

大环多胺金属模拟酶催化水解梭曼机理研究

郭楠¹, 陈世稻², 刘景全¹, 史瑞雪¹, 钟近艺^{1*}

(1. 防化研究院, 北京 102205; 2. 北京理工大学, 北京 100081)

摘要: 为解决生物酶在战场应用环境中易失活且环境耐受性差的问题, 我们合成了大环多胺双锌模拟酶配合物-2,6-双{[双(2-羟乙基)氨基]甲基}-4-甲基酚(ZnL2). ZnL2对GD(Soman, 梭曼)具有较高的催化活性, 能够实现多次催化循环, 并且在ZnL2与GD化学计量比为(0.56:1)的条件下水解率为100%. 使用高效液相色谱-质谱与核磁共振确定催化产物为甲氟膦酸酯、甲氟膦酸、甲基膦酸频哪酯与甲基膦酸, 说明ZnL2水解GD为双平行反应, 反应途径分别为GD的P—F与P—O键的断裂. 建立在实验的基础上, 使用密度泛函理论(DFT)的B3LYP方法, 从P—O与P—F键断裂这两个平行反应方向对催化过程进行计算. 计算结果表明: ZnL2上O_i末端醇盐作为一个碱试剂去激活水分子, 使其成为羟基并作为亲核试剂进攻中心磷原子, 形成一个五配位的磷酰中间体, 通过进一步亲核进攻水解中间体形成最终P—O与P—F键断裂产物. ZnL2催化GD水解的活化能为分别为5.6 kcal/mol(P—F键断裂)和11.5 kcal/mol(P—O键断裂), 说明P—O键断裂过程是GD酶促水解反应的速控步骤.

关键词: 大环多胺金属模拟酶; 催化水解; 梭曼; 密度泛函理论; 亲核进攻

中图分类号: O643.3

文献标志码: A

神经性毒剂通过磷酰化乙酰胆碱酯酶活性位点上的丝氨酸使其失去对乙酰胆碱酯的酶活性, 因此是化学战剂中致死性最强的一种毒剂^[1], 制备能够高效洗消神经性毒剂的催化剂一直是各国军方探究的重点. 近年来, 国内外学者开始致力研究绿色环保型神经性毒剂洗消剂^[2-5], 以期能够在高效洗消的同时对环境无损. 其中, 生物酶洗消剂因其绿色、温和与高效的特性而倍受关注^[6-7]. 酶基洗消剂虽然对神经性毒剂能够高效洗消, 但仍存在生物酶易受温度、pH值、溶剂、离子强度甚至湿度的影响而失活的问题. 为了在环境复杂的战场条件下, 保持生物酶洗消剂高催化活性的同时提高其环境耐受性, 国内外学者^[8-11]从上个世纪70年代开始, 就开始研究人工模拟酶消毒剂, 以期能够以其稳定、不易失活、制备方便和成本低廉等优势, 在战场上取代生物酶产品而成为新一代的仿生洗消药剂. 虽然人工合成模拟酶消毒材料是模拟天然酶的活性中心与作用机制设计与合成的, 但是它的催化活性与天然酶相比还存在差距. 目前所报道的用于军用毒

剂的模拟酶有聚乙撑亚胺衍生物模拟酶^[8], 改性聚乙撑亚胺金属胶束模拟酶^[9], 长链烷烃联氨配合物铜离子胶束模拟酶^[11], β -环糊精单取代派生物等^[12]. 聚乙撑亚胺类模拟酶^[8-9]只能对初始浓度0.008 8 mg/mL的VX(维埃克斯)与0.012 6 mg/mL的GD(Soman, 梭曼)具有较高的催化效率($\geq 99.9\%$), 当提高底物浓度后, 对0.18 mg/mL的GB(Sarin, 沙林)的半衰期最高仅为37.7 min, 对0.22 mg/mL的GD的半衰期最高仅为64.5 min, 其他模拟酶也只对初始浓度较低的军用毒剂有降解效率, 难以满足军用毒剂的降解需求(30 min内对初始浓度10 mg/mL的底物降解率需 $\geq 99.5\%$). 分析其原因, 现有的模拟酶大都以长链烷烃和环状 β -环糊精为主要结构, 更偏重于模拟酶的疏水性, 弱化了亲核进攻基团与金属协同的作用, 作用机制也与磷酸三酯酶(Phosphotriesterase, PTE)对GD的第一步“碱性亲核试剂”(Base Nucleophile)机理^[13-15](见图1)并不相同, 而且无法实现第二步的“亲核试剂”(Nucleophile)水解(见图2).

收稿日期: 2015-10-05; 修回日期: 2015-10-30.

基金项目: 资助项目: 国家自然科学基金(21373027) (Financially supported by the National Natural Science Foundation of China (21373027)).

作者简介: 郭楠(1981-), 女, 博士生, 主要从事军用毒剂洗消技术方面的研究工作(Guo Nan(1981-), female, doctoral student, study on technology of decontamination).

* 通讯联系人, E-mail: Linfzjy@163.com; Tel: +86-10-66758450.

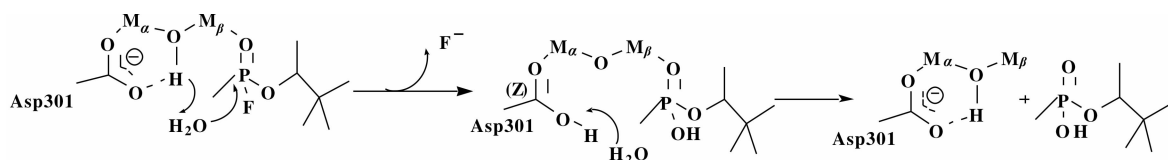


图 1 PTE 水解 GD 的“碱性亲核试剂”机理

Fig. 1 Base nucleophile mechanism of GD hydrolyzed by PTE

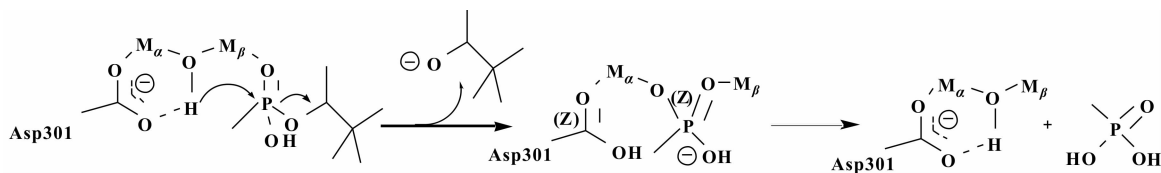


图 2 PTE 水解 GD 的“亲核试剂”机理

Fig. 2 Nucleophile mechanism of GD hydrolyzed by PTE

我们通过剖析磷酸三酯酶的活性中心结构与反应机理,在国内外首次提出使用与磷酸三酯酶活性中心结构相近、作用机制相同的大环多胺金属模拟酶作为神经性毒剂水解酶的模型,研究了对神经性毒剂 VX 的催化活性与反应机理^[16]。随后,我们又使用活性较高的大环多胺双核金属模拟酶模板 ZnL1 对 GB 进行了水解效率与机理分析,提出在配合物 ZnL1 中引入比吡啶基团碱性更强的醇盐,以减小 ZnL1 的正电荷,增加末端醇盐碱性的设计思路,并最终获得对 GB 具有更高催化活性的模拟酶配合物 ZnL2^[17]。

为验证模拟酶配合物 ZnL2 的高催化活性与广谱性,探索其对 GD 的催化反应机理,我们将 ZnL2 应用于催化水解结构更加复杂的神经性毒剂 GD,采用量化计算方法,结合实验数据,进一步探索了 ZnL2 对 GD 的催化活性与机理,为神经性毒剂水解模拟酶的制备与应用提供技术支持。

1 实验部分

1.1 实验仪器与试剂

2,6-双(氯甲基)-对甲基酚(实验室合成,纯度 $\geq 95\%$); 2-吡啶甲醛(Acros, 纯度 $\geq 99\%$); 甲醇(Sigma-Aldrich, 纯度 $\geq 99.9\%$); 乙醇胺(Acros, 纯度 $\geq 99\%$); 硼氢化钠(Acros, 纯度 $\geq 99\%$); 四氢呋喃(Sigma-Aldrich, 纯度 $\geq 99.9\%$); 二水合乙酸锌(西陇化工股份有限公司, 纯度 $\geq 99\%$); 二乙醇胺(西陇化工股份有限公司, 纯度 $\geq 99\%$); 三乙醇胺(Acros, 纯度 $\geq 99\%$); 六氟磷酸钾(Acros, 纯度

$\geq 99\%$); HEPES(Sigma-Aldrich, 纯度 $\geq 99.5\%$); GD(纯度 $\geq 99\%$); 所有溶液均用去离子水配制。

核磁共振波谱仪(NMR)(Varian 600MHz NMR, 防化研究院), AutoXBB 探头, 美国 Agilent 公司, ^1H 共振频率为 599.8 MHz, ^{31}P 共振频率为 240.0 MHz. Angilent 6520 HPLC-MS/MSQ-TOF 高效液相色谱-四级杆飞行时间串联质谱仪. 液相色谱条件: Angilent 1200 系列高效液相色谱仪, ZORBAX SB-C18 柱(150 mm $\times$ 2.1 mm, 粒径 1.8 μm), 柱温 25 $^\circ\text{C}$, 进样量 20 μL , 流速 0.25 mL/min, 流动相: A 为甲醇, B 为 0.1% 甲醇-水溶液. 梯度洗脱: 0 ~ 3 min, A : B 为 5 : 95; 3 ~ 9 min, A : B 为 50 : 50; 9 ~ 14 min, A 为 100%; 14 ~ 21 min, A : B 为 5 : 95. 质谱条件: Angilent G6520 MSQ-TOF 质谱仪, 电喷雾离子源(ESI), 负离子电离模式(GD). 扫描范围质荷比 50 ~ 1000 质量数, 干燥气温度 350 $^\circ\text{C}$, 流速 8 L/min, 雾化器压力 30 psi, Vcap: 3 200 V.

1.2 神经性毒剂水解模拟酶的合成与表征

配合物 ZnL2(图 3)的合成、表征方法与结果见文献[17]。

1.3 量化计算方法

所有的计算都使用 DFT 理论中的 B3LYP 泛函方法^[18-20], 在 Gaussian 09 软件包^[21]下运行, 使用 Gaussian 软件优化初始反应结构和反应过渡态结构, 获取相应能量, 通过机理的确定得到结构改造的方法. 在几何结构的优化中, C、H、O、N 和 F 元素使用 6-31G(d, p)基组, P 使用 6-311+G(2d)基组, Zn 使用 SDD 赝势基组^[22], 既考虑了重原子相

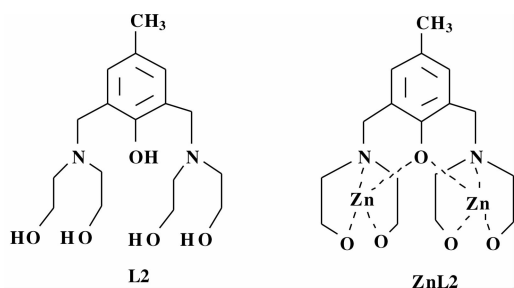


图3 配合物 L2 与 ZnL2 结构

Fig. 3 Structure of ligand L2 and complex ZnL2

Ligand abbreviations: L2 = 2, 6-bis[bis(2-hydroxyethyl) amino] methyl]-4-methylphenol

对论效应又考虑到计算资源的节省. 基于这些优化好的结构, 更精确的能量通过对所有元素使用更大的 6-311+G(2d, 2p) 基组的单点计算获得. 溶剂化效应通过对优化好的结构运行连续极化模式 (CPCM) 单点计算^[22-25] 获得. 介电常数(ϵ) 设为 80. 在与构型优化一样的理论水平上, 针对优化好的结构, 运行频率计算来获得零点的能量(ZPE), 并确定驻点本质. 必须指出, DFT 理论中范德华效应的缺失, 将导致彼此的原子之间过大的排斥作用, 特别是对于较大的基团或配体^[26]. 因此, 在研究中, 将使用 Grimme 发展的经验公式^[27] 进行色散力校正. 分子结构优化和能量单点计算都运用了色散力校正. 如果没有特别说明, 文中的能量计算都进行了 ZPE、溶剂化效应和色散力校正.

1.4 催化反应实验与机理分析

催化循环实验: 每 1 mL 模拟酶洗消液中包含 0.146 mmol 催化剂, GD 加入量为 0.063 mol (10 mg), 反应温度为 298 K, 使用核磁³¹P {¹H} 在线监测 GD 浓度随时间的变化. 每隔 30 min 在反应体系中加入 0.063 mol 的 GD, 通过观察反应产物分析反应机理.

机理分析: 使用核磁³¹P {¹H} 谱检测 GD 不同时间段的水解产物, 使用二维氢磷相关核磁检测与磷核相耦合的烷基或烷基酯基团结构信息^[28], 使用高效液相色谱-四级杆飞行时间串联质谱仪检测终产物组成.

2 结果与讨论

2.1 催化循环反应结果

使用 ZnL2 对 GD 进行催化循环, 每隔 30 min 在含有 0.146 mol/L ZnL2 的反应体系中加入 0.063

mol/L 的 GD, 通过 GD 浓度随时间的变化确定 ZnL2 对 GD 的催化活性(图 4).

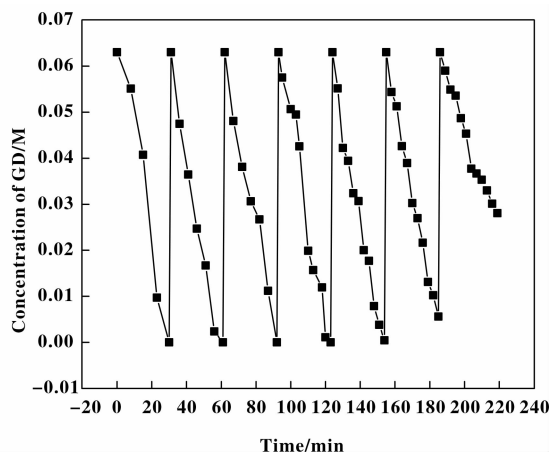


图4 ZnL2 催化循环水解 GD 的浓度曲线

Fig. 4 The plots of concentration of GD vs time in the GD cyclic catalyzed by ZnL2

从图 4 可以看出, ZnL2 对 GD 具有较高的催化循环活性, 在 123 min 前, 能够对初始浓度为 0.063 mol/L 的 GD 实现 4 次 100% 水解的催化循环, 123 min 后, 第 5 次循环水解率为 98.8%, 第 6 次催化循环水解率为 91.1%, 第 7 次为 55.5%. 可见 ZnL2 对 GD 的催化能力(0.56 : 1) 远小于化学计量比, 是一个能够高效水解且催化循环 GD 的模拟酶催化剂. ZnL2 作为神经性毒剂水解模拟酶, 对高初始浓度的 GD(0.063 mol/L) 能够实现高效水解和催化循环, 目前报道的模拟酶对 GD 的水解初始浓度最高仅为 1.18×10^{-3} mol/L^[8], 还未见能够对神经性毒剂实现高效催化循环的模拟酶催化剂的相关报道. 为了进一步了解 ZnL2 对 GD 的催化循环机理, 我们使用核磁与高效液相色谱-质谱仪进一步分析产物.

2.2 ZnL2 对 GD 的催化水解产物与机理

使用核磁监测 GD 反应过程中目标物与产物的变化情况, 由于³¹P {¹H} 丧失了耦合关系, 只能通过化学位移提供大致的结构信息, 加上化学位移对周围化学环境非常敏感, 若对化合物进行准确指认, 还需要合成标准化合物进行比对, 而二维氢磷相关核磁共振检测能够提供与磷核相耦合的烷基或烷基酯基团结构信息^[28], 且检测限比³¹P {¹H} 低, 是较为准确化合物结构与组成的判定方法. 因此, 为了准确监测消毒反应过程中的产物形成与变化规律, 将 ZnL2 对 GD 的反应过程进行磷谱采集的同

时又进行了二维氢磷相关分析. 在反应刚开始时(图 5), 反应产物中出现了少量的甲氟磷酸(化学位移 26.05 与 30.05 ppm)与大量的甲基磷酸频哪酯(化学位移 24.7 ppm), 磷谱上化学位移为 24.7

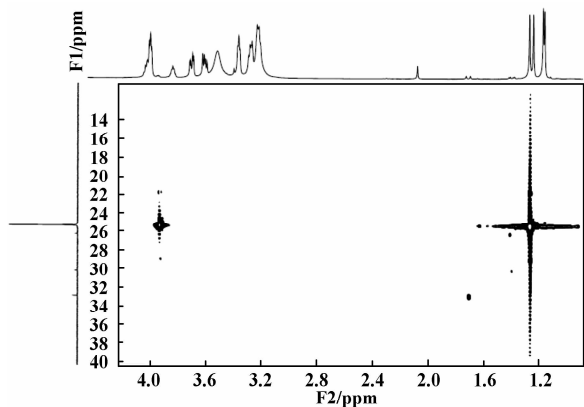


图 5 ZnL2 催化水解 GD 的核磁 ^1H - ^{31}P 相关图谱

Fig. 5 ^1H - ^{31}P HMQC spectrum

ppm 的谱峰与氢谱上的化学位移为 1.28 ppm 的谱峰相关, 确认为甲基磷酸频哪酯. 磷谱化学位移为 26.05 与 30.05 ppm 的谱峰与氢谱 1.4 ppm 相关, 确认为甲氟磷酸. 由此 ZnL2 对 GD 的主要水解产物为甲基磷酸频哪酯, 说明在反应过程中, 主要朝着 P—F 键断裂的方向进行, 并产生了一个中间产物甲氟磷酸. 为此, 我们通过催化循环的核磁图进一步剖析反应机理.

反应 80 min 时, 出现了少量的甲氟磷酸酯(化学位移 32.889 ppm)与大量的甲氟磷酸和甲基磷酸频哪酯(见图 6), 说明当体系中 F 浓度达到一定比

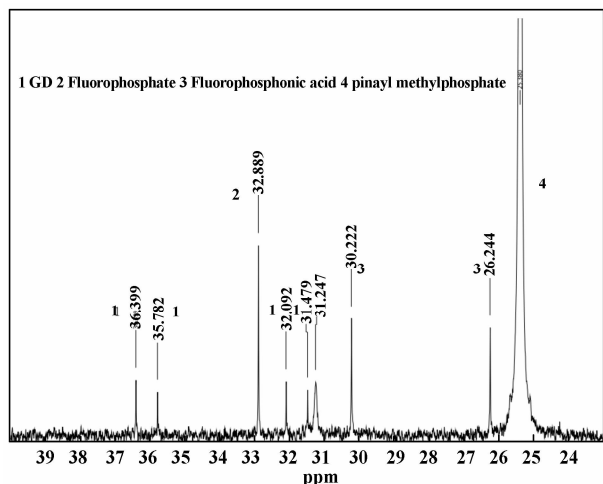


图 6 ZnL2 催化水解 GD 80 min 的核磁共振图

Fig. 6 NMR spectrum recorded of the ZnL2-catalyzed hydrolysis of GD for 80 min

例, P—F 键的反应开始放缓, P—O 键的反应仍继续进行, 因此产物甲氟磷酸酯与甲氟磷酸的比例增加. 随着反应继续进行, 甲氟磷酸酯消失, 反应产物中只含有甲氟磷酸与甲基磷酸频哪酯(图 7), 说明甲氟磷酸中的 O—R 键比 P—F 键更易断裂并生成中间产物甲氟磷酸.

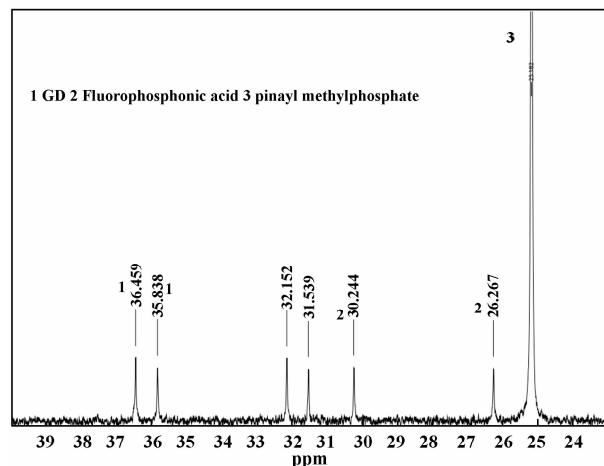


图 7 ZnL2 催化水解 GD 110 min 的核磁共振图

Fig. 7 NMR spectrum recorded of the ZnL2-catalyzed hydrolysis of GD for 110 min

当反应完成, 体系中的甲氟磷酸消失(图 8), 甲基磷酸频哪酯减少, 产物中开始出现甲基磷酸并逐渐增多, 可见大部分的甲氟磷酸已经转化为甲基磷酸, 但是甲基磷酸频哪酯并未完全转化, 可见甲氟磷酸中的 P—F 键较甲基磷酸频哪酯中的 P—O 键更易断裂.

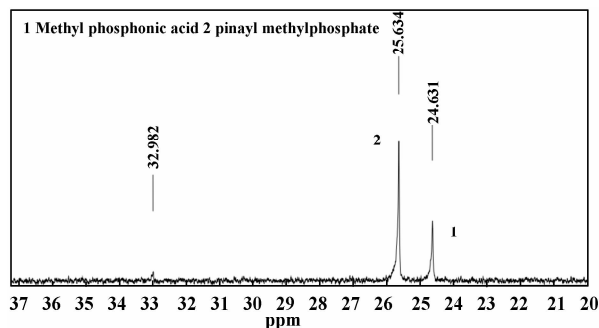


图 8 ZnL2 催化水解 GD 酶促终产物核磁共振图

Fig. 8 NMR spectrum recorded of final products of the GD catalyzed hydrolysis by ZnL2

使用高效液相色谱-质谱仪分析 GD 水解最终产物组成, 进一步确定核磁的检测结果, 见图 9.

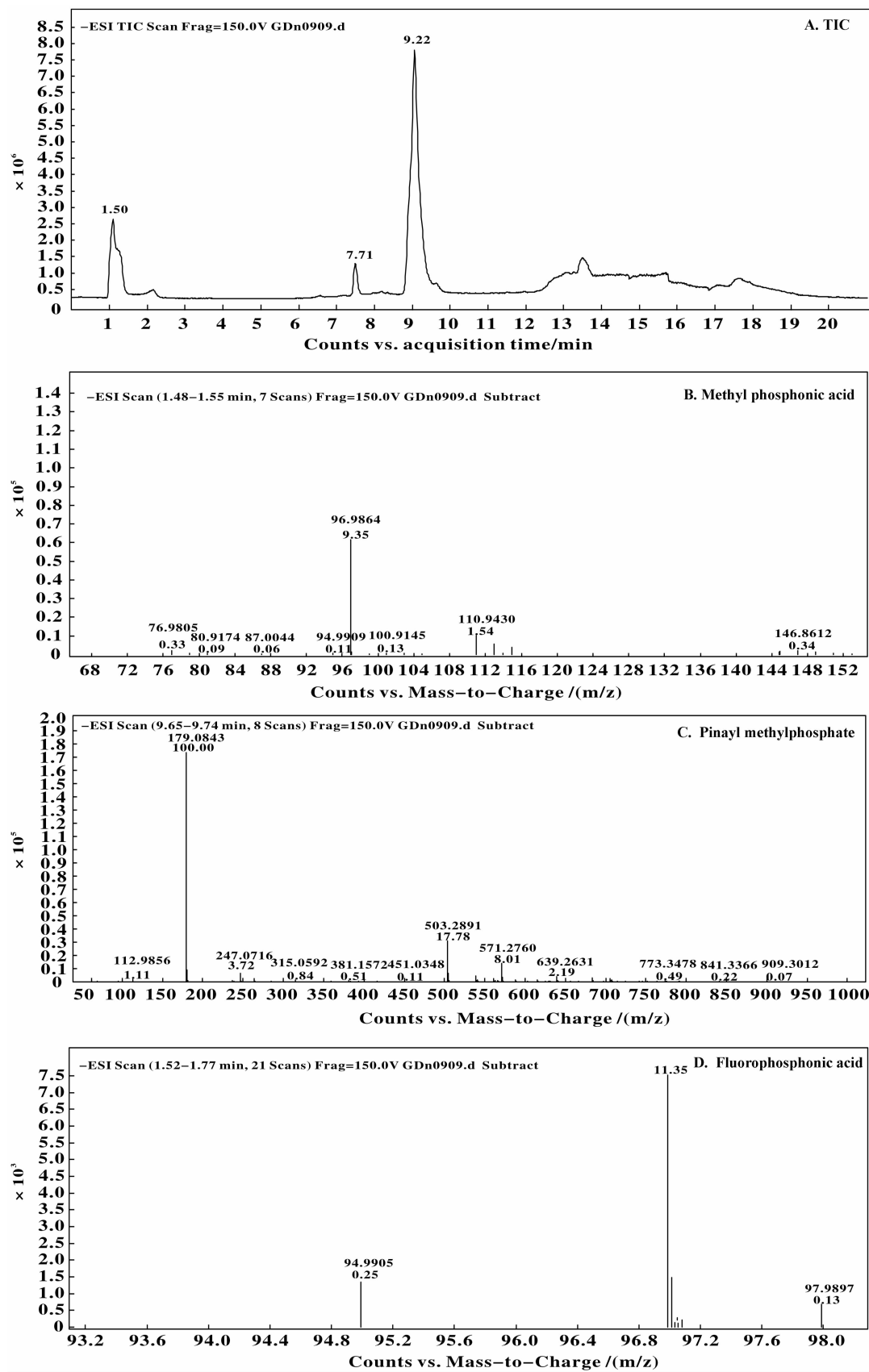


图 9 ZnL2 催化水解 GD 的产物高效液相-气相质谱图

Fig. 9 HPLC-MS spectrum of products in GD hydrolysis catalyzed by ZnL2

由液相色谱-质谱分析结果可见, ZnL2 催化水解 GD 过程中, 产生的主要产物为: 甲基膦酸(图 9. B, 在负离子响应模式下, 质荷比 94.990 4 m/z, 实测质荷比 94.990 7 m/z), 甲基膦酸频哪基酯(图 9. C, 保留时间为 9.4 min, 质谱图含有质荷比 94.990 4 m/z 的碎片, 在负离子响应模式下, 准分子离子峰为 179.084 3 m/z, 实测质荷比 179.084 0 m/z, 因为在电喷雾离子源模式下, 甲基膦酸频哪基酯的频哪基非常容易脱落, 产生质荷比 94.990 4 m/z 的特征碎片, 可根据此特征碎片判定为甲基膦酸频哪基酯)与甲氟膦酸(图 9. D, 在负离子响

应模式下, 质荷比 96.986 0 m/z, 实测质荷比 96.986 4 m/z), 进一步验证了核磁的分析结果. 由此可分析 ZnL2 催化水解 GD 的机理为(图 10): 在 ZnL2 进攻 GD 中心磷原子的过程中, P—F 键首先断裂, 随着产物甲基膦酸频哪基酯的大量生成, 反应速度降低, 反应开始朝着 P—O 键断裂的方向进行, 逐渐生成甲基膦酸频哪基酯与甲氟膦酸酯, 随着亲核进攻的进一步深入, 甲基膦酸频哪基酯中的 P—O 键断裂形成甲基膦酸. 而甲氟膦酸酯中的 P—F 键断裂生成甲氟膦酸酯, 随后 P—O 键断裂生成甲基膦酸.

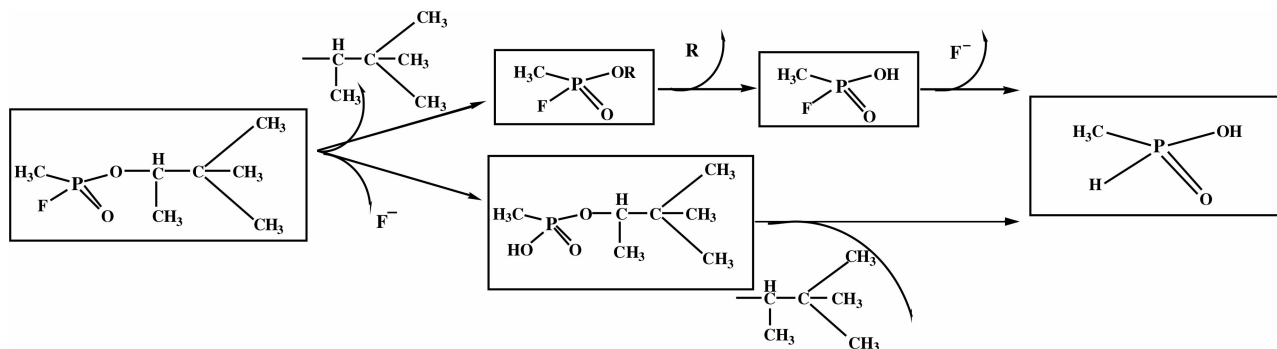


图 10 ZnL2 催化水解 GD 的产物及路径

Fig. 10 Products and mechanism of GD catalyzed hydrolysis by ZnL2

GD 的反应机理中, P—F 键断裂过程与 GB 中羟基自由基进攻 P 原子的方式基本相同, 不同的是 P—O 键的断裂. 分析原因, 是因为 GD 中 P—O 键上的烷基链的扩大, 导致空间位阻增强, 使得 GD 的烷基链比 GB 的烷基链更容易离去, 因此, 在反应过程中产生了 P—O 键断裂的产物. 而甲基膦酸频哪基酯并不能算真正意义上亲核进攻的最终产物, 只有 P—O 键与 P—F 键同时断裂, 产生甲基膦酸, 才意味着模拟酶对底物的亲核进攻过程真正完成.

从 GD 酶促水解机理分析可知, GD 的酶促反应是一个典型的平行反应, 在平行反应中, 当各产物的起始浓度为零时, 在任一瞬间, 各产物浓度之比等于速率系数之比, 因此活化能之比也与产物的浓度有关, 可根据活化能之比计算出各个产物浓度所占的比例, 也可以通过各个平行反应的活化能来计算平行反应速率之比. 但是在实际的 GD 酶促反应中, 无法控制平行反应的进行方向. 因此, 各个平行反应的活化能是无法通过实验获得的. 为此, 我们提出, 使用密度泛函理论(DFT)的 B3LYP 方法(包含 Grimme 范德华力校正)优化驻点结构, 并

计算驻点能量, 推测 GD 酶促反应的机理, 得到各个平行反应的活化能.

2.3 量化计算机理分析

在计算过程中, 从 P—O 与 P—F 键断裂这两个方向进行反应复合物结构(命名为 **React**)、中间体(命名为 **Int1**)、过渡态(命名为 **TS1** 和 **TS2**)与产物结构(命名为 **Prod**)的优化.

首先, 从 P—F 键断裂的反应方向, 我们优化得到了 ZnL2、GD 与各水分子结合的复合物(图 11), 其中 3 个水分子分别定义为 **Wat1**、**Wat2** 与 **Wat3**(图 11). 从图 11 可以看到, **Wat1** 水分子与 O_l 和 O_μ 形成两个氢键, 并与 GD 中心 P 原子保持在合理的距离上($P-O_w = 3.25 \text{ \AA}$). 从 **React** 开始, **Wat1** 对 P 原子亲核进攻的过渡态已经被优化出来, 并被频率分析确证为一级鞍点. 虚拟频率为 $63i \text{ cm}^{-1}$. 结果表明, 随着 P— O_w 键的形成, 一个 **Wat1** 中的质子被传递到 O_l 原子上, 形成一个五配位的磷酸中间体. 这清晰地表明, O_l 末端醇盐实质上作为一个碱试剂来激活 **Wat1**, 使后者成为一个羟基并最终作为亲核试剂. 在过渡态 **TS1** 和中间产

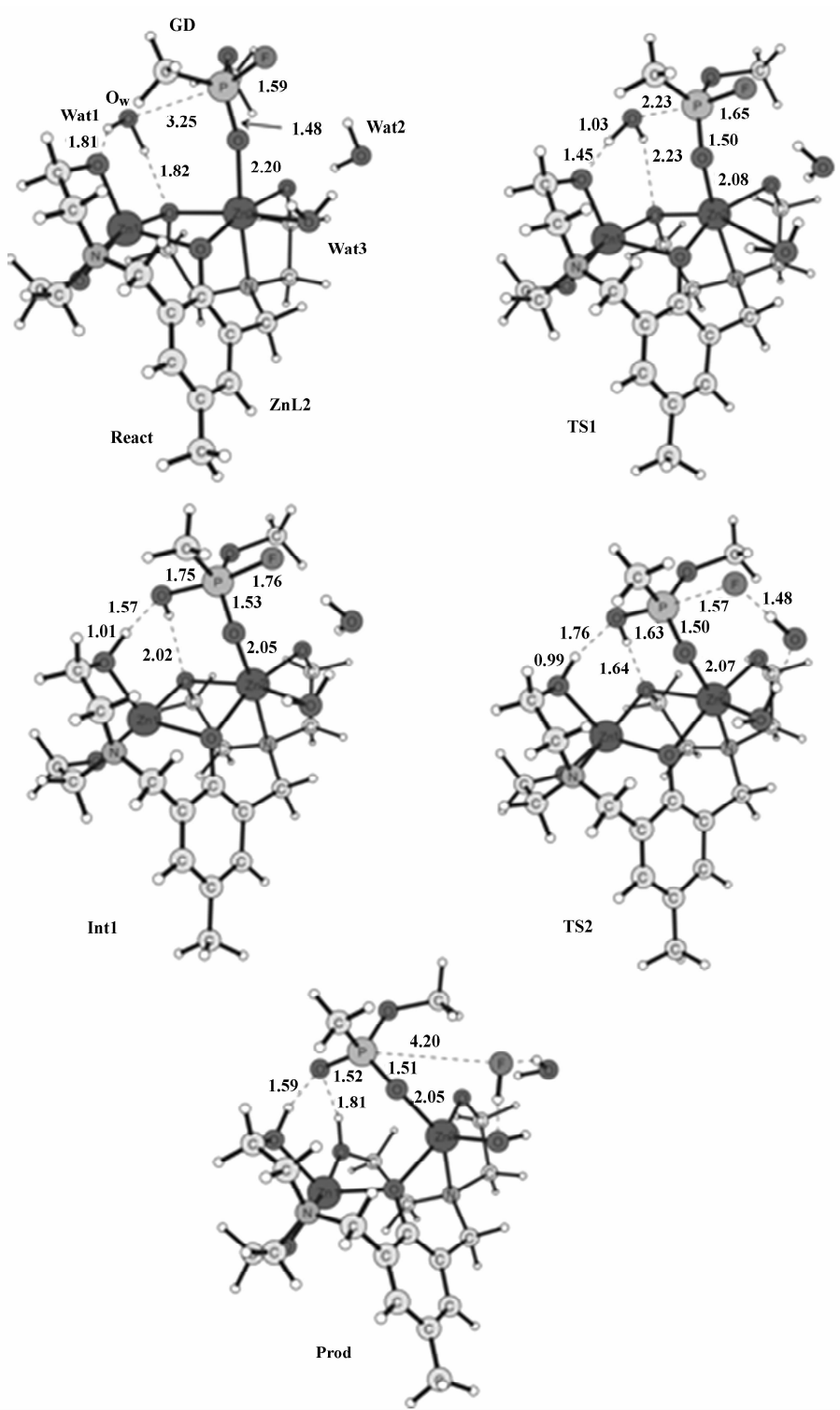


图 11 ZnL2 催化水解 GD 驻点优化结构(P—F 键断裂)

Fig. 11 Optimized structures of stationary points during the ZnL2-catalyzed hydrolysis of GD(cleavage of P-F bond)

物 **Int1** 中, P—O_w 距离分别为 2.23 和 1.75 Å. 随着 P—O_w 键的形成, P—O_p 双键从 1.48 Å 伸长到 1.53 Å, 表明 O_p 的负电荷增加了. 同时, O_p 与 Zn2 之间的距离从 React 的 2.2 Å 减小到 2.05 Å,

Zn2 离子通过稳定 O_p 原子的负电荷发挥了主要的催化作用. 这个反应步骤的能垒非常低(5.8 kcal/mol, 图 12), 说明这步亲核进攻过程是非常快速的. **Int1** 中间产物的能量比 React 高 2.8 kcal/mol.

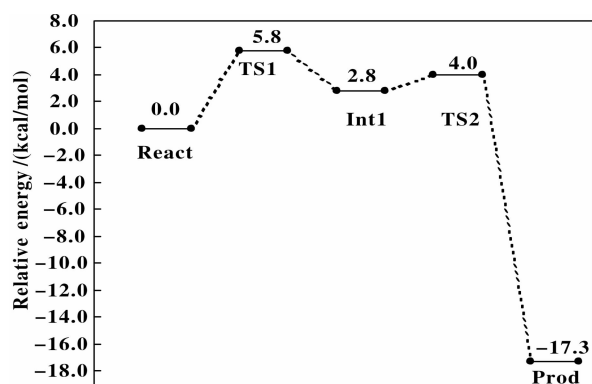


图 12 ZnL2 催化水解 GD 的势能面

Fig. 12 Potential energy surface for the ZnL2-catalyzed hydrolysis of GD

因为中心 P 原子在 **Int1** 中变成五配位, 所以原则上 P—F 键已经很容易断裂了, 因此 P—F 键断裂的过渡态被进一步优化处理, 计算出它的虚拟频率为 $87i \text{ cm}^{-1}$. **TS2** 是一个非常延迟的过渡态, 它的 P—F 间距为 $2.67 \text{ \AA}$. 随后的中间产物(即 **Prod**, 图 12) 比 **React** 低 17.1 kcal/mol . 第二步

P—F 键断裂的反应步骤的能垒同样很低(4.0 kcal/mol , 以 **React** 为参考), 甚至比 **TS1** 还要低. 这表明 **Wat1** 亲核进攻中心磷原子的第一阶段是决速步骤, 并且计算所得的 ZnL2 催化 GD 水解的综合活化能为 5.6 kcal/mol . 值得一提的是, 在计算过程中, 我们将介电常数从水的介电常数值(80)变换为表面活性剂 CTAB 的介电常数值(30)^[29], 并重新进行活化能的计算, 计算结果与原值仅相差 0.3 kcal/mol , 说明从计算的角度来说, 在 ZnL2 的水解体系中介电常数值的影响并不显著. 然而我们在实验中发现, 当 ZnL2 体系中的介质从水变换为 CTAB 胶束溶剂的时候, 反应速率增加了 3.9 倍, 活化能减小了 3.15 kcal/mol , 由此可见, 量化计算的精度仅限于不含表面活性剂的介质体系, 对于含有表面活性剂或者助溶剂的体系, 由于成分复杂, 需要加入助溶剂分子与底物的计算才能够达到较为精确的结果.

随后, 我们从 P—O 键断裂的角度, 优化了 ZnL2 与 GD 底物及 3 个小分子形成的复合物(定义为 **React**, 见图 13). 从图中可见, **Wat1** 水分子

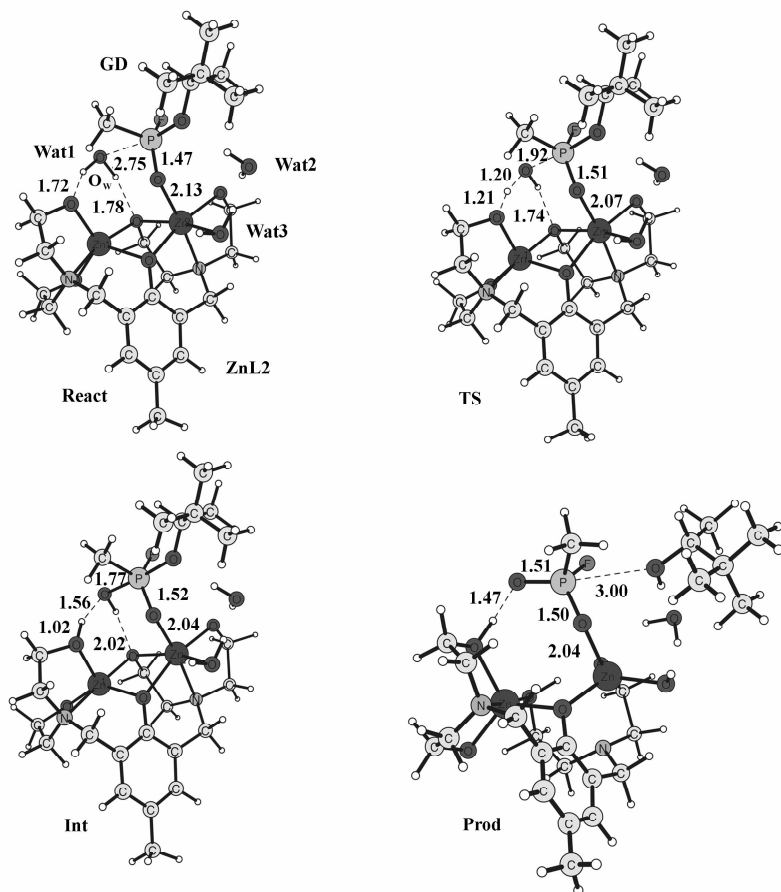


图 13 ZnL2 催化水解 GD 驻点优化结构(P—O 键断裂)

Fig. 13 Optimized structures of stationary points during the ZnL2-catalyzed hydrolysis of GD(cleavage of P—O bond)

分别与桥接醇盐(O_{μ})和端基醇盐(O_t)形成氢键。**Wat1**的氧原子(O_w)与底物磷原子之间的距离为2.75 Å。

从 **React** 开始, 我们优化得到了一个 **Wat1** 进攻底物磷原子的过渡态(即图 13 中的 **TS**)。频率分析计算证明, 该过渡态为一级鞍点, 具有一个 450 cm^{-1} 的虚拟频率。该虚拟频率的振动模式指出, 随着 $\text{P}-\text{O}_w$ 键的生成, **Wat1** 水分子中的一个质子迁移给了 O_t 氧原子, 生成了一个五配位的磷酰基中间体(即图 13 中的 **Int**)。这表明, O_t 端基醇盐担任了激活 **Wat1** 水分子的一个碱, 使得后者转变为一个亲核能力更强的氢氧根, 从而促进针对底物的亲核进攻的发生。随着 $\text{P}-\text{O}_w$ 键的生成, 磷酰基氧(O_p)到 P 的距离从 **React** 的 1.47 Å 拉长到 **Int** 中的 1.52 Å (**TS** 中的距离为 1.51 Å)。同时, O_p 到 Zn2 离子的距离从 **React** 的 2.13 Å 拉长到 **Int** 中的 2.04 Å (**TS** 中的距离为 2.07 Å)。这些结果表明, Zn2 离子通过稳定磷酰基氧上形成的负电荷, 发挥了主要的催化作用。这步反应的能垒很低, 只有 7.8 kcal/mol , 表明这是一步极为快速的过程。生成的 **Int** 中间体比反应物高 6.8 kcal/mol 。

随着五配位的中间体(**Int**)的生成, **Int** 中离去基团的 $\text{P}-\text{O}$ 键应该比较容易断裂, 并最终生成一个醇和一个四配位的磷酸酯产物。然而, 我们没能成功优化出相应的过渡态, 只优化得到了最终的产物(即图 13 中的 **Prod**)。该产物的能量比 **React** 低 23.9 kcal/mol (见图 14)。为估计该步反应的活化能, 扫描了 $\text{P}-\text{O}$ 键断裂的过程, 其中的能量最高点结构作为猜测的过渡态(即图 14 中的 **TS'**), 其能量为估计的 $\text{P}-\text{O}$ 键断裂活化能(11.5 kcal/mol)。这个能量值比 $\text{P}-\text{F}$ 键断裂的能量值要高

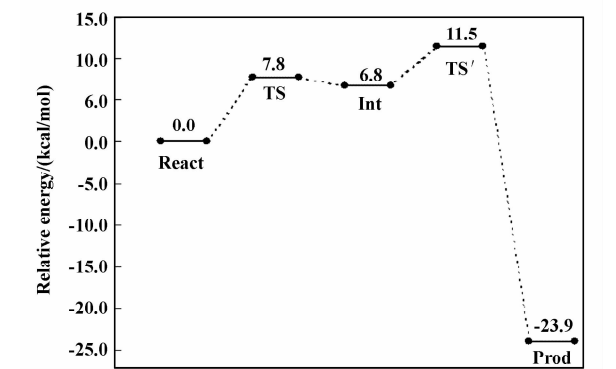


图 14 ZnL2 催化水解 GD 的势能面

Fig. 14 Potential energy surface for the ZnL2-catalyzed hydrolysis of GD

5.9 kcal/mol 。可见 $\text{P}-\text{O}$ 键断裂是 GD 酶促反应的速控步骤。根据活化能计算出各个平行反应速率, 见表 1。

表 1 ZnL2 对 GD 的酶促水解平行反应动力学参数

Table. 1 Kinetic parameters of parallel reaction in ZnL2-enzymatic hydrolysis of GD		
	Ea/(kcal/mol)	$k_{\text{cat}}/(\text{s}^{-1})$
P—F	5.6	4.9×10^8
P—O	11.5	2.3×10^4

表 1 的数据表明, $\text{P}-\text{F}$ 键和 $\text{P}-\text{O}$ 键断裂的反应速率都很高, 表明 ZnL2 能够快速催化 GD 的分解, 相对来说, $\text{P}-\text{F}$ 键断裂的反应速率比 $\text{P}-\text{O}$ 键断裂快了约 2 万倍, 因此 $\text{P}-\text{F}$ 键断裂的产物更多。

从量化计算结果可以看出, 在 ZnL2 催化水解 GD 的过程中, 催化剂只是起到了激活体系中的水分子成为亲核进攻试剂, 同时稳定质子的作用, 本身没有消耗, 因此能够实现多次高效催化循环。

3 结论

根据磷酸三酯酶活性中心的剖析结果, 设计并合成了大环多胺金属模拟酶配合物。我们将配合物 ZnL2 用于 GD 的催化水解, 实验结果表明 ZnL2 对 GD 具有很高的催化活性, 在 123 min 内, 就能够对初始浓度为 0.063 mol/L 的 GD 实现水解率为 100% 的 4 次催化循环。使用核磁共振的 $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ 谱、 $^1\text{H}-^{31}\text{P}$ 相关谱以及高效液相色谱-质谱在线监测 ZnL2 对 GD 的催化循环产物, 得出反应机理为: 反应初期, GD 的 $\text{P}-\text{F}$ 键断裂为主要反应方向, 随着 $\text{P}-\text{F}$ 键断裂产物的增加, 反应逐渐开始向着 $\text{P}-\text{O}$ 键断裂方向前进, 最后 $\text{P}-\text{F}$ 键与 $\text{P}-\text{O}$ 键反应中间产物进一步断键转化为甲基磷酸。使用 DFT 中的 B3LYP 方法, 从 $\text{P}-\text{O}$ 与 $\text{P}-\text{F}$ 键断裂这两个方向进行反应结构、中间体、过渡态与产物结构的优化, 计算结果表明: **Wat1** 水分子与 O_t 和 O_{μ} 形成两个氢键, 随着 $\text{P}-\text{O}_w$ 键的形成, 一个 **Wat1** 中的质子被传递到 O_t 原子上, 形成一个五配位的磷酰中间体, O_t 末端醇盐实质上作为一个碱试剂来激活 **Wat1**, 使后者成为一个羟基并最终作为亲核试剂。ZnL2 催化 GD 水解的综合活化能为分别为 5.6 kcal/mol ($\text{P}-\text{F}$ 键断裂) 和 11.5 kcal/mol ($\text{P}-\text{O}$ 键

断裂), 反应速率分别为 4.9×10^8 与 $2.3 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$, 证明 ZnL2 是一个对 GD 具有高催化水解活性且能多次催化循环的模拟酶催化剂。

参考文献:

- [1] Richardt A, Blum M, Danielsen S, *et al.* Decontamination of warfare agents, enzymatic methods for the removal of B/C weapons[M]. *German, Weinheim: Wiley-VCH*, 2008.
- [2] Prokop Z, Oplustil F, Defrank J, *et al.* Enzymes fight chemical weapons[J]. *Biotech J*, 2006, **1**(12): 1370–1380.
- [3] Amitai G, Adani R, Hershkowitz M. Degradation of VX and sulfur mustard by enzymatic haloperoxidation[J]. *J Appl Toxicol*, 2003, **23**(4): 225–233.
- [4] Komano A, Hirakawa T, Sato K, *et al.* Titanium dioxide photocatalytic decomposition of ethyl-S-dimethylaminoethyl methylphosphonothiolate(VX) in aqueous phase[J]. *Appl Catal B: Envir*, 2013, **134/135**(9): 19–25.
- [5] Wagner G W, Chen Q, Wu Y, *et al.* Reactions of VX, GD and HD with nanotubular titania[J]. *J Phys Chem*, 2008, **112**(31): 11901–11906.
- [6] Stehle R, Schulreich C, Wellert S, *et al.* An enzyme containing microemulsion based on skin friendly oil and surfactant as decontamination medium for organophosphates: Phase behavior, structure, and enzyme activity[J]. *J Coll Inter Sci*, 2014, **413**(1): 127–132.
- [7] Suthiwangcharoen, Nisaraporn, Nagarajan, *et al.* Enhancing enzyme stability by construction of polymer-enzyme conjugate micelles for decontamination of organophosphate agents[J]. *Biomacr*, 2014, **15**(4): 1142–1152.
- [8] Huang Qi-bing(黄启斌). Study on polymer artificial enzymes(高分子模拟酶的研究)[D]. *Beijing: Institution of Chemical Defence*(北京: 防化研究院), 1991.
- [9] Dai Qiu-yun(戴秋云). Study on artificial hydrolytic metalloenzymes(水解金属模拟酶研究)[D]. *Beijing: Institution of Chemical Defence*(北京: 防化研究院), 1993.
- [10] Breslow R, Overman L E. An “artificial enzyme” combining metal catalytic group and a hydrophobic binding cavity[J]. *J Am Chem Soc*, 1970, **92**(4): 1803–1814.
- [11] Hay R W, Govan N, E K. A metallomicelle catalyzed hydrolysis of a phosphate trimester, a phosphonate diester and O-isopropyl methylfluorophosphonate (Sarin) [J]. *Inorg Chem Commun*, 1998, **1**(6): 228–231.
- [12] Estour F, Letort S, Muller S, *et al.* Functionalized cyclodextrins bearing an alpha nucleophile-A promising way to degrade nerve agents [J]. *Chemico-Biolog Inter*, 2013, **203**(1): 202–207.
- [13] a. Jackson C, Kim H, Carr P D, *et al.* The Structure of an enzyme-product complex reveals the critical role of a terminal hydroxide nucleophile in the bacterial phosphotriesterase mechanism [J]. *Biochim et Biophys Acta*, 2005, **1752**(1): 56–64.
b. Xu Hong-mei(徐红梅), He Cong-lin(何从林), Xia Shi-wen(夏仕文). Racemization of L-tyrosine methyl ester and preparation of D-tyrosinevia alcalase2.4 L-catalyzed enantioselective hydrolysis(L-酪氨酸甲酯消旋及 Alcalase2.4L 催化对映选择性水解制备 D-酪氨酸)[J]. *J Mol Catal(China)*(分子催化), 2013, **27**(3): 212–217.
c. Tao Fu-rong(陶芙蓉), Cui Yue-zhi(崔月芝), Zhuang Chen(庄辰), *et al.* The dissolution and regeneration of cellulosein sawdust from ionic liquids(离子液体对锯末中纤维素的溶解及再生研究)[J]. *J Mol Catal(China)*(分子催化), 2013, **27**(5): 420–428.
- [14] Aubert S D, Li Y, Raushel F M, *et al.* Mechanism for the hydrolysis of organophosphates by the bacterial phosphotriesterase [J]. *Biochem*, 2004, **43**(19): 5707–5715.
- [15] Chen S L, Liao R Z. Phosphate monoester hydrolysis by trinuclear alkaline phosphatase; DFT study of transition states and reaction mechanism[J]. *Chem Phys Chem*, 2014, **15**(11): 2321–2330.
- [16] Guo Nan(郭楠), Liu Jing-quan(刘景全), Zhong Jin-yi(钟近艺), *et al.* Mechanism study on V_x hydrolysis catalyzed by macrocyclic ployamino dinuclear metal complex(有机磷毒剂水解模拟酶对 V_x 的水解机理研究). *J Chem Defence*(防化学报). 2014, **139**(1): 46–51.
- [17] Guo N, Zhong J Y, Chen S L, *et al.* Experimental and Theoretical studies of hydrolysis of nerve agent sarin by binuclear zinc biomimetic catalysts [J]. *Chem Phys*, 2015, **457**: 70–77.
- [18] Becke A D. A new mixing of hartree-fock and local densityfunctional theories [J]. *J Chem Phys*, 1993, **98**: 1372–1377.
- [19] Becke A D. Densityfunctional thermochemistry. III. The role of exact exchange [J]. *J Chem Phys*, 1993, **98**: 5648–5652.
- [20] Lee C, Yang W, Parr R G. Development of the colle-salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density[J]. *Phys Rev B*, 1988, **37**(2): 785–789.

- [21] Frisch M J, Trucks G W, Schlegel H B. Gaussian 09 revision D. 01 [DB/CD]. Wallingford CT: Gaussian Inc, 2009.
- [22] Cao X Y, Michael D. Valence basis sets for relativistic energy-consistent small-core lanthanide pseudopotentials [J]. *J Chem Phys*, 2001, **115**(16): 7348–7355.
- [23] Klamt A, Schuurmann G. COSMO: A new approach to dielectric screening in solvents with explicit expressions for the screening energy and its gradient[J]. *J Chem Soc Perkin Trans*, 1993, **2**(5): 799–805.
- [24] Cammi R, Mennucci B, Tomasi J. Second-order Møller-plesset analytical derivatives for the polarizable continuum model using the relaxed density approach[J]. *J Phys Chem A*, 1999, **103**(45): 9100–9108.
- [25] Barone V, Cossi M. Quantum calculation of molecular energies and energy gradients in solution by a conductor solvent model[J]. *J Phys Chem A*, 1998, **102**(11): 1995–2001.
- [26] Siegbahn P E M, Blomberg M R A, Chen S L. Significant van der waals effects in transition metal complexes [J]. *J Chem Theory Comput*, 2010, **6**(7): 2040–2044.
- [27] Grimme S, Antony J, Ehrlich S, *et al.* A consistent and accurate and initio parametrization of density functional dispersion correction (DFT-D) for the 94 elements H-Pu [J]. *J Chem Phys*, 2010, **132**(15): 154101–154104.
- [28] Zhong Jin-yi (钟近艺), Zheng He (郑禾), Cui Yan (崔燕). Application of two-dimensional ^1H - ^{31}P inverse NMR pulse sequence in detection of organophosphorus chemical warfare agents and related compounds (二维反式氢磷相关脉冲序列设计及在含磷化学毒剂分析中的应用) [J]. *Chin J Anal Chem* (分析化学研究报告). 2014, **42**(7): 975–979.
- [29] Qi Wen-bing (戚文彬), Wang Geng (王耕). Studies on the effect of Ionic-Nonionic surfactants on color reaction and its application IV: Distribution coefficients and effective dielectric constants of color reagents in micellar solution (离子型-非离子型混合表面活性剂对显色反应作用的研究及应用) [J]. *Acta Chim Sin* (化学学报), 1988, **46**(2): 187–190.

The Mechanism of GD Hydrolysis Catalyzed by Macrocylic Ployamino Metal Artificial Enzyme

GUO Nan¹, CHEN Shi-lu², LIU Jing-quan¹, SHI Rui-xue¹, ZHONG Jin-yi^{1*}

(1. Research Institute of Chemical Defence, Beijing 102205, China;

2. Beijing Institute of Technology, Beijing 100081, China)

Abstract: For solving the problems of inactivation and weak endurance of natural enzymes in battlefield environment, this paper reported that a binuclear zinc artificial enzyme (ZnL2), i. e. a complex of two Zn(II) ions with a macrocyclic ployamino ligand (2,6-bis{[bis(2-hydroxyethyl) amino] methyl}-4-methylphenol, ZnL2), has a high catalytic activity for cyclic catalyzing of GD (Soman), with a 100% conversion obtained at a stoichiometry ratio of 0.56 : 1 (ZnL2 : GD). Using in-situ NMR and HPLC-MS, the products from the ZnL2-catalyzed hydrolysis of GD have been verified to include methyl phosphonic acid, pinayl methylphosphate, fluorophosphonic acid and fluorophosphate. This indicates that there are two parallel reactions in the hydrolysis of GD, respectively involving the cleavages of the P—F and P—O bonds in the GD substrate. The experimental results were validated by the subsequent B3LYP method of DFT, which proposed a similar step-wise mechanism for the parallel reactions, i. e. a nucleophilic attack on the substrate phosphor by a water activated by a ligand alkoxide leading to a penta-coordinated phosphoryl intermediate, followed by the hydrolysis of phosphoryl intermediate (the dissociation of the P—F or P—O bond). The activation energy of the hydrolysis of GD by ZnL2 catalysis were 5.6 kcal/mol (P—F breakdown) and 11.5 kcal/mol (P—O breakdown), respectively. Thus the P—O breakdown is the rate-determining step of GD enzymatic hydrolyzation.

Key words: macrocyclic ployamino metal artificial enzyme; catalytic hydrolysis; GD; density functional theory (DFT) calculation; nucleophilic attack