

In Zeolithe eingeschlossene Kupfer-Histidin-Komplexe als Mimetica natürlicher Kupferenzyme**

Bert M. Weckhuysen*, An A. Verberckmoes, Ina P. Vannijvel, Josephina A. Pelgrims, Philip L. Buskens, Pierre A. Jacobs und Robert A. Schoonheydt

Enzyme sind die am häufigsten vorkommenden, aktivsten und selektivsten Katalysatoren in der Natur. Sie sind jedoch nur in einem relativ engen Temperaturbereich und nur in bestimmten Lösungsmitteln wirksam. Um Enzyme nachzuahmen, ist es sinnvoll, ihr aktives Zentrum (oder ein Analogon hiervon) in eine Matrix einzubauen. Damit kann deren Wirksamkeit auf einen breiteren Temperaturbereich und ein größeres Spektrum an Lösungsmitteln ausgedehnt werden. Zeolithe sind die anorganischen Matrices der Wahl, da ihr Porendurchmesser und die Porengometrie Formselektivität bei den zu katalysierenden Reaktionen bewirken. Bislang wurde das aktive Zentrum eines Enzyms nachgeahmt, indem stabile, starre Übergangsmetallkomplexe in Hohlräumen und Kanälen von Zeolithen synthetisiert wurden^[1, 2]. Die bekanntesten Beispiele dafür sind Phthalocyanin- und Bipyridinkomplexe^[3, 4]. Diese Komplexe können jedoch nur in zeitaufwendigen In-situ-Reaktionen hergestellt werden, und darüber hinaus sind die mit diesen Katalysatoren erzielten Umsatzzahlen bei Oxidationen niedrig.

Wir berichten hier zum ersten Mal über die Immobilisierung von Cu-Histidinkomplexen in Zeolithen durch Ionenaustausch. Aminosäuren wie Histidin sind die Schlüsselbausteine von natürlichen Enzymen, weshalb das auf die zuvor beschriebene Art erhaltene anorganische Enzym ein aktives Zentrum hat, das dem des entsprechenden natürlichen Enzyms sehr ähnlich ist. Außerdem können diese Komplexe durch einfachen Ionenaustausch hergestellt werden. Cu^{2+} wurde als Übergangsmetall-Ion gewählt, weil es stabil^[5] ist und leicht durch Elektronenspinresonanz (ESR) und diffuse Reflexionsspektroskopie (DSR) im UV-VIS-NIR-Bereich charakterisiert werden kann^[6]. Des Weiteren spielen Kupferproteine sowohl in der Pflanzen- als auch in der Tierphysiologie eine Schlüsselrolle: Hämocyanin ist das Sauerstoff-tragende Protein in den Hämolymphe von Mollusken und Arthropoden; Ascorbat-Oxidase katalysiert die Oxidation von L-Ascorbat, und Galactose-Oxidase katalysiert die Oxidation der Galactose und vieler anderer Substrate wie aliphatische und aromatische Alkohole^[7-11].

Cu-Histidin(His)-Komplexe werden in der Regel in destilliertem Wasser unter Einsatz von Histidin und Cu^{2+} im Verhältnis 5:1 hergestellt. Wir haben den bei pH 7.3 in destilliertem Wasser^[12] vorgebildeten Komplex $[\text{Cu}(\text{His})_2]^+$ mit Zeolith Na-Y umgesetzt und dabei den Anteil der ersten Komponente schrittweise erhöht. Die freigesetzten Mengen an Na^+ und das im Zeolith eingeschlossene Cu^{2+} wurden gemessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 1 dargestellt. Obwohl die Meßpunkte beträchtlich streuen, zeigen die Werte eindeutig, daß ein Ionenaustausch stattgefunden hat. Die Steigung der Geraden ($7\text{Na}^+/\text{Cu}^{2+}$) deutet darauf hin, daß neben $[\text{Cu}(\text{His})_2]^+$ auch His⁺

[*] Dr. B. Weckhuysen, A. A. Verberckmoes, I. P. Vannijvel, J. A. Pelgrims, Dr. P. L. Buskens, Prof. P. A. Jacobs, Prof. R. A. Schoonheydt
Centrum voor Oppervlaktechniek en Katalyse
Katholieke Universiteit Leuven
Kardinaal Mercierlaan 92, B-3001 Heverlee (Belgien)
Telefax: Int. +16/32 19 98
E-mail: Bert.Weckhuysen@agr.kuleuven.ac.be

[**] Diese Arbeit wurde von der belgischen Regierung im Rahmen eines Interuniversity Attraction Pole (IUAP) gefördert. Wir danken dem N. F. W. O. (National Fonds voor Wetenschappelijk Onderzoek) (B. M. W.) und dem IWT (Instituut voor Wetenschap en Technologie) (A. A. V.) für die Forschungsstipendien der wissenschaftlichen Mitarbeiter.

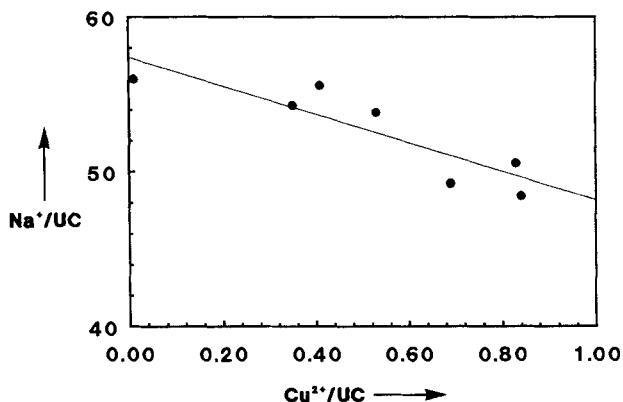


Abb. 1. Ausgetauschtes Na^+ und immobilisierter Cu^{2+} -Komplex in Zeolith Y bei steigender Konzentration des $[\text{Cu}(\text{His})_2]^+$ -Komplexes. UC = Elementarzelle.

ausgetauscht wurde. Die chemische Analyse bestätigt ein Histidin-Cu²⁺-Verhältnis von 6. Bei den hier untersuchten niedrigen Austauschraten^[13] werden für jede ersetzte $[\text{Cu}(\text{His})_2]^+$ -Einheit vier His⁺-Ionen mit ausgetauscht. Daß im Durchschnitt sieben Na^+ -Ionen frei werden und nicht sechs, deutet auf eine Ladungskompensation durch ein Proton hin; daher wird eine Restacidität bei den Feststoffen erwartet.

Die hydratisierten, hellblauen Proben werden durch eine Absorptionsbande um 15600 cm^{-1} im diffusen Reflexionsspektrum und ein typisch axialsymmetrisches ESR-Spektrum mit Hyperfeinaufspaltungen (hfs) mit Werten für $g_{||}$, g_{\perp} und $A_{||}$ -Werten um 2.27, 2.06 bzw. 170 G und einer Superhyperfeinstruktur (shfs) mit sieben Linien mit $A_{N,\perp}$ von 12.3 G charakterisiert (Abb. 2). Die spektroskopischen Daten beweisen, daß

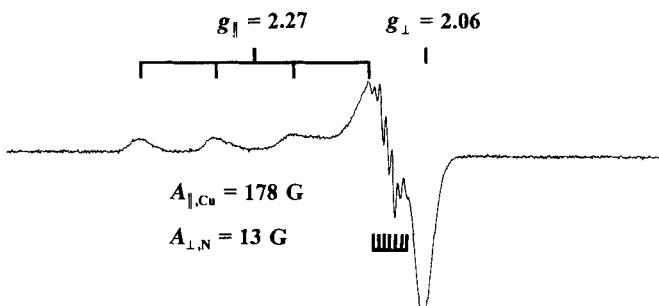


Abb. 2. ESR-Spektrum eines $[\text{Cu}(\text{His})_2]^+$ -Komplexes in Zeolith Y.

sich drei Stickstoffatome ($2 \times I_N \times n_N + 1 = 7$) in der ersten Koordinationsphäre des Cu²⁺-Ions befinden. Ähnliche spektroskopische Parameter haben Kupferproteine, z.B. die Galactose-Oxidase mit einer Absorption bei 15900 cm^{-1} und den ESR-Parametern $g_{||} = 2.24$, $g_{\perp} = 2.06$, $A_{||} = 175 \text{ G}$ (hfs), $A_{\perp} < 0.5 \text{ G}$ (shfs) und $A_{N,\perp} = 15.1 \text{ G}$ ^[8] mit einer NNNO-Koordination um das Cu²⁺-Ion. Die Intensität der d-d-Absorptionsbande im diffusen Reflexionsspektrum und die durch quantitative ESR-Messungen ermittelte Menge an Cu²⁺ sind in Abbildung 3 für steigende Beladung von Zeolith Y mit dem Cu-Histidin-Komplex gezeigt. Die d-d-Absorptionsbande von Cu²⁺ steigt linear mit zunehmender Cu-Beladung an. Dasselbe gilt für die Intensität des ESR-Signals, was darauf schließen läßt, daß nur ein Typ von eingeschlossenem Cu-His-Komplex vorliegt. Außerdem stimmt der Betrag von ESR-spektroskopisch detektierbarem Cu²⁺ mit dem chemisch bestimmten überein. Es kann also kein unkomplexiertes Cu²⁺ vorliegen.

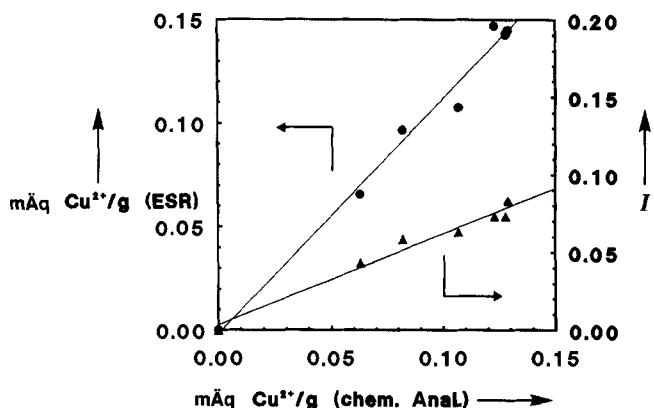


Abb. 3. Intensitäten der Cu²⁺-Signale im diffusen Reflexionsspektrum (I) und ESR-Spektrum als Funktion der Ladung des [Cu(His)₂]⁺-Komplexes in Zeolith Y. mÄq = Milläquivalente, chem. Anal. = chemische Analyse.

Die eingeschlossene [Cu(His)₂]⁺-Einheit kann als Komplex mit einem Cu²⁺-Zentrum betrachtet werden, das von drei Stickstoffatomen und einem Sauerstoffatom umgeben ist. Der vierte Ligand ist ein Sauerstoffatom einer Carboxygruppe des Histidins. In Abbildung 4 ist dieser Cu-Komplex dargestellt.

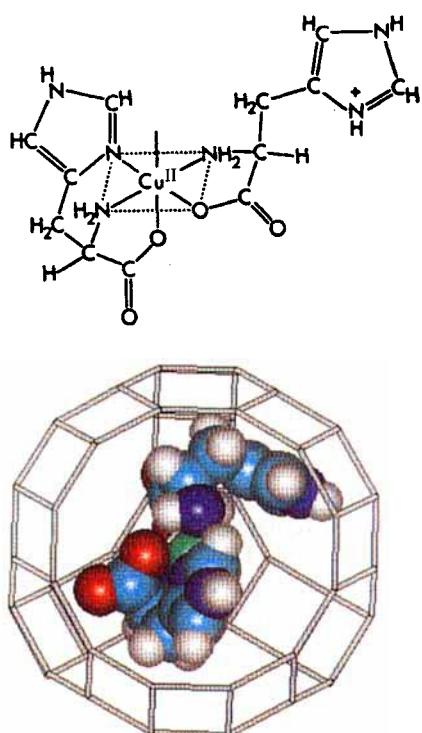


Abb. 4. Darstellung von [Cu(His)₂]⁺, im Superkäfig von Zeolith Y: Oben: Formel des [Cu(His)₂]⁺-Komplexes; unten: mit Hyperchem generiertes Kalottenmodell (hellblau: C, schwarz: H, grün: Cu, rot: O, dunkelblau: N).

Molecular Modelling zeigt, daß der [Cu(His)₂]⁺-Komplex ohne Verdrillung in den Zeolithhöhlräumen vorliegt.

Durch Trocknen der Proben wird dem System Wasser entzogen, und es tritt eine leichte Verschiebung in der DRS-Absorption (15700 cm^{-1}) und in den ESR-Parametern ein ($g_{\parallel} = 2.26$; $g_{\perp} = 2.07$; $A_{\parallel} = 160\text{ G}$). Weiterhin sind die eingeschlossenen [Cu(His)₂]⁺-Komplexe bis zu 100 °C stabil. Zugabe von Ammoniak zu der bei Raumtemperatur getrockneten Probe resultiert

in der Bildung eines $[\text{Cu}(\text{His})_2(\text{NH}_3)_x]$ -Komplexes mit einer Absorption bei 16000 cm^{-1} und Werten für g_{\parallel} , g_{\perp} und A_{\parallel} von 2.26, 2.07 bzw. 160 G. Die fehlende ESR-Superhyperfeinaufspaltung ist auf eine Verdrillung des Komplexes zurückzuführen. Entfernen des Ammoniaks im Vakuum bei 50 °C führt zum Ausgangszustand des Cu²⁺-Komplexes. Dieser Prozeß ist vollständig reversibel. Durch Abdampfen nur eines Ammoniakmoleküls wird also eine freie Koordinationsstelle erzeugt.

Diese freie Koordinationsstelle verleiht den Materialien ihr katalytisches Potential. Die Oxidation von Alkoholen und Alkenen mit *tert*-Butylhydroperoxid, einem umweltfreundlichen und billigen Oxidans^[14], wurde in Gegenwart von [Cu(His)₂]⁺-Y bei 60 °C untersucht. Die katalytische Wirksamkeit von [Cu(His)₂]⁺-Y mit 0.75 Cu/UC ist in Tabelle 1 dargestellt. 1-Penta-

Tabelle 1. Katalytische Umsetzungen mit in Zeolith eingeschlossenen [Cu(His)₂]⁺-Komplexen bei 60 °C [a].

Substrat [a]	Zeit [h]	Umsatz [%]	TON [b]	Selektivität [Mol-%]
1-Pentanol	24	12	1425	Pentansäure (100)
Benzylalkohol	24	56	2421	Benzoesäure (33), Benzaldehyd (66)
Cyclohexen	24	28	3230	Cyclohexenoxid (9), 1,2-Cyclohexandiol (89), Cyclohex-2-en-1-ol (0.3) und Cyclohex-2-en-1-on (1.7)

[a] 100 mmol Substrat, 150 mmol *tert*-Butylhydroperoxid; während der Reaktion wurde kein Cu frei (laut AAS); keine katalytische Aktivität bei Zeolith Y und bei in Zeolith eingeschlossenem Histidin, während das System Cu/Zeolith Y das Peroxid zerstört. [b] TON = Umsatzzahl.

nol wird mit 100 % Selektivität zu Pentansäure oxidiert, dagegen wird Benzylalkohol sowohl bis zum Benzaldehyd als auch vollständig bis zur Benzoesäure oxidiert; die beiden Produkte bilden sich im Verhältnis 2:1. Ähnliche Oxidationen werden durch die Galactose-Oxidase, die eine hohe Substratspezifität besitzt, katalysiert^[15]. Hervorragende Ergebnisse wurden bei der katalytischen Epoxidierung von Cyclohexen erzielt. Bei einer Umsatzzahl von 3230 ist 1,2-Cyclohexandiol das Hauptprodukt. Dieses Produkt bildet sich durch Hydrolyse von Cyclohexenoxid an den Säuregruppen von Zeolith Y. Auch wird eine geringe allylische Oxidation beobachtet, die auf sehr geringe Spuren von freiem Kupfer zurückzuführen ist. Nach der Reaktion befinden sich laut ESR- und DSR-Messungen alle [Cu(His)₂]⁺-Komplexe in den Hohlräumen des Zeoliths; im Reaktionsgemisch wurden dagegen keine Kupfer-Ionen mehr gefunden. Diese starke Einlagerungstendenz kann mit der positiven Ladung des Komplexes erklärt werden. Weiterhin änderten sich auch nach dreimaliger Regenerierung des Komplexes die katalytischen und spektroskopischen Eigenschaften nicht. Dies läßt darauf schließen, daß ein neuer, stabiler und selektiver Oxidationskatalysator synthetisiert wurde.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß wir [Cu(His)₂]⁺-Komplexe entwickelt haben, die in den Hohlräumen von Zeolith Y durch einfache Ionenaustausch immobilisiert werden können. Dies führt zu einer Koordinationsgeometrie, wie sie üblicherweise in biologischen Kupferkomplexen vorliegt. Die freie Koordinationsstelle öffnet in Gegenwart von Peroxiden den Weg zu katalytischen Oxidationen bei relativ niedrigen Temperaturen, speziell zu Olefinepoxidierungen und Alkoholoxidationen. Dieses System ist das erste Beispiel eines immobilisierten Übergangsmetall-Aminosäure-Komplexes in Zeolithen. Momentan führen wir mechanistische Untersuchungen zu diesen Oxidationen durch und versuchen, die hier diskutierte Stra-

tegi auch zum Aufbau von Systemen mit anderen Übergangsmetall-Ionen, Aminosäuren und anorganischen Oxiden zu übertragen.

Experimentelles

Die Cu(His)/Zeolith-Y-Komplexe wurden ausgehend von Zeolith Na-Y (Ventron, Si:Al-Verhältnis 2.49:1 und Kationenaustauschkapazität von 4.32 mÄg^{-1}) hergestellt. Der Zeolith Na-Y wurde durch zweimaligen Ionenaustausch mit 1 M NaCl-Lösung in seine Na^+ -Form gebracht, gewaschen, bis kein Cl^- mehr nachweisbar war, und an Luft bei Raumtemperatur ca. 12 h getrocknet. Der Ionenaustausch in den so präparierten Zeolithen wurde in einer Lösung von Cu(His) in bidestilliertem Wasser bei einem konstanten pH-Wert durchgeführt. Danach wurden die Proben zentrifugiert, der Rückstand gewaschen und bei 60°C ca. 12 h getrocknet. Der Gehalt an Na^+ und Cu^{2+} wurde durch Atomabsorptionsspektroskopie (AAS) aus Lösungen mit definierten Mengen an Zeolithmaterial in $\text{HF}/\text{H}_2\text{SO}_4$ ermittelt. Die AAS-Messungen wurden an einem Gerät von Instrumentation Laboratory mit einer Distickstoffoxid/Acetylenflamme durchgeführt. Für die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen stand ein Gerät der Firma Jeol (Superprobe 733) zur Verfügung, während die DRS-Messungen an einem Varian-Cary-5-UV-VIS-NIR-Spektrophotometer bei Raumtemperatur durchgeführt wurden. Die diffusen Reflexionsspektren wurden gegen einen Halogenkohlenwasserstoffstandard für weiße Reflexion im Bereich von 2200–200 nm aufgenommen. Die Computerauswertung der Spektren gliederte sich wie folgt: 1. Subtraktion der Grundlinie; 2. Umrechnung in Wellenzahlen und 3. Berechnung der Kubelka-Munk(KM)-Funktion. Für die ESR-Spektroskopie wurde ein Bruker ESP300E-Spektrometer (X-Band ca. 9.5 GHz) verwendet. Die quantitativen ESR-Ergebnisse wurden durch Vergleich mit Cu(Acetylacetonat)/KCl als Referenzsubstanz (Spindichte: 10^{16} – $10^{20} \text{ Cu}^{2+}/\text{g}^{-1}$) erhalten. Die Molekülmodelle wurden mit der Software Hyperchem von Autodesk angefertigt.

Eingegangen am 7. März,
ergänzte Fassung am 3. Mai 1995 [Z 7769]

Stichworte: Aminosäuren · Enzymmimetica · Katalyse · Kupferverbindungen · Zeolithe

- [1] W. J. Mortier, R. A. Schoonheydt, *Prog. Solid State Chem.* **1985**, *16*, 1.
- [2] D. E. De Vos, P. P. Knops-Gerrits, R. F. Parton, B. M. Weckhuysen, P. A. Jacobs, R. A. Schoonheydt, *J. Inclusion Phenom. Mol. Recognit. Chem.* **1995**, *21*, 185.
- [3] B. V. Romanovskii, *Proc. 5th Int. Symp. Rel. Homog. Heterog. Catal.*, VNU Science Press, **1986**, S. 343; R. F. Parton, L. Uytterhoeven, P. A. Jacobs, *Stud. Surf. Sci. Catal.* **1991**, *59*, 395.
- [4] W. De Wilde, J. H. Lunsford, *Inorg. Chim. Acta* **1979**, *34*, L229; K. Mizuno, J. H. Lunsford, *Inorg. Chem.* **1983**, *22*, 3484.
- [5] D. R. Williams, *The Metals of Life: the Solution Chemistry of Metal Ions in Biological Systems*, Van Nostrand Reinhold, New York, **1971**, S. 49.
- [6] R. A. Schoonheydt, *Catal. Rev. Sci. Eng.* **1993**, *35*(1), 129.
- [7] P. M. Colman, H. C. Freeman, J. M. Guss, M. Murata, V. A. Norris, J. A. M. Ramshaw, M. P. Venkatappa, *Nature* **1978**, *272*, 319; D. J. Cookson, M. T. Hayes, P. E. Wright, *ibid.* **1980**, *283*, 682.
- [8] R. Lontie, *Copper Proteins and Copper Enzymes*, Vol. 1–3, CRC Press, Boca Raton, FL, USA, **1984**.
- [9] R. Lontie, R. Witters in *Inorganic Biochemistry*, Vol. 1 (Hrsg.: G. L. Eichhorn), Elsevier, Amsterdam, **1973**, S. 344.
- [10] P. L. Lovett-Janison, J. M. Nelson, *J. Am. Chem. Soc.* **1940**, *62*, 1409.
- [11] W. E. Blumberg, B. L. Horecker, F. Kelly-Falcoz, J. Peisach, *Biochim. Biophys. Acta* **1965**, *96*, 336.
- [12] T. P. Kruck, B. Sarkar, *Can. J. Chem.* **1973**, *51*, 3563.
- [13] A. Cremers in *Molecular Sieves II* (Hrsg.: J. R. Katzer) (*A.C.S. Symp. Ser.* **1977**, *40*, 179).
- [14] K. B. Sharpless, T. R. Verhoeven, *Aldrichimica Acta* **1979**, *12*, 63.
- [15] P. Tressel, Dissertation, State University of New York, Buffalo, **1980**.

Synthese und Struktur eines nanodimensionierten Multicyclophans: das “Kuratowski-Cyclophan” – ein Beispiel für ein achirales, nichtplanares $K_{3,3}$ -Stereoelement**

Chao-Tsen Chen, Peter Gantzel, Jay S. Siegel*, Kim K. Baldridge, Robin B. English und Douglas M. Ho

Bei dem Bemühen, polycyclische Moleküle mit Dimensionen im Nanometerbereich zu synthetisieren, werden Chemiker zunehmend mit Problemen der molekularen Verflechtung konfrontiert^[1]; damit stellt sich die wichtige Aufgabe, topologische Stereokontrolle zu erreichen^[2]. Die Synthese von Molekülen mit der Form von Möbius-Leitern^[3], Kleeblattknoten^[4] und Catenanen^[5] (Abb. 1) veranschaulicht dies^[6]. Möbius-Leitern



Abb. 1. Topologisch definierte Syntheseziele: Möbius-Leiter (links), Kleeblattknoten (Mitte) und Catenanen (rechts).

gehören zu einer Gruppe von Strukturen mit einem nichtplanaren Graphen als topologischem Strukturelement^[7]. Das Stereoelement der Möbius-[3]Leiter umfaßt zwei Sätze von drei Punkten (Atomen), wobei jeder Punkt des einen mit jedem Punkt des anderen Satzes verbunden ist; dieses Element wird als $K_{3,3}$ bezeichnet^[8, 9]. Generell weisen topologische Stereoelemente bestimmte Symmetrie- und Verknüpfungsmuster auf, wobei im Fall der Möbius-[3]Leiter das $K_{3,3}$ -Element chiral ist. Über die gezielte Konstruktion eines Makrocyclophans, das durch ein achirales $K_{3,3}$ -Stereoelement beschrieben wird, wurde bisher noch nicht berichtet^[10, 11]. Wir beschreiben nun das Design, die Synthese und die strukturelle Charakterisierung eines achiralen (D_{2d})-Makrocyclophans, das dem nichtplanaren $K_{3,3}$ -Molekülgraphensatz zuzurechnen ist.

Das Kuratowski-Cyclophan **1**^[12], ein polycyclisches Makrocyclophan, enthält einen gestreckten, nadelförmigen Kern aus acht aromatischen Ringen (**2**), wobei die flankierenden Ringe paarweise durch vier 2,7-Dihydroxynaphthalin-Reste über die Molekülmittelebene verbunden sind. Der $K_{3,3}$ -Subgraph ist dem Molekülgerüst dergestalt überlagert, daß die Scheitelpunkte der beiden unabhängigen Drei-Punkt-Sätze jeweils von einem

* Prof. Dr. J. S. Siegel, C.-T. Chen, P. Gantzel

Department of Chemistry
University of California at San Diego
La Jolla, CA 92093-0358 (USA)
Telefax: Int. +619/534-5383
E-mail: jss@chem.ucsd.edu

Dr. K. K. Baldridge
San Diego Supercomputer Center
P.O. Box 85608, San Diego, CA 92186 (USA)
Telefax: Int. +619/534-5149
E-mail: kimb@sdc.sdu.edu

R. B. English
Department of Chemistry, Rhodes University
Box 94, Grahamstown 6140 (Südafrika)

D. M. Ho
Department of Chemistry, Princeton University
Princeton, NJ 08544 (USA)

** Diese Arbeit wurde von der National Science Foundation (CHE-9307582; ASC-8902827) und der Alfred P. Sloan Foundation gefördert.