

三吡啶胺 Zn(II) 配合物作为碳酸酐酶模拟物的研究*

寇福平** 林华宽 朱守荣 陈荣悌

(南开大学化学系, 天津 300071)

摘要 利用 pH 电位滴定法, 在 $25 \pm 0.1 \text{ }^\circ\text{C}$, $I=0.1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}\text{KNO}_3$ 条件下, 测定了三吡啶胺 (TPA) 的质子化常数和三吡啶胺 Zn(II) 配合物中配位水的解离常数. 结果表明, 该配合物中与 Zn(II) 配位的 H_2O 分子的电离常数显著下降, 测得 pK_a 为 7.8. 在 $25 \pm 0.1 \text{ }^\circ\text{C}$, $I=0.1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}\text{NaClO}_4$ 条件下, $\text{pH}=6 \sim 9$ (三羟甲基氨基甲烷缓冲溶液, $20 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$) 范围内, 用紫外-可见分光光度法考察了该配合物催化对硝基苯酚乙酸酯 (NA) 水解的动力学行为, 得到了配合物催化酯水解的二级反应速率常数 k_{NP} , 其最大值为 $3.32 \times 10^{-2} (\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3})^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$. 热力学、动力学的研究结果均说明, 三吡啶胺 Zn(II) 配合物中与 Zn(II) 配位的 OH^- 是较好的亲核试剂, 该配合物是一个较好的碳酸酐酶模拟物.

关键词: 碳酸酐酶, 模拟物, 亲核试剂, 速率常数

金属水解酶中主要是锌酶, 例如碳酸酐酶 CA, 羧肽酶 CP, 碱性磷酸酯酶 AP 等. 对这类酶催化功能机制及处于酶活性中心的金属离子的作用的研究引起了人们的浓厚兴趣, 成为当前的一个热门课题^[1]. 为此, 人们设计了各式各样的金属配合物来进行模拟. 就催化功能的模拟而言, 较成功的多是 Cu(II) 或 Co(II) 配合物作为酶模拟物的研究^[2,3]. 由于实际中这两种金属离子在水解酶中并不常见, 因此它们的配合物还不能较好地反映和解释酶的许多特性. 迄今为止, 只有较少的 Zn(II) 配合物作为水解酶模拟物的研究报导^[4,5]. 以 Zn(II) 配合物作为酶的模拟物较其它金属配合物来说更接近于实际, 因而具有更重要的理论和实际意义.

研究表明, 在碳酸酐酶 (CA) 的活性中心, 有一水分子与金属离子 Zn(II) 配位, 其电离常数 $pK_a=7.5$ ^[6]. 我们知道, 在金属配合物中一般都有水分子与金属离子配位, 但是这种配位程度的强弱与配体及金属离子的性质有很大关系. Chin 等^[2] 对二吡啶胺 Cu(II) 配合物对酯类及酰胺类物质的水解的催化行为进行了研究, 发现有很好的催化效果. 三吡啶胺和二吡啶胺比较类似, 但对其金属配合物开展水解酶模拟物的研究尚未见报导, 为此本文对此进行了探讨.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

P.E 240 元素分析仪, Nicolet 170SXFT 红外光谱仪 (KBr 压片, $400 \sim 4000 \text{ cm}^{-1}$), Backman $\phi 71$ 型 pH 计, 配有复合电极. UV-vis 160A 型分光光度计. CH_3CN 用 CaH_2 干燥并在氮气气氛下保存. NaClO_4 , KNO_3 , ZnSO_4 , 三羟甲基氨基甲烷等为分析纯试剂, 经二次

1996-03-19 收到初稿, 1996-05-20 收到修改稿. 联系人: 林华宽. * 国家自然科学基金资助项目. ** 现在浙江大学化学系

重结晶提纯. 三吡啶胺 (TPA) 按文献^[7]合成, m.p.130 ~ 131 °C (文献值为 130 ~ 132 °C). 实验使用二次蒸馏水、称量法配制溶液.

1.2 [Zn(TPA)₂](ClO₄)₂·5H₂O 的合成

将 10mmol(2.48 g)TPA 置于 100ml 二次蒸馏水中, 加热使其溶解, 此时加入 10mmol(3.71 g)Zn(ClO₄)₂·6H₂O, 搅拌, 过滤. 滤液在室温下静置, 慢慢析出无色棱状晶体 C₃₀H₂₄N₈Zn(ClO₄)₂·5H₂O, 元素分析 (计算值, 质量分数): C 42.30(42.31), H 3.38(4.02), N 12.63(13.26). 红外光谱 (KBr 压片, cm⁻¹), 3200 ~ 3600(OH), 1281(C-N), 1643(C=N), 3059(Ar-H).

1.3 pH 电位滴定

TPA 配体、ZnSO₄ 浓度均为 1 mmol·dm⁻³, 两者摩尔比为 2:1. 实验温度为 25±0.1 °C, 用 KNO₃ 维持溶液离子强度 I=0.1mol·dm⁻³. 使用 0.1 mmol·dm⁻³ 的 NaOH 进行滴定, 实验在高纯氮气氛中进行. 数据处理采用 TITFIT 程序^[8], 用计算机进行非线性拟合得到结果. 每组至少进行二次平行实验, 每次包含至少 40 个实验点. 0.1mol·dm⁻³KNO₃ 溶液中 (25 °C) H⁺ 的活度系数 γ=0.8318, K_w=1.008×10⁻¹⁴^[9]. 图 1 所示为 TPA 配体及其 Zn(II) 配合物的滴定曲线.

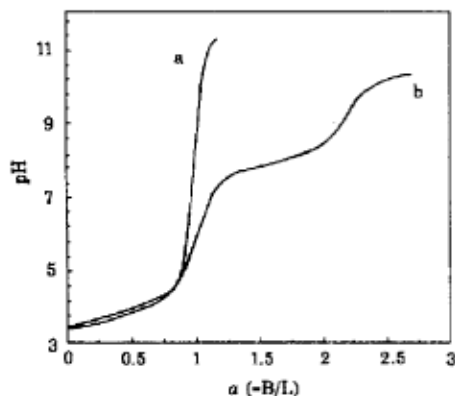


图 1 配体 TPA 及其 Zn(II) 配合物的滴定曲线
Fig.1 Titration curves for ligand and complex

- (a) 2mmol·dm⁻³ of TPA·HCl,
(b) solution a⁺1mmol·dm⁻³ of ZnSO₄

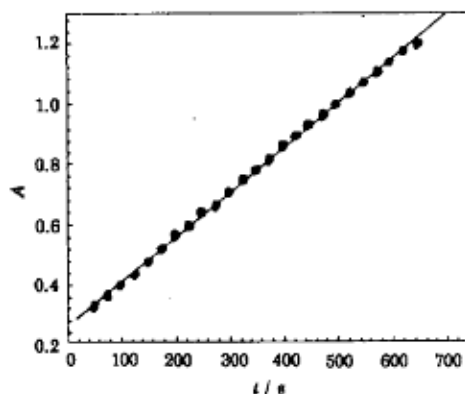


图 2 NA 酯水解反应起始阶段的 A ~ t 图
Fig.2 The experimental curve for NA(2mmol·dm⁻³) hydrolysis at pH=8.23, 25 °C, I=0.1mol·dm⁻³ NaClO₄

1.4 NA 酯水解动力学

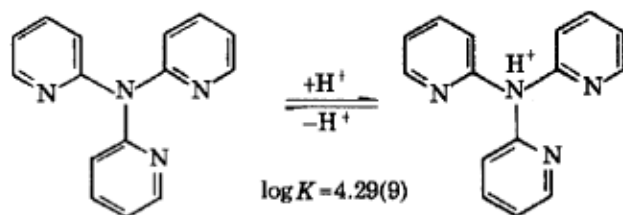
实验中跟踪 NA 酯的水解产物对硝基苯酚的特征吸收波长 400 nm, 温度为 25±0.1 °C, 以 NaClO₄ 维持溶液离子强度 I=0.1 mol·dm⁻³, 缓冲溶液用三羟甲基胺基甲烷 (Tris) 配制, 其浓度为 20 mmol·dm⁻³, 在此浓度范围 Tris 与 Zn(II) 之间没有相互作用^[10]. 使用起始斜率法确定酯水解反应速率, NA 酯浓度为 1.0 mmol·dm⁻³, 2.0 mmol·dm⁻³, 3.0 mmol·dm⁻³, 配合物浓度为 0.5 mmol·dm⁻³, 1.0 mmol·dm⁻³, 1.5 mmol·dm⁻³, 实验控制最终混合溶液中含 10 % CH₃CN (v/v). 选取与每次实验所用相同浓度的缓冲溶液作参比溶液. 取反应起始阶段即吸光度 (A) ~ 时间 (t) 作图为直线 (r ≥ 0.999, 图 2) 时的数据进行处理, 得到斜率值. 再以斜率对酯和配合物浓度作图求得配合物催化酯水解的二级反应速率常数 k_{NP} ((mol·dm⁻³)⁻¹·s⁻¹). 实验时需首先测得不同 pH 时对硝基苯酚的摩尔消光系数 ε(表 1).

2 结果及讨论

2.1 配体及其 Zn(II) 配合物的质子化行为

图 1 给出了配体及其 Zn(II) 配合物的滴定曲线, 由图可以看出, 配体只有一级质子化, 该质子结合在氨基氮原子上, 这是由于 H^+ 的吸电子作用, 使吡啶环上电子云密度降低, 因而吡啶环上的氮原子不能进一步被质子化. 计算得到的质子化常数即下列反应的平衡常数为 $10^{4.29[9]}$.

结构式



TPA 同时可以作为二齿或三齿配体, 当其与金属离子如 Zn(II)、Cu(II) 等配位时, 往往采取二齿配体的形式^[10]. 在实际中只能得到它和 Zn(II) 形成的摩尔比为 2:1 的配合物. 这从配合物的滴定曲线也能够看出. 生成配合物的过程中, 在 $pH \sim 8$ 时体系解离出了一个质子, 它即是来自配合物中的配位水分子的离解. 计算得到其离解常数为 $pK_a=7.8$, 即由于 H_2O 与 Zn(II) 配位, 使 H_2O 离解质子变的更容易.

这是一个很有意义的结果, 它与碳酸酐水解酶 (CA) 中水的电离常数 ($pK_a=7.5^{[6]}$) 十分接近, 尽管在 CA 中水的容易电离还可能得益于临近的咪唑基或 Zn(II) 离子周围的疏水环境的贡献. 本文的研究结果则表明, 在 Zn(II) 和 TPA 形成的配合物中, 配位水分子仅凭金属离子的配位活化作用, 也可以使其电离变得比较容易, 即实现使 pK_a 数值减小的目的. 据此, 我们说该配合物可能是较好的水解酶模拟物.

表 1 不同值时对硝基苯酚的摩尔消光系数 ϵ

Table 1 The extinction coefficient ϵ of 4-nitrophenyl at different pH (Tris buffer, 10 % $CH_3CN(v/v)$, $0.1mol \cdot dm^{-3}$ $NaClO_4$, $25^\circ C$)

pH	ϵ	pH	ϵ
6.20	3044	7.80	16185
6.61	4453	8.23	17901
7.00	8598	8.63	18371
7.40	12834	9.04	19222

2.2 配合物对 NA 酯的催化水解行为

实验测得的速率是各种因素对酯水解的贡献之和, 即酯水解反应的速率应为

$$\nu = -\frac{d[NA]}{dt} = \frac{d[NP]}{dt}$$

其中, $[NP]$ 代表水解产物对硝基苯酚的浓度, 因 $[NP]=\frac{1}{\epsilon} \cdot dA$, 则有

$$\nu = \frac{1}{\epsilon} \cdot dA/dt = (k_{NP} \cdot c + k_{OH^-} \cdot [OH^-] + \dots) \cdot [NA]$$

上式中 c 为配合物的浓度, k_{NP} 为配合物的催化水解速率常数, k_{OH^-} 为缓冲溶液的催化水解速率常数. 因此, ν 可通过起始浓度法得到, 以 ν 对酯的浓度 $[NA]$ 作图为一一直线, 其斜率值再对配合物的总浓度作图就可求得 k_{NP} 值. 实验结果见表 2 和图 3.

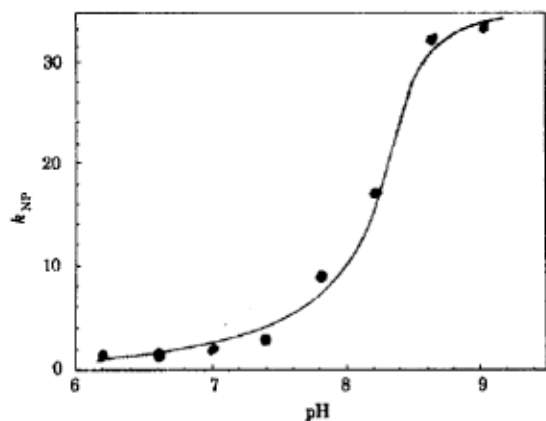


图3 配合物催化 NA 酯水解的二级反应速率常数 k_{NP} 与 pH 的关系

Fig.3 Second-order rate constants (k_{NP} [$\times 10^{-3}(\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3})^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$]) of NA hydrolysis as a function of pH with the Zn(II)-TPA complex

对金属水解酶类的催化机制有如下三种观点^[11]；第一种是 Lewis acid 机理，认为金属离子以路易斯酸的角色出现，它和羰基氧原子作用或配位，一定程度上减弱了 C=O 键的强度（亦即直接活化了底物）从而有利于亲核体对羰基碳原子的进攻。第二种机理认为金属离子的作用是活化水分子得以生成亲核能力较强的 $\text{Zn}\cdots\text{OH}^-$ 形式的亲核进攻试剂。第三种机理则是前面两者的结合，即认为金属离子具有双重活化功能。我们认为，对于我们所讨论的配体，其配合物在催化酯水解时，按照上述第二种机理的可能性较大，因为配体有较大的空间位阻，金属离子和底物的接近可能会受到影响，从而对采取第三种机理不利。

从表 3 中的数据可以看出，TPA 的 Zn(II) 配合物催化酯水解的速率常数 k_{NP} 是

pH 的函数。所得到的 sigmoidal^[4] 曲线（图 3）也说明，催化酯水解的动力学过程具有典型的酸碱平衡的特点。在 pH 约为 8.2 时出现转折点（亦即 $pK_a \sim 8.2$ ），这与从热力学得到的结果基本一致（ $pK_a \sim 7.8$ ，pH 电位滴定确定）。当 pH 达到 9 左右时，由于配合物中配位水几乎全部电离，它对酯水解的催化效果达到了最大值，此时 k_{NP} 等于 $0.033(\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3})^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ 。这一结果显然要比简单的小分子配合物的催化效果明显好 [如 $(\text{NH}_3)_5\text{Co}^{\text{III}}\text{OH}$ ，25 °C，pH=9.3， $k_{NP}=1.5\times 10^{-3}(\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3})^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$]，并且和某些良好的水解酶模拟物的催化效果接近^[4]（如 $\text{Zn}^{\text{II}}\text{-[12]aneN-OH}$ ，25 °C，pH=9.3， $k_{NP}=3.6\times 10^{-2}(\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3})^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ）。

表 2 TPA 的 Zn(II) 配合物催化 NA 酯水解的二级反应速率常数

Table 2 Second-order rate constant $k_{NP}((\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3})^{-1}\cdot\text{s}^{-1})$ for hydrolysis of NA by complex Zn(II) with TPA at 25 °C, $I=0.1\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}\text{ NaClO}_4$

pH	k_{NP}	pH	k_{NP}
6.20	1.42×10^{-3}	7.80	9.05×10^{-3}
6.6	1.45×10^{-3}	8.23	1.70×10^{-2}
7.01	1.93×10^{-3}	8.63	3.21×10^{-2}
7.40	2.68×10^{-3}	9.04	3.32×10^{-2}

热力学和动力学的研究结果均表明，在 TPA 的 Zn(II) 配合物中，与 Zn(II) 配位的水分子受到 Zn(II) 的活化后较容易解离出质子，生成了具有较强亲核性的亲核试剂 $\text{Zn(II)}\cdots\text{OH}^-$ 。正是它进攻酯中的羰基碳原子来达到催化酯水解的目的。

参 考 文 献

- 1 Breslow R. *Acc. Chem. Res.*, **1995**, **28**:146
- 2 Chin J, Banaszczyk M. *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, **111**:2724
- 3 Chin J, Jubian V. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1989**:839
- 4 Kimura E, Shiota T, Koike T, et. al. *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, **112**:5805
- 5 Breslow R, Berger D, Huang D-L. *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, **112**:3686
- 6 Pocher Y, Sarkanen S. *Adv. Enzymol.*, **1987**, **47**:149
- 7 Wibaut J P, La Bastide G L C. *Rec. Trav. Chim.*, **1933**, **52**:493
- 8 吴益和, 蔡惠芝, 许鸿祥. *计算机应用与化学*, **1989**, **6**(2): 138
- 9 寇福平. [博士学位论文]. 天津: 南开大学化学系, 1995
- 10 Pena M J, Arevalillo A, Rucandio I, et. al. *Electrochim Acta*, **1990**, **35**(3): 673
- 11 Chin J, Kim J H. *Angew. Chem, Int. Ed. Engl.*, **1990**:523

A Zinc(II) Complex of Tripyridylamine(TPA) as a Model for Carbonic Anhydrase

Kou Fuping Lin Huakuan Zhu Shourong Chen Yun-Ti
(Department of Nankai University, Tianjing 300071)

Abstract The protonation constant of TPA and, in its 1:2 (Zn(II):L) complex, the deprotonation constant of H₂O coordinated to Zn(II) have been determined by pH titration at 25±0.1 °C, *I*=0.1 mol·dm⁻³ KNO₃. They are 4.29 and 7.8, respectively. It is worthy to be noted that the H₂O bound to Zn(II) could deprotonate easily near physiology pH. A kinetic study of 4-nitrophenyl acetate(NA) hydrolysis by Zn(II)(TPA)₂·H₂O complex in 10 %(v/v) CH₃CN at 25±0.1 °C, *I*=0.1 mol·dm⁻³ NaClO₄, and pH range 6 ~ 9(20 mmol·dm⁻³ Tris buffer), has been carried out. The maximum value of second-order rate constant *k*((mol·dm⁻³)⁻¹·s⁻¹) obtained is 3.32×10⁻². Thus, our present model study shows that, like the Zn(II)-enzymes, the Zn(II)-bound OH⁻ in complex can act as a good nucleophile agent to the carbonyl carbons, the Zn(II) complex of TPA is a good model for carbonic anhydrase.

Keywords: Carbonic anhydrase, Model, Nucleophile agent, Rate constant