

Comparison of Catecholase Activity of Selected Copper(II) based Catalysts (Porovnání katecholázové aktivity vybraných katalyzátorů na bázi mědi)

Tomáš Mikysek^a, Michaela Bártová^a, Milan Sýs^a, and Miroslav Novák^b

^a Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemical Technology, University of Pardubice, Studentská 573, 53210 Pardubice, Czech Republic,
e-mail: tomas.mikysek@upce.cz

^b Institute of Chemistry and Technology of Macromolecular Materials, Faculty of Chemical Technology, University of Pardubice, Studentská 573, 53210, Pardubice, Czech Republic.

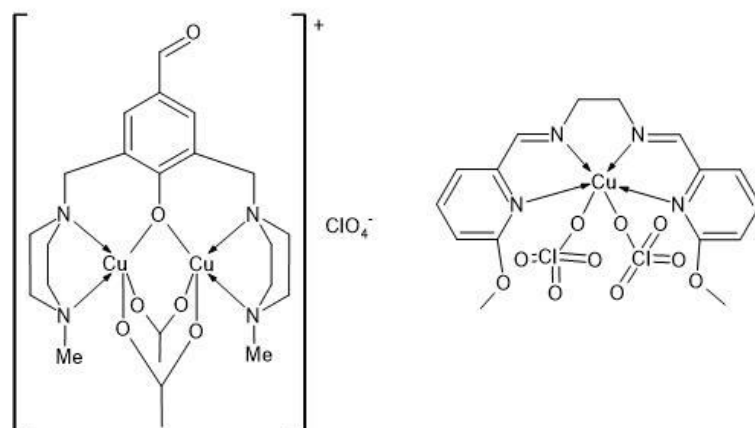
Abstract

In his contribution a comparison of catecholase activity of recently synthesized mono- and binuclear copper(II) complexes towards selected substrates (3,5-DTBC and neurotransmitters) is presented. The Michaelis-Menten kinetics model was applied for such description. Besides a finding of comparable catalytic activity for the copper complexes tested, the measurements have been performed in methanol as well as in phosphate buffer pH 7 where the measurements can be compared with enzyme tyrosinase.

Key words: UV-VIS spectrophotometry; dopamine; amperometry, copper complexes; Tyrosinase.

Úvod

Příprava a charakterizace umělých enzymů jsou v popředí zájmu v oblasti katalýzy. Jejich možné využití je zkoumáno jak v reakcích při syntéze tak i v elektroanalýze^{1,2}. Většinou se jedná o jedno nebo vícejaderné komplexy mědi. Jedním z celé řady příkladů je zapojení komplexů mědi coby náhrady enzymu tyrosináza, který lze s úspěchem využít v biosenzorech sloužících ke stanovení obsahu polyfenolyckých resp. biologicky aktivních látek (např. neurotransmiterů)³. Nicméně stabilita biosenzoru obsahujícího enzym tyrosináza je bohužel omezena pouze na několik týdnů v závislosti na jeho konstrukci a skladování⁴⁻⁶. To je jedním z důvodů, proč je část výzkumu věnována syntéze biomimetických katalyzátorů, tedy především komplexů mědi s cílem napodobit chování tyrosinázy. Nově syntetizované komplexy jsou sice příslibem v této oblasti, avšak jejich problémem je nízká rozpustnost a tak se celá řada měření popisující katecholázovou aktivitu příslušného komplexu odehrává v prostředí methanolu či jiného nevodného rozpouštědla a jako modelový substrát je obvykle použit 3,5-di-terc-butylkatechol (3,5-DTBC) za tvorby definovaného produktu 3,5-di-terc-butylchinonu s charakteristickým absorpčním maximem v UV-VIS (400 nm)⁷. Tyto podmínky jsou však obtížně srovnatelné s tyrosinázou katalyzovanou přeměnou substrátu, která probíhá výhradně ve vodném prostředí. Navíc produktem tyrosinázou katalyzované oxidace celé řady substrátů mj. neurotransmiterů je sice příslušný chinon avšak ten podléhá následné reakci v podobě tvorby polymeru⁸. Relativní porovnání připravených katalyzátorů, v rámci jejich charakterizace, nabízí parametry, které jsou typické pro popis enzymem katalyzovaných reakcí. Tedy srovnání pomocí parametrů modelu Michaelis-Mentenové. K tomuto popisu se nejčastěji používá UV-VIS spektrofotometrie, ale lze s úspěchem využít i elektrochemických technik např. amperometrie. V tomto příspěvku je dále uvedeno, diskutováno porovnání katalytické aktivity jedno a dvoujaderných komplexů mědi (viz. Obr.1) pro různé substráty a rovněž s katalytickou aktivitou enzymu tyrosináza.



Obr. 1. Příklad struktur studovaných komplexů mědi, **K1** (vlevo) a **K2** (vpravo).

Experimentální část

Chemikálie

Dopamin, 3,5-di-*tert*-butylkatechol (3,5-DTBC), enzym tyrosináza (EC 1.14.18.1 z (*Agaricus biosporus*), a chloristan lithný byly získány od Sigma-Aldrich (Praha, ČR) stejně tak acetonitril (kvalita pro HPLC). Deionizovaná voda (odpor >18 MΩ cm) byla připravena z demineralizované vody pomocí systému Milli-Q systému od firmy Merck Millipore (Darmstadt, Německo) soli pro přípravu 0,1 M fosfátového pufru byly zakoupeny v Lach-Ner s.r.o. (Neratovice, ČR). Studované komplexy mědi **K1**: $[Cu_2L(OAc)_2(H_2O)](ClO_4)$ s ligandem: 2,6-bis[(*N*-methyl piperazine-1-yl)methyl]-4-formyl phenol (*HL*) a **K2**: $[Cu(ClO_4)_2(L2)]$ s ligandem 1,2-($C_5H_4N-6-OCH_3-2-CH=N$) $_2CH_2CH_2$ (*HL2*) byly syntetizovány na Ústavu chemie a technologie makromolekulárních látek Univerzity Pardubice.

Instrumentace

Amperometrická měření byla prováděna v klasickém tří-elektrodovém uspořádání, kde pracovní elektrodou byl disk ze skelného uhlíku (o průměru 3 mm), dále jako referentní byla zvolena chlorido-stříbrná elektroda s 3 M KCl (Pozn.: pro měření v bezvodém methanolu byla použita kalomelová elektroda s můstkem) a jako pomocná byl použit platinový plíšek. Elektrody byly připojeny k potenciostatu AUTOLAB PGSTAT101 of firmy Metrohm Česká republika s.r.o., s ovládáním prostřednictvím software NOVA 1.11.

Spektrofotometrické experimenty byly prováděny na přístroji V2450 firmy Shimadzu (Kyoto, Japonsko) v 1 cm křemenné kyvetě od firmy Fisher Scientific (Pardubice, ČR) v rozmezí vlnových délek od 800 do 200 nm rychlostí 0.5 nm s⁻¹.

Výsledky a diskuse

Katalytická aktivita komplexů mědi uvedených na obrázku 1 byla studována jak pomocí amperometrie tak pro srovnání i pomocí spektrofotometrie a to pro různé substráty: 3,5-DTBC a dopamin. Kinetické parametry získané pomocí amperometrie ve vsádkovém uspořádání (kde na pracovní elektrodě byla sledována redukce příslušného *o*-chinonu, který vznikl katalytickou přeměnou substrátu) odpovídaly hodnotám získaným ze spektrofotometrických měření.

Porovnáme-li hodnoty jednoho z kinetických parametrů (K_m) u obou studovaných komplexů s využitím 3,5-DTBC jako substrátu, dojdeme k hodnotám 0,22 mM vs 1,6 mM, kde nižší hodnota získaná pro acetátový komplex ukazuje na lepší afinitu tohoto katalyzátoru k danému substrátu. Zároveň porovnáním struktur obou komplexů můžeme usoudit, že svou roli zde hraje rozdílné uspořádání z hlediska koordinace a také přítomnost druhého atomu mědi, navíc

potřebujeme dvojnásobnou koncentraci komplexu K2, což z něj činí v tomto případě „horší“ katalyzátor. Nutno podotknout, že látka 3,5-DTBC není rozpustná ve vodě, proto měření probíhalo v acetonitrilu. V tabulce I jsou uvedeny i další kinetické parametry, např. hodnoty rychlostní konstanty K_{cat} , udávající počet molekul substrátu přeměněných jednou molekulou komplexu/enzymu za jednotku času, kde jednojaderný komplex K2 není významně horší. Navíc oba komplexy se liší i v rozpustnosti, jednojaderný komplex je rozpustný ve vodě, a lze tedy provést měření ve fosfátovém pufru pH 7. Porovnáme-li dále hodnotu K_m (2,1 mM) s hodnotou tabelovanou pro enzym tyrosináza (0,84-1,1 mM) dostupnou v databázi BRENDA ⁸, pak vidíme, že tyto hodnoty jsou vesměs srovnatelné.

Tabulka I. Hodnoty kinetických parametrů popisující katalytickou aktivitu komplexů **K1** (150 μM) a **K2** (300 μM) pro vybrané substráty.

Substrát	K1			K2		
	K_m [mM]	V_{max} [mAU s ⁻¹]	K_{cat} [h ⁻¹]	K_m [mM]	V_{max} [mAU s ⁻¹]	K_{cat} [h ⁻¹]
3,5-DTBC	0,22	1,6 ^a	38,8	1,6	1,7 ^a	20,3
Dopamin	0,73	1,129	-	2,1 ^b	0,19 ^b	-

Pozn.: ^a V_{max} [$\mu\text{M s}^{-1}$], v prostředí acetonitrilu; ^b v prostředí 0,1 M fosfátového pufru

Závěr

Tento příspěvek nabízí srovnání katalytické aktivity studovaných komplexů mědi v porovnání s enzymem tyrosinázou.

Acknowledgments

The support received from the Czech Science Foundation (Project No. 19-03160S) and University of Pardubice (Project No. SGS-2022-02) is gratefully acknowledged.

References

1. Serrano-Plana J., Garcia-Bosch I., Company A., Costas M.: *Acc. Chem. Res.* **48**, 2397 (2015).
2. Mobin S. M., Sanghavi B. J., Srivastava A. K., Mathur P., Lahiri G. K.: *Anal. Chem.* **82**, 5983 (2010).
3. Sýs M., Vytřas K.: *Curr. Med. Chem.* **25**, 3988 (2018).
4. Wang Y., Zhang X., Chen Y., Xu H., Tan Y., Wang S.: *Am. J. Biomed. Sci* **2**, 209 (2010).
5. Fritea L., Tertiş M., Cosnier S., Cristea C., Săndulescu R.: *Int. J. Electrochem. Sci.* **10**, 7292 (2015).
6. Njagi J., Chernov M. M., Leiter J., Andreescu S.: *Anal. chem.* **82**, 989 (2010).
7. Kumari S., Mahato A. K., Maurya A., Singh V. K., Kesharwani N., Kachhap P., Koshevoy I. O., Haldar C.: *New J Chem* **41**, 13625 (2017).
8. Sýs M., Obluková M., Kolivoška V., Sokolová R., Korecká L., Mikysek T.: *J. Electroanal. Chem.* **864**, 114066 (2020).