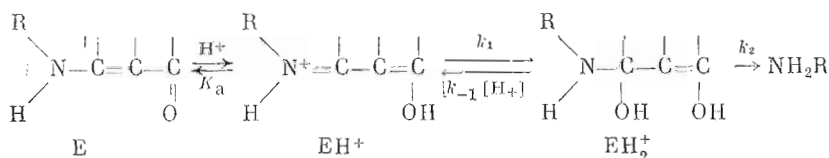


Рис. 2

Рис. 2. Линеаризация pH-зависимости скорости гидролиза полимерных енаминов: 1 — (1б), 2 — (1г)

Интересно, что у кетоенаминовых производных аминокислот и их эфиров pH-зависимости скорости гидролиза различны: у эфиров они имеют сигмоидный характер, а у аминокислот колоколообразны (рис. 1).

При гидролизе енаминов активна их протонированная форма [5]:



Поэтому скорость гидролиза енаминов должна зависеть от доли протонированного енаминона в соответствии с известными [5, 6] уравнениями (1) и (2):

$$k_{\text{эфф}} = k/(1 + K_a/[\text{H}^+]) \quad \text{или} \quad k_{\text{эфф}} = k - K_a k_{\text{эфф}}/[\text{H}^+], \quad (1)$$

$$k_{\text{эфф}} = \frac{k_2(k_1 + k_1^{\text{OH}^-}[\text{OH}^-])[\text{H}^+]}{(k_{-1}[\text{H}^+] + k_{-1}^{\text{OH}^-} + k_2)([\text{H}^+] + K_a)}, \quad (2)$$

где  $k_1$ ,  $k_1^{\text{OH}^-}$ ,  $k_2$  — константы скорости присоединения молекулы воды, гидроксид-иона и распада карбиноламина.

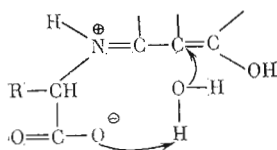
Действительно, в соответствии с уравнением (1) для полимеров (1б) и (1г), характеризующихся сигмоидной pH-зависимостью скорости гидролиза, функции  $k_{\text{эфф}}$  от  $k_{\text{эфф}}/[\text{H}^+]$  оказались линейными (рис. 2), причем коэффициенты корреляции для прямых составили 0,99 и 0,98 соответственно.

Если гидролиз полимеров (1а) и (1б) катализируется их собственными карбонильными и/или карбоксилатными группами, то его скорость должна зависеть не только от степени протонирования енаминов, но и от доли активной формы каталитических групп. Наблюдаемая для соединений (1а) и (1б) колоколообразная pH-зависимость согласуется с участием в гидролизе карбоксилатных анионов. Падение скорости гидролиза

при высоких значениях рН может быть связано с уменьшением доли протонированного енаминона, а понижение скорости при низких значениях рН — с уменьшением доли карбоксилат-анионов.

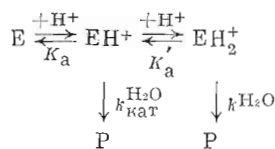
Для уточнения природы каталитических групп гидролиз карбоксилатсодержащих енаминонов (1а) и (1б) проводили в тяжелой воде. Известно, что достаточно надежным критерием внутримолекулярного кислотно-основного катализа является величина кинетического изотопного эффекта при гидролизе, определяемая как отношение констант скорости гидролиза в обычной и тяжелой воде  $k^H/k^D$  [7]. Для обычных реакций это отношение составляет 1,0–1,4, а при внутримолекулярном общем кислотно-основном катализе оно возрастает до 2–3 [8, 9].

Как видно из данных табл. 2, в кислой среде (рН 1,68) кинетический изотопный эффект при гидролизе соединений (1а) и (1б) невелик ( $k^H/k^D$  равно соответственно 1,16 и 1,35), тогда как в нейтральной среде (рН 6,86) отношение  $k^H/k^D$  достигает 2,04 и 2,80. Эти данные позволяют утверждать, что в енаминонах (1а) и (1б) карбоксилатные группы играют роль общих основных катализаторов при атаке молекулы воды на протонированный имин:



В кислой среде карбоксилатные группы в енаминонах (1а) и (1б) протонированы, а карбоксильные группы внутримолекулярный общий кислотный катализ не осуществляют.

Если в кислой и нейтральной области рН пренебречь участием гидроксильных ионов и принять, что  $k_1 \ll k_2$ , гидролиз карбоксилатсодержащих енаминонов можно описать следующей схемой:



Этой схеме отвечает уравнение (3)

$$k_{\text{эфф}} = \frac{k_{\text{кат}}^{\text{H}_2\text{O}} + k^{\text{H}_2\text{O}}}{1 + \frac{K'_a}{[\text{H}^+]} + \frac{[\text{H}^+]}{K_a}}, \quad (3)$$

из которого следует колоколообразная рН-зависимость скорости реакции [6].

Для оценки констант ионизации  $K_a$  и  $K'_a$ , а также истинной константы скорости  $k = k_{\text{кат}}^{\text{H}_2\text{O}} + k^{\text{H}_2\text{O}}$  их значения подбирали по известной процедуре [6].

Значения констант  $k$  и  $K_a$  для соединений (1а) и (1б), определенные графически (рис. 2), а также оптимизированные значения констант, характеризующих гидролиз карбоксилатсодержащих енаминонов, приведены в табл. 3.

В табл. 3 также включены значения констант ионизации енаминонов, оцененные из рН-зависимости молярных коэффициентов поглощения при 320 нм. Интересно, что значения  $pK_a$  для енаминонов (1а) и (1б), найденные из кинетических данных, оказались близкими к  $pK_1$  соответствующих аминокислот (2,34 у глицина и 1,77 у гистидина при 25° С [10]). Хорошее совпадение значений  $pK_a$ , оцененных кинетически и спектрально, а также близость величин  $pK_a$  и  $pK_1$  карбоксильных групп енаминонов и карбоксильных групп соответствующих аминокислот подтверждают правомерность допущений, принятых при составлении кинетической схемы гидроли-

Истинные константы скорости гидролиза и константы ионизации полимерных енаминонов, найденные из кинетических данных и оцененные спектрофотометрически (в скобках)

Енаминон	$k_{H_2O} (\pm 5\%),$ л·моль <sup>-1</sup> ·с <sup>-1</sup>	$k_{H_2O} + k_{кат}^{H_2O}$ ( $\pm 5\%$ ), л·моль <sup>-1</sup> ·с <sup>-1</sup>	pK <sub>a</sub>	pK' <sub>a</sub>
(1a)		11,20	5,83±0,02 (5,85±0,04)	2,35±0,02
(1б)	1,432		4,25±0,03 (4,26±0,04)	
(1в)		7,94	5,23±0,02 (5,21±0,04)	1,79±0,02
(1г)	0,466		4,05±0,03 (4,08±0,04)	

за енаминонов в кислой и нейтральной среде. Сравнение истинных констант скорости гидролиза енаминонов показывает, что при переходе от эфира глицина к эфиру гистидина скорость уменьшается в 3 раза, тогда как при внутримолекулярном катализе переход от глицина к гистидину сопровождается падением скорости лишь на 40%. Таким образом, введение функциональных групп, способных выступать в роли внутримолекулярных катализаторов гидролиза, обеспечивает возможность ускоренного расщепления полимерных енаминонов с объемистыми заместителями.

Поскольку сополимер винилпирролидона и метакрилоацетона нетоксичен и обладает собственной биологической активностью [14], выражающейся в мембранотропном действии на бактериальные клетки, выявленные особенности гидролиза полимерных енаминонов аминокислот имеют принципиальное значение при синтезе полимерных производных стерически затрудненных фармакологически активных аминокислот, таких, например, как  $\alpha$ -аминобензилпенициллин [3].

### Экспериментальная часть

В работе использовали фракционированный водорастворимый сополимер винилпирролидона и метакрилоацетона, синтез и характеристики которого описаны ранее [3]. Конденсацию калиевых солей аминокислот с сополимером проводили в абсолютном этаноле при эквимолярном соотношении реагентов; pH реакционной смеси поддерживали около 8,0–8,2, добавляя 0,01 н. раствор этилата натрия в абсолютном спирте. Реакционную смесь выдерживали 10 ч при 60–70° С, а затем оставляли на ночь при 20° С в атмосфере сухого аргона. Продукт реакции осаждали диэтиловым эфиром, очищали от примесей низкомолекулярных веществ гель-фильтрацией в этаноле на сефадексе LH-20.

Конденсацию эфиров аминокислот с указанным сополимером проводили 6 ч в абсолютном этаноле в присутствии каталитических количеств ледяной уксусной кислоты при 60–70° С. Выделение и очистку продуктов осуществляли как описано выше. Состав полученных полимерных енаминонов (1a – г) определяли спектрофотометрически в этаноле по ранее описанной методике [3]. Хотя наблюдаемые кинетические эффекты при гидролизе не зависят от молекулярной массы полимера-носителя, использовали сополимер с достаточно узким молекулярно-массовым распределением во избежание потерь низкомолекулярных фракций при выделении и очистке полимерных енаминонов.

*Кинетические измерения.* Гидролиз полимерных енаминонов проводили при 25° С в термостатируемой ячейке спектрофотометра «Spesord UV-VIS». В рабочую кювету помещали исходный раствор  $1 \cdot 10^{-4}$  М енаминона, а в сравнительную кювету — тот же раствор после полного гидролиза енаминона. Опыты повторяли до получения 3–5 сходящихся результа-

тов. 0,05 М буферные растворы готовили из стандарт-титров, применяемых в рН-метрии. Изотопные эксперименты проводили с использованием буферных растворов, приготовленных на тяжелой воде (99,9% D<sub>2</sub>O). Контроль за гидролизом осуществляли, регистрируя поглощение при 320 нм. Кинетические кривые линеаризовали в координатах

$$\frac{1}{D - D_{\infty}} - \frac{1}{D_0 - D_{\infty}}, t.$$

Поскольку суммы текущих и начальных концентраций енаминона и образующегося диона равны ( $c_1 + c_2 = c_1^0 + c_2^0$ ), регистрируемые параметры связаны с концентрациями енаминона соотношениями

$$\begin{aligned} D - D_{\infty} &= [(c_1 \varepsilon_1 + c_2 \varepsilon_2) - (c_1^0 + c_2^0) \varepsilon_2] l = \\ &= [c_1 \varepsilon_1 + c_2 \varepsilon_2 - (c_1 + c_2) \varepsilon_2] l = c_1 (\varepsilon_1 - \varepsilon_2) l, \\ D_0 - D_{\infty} &= [(c_1^0 \varepsilon_1 + c_2^0 \varepsilon_2) - (c_1^0 + c_2^0) \varepsilon_2] l = c_1^0 (\varepsilon_1 - \varepsilon_2) l, \end{aligned}$$

где  $\varepsilon_1, \varepsilon_2$  — молярные коэффициенты поглощения енаминона и диона при 320 нм,  $l$  — толщина слоя.

В связи с этим константы скорости гидролиза енаминонов рассчитывали как произведение тангенса угла наклона прямой на величину  $(\varepsilon_1 - \varepsilon_2)$  при данном рН:

$$k_{эфф} = \Delta \left( \frac{1}{D - D_{\infty}} - \frac{1}{D_0 - D_{\infty}} \right) (\varepsilon_1 - \varepsilon_2) l / \Delta t.$$

Поглощение звеньев енаминона оценивали по оптической плотности раствора ( $D_0 - D_{\infty}$ ), найденной экстраполяцией кинетической кривой к начальному времени реакции с учетом поглощения дионовых звеньев полимера:

$$\varepsilon_1 = [(D_0 - D_{\infty}) / (c_1^0 l) - \varepsilon_2].$$

Величины  $\varepsilon_2$  при различных рН определяли по УФ-спектрам сополимера известного состава. Константы ионизации енаминонов ( $K_a$ ) определяли по известному уравнению

$$[H^+] = K_a (\varepsilon_{\max} - \varepsilon_1) / (\varepsilon_1 - \varepsilon_{\min}),$$

где  $[H^+]$  — концентрация протонов в растворе при 25° С, а  $\varepsilon_{\max}$  и  $\varepsilon_{\min}$  — поглощение полностью ионизованного и полностью протонированного енаминона при 320 нм. В расчетах использовали  $\varepsilon_{\max}$  и  $\varepsilon_{\min}$ , найденные при рН 9,18 и 2,01 соответственно, так как увеличение рН до 12,0 и его уменьшение до 1,68 не приводило к изменению поглощения.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. А. с. 465407 (СССР). Способ получения водорастворимых физиологически активных полимеров / Панарин Е. Ф., Копейкин В. В. Оpubл. в Б. И., 1975, № 12, с. 53.
2. Панарин Е. Ф., Копейкин В. В., Афиногенов Г. Е. Биоорг. химия, 1978, т. 4, № 3, с. 375–381.
3. Копейкин В. В., Панарин Е. Ф. Высокомолекулярный соед., 1979, т. А21, № 7, с. 1539–1546.
4. Pollack R. M., Kayser R. H. J. Amer. Chem. Soc., 1977, v. 99, p. 3379–3387.
5. Dixon K., Greenhill J. V. J. Chem. Soc. Perkin Trans. II, 1974, № 2, p. 164–168.
6. Березин И. В., Клевсов А. А. Практический курс химической и ферментативной кинетики. М.: МГУ, 1976, с. 34–36.
7. Хоффман Р. В. Механизмы химических реакций. М.: Химия, 1979, с. 258–259.
8. Gruhn W. B., Bender M. L. Bioorg. Chem., 1976, v. 4, № 3, p. 219–236.
9. Kunitake T., Okahata Y., Tahara T. Bioorg. Chem., 1976, v. 5, № 2, p. 155–167.
10. Greenstein J. P., Winilz M. Chemistry of the amino acids. N. Y.—London: J. Wiley & Sons Inc., 1961, v. 1, p. 486–487.
11. Афиногенов Г. Е., Панарин Е. Ф., Копейкин В. В. Антибиотики, 1978, № 5, с. 419–424.

Поступила в редакцию  
15.I.1982  
После доработки  
6.IV.1982.

ON THE INTRAMOLECULAR (I NTRA-UNIT) CATALYSIS OF HYDROLYSIS  
OF POLYMERIC KETOENAMINE DERIVATIVES OF AMINO ACIDS

KOPEIKIN V. V., PANARIN E. F.

*Institute of High Molecular Weight Compounds, Academy of Sciences  
of the USSR, Leningrad*

Data on the catalytic hydrolysis in monomeric units of polymeric enamminones of amino acids (Gly, His) based on a water-soluble copolymer of N-vinylpyrrolidone and methacryloylacetone have been obtained. Accelerated cleavage of the amino acid enamminones is no longer observed after esterification of their carboxylic groups. The deuterium kinetic isotope effect of the solvent observed at neutral pH, and analysis of the pH-dependences for the hydrolysis rate over the pH range 1,68--9,18 (at 25° C) indicate that the hydrolysis of polymeric amino acid enamminones involves not only the direct nucleophilic water attack on the protonated enamminone, but also intramolecular general base catalysis of water attack by the internal carboxylate groups. This intramolecular catalysis of hydrolysis is of importance in connection with the problem of synthesis of biologically active preparations capable of releasing a desired active compound from the polymeric matrix in the aqueous solution under mild conditions.