维普资讯 http://www.cqvip.com

第1期 无机化学学报 Vol. 15, No. 1
1999年1月 JOURNAL OF INORGANIC CHEMISTRY Jan., 1999

不对称氧氮氧三齿配体Cu(Ⅱ)配合物催化NA酯水解研究

解永树* 寇福平 林瑞森 宗汉兴

(浙江大学化学系,杭州 310027)

合成了不对称氮氧杂链型配体N-(2′-羟基)苄基乙醇胺(HL),通过元素分析、IR和^{1}H NMR等手段进行了表征。用pH电位滴定法,在25±0.1℃,I=0.10(KNO_3)条件下,研究了该配体质子化及其与Cu(Ⅱ)离子配位热力学。在25±0.1℃,I=0.10(KNO_3),pH=7~9(50 mol·L^{-1}缓冲溶液)范围内,通过分光光度法测定了配合物对p-硝基苯酚乙酸酯(NA)水解催化动力学,得到了NA酯催化水解二级反应速率常数k_{NP}((mol·L^{-1})$^{-1}$·s^{-1})。结果表明:Cu(Ⅱ)离子与醇羟基配位作用较强,并且还与一个水分子有较弱的配位。配位醇羟基和水分子的离解常数pK_a分别为7.62和11.22。在中性pH值可以产生具有有很强亲核能力的配位烷氧负离子Cu(Ⅱ)…$^-$OR,配合物对酯的水解有金属离子Lewis酸活化和亲核试剂进攻双重催化作用,与碱性磷酸酯催化作用比较类似,在pH中性和弱碱性条件下对NA酯水解有很好的催化效果,当pH为9.0时,k_{NP}达到0.12 (mol·L^{-1})$^{-1}$·s^{-1}。

关键词: 不对称氮氧杂配体 铜(Ⅱ)配合物 催化动力学 亲核试剂

分类号: O614·12

水解酶中金属酶占很大的比重,位于活性中心的金属离子对酶的催化功能起着重要作用[1]。很多研究者设计了各种配体来模拟其活性中心配位环境,通过考察它们的金属配合物的结构和性质,来认识和理解金属酶中金属离子的作用[2,3]。

就模拟水解酶而言,考察较多的是Cu(Ⅱ)、Co(Ⅱ)、Zn(Ⅱ)等金属离子配合物[4~6]。但是,研究的多为含氮配体,与氨基酸结构相类似的链型氮氧杂型配体则很少[7],而后者与天然酶的实际情况更接近,因而更具有理论和实际意义。对于Cu(Ⅱ)配合物,Cu(Ⅱ)离子较常见的是四配位方式,如与二齿配体形成稳定的1∶1型配合物[8],催化底物水解有双重作用。一方面,有很强Lewis酸性的Cu(Ⅱ)离子,以Lewis酸形式活化底物羰基;另一方面,与水分子配位使其转化为亲核试剂Cu(Ⅱ)…$^-$(OH)并进攻底物,这两方面是配合物催化水解的重要因素。Kimura等[9,10]在Zn(Ⅱ)配合物模拟水解酶研究中发现,与金属配位的烷氧负离子Zn(Ⅱ)…OR是一类较金属配位羟基Zn(Ⅱ)…$^-$OH更好的亲核试剂,对底物水解有更好的催化效果。我们发现与金属配位的酚羟基在一定条件下对催化底物水解有重要贡献[6]。因此,我们合成了含有一个醇羟基和一个酚羟基不对称ONO链型三齿配体N-(2′-羟基)苄基乙醇胺。该配体合成简便,有较好水溶性,而且Cu(Ⅱ)离子与其配位之后第四配位点可以有一个水分子配位。我们通过对该配体与Cu(Ⅱ)配位热力学及其配合物催化NA酯水解动力学研究,考察了在中性pH值酚羟基、醇羟基以及水分子配位并生成Cu(Ⅱ)…$^-$OAr、Cu(Ⅱ)…$^-$OR和Cu(Ⅱ)…$^-$OH三种

收稿日期:1997-11-11。 收修改稿日期:1998-03-19。

国家教委博士点基金(No. 94335241)、国家自然科学基金资助项目(No. 29773041)。

* 通讯联系人。

第一作者:解永树,男,28岁,现为中国科学技术大学化学系博士后;研究方向:生物无机化学。

维普资讯 http://www.cqvip.com

亲核试剂的可能性，比较了不同亲核试剂的亲核能力，讨论了配合物双重催化的可能性，并将催化机理与碱性磷酸酯酶作用机理进行了比较。

1　实验部分

1.1　试剂和仪器

$Cu(NO_3)_2$ 为优级纯试剂，其溶液浓度用 EDTA 容量法标定。KNO_3 为分析纯，经二次重结晶提纯。$NaBH_4$，NaOH，Na_2SO_4，Na_2CO_3，$CHCl_3$，无水乙醇，盐酸均为分析纯，其中无水乙醇使用前经金属钠作进一步无水处理。水杨醛和乙醇胺为分析纯，使用前经减压蒸馏处理。溶液配制用称量法，水为二次蒸馏水。三-(羟甲基)-氨基甲烷(Tris)为分析纯试剂，N-2-羟乙基哌嗪-N′-2-乙撑磺酸(HEPES)为香港 FARCO 公司的分析纯试剂，2-(N-吗啉代)乙撑磺酸(MES)为 Fluka 公司试剂(>99%)。

日本 Yanaco 公司 MP-500 型熔点仪，*Perkin-Elmer* 240C 元素分析仪，*Nicolet* 170SXFT 红外光谱仪(KBr 压片，400～4000 cm^{-1})，^1H NMR 谱在 Bruker AM-200 核磁共振仪上记录($CDCl_3$ 为溶剂)。美国 Beckman Φ71 型 pH 计，配有 Beckman 复合电极。日本 Shimadzu UV-260 型分光光度计。

1.2　配体合成

在 200 mL 绝对乙醇中加入乙醇胺 0.2 mol，维持搅拌下滴加 0.2 mol 水杨醛乙醇溶液 100 mL，反应溶液浓缩、静置，析出希夫碱缩合产物，过滤，洗涤，干燥备用。取 0.02 mol 该希夫碱溶于 100 mL 绝对乙醇中，慢慢滴加 0.2 mol $NaBH_4$ 乙醇溶液 100 mL，反应液由黄色渐渐变浅至无色，滴加完毕后维持反应 1 h。用 6 mol·L^{-1} 盐酸(5 mL)破坏过量的 $NaBH_4$，继以 0.1 mol·L^{-1} NaOH 调节溶液 pH～8，真空浓缩近干后，加入约 50 mL 二次蒸馏水溶解瓶内产物，用 50 mL $CHCl_3$ 萃取 5 次，合并萃取液并用饱和 Na_2CO_3 溶液洗涤三次，经无水 Na_2SO_4 干燥过夜，抽滤，浓缩得到产物。产率 40%，m.p. 142～145 ℃，$C_9H_{13}NO_2 \cdot HCl \cdot 3/2H_2O$(计算值，C，46.85；H，6.99；N，6.07，实测值，C，46.86；H，7.42；N，5.98)，ν_{max}(KBr)：3403(*s*，OH)，3198(*s*，NH)，3085 *m*，2966*s*，2842*m*，1593s，1459(s，C-N)，1364m，1261m，765m(Ar)；^1H NMR，$\delta_H(D_2O)$：7.50～8.01(4H，m，Ar-H)，4.19(2H，d，Ar-CH_2)，3.79(2H，*d*，CH_2OH)，3.11(2H，*d*，$NHCH_2$)。

1.3　pH 滴定测定质子化常数及配位平衡常数

测定质子化常数时，配体浓度为 1×10^{-3} mol·L^{-1}，进行配合物滴定时溶液中还加入等摩尔 $Cu(NO_3)_2$。实验温度均为 25±0.1 ℃，KNO_3 控制离子强度 $I=0.10$。用 0.1522 mol·L^{-1} NaOH 标准溶液，在高纯氮气氛中滴定。每组实验至少平行两次，每次至少在 pH=3～11 范围内取 40 个实验点，数据处理采用 SCMAR 程序[11]，按非线性阻尼最小二乘法原理进行拟合。

1.4　分光光度法测 NA 酯水解动力学

反应中用紫外-可见分光光度计跟踪 NA 酯水解产物对-硝基苯酚在特征吸收波长 400 nm 处吸收峰，实验条件为 25±0.1 ℃，$I=0.10(KNO_3)$。pH 值用 50 mmol·L^{-1} 缓冲溶液(Tris 5～7，HEPES 7～8，MES 8～9)控制。NA 酯浓度为 1.0 mmol·L^{-1}，配合物浓度均为 0、0.5、1.0、1.5 和 2.0 mmol·L^{-1}。反应混合溶液中含 10% CH_3CN(V/V)。参比溶液中不加酯，其余成分同反应溶液。反应开始后，每 5 秒取一个吸光度数据，整个实验过程中，NA 酯水解少于 5%。实验数据处理同文献[6]。

维普资讯 http://www.cqvip.com

2 实验结果

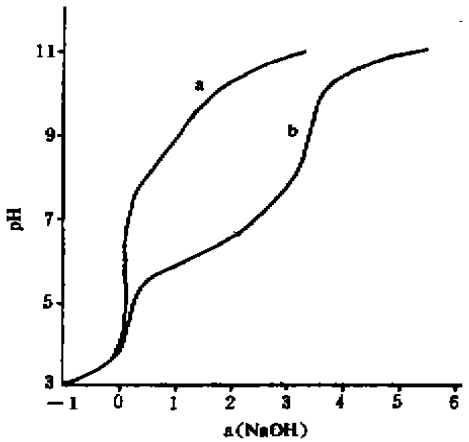
2.1 配体的质子化行为

因醇羟基是非常弱的酸，在滴定pH范围内不可能离解，不必考虑其质子化过程，所以有对应于氨基和酚氧负离子的两级质子化过程(见图1曲线a)。配体含有一个酚羟基，可表示为HL的形式，质子化反应过程式如下：

$$L^- + H^+ = HL \qquad \beta_1 = [HL]/[L^-][H^+] \tag{1}$$

$$L^- + 2H^+ = H_2L^+ \qquad \beta_2 = [H_2L^+]/[L^-][H^+]^2 \tag{2}$$

拟合得到配体质子化常数 $\log\beta_1 = 10.19$，$\log\beta_2 = 18.56$。酚氧负离子结合质子的能力强于氨基，可以认为配体的第一级质子化是酚氧负离子的质子化过程，第二级为氨基质子化过程。



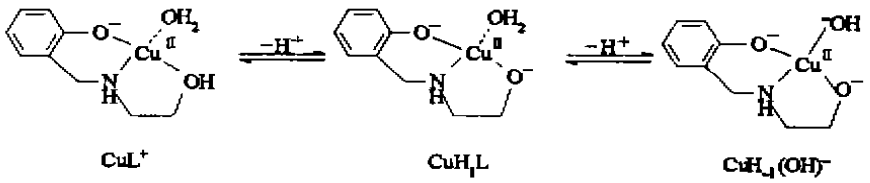
a: 1 mmol·L^{-1} HL
b: a+1 mmol·L^{-1} Cu(NO$_3$)$_2$

图1 HL及其Cu(Ⅱ)配合物滴定曲线

Fig. 1 Titration curves for HL and Cu(Ⅱ)−HL system

2.2 配体与铜(Ⅱ)配位

配合物滴定过程见图1曲线b。从图中可以看出，在pH～5时即开始生成配合物，并释放出质子，溶液pH上升缓慢，直至滴定度为4，说明在配位过程中共释放出四个质子。第一和第二个质子分别为配体质子化氨基(−N$^+$H$_2$−)和酚羟基离解出来的。此时生成配合物CuL^-。第三个质子是醇羟基或者水分子配位后离解出来的。虽然烷氧负离子($^-$OR)碱性比氢氧根离子($^-$OH)强，由此判断配位水分子易离解出质子，但是考虑到螯合效应能增加配合物的稳定性，因此，参考文献[9,10,12]，我们认为这个质子是醇羟基配位离解出来的，此时生成配合物$CuH_{-1}L$。第四个质子一定是由水与Cu(Ⅱ)离子配位而离解出来的，此时生成配合物$CuH_{-1}L\cdot(OH)^-$(图式1所示)。



CuL^+ $CuH_{-1}L$ $CuH_{-1}(OH)^-$

图式1

Scheme 1

对应于这三种配合物形体，溶液中应有下列配位反应平衡：

$$L^- + Cu^{2+} = (CuL)^+ \qquad K_{110} = [(CuL)^+]/[Cu^{2+}][L^-] \tag{3}$$

$$L^- + Cu^{2+} = CuH_{-1}L + H^+ \qquad K_{11-1} = [CuH_{-1}L][H^+]/[Cu^{2+}][L^-] \tag{4}$$

维普资讯 http://www.cqvip.com

$$L + Cu^{2+} + H_2O = (Cu(H_{-1}L)OH)^+ + 2H^+ \quad K_{11-2} = [(Cu(H_{-1}L)OH)^+][H^+]^2/[Cu^{2+}][L] \quad (5)$$

从上述平衡可得到有关配合物形体中位醇羟基或水分子的质子离解平衡式。

$$(CuL)^+ = CuH_{-1}L + H^+ \quad Ka_1 = [CuH_{-1}L][H^+]/[(CuL)^+] \quad (6)$$

$$CuH_{-1}L + H_2O = (Cu(H_{-1}L)OH) + H^+ \quad Ka_2 = [(Cu(H_{-1}L)OH)^+][H^+]/[CuH_{-1}L] \quad (7)$$

式(6)是醇羟基配位时质子离解平衡，其 $pKa_1 = \log K_{11-1} - \log K_{11-2}$，式(7)表示配位水离解质子的平衡，其 $pKa_2 = \log K_{11-1} - \log K_{11-2}$，表 1 列出了拟合的平衡常数 $\log K$ 和离解常数 pKa 值。各配合物形体在不同 pH 的分布曲线见图 2。

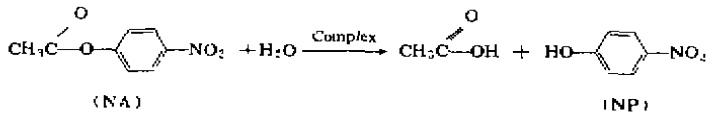
表 1　配体与 Cu(Ⅱ)配位平衡常数和离解常数

Table 1　Coordination Equilibria Constants of Cu(Ⅱ) with the Ligand and Dissociation Constants (25±0.1 C, I=0.10 (KNO_3))

$\log K_{110}$	$\log K_{11-1}$	$\log K_{11-2}$	pKa_1	pKa_2
9.73(5)	2.11(2)	−9.11(3)	7.62	11.22

2.3　Cu(Ⅱ)配合物催化 NA 酯水解

NA 酯水解反应式为：



(NA)　　(NP)　　(8)

反应速度为：

$$v = -\frac{d[NA]}{dt} = \frac{d[NP]}{dt} \quad (9)$$

$$v = \frac{1}{\varepsilon} \cdot dA/dt = (k_{NP} \cdot C + k_{OH^-}[OH^-] + \cdots)[NA] \quad (10)$$

v 包含了各种催化因素对酯水解速率的贡献，式中 C 为 Cu(Ⅱ)总浓度，k_{OH^-} 为缓冲溶液催化水解速率常数，k_{NP} 为配合物催化水解反应速度常数。通过初始斜率法[6]得到 v，再以 v 对配合物浓度作图得一直线，通常线性回归得其斜率值，求得 k_{NP} 值($(mol \cdot L^{-1})^{-1} \cdot s^{-1}$)。结果见图 3。

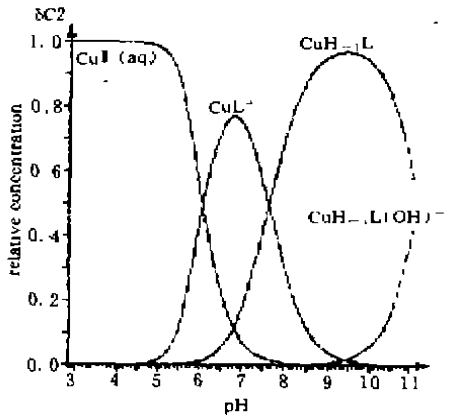


图 2　各配合物形体在不同 pH 时的分布曲线

Fig. 2　Distribution curves for the coordination compounds as a function of pH at 25 C, and I = 0.10(KNO_3)

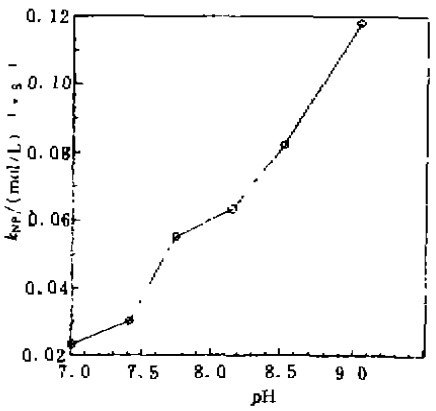


图 3　配合物催化 NA 酯水解二级反应速率常数与 pH 的关系

Fig. 3　Rate-pH profile for the second-order rate constants of NA hydrolysis catalyzed by the coordination compounds at 25 C, and I = 0.10 (KNO_3)

维普资讯 http://www.cqvip.com

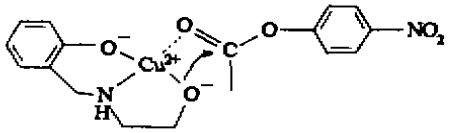
3 结果讨论

配合物催化水解时，一方面金属离子能以 Lewis 酸[2,3]的方式去活化底物，另一方面，通过配位作用产生的亲核试剂可以进攻底物导致水解。顺式双配位水 Cu(Ⅱ)配合物对酯类、酰胺类等底物水解有较好的催化效果，正是由于它们具有上述双催化功能[3,4]。

从表 1 可知，配体与 Cu(Ⅰ)离子配位时，配位水的离解常数 $pK_{a_2}=11.22$。因此，在中性和弱碱性 pH 值时，几乎没有氢氧根配合物 $CuH_{-1}L\cdot(OH)^-$ 的存在。配位醇羟基离解常数 pK_{a_1} 为 7.62，此时可形成配位酚氧负离子 Cu(Ⅰ)…$^-$OAr 和配位烷氧负离子 Cu(Ⅱ)… OR，分别对应于配合物形体 CuL^+ 和 $CuH_{-1}L$。

比较图 2 和图 3 可以看出，在 pH 7 时，CuL^+ 有较大浓度，此时 k_{NP} 较小，随着 pH 增大，$CuH_{-1}L$ 的浓度迅速增大，k_{NP} 也随之迅速增大，并达到很好的催化效果，在 pH 为 9.0 时，k_{NP} 达到 0.12 $(mol\cdot L^{-1})^{-1}\cdot s^{-1}$。这说明后一种配位形体催化能力比前一种强。由于两种形体中与 Cu(Ⅱ)离子配位作用均很弱的水分子较易离去，使 Cu(Ⅰ)离子有空配位轨道，能够以 Lewis 酸方式与底物羰基氧原子作用，削弱碳氧双键，从而活化底物；同时在顺式方向上配位的亲核试剂可以进攻底物羰基碳原子，从而均能起到双重催化作用。后一种配位形体中，Cu(Ⅱ)多一个配位负离子（见图式 1），Cu(Ⅰ)的 Lewis 酸性比前一种弱，而该配位形体催化能力却更强，说明其亲核试剂 Cu(Ⅱ)…$^-$OR 的亲核性比 Cu(Ⅱ)…$^-$OAr 强得多。Cu(Ⅰ)…$^-$OR 的双重催化作用如图式 2 所示。

根据在不同 pH 各配合物形体的分布数据和催化反应速率常数 k_{NP}，线性拟合得到 CuL^+ 和 $CuH_{-1}L$ 两种形体催化 NA 酯水解的速率常数 k_1 和 k_2 分别为 0.01 和 0.11 $(mol\cdot L^{-1})^{-1}\cdot s^{-1}$。可以看出，$CuH_{-1}L$ 的催化能力确实比 CuL^- 强很多。



图式 2 Cu(Ⅱ)…$^-$OR 对 NA 酯水解的双重催化作用

Scheme 2 Double-catalysis of NA hydrolysis catalyzed by Cu(Ⅰ)…$^-$OR

$CuH_{-1}L$ 的催化速率常数 0.11 与 Kimura 等的 1,4,7,10-四氮杂-环十二烷和 1-(2-羟乙基)-1,5,9-三氮杂-环十二烷的 Zn(Ⅰ)配合物[13,14]的催化速率常数 0.10 和 0.14 均比较接近，而比 1,5,9-三氮杂-环十二烷 Zn(Ⅱ)配合物[15]的 3.6×10^{-2} 大。说明该配合物形体对 NA 酯水解确实有很好的催化效果。

从图 3 还可以看出，k_{NP} 与反应 pH 之间不存在常见的 Sigmoidal 型曲线的关系，这正是由于有上述不同配位形体存在，它们的浓度与 pH 之间不存在 Sigmoidal 型曲线关系，而且催化能力也各不相同而造成的。

以上表明该配体与 Cu(Ⅰ)配位在中性 pH 值能产生配位烷氧负离子 Cu(Ⅱ)…$^-$OR，它确实是一类很好的亲核试剂。$CuH_{-1}L$ 在中性和弱碱性 pH 值时对酯的水解有很好的催化效果，而且具有金属离子 Lewis 酸和亲核试剂的双重催化作用。这些性质与碱性磷酸酯酶[16]中 Zn(Ⅱ)离子 Lewis 酸作用和丝氨酸醇羟基亲核作用等相类似，反映了它的催化特性。以上工作为进一步研究水解酶模拟物建立了良好的基础。

维普资讯 http://www.cqvip.com

参 考 文 献

[1] Steitz T. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1993**, **90**, 6498.

[2] Woolley P. *Nature*, **1975**, **258**, 677.

[3] Chapman W. H., Breslow R. *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, **117**, 5462.

[4] Chin J. *Acc. Chem. Res.*, **1991**, **24**, 145.

[5] Chin J., Banaszczyk M. *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, **111**, 2724.

[6] KOU Fu-Ping(寇福平), LIN Hua-Kuan(林华宽), ZHU Shou-Rong(朱守荣), CHEN Yun-Ti(陈荣悌) *Wuli Huaxue Xuebao(Acta Physico-Chimica Sinica)*, **1996**, **12**(9), 804.

[7] Abufarag A., Vahrenkamp H. *Inorg. Chem.*, **1995**, **34**, 2207.

[8] Chin J., Jubian V. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1988**, 839.

[9] Koike T., Kajitani S., Kimura E., Shiro M. *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, **117**, 1210.

[10] Kimura E., Kodama Y., Koike T., shiro M. *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, **117**, 8304.

[11] SUN Hong-Wei(孙宏伟) *Doctoral Thesis, Departments of Chemistry, Nankai University*(南开大学化学系博士论文), **1997**.

[12] Hall J. L., Dean W. E. *J. Am. Chem. Soc.*, **1960**, **82**, 3300.

[13] Koike T., Takamura M., Kimura E. *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, **116**, 8443.

[14] Kimura E., Nakamura I., Koike T., Shionoya M., Kodama Y., Ikeda T., Shiro M. *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, **116**, 4764.

[15] Kimura E., Shiota T., Koike T., Shiro M., Kodama M. *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, **112**, 5805.

[16] Coleman J. E. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **1992**, **21**, 441.

INVESTIGATION OF NA ESTER HYDROLYSIS CATALYZED BY COPPER (Ⅱ) COMPLEXES OF AN UNSYMMETRICAL ONO TRIDENTATE CHAIN LIGAND

XIE Yong-Shu　KOU Fu-Ping　LIN Rui-Sen　ZONG Han-Xing

(*Department of Chemistry, Zhejiang University, Hangzhou* 310027)

A new unsymmetrical ONO tridentate chain ligand N-(2′-hydroxyl) benzyl-ethanolamine has been synthesized and characterized by elemental analysis, IR and ^{1}NMR. Thermodynamics of its protonation and complexation with Cu(Ⅱ) ion has been investigated by potentiometric pH titration at 25±0.1℃, and $I=0.10$ (KNO_3). Kinetics of *p*-nitrophenyl acetate (NA) hydrolysis catalyzed by the complexes has been studied spectrophotometrically at 25±0.1℃, and $I=0.10$ (KNO_3) in 10% (V/V) CH_3CN aqueous solution at pH 7～9 (50 mmol·L^{-1} buffers), and the second-order rate constants k_{NP} were obtained. The experimental results indicate that Cu(Ⅱ) coordinates strongly with the alcoholic hydroxyl in the ligand and also coordinates weakly with a water molecule with p*K*a values of 7.62 and 11.22 for them respectively, the complexes effectively catalyze NA hydrolysis at neutral and weak alkaline pH with a k_{NP} value of 0.12 (mol·L^{-1})$^{-1}$·s^{-1} at pH 9.0. According to a double-catalysis mechanism, Lewis acid activation by metal ion and nucleophilic attack by Cu(Ⅱ)-bound alkoxide, is somewhat similar to that of alkaline phosphatase catalyzed ester hydrolysis.

Keywords: **unsymmetrical oxa-aza ligand**　**Cu(Ⅱ) coordination compound**　**kinetics nucleophile**