

金属卟啉 MTPPS 对 NADH 氧化的催化作用

吴宝璋^{*} 杨长通 吴辉煌

(厦门大学化学系 固体表面物理化学国家重点实验室 厦门 361005)

摘要 中位-四(对-磺基苯基)卟啉的铁、锰配合物(FeTPPS 和 MnTPPS)用作 NADH 氧化的催化剂,均相溶液中的反应动力学用紫外可见光谱测定.结果表明,在除氧的中性溶液中 FeTPPS 和 MnTPPS 降低了 NADH 在玻碳电极上氧化的过电位,过程用 EC 再生机理解释.在氧饱和的溶液中 MTPPS 起电子转移中介体的作用促进 NADH 氧化,其还原态被 O₂ 氧化而再生.测得 FeTPPS 和 NADH 反应的速率常数为 $3.3\text{mol}^{-1}\cdot\text{L}\cdot\text{s}^{-1}$,而 MnTPPS 和 NADH 反应的速率常数约为 FeTPPS 的 1/2. 讨论了 MTPPS 作为 NADH 仿生氧化催化剂的前景.

关键词 金属卟啉, NADH 氧化, 仿生催化, 动力学分析

烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD⁺)是目前已知的 250 余种脱氢酶的辅酶,有效地实现还原态辅酶 NADH 的氧化再生是发展生物催化技术和开发各种脱氢酶电极的关键.为此,已采用醌类、吩嗪、二茂铁及某些氧化还原染料作为 NADH 氧化的电催化剂^[1~5],其中麦尔多拉蓝等氧氮蒽衍生物呈现较好的效果^[3~5],但是这些染料分子的化学稳定性较差,尤其是在脱氢酶呈较大活性的弱碱性介质中不稳定^[4].基于细胞色素是呼吸链中双氧化 NADH 的中介体这一原理^[6],本文探讨中位-四(对-磺基苯基)卟啉的铁、锰配合物对 NADH 氧化的催化作用.这些金属卟啉在水溶液中形成带负电荷的配离子,能在吡咯电聚合的过程中和酶一起固定在聚合物中,可望构成新型的酶电极.

1 实验

中位-四(对-磺基苯基)卟啉的铁、锰配合物(FeTPPS 和 MnTPPS)在本实验室制得,合成步骤参阅文献[7],产物经过多种光谱方法鉴定.二氢烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)为中国科学院上海生化所产品,其它试剂为国产分析纯试剂.

所有溶液用二次蒸馏水配制,溶液 pH 值由 821 型袖珍数字 pH 离子计测量.除氧的试验溶液是指通高纯氮 20min 后的溶液.氧饱和的试验溶液是指通高纯氧 20min 后的溶液.

日本岛津 UV-240 型紫外可见分光光度计用于 NADH 均相化学反应动力学常数的测定. RDE-4 型双恒电位仪(美国 Pine 公司)和 3033 型 X-Y 记录仪(重庆仪表四厂)用于电化学实验.采用普通的三室电解池,铂片为辅助电极,饱和甘汞电极(SCE)为参比电极,文中电位值相

^{*} 女,56岁,副教授

收稿日期:1998-09-04,修回日期:1998-12-07,定稿日期:1999-02-14,国家自然科学基金(29233082)和福建省自然科学基金资助课题

对于 SCE 而言,工作电极为玻碳,使用前经 5# 金相砂纸抛磨,并在二次蒸馏水中超声波洗涤 10min,晾干后备用.所有实验在室温下进行.

2 结果与讨论

2.1 MTPPS 对 NADH 氧化的催化作用

图 1 示出磷酸盐缓冲溶液 (pH 6.8) 中的吸收光谱, NADH 的特征吸收峰在 340nm 附近 (见曲线 $t=0$), 其氧化产物 NAD^+ 在 300 ~ 400 nm 波长范围内无吸收峰^[8], 而 FeTPPS 的特征吸收峰在 410nm 附近. 在不含其它物质的氧饱和溶液中 NADH 是稳定的, 溶液搁置较长时间后其特征吸收峰的位置和吸光值保持不变. 一旦加入 FeTPPS, 340nm 处的吸光值 A 将明显地随时间 t 的延长而不断下降, 说明 NADH 浓度逐渐在减小. 与此同时, 410nm 附近的 FeTPPS 特征峰则几乎不随时间而变化. 以上事实表明, 在常温下 FeTPPS 能催化 NADH 与双氧的反应. 用 MnTPPS 代替 FeTPPS 进行实验, 可得类似于图 1 的结果, 但 MnTPPS 的特征吸收峰 (位于 465nm 附近) 随时间变化的速度较慢.

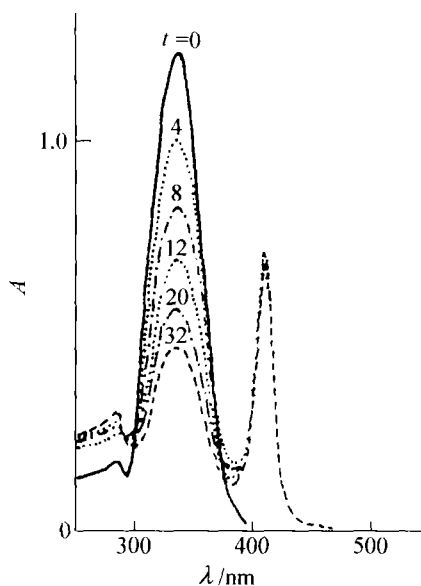


图 1 1×10^{-4} mol/L NADH 和 2.5×10^{-5} mol/L FeTPPS 溶液 (pH 6.8) 的吸收光谱变化
曲线上方数字为反应时间 t/min

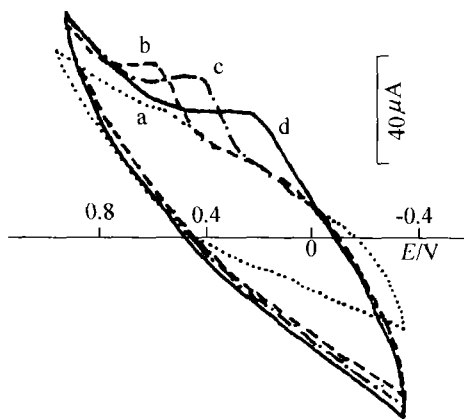
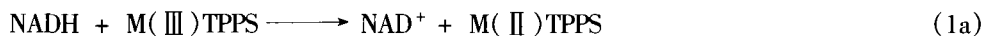


图 2 玻碳电极上 NADH 氧化的循环伏安图
曲线: a—空白溶液, b—不含 MTPPS,
c—含 MnTPPS, d—含 FeTPPS,
扫描速率 50mV/s

为了说明 MTPPS 在 NADH 氧化过程中的作用,进行了除氧溶液中的电化学实验.图 2 是玻碳电极在除氧磷酸盐缓冲溶液 (pH 6.8) 中的伏安图,曲线 a 和 b 分别代表溶液中不含和含有 5×10^{-4} mol/L NADH 的情形.比较曲线 a 和 b 可知, NADH 在玻碳上的电氧化发生在比 +0.5V 正的电位区,和文献 [1] 报道的相近.在 pH 7.0 介质中 NADH 的氧化还原电位为 -0.565V ^[9],显然 NADH 在固体电极上直接氧化的过电位相当高.若溶液中存在 FeTPPS 或 MnTPPS,氧化的过电位将明显降低.如曲线 c 和 d 所示,当 MTPPS 的浓度为 1×10^{-4} mol/L 时,

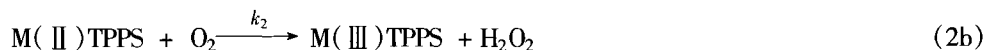
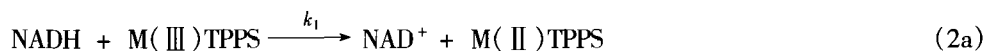
FeTPPS 和 MnTPPS 分别使 NADH 氧化的起始电位负移了 400mV 和 200mV.

NADH 氧化为 NAD^+ 是一个涉及电子转移和质子转移的反应,其微观过程较为复杂.参照醌类、吩嗪、二茂铁及氧化还原染料对 NADH 电氧化的催化作用^[1~5],在含 MTPPS 的除氧溶液中 NADH 的电氧化可表示为:



上式表示 MTPPS 在氧化过程中起电子转移中介体的作用, MTPPS 的再生由电极反应完成.在这种 EC 再生机理中, NADH 电氧化的电位将由金属卟啉的氧化还原电位所决定. 我们已对 MTPPS 的基本电化学性质进行研究^[10], 在 pH 7 溶液中 FeTPPS 和 MnTPPS 的氧化峰分别位于 0.12 V 和 0.32 V, 与各自存在时 NADH 氧化的起始电位接近.

基于无氧溶液中的反应情形, 在氧饱和的溶液中 MTPPS 催化 NADH 氧化的反应式可表示为:



与式(1)不同, 式(2)中 MTPPS 的再生由化学反应完成. 式(2b)中氧还原的产物被认为 H_2O_2 , 是根据我们对 MTPPS 存在下氧还原的实验结果提出的^[9], 利用旋转环盘电极技术可检测到 MTPPS 存在时氧还原的产物为 H_2O_2 . 金属卟啉虽可作为细胞色素的模型物, 但与天然的氧化还原蛋白仍有差别, 后者将双氧还原为 H_2O . 图 1 中 FeTPPS 的特征峰几乎不随时间变化, 可解释为其还原产物迅速被 O_2 氧化再生.

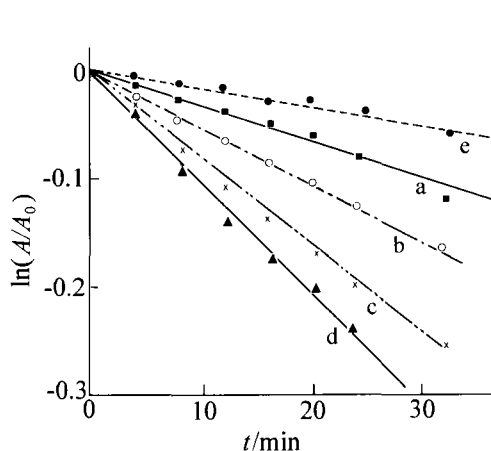


图 3 不同 MTPPS 浓度下的 $\ln(A/A_0) \sim t$ 关系

曲线 a~d 为 $1.25, 2.5, 3.75, 5.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$

FeTPPS, 曲线 e 为 $2.5 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ MnTPPS.

NADH 初始浓度均为 $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$

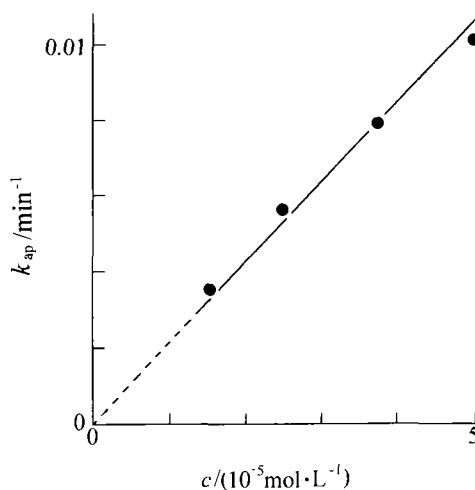


图 4 NADH 均相氧化的表观速率常数
与 FeTPPS 浓度的关系

2.2 溶液中 NADH 氧化的动力学

根据稳定态原理由式(2)可导出 NADH 均相氧化的动力学关系式, 但其一般表达式较为复杂. 既然图 1 表明反应过程中 Fe(III)TPPS 的浓度基本不变, 因此反应(2a)可被近似地视为准

一级反应.图3曲线 a~d 示出 NADH 的初始浓度为 $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$, 而 FeTPPS 的初始浓度不同时, 340nm 峰吸光值的对数 $\ln(A/A_0)$ 随时间 t 的变化, A_0 为 $t=0$ 时的 A 值. 图中 $\ln(A/A_0) \sim t$ 呈线性关系, 符合准一级反应的速度规律, 由其斜率可求出表观速率常数 k_{ap} . k_{ap} 是 FeTPPS 初始浓度的函数, 二者的关系示于图4中. 图4证实了 k_{ap} 与 FeTPPS 的初始浓度成正比, 由图中直线的斜率可估算反应(2a)的速度常数 k_1 . 经计算, 其值为 $2.0 \times 10^2 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 或 $3.3 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$. Sevcik 等^[11]用亚甲蓝作为均相溶液中 NADH 被 O_2 氧化的催化剂, 并测得 pH 7.6 和 pH 9.0 介质中的速率常数 k_1 分别为 3.2 和 $5.3 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$.

和 FeTPPS 相比, MnTPPS 与 NADH 反应的速度常数较小. 图3曲线 e 表示在氧饱和的 $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ NADH 溶液中 MnTPPS 初始浓度为 $2.5 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 时的 $\ln(A/A_0) \sim t$ 关系, 比较曲线 e 和 b, 可估算出 MnTPPS 与 NADH 的反应速率常数 k_1 约为 FeTPPS 的 1/2.

上述实验结果表明 MTPPS 可作为 NADH 氧化的催化剂, 但催化性能依金属卟啉的品种而异. 就降低氧化电位而论, FeTPPS 对 NADH 电氧化的催化效果略逊于某些氧化还原染料(如麦尔多拉蓝、萘甲酰尼罗蓝), 但明显优于醌类、吩嗪和二茂铁等. 作为 NADH 电氧化的优良催化剂除电极反应(1b)的热力学(电位值)和电极反应动力学必须符合要求外, 化学步骤(1a)必须有较大的速率常数, 但目前这方面的数据仍很有限. 本工作用光谱方法测得的反应(2a)的动力学数据与反应(1a)的理应一致, 可供参考. 利用金属卟啉作为 NADH 氧化的催化剂是仿生催化研究的一部分, 有关的工作将继续进行.

References

- 1 L. Gorton, *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1*, **1986**, 82, 1245.
- 2 P. N. Bartlett, P. Tebbutt, R. G. Whitaker, *Progress in Reaction Kinetics*, **1991**, 16, 55.
- 3 S. Yabuki, H. Shinohara, Y. Ikariyama, M. Aizawa, *J. Electroanal. Chem.*, **1990**, 277, 179.
- 4 WU Hui - Huang, YI Liang - Dong, ZHOU Shao - Min, *Acta Chimica Sinica*, **1990**, 48, 33 (in Chinese).
- 5 L. Gorton, G. Bremle, E. Csoregi, G. Jonsson - Pettersson, B. Persson, *Anal. Chim. Acta*, **1991**, 249, 43.
- 6 G. Dryhurst, K. M. Kadish, F. Scheller, R. Renneberg (Eds), "*Biological Electrochemistry*", Academic Press, New York, **1982**.
- 7 WU Bao - Zhang, LI Zhi - Xian, *Journal of Xiamen University* (Natural Science Edition), **1987**, 26, 468 (in Chinese).
- 8 H. U. Gergneyer, "*Methods of Enzyme Analysis*", Vol. 1, Weinheim, Florida, **1983**, p. 285.
- 9 A. L. Lehninger, *Biochemistry*, 2nd Edn., Worth, New York, **1981**, p. 81.
- 10 YANG Chang - Tong, WU Bao - Zhang, WU Hui - Huang, *Journal of Xiamen University* (Natural Science Edition), **1998**, 37, 865.
- 11 P. Sevcik, B. Dunford, *International J. Chem. Kinetics*, **1995**, 27, 925.

Catalytic Oxidation of Reduced Coenzyme NADH by Metalloporphyrins MTPPS

WU Bao-Zhang* YANG Chang-Tong WU Hui-Huang

(Department of Chemistry, State Key Laboratory of Physical Chemistry for Solid Surfaces, Xiamen, 361005)

Abstract The metalloporphyrins FeTPPS and MnTPPS [TPPS standing for *meso*-tetrakis (*p*-sulfonatophenyl) porphyrin], were used as the catalysts for NADH oxidation. The reaction kinetics in solution was measured by UV-vis spectroscopy. It was found that in neutral deoxygenated solution, the presence of FeTPPS or MnTPPS decreases the overpotential of NADH oxidation at a glassy carbon electrode, the processes are explained in terms of EC mechanism. In oxygen-saturated solution, MTPPS as an electron-transfer mediator accelerated NADH oxidation, and reduced MTPPS was regenerated via chemical oxidation by O₂. The rate constant for the oxidation of NADH by FeTPPS was measured as 3.3 mol⁻¹·L·s⁻¹, however, for MnTPPS the rate constant was about a half of that for FeTPPS. The prospects of using MTPPS as biomimetic catalysts for NADH oxidation are discussed.

Keywords metalloporphyrins, NADH oxidation, biomimetic catalysis, kinetic analysis

(Ed. SHEN Hong)