

不对称铁卟啉的合成及其模拟细胞色素P450对环己烷的羟化作用

计亮年 王文雄 计晴 黄锦汪 Hsieh An-Kong

(中山大学化学系)

(国立新加坡大学化学系)

摘要 合成并表征了3种在苯环上具有推电子或拉电子取代基的新的不对称四苯基卟啉衍生物及其铁配合物。研究了其铁配合物作为细胞色素P450模拟酶对环己烷的羟化作用,并与结构类似的对称卟啉进行了比较。结果进一步证明,与对称金属卟啉相似,苯环上取代基性质和空间位阻对于金属卟啉的催化活性是十分重要的。不对称金属卟啉的催化活性比结构类似的对称金属卟啉的稍大。

关键词 不对称卟啉, 四苯基卟啉衍生物, 细胞色素p450模拟, 环己烷, 羟化作用

众所周知,自然界大多数金属酶的活性部位往往由金属配合物组成。细胞色素P450单加氧酶的活性部位就是在轴向位置有半胱氨酸残基的S配位的铁卟啉配合物。由于细胞色素P450在温和条件下对底物羟化具有专一和高效的催化性能,人们致力于合成细胞色素P450的各种模拟体系,以期应用到工业生产^[1]。我们曾合成了一系列苯环上带有各种推电子和拉电子基团的对称的四苯基卟啉衍生物及其金属配合物^[2,3],并作为细胞色素P450模拟体系研究了它们对苯^[4]和环己烷^[1,2]羟化的催化作用。金属酶的活性部位通常处于某种扭曲的不对称状态,研究由不对称铁卟啉组成的细胞色素P450模拟体系对底物羟化催化的影响,对于结构与催化活性关系的研究和寻找新的高效催化剂都具有重要意义。

本文合成并表征了如图1所示的3种具有推电子和拉电子基团的不对称四苯基卟啉衍生物及其铁配合物。这些化合物尚未见文献报道。以这些不对称铁卟啉配合物与硫代乙醇酸及吡啶组成细胞色素P450模拟体系,研究了它们在温和条件下在环己烷中的吸氧活性和对底物环己烷的羟化效果,同时,比较了它们与相应的对称铁卟啉配合物的催化性能。

本文1991年3月17日收到

• 国家自然科学基金和英国皇家化学会会员研究基金资助项目

- 1) 计亮年,刘敏,谢安康。金属卟啉在环己烷及苯酚体系中催化活性的研究,无机化学学报,待发表
- 2) Ji L N(计亮年), Liu Min, Hsieh A K. Hydroxylation of Cyclohexane Catalyzed by various Metalloporphyrins, J Molecular Catalysis, in press

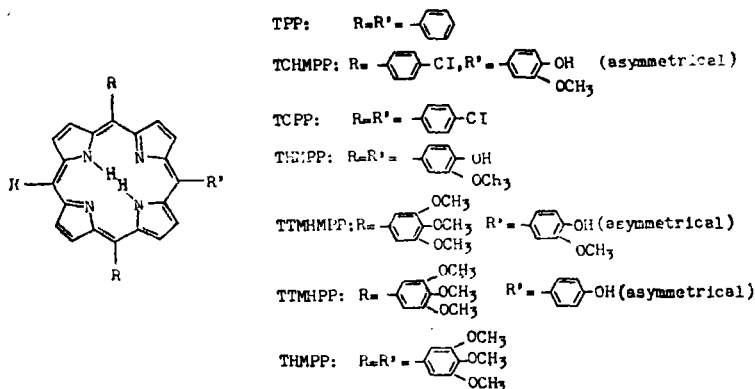


图1 某些对称和不对称卟啉化合物的命名

Fig.1 The nomenclature of some symmetrical and asymmetrical porphyrins compounds

1 实验部分

1.1 试剂

吡咯和苯甲醛衍生物使用前减压重蒸, 醋酸、丙酸使用前先干燥。其它试剂均分析纯或化学纯, 未经处理直接使用。

1.2 实验仪器

元素分析用PE240C元素分析仪; 质谱(MS)分析用ZAB-HS质谱仪; ^1H NMR谱以JEOL FX90Q核磁共振仪测定; 红外光谱(IR)用Nicolet 5DX红外分析仪; 紫外可见吸收光谱(UV-Vis)用岛津MPS-2000紫外可见分光光度计测定; 羟化产物用上分104型气相色谱仪(上海分析仪器厂)分析。

1.3 卟啉及其铁配合物的合成

用于对比试验的对称卟啉TPP、THMPP按Adler^[5,6]的方法合成。其它对称卟啉由合成不对称卟啉时分离而得到。不对称卟啉的合成方法如下: 使两种相应的苯甲醛衍生物的摩尔比为1:3, 并使它们的总摩尔数与新蒸吡咯相等。以上物质在丙酸介质中于131℃搅拌反应30min后减压蒸出大部分丙酸, 冷却, 加入适量无水乙醇, 静置1~2天, 过滤, 得紫红色卟啉粗产品。将粗产品溶于氯仿, 以中性氧化铝(100~200目)层析分离对称卟啉和不对称卟啉。以氯仿为第一洗脱剂被迅速淋下的第一色带为相应的对称卟啉; 再以丙酮-氯仿(1:4)为第二洗脱剂, 洗下的就是相应的不对称卟啉。分别收集、减压蒸干, 再在氯仿-甲醇中重结晶, 得到纯净的对称卟啉和不对称卟啉。

使卟啉、醋酸亚铁(新制)和氯化钠在DMF介质中回流反应若干小时, 以薄层层析确定反应完全后, 冷却。以氯仿萃取反应液中铁卟啉配合物, 并分别用15% HCl和水洗涤若干次, 然后以无水氯化钙干燥有机相, 减压蒸去氯仿至近干, 用无水乙醇洗涤, 过滤, 得到相应的铁卟啉配合物。用中性氧化铝(100~200目)层析分离(至少2次), 产品在100℃真空干燥若干小时。

1.4 环己烷羟化反应

反应体系为: 合成的铁卟啉0.025m mol, 硫代乙醇酸4.3m mol, 吡啶2.48m mol,

环己烷2.77 mol, 9:1的丙酮-缓冲溶液(pH=6.5) 10ml, 氧气为氧源(10⁵Pa)。以上体系在20±0.2℃下反应1 h后, 分析羟化产物含量。

体系的吸氧活性试验如前文^{1,2)}(⁴⁾所述。环己烷羟化产物环己醇、环己酮的产率用气相色谱测定^{1,2)}。

2 结果与讨论

2.1 不对称卟啉的合成

实验表明, 反应温度、反应时间和两种相应的苯甲醛衍生物的比例都对不对称卟啉的产率有直接的影响。各种因素对TTMHPP产率的影响见表1。在反应时间(30 min)和3,4,5-三甲氧基苯甲醛与*p*-羟基苯甲醛的比例(3:1)相同时, 不对称卟啉TTMHPP产率随温度升高逐渐增大, 但是当温度升到某一数值后, 继续升高温度产率反而降低; 在反应温度(130℃)和两种苯甲醛衍生物比例(3:1)相同时, 出现了不对称卟啉的产率随反应时间的增长先增大后降低的现象; 在反应温度(130℃)和反应时间(30 min)相同时, 不对称卟啉的产率又直接与两种苯甲醛衍生物的比例有关, 高于或低于3:1都会使产率降低。卟啉的合成是一类复杂的多分子参与的有机合成反

表1 温度、反应时间、苯甲醛衍生物的比例对TTMHPP产率的影响

Tab.1 Influence of temperature, reaction time and ratio of the benzaldehyde derivatives on the yield of TTMHPP

温度 (℃)	反应时间 (min)	比例* I/I	产率(%) (TTMPP + TTMHPP)	产率(%) (TTM-HPP)	温度 (℃)	反应时间 (min)	比例* I/I	产率(%) (TTMPP + TTMHPP)	产率(%) (TTM-HPP)
100	30	3.0	9.23	2.1	130	30	3.0	21.35	4.1
110	30	3.0	10.21	2.1	130	40	3.0	21.75	3.9
120	30	3.0	19.01	3.8	130	50	3.0	20.81	3.3
130	30	3.0	21.25	3.9	130	60	3.0	16.24	1.8
135	30	3.0	21.50	4.0	130	30	2.0	20.92	0.8
140	30	3.0	20.62	3.7	130	30	2.5	21.03	3.3
150	30	3.0	14.95	2.6	130	30	3.0	21.35	4.0
130	10	3.0	8.11	2.1	130	30	3.5	20.33	3.1
130	20	3.0	13.50	2.8	130	30	4.0	21.08	1.8

* I = 3,4,5-trimethoxybenzaldehyde

I = *p*-hydroxybenzaldehyde

应, 在一定的条件下, 升高温度或增加反应时间无疑有利于大环化合物的生成, 但是, 继续升高温度或增加反应时间都可能造成多聚物的生成, 使不对称卟啉的产率降低。本文合成的是一类R:R'=3:1的不对称卟啉, 很显然, 只有在相应的苯甲醛衍生物比例为3:1时产率才最高, 否则容易生成其它类型的不对称卟啉。由此可见, 选择反温度131℃、反应时间30 min、两种相应的苯甲醛衍生物的比例3:1这样的实验条件合成R:R'=3:1的不对称卟啉是合适的。

2.2 不对称卟啉及其铁配合物的表征

3种不对称卟啉的元素分析数据见表2, 计算值与实测值表现得相当一致。以质谱对元素分析结果偏差稍大的TTMHPP进行验证, 其分子量为901, 与理论值(900.9)完全吻合, 说明合成的正是预定的不对称卟啉。

表2 不对称卟啉的元素分析

Tab. 2 Elemental analysis for the asymmetrical porphyrins

化合物	分子式	C %		H %		N %	
		detd.	cal.	detd.	cal.	detd.	cal.
TCHMPP	C ₄₅ H ₂₈ N ₄ O ₂ Cl ₃	70.72	70.73	3.80	3.83	7.42	7.23
TTMHMPP	C ₅₄ H ₅₀ N ₄ O ₁₁	63.40	63.67	5.32	5.40	5.89	6.02
TTMHPP	C ₅₃ H ₄₈ N ₄ O ₁₀	70.20	70.65	5.29	5.38	5.96	6.22

¹H NMR数据(表3)进一步提供了3种不对称卟啉结构的信息。处于不同环境中H的化学位移及其积分面积比都与理论分析相一致。

表3 不对称卟啉化合物的¹H NMR数据

Tab. 3 Data of ¹H NMR for the asymmetrical porphyrins

化合物	化学位移(δ ppm)					
	pyrrol-H	Bz-H	Bz-OH	<i>p</i> -OCH ₃	<i>m</i> -OCH ₃	<i>m</i> ¹ -OCH ₃
TCHMPP	8.81~9.00	7.23~8.36	6.00			4.00
积分面积比	5.81	11.1	0.72			2.20
H原子比	8	15	1			3
TTMHMPP	8.82~9.00	7.10~8.12	6.08	4.09	3.98	4.15
积分面积比	4.10	4.83	0.53	4.90	9.00	1.60
H原子比	8	9	1	9	18	3
TTMHPP	8.82~8.00	7.10~8.12	6.05	4.09	3.98	
积分面积比	5.60	7.80	0.70	5.60	14.0	
H原子比	8	10	1	9	18	

3种不对称卟啉的IR吸收(KBr压片)及其相应的归属见表4。不对称卟啉苯环上的取代基如—OH、—OCH₃的有关振动谱带都得到了合理的归属, 并在不同的不对称卟啉中有良好的一致性。

不对称的卟啉UV-Vis光谱数据见表5。与对称卟啉一样, 不对称卟啉的UV-Vis吸收光谱也可分为700~450nm的第一区域和450~350nm的第二区域(soret谱带)。第一区域的4个谱带是卟啉环的A_{2u}→E_g跃迁谱带^[7]。由于苯环上取代基的推电子或拉电子性质通常对A_{2u}能级能量产生一定的影响, 推电子取代基使A_{2u}能量升高, 谱带红移; 拉电子取代基使A_{2u}能量降低, 谱带蓝移^[2], 因此3种不对称卟啉的吸收光谱有一定的差异。TCHMPP与TTMHMPP, 两者R'相同(有—OH和—OCH₃取代基), 但前者R上的取代基为拉电子的—Cl, 后者R上有3个推电子的—OCH₃, 因而前者谱带蓝移,

后者谱带红移。对于TTMHMPP和TTMHPP, 两者结果十分相似, R上的取代基都相同(3个—OCH₃), 而且R'都有1个—OH取代基。虽然前者R'还有1个—OCH₃取代基, 但是由于R¹上这两种取代基性质是相同的, 所以这两种不对称卟啉的谱带位置十分接近。以上结果也表明, 由于苯环与卟啉环并不完全处于同一平面中^[3], 苯环上取代基与卟啉环间的共轭性质并不是很强烈的。

表4 不对称卟啉的红外光谱数据(KBr压片, cm⁻¹)Tab. 4 IR spectral data for the asymmetrical porphyrins (KBr pellets) (cm⁻¹)

谱带归属	TCHMPP	TTMHMPP	TTMHPP	谱带归属	TCHMPP	TTMHMPP	TTMHPP
ν_{O-H}	3500(m)	3505(s)	3450(s)	ν_{C-O-C}	1118(m)	1127(s)	1127(s)
ν_{N-H}	3312(m)	3318(m)	3310	(C-OCH ₃)			
$\nu_{C-H(CCH_3)}$	2921(m)	2940	2940	$\nu_{C=C(Bz)}$	1230(s)	1007	
$\nu_{C=C(Bz)}$	1600(s)	1584	1583(s)	δ_{CP-CP}			
	1582(s)			ν_{CP-N}	935(m)	925(m)	925(m)
ν_{CP-CP}	1500(s)	1498	1500(s)	$\nu_{CP'-CP}$			
$\nu_{CP'-CP}$	1459(s)	1470(s)	1467(s)	π_{C-H}	808(m)	801	800
δ_{C-CN}				δ_{C-H}	718(m)	736	737
ν_{C-O}	1268(s)	1239(s)		π (环变形)	648(m)	650	649
ν_{O-H}	1209(s)	1207	1206		467(m)	467	467

表5 不对称卟啉(氯仿溶液)的电子光谱数据[λ (nm)]Tab.5 Electronic spectral data for the asymmetrical porphyrins in CHCl₃[λ (nm)]

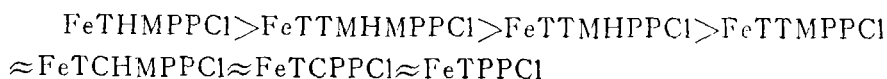
化合物	Soret	IV	III	I	I
TCHMPP	418.9	516.1	552.1	591.5	648.1
TTMHMPP	420.9	517.3	554.6	591.2	648.5
TTMHPP	420.9	517.7	554.3	591.5	648.3

对合成的几种对称卟啉和不对称卟啉的铁配合物进行了类似的表征, 证明合成的正是预定的配合物^[3]。

2.3 不对称卟啉铁配合物对环己烷氧化的催化作用

以铁卟啉配合物模拟细胞色素P450对底物氧化, 已有多种不同的体系^{[1,2][4,8]}。本文采用类似于文1,2)的体系, 底物氧化所得产物为环己醇和环己酮, 与文1,2)结果相符。各种铁卟啉组成的体系中, 底物环己烷氧化的效果如表6。由表可见, 铁卟啉催化活性的顺序为:

3) 王文雄, 计晴, 黄锦廷等。见: 第一届全国配位化学会议论文集, 南京, 1989: D-2



有关细胞色素P450催化底物羟化的研究已经表明, 羟化效果决定于O₂在其活性中心铁卟啉上的配位及活化状况, 因此, 影响小分子氧配位活化的所有因素都将对细胞色素P450模拟体系对底物的羟化效果产生直接的影响。

表6 不同金属卟啉的催化活性

Tab.6 The catalytic activity of different metalloporphyrins

催化剂	产率(%) (I)	产率(%) (II)	比例 (II / I)	产率(%) (I + II)
FeTHMPPCl	10.81	19.04	1.8	29.85
FeTTMHMPPCl	10.81	15.26	1.4	26.07
FeTTMHPPCl	6.35	19.45	3.1	25.80
FeTTMPPCl	10.03	15.00	1.5	25.03
FeTCHMPPCl	6.34	18.05	2.8	24.39
FeTCPPCl	9.23	15.10	1.6	24.33
FeTPPCl	6.67	17.60	2.6	24.27

I: Cyclohexanol

II: Cyclohexanone

分析FeTHMPPCl、FeTCHMPPCl和FeTCPPCl的催化活性与其结构的关系, 不难发现, 卟啉苯环上取代基性质对催化活性影响很大。FeTHMPPCl的4个苯环都具有推电子性质的*m*-OCH₃和*p*-OH取代基; FeTCHMPPCl除1个苯环仍为*m*-OCH₃和*p*-OH外, 其余3个苯环的取代基为拉电子性质的*p*-Cl; FeTCPPCl的4个苯环的取代基均为*p*-Cl。3种铁卟啉中, FeTHMPPCl催化活性最大, FeTCPPCl催化活性最小, 说明无论是对称卟啉还是不对称卟啉的铁配合物, 苯环上推电子取代基有利于O₂的配位活化, 而拉电子取代基则不利于O₂的配位活化。这与我们以前的研究结果是一致的^{1,2), [4]}。

FeTTMHMPPCl、FeTTMHPP和FeTTMPPCl都有类似的结果: 前两者除3个苯环上都有3, 4, 5-三甲氧基外, 第四个苯环上的取代基分别为*m*-OCH₃、*p*-OH和*p*-OH, 为不对称卟啉; 后者4个苯环上的取代基均为3, 4, 5-三甲氧基, 为对称卟啉。比较这些铁卟啉配合物的催化活性, 至少可以得到以下结论: ①三者的催化活性都较强, 看来除了它们苯环上的推电子取代基有利于分子氧配位活化外, 取代基都具有较大的空间位阻, 避免了非催化活性的μ-氧二聚物(MP)O的生成^{1), [4]}也是一个重要原因; ②FeTTMHMPPCl和FeTTMHPPCl的催化活性比FeTTMPPCl强得多, 说明在结构相近的条件下, 具有推电子取代基的不对称卟啉铁配合物比对称卟啉的有较强的催化活性; ③不对称卟啉的催化活性FeTTMHMPPCl > FeTTMHPPCl, 是由于FeTTMHMPPCl的异型苯环上的*m*-OCH₃的推电子效应及位阻效应都有利氧分子配位活化的缘故。

我们在以铁卟啉模拟细胞色素P450催化环己烷羟化时,还测定了体系的吸氧曲线(图2, 3)。从表6和图2可见,各种铁卟啉的催化活性与体系的吸氧量大小是一致的。氧气是环己烷羟化的氧源,铁卟啉的催化活性越强,羟化产物越多,所需氧气越多,故体系的吸氧量越大。但是,铁卟啉的催化活性与体系吸氧量并无一定的定量关系,这可能与环己烷羟化产物环己醇进一步氧化为环己酮的程度有关。

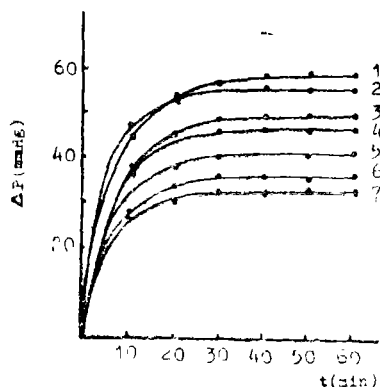


图2 不同金属卟啉的吸氧曲线

Fig.2 The oxygen uptaking curves of different metalloporphyrins

1. FeTHMPPCl, 2. FeTTMHMPPCl,
3. FeTTMHPPCl, 4. FeTTMPPCl,
5. FeTCHMPPCl, 6. FeTCPPCl,
7. FeTPPCl,

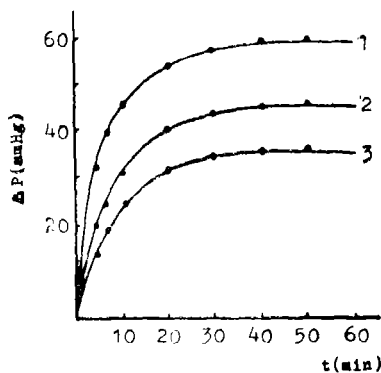


图3 不同浓度FeTTMHPPCl的吸氧曲线

Fig.3 The oxygen uptaking curves of different concentration of FeTTMHPPCl

1. $2.78 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$
2. $1.85 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$
3. $0.93 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$

本文采用的细胞色素P450模拟体系,环己烷羟化的产率高达20~30%,比以前我们报道的类似体系^{1,2)}高得多。这是由于本体系中催化剂与底物的摩尔比比较高的缘故。从图3可见,在相同的模拟体系中,随着不对称卟啉铁配合物浓度的增大,体系吸氧量也显著增大。看来,在细胞色素P450模拟体系的应用研究中,寻找催化剂与底物的合理比例,是必要的。

参 考 文 献

- 1 计亮年,刘敏,杨惠英等.化工进展,1991,3:9
- 2 Ji Liang-nian(计亮年),Liu Min(刘敏),Hsieh An Kong. Inorg Chimica Acta, 1991, 178(1): 59
- 3 Ji L N(计亮年),Liu Min(刘敏) et al, Inorg Chimica Acta, 1990, 174: 21
- 4 郑颖,曾添贤,计亮年.无机化学学报.1988,4(4): 54
- 5 Adler A D, Longo F R, Finarelli J D et al. J Org Chem, 1972, 32: 476
- 6 Kin J B, Leonard J J, Longo F R. J Am Chem Soc, 1972, 94: 3986
- 7 Walker F A, Balke V L, Mcdermott G A. Inorg Chem, 1982, 21: 3342
- 8 吴越,叶兴凯,张长安.化学通报,1988(1): 1

Synthesis of Asymmetrical Porphyrinatoiron and Studies of Hydroxylation of Cyclohexane by These Compounds as Model Enzymes of Cytochrome P450

*Ji Liangnian** *Wang Wenxiong* *Ji Qin*
Huang Jinwang *Hsieh An-Kong*

Abstract Three new asymmetrical derivatives of tetraphenylporphyrin with electron-donating and electron-withdrawing substituents in its phenyls and their iron(II) coordination compounds have been synthesized and characterized. The hydroxylation of cyclohexane by these asymmetrical porphyrinatoiron(II) chloride as model enzymes of cytochrome P450 have been studied and compared with some analogue symmetrical porphyrinatoiron(II) chloride. It has been further proved that properties and steric effect of the substituents in phenyl of porphyrins are important for catalytic activity similar to symmetrical metalloporphyrins. It seems that the catalytic activity of the asymmetrical metalloporphyrins is slightly greater than the symmetrical ones with analogue construction.

Keywords asymmetrical porphyrin, derivatives of tetraphenylporphyrin, model of cytochrome P450, cyclohexane, hydroxylation

* Department of Chemistry, Zhongshan University