

# $\alpha$ -糜蛋白酶催化合成二吡咯甲烷衍生物

刘联胜, 姜国芳, 付磊涵, 谢宗波\*, 乐长高\*

(东华理工大学 应用化学系, 江西 南昌 330013)

**摘要:** 以 $\alpha$ -糜蛋白酶为生物催化剂, 以体积分数40%的乙醇水溶液为反应介质, 50℃下, 通过吡咯与醛的串联反应, 合成了一系列二吡咯甲烷衍生物。当对硝基苯甲醛1 mmol, 吡咯4 mmol,  $\alpha$ -糜蛋白酶20 mg, 该反应在50℃时反应3 h即可完成, 具有较好的底物适应性, 且产率最高可达69%, 也无需氮气保护。

**关键词:**  $\alpha$ -糜蛋白酶; 二吡咯甲烷衍生物; 生物催化; 酶的非专一性; 精细化工中间体

**中图分类号:** TQ314 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5214 (2018) 06-1077-04

## Enzymatic Synthesis of Dipyrromethanes Catalyzed by $\alpha$ -Chymotrypsin

LIU Lian-sheng, JIANG Guo-fang, FU Lei-han, XIE Zong-bo\*, LE Zhang-gao\*

(Department of Applied Chemistry, East China University of Technology, Nanchang 330013, Jiangxi, China)

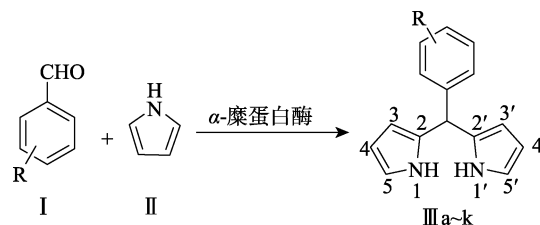
**Abstract:** A series of dipyrromethanes were synthesized via  $\alpha$ -chymotrypsin-catalyzed tandem reaction between pyrrole and aldehydes at 50 °C using 40% (volume fraction) alcohol aqueous solution as reaction medium. When p-nitrobenzaldehyd 1 mmol, pyrrole 4 mmol,  $\alpha$ -chymotrypsin 20 mg, this reaction could complete within 3 h at 50 °C, under no protection of nitrogen. Moreover, the reaction had advantages of broad substrate scope. The highest yield of product could be up to 69%.

**Key words:**  $\alpha$ -chymotrypsin; dipyrromethanes; biocatalysis; enzyme promiscuity; fine chemical intermediates

**Foundation items:** National Natural Science Foundation of China (21462001, 21465002), Science and Technology Projects of Jiangxi (20142BAB203008), Science and Technology Foundation of the Jiangxi Education Department (KJLD12006, GJJ14466, KJLD14050)

二吡咯甲烷类化合物是合成杯卟啉、杯吡咯、卟啉及其衍生物, 如灵杆菌素、血红素类、叶绿素类物质的重要前体<sup>[1]</sup>, 这些物质可以运用到手性催化剂、手性传感器以及合成受体的设计中<sup>[2]</sup>。在过去几十年间, 大量合成二吡咯甲烷类化合物的方法被开发出来, 比如: 用三氟乙酸<sup>[3-5]</sup>、TiCl<sub>4</sub><sup>[6]</sup>、三氟甲磺酸盐<sup>[7]</sup>、I<sub>2</sub><sup>[8]</sup>、对甲苯磺酸<sup>[9]</sup>、阳离子交换树脂<sup>[10]</sup>等作为催化剂的方法已被报道。酶作为生物体内大量生化反应的催化剂, 其绿色、安全、高效的特点已得到化学家们的广泛关注, 并将酶的非专一性运用到多种有机合成反应中且取得了较好的效果<sup>[11-12]</sup>。例如: C—N键<sup>[13]</sup>、C—C键<sup>[14]</sup>、C—S键<sup>[15]</sup>的形成反应。但鲜见酶催化合成二吡咯甲烷及其衍生物

报道。结合本课题组之前的工作<sup>[16]</sup>, 作者尝试将 $\alpha$ -糜蛋白酶用于二吡咯甲烷及其衍生物的催化合成中, 反应路线如下所示:



## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

吡咯 (质量分数 99%), 萨恩化学技术 (上海)

收稿日期: 2017-08-28; 定用日期: 2018-01-12; DOI: 10.13550/j.jxhg.20170701

基金项目: 国家自然科学基金 (21462001, 21465002); 江西省自然科学基金 (20142BAB203008); 江西省教育厅科技项目 (KJLD12006, GJJ14466 和 KJLD14050)

作者简介: 刘联胜 (1991—), 男, 硕士生。联系人: 谢宗波 (1978—), 男, 博士, 教授, E-mail: zbxie@ecit.cn; 乐长高 (1967—), 男, 博士, 教授, 博士生导师, E-mail: zhgle@ecit.cn。

有限公司; 醛 (质量分数 98%), 梯希爱 (上海) 化成工业发展有限公司; 氘代氯仿 (氘代率 99.8%, 含体积分数 0.03% TMS)、 $\alpha$ -糜蛋白酶 (800 U/mg), 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 其他试剂均为 AR。所有试剂使用前未经任何处理。

WRS-2A 型微机熔点仪, 上海仪电物理光学仪器有限公司 (使用前温度未经校正, 起始温度为 60 °C, 升温速率为 1 °C/min); Bruker AV-400 型核磁共振波谱仪, 瑞士 Bruker 公司。

## 1.2 模板反应

在 10 mL 具塞锥形瓶中, 加入 0.2684 g (4 mmol) 吡咯、0.1511 g (1 mmol) 对硝基苯甲醛、20 mg  $\alpha$ -糜蛋白酶和 3 mL 体积分数 40% 的乙醇水溶液, 于 50 °C 恒温摇床 (270 r/min) 中反应 3 h, 经柱色谱分离 (体积比 4 : 1 的正己烷和乙酸乙酯) 得到目标产物。

## 2 结果与讨论

### 2.1 温度对酶促反应的影响

温度不仅是影响化学反应速率的重要因素, 也是影响酶活性的重要因素, 因此, 优先考察了温度对模板反应的影响, 结果见表 1。

表 1 温度对酶促反应的影响

	温度/°C				
	20	30	40	50	60
产率/%	30	48	55	61	55

反应条件: 对硝基苯甲醛 1 mmol, 吡咯 4 mmol, 体积分数 40% 乙醇水溶液 3 mL,  $\alpha$ -糜蛋白酶 20 mg, 反应时间 3 h; 柱色谱分离产率。

由表 1 可见, 随着温度升高反应产率也逐渐升高, 当温度为 50 °C 时产率取得最大值 61%, 之后, 再升高温度产率反而降低。因为酶是生物催化剂, 过高的温度会使酶蛋白变性失活, 从而影响其催化性能, 导致反应产率降低。因此, 选择 50 °C 作为最佳反应温度。

### 2.2 催化剂用量对酶促反应的影响

催化剂用量对酶促反应的影响见表 2。

表 2 催化剂用量对酶促反应的影响

	酶/mg					
	0	5	10	15	20	25
产率/%	0	23	38	53	61	61

反应条件: 对硝基苯甲醛 1 mmol, 吡咯 4 mmol, 体积分数 40% 乙醇水溶液 3 mL, 反应温度 50 °C, 反应时间 3 h; 柱色谱分离产率。

由表 2 可见, 不加催化剂时, 没有产物生成, 当  $\alpha$ -糜蛋白酶催化剂用量为 5 mg 时, 产率为 23%; 随着酶用量的增加产率不断提高, 当酶用量增至 20 mg 时, 产率达到了最大值 61%。因此, 最终选择 20 mg 为最佳酶用量。

### 2.3 二吡咯甲烷衍生物的合成

确定酶促反应的最佳条件后, 又考察了该法底物普适性, 选取一系列取代苯甲醛与吡咯反应, 结果如表 3 所示。

表 3 二吡咯甲烷衍生物的合成  
Table 3 Synthesis of dipyrromethanes

序号	R	产物	产率/%
1	4-NO <sub>2</sub>	III a	61
2	2-NO <sub>2</sub>	III b	55
3	4-Br	III c	58
4	4-F	III d	48
5	4-OCH <sub>3</sub>	III e	38
6	4-CH <sub>3</sub>	III f	30
7	3-NO <sub>2</sub>	III g	69
8	3-Br	III h	51
9	2-Br	III i	54
10	2-CH <sub>3</sub>	III j	28
11	2-OCH <sub>3</sub>	III k	35

反应条件: 醛 1 mmol, 吡咯 4 mmol, 40% 乙醇水溶液 3 mL,  $\alpha$ -糜蛋白酶 20 mg, 50 °C 反应 3 h; 柱色谱分离产率。

由表 3 可知,  $\alpha$ -糜蛋白酶能够催化多种芳香醛与吡咯反应, 生成二吡咯甲烷类化合物; 同时苯甲醛的取代基对反应效果影响较大, 连有吸电子取代基的苯甲醛反应产率较高 (表 3, 序号 1~4, 7~9), 而苯甲醛连有供电子基团时产率明显较低 (表 3, 序号 5~6, 10~11), 主要是因为吸电子基团降低了醛羰基的电子云密度, 有利于反应的进行; 而空间效应对反应的影响不太明显。

III a<sup>[2]</sup>: 黄色固体, 熔点 160~163 °C; <sup>1</sup>HNMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$ : 5.59 (s, 1H, C—H), 5.75~5.93 (m, 2H, H3), 6.06~6.23 (m, 2H, H4), 6.63~6.82 (m, 2H, H5), 7.36 (d,  $J=8.5$  Hz, 2H, Ar—H), 7.98 (s, 2H, N—H), 8.16 (d,  $J=8.5$  Hz, 2H, Ar—H)。

III b<sup>[10]</sup>: 黄色液体, <sup>1</sup>HNMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$ : 5.85 (s, 1H, C—H), 6.13~6.19 (m, 4H), 6.70~6.72 (m, 2H, H5), 7.27~7.28 (m, 1H, Ar—H), 7.36~7.39 (m, 1H, Ar—H), 7.49~7.52 (m, 1H, Ar—H), 7.83~7.87 (m, 1H, Ar—H), 8.18 (s, 2H, N—H)。

III c<sup>[2]</sup>: 黄色固体, 熔点 123~124 °C; <sup>1</sup>HNMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$ : 5.42 (s, 1H, C—H), 5.89 (s, 2H, H3), 6.17 (dd,  $J=2.8, 5.9$  Hz, 2H, H4), 6.71 (dd,  $J=2.6, 4.2$  Hz, 2H, H5), 7.09 (d,  $J=8.4$  Hz, 2H, Ar—H), 7.44 (d,  $J=8.4$  Hz, 2H, Ar—H), 7.84~8.05 (s, 2H, N—H)。

III d<sup>[2]</sup>: 棕色固体, 熔点 79~81 °C; <sup>1</sup>HNMR

(400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$ : 5.47 (s, 1H, C—H), 5.89 (s, 2H, H3), 6.15 (d,  $J=2.8$  Hz, 2H, H4), 6.71 (s, 2H, H5), 6.91~7.07(m, 2H, Ar—H), 7.09~7.22(m, 2H, Ar—H), 7.86 (s, 2H, N—H)。

III e<sup>[2]</sup>: 黄色固体, 熔点 99~101 °C; <sup>1</sup>HNMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$ : 3.79 (s, 3H, O—CH<sub>3</sub>), 5.43 (s, 1H, C—H), 5.80~6.03 (m, 2H, H3), 6.17 (dd,  $J=2.8$ , 6.0 Hz, 2H, H4), 6.63~6.74 (m, 2H, H5), 6.85 (d,  $J=8.6$  Hz, 2H, Ar—H), 7.13 (d,  $J=8.6$  Hz, 2H, Ar—H), 7.94 (s, 2H, N—H)。

III f<sup>[2]</sup>: 黄色固体, 熔点 108~110 °C; <sup>1</sup>HNMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$ : 2.33 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 5.45 (s, 1H, C—H), 5.92 (s, 2H, H3), 6.16 (dd,  $J=2.8$ , 5.9 Hz, 2H, H4), 6.69 (dd,  $J=2.6$ , 4.2 Hz, 2H, H5), 7.10~7.14 (m, 4H, Ar—H), 7.94 (s, 2H, N—H)。

III g<sup>[17]</sup>: 黄色固体, 熔点 133~135 °C; <sup>1</sup>HNMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$ : 5.58 (s, 1H, C—H), 5.81~5.93 (m, 2H, H3), 6.10~6.24 (m, 2H, H4), 6.67~6.83 (m, 2H, H5), 7.47 (t,  $J=7.9$  Hz, 1H, Ar—H), 7.55 (d,  $J=7.7$  Hz, 1H, Ar—H), 8.02 (s, 2H, N—H), 8.11 (t,  $J=8.1$  Hz, 2H, Ar—H)。

III h: 黄色固体, 熔点 137~139 °C; <sup>1</sup>HNMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$ : 5.44 (s, 1H, C—H), 5.90 (s, 2H, H3), 6.15~6.17 (m, 2H, H4), 6.70~6.72 (m, 2H, H5), 7.13~7.20 (m, 2H, Ar—H), 7.37~7.40 (m, 2H, Ar—H), 7.95 (s, 2H, N—H)。

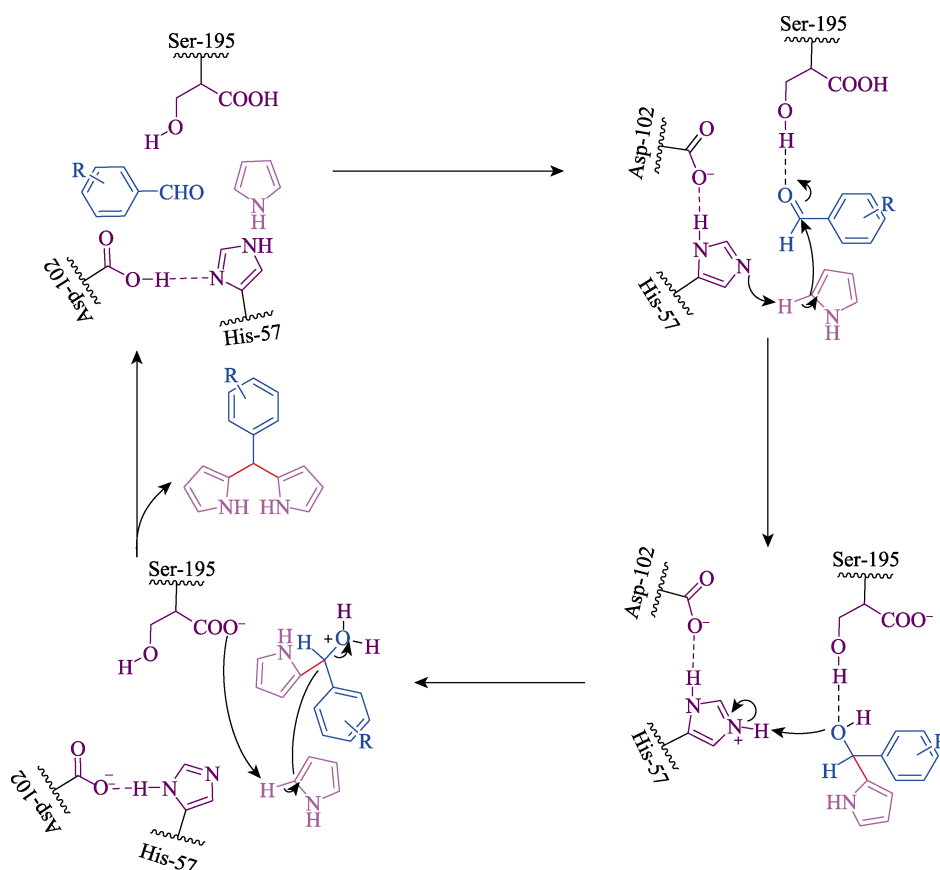
III i<sup>[17]</sup>: 棕色固体, 熔点 164~165 °C; <sup>1</sup>HNMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$ : 5.89 (t,  $J=2.6$  Hz, 3H), 6.16 (q,  $J=2.9$  Hz, 2H), 6.71 (d,  $J=1.4$  Hz, 2H), 7.09 (q,  $J=1.4$  Hz, 2H, Ar—H), 7.24 (t,  $J=7.0$  Hz, 1H, Ar—H), 7.57 (d,  $J=7.9$  Hz, 1H, Ar—H), 8.00 (s, 2H, N—H)。

III j<sup>[18]</sup>: 棕色固体, 熔点 99~101 °C; <sup>1</sup>HNMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$ : 2.30 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 5.37 (s, 1H, C—H), 5.85 (d, 2H, H3), 6.21 (d,  $J=2.7$  Hz, 2H, H4), 6.69 (d,  $J=2.6$  Hz, 2H, H5), 7.11~7.19 (m, 4H, Ar—H), 7.81 (s, 2H, N—H)。

III k<sup>[7]</sup>: 黄色固体, 熔点 113~116 °C; <sup>1</sup>HNMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$ : 3.83 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 5.78 (s, 1H, C—H), 5.91 (s, 2H, H3), 6.15 (d,  $J=2.5$  Hz, 2H, H4), 6.63 (d,  $J=1.4$  Hz, 2H, H5), 6.94~6.97 (m, 2H, Ar—H), 7.12 (d,  $J=6.8$  Hz, 1H, Ar—H), 7.28 (t,  $J=7.8$  Hz, 1H, Ar—H), 7.97 (s, 2H, N—H)。

## 2.4 反应机理的推测

$\alpha$ -糜蛋白酶属于肽酶 S1 族的丝氨酸蛋白酶, 含有 245 个氨基酸残基, 催化三联体由 His-57、Asp-102 和 Ser-195 组成<sup>[19-21]</sup>。由此推测,  $\alpha$ -糜蛋白酶催化合成二吡咯甲烷类化合物的可能机理, 如下式所示。His-57 先夺取吡咯 C-2 上的质子, 使吡咯作为亲核试剂进攻被 Ser-195 通过氢键活化的醛羰基, 生成的吡咯醇与另一分子吡咯以类似的方式结合在一起, 生成二吡咯甲烷类化合物。



### 3 结论

本文发展了一种生物催化合成二吡咯甲烷衍生物的方法, 并对可能的催化机理进行了推测。该法用生物催化剂替代了传统的化学催化剂, 反应条件较为温和。该研究进一步拓展了生物催化及酶非专一性的应用范围, 对推动酶促反应方法学的发展及其在有机合成中的应用具有积极意义。

#### 参考文献:

- [1] Wu Z, Hu J, Wang K. One-step synthesis of dipyrromethanes in water[J]. *Chinese J Org Chem*, 2012, 32(3): 616-620.
- [2] Kabeer A S, Patil V A, Ahmed A. A novel method for the synthesis of dipyrromethanes under solvent-free condition[J]. *E-J Chem*, 2012, 9(4): 1796-1800.
- [3] Rao P D, Littler B J, Geier III R G, *et al.* Efficient synthesis of monoacyl dipyrromethanes and their use in the preparation of sterically unhindered trans-porphyrins[J]. *J Org Chem*, 2000, 65(4): 1084-1092.
- [4] Geier III R G, Lindsey J S. Effects of aldehyde or dipyrromethane substituents on the reaction course leading to meso-substituted porphyrins[J]. *Tetrahedron*, 2004, 60(50): 11435-11444.
- [5] Ak M, Gancheva V, Terlemezyan L, *et al.* Synthesis of a dipyrromethane functionalized monomer and optoelectrochromic properties of its polymer[J]. *Eur Polym J*, 2008, 44(8): 2567-2573.
- [6] Setsune J-I, Hashimoto M, Shiozawa K. Synthesis and atropisomerism of meso-tetraarylporphyrins with mixed meso-aryl groups having ortho-substituents[J]. *Tetrahedron*, 1998, 54(8): 1407-1424.
- [7] Temelli B, Unaleroğlu C. A novel method for the synthesis of dipyrromethanes by metal triflate catalysis[J]. *Tetrahedron*, 2006, 62(43): 10130-10135.
- [8] Faugeras P A, Boëns B, Elchinger P H. Synthesis of meso-substituted dipyrromethanes using iodine-catalysis[J]. *Tetrahedron Lett*, 2010, 51: 4630-4632.
- [9] Boyle R W, Xie L Y, Dolphin D. meso-Phenyl substituted porphocyanines: A new class of functionalized expanded porphyrins[J]. *Tetrahedron Lett*, 1994, 35(30): 5377-5380.
- [10] Naik R, Joshi P, Kaiwar S P. Facile synthesis of meso-substituted dipyrromethanes and porphyrins using cation exchange resins[J]. *Tetrahedron*, 2003, 59(13): 2207-2213.
- [11] Humble M S, Berglund P. Biocatalytic promiscuity[J]. *Eur J Org Chem*, 2011, 2011: 3391-3401.
- [12] Busto E, Gotor-Fernandez V, Gotor V. Hydrolases: Catalytically promiscuous enzymes for non-conventional reactions in organic synthesis[J]. *Chem Soc Rev*, 2010, 39(11): 4504-4523.
- [13] Wu W B, Xu J M, Wu Q. Promiscuous acylases-catalyzed markovnikov addition of *N*-heterocycles to vinyl esters in organic media[J]. *Adv Synth Catal*, 2006, 348(4/5): 487-492.
- [14] Xu J M, Zhang F, Liu B K. Promiscuous zinc-dependent acylase-mediated carbon-carbon bond formation in organic media[J]. *Chem Commun*, 2007, 2007(20): 2078-2080.
- [15] Lou F W, Liu B K, Wu Q. Candida antarctica lipase B (CAL-B)-catalyzed carbon-sulfur bond addition and controllable selectivity in organic media[J]. *Adv Synth Catal*, 2008, 350(13): 1959-1962.
- [16] Xie Z B, Sun D Z, Jiang G F, *et al.* Facile synthesis of bis (indolyl) methanes catalyzed by  $\alpha$ -chymotrypsin[J]. *Molecules*, 2014, 19(12): 19665-19677.
- [17] Zhang Y, Liang J, Shang Z C. Fast and eco-friendly synthesis of dipyrromethanes by  $H_2SO_4 \cdot SiO_2$  catalysis under solvent-free conditions[J]. *Chin J Chem*, 2010, 28(2): 259-262.
- [18] Said A H E, Hassan G B. Nano  $Fe_3O_4$ -catalyzed one-pot synthesis of dipyrromethanes under solvent-free condition[J]. *Org Chem: An Indian J*, 2015, 11: 403-407.
- [19] Kumar A, Venkatesu P. Overview of the stability of  $\alpha$ -chymotrypsin in different solvent media[J]. *Chem Rev* 2012, 112(7): 4283-4307.
- [20] Liu Y, Liu R. The interaction of  $\alpha$ -chymotrypsin with one persistent organic pollutant (dicofol): spectroscopy and molecular modeling identification[J]. *Food Chem Toxicol*, 2012, 50(9): 3298-3305.
- [21] Blow D M, Birtoft J J, Hartley B S. Role of a buried acid group in the mechanism of action of chymotrypsin[J]. *Nature*, 1969, 221: 337-340.
- [4] Donald D S. Diimidazopyrazines and tetracarboxamidopyrazines: US3959277[P]. 1976-05-25.
- [5] Antje G S, Helmut G, Jan-Michael S. Pyrazine-2, 5-diamines as novel oxidation dye precursors of the developer type: DE102016205615[P]. 2017-02-23.
- [6] Heribert L, Frank K. Hair dye containing 1, 2, 4, 5-tetraaminobenzene and a second oxidative dye: DE10020733 A1[P]. 2001-11-08.
- [7] Naoki W, Fuyuhiko K, Yasuko K, *et al.* Polybenzazoles and fibers thereof with improved durability: JP2007308632 A[P]. 2007-11-29.
- [8] Zhao F, Zhang J, Zhang L, *et al.* Discovery and optimization of a series of imidazo[4, 5-*b*]pyrazine derivatives as highly potent and exquisitely selective inhibitors of the mesenchymal-epithelial transition factor (c-Met) protein kinase[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2016, 24(18): 4281-4290.
- [9] Martínez G S, Hernández A I, Varela C, *et al.* Imidazo[1, 2-*a*]pyrazines as novel PI3K inhibitors[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2012, 22(5): 1874-1878.
- [10] Guillou S, Jacob G, Terrier F, *et al.* An unexpected synthesis of 7-azidofurazano[3, 4-*b*]tetrazolo-pyrazine[J]. *Tetrahedron*, 2009, 65(43): 8891-8895.
- [11] Li Haibo (李海波), Cheng Bibo (程碧波), Li Hongzhen (李洪珍). Synthesis of 2, 6-diamino-3, 5-dinitropyrazine-1-oxide[J]. *Chinese J Org Chem (有机化学)*, 2007, 27(1): 112-115.
- [12] Pagoria P F, Mitchell A R, Bala K. New synthesis of 2, 6-diamino-3, 5-dinitropyrazine-1-oxide from 2, 6-diaminopyrazine-1-oxide: US2009/0299067[P]. 2009-12-03.
- [13] Hayashi E, Yamanaka H, Shimizu K. A new deoxygenation reaction of an aromatic heterocyclic *N*-oxides[J]. *Chem Pharm Bull*, 1958, 6(3): 323.
- [14] Den Hertog H J, Overhoff J. Pyridine-*N*-oxide as an intermediate for the preparation of 2- and 4-substituted pyridines[J]. *Recl Trav Chim Pays-Bas*, 2015, 69(4): 468-473.
- [15] Vohra S K, Harrington G W, Zacharias D E, *et al.* New synthesis of 2-amino-6-alkoxy-pyrazines from *N*-nitrosobis(cyanomethyl)amine and alkoxides[J]. *J Org Chem*, 1979, 44(7): 1128-1130.
- [16] Ma Haixia, Song Jirong, Zhao Fengqi, *et al.* Crystal structure, safety performance and density functional theoretical investigation of 2, 6-diamino-3,5-dinitropyrazine-1-oxide (LLM-105)[J]. *Chinese J Chem*, 2008, 26(11): 1997-2002.

(上接第 1071 页)