

УДК 54-386+542.943'7+546.562

С.О.Малінкін, Л.В.Пенкова, В.О.Павленко

**КАТАЛІТИЧНА АКТИВНІСТЬ ТЕТРАЯДЕРНОГО КОМПЛЕКСУ МІДІ(II)
З ТОПОЛОГІЄЮ МОЛЕКУЛЯРНОЇ ГРАТКИ
В РЕАКЦІЇ ОКИСНЕННЯ 3,5-ДИ-ТРЕТ-БУТИЛПІРОКАТЕХІНУ**

Показано, що комплекс $[\text{Cu}_4(\text{KA})_4(\text{H}_2\text{O})_4] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (1), де КА — двічі депротонувана 3-ацетил-4-метил-1*H*-піразол-5-карбонова кислота, виявляє каталітичну активність у реакції окиснення 3,5-ди-*трет*-бутилпірокатехіну (ДТБК) молекулярним киснем. За результатами фізико-хімічних методів дослідження виявлено, що комплекс 1 у розчині дисоціює на біядерні комплексні частинки, які й беруть участь в каталітичних перетвореннях. Кінетична поведінка процесу окиснення підпорядковується моделі Міхаеліса–Ментен, отримані значення розрахованих кінетичних параметрів вказують на відносно високу каталітичну активність комплексу.

ВСТУП. На сьогоднішній день одним з найперспективніших напрямків сучасної біонеорганічної та біофізичної хімії є дослідження низькомолекулярних модельних сполук, які імітують каталітичну дію металоферментів. Головним чином увага вчених зосереджена на дослідженні структурних та каталітичних властивостей синтетичних модельних систем.

Катехолоксидаза — один з найвідоміших мідьмісних ферментів, що каталізує реакцію двоелектронного окиснення орто-дифенолів у відповідні хінони [1]. Активний центр ферменту містить два іони міді(II), які зв'язані з чотирма гістидиновими амінокислотними залишками і містково координованою молекулою розчинника, що забезпечує міжметальну відстань ≈ 3.5 Å. Синтез та дослідження простих модельних систем — біядерних комплексів міді(II) — дає можливість детальніше розглянути хімічні перетворення, які зазнають каталізатор і субстрат у процесі окиснення. Зазвичай у реакціях моделювання каталітичної активності катехолоксидази як субстрат використовують 3,5-ди-*трет*-бутилпірокатехін (ДТБК). Незважаючи на значну кількість модельних комплексів, що описані в літературі [2–8], механізми окиснення катехолу природними ферментами і модельними сполуками залишаються досі недостатньо зрозумілими.

Піразольні ліганди з донорними замісниками в 3- та 5-положеннях гетероциклу знайшли широке застосування в синтезі комплексів для моделювання біядерних активних центрів

різноманітних ферментів: гідролаз (Zn) [9], уреаз (Ni) [10] та мідьмісних ферментів, що містять біядерні активні центри типу III [11].

У попередній роботі [12] був синтезований та досліджений методом рентгеноструктурного аналізу комплекс з топологією $[2 \times 2]$ молекулярної ґратки (MP) $[\text{Cu}_4(\text{KA})_4(\text{H}_2\text{O})_4] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (1), де КА — 3-ацетил-4-метил-1*H*-піразол-5-карбонова кислота (рис. 1). Було встановлено, що сполука виявляє каталітичну активність у реакції окиснення ДТБК.

Комплекс 1 розчинний у воді, метанолі, ДМСО та сумішах цих розчинників, а ДТБК —

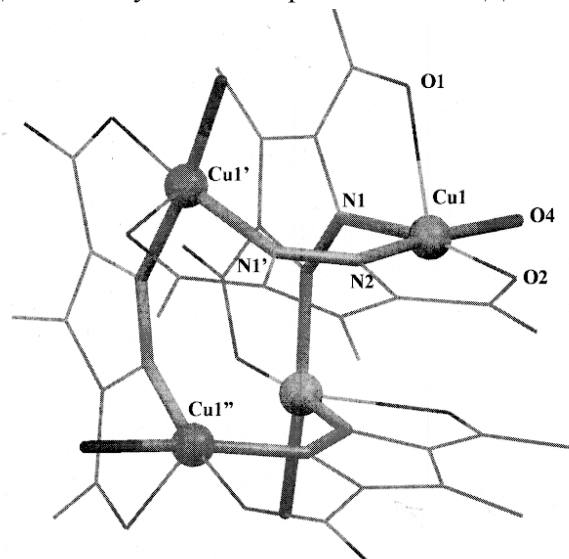


Рис. 1. Будова $[\text{Cu}_4(\text{KA})_4(\text{H}_2\text{O})_4]$ (1) (атоми водню опущені для чіткості).

лише в ДМСО та спирті, тому дослідження кінетики проводили в суміші вода/ДМСО (3/1, о/о) спектрофотометрично при 25 °С на приладі Varian Cary 50.

Кінетичні параметри реакції розраховували за кількістю продукту окиснення ДТБК — дитрет-бутил-хінону (ДТБХ), якому відповідає смуга при 412 нм ($\epsilon = 1684 \text{ моль}^{-1} \cdot \text{л} \cdot \text{см}^{-1}$) (рис. 2).

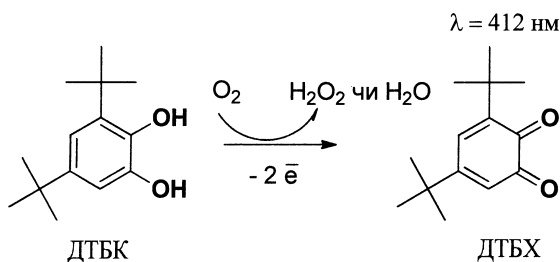


Рис. 2. Окиснення ДТБК до ДТБХ молекулярним киснем.

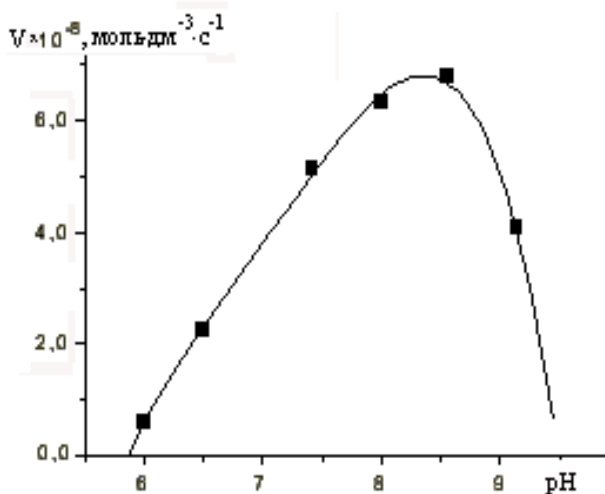


Рис. 3. Залежність початкової швидкості окиснення ДТБК від рН.

Для встановлення оптимальних умов окиснення ДТБК у присутності комплексу була досліджена залежність початкової швидкості утворення ДТБХ від рН середовища.

Як видно на рис. 3, максимальна швидкість окиснення ДТБК спостерігається в діапазоні рН 8–8.5, тому в подальшому всі дослідження проводили в розчині біологічного буферу TRIS (0.1 моль/л) з постійним значенням рН 8. Важливо, що такий самий оптимум каталітичної активності спостерігається для мідьмісного ферменту катехолоксидази, який повністю втрачає каталіти-

чну активність при рН <4 та рН >10 [13].

Кінетику реакції катехолазного типу досліджували методом початкових швидкостей. Константи швидкості псевдопершого порядку k_{obs} розраховували за допомогою методу початкових концентрацій (<10 % конверсії). Встановлено, що максимальна швидкість процесу окиснення при 25 °С складає $6.96 \cdot 10^{-3} \text{ моль}/(\text{л} \cdot \text{год})$. Кінетична поведінка окиснення ДТБК у присутності комплексу 1 підпорядковується моделі Міхаеліса–Ментен. Константи псевдопершого порядку швидкості окиснення зв'язаного з каталізатором субстрату, або число оборотів, k_{cat} і константу Міхаеліса K_M розраховували з графіка Лайнуівера–Берка, що ілюструє лінійну залежність оберненої швидкості від оберненої концентрації субстрату, за допомогою рівняння :

$$V_0^{-1} = (k_{cat} \cdot [\text{каталізатор}])^{-1} +$$

$$+ K_M \cdot (k_{cat} \cdot [\text{каталізатор}] \cdot [\text{ДТБК}]_0)^{-1},$$

де $[\text{каталізатор}]$ — концентрація комплексу 1, $[\text{ДТБК}]_0$ — початкова концентрація субстрату, V_0^{-1} — початкова швидкість окиснення субстрату.

Отримані значення параметрів $k_{cat} = 1740 \text{ год}^{-1}$, $K_M = 3.95 \cdot 10^{-3} \text{ моль/л}$ і $k_{cat}/K_M = 4.4 \cdot 10^5 \text{ л}/(\text{моль} \cdot \text{год})$ у порівнянні з літературними даними для модельних комплексів міді(II) в реакції окиснення ДТБК свідчать про відносно високу каталітичну активність комплексу 1. Так, відомо, що найефективнішими каталізаторами серед функціональних моделей є комплекси з $k_{cat} = 9927 \text{ год}^{-1}$ [14], при цьому середні значення каталітичної активності модельних систем характеризуються значеннями в діапазоні 1000–5000 год^{-1} [10, 15].

Взаємодію сполуки 1 з модельним субстратом ДТБК досліджували в залежності від концентрації розчиненого кисню (рис. 4). Залежність логарифму початкових швидкостей від логарифму концентрації кисню є лінійною: $\lg V_0 = 0.363 \cdot \lg(C(\text{O}_2)) - 12.627$ ($R^2 = 0.9943$), отже, можна зробити висновок, що порядок реакції за киснем (n) дорівнює 0.36. В той же час окиснення субстрату за відсутності каталізатора є реакцією першого порядку [11].

Як було показано в роботі [16], нативна мета-форма катехол-оксидази реагує з одним еквівалентом катехіну в анаеробних умовах, при цьому утворюється один еквівалент відповідного

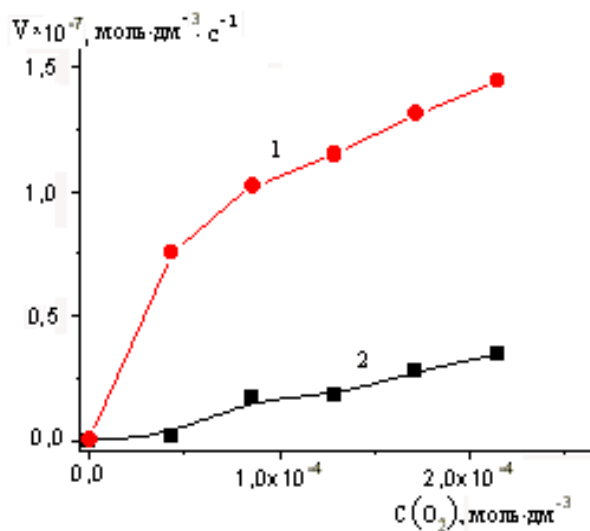


Рис. 4. Залежність початкової швидкості реакції окиснення ДТБК від $[O_2]$ у присутності комплексу 1 в системі вода/ДМСО (3/1, о/о) при 25 °С. $[I]_0 = 4 \cdot 10^{-6}$; $[ДТБК]_0 = 4 \cdot 10^{-4}$ М. 1 — в присутності комплексу 1; 2 — без нього.

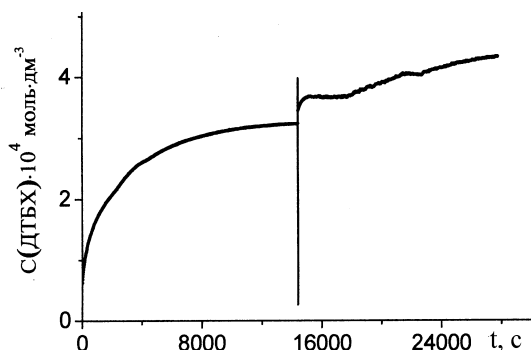


Рис. 5. Часова залежність каталітичного окиснення ДТБК у присутності комплексу 1; рН 8,0, $t = 25$ °С, у ДМСО/Н₂О (3/1, о/о) в атмосфері кисню. $[I]_0 = 4 \cdot 10^{-6}$; $[ДТБК]_0 = 4 \cdot 10^{-4}$ М і після вертикальної лінії — повторне додавання ДТБК (0.1 мл, 12 ммоль).

хінону. Проте в випадку комплексу 1 реакція не відбувається за відсутності кисню. Також варто зазначити, що комплекс необоротно руйнується в процесі реакції, і при повторному додаванні порції субстрату не виявляє каталітичної активності (рис. 5). Тому ступінь конверсії ДТБК у каталітичній реакції окиснення як при низьких, так і при високих співвідношеннях катехол/комплекс не досягає значення 100 % (лише 65 % навіть після 24 год). При цьому одна молекула біядерного комплексу каталізує окис-

нення близько 27 молекул ДТБК при стократному надлишку субстрату.

Для дослідження взаємодії сполуки 1 з ДТБК була вивчена поведінка комплексу в розчині методами електроспрей мас-спектрометрії (ESI-MS), спектроскопії електронного парамагнітного резонансу (ЕПР) та циклічної вольтамперометрії (ЦВА). Спектри ESI-MS метанольних розчинів з концентрацією комплексу $1 \cdot 10^{-6}$ моль/л були записані на спектрометрі Bruker Daltonics APEX ULTRA ESI-FT-MS. ЕПР-спектри отримували на спектрометрі Bruker ESP 300E в X-частотному діапазоні (9.3 GHz) при 120 К, розчинник — вода/ДМСО (3/1, о/о) або метанол ($C = 1 \cdot 10^{-3}$ моль/л). Дифенілпікрилгідрозид (dpph) використовували як стандарт при розрахунку g-фактора. Електрохімічну поведінку комплексу 1 вивчали методом ЦВА в метанольному розчині ($C = 0.1$ моль/л) в атмосфері азоту при швидкості розгортки потенціалу 25 мВ/с, з використанням дискового платинового електрода ($d = 1$ мм) і тетра-бутиламоній перхлорату як фонового електроліту ($C = 0.1$ моль/л).

При дослідженні водно-спиртових розчинів сполуки 1 методом ESI-MS були зареєстровані два типи сигналів, що відповідають тетра- та біядерним частинкам (рис. 6).

Отже, комплекс 1 при розчиненні дисоціює з утворенням біядерного комплексу складу $[Cu_2KA_2]$. Хоча наявні дані не дають можливості встановити будову біядерної частинки, з певною вірогідністю можна говорити про її подібність до сполук типу M_2L_2 , характерних для даного класу лігандів (рис. 7) [17—20]. Хоча встановити точно ступінь дисоціації комплексу за допомогою відомих фізико-хімічних методів дослідження не уявляється можливим у зв'язку з подібністю координаційного оточення іонів міді (II) в бі- та тетраядерних частинках. Проте в спектрах ЕПР заморожених водно-метанольних розчинів сполуки 1 (рис. 8) майже відсутній сигнал, що характерно для біядерних піразолатних комплексів, у яких реалізується сильна антиферромагнітна взаємодія між парамагнітними центрами. У випадку ж сполук з топологією $[2 \times 2]$ МР спостерігається інтенсивний сигнал зі значенням g-фактору близько 2.14 [21—23]. Це свідчить про практично повну дисоціацію тетраядерного комплексу 1 у водному розчині на біядерні фрагменти.

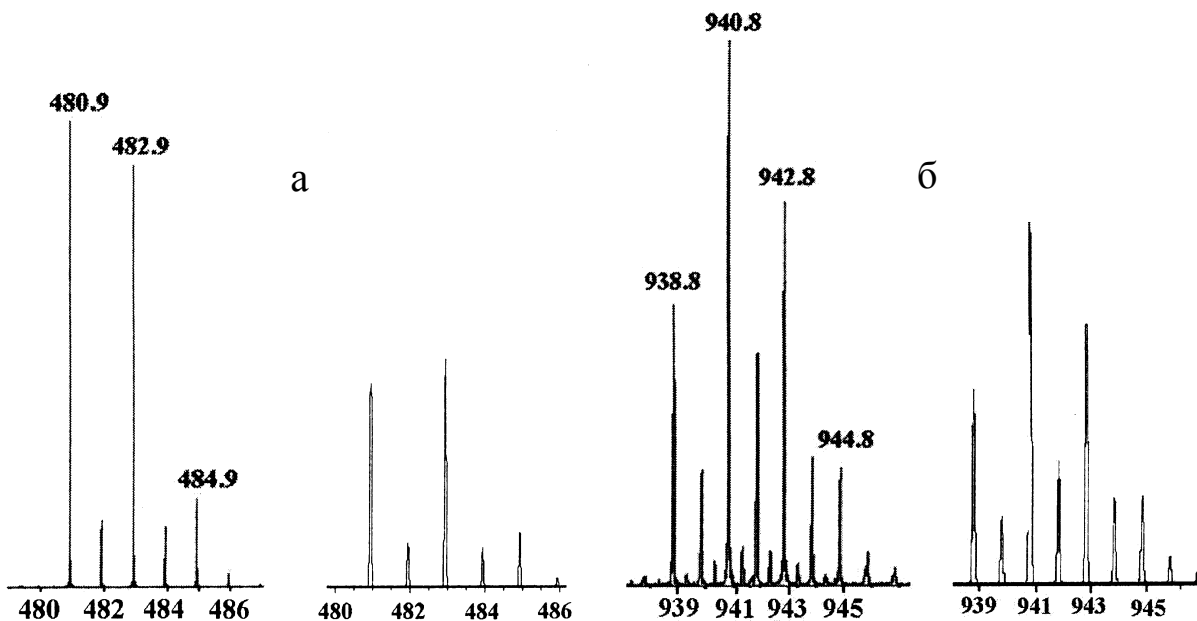


Рис. 6. Розраховані (праворуч) та спостережені в ESI-MS мас-спектрах (ліворуч) ізотопні паттерни для частинок $\{[\text{Cu}_2\text{KA}_2+\text{H}^+]\}^+$ ($M_{\text{розр}}=480.9\text{ m/z}$) (а) і $\{[\text{Cu}_4\text{KA}_4]+\text{Na}^+]\}^+$ ($M_{\text{розр}}=940.8\text{ m/z}$) (б).

Крім того, дослідження електрохімічних властивостей комплексу 1 у водному та метанольному розчинах показали перебіг одного необоротного процесу з формальним редокс-потенціалом -0.409 В відносно фероцену. Редокс-процес відповідає переходу $\text{Cu(II)} \rightarrow \text{Cu(I)}$, що є характерним для біядерних фенольних і піразолатних комплексів міді(II) [6, 24], і значно відрізняється від значення потенціалу ($E_{1/2} = -0.93\text{ В}$) для тетраядерних піразолатних сполук [17] з піразолатними лігандами. Така поведінка свідчить про наявність лише біядерних електроактивних частинок у розчині.

Незважаючи на складну будову в криста-

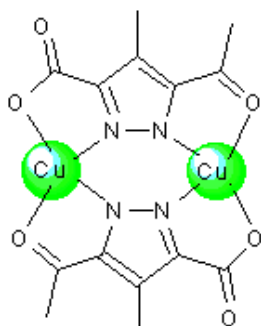


Рис. 7. Імовірний тип координації в комплексі $[\text{Cu}_2\text{KA}_2]$.

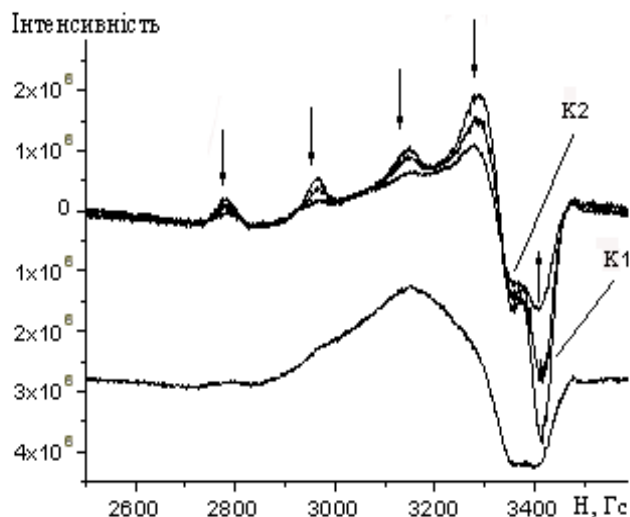


Рис. 8. ЕПР-спектри заморожених розчинів реакційних сумішей комплекс/ДТБК (зверху донизу) 2:1, 1:1, 2:3, 1:2 та 1:50, вода/ДМСО (3/1, о/о) при 120 К (К1 — біядерний комплекс Cu(II)/Cu(I) , К2 — суміш каталітично інертних комплексів).

лічному стані в розчині комплекс майже повністю дисоційований і знаходиться у вигляді біядерних комплексних частинок, які й виступають каталізатором процесу окиснення.

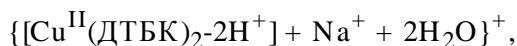
Виходячи з отриманих даних, можна при-

пустити механізм взаємодії, що полягає в збільшенні швидкості реакції за рахунок відновлення комплексу 1 катехолом у присутності кисню, з утворенням змішано-валентної координаційної сполуки Cu(I)Cu(II), яка і каталізує процес окиснення. Комплекс міді(II) може відновлюватись при взаємодії з фенольним радикалом [25—27], що утворюється в процесі автоокиснення ДТБК. Роль другого атома міді(II) — структурна, що полягає в утриманні біядерного мотиву. Наступні перетворення перебігають за двома конкурентними напрямками:

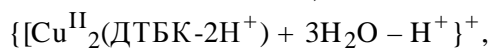
- окиснення міді(I) до міді(II) киснем з утворенням пероксо-комплексу міді(II);
- руйнування змішано-валентного комплексу з утворенням стійких сполук міді(II), що не вступають у каталітичний процес.

З метою ідентифікації можливих продуктів каталітичної реакції були застосовані методи ЕПР та ESI-MS. За даними спектрів ЕПР заморожених водно-спиртових розчинів сумішей зі співвідношенням комплекс/субстрат 2:1, 1:1, 2:3, 1:2 та 1:50 спостерігається поява сигналу, що відповідає комплексу міді(I)/мідь(II), в якому згідно із значеннями параметрів $A_{||} = 184$ Гс, $g_{||} = 2.24$, $g_{\perp} = 2.02$ іони міді(II) знаходяться в N_2O_2 -координаційному оточенні. Інтенсивність сигналу зменшується по мірі зростання концентрації ДТБК, що вказує на руйнування каталітично активного комплексу в процесі окиснення ДТБК. Широкий інтенсивний сигнал з $g = 2.08$, який спостерігається в усіх спектрах, відповідає сполукам міді(II) з ДТБК [28], що є інертними продуктами реакції.

Методом мас-спектромерії встановлено, що лише при співвідношеннях комплекс/субстрат 2:1 та 1:1 спостерігаються патерни, що відповідають бі- та тетраядерним частинкам комплексу 1, при надлишку ДТБК відповідні патерни в спектрах зникають. Крім того, з'являються сигнали при всіх співвідношеннях комплекс/субстрат, які можна віднести до сполук складу:



$$M = 563.3;$$



$$M = 422.3.$$

Хоча методом ESI-MS неможливо ідентифікувати всі наявні продукти реакції, можна

зробити висновок, що це є моноядерні комплекси міді(II) з субстратом, що не вступають у каталітичні перетворення. Про подібні комплекси міді(II) повідомлялось у літературі [28, 29], тому їх утворення в процесі реакції не викликає здивування.

Варто зазначити, що реакція окиснення ДТБК киснем повітря в присутності комплексів Cu(II) є процесом досить складним і неоднозначним, з можливістю перебігу за кількома механізмами і в декілька стадій. Проте в літературі повідомляється про два основні напрями окиснення пірокатехінів за участю біядерних модельних комплексів міді(II). Перший механізм полягає в окисненні ДТБК комплексом міді(II) за відсутності кисню з утворенням ДТБХ-радикалу [30, 31], інший — "класичний" механізм, що полягає в окисненні ДТБК пероксо-комплексом міді(II) [15, 32, 33]. У результаті нашого дослідження було встановлено, що піразолатний комплекс міді(II) не взаємодіє з субстратом за відсутності кисню; крім того, не було виявлено утворення ДТБХ-радикалу, що вказує на перебіг каталітичної реакції за участю пероксо-сполук міді(II). При цьому каталітична активність комплексу 1 порівняно з найкращими біядерними моделями лише в кілька разів менша, що свідчить про визначальну роль структурних та електрохімічних особливостей комплексу в реакції окиснення.

РЕЗЮМЕ. Показано, що комплекс $[Cu_4(KA)_4(H_2O)_4] \cdot 4H_2O$ (1), где KA — дважды депротонированная 3-ацетил-1Н-пиразол-5-карбоновая кислота, проявляет каталитическую активность в реакции окисления ди-*tert*-бутилпирокатехина (ДТБК) молекулярным кислородом. По результатам физико-химических методов исследования комплекс 1 в растворе диссоциирует на биядерные комплексные частицы, которые и участвуют в каталитических превращениях. Кинетическое поведение процесса окисления подчиняется модели Михаэлиса–Ментен, полученные значения рассчитанных кинетических параметров указывают на относительно высокую каталитическую активность комплекса.

SUMMARY. It was shown that a complex $[Cu_4(KA)_4(H_2O)_4] \cdot 4H_2O$ (1), where KA is a doubly deprotonated 3-acetyl-1H-pyrazole-5 carboxic acid, had shown the catalytic activity in the oxidation of di-*tert*-butyl-catechole (DTBC) by a molecular oxygen. According to the data obtained by physical methods complex 1 dissociated into the binuclear complex species in the solution that ensured the catalytic

reaction course. Kinetic behavior of the oxidation process was subjected to the Michaelis–Menten kinetics. Obtained values of calculated kinetic parameters indicated the high catalytic activity of a complex.

ЛІТЕРАТУРА

1. Karlin K.D., Tyeklar Z. Bioinorganic Chemistry of Copper. -New York: Chapman & Hill, 1993.
2. Bauer-Siebenlist B., Dechert S., Meyer F. // Chem. Eur. J. -2005. -**11**. -P. 5343–5352.
3. Kryatov S.V., Rybak-Akimova E.V., Meyer F., Pritzkow H. // Eur. J. Inorg. Chem. -2003. -P. 1581–1590.
4. Meyer F., Pritzkow H. // Angew. Chem. -2000. -**112**. -P. 2199–2202.
5. Selmeczi K., Reglier M., Speier G., Peintler G. // React. Kinet. Catal. Lett. -2004. -**81**. -P. 143–151.
6. Ackermann J., Meyer F., Kaifer E., Pritzkow H. // Chem. Eur. J. -2002. -**8**. -P. 247–258.
7. Borzel H., Comba P., Pritzkow H. // Chem. Commun. -2001. -P. 97–98.
8. Granata A., Monzani E., Casella L.J. // Biol. Inorg. Chem. -2004. -**9**. -P. 903–913.
9. Merkel M., Moller N., Piacenza M. et al. // Chem. Eur. J. -2005. -**11**. -P. 1201–1209.
10. Mukherjee J., Mukherjee R. // Inorg. Chim. Acta. -2002. -**337**. -P. 429–438.
11. Koval I.A. The Ph.D. thes. in the group of Coordination and Bioinorganic Chemistry (CBAC) at Leiden University.
12. Malinkin S., Golenya I.A., Pavlenko V.A. et al. // Acta Crystallogr. -2011. -**E 67**. -P. m1260–m1261.
13. Rompel A., Fischer H., Meiwes D. et al. // J. Biol. Inorg. Chem. -1999. -**4**. -P. 56–63.
14. Wegner R., Gottschaldt M., Wolfgang P. et al. // J. Mol. Catal. A. -2003. -**201**. -P. 93–118.
15. Monzani E., Quinti L., Perotti A. et al. // Inorg. Chem. -1998. -**37**. -P. 553–562.
16. Eicken C., Krebs B., Sacchettini J.C. // Curr. Opin. Struct. Biol. -1999. -**9**. -P. 677–683.
17. King P., Clerac R., Anson C.E., Powell A.K. // Dalton Trans. -2004. -P. 852–861.
18. Penkova L., Demeshko S., Haukka M. et al. // Z. Anorg. Allg. Chem. -2008. -**634**. -P. 2428.
19. Bayon J.C., Esteban P., Net G. et al. // Inorg. Chem. -1991. -**30**. -P. 2572.
20. Perez J.A., Pons J., Solans X. et al. // Inorg. Chim. Acta. -2005. -**358**. -P. 617.
21. Klingele (Hausmann) J., Prikhod'ko A.I., Leibel G. et al. // J. Chem. Soc., Dalton Trans. -2007. -P. 2003–2013.
22. Van der Vlugt J.I., Demeshko S., Dechert S., Meyer F. // Inorg. Chem. -2008. -**47**. -P. 1576–1585.
23. Schneider B., Demeshko S., Dechert S., Meyer F. // Angew. Chem. -2010. -**122**. -P. 9461–9464.
24. Reim J., Krebs B. // J. Chem. Soc., Dalton Trans. -1997. -P. 3793–3804.
25. Pokhodenko V.D., Khizhnyi V.A., Koshechko V.G. // Teor. Eksp. Khim. -1974. -**10**, № 1. -P. 112–115;
26. Pokhodenko V.D. // Izv. Akad. Nauk SSSR. Ser. Khim. -1990. -**10**. -P. 2338–2354.
27. Goloverda G.Z., Khizhnyi V.A., Pokhodenko V.D. // Teor. Eksp. Khim. -1990. -**26**, № 2. -P. 163–168.
28. Speier G., Tisza S., Tyekkr Z. et al. // Inorg. Chem. -1994. -**33**. -P. 2041–2045.
29. Ovcharenko V.I., Gorelik E.V., Fokin S.V. et al. // J. Amer. Chem. Soc. -2007. -**129**. -P. 10512–10521.
30. Thompson J.S., Calabrese J.C. // Ibid. -1986. -**108**. -P. 1903–1907.
31. Kaizer J., Pap J., Speier G. et al. // J. Inorg. Biochem. -2002. -**91**. -P. 190–198.
32. Klabunde T., Eicken C., Sacchettini J.C., Krebs B. // Nat. Struct. Biol. -1998. -**5**. -P. 1084–1090.
33. Monzani E., Battaini G., Perotti A. et al. // Inorg. Chem. -1999. -**38**. -P. 5359–5369.

Київський національний університет
ім. Тараса Шевченка

Надійшла 30.11.2011