

链型含醇羟基 N_3O_2 配体 Zn(II)和 Cu(II)配合物催化
对 - 硝基苯酚乙酸酯水解研究解永树* 薛 奕 林瑞森[△] 刘清亮

(中国科技大学化学系, 合肥 230026)

([△]浙江大学化学系, 杭州 310027)

合成了链型五齿配体 N-(2- 羟乙基)-N''-(2- 羟基苄基)- 二乙烯三胺(HL), 通过元素分析、IR 和 1H NMR 等手段进行了表征。用 pH 电位滴定法, 在 $25 \pm 0.1^\circ C$, $I=0.10(KNO_3)$ 条件下, 测定了配体的质子化常数以及配体与 Cu(II) 和 Zn(II) 配位反应平衡常数。讨论了配体与金属离子的配位情况, 得到了配位酚羟基和水的离解常数。运用分光光度法, 在 $pH=7.0 \sim 9.0$ 范围内, 研究了配合物催化对硝基苯酚乙酸酯(NA)水解动力学, 得到了 NA 酯水解的配合物催化速率常数 k_c 。结果表明, Cu(II) 与配体的氨基和酚羟基配位, 生成四配位配合物, 配位酚羟基的 pK_a 值为 4.79, 对 NA 酯水解基本上没有催化效果; 而 Zn(II) 则可以分别与配体的三个氨基, 一个酚羟基和一个溶剂水分子配位, 形成五配位配合物, 配位酚羟基和水的 pK_a 分别为 5.99 和 9.17, 催化 NA 酯水解时, 存在 $Zn(II) \cdots OH$ 和醇羟基的协同作用, 有很好的催化效果, pH 为 9.0 时, k_c 可达 $8.50 \times 10^{-2} mol^{-1} \cdot L \cdot s^{-1}$ 。

关键词: Zn(II)配合物 Cu(II)配合物 催化动力学 酶模拟物
分类号: O614.12

金属水解酶在生物体系中有重要作用, 其活性中心大多为 Zn(II) 配位结构。在催化底物水解过程中, 水分子等配位并转变成亲核试剂, 进攻底物。如碳酸酐酶^[1](CA) 活性中心配位水离解生成的 $Zn(II) \cdots OH$ 和碱性磷酸酯酶^[2](AP) 中受活化的丝氨酸羟基, 在水解催化机理中都起着重要作用。模拟研究发现 $Zn(II) \cdots OAr$ 也是有效的亲核试剂^[3]。Kimura 等^[4] 对带醇羟基侧臂的四氮大环五齿配体 Zn(II) 配合物研究表明该配合物在催化底物水解时有 $Zn(II) \cdots OH$ 和醇羟基的协同作用。但是这些研究主要为大环和三角架型配体, 对链型配体的研究则很少^[5]。我们^[6] 曾研究过含酚羟基链型四齿配体 N, N'-二-(2-羟基苄基)-丙二胺与 Zn(II) 离子配位行为及其配合物催化对硝基苯酚乙酸酯(NA) 水解性质。本文合成了含酚羟基和醇羟基的链型五齿配体 N-(2-羟乙基)-N''-(2-羟基苄基)-二乙烯三胺, 通过研究它与 Zn(II) 和 Cu(II) 配位性质, 考察在中性 pH 附近生成不同亲核试剂的能力; 研究配合物催化 NA 酯水解动力学行为。

1 实 验

1.1 试剂和仪器

$Zn(NO_3)_2$ 和 $Cu(NO_3)_2$ 为优级纯, 其溶液浓度用容量法标定。 KNO_3 为分析纯, 经两次重结晶提纯。 $NaBH_4$, $NaOH$, Na_2SO_4 , Na_2CO_3 , $CHCl_3$, 无水乙醇, 盐酸, 水杨醛等为分析纯, 其中无水乙醇经金属钠和邻苯二甲酸二乙酯进一步除水, 水杨醛经减压蒸馏处理。N-2-羟乙基哌嗪-N'-2-

收稿日期: 2000-01-21。收修改稿日期: 2000-03-17。

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, 博士后; 研究方向: 生物无机化学。

乙撑磺酸 (HEPES) (FARCO 公司产) 为分析纯, 2-(N-吗啉代)乙撑磺酸 (MES) (Fluka 公司产) 纯度 > 99%, N-(2-羟乙基)-二乙烯三胺的合成见文献^[7]。用二次蒸馏水, 称量法配制溶液。Perkin-Elmer 240C 元素分析仪, Nicolet 170SXFT 红外光谱仪 (KBr 压片), ¹H NMR 谱在 Bruker AM-200 核磁共振仪上记录。Beckman ϕ 71 型 pH 计, 配有 Beckman 39841 型复合电极, Shimadzu Uv-260 型分光光度计。

1.2 配体的合成

N-(2-羟乙基)二乙烯三胺 0.2mol 溶于 200mL 乙醇, 缓慢滴加 0.2mol 水杨醛的 100mL 乙醇溶液, 适当浓缩后缓慢加入 0.2mol NaBH₄ 的 100mL 乙醇溶液, 滴加完毕后维持反应 1h。用 6mol · L⁻¹ 盐酸 (5mL) 破坏过量的 NaBH₄, 继以 0.1mol · L⁻¹ NaOH 调节溶液至 pH ~ 8, 再真空浓缩至近干, 加入 50mL 水溶解产物, 用 50mL CHCl₃ 萃取 5 次, 合并萃取液并用饱和 Na₂CO₃ 溶液洗涤三次, 经无水 Na₂SO₄ 干燥过夜, 抽滤, 浓缩得油状物, 将其溶于 CH₂Cl₂, 再通入干燥的 HCl 气体, 析出 N-(2-羟基苄基)-N''-(2-羟乙基)-二乙烯三胺盐酸盐 (C₁₃H₂₃N₃O₂·HCl), (计算值: C, 43.03; H, 7.23; N, 11.59。实测值: C, 42.95; H, 7.24; N, 11.45)。ν_{max}: 3399w, 2961w, 2783w, 1600s, 1459s, 1266m, 1072m, 762s (Ar) cm⁻¹。δ_H (D₂O, TMS): 6.88 ~ 7.29 (4H, m, Ar-H), 4.22 (2H, d, Ar-CH₂), 3.77 (2H, m, CH₂OH), 3.44 (8H, s, (CH₂)₂NH(CH₂)₂), 3.20 (2H, m, NHCH₂)。

1.3 pH 滴定

实验温度为 25 ± 0.1℃, KNO₃ 控制离子强度 I = 0.10。用 0.1522mol · L⁻¹ NaOH 标准溶液滴定。配体浓度为 1mmol · L⁻¹, Cu (II) 或 Zn (II) 离子与配体等摩尔进行配位滴定, 实验在高纯氮气氛围中进行, 每组至少平行两次, 每次在 pH = 3 ~ 11 范围内至少测 40 个点, 用 SCMAR 程序^[8]处理数据。

1.4 对硝基苯酚乙酸酯水解动力学

反应过程中监测水解产物对硝基苯酚 (λ_{max} = 400nm), 在 25 ± 0.1℃, I = 0.10 (KNO₃), pH 值用 50mmol · L⁻¹ 缓冲溶液 (HEPES 7 ~ 8, MES 8 ~ 9) 控制, NA 酯和配合物浓度均为 0.5, 1.0, 1.5 和 2.0mmol · L⁻¹。最终混合溶液中含 10% CH₃CN (v/v), 反应用缓冲溶液作参比, 实验数据处理同前^[3c, 6]。

2 结果与讨论

2.1 配体的质子化

配体含有一个酚羟基, 可以表示为 HL 的形式。显然, L⁻ 有分别对应于酚氧负离子和三个氨基的质子化过程。图 1a 为 HL · 3HCl 的滴定曲线, 横坐标 α (NaOH) 表示加入的 NaOH 与配体摩尔数之比, 称为滴定度。表 1 列出了 L⁻ 的质子化常数。其中 β_i 和 K_i 分别表示累积质子化常数和逐级质子化常数。

表 1 L⁻ 的质子化常数

Table 1 Protonation Constants of L⁻ (25 ± 0.1℃, I = 0.10 (KNO₃))

i	1	2	3	4
lgβ _i	10.55(2)	19.78(3)	27.80(3)	31.86(5)
lgK _i	10.55	9.23	8.02	4.06

2.2 Cu (II) 与配体配位过程

图 1b 为配体与 Cu(II)配位滴定曲线。横坐标 $a(\text{NaOH})$ 表示所加 NaOH 与配体摩尔数之比, $a < 0$ 表示配体仍为质子化形式。

比较 a 和 b 可以看出, 配体与 Cu(II)配位时共有四个质子被滴定。Cu(II)首先与两个氨基氮原子配位, 再与酚羟基配位。如下列方程式所示:

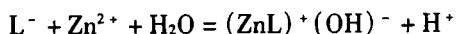


$$K_{11n} = \frac{[\text{CuH}_n\text{L}^{n+1}]}{[\text{L}^-][\text{Cu}^{2+}][\text{H}^+]^n} \quad (1)$$

式中平衡常数表示为 K_{mnh} 的形式, 其中 m , l , h 分别表示配合物中金属离子, 配体和 H^+ 的摩尔数。通过实验数据的非线性拟合, 算得 $\lg K_{111}$, $\lg K_{110}$ 分别为 24.73(3) 和 19.94(8)。 $\lg K_{111} - \lg K_{110}$ 即可得配位酚羟基的离解常数 $\text{p}K_a$ 值为 4.79, 说明该酚羟基同 Cu(II)离子配位而被活化使其易于离解质子。

2.3 Zn(II)与配体配位过程

图 1c 为配体与 Zn(II)配位滴定曲线。可以看出, 共有五个质子被滴定。当滴定度为 4 时, 配体的质子化氨基和酚羟基质子都已被滴定。第五个质子是来自配位醇羟基或水分子的离解, 参照五齿大环配体 Zn(II)配合物的研究^[4], 可以认为该质子来自于配位水分子的离解。这与后文的动力学研究结果也相符合。则溶液中除存在与 Cu(II)配位类似的平衡之外, 还有(2)式所示平衡。

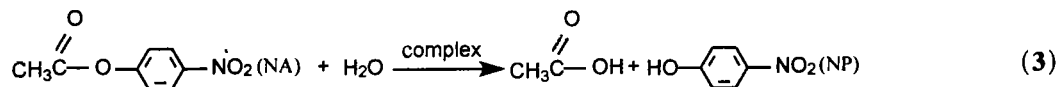


$$K_{11-1} = \frac{[(\text{ZnL})^+ (\text{OH})^-][\text{H}^+]}{[\text{L}^-][\text{Zn}^{2+}]} \quad (2)$$

通过实验数据的非线性拟合, 得到 $\lg K_{111}$, $\lg K_{110}$ 和 $\lg K_{11-1}$ 分别为 17.88(8), 11.89(3) 和 2.72(6)。与 Cu(II)配合物类似, $\lg K_{111} - \lg K_{110}$, $\lg K_{110} - \lg K_{11-1}$ 分别得到配位酚羟基和水的离解常数 $\text{p}K_a$ 值: 5.99, 9.17。

2.4 Zn(II)配合物对 NA 酯的催化水解

NA 酯水解反应式为:



反应速率为:

$$v = -\frac{d[\text{NA}]}{dt} = \frac{d[\text{NP}]}{dt} = \frac{1}{\varepsilon} \cdot \frac{dA}{dt} \quad (4)$$

式中 A 为吸光度, ε 为摩尔吸收系数, v 包含了各种催化因素对酯水解速率的贡献, 通过初始斜率法^[9]以 A 对 t 作图, 所得直线斜率即为 dA/dt , 再根据事先由实验求得的 ε 值和(4)式可算得 v_0 。在一定 pH 值下, 固定配合物总浓度 $[C]$, 以 v 对 $[\text{NA}]$ 作图, 或者固定 $[\text{NA}]$, 以 v 对 $[C]$ 作图(以 $\text{pH} = 8.23$ 为例), 结果见图 2。

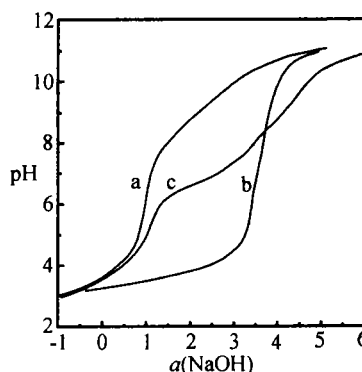


图 1 HL · 3HCl 及其 Cu(II)和 Zn(II)配合物滴定曲线

Fig. 1 Titration curves for HL · 3HCl and its Cu(II) and Zn(II) complexes

a: 1 mmol · L⁻¹ HL · 3HCl

b: a + 1 mmol · L⁻¹ Cu(NO₃)₂

c: a + 1 mmol · L⁻¹ Zn(NO₃)₂

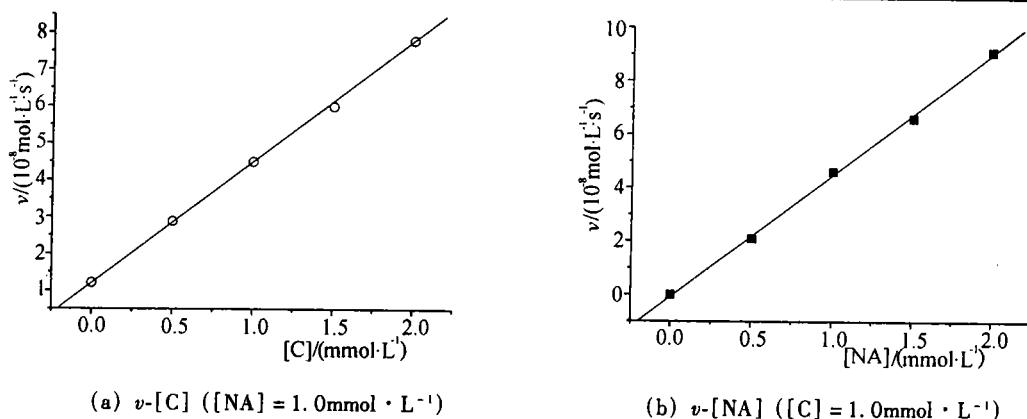
图 2 配合物催化 NA 酯水解反应速率随 $[C]$ 和 $[NA]$ 的变化

Fig. 2 Complexes catalyzed Hydrolysis reaction rate of NA vs $[C]$ and $[NA]$ at 25°C , $I=0.10$ and $\text{pH}=8.23$

从图 2a 和 b 可以看出,二者均为线性关系,因此 v 又可表示为(5)式。

$$v = (k_c \cdot [C] + k_{\text{OH}^-} [\text{OH}^-] + \cdots) [NA] \quad (5)$$

式中 $[C]$ 为 Zn(II) 总浓度, k_{OH^-} 为缓冲溶液催化水解反应速率常数, k_c 为配合物催化水解反应速率常数。在一定 pH 值下,固定 $[NA]$,以 v 对 $[C]$ 作图,通过其斜率值可求得 k_c 值, k_c 随 pH 的变化见图 3。根据配位平衡常数计算出的各配位形体在不同 pH 下占 Zn(II) 总浓度的比例 (C_i) 见图 4。

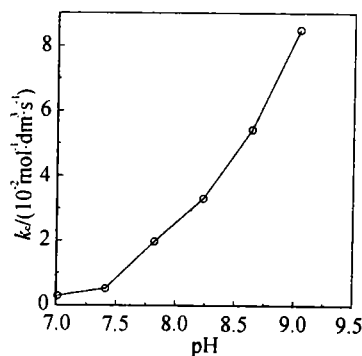


图 3 Zn(II) 配合物催化 NA 酯水解二级反应速率常数 k_c 随 pH 的变化

Fig. 3 Rate-pH plot for the second-order rate constants of NA hydrolysis catalyzed by the complexes at 25°C , and $I=0.10(\text{KNO}_3)$

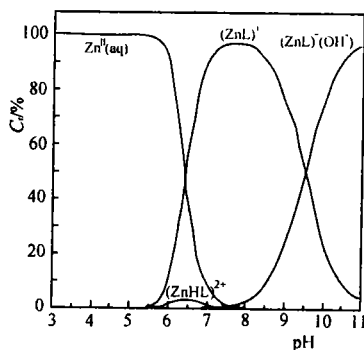


图 4 配合物浓度随 pH 变化的分布曲线

Fig. 4 Distribution curves for the complexes as a function of pH at 25°C , and $I=0.10(\text{KNO}_3)$

从图 3 和图 4 可以看出, $(\text{ZnHL})^{2+}$ 和 $(\text{ZnL})^+$ 的浓度分别在 pH 6.5 和 7.5 左右达到最大值。在 pH 7.0~9.0 范围内 k_c 与 $(\text{ZnL})^+(\text{OH})^-$ 的浓度随 pH 增大而很快增大,说明酯水解催化主要是由于 $(\text{ZnL})^+(\text{OH})^-$ 的贡献,虽然 $(\text{ZnL})^+$ 的酚羟基配位并生成 $\text{Zn(II)} \cdots \text{OAr}$,但是由于其配位作用太强, $\text{p}K_a$ 值仅为 5.99,故生成的 $\text{Zn(II)} \cdots \text{OAr}$ 亲核性较小,而且该配合物没有象 $\text{N, N}'$ -二-(2-羟基苄基)-丙二胺 ($\text{H}_2\text{L}'$) 的 Zn(II) 配合物 $(\text{ZnHL}')^+$ 那样存在类似于碳酸酐酶 (CA) 的催化作用^[6](图 5(a), (b)),因此催化能力较差。配位形体 $(\text{ZnL})^+(\text{OH})^-$ 中水分子配位并离解生成亲核试剂 $\text{Zn(II)} \cdots \text{OH}^-$ 。由于其 $\text{p}K_a$ 值为 9.17,说明它所受活化作用较弱,在所研

究的 pH 范围内浓度较小,似乎不应有如此好的催化效果。实际上具有的强催化能力可能是由于 Zn(II) $\cdots$ OH 和醇羟基的协同催化作用(图 5(c))^[4], pH 为 9.0 时, k_c 达到 $8.50 \times 10^{-2} \text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$, 比大环配体 1, 5, 9-三氮杂环十二烷 Zn(II) 配合物^[9]催化效果好(pH = 9.0 时, $k = 3.6 \times 10^{-2} \text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$), 尽管后者水分子的 pKa 值为 7.4, 很容易离解生成亲核试剂, 但是在该配合物中则没有这种协同催化作用, 因此催化作用稍差。

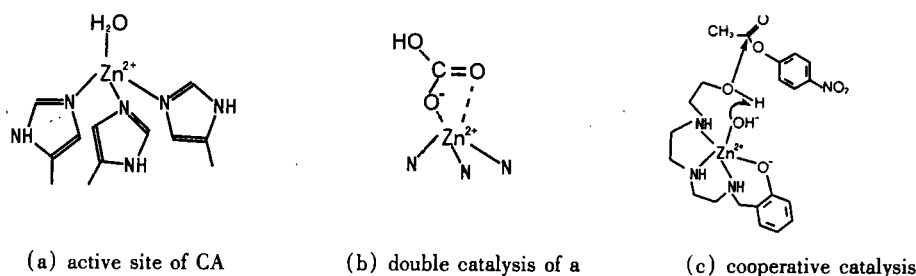


图 5 Zn(II)配合物的结构及其催化作用

Fig. 5 Structures and catalysis of the Zn(II) complexes

HL 的 Cu(II)配合物对 NA 酯水解基本上没有催化效果。如上文所述, 酚羟基配位作用太强, 生成的 Cu(II) $\cdots$ OAr 亲核能力很弱; 而且不存在类似于 Zn(II)配合物第五点的配位和催化作用, 因此催化能力很差。

从以上结果可以看出, 配体与 Cu(II)只能生成四配位配合物, 对 NA 酯水解基本没有催化能力, 而与 Zn(II)则能生成五配位配合物, 而且存在 Zn(II) $\cdots$ OH 和醇羟基的协同作用, 反映了碱性磷酸酯酶的催化特性, 催化效果很好。虽然很多 Cu(II)配合物比相应 Zn(II)配合物催化底物水解性能好^[10], 但是天然金属水解酶的活性中心金属离子一般都是 Zn(II)离子, 而不是 Cu(II)离子。本文的研究反映了 Cu(II)与 Zn(II)配位和催化性质的差别。

参 考 文 献

- [1] (a) Botre F. *Carbonic Anhydrase*, Ed. By Gros G., Storey B. T., VCH: New York, 1990.
(b) Pocker Y., Stone J. T. *Biochem.*, 1967, 6, 668.
- [2] Gettins P., Coleman J. E. *Biol. Chem.*, 1984, 259, 4991.
- [3] (a) Zhu S. R., Kou F. P., Lin H. K., Chen Y. T. *Inorg. Chem.*, 1996, 35, 5851.
(b) LIN Hua-Kuan(林华宽), KOU Fu-Ping(寇福平), ZHU Shou-Rong(朱守荣), CHEN Rong-Ti(陈荣悌)
Gaodeng Xuexiao Huaxue Xuebao(*Chemical Journal of Chinese Universities*), 1997, 18(4), 513.
(c) KOU Fu-Ping(寇福平), LIN Hua-Kuan(林华宽), ZHU Shou-Rong(朱守荣), CHEN Rong-Ti(陈荣悌)
Wuli Huaxue Xuebao(*Acta Physico-chimica Sinica*), 1996, 12, 804.
- [4] Koike T., Kajitani S., Nakamura I., Kimura E., Shiro M. *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, 117, 1210.
- [5] (a) Greener B., Moore M. H., Walton P. H. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1996, 27.
(b) Koike T., Inoue M., Kimura E., Shiro M. *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, 118, 3091.
(c) Malik M. A., Motevalli M., O'Brien P. *Inorg. Chem.*, 1995, 34, 6223.
(d) Ruf M., Vahrenkamp H. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1995, 1915.
- [6] XIE Yong-Shu(解永树), KOU Fu-Ping(寇福平), WANG Ping-Shan(王平山), LIN Rui-Sen(林瑞森), ZONG Han-Xing(宗汉兴) *Huaxue Xuebao*(*Acta Chimica Sinica*), 1998, 56, 1192.

- [7] XIE Yong-Shu(解永树), LIN Rui-Sen(林瑞森), LIU Qing-Liang(刘清亮) *Wuji Huaxue Xuebao (Chinese J. Inorg. Chemistry)*, **2000**, **16**(4), 597.
- [8] (a) SUN Hong-Wei(孙宏伟) *Ph. D. Thesis, Nankai Univ.*, Tianjin, **1997**.
(b) XIE Yong-Shu(解永树), KOU Fu-Ping(寇福平), LIN Rui-Sen(林瑞森), ZONG Han-Xing(宗汉兴) *Gaodeng Xuexiao Huaxue Xuebao (Chem. J. Chinese Universities)*, **1998**, **19**, 676.
- [9] Kimura E., Shiota T., Koike T., Shiro M., Kodama M. *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, **112**, 5805.
- [10] Chin J., Jubian V. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1989**, 839.

Hydrolysis of *p*-Nitrophenyl Acetate Promoted by Cu (II) and Zn (II) Complexes of an Alkoxy-Containing Ligand with N₃O₂ Donor Set

XIE Yong-Shu XUE Yi LIN Rui-Sen* LIU Qing-Liang

(Department of Chemistry, University of Science and Technology of China, Hefei 230026)

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

Pentadentate chain ligand N-(2-hydroxybenzyl)-N'-(2-hydroxyethyl)-diethylenetriamine (HL) was synthesized and characterized by elemental analysis, IR and ¹H NMR. By pH potentiometric titration, protonation constants of the ligand and equilibria constants of Cu (II) and Zn (II) complexation with the ligand have been determined. The dissociation constant for the phenoxyl and water in the complexes were obtained. The kinetics of *p*-nitrophenyl acetate (NA) hydrolysis catalyzed by the complexes was determined spectrophotometrically at 25 ± 0.1 °C and at pH 7.0 ~ 9.0, and the second-rate constants *k_c* for NA hydrolysis were obtained. The experimental results indicate that the ligand coordinate with Cu (II) yielding four-coordinated complex with three amino groups and the phenoxyl coordinated, and the dissociation constant p*K_a* value for the phenoxyl is 4.79, with no catalysis on NA hydrolysis. The complex of the ligand with Zn (II) has an additional water coordinated at the fifth coordination site. And the p*K_a* values for the phenoxyl and the water are 5.99 and 9.17 respectively. In the catalysis process of NA hydrolysis, the coordinated hydroxide Zn (II) ⋯⁻OH and the alkoxy group act cooperatively, which represents the characteristics of catalysis for alkaline phosphatase and thus has strong catalytic ability. At pH 9.0, *k_c* reaches 8.50 × 10⁻² mol⁻¹ · L · s⁻¹.

Keywords: Zn (II) complexes Cu (II) complexes catalytic kinetics enzyme mimics