

國立台灣師範大學化學系博士論文

指導教授：李位仁 博士

紫酸磷酸酶活性中心之雙金屬擬態化合物合成及其衍生物  
對 Michael Addition 之碳-硫鍵生成催化反應研究

**A Bimetallic Mimic for the active site of Purple Acid  
Phosphatases and the Catalysis of its Derivatives toward  
Michael Addition of Carbon-Sulfur Bond Formation**

研究生：汪子立

中華民國一佰零一年六月

## 目錄

中文摘要.....	3
第一章 緒論.....	4
第二章 錯合物 <b>1</b> 對磷酸酯類水解之反應性探討.....	5
第三章 錯合物 <b>1</b> 催化 Thia-Michael Addition 之反應性測試.....	6
第四章 錯合物 <b>1</b> 之 Thia-Michael Addition 反應機制探討.....	7
第五章 結論 .....	9
參考文獻 .....	10

## 摘要

為了模擬紫酸磷酸酶之異核雙金屬活性中心( $\text{Fe}^{\text{III}} \cdots \text{M}^{\text{II}}$ ,  $\text{M} = \text{Fe}, \text{Zn}, \text{or Mn}$ )，本研究設計了一個不對稱多牙基配子 2-[di(2-pyridylmethyl)aminomethyl]-6-[(2-hydroxyl-benzyl)(2-pyridylmethyl)aminomethyl]benzoate ( $\text{H}_2\text{L}^1$ )。將此配位基與等當量的 $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_9](\text{ClO}_4)_3$ 與 $[\text{Zn}(\text{H}_2\text{O})_6](\text{ClO}_4)_2$ 在甲醇下反應，可得到一深紫色錯合物 $[\text{L}^1\text{Zn}(\text{CH}_3\text{CN})\text{Fe}(\mu\text{-OH})]_2(\text{ClO}_4)_4$  (**1**)並經由 X-ray 繞射解析法鑑定。錯合物 **1** 具有四核金屬中心，配位基之苯甲酸根以 W-shaped 的形式橋接  $\text{Fe}^{\text{III}}$  與  $\text{Zn}^{\text{II}}$  中心， $\text{Fe}^{\text{III}}$  中心幾合結構為扭曲八面體，而  $\text{Zn}^{\text{II}}$  中心結構則為扭曲四角錐。除此之外， $\text{Fe}^{\text{III}}$  中心彼此以氫氧根離子互相橋接，而每一  $\text{Zn}^{\text{II}}$  中心則配位一乙腈分子。我們預期在催化磷酸酯類水解過程中，此乙腈分子可以被磷酸酯類取代，隨後配位在  $\text{Fe}^{\text{III}}$  中心上的氫氧根離子對磷酸酯類進行親核性攻擊。雖然催化效果不盡理想，但值得注意的是，錯合物 **1** 對於催化 Michael addition 之碳-硫鍵生成具有高產率的表現。

關鍵字：紫酸磷酸酶，Michael Addition，異核雙金屬活性中心。

## 第一章 緒論

紫酸磷酸酶(PAPs)廣泛存在於哺乳動物和植物中，主要分為三大類：(1)植物中，存於紅菜豆<sup>1a,1b</sup>與甘藷<sup>1c</sup>之PAP的活性中心金屬為 $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-Zn}^{\text{II}}$ 與 $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-Mn}^{\text{II}}$ ，(2)哺乳類動物中，存於人類<sup>1d</sup>、豬<sup>1e</sup>、老鼠<sup>1f,1g</sup>之PAP活性中心金屬為 $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-Fe}^{\text{II}}$ ，(3)真菌中<sup>2h</sup>，此類PAP之活性中心結構到目前為止尚未被鑑定出來。有趣的是，紫酸磷酸酶是自然界中唯一擁有雙核混價金屬的水解酶，可在酸性或中性環境下水解生物體內的磷酸酯類或磷酸酐，如ATP (adenosine triphosphate)。

1995年，Prof. Norbert Sträterl 與 Bernt Krebs 率先從紅菜豆中將PAP蛋白分離並成功結晶，其蛋白質為一 homodimers 結構，分子量為111 kDa。由X-Ray 結構解析得知<sup>2b</sup>，兩個單體各存在一個活性中心，而活性中心是由一個鐵金屬及鋅金屬離子構成，彼此之間藉著天門冬胺酸(Asp 164)和一個氫氧根離子橋接，其 $\text{Fe}^{\text{III}}\text{...Zn}^{\text{II}}$ 之間的距離為3.26 Å。鐵金屬中心配位一個組胺酸(His325)，天門冬胺酸(Asp135)，酪胺酸(Tyr167)和一個terminal的氫氧根；而鋅金屬中心離子則由兩個組胺酸(His286, His323)，一個天門冬醯胺(Asn201)和一個水分子所配位。

## 第二章 錯合物 1 對磷酸酯類水解之反應性探討

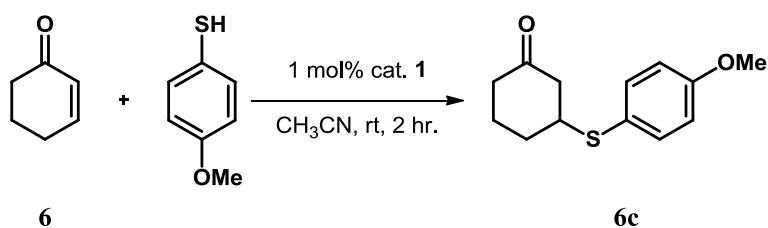
根據文獻報導，酵素 PAPs 的活性會受到 pH 值的影響<sup>1</sup>，因此我們配置下列三種緩衝溶液，分別為 MES (pH = 5.5, 0.01M)，HEPES (pH = 7.0, 0.01M)和 CHES (pH = 9.0, 0.01M)三種。隨後在氮氣下依序加入錯合物 1 與受質 BDPP(bis(4-nitrophenyl)phosphate)。此時緩衝溶液中，錯合物 1 濃度為  $1 \times 10^{-5}$  M，BNPP 濃度為  $1 \times 10^{-3}$  M。反應過程中，以 UV/vis 光譜追蹤  $\lambda_{\max} = 400$  nm 之吸收峰，此吸收峰為 4-nitrophenolate 之特徵吸收峰。我們發現，在酸性跟中性的條件下，一小時過後 UV/vis 光譜並無明顯變化，然而在鹼性條件下，則可觀測到  $\lambda_{\max} = 400$  nm 之吸收峰的生成。可惜的是，當與背景反應比較時，其反應速率只比背景反應快了 1.1 倍，可視為誤差範圍內。換句話說，在弱鹼條件下，幾乎都是背景反應。

由於錯合物 1 對於磷酸酯類水解反應不具催化活性，進而啟發我們從另一個角度看待錯合物 1 與其反應型態之間的關係。近年來，仿生催化劑的概念越來越受重視，主要訴求為低污染，低花費，及高效率等重點。錯合物 1 的中心金屬為地球中含量較豐富且價格便宜的鐵與鋅金屬離子，又錯合物 1 為一混價四核金屬錯合物，有機會藉由多金屬中心的協同作用，提升催化活性。因此，我們以仿生催化劑的觀點再出發，開始尋找適合錯合物 1 的催化反應。幸運地，錯合物 1 對於 Thia-Michael Addition 反應具有不錯的催化活性，後續章節將會有一系列的探討。

### 第三章 錯合物 1 催化 Thia-Michael Addition 之反應性測試

4-Methoxybenzenethiol 與 2-Cyclohexenone (**6**) 之 Michael Addition 反應分別在氮氣及空氣下進行。反應過程中，我們以薄層色層分析片 (Thin Layer Chromatography, TLC) 片追蹤反應。反應過程中，在  $R_f = 0.7$  與  $R_f = 0.3$  有兩個吸收帶。待反應結束後，我們以管柱層析法進行純化，並利用  $^1\text{H-NMR}$  鑑定。確認  $R_f = 0.7$  為 4-methoxybenzenethiol 之 disulfide 衍生物， $R_f = 0.3$  為產物 3-(4-methoxyphenylsulfanyl)-cyclohexan-1-one (**6c**)。產率如表 3-1 所示，在空氣下 disulfide 產率為氮氣下的 6.5 倍，亦即空氣下有 26% 的 4-methoxybenzenethiol 被氧化成 disulfide。值得一提的是，氮氣下反應時間只要五分鐘，**6c** 產率即可達 97%。

表 3-1 錯合物 1 之 Thia-Michael Addition 催化反應測試



	$\text{N}_2$	Air	
<b>6c</b>	97%	67%	<p>• Disulfide • <b>6c</b></p>
Disulfide	2%	13%	

## 第四章 錯合物 1 之 Thia-Michael Addition 反應機制探討

為了進一步明瞭催化過程中的反應機制，我們以 2-cyclohexenone (6)與 4-methoxybenzenethiol 為例，利用 ESI-MS 追蹤反應，如圖 4-1 所示。錯合物 1 在 CH<sub>3</sub>CN 溶劑中訊號為 762.0，隨後加入一當量的 2-cyclohexenone (6)，並未發現與催化劑 1 配位的訊號，緊接著加入 4-methoxybenzenethiol， $m/z = 835.1$

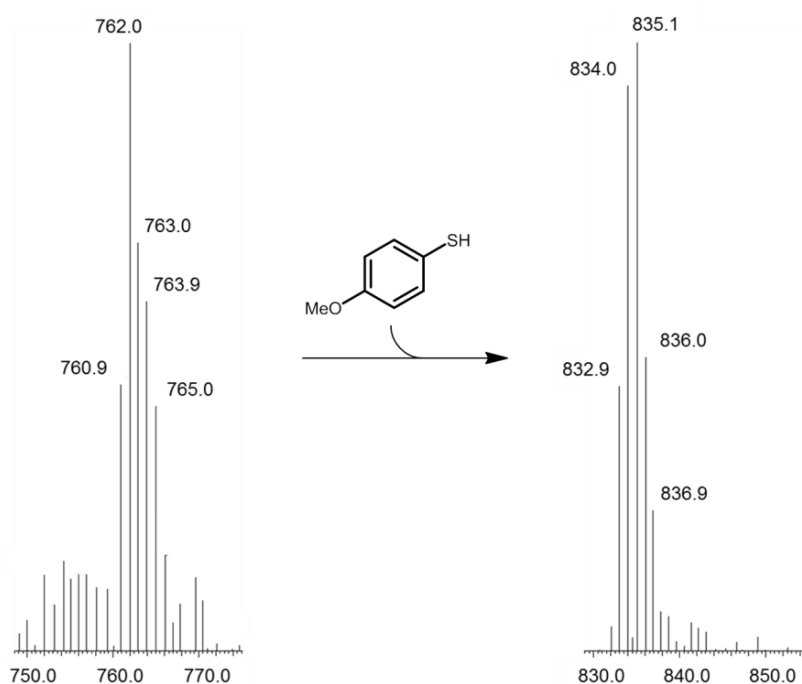


圖 4-1 ESI-MS 圖譜：錯合物 1(左)與加入過量 4-methoxybenzenethiol 之含錯合物 1 乙腈溶液(右)

處有訊號產生，經過比對，此訊號為 4-methoxybenzenethiol 配位至催化劑 1 之訊號，而  $m/z = 235.0$  處則生成產物(6c)之訊號。另一方面，即使再加入一當量的 2-cyclohexenone (6)，仍未發現其配位至催化劑 1 的訊號。根據文獻報導<sup>2</sup>與 ESI-MS 所提供的證據，我們認為反應機制如圖 4-2 所示。一開始 thiols 先配位至催化劑 1 之鋅金屬中心，並失去兩當量質子與 CH<sub>3</sub>CN，溶劑分子形成 thiolates，此時加入的 enones 受到架橋氫氧根氫鍵引力的作用，形成 enolate form，隨後配位在鋅金屬中心的 thiolate 對 enolate 之  $\beta$  碳進行共軛加成反應並生成產物(此時

仍是 enolate form)，最後產物接受由周遭環境所提供的質子並從催化劑 **1** 釋出完成整個催化反應，催化劑 **1** 則繼續進行下一個催化循環。經過上述反應機制的探討，我們認為，由於配位基  $H_2L^1$  本身的不對稱性，使催化劑 **1** 同時具有兩個催化活性中心，可同時活化 enones 與 thiols，因此反應性好。

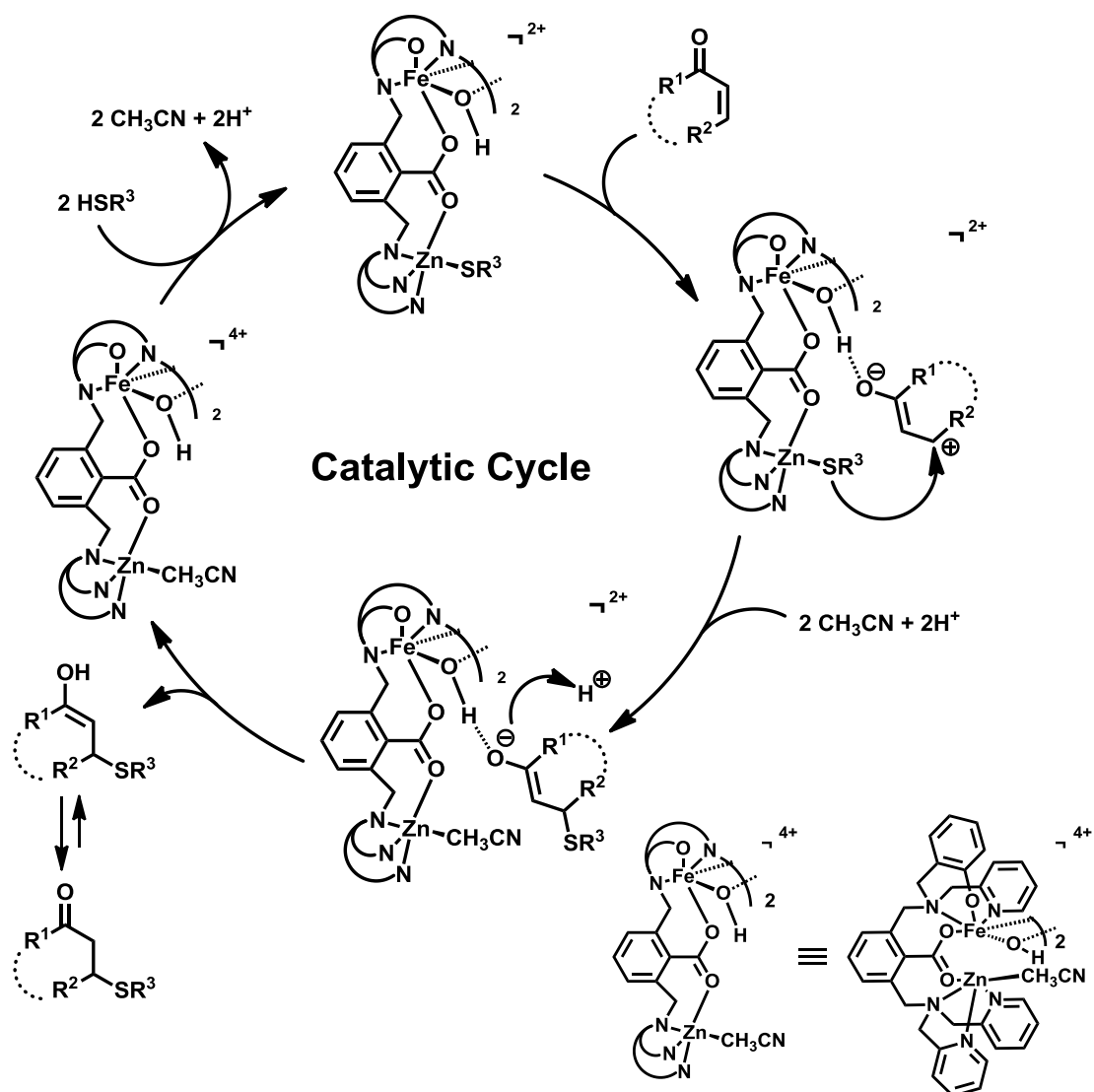


圖 4-2 錯合物 **1** 之反應機制示意圖



## 第五章 結論

本研究以設計紫酸磷酸酶擬態化合物為目標，合成不對稱配位基  $H_2PHPB (H_2L^1)$ ，並利用此配位基得到異核四金屬中心錯合物， $[L^1Zn(CH_3CN)Fe(\mu-OH)]_2(ClO_4)_4$  (**1**) 研究成果歸納成下列幾個重點。

1. 錯合物 **1** 中，配位基  $L^1$  由於本身立體障礙的關係，迫使苯甲酸根以 W-shaped 的形式橋接鐵與鋅金屬離子，其距離為  $6.0 \text{ \AA}$ 。此距離遠大於紫酸磷酸酶活性中心兩金屬的距離 ( $Fe \cdots Zn = 3.26 \text{ \AA}$ )。
  2. 錯合物 **1** 之鐵金屬中心雖然相距  $3.14 \text{ \AA}$ ，但根據 EPR 所量測的結果，其錯合物為 **1** 具有反鐵磁耦合的現象，我們推測錯合物 **1** 在溶液中其鐵金屬中心仍是藉由兩個氫氧根橋接一起，沒有多餘的空配位提供給磷酸酯類進行鍵
- 根據上述兩點，我們認為這是造成錯合物 **1** 無法水解磷酸酯類的主因。

雖然對於紫酸磷酸酶之擬態化合物的反應性測試並不如當初預期來的理想，因此我們以仿生催化劑的觀點再出發，並利用錯合物 **1** 含多金屬中心的特性，進行 Thia-Michael Addition 的反應性測試，其研究成果可歸納成以下幾個重點：

- 一 錯合物 **1** 同時具有 Lewis Acid/Base 與 Brønstead Acid 活性中心，可分別活化 Michael Donor (enones) 與 Michael Acceptor (thiols)，經由 ESI-MS 所提供的資訊我們推測認為，thiols 會配位到鋅金屬中心並被活化成親核性較強的 thiolates，隨後對受到  $Fe(\mu-OH)Fe$  活化成 enolate form 之 enones 進行 Michael Addition 反應而得到產物。錯合物其概念與文獻中所提出的 **DCA (Double Catalytic Activation)** 概念不謀而合。
- 二 錯合物 **1** 對於 thia-Michael Addition 具有極高的反應性，我們發現，即使暴露在空氣下，錯合物 **1** 在室溫下對於催化產物 3-(4-methoxyphenylsulfanyl)-cyclohexanone (**6c**) 仍有 67% 的產率，而在氮氣下五分鐘內產率則可高達 97%。

## 參考文獻

1. Sträter<sup>1</sup>, N.; Klabunde, T.; Tucker, P.; Witzel, H.; Krebs, B. *Science* **1995**, *268*, 1489. (b) Klabunde, T.; Sträter<sup>1</sup>, N.; Fröhlich, R.; Witzel, H.; Krebs, B. *J. Mol. Biol.* **1996**, *259*, 737. (c) Schenk, G.; Gahan, L. R.; Carrington, L. E.; Mitić, N.; Valizadeh, M.; Hamilton, S. E.; de Jersey, J.; Guddat, L. W. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2005**, *102*, 273. (d) Sträter, N.; Jasper, B.; Scholte, M.; Krebs, B.; Duff, A. P.; Langley, D. B.; Han, R.; Averill, B. A.; Freeman, H. C.; Guss, J. M. *J. Mol. Biol.* **2005**, *351*, 233. (e) Guddat, L. W.; McAlpine, A. S.; Hume, D.; Hamilton, S.; de Jersey, J.; Martin, J. L. *Structure* **1999**, *7*, 757. (f) Uppenberg, J.; Lindqvist, F.; Svensson, C.; Ek-Rylander, B.; Andersson, G. *J. Mol. Biol.* **1999**, *290*, 201. (g) Lindqvist, Y.; Johansson, E.; Kaija, H.; Vihko, P.; Schneider, G. *J. Mol. Biol.* **1999**, *291*, 135. (h) Schenk, G.; Korsinczky, M. L. J.; Hume, D. A.; Hamilton, S.; de Jersey, J. *Gene* **2000**, *255*, 419.
2. Delp, S. A.; Munro-Leighton, C.; Goj, L. A.; Ramírez, M. A.; Gunnoe, T. B.; Petersen, J. L.; Boyle, P. D. *Inorg. Chem.* **2007**, *46*, 2365.