

含水杨酸的缩聚物对 *P*-硝基苯酚 乙酸酯水解反应的催化作用 (I)*

何炳林 黄文强 郭贤权 俞耀庭

(南开大学化学系)

摘 要

通过 Mannich 反应,由水杨酸、甲醛和甲胺合成了一种在主链上含有水杨酸基和叔胺基的新型聚电解质 SFMA. 用 SFMA 作为聚合物催化剂催化 *P*-硝基苯酚乙酸酯 (PNPA) 的水解反应. 动力学研究结果表明,在较高的 pH 值下, SFMA 比水杨酸及其与甲醛的缩聚物具有较高的加速作用. 缩聚物主链上的胺基能与水杨酸基的羟基发生协同作用. 对缩聚物的组成及其在水溶液中的构象对催化活性的影响也进行了研究.

五十年代,有人^[1,2]用化学模拟的方法来研究酶的催化历程. 六十年代以来,许多人用聚合物来模拟酶的催化作用^[3-6]. 聚合物作为酯水解反应的高效催化剂,在催化过程中通过功能基间的协同作用、静电作用或疏水作用,使它具有比低分子模型化合物高得多的催化活性^[7]. 丝氨酸水解酶的活性中心含有丝氨酸残基. 丝氨酸的羟基有很高的离解常数^[8]和亲核反应性^[9]. Overberger 等用 *P*-乙烯基苯酚和 4(5)-乙烯基咪唑的共聚物来模拟丝氨酸水解酶的催化作用^[10]. Noguchi 等用合成的酪氨酸和谷氨酸的肽来研究羟基和羧基在催化活性酯水解过程中的协同作用^[11]. 但这些研究大多把催化基团和相互作用基团悬挂在侧链上.

水杨酸具有互为邻位的羟基和羧基,其羟基的离解常数在 13 以上,与丝氨酸的羟基相似;而且在乙酰水杨酸的水解过程中,邻近的羧基可以发生分子内的催化作用^[12]. 因此,在较高的 pH 值下水杨酸的羟基很有可能具有亲核反应性. 如果在大分子主链上再引进可能与羟基发生协同作用的基团(如胺基),则有可能大大提高水杨酸羟基对酯基的亲核性. 为了证实这种设想,我们用缩聚的方法在聚合物主链上直接引入水杨酸和胺二种功能基,并用这种聚合物作为 *P*-硝基苯酚乙酸酯 (PNPA) 水解反应的催化剂来研究它的催化作用.

实 验 部 分

合成

1. 底物——*P*-硝基苯酚乙酸酯 (PNPA) 按常规方法合成^[13]. 产率: 78.9% (以 *P*-

* 本文部分内容曾在 "IUPAC MACRO 82" 会议上宣读,本刊于 1981 年 10 月 30 日收到.

硝基苯酚计)。熔点: 79.4—81.3°C (文献^[13]值: 81°C)。

元素分析: $C_8H_7NO_4$ 计算值: C: 52.99, H: 3.90, N: 7.73; 实测值: C: 52.72, H: 3.93, N: 7.98。

2. 水杨酸、甲醛缩聚物 (SF) 的合成。在三口瓶中加入 6.9 克水杨酸(0.05mol), 37% 甲醛水溶液 20 毫升 (~0.25mol) 和 5 毫升浓盐酸, 搅拌下升温至 98—101°C 反应约 12 小时, 所得的缩聚物水冲洗后溶于 30 毫升 5% 的氢氧化钠溶液中, 再于 5% 的盐酸溶液中重沉淀。沉淀物用热蒸馏水冲洗至水中无氯离子, 于 50°C 真空烘干。产物重 7.1 克。产率: 94.7% (按水杨酸计)。UV λ_{max} 311nm (ϵ 4200, pH9.7)。IR 1672, 1617 cm^{-1} (C=O)。

元素分析: $(C_8H_6O_3)_n$ 计算值: C: 65.85, H: 4.88; 实测值: C: 65.19, H: 4.73。

3. 水杨酸、甲醛和甲胺缩聚物 (SFMA) 的合成。甲胺 (0.05mol) 和甲醛(过量)溶液在室温下混合数分钟后加入到水杨酸 (0.05mol) 和甲醛的混合液中, 约 90°C 下反应 2 小时, 加入硫酸 (2 克, 50% 浓度) 催化并升温至沸腾, 回流 1 小时, 蒸出水和未反应的物质, 在 150—160°C 进一步缩合 2 小时, 得到熔融缩聚物。将粗产物溶于 5% 碱溶液中, 在 5% 的盐酸溶液中重沉淀。重复沉淀一次。沉淀物用热蒸馏水冲洗至无氯离子。50°C 真空烘干。得产物 4.1 克。产率 47.5% (按水杨酸计)。UV λ_{max} 310nm (ϵ 3100, pH9.7)。IR 1672, 1610 cm^{-1} (C=O), 1385 cm^{-1} (C—N)。

元素分析: $(C_2H_5N)_n(C_8H_6O_3)_{1.65n}$ 计算值: C: 62.93, H: 5.14, N: 4.83; 实测值: C: 63.50, H: 5.65, N: 4.66。

pH 滴定

1. 缩聚物“表观酸值”的测定: 将水杨酸及其缩聚物分别溶于 0.1N 的标准氢氧化钠溶液中, 用 0.1N 标准盐酸溶液滴定。用 pHS-2 型酸度计指示滴定中 pH 值变化。用 pH 值对消耗的盐酸的体积作图。氢氧化钠总的毫克当量数与消耗的盐酸总毫克当量数(羧基的突跃范围在 pH5—6)之差即为样品的“表观酸值”。

2. 缩聚物中可离解基团的 pK_a 值的测定: 将水杨酸及其缩聚物样品分别溶于标准碱溶液中, 用 KCl 调节溶液在滴定终了时的离子强度, 在 $30 \pm 0.2^\circ C$ 下用标准盐酸溶液滴定。用 pHS-2 型酸度计指示滴定中的 pH 值变化。在没有水杨酸或其缩聚物样品的条件下用同样的方法进行空白滴定。在相同 pH 值下样品与空白滴定消耗的酸的体积之差 (ΔV) 对 pH 作图, 曲线突跃拐点所对应的 pH 值就是水杨酸及其缩聚物中可离解基团的 pK_a 值^[14]。缩聚物的功能基在 ΔV -pH 图上突跃不明显时, 利用修正的 Henderson-Hasselbach 方程^[15]:

$$pH = pK_a - n \log \frac{1-\alpha}{\alpha}$$

(式中 α 为离解度), 用 pH 对 $\log \frac{1-\alpha}{\alpha}$ 作图。 $\alpha = 0.5$ 时, 直线在 pH 轴上的截距为 pK_a , 斜率为 n 值。

缩聚物溶液粘度的测定

将缩聚物的样品溶于 pH9.30 的 0.05M Tris-HCl 缓冲溶液中(Tris: 三羟甲基氨基

甲烷),在不同的氯化钾浓度下用 Ubbelohde 稀释粘度计在 $30 \pm 0.05^\circ\text{C}$ 下进行测定。

动力学测量

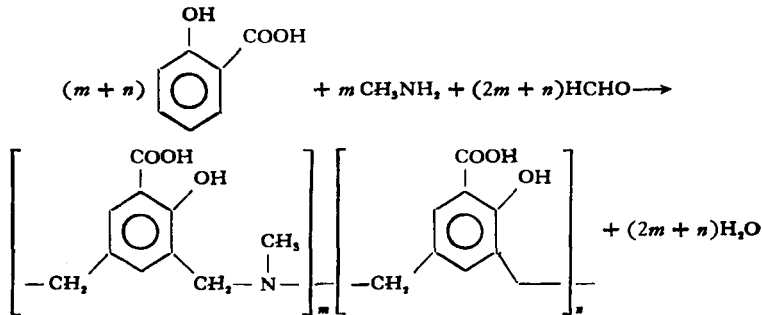
水杨酸及其缩聚物催化酯水解反应的动力学的测量按常法^[10]进行。除特殊说明的以外,所有反应均在含有 0.5M/l 氯化钾的缓冲溶液 ($\text{pH}7-9.5$ 用 0.05M Tris-HCl 溶液, $\text{pH}9.5$ 以上用 0.05M 三乙胺-HCl 溶液)中进行。催化剂按水杨酸的量配制成 $5 \times 10^{-4}\text{M/l}$ 浓度的溶液。底物 PNPA 配制成一定浓度的乙醇溶液。使用时,移取 5 微升底物溶液加到 3 毫升的催化剂溶液中使最终浓度为 $5 \times 10^{-5}\text{M/l}$ 。用 SPECORD UV VIS 型分光光度计,自配恒温夹套池架与恒温槽相接控制反应温度为 $30 \pm 0.2^\circ\text{C}$,记录 PNPA 水解反应释放出的 *P*-硝基苯氧离子在 400nm 处的吸光度变化 (A_t)。反应经过 7 个半衰期以上的吸光度作为反应终了的吸光度 (A_∞)。

数据处理:所有 PNPA 的水解反应均按假一级反应动力学处理。用 $\ln(A_\infty - A_t)$ 对时间 t 作图。直线的斜率为假一级速度常数 k_m ;酯催化水解反应的一级速度常数为 $k_0 = k_m - k_m$, 式中 k_m 为 PNPA 在缓冲溶液中的自发水解反应速度常数;二级速度常数为 $k_{cat} = k_0/[C]$, 式中 $[C]$ 为催化剂的浓度。酯水解反应的初速度 $V_i = k_m \cdot [\text{PNPA}]$, 式中 $[\text{PNPA}]$ 为起始浓度。

结果和讨论

合成

水杨酸和甲醛在酸性介质中很容易发生缩聚反应。在有甲胺存在时,是 Mannich 缩合反应。反应方程式如下:



由于甲醛与甲胺在常温下混合就迅速反应生成羟甲基中间体,后者在酸性介质中迅速脱水生成西佛碱^[6]使胺不能参加缩聚反应。实验证明,在 $\text{pH}5$ 的条件下甲胺并不参与水杨酸和甲醛的缩聚反应。为了减少副反应,我们先用胺和甲醛混合,然后在 $\text{pH}6-7$ 的条件下同水杨酸反应一段时间,再加入酸催化,结果缩聚物中的氮含量可达理论值的 70% 以上。

加料配比与缩聚物组成的关系。在甲醛过量的条件下,我们发现甲胺(MA)和水杨酸(SA)的克分子比从 0.3 到 1 之间变化时,缩聚物链中胺基数(A)与水杨酸基数(S)之间的比值随甲胺加入量的增加而增加(图 1)。

水杨酸、甲醛和甲胺缩聚物的链节可以分为二种基本的结构单元:含胺基(A)和含水杨酸基(S)的结构单元[式(I)]。用 pH 滴定方法可以测得缩聚物中水杨酸的羧基的

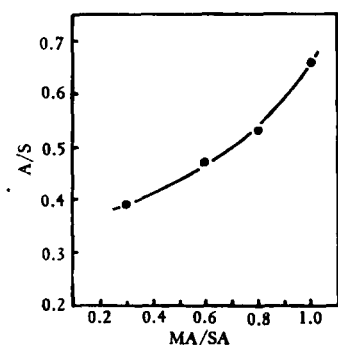


图 1 甲胺过量的条件下, 缩聚物 SFMA 链中胺基数与水杨酸基数的比值 (A/S) 与甲胺 (MA) 和水杨酸 (SA) 加料配比关系图。

“表观酸值”。对几种不同含氮量的 SFMA 样品测得的表观酸值和由含氮量直接计算的酸值列于表 1。由表 1 可见, 表观酸值与计算值之差正好等于胺基含量。这一结果表明, pH 滴定法只能测得邻近没有胺基的水杨酸基单元的酸值。因此, 邻近的胺基和水杨酸基在中性和弱酸性介质中极有可能形成类似氨基酸的内盐结构(式 (II))。

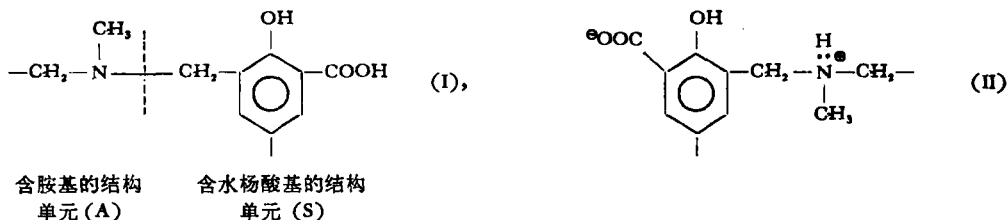


表 1 水杨酸及其缩聚物的酸值

缩聚物*	氮含量 (%)	计算的胺基含量 (mN/g)	A:S	滴定的表观酸值 (mN/g)	总酸值		
					计算值** (mN/g)	胺基+滴定值 (mN/g)	与计算值比较的误差(%)
SA	—	—	—	7.15	7.24	—	-1.2
SF	—	—	—	6.32	6.66	—	-5.1
SFMA(I)	3.26	2.33	1:2.58	4.08	6.01	6.51	+8.3
SFMA(II)	3.82	2.73	1:2.16	2.88	5.88	5.61	-4.6
SFMA(IV)	4.83	3.44	1:1.65	2.17	5.67	5.61	-1.1
SFMA(V)	5.20	3.71	1:1.51	1.75	5.61	5.46	-2.6
SFMA(VI)	5.93	4.24	1:1.29	1.38	5.47	5.62	+2.7

* SA 为水杨酸, SF 为水杨酸, 甲醛缩聚物, SFMA 为水杨酸, 甲醛, 甲胺缩聚物。

** 计算的酸值 = 胺基的毫克当量数 × 水杨酸基的比例系数 (S)。

表 2 水杨酸及其缩聚物的功能基的 pK_a 值*

	n_1	pK_{a_1}	n_2	pK_{a_2}	n_3	pK_{a_3}
SA	—	2.90	—	13.15		
SF	1.06	4.35	—	13.10		
SFMA	1.56	4.48	1.11	9.72**	—	12.30

* 测定条件: $30 \pm 0.2^\circ\text{C}$, 滴定终了中性盐浓度: 0.5M/l 。

** 为胺基的 pK_a 值。

为了比较不同环境中水杨酸及其缩聚物功能基的酸碱度及其催化活性,我们在 $30 \pm 0.2^\circ\text{C}$, 离子强度为 0.5 (用 KCl 调节)的条件下用 pH 滴定法测定了各功能基的 pK_a 值(见表 2)。

动力学

水杨酸及其缩聚物对酯水解反应的催化作用是通过测量 PNPA 水解释放出来的 P-

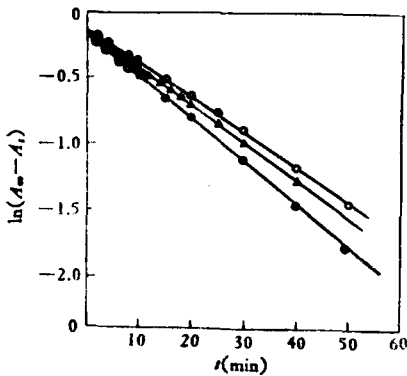


图 2 PNPA 自发水解 (○), SF 催化 (▲) 和 SFMA 催化 (●) 水解反应的 $\ln(A_\infty - A_t)$ 与时间 t 的关系图 ($\text{pH} 9.07$; 0.5M KCl; $30 \pm 0.2^\circ\text{C}$)。

硝基苯氧离子在 $400\text{nm}^{[10]}$ 处的吸光度随时间的变化进行研究的。实验证明,用 $\ln(A_\infty - A_t)$ 对时间 t 作图有很好的直线关系(图 2),符合假一级动力学历程。本文所有的动力学研究都是在催化剂浓度过量于底物浓度的条件下进行的。

缩聚物分子的构象与催化活性的关系。对缩聚物溶液粘度的测定表明,水杨酸、甲醛和甲胺的缩聚物具有聚电解质的特性。溶液中的离子强度对聚电解质的分子构象有很大的影响^[17]。我们在不同的氯化钾浓度的缓冲溶液中测定了缩聚物的比浓粘度 (η_{sp}/C), 结果发现,它的比浓粘度随氯化钾浓度的增加迅速降低;当氯化钾浓度达到

0.3M 以上时,其比浓粘度趋于一定值(图 3)。这说明缩聚物的构象由于中性盐的加入发生了变化。粘度的降低意味着缩聚物分子发生了收缩缠绕作用^[17]。在相近的 pH 值下测定 SFMA 催化 PNPA 水解时发现,酯水解反应的速度由于氯化钾浓度的增加而增加;当增加到 0.3M 以上时,反应速度也趋于一最大值(图 4)。这说明缩聚物分子收缩卷曲的构象是催化 PNPA 水解反应的有利构象。这与 Overberger 等人的结论^[18]相一致。

缩聚物的组成与催化活性的关系。用不同含氮量的 SFMA 催化 PNPA 水解反应时,二级速度常数并不随缩聚物含氮量增加而增加,而是经过一最大值后随含氮量增加而

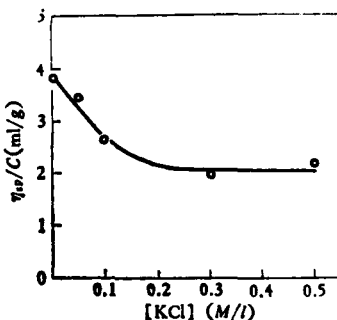


图 3 缩聚物 SFMA 的比浓粘度与溶液中 KCl 浓度的关系。

($\text{pH} 9.30$; 0.05M Tris-HCl 缓冲溶液; $30^\circ\text{C} \pm 0.05^\circ\text{C}$)

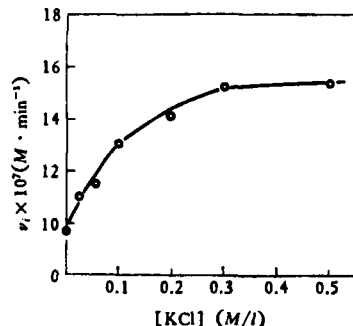


图 4 SFMA 催化的 PNPA 水解反应。反应速度与溶液中 KCl 浓度的关系。

([SFMA]: $5 \times 10^{-4}\text{M/l}$; [PNPA]: $5 \times 10^{-3}\text{M/l}$; $\text{pH} 9.14$; 0.05M Tris-HCl 缓冲溶液, $30 \pm 0.2^\circ\text{C}$)。

降低(图 5a)。这说明缩聚物链中的胺基并不直接发生催化作用。由二级速度常数对缩聚物链组成作图(图 5b)可以看出, SFMA 催化 PNPA 水解的二级速度常数的最大值出现

在聚合物链中水杨酸基数与胺基数之比为 2 的附近。就是说, 当缩聚物的链节是由二个水杨酸基和一个胺基组成时, 它的活性最高。这似乎说明了一个胺基和羟基相邻近时, 才具有较高的催化活性, 即胺基和羟基是活性中心。

pH 值对缩聚物催化活性的影响。在不同 pH 值的缓冲溶液中水杨酸及其缩聚物 SF, SFMA 催化 PNPA 水解反应的二级速度常数列于表 3 中。由此看出, 水杨酸及其缩聚物催化酯水解反应的二级速度常数都随 pH 值的增加而增加。在所研究的 pH 值范围内, 水杨酸的羧基是以阴离子形式存在的, 不随 pH 值变化; 而它的羟基则随 pH 值的增加离解度增大。即苯氧阴离子的浓度随 pH 值增加而增加。因此, 水杨酸及其缩聚物的二级速度常数随 pH 值升高而增加, 这说明, 水杨酸的苯氧阴离子是进攻酯羰基的亲核基团。

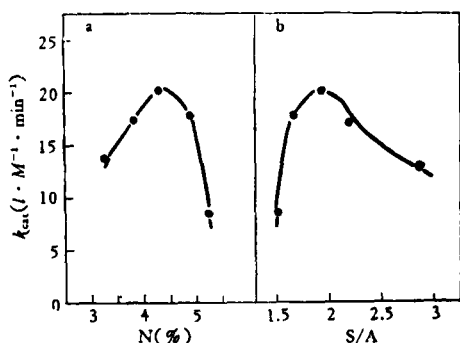


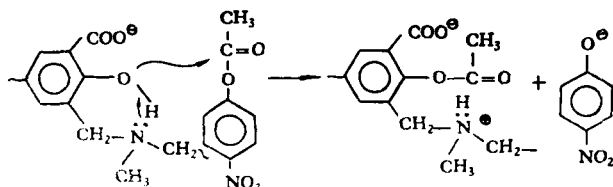
图 5 SFMA 催化的 PNPA 水解反应。二级速度常数 k_{cat} 与 SFMA 含氮量或组成的关系。([SFMA]: $5 \times 10^{-4} M/l$; [PNPA]: $5 \times 10^{-3} M/l$; pH = 9.28; 0.5 M KCl; $30 \pm 0.2^\circ C$)。

表 3 不同 pH 值下水杨酸及其缩聚物催化 PNPA 水解反应的二级速度常数*
 k_{cat} ($l \cdot M^{-1} \cdot min^{-1}$)

	pH					
	7.97	8.46	9.07	9.76	10.65	11.21
SA	—	-0.77	0.34	42.8	370.8	526
SF	—	-0.43	5.92	39.6	578.4	1212
SFMA	1.00	1.62	12.56	88.8	698.4	1402

* 反应条件: [C] $5 \times 10^{-4} M/l$; [PNPA] $5 \times 10^{-3} M/l$; 0.5M KCl; $30 \pm 0.2^\circ C$ 。

由表 3 还可看到, 缩聚物的催化活性比水杨酸高。但水杨酸及其与甲醛的缩聚物 SF 在 pH 8.46 以下时, 两者都已失去活性(负值), 而含胺的缩聚物 SFMA 在 pH 7.97 时仍有相当的活性。这说明缩聚物链中的氮与水杨酸的羟基发生了有利于催化作用的协同作用。由于缩聚物中水杨酸的羟基与胺的氮原子间有非常合适的空间位置, 可以形成六元环的“质子转移体系”, 从而增加了羟基的亲核性。这种体系与丝氨酸水解酶中的咪唑基氮与丝氨酸残基的羟基的作用^[19]相似。显然, 水杨酸及其与甲醛的缩聚物 SF 则没有这种作用。因此, SFMA 催化 PNPA 水解反应的乙酰化过程可以用下式来表示:



生成的乙酰水杨酸基可以借助于胺基的普通碱或邻位的羧基的协同作用发生去酰化, 从

而使催化基团再生。

致谢 南开大学元素有机化学研究所分析室协助测定聚合物的红外光谱和元素分析, 谨致谢意。

参 考 文 献

- [1] Bruice, T. C., Schmir, G. L., *J. Am. Chem. Soc.*, **79** 1663(1957).
- [2] Bender, M. L., Turnquest, B. W., *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 1656(1957).
- [3] Overberger, C. G., Salamone, J. C., *Accounts Chem. Res.*, **2**, 217(1969).
- [4] Klotz, I. M., Royer, G. P., Scarpa, I. S., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **68**, 263(1971).
- [5] Letsinger, R. L., Savereide, T. J., *J. Am. Chem. Soc.*, **84**, 114; 3122(1962).
- [6] Kunitake, T., *Bioorg. Chem.*, Vol. 1, Academic Press, 1977, p. 153.
- [7] Overberger, C. G., Mitra, S., *Pure, Appl. Chem.*, **51**, 1391(1979).
- [8] Bruice, T. C., Fife, T. H., Bruno, J. J., Brandon, N. E., *J. Am. Chem. Soc.*, **84**, 1973(1962).
- [9] Anderson, B. M., Cordes, E. H., Jencks, W. P., *J. Biol. Chem.*, **236**, 455(1961).
- [10] Overberger, C. G., Salamone, J. C., Yaroslavsky, S., *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 6231(1967).
- [11] Noguchi, N., Tokura, S., Komai, T., Yamamoto, H., Ohuishi, O., *J. Biochem.*, **64**, 703(1968).
- [12] Bender, M. L., *Chem. Rev.*, **60**, 53(1960).
- [13] Overberger, C. G., Pierre, T. St., Vorchheimer, N., Yaroslavsky, S., *J. Am. Chem. Soc.*, **87**, 296(1965).
- [14] Parke, T. V., Davis, W. W., *Anal. Chem.*, **26**, 642(1954).
- [15] Katchalsky, A., Spinik, P., *J. Polym. Sci.*, **2**, 432(1947).
- [16] Jencks, W. P., *J. Am. Chem. Soc.*, **81**, 475(1959).
- [17] Morawetz, H., "Macromolecules in Solution" Interscience Publisher, New York, N. Y., 1965, Chapt. VII.
- [18] Overberger, C. G., Morimoto, M., *J. Am. Chem. Soc.*, **93**, 3222(1971).
- [19] Blow, D. M., "The Enzymes", 3rd ed., Vol. 3, Academic Press, 1971, p. 185.

CATALYSIS OF CONDENSATION POLYMERS CONTAINING SALICYLIC ACID FOR HYDROLYSIS OF *P*-MITROPHENYL ACETATE IN AQUEOUS SOLUTION (I)

He Binglin, Huang Wenqiang, Guo Xianquan and Yu Yaoting

(Department of Chemistry, Nankai University)

ABSTRACT

Condensation polymer of salicylic acid, formaldehyde and methyl amine (SFMA) was prepared by Mannich's condensation. The Catalytic kinetics of hydrolysis of *p*-nitrophenyl acetate (PNPA) by SFMA was investigated. The results indicated that SFMA shows greater rate enhancement than salicylic acid and its polycondensate with formaldehyde for hydrolysis of PNPA in aqueous solution. Effects of pH values of solution, polycondensate's component and conformation in solution on the catalytic activity of SFMA were also studied.