

细胞色素P-450模拟酶的合成及其用于 常温常压下催化氧化苯为苯酚的研究*

郑颖 曾添贤 计亮年

(中山大学生物工程研究中心)

本文合成了三种具有不同取代基的铁卟啉配合物,其中氯化四-(4-羟基-3-甲氧苯基)卟啉铁(Ⅲ)是迄今未见报道的新化合物。用它们分别与硫醇化合物和氧一起,构成了新型的细胞色素P-450的模拟体系。实验表明,这些体系具有显著的吸氧活性并能在常温常压下将苯一步氧化为苯酚。文中还对结构与性能之间的关系进行了探讨。在实验的基础上,对羟化机制提出了初步的设想。

关键词: 细胞色素P-450 酶 合成

细胞色素P-450(以下简称P-450)的模拟研究近年来开展得十分活跃^[1,2]。但在模型化合物的结构与功能之间的关系以及模型体系的构成机制方面,尚缺乏系统的研究。到目前为止,国内有报道的模型体系多由铁配合物-抗坏血酸-氧构成^[3,4],而近

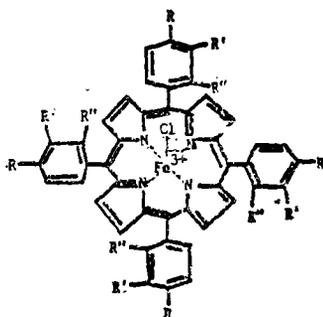


图1 合成产物的结构

Fig. 1 Structure of products

- I. $R = R' = R'' = H$ FeTPPCI
- II. $R = -OCH_3, R' = R'' = H$ FeTMPPCI
- III. $R = -OH, R' = -OCH_3, R'' = H$ FeTHMPPCI

本文于1987年6月10日收到。

* 本文为广东省科学技术委员会资助课题。

年来对P-450的活性中心的研究确证,其辅基铁卟啉的轴向配体是一硫醇化合物,该化合物对P-450的活性起着重要的作用〔2〕。

为考查卟啉环上的取代基对铁卟啉吸氧和催化性能的影响,作者合成了有不同取代基效应的三种铁卟啉配合物(图1)。并且采用硫醇化合物分别与这些铁卟啉构成了一系列新型的更接近P-450活性中心的模型体系。研究了模型体系的结构与活性之间的关系,并以血晶(氯化高铁血色素)进行了比较研究。

实 验 部 分

一、试剂和仪器

所用药品为分析纯或化学纯试剂。除文献要求纯化外均直接使用。血晶为SIGMA公司产品。

质谱和元素分析仪的型号分别为Zab-HS和Perkin-Elmer240C;红外光谱、电子光谱和核磁共振谱分别用Nicolet 5-DX、岛津UV-240和JEOL FX90Q测绘。

二、铁卟啉的合成

1. 配体(参见图1)的合成

THMPP的合成采用文献〔5〕的方法,将苯甲醛改为香草醛,产率15.6%。TPP和TMPP同法合成,产率分别为:15.9%、16.0%。

2. 铁配合物的合成

将2克THMPP溶于预先制好的氯化亚铁的冰乙酸饱和溶液中,回流4小时,用层析硅胶板检验反应进程。若反应完成(无紫红色带出现),蒸去溶剂,沉淀物用氯仿溶解,加几滴浓盐酸,振荡,水洗,蒸至近干,冷却过滤,即得紫色光泽的晶体,产率59.0%。

FeTPPCL和FeTMPPCL同上法合成,产率分别为90.4%、92.0%。

三、吸氧和羟化实验

1. 体系的构成和操作

典型模拟体系的组成为:铁卟啉0.025mmol,硫醇2.5mmol,吡啶2.5mmol,苯2.5mmol,介质(丙酮:水=9:1)5ml。

将上述物质加入自制反应装置中〔6〕,在恒温(26℃)、恒压(一大气压)下,以纯氧为氧化剂,通过测定氧的吸收量进行动力学跟踪。

2. 羟化产物分析

产物苯酚用岛津GC-9A气相色谱仪分析并定量。担体为Chromosob W,固定液为10%聚乙二醇,柱长3米,柱温180℃,气化温度220℃;氮气流速60ml/min,氢焰检测。以标准物鉴定苯酚,外标法计算苯酚的产率。

note: TPP = tetraphenylporphyrin

TMPP = tetra-(4-methoxyphenyl)porphyrin

THMPP = tetra-(4-hydroxyl-3-methoxyphenyl)porphyrin

结果与讨论

一、产物的鉴定

合成产物的元素分析数据和质谱结果见表1、表2。

表1 产物的元素分析数据

Table 1 Elementary Analysis Data of Products

| compound | calculated (%) | | | measured (%) | | |
|-----------|----------------|------|------|--------------|------|------|
| | C | H | N | C | H | N |
| THMPP | 72.17 | 4.80 | 7.20 | 71.18 | 4.75 | 6.85 |
| FeTHMPPCl | 64.91 | 4.09 | 6.31 | 66.21 | 4.26 | 6.82 |
| TMPP | 78.45 | 5.21 | 7.63 | 76.94 | 5.20 | 8.07 |
| FeTMPPCl | 69.95 | 4.40 | 6.80 | 68.20 | 4.30 | 6.53 |
| TPP | 85.96 | 4.92 | 9.12 | 84.35 | 4.85 | 8.89 |
| FeTPPCl | 75.06 | 4.01 | 7.96 | 72.23 | 3.91 | 7.33 |

表2 产物的质谱数据

Table 2 Mass Spectrum Data of Products

| compound | THMPP | FeTMPP | FeTPP |
|--------------------|--------|--------|--------|
| calculated | 798.82 | 788.66 | 668.55 |
| measured (M^+) | 799 | 788 | 668 |

TPP和TMPP的红外光谱与文献相符。THMPP的红外光谱除具有与TMPP相似的特征外，在 1205cm^{-1} 和 $3500-3400\text{cm}^{-1}$ 处还分别有强的和宽的羟基特征吸收，后者表明该分子中的对位取代羟基以强的氢键缔合形式存在。

与配体相比，铁卟啉的红外光谱最明显的区别是N-H振动吸收峰(3360cm^{-1})消失，而 1000cm^{-1} 附近的吸收增强，该吸收已被确定为金属卟啉类的特征峰^[7]。

磁化率测量确证在铁配合物中铁离子为正三价($\mu_{\text{eff}}^{\text{calc}}$: B. M. FeTPPCl 5.17; FeTMPPCl 5.34; FeTHMPPCl 5.42)。

二、取代基效应分析

取代基效应对卟啉大环性质的影响在其电子光谱(表3)和核磁共振谱(表4)中已有体现。

从表3可知，取代基的推电子效应使卟啉大环的特征吸收红移。设在TPP中取代基效应为零，则按文献[8]中的取代基常数计算，推电子效应顺序为 $\text{TMPP} > \text{THMPP} > \text{TPP}$ ，但在表3、表4中，取代基效应按

THMPP > TMPP > TPP

顺序呈明显的规律性。我们认为其原因是：在THMPP分子中，不但存在取代基与卟啉大环之间的 $\pi-p$ 共轭作用^[9]，还有由分子内羟基形成的内氢键，这些都使化合物的特征吸收红移。

表3 卟啉的吸收波长比较

Table 3 Comparison of λ_{max} of Porphyrins(solvent: acetone, λ ; nm)

| compound | soret | IV | III | I | I | $\Sigma\sigma^*$ |
|----------|-------|-----|-----|-----|-----|------------------|
| TPP | 414 | 510 | 544 | 586 | 643 | 0.000 |
| TMPP | 417 | 514 | 550 | 591 | 648 | -1.072 |
| THMPP | 420 | 515 | 552 | 591 | 648 | -0.968 |

* see[8]

表4 卟啉的化学位移比较

Table 4 Comparison of NMR Data of Porphyrins(δ , ppm)

| compound | pyrrole-H | o-phenyl-H | m-phenyl-H | N-H |
|----------|-----------|------------|------------|-------|
| TPP | 8.84 | 8.22 | 7.78 | -2.76 |
| TMPP | 8.86 | 8.14 | 7.29 | -2.75 |
| THMPP | 8.90 | 7.79 | | |

从表4还得知，推电子取代基对卟啉大环电子分布的影响是：使吡咯环上的电子密度减小（该环质子的 δ 增大），使苯环和中心氮原子上的电子密度增大（ δ 变小）。取代基的推电子能力越大，影响的程度越大。

三、模型体系的活性组分

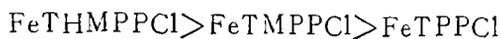
在构成模型体系时采用了下列硫醇化合物：硫酚、二巯基丙醇、巯基乙酸、半胱氨酸、3-巯基丙酸、2-巯基苯甲酸和二乙胺硫代甲酸钠。实验证明：吸氧和羟化是通过形成一活性中间配合物进行的。研究体系中各组分的作用得知：铁卟啉、硫醇和氧，是形成活性催化体系的必要条件。

对全部模型体系进行吸氧动力学跟踪，作出活性体系的吸氧曲线示于图2—4。图中每一条曲线代表一种铁卟啉，每组曲线表示在硫醇和其他条件相同的情况下，三种铁卟啉（图3中还包括血晶）的吸氧性能比较。

四、取代基对铁卟啉吸氧及催化性能的影响

考查图2—4不难看出，就初始吸氧速度而言，FeTHMPPCl和FeTMPPCl均比FeTPPCl快得多。说明卟啉环上取代基的推电子效应能够提高铁卟啉的吸氧活性。同时也使铁配合物的性质更为接近天然辅基血晶（图3）。前面的光谱分析已证明：取代基的推电子效应，使卟啉中心氮原子上的电荷密度增大。这意味着使中心铁离子的给

电子能力增强,有利于其对 O_2 的结合和活化。在图2-1, 2-2, 2-4中,吸氧速度的顺序为:



与前面光谱性质的顺序一致。因此,合成带推电子取代基的模型化合物对深入模拟研究很有意义。

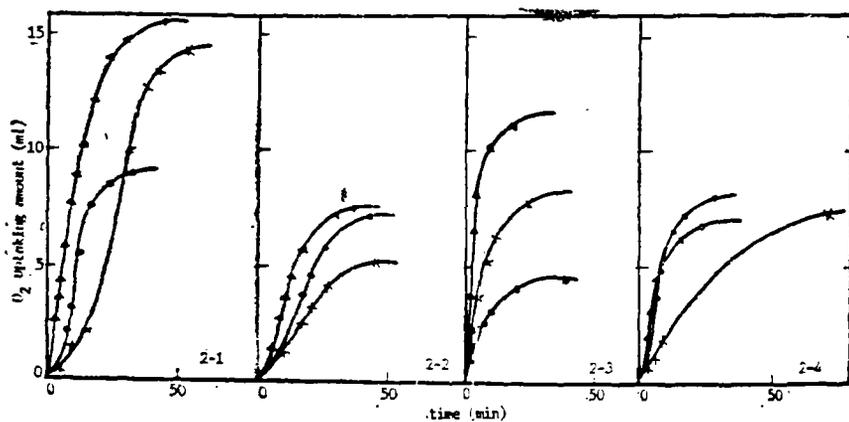


图2 模型体系的吸氧动力学曲线

Fig. 2 O_2 uptaking curves of model systems

Δ FeTHMPPCl ● FeTMPPCl \times FeTPPCl

2-1 dimercaptopropanol system

2-2 thiol phenol system

2-3 thiolglycollic acid system

2-4 3-mercaptopropionic acid system

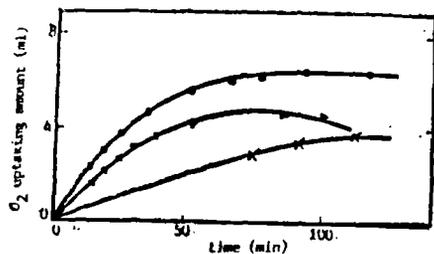


图3 邻巯基苯甲酸体系的吸氧曲线

Fig. 3 O_2 uptaking curves of o-mercaptobenzoic acid systems

\circ hemin

Δ FeTHMPPCl

● FeTMPPCl

\times FeTPPCl

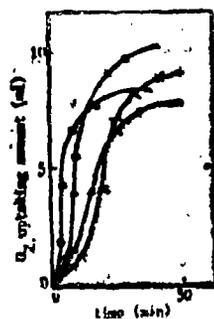


图4 半胱氨酸体系的吸氧曲线

Fig. 4 O_2 uptaking curves of cysteine systems

Δ FeTHMPPCl

● FeTMPPCl

\times FeTPPCl

表5示出在其他条件相同时,不同铁卟啉的催化羟化结果。表中数据明确体现出此类模型体系在常温常压下就有显著的羟化活性。

比较FeTMPPCl与FeTPPCL的催化结果可知:取代基的推电子效应对羟化有利。不过,在羟化过程中由于涉及的因素比吸氧复杂(如中间配合物稳定性、其结构是否利于与底物苯的接触、羟化反应的最适合时间等),而可能导致羟化产率与吸氧性能不一致。怎样将二者统一起来,有待进一步的研究。

表5 模型体系的羟化结果

Table 5 Hydroxylation Results of Model Systems

| catalyst | thiol compound | base | pH | yield(%) |
|-----------|----------------|----------|-----|----------|
| FeTPPCL | | | | 11.5 |
| FeTMPPCl | thiol phenl | pyridine | 5~7 | 41.6 |
| FeTHMPPCl | | | | 9.45 |

五、硫醇化合物的作用

图5是对羟化体系进行电子光谱跟踪的典型谱图。由图得知体系在反应过程中形成了新的配合物。实验时也观察到,当体系pH为5~7时,体系中生成棕红色的物质。且只有形成这种棕红物质的体系有吸氧和羟化苯为苯酚的能力。据此推测该棕红色物质是一活性中间配合物,由铁卟啉和硫醇生成,并具有图5中I所代表的新配合物的特征。此实验结果验证了文献[10]中认为硫醇在羟化体系中起配位与还原双重作用的观点。硫醇的还原作用是将三价铁还原为二价铁,所生成的配合物才有吸氧活性。



图5 FeTPPCL—硫醇体系的电子光谱

Fig. 5 UV spectrum of FeTPPCL-thiol phenol model system

- time = 0(min)
- time = 2(min)
- · - · - time = 5(min)
- time = 10(min)

在选用的七种硫醇化合物中,由二乙胺硫代甲酸钠构成的体系既不形成棕红色物质,又不吸氧,原因就是其分子中没有巯基(-SH),不能将三价铁还原,因而不能形

成吸氧配合物。

有活性的六种硫醇中，以二巯丙醇的作用效果最显著(图2-1)。说明给电子能力强，配位能力强(二巯丙醇分子中的羟基推电子，与其他几个硫醇相比，其分子中巯基上的电荷密度最大)的硫醇，对吸氧有利。

六、碱的作用

由正交实验表明，碱的存在有利于吸氧和羟化。而且碱的性质会影响羟化结果。图6中示出采用不同碱时FeTPPCl-二巯丙醇体系的羟化产率-时间曲线。由图可知以吡啶为碱效果较好。估计吡啶在此除起调节pH的作用外，还参与配位使吸氧前的五配位物质稳定化；同时它又易被O₂取代，不会妨碍吸氧的进行，因而有利于羟化。

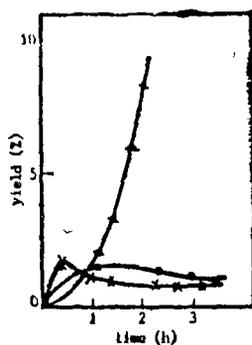


图6 不同碱体系的产率-时间曲线

Fig. 6 Yield-time curves of model systems FeTPPCl-DMP-B

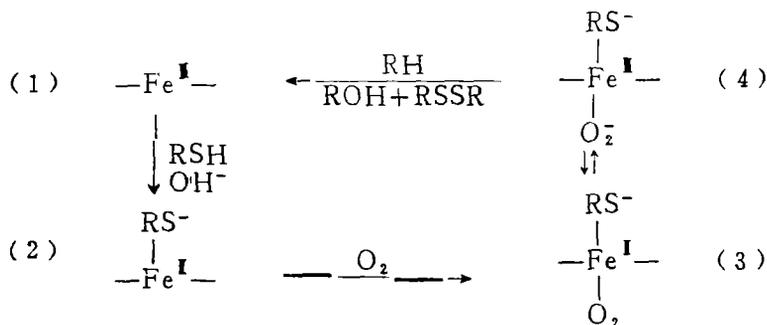
▲ B = pyridine

× B = imidazole

● B = Me₄NOH

(DMP = dimercaptopropanol)

综合上述实验结果并结合文献[11]报道归纳出：在此类羟化体系中催化羟化的机制如下：



在上面的循环中，铁卟啉(1)与硫醇化合物在碱性条件下生成五配位的二价铁配合物(2)。(2)具有强的吸氧活性，易吸氧生成(3)。(3)在巯基的推电子作用下，中心铁离子的 d_{z^2} 轨道能级升高，电子易于由铁向O₂的 π^* 轨道反馈，从而使O₂活化，生成(4)。(4)是强氧化剂，能将苯一步氧化为苯酚。我们还认为在羟化过程中所形成的棕红色物

质可能是(4)。

参 考 文 献

- [1] Guengrich, F.F. et al., *Acc.Chem.Res.*, 17, 9-16(1984).
- [2] Sakurai, K., *Kagaku Zokan.*, 95, 21-38(1982).
- [3] 张岱山, 吴越, 催化学报, 4(2), 1(1983).
- [4] 李广年等, 催化学报, 2(4), 323(1981).
- [5] Adler, A.D. et al., *J. Amer.Chem.Soc.*, 97(18), 5107(1975).
- [6] 叶兴凯等, 燃料化学学报, 9, 130(1981).
- [7] 曹锡章等, 高等学校化学学报, 6(1), 13(1985).
- [8] 邢其毅著, 基础有机化学, 高等教育出版社, 上册, 425页(1983).
- [9] 徐光宪著, 物质结构, 人民教育出版社, 下册, 520页(1962).
- [10] Davis, R. et al., *J. Amer.Chem.Soc.*, 103(25), 7647(1981).
- [11] Sakurai, H. et al., *Inorg.Chim.Acta*, 91, L9(1984).

SYNTHESES OF MODEL ENZYMES OF CYTOCHROME P-450 AND STUDIES OF HYDROXYLATION OF BENZENE TO PHENOL BY THESE MODEL SYSTEMS UNDER MILD CONDITIONS

Zheng Ying Zeng Tianxian Ji Liangnian

(*Biotechnology Research Center, Zhongshan University*)

As we know, the active site of many enzymes are metallic coordination compounds. We report here that two derivatives of tetraphenylporphyrin(TPP), with different substituents, and their iron(II) compounds have been prepared. These compounds as shown in the text are model compounds of hemin. Compound I is a new one which has not been reported in any literatures before. Hydroxylation of benzene to phenol, under mild conditions, was also studied by the systems consisting of the synthetic iron porphyrins and thiol compounds as a model system of cytochrome P-450. The O₂ uptaking abilities of these systems were tested and the yield of hydroxylation were measured. The results show that the iron porphyrins which have electron-donating substituents exhibit better O₂ uptaking activities than TPP iron complex. The maximum yield of hydroxylation of benzene is about 40%.

Keywords cytochrome p-450 enzyme synthesis