

化学模拟生物固氮

IX 铁钼辅基模型化合物的合成和性能表征*

许志文、林国栋、林硕田、颜翠竹、丁马太
林培三、韩国彬、张藩贤、许良树、蔡启瑞

(厦门大学固氮研究组)
(厦门大学物理化学研究所)

摘 要

采用乙二醇基阴离子作为活插头(可通过水解除去的双配位螯形配位体),对前文^[1]提出的合成方法作了重要改进,以期所合成的铁钼辅基模型化合物中 $\text{Mo}^{\text{IV(III)}}$ 第一配位界内两个不稳定的配位体处于相邻的位置,如厦门模型Ⅲ(或厦门模型Ⅱ)所要求。合成和重组活性评价结果,重组活性比使用乙腈等为活插头的提高2个数量级,化学催化活性和选择性接近于天然 FeMo-co 水平。

根据固氮酶各种底物的已知酶促反应和络合催化原理,提出的串联双座双活口双立方烷型原子簇结构的固氮酶活性中心模型 $[\text{S}^*\text{Fe}_3\text{S}_2^*(\text{L})]\text{Mo}[(\text{L}')\text{S}_2^*\text{Fe}_3\text{S}^*]$ (厦门模型Ⅱ)^[1],为铁钼辅基模型化合物的合成提供了依据。

一、铁钼辅基模型化合物合成方案的设计

双立方烷型原子簇结构化合物的合成和结构测定,见于Eisenhuth等^[2]1968年的报导。他们从 $\text{Zn}(\text{CH}_3)_2$ 出发,通过甲醇醇解,方便地获得了带有甲氧锌结构的双立方烷簇 $\text{Me}_6\text{Zn}_7(\text{OCH}_3)_8$ 。从配位化学的角度看,这种双立方烷型原子簇的形成,应与中央离子取八面体配位倾向的大小有密切的关系,也和适当的 μ_3 -型桥式配位体的存在以及六个角上的金属离子取四面体配位的倾向有关。 $\text{Mo}^{\text{IV(III)}}$ 形成八面体六配位的倾向比起 $\text{Zn}^{\text{II}}(d^{10})$ 要强得多;又从 Fe_4S_4^* 原子簇容易形成来看, S^* 是已知的 μ_3 -型配位体,

* 本文曾在全国化学模拟生物固氮协作组领导小组扩大会议(昆明,1980,8)上宣读。

$\text{Fe}^{\text{II(III)}}$ 也有取得四面体配位的倾向。所以, 如果选用适当的 μ_3 -型的活动配位体 LL' , 合成上述结构的模型化合物应是可能的。这一点前文^[3]已予指出。

根据所提出的模型, 我们设计了如下方案: 用 MoS_4^{2-} 与过量的 FeCl_2 或 FeCl_3 加适当的还原剂反应, 并使用适当的活动配位体, 以保护 $\text{Mo}^{\text{IV(III)}}$ 相邻的两个空配位, 然后加 NaHS (添加适当的碱) 进行补硫, 使反应系统的钼硫比达到 1 : 6。制备以氯为外配位体的并联双座双立方烷型铁钼辅基模型化合物 (氯化物系列)。再以柠檬酸盐或叔丁基硫醇进行外配位体交换, 分别制备柠檬酸盐系列或硫代系列的模型化合物。

从所提出的模型可见, 1 个 $\text{Mo}^{\text{IV(III)}}$ 是和 4 个 S^* (无机硫) 相结合的。文献也曾报告, MoFe -旦白经酸碱处理后, 会析出 MoS_4^{2-} 。所以选用 MoS_4^{2-} (钼盐或季铵盐) 作为起始原料之一。为了使得化学平衡能朝有利于一钼多铁原子簇络合物生成的方向进行, 我们认为过量的亚铁盐或铁盐的使用是必要的。对于这样的体系, 如果使用硫醇、硫酚等巯基化合物作还原剂, 则由于巯基对钼有很大的亲和力, 根据文献报导^[4], 得到的是桥联的双立方烷型原子簇化合物, 其中 $\text{Mo}^{\text{IV(III)}}$ 是配位饱和的, 因而基本丧失催化活性。因此, 我们选用金属氢化物 (如 KH 、 NaH) 或 KBH_4 , 而不用巯基化合物作还原剂。这时, 所形成的原子簇较之所提出的模型还缺两个 S^* , 因此必须补 S^* 。考虑到钼由六价还原到四价, 其配位数便由 4 增加到 6, 为了使所补加的 S^* 不致占领 $\text{Mo}^{\text{IV(III)}}$ 的这两个配位, 就要在补 S^* 之前, 选择一种恰当的活动配位体来加以保护, 并根据上述模型的要求, 使其处于相邻的位置。要求所选用的活动配位体对钼具有相当的络合能力, 而又能在以后的活性测定中通过还原加氢或水解、或底物分子的排代而方便地移去。最先我们^[3]采用的是 CH_3CN 或过量的 FeCl_2 , 以后选用了螯形的双配位体, 如乙二醇基阴离子。在上述甲氧钼双立方烷簇中, 已知甲氧基是很好的 μ_3 -型配位体。所以这种双烷氧基的配位体应有利于相邻两个活动配位的保护, 这是合成过程中的一个关键性改进。

二、实 验

关于使用乙腈作活动配位体的实验, 我们已作过详细介绍^[3]。下面只介绍使用乙二醇基阴离子作为活动配位体的一个典型例子。

在搅拌下, 将以下三种原料的混合物: 106mg $\text{NaOC}_2\text{H}_4\text{ONa}$ (1mM)、48mg NaH (2mM) 和 25ml K_2MoS_4 的 DMF 溶液 (内含 K_2MoS_4 1mM) 加入到 20ml FeCl_2 的 DMF 溶液 (内含 FeCl_2 10mM), 搅拌下反应 24 小时, 再加入 20ml NaHS 的 DMF 溶液 (内含 NaHS 2mM), 继续反应 24 小时, 得到一黑色的反应生成物混合液。这样的混合液经 DMF/乙醚重结晶分离, 得到棕黑色微晶或针状结晶样品。

采用Schrauzer等^[5]和 Brill 等^[6]所使用的方法和相同的测试条件, 在室温和 pH=9.6条件下, 测定所合成的模型化合物及各步反应中间产物对 KBH_4 还原乙炔为乙烯的催化活性和选择性, 以检验合成方案的每一步骤。产物分析使用国产 SP-2305 气相色谱仪。

重组实验中, UW45 突变种的生长条件、固氮酶合成的抑制、粗酶的制备、活化条件和鉴定均参照 Shah 等^[7]的方法。重组活化反应温度为 30°C , 反应时间为 20 分钟。还原乙炔为乙烯反应产物的分析同上。固氮成氨的产物 ($40\text{--}50\% \text{NH}_3$) 经 H_2SO_4 吸收后, 可用常规的 Nessler 定氨法测定, 并严格与三种空白实验对比。有关重组活性评价的实验, 详见我校固氮生化方面的报告^[8]。

三、结果与讨论

(一) 原子簇活性中心多核络合活化底物的初步判据^[9]

我们提出的关于固氮酶底物分子 $n\text{-RC}\equiv\text{CH}$ 、 $n\text{-RC}\equiv\text{N}$ 、 $n\text{-RN}\equiv\text{C}$ 、 $\text{C}\equiv\text{N}^-$ 和 $\text{N}\equiv\text{N}$ 的 $\mu_3(\eta^2)$ 型络合方式, 是从这些已知酶促反应的底物作为化学探针并根据络合催化原理推论出来的^[11]。乙炔的高选择性顺式还原加氢成乙烯是作为多核活化底物这一推论的一个出发点^[11]。由于乙炔底物分子中两对 π 键 (π_x, π_x^* ; π_y, π_y^*) 以双侧基加端基 [$\mu_3(\eta^2)$ 型] 络合在三核上, 在结合力方面要比乙烯 [只有一对 π 键 (π_x, π_x^*)] 对单核作单侧基络合强得多。因此乙炔还原加氢生成的乙烯配位体, 应是容易被未反应的乙炔分子从活性中心置换出来的, 从而防止进一步还原而生成乙烷。这样, 对于生成乙烯的选择性应当是高的。如果是单核的, 乙烯则以一对 π 键络合, 乙炔也基本上是以一对 π 键络合的, 这样, 络合能力相差就不很多, 乙炔置换乙烯配位体也就不是那么快了。乙炔按 $\mu_3(\eta^2)$ 型的络合, 也有利于 2 个 H 从同一侧按顺式加上去。因此对于生成顺式加成产物的选择性也应当是高的。上述论点后来从 Muetterties 等^[10] 的实验得到了有力的支持。他们发现原子簇络合物催化剂 $\text{L}_4\text{Ni}_4\text{L}_3$ ($\text{L} = t\text{-BuN}\equiv\text{C}$) 对于 $\text{RC}\equiv\text{CR}$ 炔键的顺式加氢为烯键, 具有很高的催化选择性。在反应中, $\text{L}_4\text{Ni}_4\text{L}_3$ 的三个桥连的异腈配位体之一被 $\text{R}-\text{C}\equiv\text{C}-\text{R}$ 所置换, 形成 $\text{RC}\equiv\text{CR}$ 的 $\mu_3(\eta^2)$ 型络合物。此外, 由于固氮酶底物分子在混合立方烷原子簇骨架中形成一种三桥式配位体, 电子容易从催化剂传递到底物分子, 这样就保证了高催化活性。

表一的实验数据支持了我们的这些看法。我们可以采用对 KBH_4 还原乙炔为乙烯的催化活性和选择性作为原子簇活性中心多核络合活化底物的一种判据, 对合成的每一步骤作初步检验, 并做以下的讨论。

表一、不同模拟体系的活性比较

模拟体系	加入量 nM Mo*	转变数 $\left[\frac{\text{nM C}_2\text{H}_2}{\text{nM Mo} \cdot \text{分}} \right]$	选择性 %	备注
MoO ₄ ²⁻ -CySH	1×10 ⁵	6.4×10 ⁻²	67	前文 ^[9]
	1×10 ⁴	0.18	53	
	1×10 ³	0.20	55	
MoO ₄ ²⁻ -胰岛素	6.0	23.4	68	文献[5]
	12	12	74	
MoS ₄ ²⁻	2.1×10 ²	1.2	89	前文 ^[9]
本 模 型 化 合 物	1220 C	1.3×10 ²	93	CH ₃ CN 为活动配位体 前文 ^[3]
	7012	1.3×10 ²	94	-OC ₂ H ₄ O ⁻ 为活动配位体
	7152	1.3×10 ²	96	
FeMo-co	11	25	98	文献[13]
	2.5	34		

* 反应瓶体积为25ml, 总反应溶液体积为3.5ml。

(二) 反应原料物中合适的钼、铁、硫配比

我们报导^[3]过, 在以CH₃CN为活动配位体的反应体系中, 不同钼、铁、硫配比的情况。在这种体系中, 当铁钼比小于6时, 活性较差。在未经柠檬酸盐交换前, 过量的铁似乎也导致活性的略为下降。但采用乙二醇基阴离子作活动配位体之后, 这种情况下活性也有所提高。而且发现, 要获得高的活性和选择性, 钼铁比应在1:10左右。

Coucouvanis等^[11]最近报导, 钼铁硫原子簇(ϕ_4P)₂[Cl₂Fe(S*)₂Mo(S*)₂FeCl₂]有解离出FeCl₂的倾向。看来要形成一钼多铁的铁钼辅基模型化合物就更有必要采用过量的铁盐来有效地抑低这种解离倾向。此外, 过量铁对于防止钼钼之间通过硫桥缔合而形成双钼或多钼化合物, 看来也是必要的^[12]。

至于补硫的效果, 不管在CH₃CN还是-OC₂H₄O⁻作活动配位体的情况下, 都有助于活性和选择性的明显提高(表二)。很可能是S*补角之后, 双活口双立方烷的构型就相当稳定了, 这样, 在化学催化活性测试实验的水溶液里, 原子簇络合物解离脱铁的程度大大减小, 而能对底物作三核络合活化的钼铁硫原子簇浓度就较大。

值得指出的是, 我们以上关于钼铁硫比例的讨论以及粗结晶样品钼铁硫比例的初步分析结果, 都是和厦门模型Ⅲ相一致的。这可以看成是对XM-Ⅲ的实验支持。但由于目前的粗结晶样品纯度还有待于进一步提高, 单凭目前这钼铁硫比例的初步分析结果还不能完全排除XM-I(或其单体)结构的可能性。况且目前也尚未见报导能确凿说明

钼钼之间距离大于 XM-Ⅱ 所假设的距离 (3.3—3.5 Å) 的实验事实。

有趣的是本实验室洪满水等最近观察到, 一定比例的 FeCl_2 (或 FeSO_4) 和 MoS_2^{2-} 的简单混合, 也能得到较好的活性和选择性。一个可能的解析是一部分亚铁充当还原剂, 将电子传递给钼 (如通过硫桥), 同样导致能对底物分子作多核络合活化的一钼多铁 (如一钼四铁, 钼铁之间以硫桥联结) 原子簇的形成。但这种原子簇尚未见重组活性。

表二、补加NaHS 前后反应混合物活性比较

样品编号		1220 C	7152
补加NaHS前 (Mo : S* = 1 : 4)	转变数	8	16
	选择性	93	94
补加NaHS后 (Mo : S* = 1 : 6)	转变数	19	24
	选择性	93	96
备 注		CH_3CN 作活动配位体	$^-\text{OC}_2\text{H}_4\text{O}^-$ 作活动配位体

(三) 钼上相邻两个空配位的保护

比较了用某些底物 (如乙腈) 和用螯形配位体 (如乙二醇基阴离子) 对钼上两个空配位的保护效果。

乙腈本身是固氮酶的底物, 能以 μ_3 -键型络合, 在一定程度上保护 $\text{Mo}^{\text{IV(III)}}$ 上的两个配位不被 S^* 占据。在活性测定中, 又可被 $\text{HC}\equiv\text{CH}$ 等底物分子所排代或通过酶促还原加氢反应除掉。但其络合能力很弱, 所以这种保护作用有限。更大的缺点是这样的活动配位体不能保证双立方烷中 $\text{Mo}^{\text{IV(III)}}$ 的两个可利用配位处于相邻的位置, 可能更多是处于间位。这样, 虽然也能构成对底物作三核络合活化的构型, 使得化学催化活性、选择性都不错, 但由于这种构型和铁钼辅基不同, 粗结晶样品的重组活性很低 (表三 913c)。

表三、模型化合物的重组生物活性

样品编号	还原乙炔为乙烯 [nMC ₂ H ₂ /nMMo·分]	固氮成氨 [nMN ₂ /nMMo·分]	附 注
913 C	0.1		CH_3CN 为活动配位体
318 A	5.9(17.7)*		$^-\text{OC}_2\text{H}_4\text{O}^-$ 为活动配位体
7012S ₂	5.9, 6.8	1.8	
716c	(13.1, 18.3)* 28	7.1	

* 括号内数据为柠檬酸盐交换后的重组活性

乙二醇钠可通过它的两个烷氧基都络合到 $\text{Mo}^{\text{IV(III)}}$ 上,形成比较稳定的五元环,来保证两个空配位是在相邻的位置上。这样的络合,在活性测定中又可通过水解解络。如果所合成的原子簇是双立方烷型的,则其作用机理如厦门模型Ⅲ;而如果是单立方烷型的,则其作用机理如厦门模型Ⅰ。两者都应该导致较高的催化活性和较好的选择性。

实验表明,采用这样的螯形配位体,还原乙炔为乙烯的选择性达95—96% (生成物中也有少量 C_4 组分)。而且在与UW45重组后,酶变数提高百倍以上。从表三可见,一般为6左右(柠檬酸盐交换后还会有明显提高,见下一点讨论),个别样品曾达到28 [$\text{nMC}_2\text{H}_2/\text{nM Mo}\cdot\text{分}$]。最近,我们用其中两个样品(7012S₂和716e),测定它们还原 N_2 为 NH_3 的催化活性,酶变数分别达到1.8和7.1 [$\text{nMN}_2/\text{nM Mo}\cdot\text{分}$]。数次实验都能很好地重复,约为这些样品还原乙炔为乙烯酶变数的1/4(见表三)。这与固氮酶对 N_2 和对 C_2H_2 还原酶变数的比例相符合。并且,样品经氧化后,对 C_2H_2 还原的酶变数为0时,对 N_2 还原的酶变数也同时为0。

(四) 外配位体的交换

我们曾报导^[3],以乙腈为活动配位体时,氯化物系列用柠檬酸盐进行外配位基置换后,能显著地提高其催化活性。实验还表明,采用乙二醇基螯形配位体时,以氯为外配位体的模型化合物,已经具有一定的重组活性。但在用柠檬酸盐处理后,重组生物活性有显著提高。如样品318A的酶变数由5.9提高到17.7;样品7012S₂由6左右提高到13—18(见表三)。可能是在中性的溶液中,这种乙二醇基螯形配位体更容易水解的缘故。

(五) 其它

电化学方面实验(由许书楷等测试)表明,所合成的模型化合物还具有还原乙炔为乙烯的电催化能力,选择性也在95%左右。顺磁共振实验(由许金来等测试)也有一些初步的结果(用Microspin-ESR 3型波谱仪在X波段、77°K液氮温度下测定,因液氮冷却循环装置尚未建立)。这些工作以及电子光谱和拉曼光谱表征都正在电化组、波谱组和光谱组进行,将另行报导。

参 考 文 献

- [1] a, K. R. Tsai, *Proceeding of The 3rd International Symposium on Nitrogen Fixation*, 1978.
b, 蔡启瑞等, 厦门大学学报(自然科学版), 1979, 2, 30.
c, K. R. Tsai, in *Nitrogen Fixation, 1, Free-Living Systems and Chemical Models* (W. E. Newton and W. H. Orme-Johnson, Eds.), P.373. University Park Press, Baltimore, 1980.
- [2] Eisenhuth, W. H., *et al.*, *J. Amer. Chem. Soc.*, **90**(1968), 5397.
- [3] 许志文等, 厦门大学学报(自然科学版), 1980, 2, 41.

- [4] Holm, R. H., et al., *J. Amer. Chem. Soc.*, **101**(1979), 4140.
[5] Schranzer, G. N., et al., *Ibid.*, **101**(1979), 917.
[6] Brill, W. J., et al., *B. B. R. C.*, **81**(1978), 232.
[7] Shah, V. K., et al., *Biochem. Biophys. Acta*, **256**(1972), 498; **292**(1973), 246.
[8] 曾定等, 本刊, 本期, 第78页。
[9] 张藩贤等, 厦门大学学报(自然科学报), 1980, 2, 50。
[10] Muetterties, E. L., et al., *J. Amer. Chem. Soc.* **99**(1977), 743.
[11] Coucouvanis, D., et al., *J. C. S. Chem. Comm.* **101**(1979), 361.
[12] a, Holm, R. H., et al., *J. Amer. Chem. Soc.* **100**(1978), 4630.
b, Holm R. H., et al., *Ibid.*, **101**(1979), 4140.
c, George Christou, *JCS. Chem. Comm.*, 1979, 91.
[13] McKenna, C. E., et al., in *Molybdenum Chemistry of Biological Significance*, (W. E. Newton and S. Otsuka, Eds.), P.39. Plenum Press, 1980.

Chemical Modeling of Biological Nitrogen Fixation

IX Synthesis and Characterization of FeMo-co Modeling Compounds.

Xu Zhiwen, Lin Guodong, Lin Shuotian, Yan Chizhu, Ding Matai,
Lin Peisan, Han Guobin, Zhang Panxian, Xu Liangshu, Tsai, K.R.

Nitrogen Fixation Research Unit, Xiamen University
Institute of Physical Chemistry, Xiamen University

Abstract

A significant improvement has been made to the method previously proposed^[3] for synthesizing FeMo-co modeling compounds. With the use of ethylene glycolate anion as labilizable blocking agent(hydrolyzable bidentate chelating ligand)to protect two neighboring coordination sites in the first coordination sphere of Mo^{IV(OH)} of the synthesized FeMo-co modeling compound, an increase in reconstituted-nitrogenase activity of 2 orders of magnitude of the sample synthesized (as compared with the use of acetonitrile or other monodentate ligands as blocking agents) has been obtained. Catalytic activity and selectivity assays as well as preliminary characterization by EPR method have also been made.