

1, 3, 5- 三(N- α - 吡啶亚甲基氨基亚甲基) 苯合三铜(II) 配合物作为模拟水解酶的研究

赵小军^{1,2} 林华宽^{*,1,3} 杨恩翠² 朱守荣¹

王旭¹ 郭延河¹ 苏循成¹ 陈荣悌¹

(¹ 南开大学化学系, 天津 300071)

(² 天津师范大学化学与生命科学学院, 天津 300074)

(³ 南京大学配位化学国家重点实验室, 南京 210093)

研究了 1, 3, 5- 三(N- α - 吡啶亚甲基氨基亚甲基) 苯三铜(II)配合物作为水解酶模拟物催化 4- 硝基苯酚醋酸酯(NA)水解动力学。在 pH 为 7.5 ~ 9.3 范围内配体与铜(II)形成了 1:3 (配体: 铜离子)配合物。结果表明, 催化水解速率对 NA 及配合物浓度皆呈一级反应, 其水解速率方程 $v = k_{\text{obs}}^{\text{T}} [\text{NA}] = ([\text{ML}]^{\text{T}} + [\text{OH}^-] + k_0 + i) [\text{NA}]$ 。其二级反应速率常数 $k_{\text{MLH-1}}$ 在一定范围内随 pH 值的增加而增加。 $k_{\text{MLH-1}}$ 的最大值和 k_{OH} 分别为 0.266, 8.57 mol⁻¹ · m³ · s⁻¹, k_0 为 NA 的溶剂解常数, $k_0 = 1.28 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ (25.0 ± 0.1 °C, $I = 0.10, 0.020$ Tris 缓冲溶液), $k_{\text{MLH-1}}$ 值较以前报道的配合物更大, 显示该配合物催化活性更高, 表明 Cu(II)配合物中的 Cu···OH⁻ 是有效的亲核试剂, 对底物 NA 酯的水解有较好的催化作用, 依据实验结果提出了催化反应的机理。

关键词: 动力学 催化水解 金属酶 三角架配体 铜(II)配合物
分类号: O614.12

在生物演化过程中产生了许多水解酶, 它们具有高效催化性和专一选择性的特点。可催化水解断裂诸如磷酸酯、蛋白质和 DNA 等生物体内的大分子。为了从根本上认识和理解酶的结构、性质和功能间的关系, 人们对金属水解酶的作用和金属离子在活性中心的作用作了大量研究工作。设计并合成了一系列金属水解酶的模拟物^[1~4], 其研究主要集中在两种类型的配合物, 即含氮大环(包括带醇羟基侧臂)配合物和开链杂环多胺配合物上。

三角架是一类新型的配体。它具有较低的对称性, 结构向空间三个方向发展, 可与过渡金属离子形成三核金属配合物。而含有多个铜离子的配合物可作为含铜蛋白质的模型, 来模拟生物体系的活性中心, 在金属生物合成过程中混合金属配合物可代替其活性部分, 来模拟生物合成过程中的催化体系^[5, 6]。因此, 研究这类多核金属配合物能否作为模拟水解金属酶催化酯类水解具有十分重要的意义。我们在研究工作中考查了 1, 3, 5- 三(N- α - 吡啶亚甲基氨基亚甲基) 苯三铜(II)铜配合物催化 NA 酯水解的催化效果。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

收稿日期 2001-08-24。收修改稿日期: 2001-09-26。

国家自然科学基金资助项目 (No. 29971018) 和天津市教委自然科学基金资助项目 (No. 990711)。

* 通讯联系人。E-mail: hklin@nankai.edu.cn

第一作者 赵小军, 男, 46 岁, 副教授 研究方向 配位物理化学。

CH_3CN 用 CaH_2 干燥并在氮气氛围下保存, KNO_3 , CuSO_4 经二次重结晶提纯, 4-硝基苯酚醋酸酯 (NA) 在干燥乙醚中重结晶提纯, α -胺甲基吡啶 (Fluka 公司) 三羟甲基胺基甲烷 (Sino-American Biotechnology 公司) 等为分析纯试剂, 1, 3, 5-三(N- α -吡啶亚甲基氨基亚甲基)苯自己合成(合成方法另文发表), C, H, N 的含量用美国 Perkin-Elmer 公司的 240C 元素分析仪测定; 红外光谱 (KBr 压片) 在德国 Bruker 仪器有限公司生产的 Eouinox 55 FT 红外光谱仪上进行; ^1H NMR 谱 (DMSO-d_6 为溶剂) 在 Bruker AC-P 200 核磁共振谱仪上测定, 以上所有表征数据与文献符合。实验使用二次蒸馏水, 称量法配制溶液。pH 滴定采用 Backman ϕ 71 型 pH 计进行, 配有 39841 复合电极, 水解反应动力学在 HITACHI U-3400 型紫外分光光度计上进行, 水解反应的温度控制在 298K, 4-硝基苯酚醋酸酯 (NA) 水解反应速率用初始斜速法求得, 跟踪波长为 400nm, 此波长的吸收为水解所生成的 4-硝基苯酚的吸收, 反应混合物用 $0.020\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris(三羟甲基胺基甲烷)作缓冲剂控制溶液的 pH 值, 在此条件下, Tris 不与中心铜(II)离子配位, 为了增加 NA 的溶解性, 溶剂中加入了 10% 的乙腈, 具体实验方法如下:

1.2 pH 电位滴定

配体与金属离子的摩尔比为 1:3, 实验温度为 $(25.0 \pm 0.1)^\circ\text{C}$, 所有溶液均用二次蒸馏水配制, 所有滴定实验均在高纯 N_2 保护、 $(25.0 \pm 0.1)^\circ\text{C}$, 离子强度 $I = 0.1\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ NaNO_3 条件下进行; 所测定 pH 值均经过校正。数据处理采用改进的 TITFIT 程序在 IBM586 计算机上进行曲线拟合和参数优选, 所得结果至少是三次测量的平均值。图 2 所示为铜(II)配合物的物种分布曲线。

1.3 NA 酯水解动力学

将一定量的配合物和缓冲溶液混合, 恒温 5 分钟, 然后加入一定量的已恒温的 NA 乙腈溶液, 以不加配合物和 NA 的相同溶液作为参比液, 记录 400nm 吸收随时间变化的斜率, 对于本研究, 取转化率 $< 5\%$ 的点, 其相关系数 > 0.99 , 所有实验均重复三次。

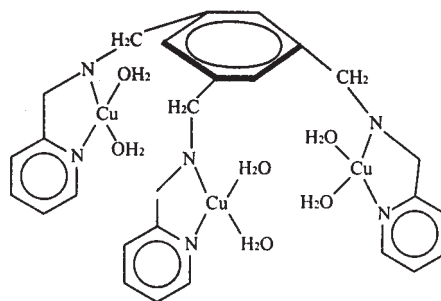


图 1 铜(II)催化剂的模型

Fig. 1 Model of Cu (II) catalyst
(the conformation is 310)

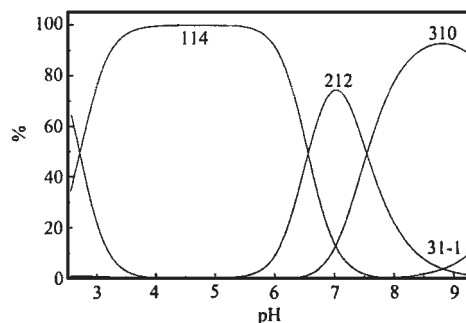


图 2 铜(II)配合物的不同物种分布图

Fig. 2 Distributing diagram of various species of Cu (II) -L complex

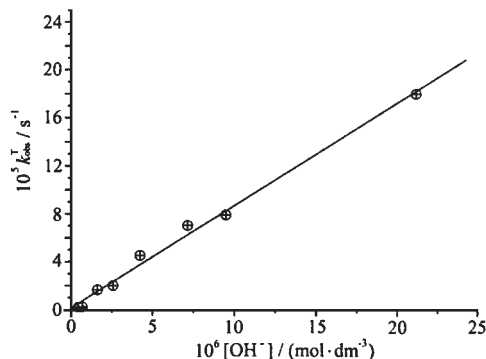


图 3 不同 pH 下 Cu_3L 催化 NA 水解的表现速率常数对 $[\text{OH}^-]$ 作图

Fig. 3 Plot of the apparent rate constants of catalytic hydrolysis for Cu (II) vs the $[\text{OH}^-]$ at different pH values

1.3.1 对硝基苯酚(NP)在动力学实验条件下表观摩尔消光系数的测定

为了测定配合物催化对硝基苯酚醋酸酯的水解速率, 我们测定了产物对硝基苯酚在实验条件下相应缓冲溶液中(10% CH₃CN 水溶液, 0.02mol · L⁻¹ Tris, 0.1mol · L⁻¹ KNO₃)的吸光度随时间的变化, 求得了相应的表观摩尔消光系数 ε_{obs} , 结果列于表 1。

表 1 400nm 时, 对 - 硝基苯酚在不同 pH 下的表观摩尔消光系数

Table 1 Observed Molar Absorption Coefficient ε_{obs} Values of 4-Nitrophenol at 400nm

pH	7.579	7.758	8.129	8.329	8.544	8.772	8.895	9.242
ε_{obs}	11919	13368	15723	15862	16447	16750	16949	17421

$T = 25.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$, $I = 0.1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ KNO₃, 0.020mol Tris buffers, 10% CH₃CN aqueous solution.

2 结果和讨论

在实验条件下,

$$r = -d[\text{NA}]/dt = d(A/\varepsilon_{\text{obs}})/dt = k_{\text{obs}}[\text{NA}] = (k_{\text{obs}}^{\text{com}}[\text{complex}] + k_{\text{OH}}[\text{OH}^-] + k_0)[\text{NA}] \quad (1)$$

NA 水解反应的速率随 NA 浓度的增加而线性增加, 即水解反应对 NA 呈一级反应, 利用初始速率法所得水解反应的表观速率常数列于表 2。由表 2 看出, 配合物不存在时, NA 的水解仍能进行, 这是溶液中游离的 OH⁻ 所起的催化作用。以不加配合物的表观反应速率常数 k_{obs} 对 [OH⁻] 回归 ($k_{\text{obs}} = k_{\text{OH}}[\text{OH}^-] + k_0$) 可以得到: $k_{\text{OH}} = 8.57\text{mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$, $k_0 = 1.2810^{-6}$, $r = 0.997$, 与文献^[7, 8]相符合。

表 2 在不同 pH 和催化剂浓度下, 配体的铜(II)配合物的水解表观速率常数 k_{obs} Table 2 NA Hydrolysis Apparent Rate Constant k_{obs} for Copper (II) Ccomplex of L at Different Values pH and Complex Concentrations ($25.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$, $I = 0.1\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ KNO₃)

$10^4 c_{\text{CuL}}$ /(mol · dm ⁻³)	pH							
	7.579	7.758	8.129	8.329	8.544	8.772	8.895	9.242
0.00	2.03	2.24	14.61	20.12	45.36	70.47	79.45	102
1.63	4.39	5.73	17.85	30.12	59.71	91.19	117.8	132.6
2.13	5.56	7.89	21.56	34.02	62.42	112.3	120.5	148.7
2.67	6.25	9.22	22.94	36.67	71.3	120.4	128.5	168.2
3.20	6.83	10.82	28.58	43.13	74.68	125.2	138.8	176.3
3.73	9.26	11.12	30.87	48.96	82.02	135.5	152.3	187.1

由文献^[7]的结果可知, Cu₃L 存在着两种形式的配合物, 即普通水合物 Cu₃L(2), 和带羟基配位的配合物 Cu₃LH₁(3), 为简单计, 用 ML 表示 Cu₃L, 用 MLH₁ 表示 Cu₃LH₁, 两种配合物存在着酸碱平衡, 其组分比例随溶液的 pH 值变化。

$$[\text{ML}] = [\text{MLH}_1] + [\text{H}^+] \quad (2)$$

$$\text{p}K_a = -\log\{([\text{MLH}_1][\text{H}^+])/[\text{ML}]\} = \lg\beta_{310} - \lg\beta_{31-1} = 24.07 - 16.87 = 7.20 \quad (3)$$

在我们所研究的 pH 值范围内, ML 基本上没有催化能力, 故起催化作用的主要为 MLH₁。其催化水解的机理如图 4 所示。

以 k_{obs} 对 [complex] 作图, 可求得 $k_{\text{obs}}^{\text{com}}$, 列于表 3。

根据酶催化原理和以上机理:

$$\text{得} \quad k_{\text{obs}}^{\text{com}}[\text{com}]^T = k_{\text{MLH}_1}[\text{MLH}_1] \quad (4)$$

k_{MLH_1} 为配合物 MLH₁ 催化 NA 水解的二级速率常数。根据酸碱平衡, 有

$$[\text{MLH}_1] = [\text{ML}]^T K_a / (K_a + [\text{H}^+]) \quad (5)$$

表 3 不同 pH 下二级速率常数

Table 3 Second-order Reaction Rate Constants $k_{\text{obs}}^{\text{com}}$ ($\text{mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$) at different pH
Values ($25.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$, $I = 0.1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ KNO}_3$)

$10^2 k_{\text{obs}}^{\text{com}}$ $/(\text{mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{s}^{-1})$	pH							
Cu_3L	7.579	7.758	8.129	8.329	8.544	8.772	8.895	9.242
	1.792	2.537	4.482	7.524	9.713	10.79	18.52	23.67

其中, $[\text{ML}]^{\text{T}}$ 为配合物 ML 的总浓度(即 $[\text{com}]^{\text{T}}$, K_{a} 为配合物 ML 的电离常数
将(5)式代入(4)式,得:

$$k_{\text{obs}}^{\text{com}} = k_{\text{MLH-1}} [\text{ML}]^{\text{T}} K_{\text{a}} / (K_{\text{a}} + [\text{H}^+])$$

所以

$$k_{\text{obs}}^{\text{com}} = k_{\text{MLH-1}} - \frac{K_{\text{a}}}{[\text{H}^+]} \quad (6)$$

$k_{\text{MLH-1}}$ 为配合物 MLH_{-1} 催化 NA 水解的二级速率常数。

将式(5)取倒数,得:

$$\frac{1}{k_{\text{obs}}^{\text{com}}} = \frac{1}{k_{\text{MLH-1}}} + \frac{[\text{H}^+]}{k_{\text{MLH-1}} \cdot K_{\text{a}}} \quad (7)$$

以 $\frac{1}{k_{\text{obs}}^{\text{com}}}$ 对 $[\text{H}^+]$ 进行线性回归,可以求得 MLH_{-1} 的二级表观速率常数 $k_{\text{MLH-1}}$ 和解离常数 K_{a} 。

$k_{\text{MLH-1}} = 0.266 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$, $\text{p}K_{\text{a}} = 8.63$ 。

表 4 不同配合物催化 NA 酯水解性能比较

Table 4 Comparison of Catalytic Property on Different Complexes for NA Ester

complex	K_{NA}	$\text{p}K_{\text{a}}$
A	0.266	8.63 ^[this article]
B	0.033	8.2 ^[9]
C	0.12	8.54 ^[10]
D	0.0253	7.5 ^[11]

本文配合物比文献^[9-11]报道的其它三角架配体化合物催化 NA 水解的能力有显著增加(见

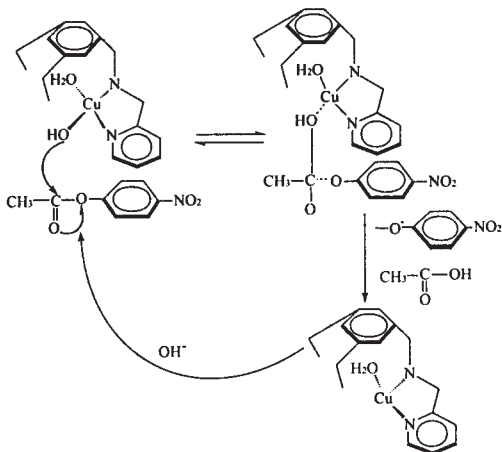
图 4 铜(II)配合物 $[\text{MLH}_{-1}]$ 催化 NA 水解反应的机理

Fig. 4 Mechanism of catalytic hydrolysis for Cu (II) complex (MLH_{-1})

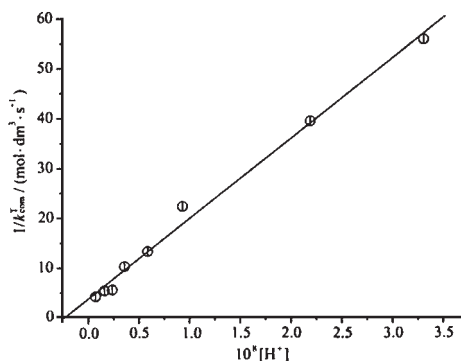
图 5 Cu_3L 配合物催化 NA 水解的二级反应速率常数 $k_{\text{obs}}^{\text{com}}$ 与 $[\text{H}^+]$ 的关系

Fig. 5 Second-order rate constants of NA hydrolysis as a function of $[\text{H}^+]$ with the Cu (II)₃L complexes as a catalyst

表 4)。这是因为在 1, 3, 5- 三 (N- α - 吡啶亚甲基氨基甲基) 苯三铜(II)配合物中, 生成了具有更强亲核性的亲核试剂 $\text{Cu(II)}\cdots\text{OH}$, 由于它进攻酯中的羰基碳原子而达到了催化酯水解的目的。

参 考 文 献

- [1] (a)Pocker Y., Stone J. T. *J. Am. Chem. Soc.*, **1965**, **87**, 5459.
(b)Pocker Y., Stone J. T. *Biochemistry*, **1968**, **7**, 2923.
(c)Blow D. M., Steitz T. A. *Ann. Rev. Biochem.*, **1980**, **39**, 78
- [2] (a)Pocker Y., Deits T. L. *J. Am. Chem. Soc.*, **1982**, **104**, 2424.
(b)Pocker Y., Stone J. T. *Adv. Enzymol.*, **1987**, **47**, 149.
(c)Lipscomb W. N. *Proc. Robert A. Welch Found Conf. Chem. Res.*, **1971**, **15**, 134.
- [3] (a)Ochiai E. *J. Chem. Educ.*, **1988**, **65**, 943.
(b)Vallee B. L. Galde A. *Adv. Enzymol.*, **1986**, **56**, 238.
- [4] Chin J. *Acc. Chem. Res.*, **1991**, **24**, 145.
- [5] Chris M. Hartshorn, Peter J. Stell *Aust. J. Chem.*, **1995**, **48**, 1587.
- [6] WANG Yu, LIN Yuan-Chuan *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **1993**, 687.
- [7] Jencks W. P., Gilchrist M. *J. Am. Chem. Soc.*, **1968**, **90**, 2622.
- [8] CHEN Wan-Dong(陈万东), ZHU Shou-Rong(朱守荣), LI Hua-Kuan(林华宽), KOU Fu-Ping(寇福平) et al *Huaxue Xuebao(Acta Chimica Sinica)*, **1997**, **55**(7), 1097.
- [9] KOU Fu-Ping(寇福平), LI Hua-Kuan(林华宽), ZHU Shou-Rong(朱守荣), CHEN Rong-DI(陈荣悌) *Wuji Huaxue Xuebao(Chinese Journal of Inorganic Chemistry)*, **1996**, **9**, 804.
- [10] CHEN Wan-Dong(陈万东), ZHU Shou-Rong(朱守荣), LI Hua-Kuan(林华宽), XIAN Jing-Chun(贤景春) et al *Gaodeng Xuexiao Huaxue Xuebao(Chemical Journal of Chinese Universities)*, **1997**, **8**, 1321.
- [11] XIE Yong-Shu(解永树), KOU Fu-Ping(寇福平), LIN Rui-Sen(林瑞森), LIU Qing-Liang(刘清亮) *Wuji Huaxue Xuebao(Chinese Journal of Inorganic Chemistry)*, **2000**, **5**, 461.

A Complex of 1, 3, 5-tri-(N- α -pyridylmethylenic aminomethylenic) Benzene Tri-Copper (II) as a Model for Hydrolytic Metalloenzyme

ZHAO Xiao-Jun^{1,2} LIN Hua-Kuan^{*, 1,3} YANG En-Cui² ZHU Shou-Rong¹

WANG Xu¹ GUO Yan-He¹ SU Xun-Cheng¹ CHEN Yun-Ti¹

(¹ Department of Chemistry, Nankai University, Tianjin 300071)

(² College of Chemistry and Life Science, Tianjin Normal University, Tianjin 300074)

(³ State Key Laboratory of Coordination Chemistry, Nanjing University, Nanjing 210093)

Copper (II) complexes of novel tripod ligand have been examined as catalysts for the hydrolysis of 4-nitrophenyl acetate (NA). The ligand forms a 1:3 Copper (II) complex in pH range 7.5 ~ 9.3. In the kinetic studies using the copper complexes in 10% (V/V) CH₃CN at 298K, $I = 0.10 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ KNO}_3$ and pH 6.8 ~ 9.0, it was shown that the Cu (II)•••OH⁻ serves as a good nucleophile that effectively catalyze NA hydrolysis. The hydrolysis rate follows the law $v = k_{\text{obs}}^{\text{T}}[\text{NA}] = (k_{\text{obs}}^{\text{com}}[\text{complex}] + k_{\text{OH}}[\text{OH}^-] + k_0)[\text{NA}]$. The second-order rate constant of CuLH₁ is $0.266 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ ($T = 25.00.1^\circ\text{C}$, $I = 0.10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ KNO}_3$, $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Tris buffer}$, 10% CH₃CN aqueous solutionfor), The catalytic reaction mechanism is suggested by the experimental results.

Keywords: kinetics catalytic hydrolysis metalloenzyme tripodal ligand copper (II) complex