

研究报告(001~006)

紫外分光光度法-核磁共振法用于  
胆甾类人工受体对酚类的识别研究叶英<sup>1,3</sup>, 索有瑞<sup>1,2</sup>, 杨永晶<sup>1,3</sup>, 杨芳<sup>1,3</sup>, 韩丽娟<sup>1,3</sup>

(1. 中国科学院西北高原生物研究所, 青海 西宁 810001;

2. 青海大学农林科学院, 青海 西宁 810016; 3. 中国科学院大学研究生院, 北京 100049)

摘要: 利用常规加热方法, 以脱氧胆酸甲酯为主体、芳酰胺及氨基酸甲酯为手臂合成了分子钳 a-d。利用紫外分光光度法及<sup>1</sup>H NMR 研究考察了部分分子钳对苯酚、对甲氧基苯酚、间甲氧基苯酚的识别性能, 并测定了主客体之间的结合常数(*K<sub>a</sub>*)和自由能变化值(- $\Delta G^0$ )。研究表明, 主体分子钳与所考察的酚类化合物可形成 1:1 型超分子配合物。

关键词: 脱氧胆酸; 分子钳; 酚类化合物; 紫外分光光度法; 识别性能

中图分类号: O657.3

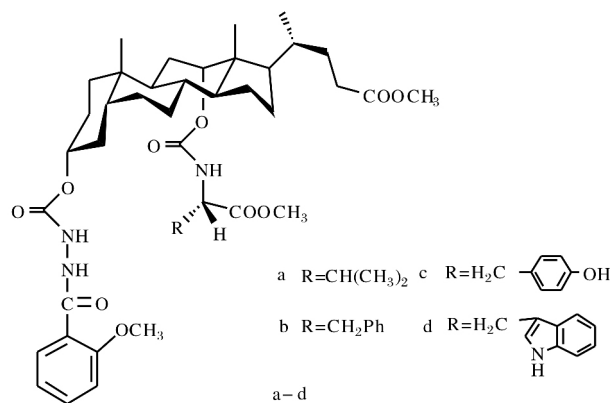
文献标志码: A

文章编号: 1006-3757(2015)01-0001-06

酚类化合物是重要的有机化工原料, 广泛地应用于医药、农药、染料、涂料、炼油等领域<sup>[1-2]</sup>。然而很多酚又是中等强度的化学毒物, 处置不当容易造成环境污染。目前含酚废水已经成了当今世界上危害大、污染范围广的工业废水之一, 是环境中水污染的重要来源<sup>[3]</sup>。酚类化合物的用途与危害并重, 为了在生产中能够扬长避短地发挥其功能作用, 化学工作者们一直热衷于研究酚类化合物的各种化学行为与作用机理<sup>[4-5]</sup>。

此外, 不同类型人工受体的合成及分子识别性能研究也是现代生物有机化学的研究热点<sup>[6]</sup>。通过人工受体的分子识别性能研究可以更好地了解受体与底物分子之间的相互作用, 从而开拓出更有效的化学试剂应用于生物传感、新药合成、手性拆分、仿生催化等领域<sup>[7]</sup>。为了研究酚类化合物与相关受体的作用过程, 使其能更好地应用于我们的生活、生产中, 同时也为了进一步拓展胆甾类人工受体的研究, 本文利用常规加热方法, 以脱氧胆酸甲酯为主体、芳酰胺及氨基酸甲酯为手臂合成了分子钳 a-d (scheme 1), 并且利用紫外分光光度法及<sup>1</sup>H NMR 研究考察

了主体化合物对苯酚、对甲氧基苯酚、间甲氧基苯酚的识别性能。



Scheme 1 Target compounds a-d

## 1 实验部分

### 1.1 主要仪器与试剂

Varian INOVA-400 MHz 核磁共振仪(美国 Varian 公司); TU-1901 型分光光度计(北京普析

收稿日期: 2015-03-08; 修订日期: 2015-03-24.

基金项目: 国家国际科技合作专项(S2014GR0058) 资助.

作者简介: 叶英(1983-), 女, 工程师, 博士研究生, 主要从事生物有机化学和天然药物化学方面的研究.

通信作者: 索有瑞, 研究员, 《分析测试技术与仪器》副主编, 主要从事生物有机化学和天然药物化学方面的研究.

E-mail: yrsuo@nwipb.cas.cn

通用仪器有限公司); XT-4 型熔点测定仪(温度计未经校正,上海团结仪器制造有限公司); DF-101S 集热式磁力搅拌器(河南省予华仪器有限公司)。

$\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ( $\geq 99.5\%$ ): 上海展云化工有限公司; 乙酸乙酯 ( $\geq 99.5\%$ ): 天津市大茂化学试剂厂;  $\text{NaHCO}_3$  ( $\geq 99.5\%$ ): 天津市致远化学试剂有限公司; 无水  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  ( $\geq 99\%$ ): 天津市津北精细化工有限公司; 脱氧胆酸 (98%)、吡啶 ( $\geq 99\%$ )、三光气 (99%)、邻甲氧基苯甲酸 (99%)、氘代氯仿-d ( $99.8\%$ )、L-缬氨酸 (99%)、L-苯丙氨酸 (99%)、L-酪氨酸 (99%)、L-色氨酸 (99%): 均为上海晶纯生化科技股份有限公司生产。无水  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : 分析纯  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  加  $\text{CaH}_2$  回流数天, 反应前蒸出使用; 无水吡啶: 分析纯吡啶加 KOH 干燥 24 h 后过滤, 蒸馏后使用。L-氨基酸甲酯盐酸盐按文献<sup>[8]</sup>制备, 脱氧胆酸甲酯中间体 2 按文献<sup>[9]</sup>合成, 邻甲氧基苯甲酰肼按文献<sup>[10]</sup>合成。

### 1.2 中间体 3 的常规合成法<sup>[11]</sup>

在 50 mL 圆底烧瓶中加入 0.5 mmol 中间体 2、8~10 mL 无水  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 、0.5 mL 无水吡啶、0.18 mmol 三光气, 于 50 °C 下加热回流反应 1~2 h, TLC 监测反应进程。待反应完全后, 往反应体系中再加入 1 mmol 邻甲氧基苯甲酰肼、0.5 mL 无水吡啶, 65 °C 下加热回流反应 2~3 h, TLC 监测反应进程。待反应完全后减压蒸去  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 残余物加乙酸乙酯溶解, 所得溶液依次用饱和  $\text{NaHCO}_3$ 、饱和食盐水洗涤, 收集有机相并用无水  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  干燥过夜, 过滤, 减压蒸去溶剂, 柱层析分离纯化, 得白色固体, 产率 75% m. p. 98.9~100.2 °C。

### 1.3 分子钳 a-d 的合成通法<sup>[11]</sup>

在 50 mL 圆底烧瓶中加入 0.5 mmol 中间体 3、8~10 mL 无水  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 、0.5 mL 无水吡啶、0.18 mmol 三光气, 于 65 °C 下加热回流反应 3~4 h, TLC 监测反应进程。待反应完全后减压蒸去  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 残余物加乙酸乙酯溶解, 所得溶液依次用饱和  $\text{NaHCO}_3$ 、饱和食盐水洗涤, 收集有机相并用无水  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  干燥过夜, 过滤, 减压蒸去溶剂, 柱层析分离纯化, 得白色固体, 产率为 42%~70%。目标物的质谱、氢谱、碳谱等数据与文献<sup>[12]</sup>报道的一致。

### 1.4 识别性能研究方法

#### 1.4.1 紫外分光光度滴定法

分别量取 2.5 mL 氯仿溶液于 2 个比色皿中, 放入紫外可见光谱仪中扣除空白。用氯仿配制浓度为

$1 \times 10^{-4} \sim 1 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$  的主体分子钳溶液及初始浓度为  $1.6 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$  的客体酚类溶液。量取 2.5 mL 配制好的主体分子钳溶液于其中一个比色皿中, 另一比色皿中加入 2.5 mL 氯仿液作参比, 测定所配制主体分子钳的吸光度值。然后往主体分子钳溶液中不断加入一定量的客体分子(加入客体溶液的总体积不超过 100  $\mu\text{L}$ ) 摇匀, 使其浓度保持在  $10^{-4} \sim 10^{-3} \text{ mol/L}$ 。与此同时氯仿参比液中加入同浓度同体积的客体溶液, 摇匀, 然后测定各组配合物溶液的吸光度值。一个主体中加入客体次数至少 8 次, 得到至少 8 条以上的光谱线(图 1)。测定温度控制在  $(25 \pm 0.1) \text{ }^\circ\text{C}$ 。

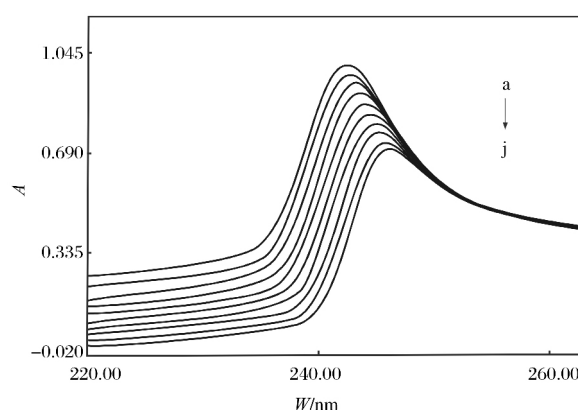


图 1 分子钳 b 中加入对甲氧基苯酚的 UV 谱图

Fig.1 UV-vis spectra of compound b ( $1 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ ) in the presence of  $\text{C}_6\text{H}_4\text{OH}-\text{OCH}_3-p$

(a) 0 (b)  $1.6 \times 10^{-4}$  (c)  $3.2 \times 10^{-4}$  (d)  $4.8 \times 10^{-4}$  (e)  $6.4 \times 10^{-4}$  (f)  $8.0 \times 10^{-4}$  (g)  $9.6 \times 10^{-4}$  (h)  $11.2 \times 10^{-4}$  (i)  $12.8 \times 10^{-4}$  (j)  $14.4 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$  with  $\lambda_{\text{max}}$  at 242 nm

#### 1.4.2 分子模拟

应用 Chem 3D 程序, 通过分子力学结构计算获得能量最低分子构象, 对主体及其与客体形成的配合物进行构象搜寻和结构最佳化<sup>[13]</sup>。

#### 1.4.3 核磁共振法<sup>[14-15]</sup>

在 2 支核磁样品管中, 分别加入一定量的主体和摩尔比为 1: 1.5 的主客体混合物,  $\text{CDCl}_3$  溶解, 在同一条件下分别测定其  $^1\text{H}$  NMR 谱, 观察相关质子的化学位移变化。

## 2 结果与讨论

### 2.1 目标主体与酚类客体 1: 1 型配合物的形成

当向主体分子钳溶液中不断加入酚类客体分子

溶液时,主客体分子间氢键及  $\pi - \pi$  堆叠等非共价作用力成为识别推动作用力,使溶液吸光度值呈规律性下降,表明所考察的酚类化合物与目标主体分子产生了识别配合作用,紫外吸收变化图谱见图 1. 根据 Hildebrand - Benes 方程,固定主体浓度,以  $1/[G]_0$  对  $1/\Delta A$  作图得一条直线(图 2),说明所考察的主客体间形成 1: 1 型配合物,然后再根据直线的截距  $1/a$  和斜率  $1/Ka \cdot a$  可求出配合物的结合常数  $Ka$  值及自由能变化值  $-\Delta G^0$ [9].

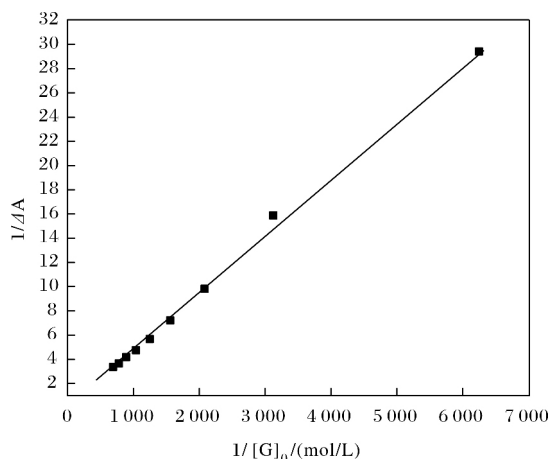


图 2 25 °C 时,分子钳 b 与  $C_6H_4OH - OCH_3 - p$  形成配合物的  $1/\Delta A$  对  $1/[G]_0$  作图

2. Typical plot of  $1/\Delta A$  versus  $1/[G]_0$  for inclusion complex of molecular tweezer b with *p*-methoxyphenol in  $CHCl_3$  at 25 °C

根据 Job 法<sup>[16]</sup>测定配合物的组成比,以配合物形成过程中主体化合物的摩尔比对吸光度差值  $A_{obs} - A_H$  作图,得配合物的 Job 点图(图 3). 同样可看出,一个分子钳 b 可与一个对甲氧基苯酚分子形成配合物. 图 2、图 3 均显示,对甲氧基苯酚与主体分子钳 b 产生识别配合作用,形成了 1: 1 型超分子配合物,同样,主体分子钳 a、c、d 也能与苯酚、对甲氧基苯酚、间甲氧基苯酚形成 1: 1 型超分子配合物,其相关配合物的结合常数 ( $Ka$ ) 和自由能变化值 ( $-\Delta G^0$ ) 列于表 1.

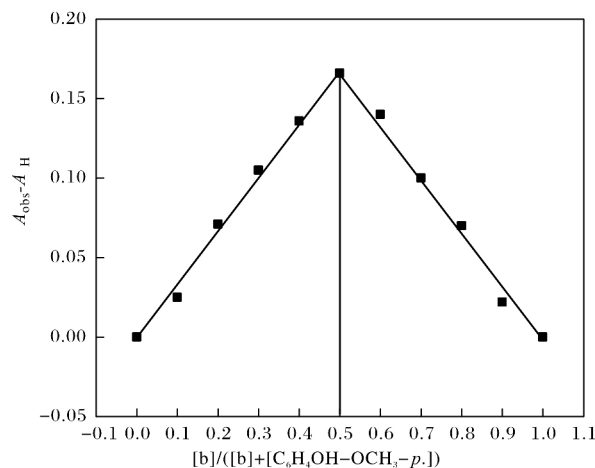


图 3 分子钳 b 与  $C_6H_4OH - OCH_3 - p$  形成 1: 1 型配合物的 Job 点图

Fig. 3 Job's plot showing 1: 1 complex formation for compound b with *p*-methoxyphenol

表 1 25 °C 时,在  $CHCl_3$  溶液中,分子钳 a、b、c、d 与苯酚、对甲氧基苯酚、间甲氧基苯酚形成配合物的结合常数 ( $Ka$ ) 和自由能变化值 ( $-\Delta G^0$ )

Table 1 Association constants ( $Ka$ ) and Gibbs free energy changes ( $-\Delta G^0$ ) for inclusion complexes of phenol, *p*-methoxyphenol, *m*-methoxyphenol with molecular tweezers a, b, c and d in  $CHCl_3$  at 25 °C

主体	客体	$Ka / (L/mol)$	$-\Delta G^0 / (KJ/mol)$
a	苯酚	845.26	16.69
	对甲氧基苯酚	264.48	13.82
	间甲氧基苯酚	47.39	9.56
b	苯酚	2 012.31	18.84
	对甲氧基苯酚	12.62	6.28
	间甲氧基苯酚	976.17	17.05
c	苯酚	556.73	15.66
	对甲氧基苯酚	140.80	12.25
	间甲氧基苯酚	163.11	12.62
d	苯酚	1 563.24	18.22
	对甲氧基苯酚	723.71	16.31
	间甲氧基苯酚	548.41	15.63

## 2.2 主体分子钳对酚类客体的选择性识别现象

由表 1 可看出,所合成的胆甾类主体对所考察的客体分子苯酚、间甲氧基苯酚、对甲氧基苯酚均具有良好的识别能力. 所考察的主体对客体苯酚、间甲氧基苯酚、对甲氧基苯酚的识别能力有差别,其结合常数最高可达  $2.012.31 \text{ L/mol}$ ,而最低的只有  $1.2.62 \text{ L/mol}$ . 其中主体 a 和 d 对所考察客体的识别能力为: 苯酚 > 对甲氧基苯酚 > 间甲氧基苯酚,主体 c 和 b 对所考察客体的识别能力为: 苯酚 > 间甲氧基苯酚 > 对甲氧基苯酚.

其次,客体结构的微小变化对结合常数也存在明显的影响. 如: 当芳环上的  $\text{OCH}_3$  分别位于芳环的间位和对位时,主体 a 与客体的结合常数分别为  $47.39, 264.48 \text{ L/mol}$ ,这可能是  $\text{OCH}_3$  的供电子效应不同影响客体上的酚羟基与主体上酰胺氮氢结合形成氢键的作用. 当  $\text{OCH}_3$  处于对位时,供电子效应大些,从而客体上酚羟基与主体上酰胺氮氢结合形成氢键的作用最强. 这种由于客体取代基的位置变化所造成的微环境效应对识别性能的影响,在理论上对研究人工受体的设计合成和对识别对象的初步筛选具有重要意义. 而主体 b 对客体间甲氧基苯酚、对甲氧基苯酚的识别能力则与主体 a 不同,造成主体 b 与间甲氧基苯酚、对甲氧基苯酚识别能力差异的主要原因可能是主客体芳环的  $\pi-\pi$  堆叠起了主导作用. 由此可见,主客体之间形成超分子配合物的推动力是氢键、 $\pi-\pi$  堆叠等非共价作用力,至于哪种作用力占主导地位则取决于主客体的结构匹配程度.

## 2.3 计算机模拟分析

应用 Chem 3D 程序分子力学结构计算(MM2)进行分子构象模拟,主体 a-d 具有多种构象. 但当其处于最低能量时,有图 4 所示的钳形构象. 图 5 是分子钳 d 和客体对甲氧基苯酚形成配合物的最低能量构象. 由图 5 可见,对甲氧基苯酚客体分子适合于进入主体裂穴,并与主体分子钳 d 产生配合作用. 当对甲氧基苯酚进入分子钳 d 的裂穴时,主体手臂上的芳环发生构象变化,与客体的苯环形成  $\pi-\pi$  堆叠作用,从而将对甲氧基苯酚客体很好地包合在主体分子钳 d 的裂穴中.

## 2.4 $^1\text{H}$ NMR 研究

为了进一步确认配合物形成时主客体之间的结合位点及主要作用力,利用  $^1\text{H}$  NMR 初步考察了主体分子钳 b 与苯酚的识别配合作用(如图 6).

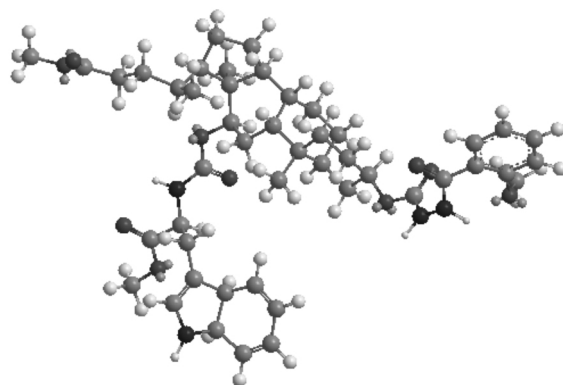
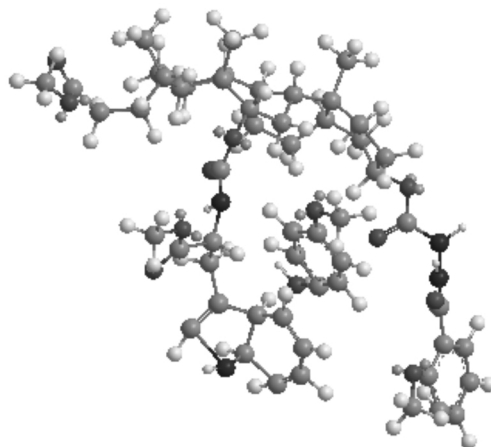


图 4 分子钳 d 的最低能量构象

Fig. 4 Minimum energy conformation structure of molecular tweezer d



5 分子钳 d 与对甲氧基苯酚形成 1:1 型配合物的最低能量构象

Fig. 5 Minimum energy conformation structure of plex of molecular tweezer d with *p*-methoxyphenol

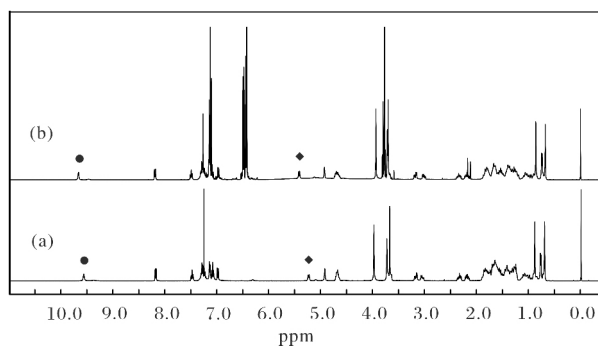


图 6 在  $\text{CDCl}_3$  溶液中,分子钳 b 中加入苯酚的  $^1\text{H}$  NMR 谱图: (a) +0 当量; (b) +1.5 当量  
Fig. 6 Portion of  $^1\text{H}$  NMR spectra of molecular b in  $\text{CDCl}_3$  in presence of increasing amount of phenol:

(a) +0 equiv; (b) +1.5 equiv

●:  $\text{CH}_3\text{O}-\text{PhCONH}$ ; ◆:  $12\alpha-\text{OCONH}$

当分子钳 b 与苯酚形成配合物时, 其相关质子的化学位移值发生了不同程度的低场或高场移动,  $\text{CH}_3\text{O}-\text{PhCONH}$  与  $12\alpha-\text{OCONH}$  中的氢质子化学位移( $\delta$ ) 分别由 9.56、5.23 ppm 向低场移动至 9.64、5.40 ppm. 这说明在配合物形成过程中, 主体酰胺氮氢参与了氢键作用, 氢键的形成使核外电子云密度减小, 氢核受去屏蔽作用  $\delta$  移向低场. 同时主客体芳环上的氢质子也有不同程度的化学位移变化  $\delta$  7.0 - 7.2 ppm 左右为苯环上的氢质子信号, 变化较为明显, 同时峰形叠加复杂. 此外, 参与主客体配合作用的苯酚, 其  $\delta$  6.7 ppm 左右的氢质子可能受主体芳环的屏蔽作用影响, 化学位移向高场移动至 6.5 ppm 左右, 由此表明主客体间存在  $\pi-\pi$  堆叠作用.  $\delta$  3.7 ppm 左右为  $\text{COOCH}_3$  上的氢质子, 同样在形成配合物时具有化学位移变化现象, 此处峰形较为复杂, 不易辨识, 初步推断此处亦有氢键作用力的产生.  $\delta$  3.0 ~ 3.2 ppm 左右为  $\text{PhCH}_2$  上氢质子信号, 受苯环屏蔽作用影响, 其位移值在主客体配合过程中向高场移动.  $\delta$  2.2 ppm 左右为胆甾环上的氢质子位移, 当配合物形成时, 部分氢质子向高场移动. 上述核磁共振氢谱数据表明, 在主体化合物 b 与客体苯酚形成配合物的过程中,  $\text{CH}_3\text{O}-\text{PhCONH}$ 、 $12\alpha-\text{OCONH}$  及芳环上、胆甾环上的氢质子均参与配合作用, 并且氢键与  $\pi-\pi$  堆叠作用为主要推动作用力.

### 3 结论

本文用常规加热的方法合成了以芳酰胺及各种氨基酸甲酯为手臂的胆甾类分子钳. 该类化合物对所考察的酚类化合物具有良好的识别作用, 主配体间形成 1: 1 型配合物, 有望应用于环境、医药等领域中有关酚类化合物的分析、分离、转运等.

#### 参考文献:

- [ 1 ] 周光龙. 漆酚类化合物及其应用展望 [J]. 中国生漆, 2004, 23(2): 38 - 43.
- [ 2 ] Zhu Q Y, Holt R R, Lazarus S A, et al. Inhibitory effects of cocoa flavanols and procyanidin oligomers on free radical induced erythrocyte hemolysis [J]. Exp Biol Med, 2002, 227(5): 321 - 329.
- [ 3 ] 陈海荣, 朱利中, 杨坤, 等. 钱塘江水系中酚类化合物的浓度水平及污染特征 [J]. 中国环境科学, 2005, 25(6): 729 - 732.
- [ 4 ] 赵丽, 刘征涛, 冯流, 等. 单歧藻对烷基酚类化合物的生物降解性及 QSBR 研究 [J]. 环境科学研究, 2005, 18(1): 23 - 28.
- [ 5 ] 李峰, 周源. 苯酚类抗癌药的药效机制及其 QSAR 研究 [J]. 癌变·畸变·突变, 2004, 16(4): 229 - 323.
- [ 6 ] Hu J, Zhang M, Yu L B, et al. Synthesis and binding ability of 1,2,3-triazole-based triterpenoid receptors for recognition of  $\text{Hg}^{2+}$  ion [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2010, 20: 4342 - 4345.
- [ 7 ] Collinson S R, Gelbrich T, Hursthouse M B, et al. Novel ferrocene receptors for barbiturates and ureas [J]. Chem Commun, 2001: 555 - 556.
- [ 8 ] 宋霞, 陈敏, 孙露. 二氯亚砷 - 甲醇溶液中合成氨基酸甲酯盐酸盐的研究 [J]. 化学试剂, 2007, 29(11): 687 - 688.
- [ 9 ] Liu M, Wang X H, Bi Q W, et al. Microwave-assisted synthesis and recognition properties of chiral molecular tweezers based on deoxycholic acid [J]. J Chem Res, 2013, 37: 394 - 397.
- [ 10 ] 叶英, 赵志刚, 刘兴利, 等. 吡啶-6-酰胺类化合物的微波合成及其抗菌活性研究 [J]. 有机化学, 2009, 29(6): 993 - 997.
- [ 11 ] 杨学军, 赵志刚, 李晖, 等. 脱氧胆酸手性分子钳的微波合成及其对中性分子的识别性能研究 [J]. 2008, 20: 1447 - 1452.
- [ 12 ] Ye Y, Suo Y R, Yang F, et al. Microwave-assisted synthesis of novel chiral receptors derived from deoxycholic acid and their molecular recognition properties [J]. Chem Lett, 2014, 43: 1812 - 1814.
- [ 13 ] Yakovenko A V, Boyko V I, Kalchenko V I, et al. *N*-Linked peptidocalix [4] arene bisureas as enantioselective receptors for amino acid derivatives [J]. J Org Chem, 2007, 72: 3223 - 3231.
- [ 14 ] Tripathi A, Pandey P S. Hydrogen sulfate-induced organogelation of a bile acid based anion-receptor [J]. Tetrahedron Lett, 2011, 52: 3558 - 3560.
- [ 15 ] Kumar A, Pandey P S. Anion recognition by 1,2,3-triazolium receptors: application of click chemistry in anion recognition [J]. Org Lett, 2008, 10(2): 165 - 168.
- [ 16 ] Bao X P, Zhou Y H. Synthesis and recognition properties of a class of simple colorimetric anion chemosensors containing OH and CONH groups [J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2010, 147: 434 - 441.

## Application of UV Spectrophotometry – NMR Methodology in Research on Recognition Properties of Receptors Based on Deoxycholic Acid for Phenolic Compounds

YE Ying<sup>1,3</sup>, SUO You – rui<sup>1,2</sup>, YANG Yong – jing<sup>1,3</sup>, YANG Fang<sup>1,3</sup>, HAN Li – juan<sup>1,3</sup>

(1. Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, China;

2. Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Qinghai University, Xining 810016, China;

3. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

**Abstract:** Under the conventional heating condition, molecular tweezers a – d derived from deoxycholic acid were synthesized using deoxycholic acid methyl ester as the spacer, aryl hydrazine and carbamate as arms. Selective recognition properties of these molecular tweezers for phenol, *p* – methoxyphenol and *m* – methoxyphenol have been investigated by UV – Vis spectra titration and <sup>1</sup>H NMR study. The results indicate this type of molecular tweezers can form 1: 1 supramolecular complex with phenol, *p* – methoxyphenol and *m* – methoxyphenol. The association constants (*K<sub>a</sub>*) and Gibbs free energy changes ( $-\Delta G^0$ ) for the supramolecular complexes have also been determined.

**Key words:** deoxycholic acid; molecular tweezers; phenolic compounds; UV spectrophotometry; molecular recognition

**Classifying number:** O657.3

声明

### 本刊许可中国学术期刊(光盘版)电子杂志社数字化传播的声明

本刊已许可中国学术期刊(光盘版)电子杂志社在中国知网及其系列数据库产品中以数字化方式复制、汇编、发行、信息网络传播本刊全文。该社著作权使用费与本刊稿酬一并支付。作者向本刊提交文章发表的行为即视为同意我社上述声明。

《分析测试技术与仪器》编辑部