

第一页为封面页

参赛队员姓名： 武钰涵(WU YUHAN)

中学： 西安高新第一中学

省份： 陕西

国家/地区： 中国

指导教师姓名： 张伟强

论文题目： 一氧化碳缓释治疗分子 CORM-02 的非气体
合成方法研究

Non-gaseous Synthesis of Therapeutic Carbon

Monoxide Releasing Molecule CORM-02

第二页为创新性申明

本参赛团队声明所提交的论文是在指导老师指导下进行的研究工作和取得的研究成果。尽本团队所知，除了文中特别加以标注和致谢中所罗列的内容以外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果。若有不实之处，本人愿意承担一切相关责任。

参赛队员：

武钰涵

指导老师：

张书强

2020 年 9 月 15 日

第三页此处开始为论文的主体部分……

论文题目

一氧化碳缓释治疗分子 CORM-02 的非气体合成方法研究

作者

论文摘要

一氧化碳释放治疗分子 (Therapeutic Carbon Monoxide Releasing Molecules, CORMs) 可实现生物体内靶向一氧化碳 (CO) 传输, 具有广泛的医学治疗应用前景。二聚三羰基二氯化钌(II), ($\text{Ru}_2(\text{CO})_6\text{Cl}_4$) CORM-2 可以有效抑制缺血再灌注损伤, 具有抗炎、抗菌、抗病毒、促进血管舒张、保护器官等多种治疗功效。然而, CORM-02 的传统合成方法需要高压 CO 气体还原羰基化高价钌原子, 具有难操作、危险等问题。本文采用 $\text{Fe}(\text{CO})_5$ 为羰基源, 成功实现了甲酸促进的三氯化钌还原羰基化过程, 发展了安全高效的 CORM-2 制备方法。该方法具有反应条件温和, 可避免使用高压 CO 气体钢瓶, 克服了传统羰基化反应过程复杂危险、产物分离繁琐的难题。

关键词

非气体式羰基化反应、一氧化碳释放分子、五羰基铁

论文正文:

1. 研究背景

近年来, 生物医学研究发现一氧化碳(Carbon Monoxide, CO)是人体内的重要信使分子, 具有传递细胞间信息、调节细胞功能等许多作用的生理功能。然而, 过量摄入的一氧化碳会强力结合人体内的血红蛋白, 导致机体缺氧中毒。因此, 生理环境下, 安全、定量、可控的CO靶向释放开始成为一氧化碳医学治疗研究的关键科学技术^[1]。2003年, Motterlini 等使用稳定的二聚三羰基二氯代钌(II), $[\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}_2]_2$ 作为固体一氧化碳源, 成功模拟了内源性CO的生理功能^[2]。此后, $[\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}_2]_2$ 成为一种重要的一氧化碳释放分子(Therapeutic Carbon Monoxide Releasing Molecules-02, CORM-02)广泛应用于各类一氧化碳生物医学研究。动物实验发现^[3], 通过抑制炎症因子表达、脂质过氧化、减轻炎症反应等作用机制, CORM-2对鼠脊髓缺血再灌注损伤具有明显的保护作用, 降低VMC小鼠病死率及心肌损伤。CORM-2毒性小, 腹腔或静脉注射治疗剂量CORM-2 (10mg/kg)不会引起实验动物血液羰基血红蛋白水平的明显升高。CORM-2还是许多一氧化碳释放分子不可或缺的前驱体。从CORM-02出发, 通过与功能配体反应可获得水溶性CORM-03 $[\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{Gly})]$ 、光激发Photo-CORM $[\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(2,2\text{-bipyridine})]$ 和 $\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}_2(\text{pentanedione})$ 等各类一氧化碳释放分子^[4]。CORM-2作为固体一氧化碳源, 在生理环境下的释放剂量易控制, 毒副作用小, 已经开始广泛应用于一氧化碳相关治疗研究。然而, CORM-2具有独特的氯桥连多羰基双金属中心结构, 其制备步骤复杂、分离纯化困难、合成过程需要使用高压一氧化碳。因此, CORM-02大规模安全制备困难, 导致其价格昂贵, 每克接近5000元的价格极大限制了一氧化碳医学治疗研究的发展。

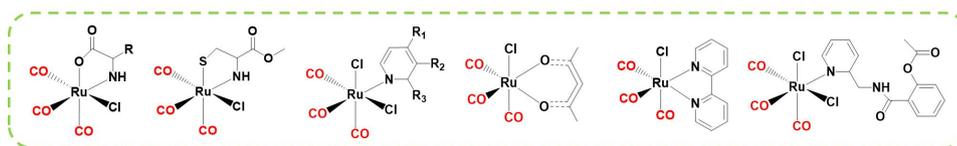
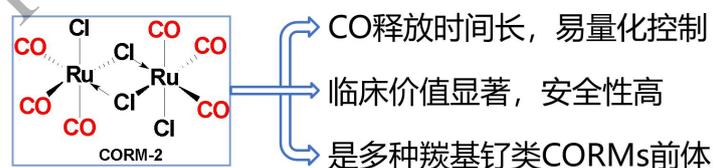
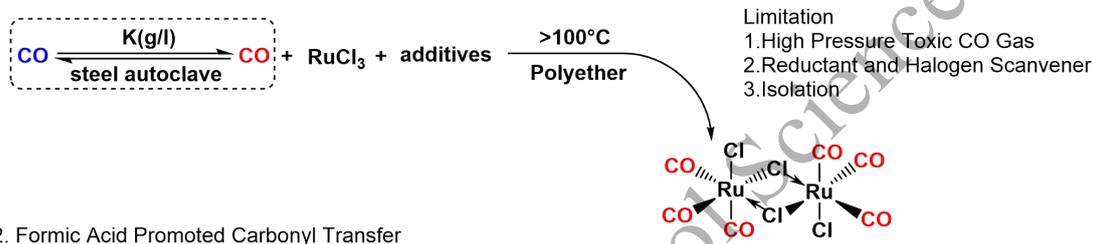


图 1. CORM-02 是一氧化碳治疗研究的重要先导药物分子

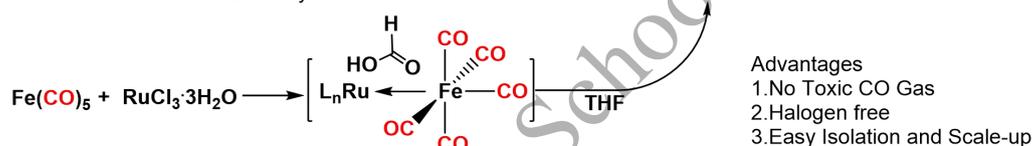
CORM-02 的传统制备方法是采用高压一氧化碳气体对三氯化钌进行还原羰基化。1967年, M. Bruce 等人采用 $\text{CO}(10\text{atm})$ 实现了甲醇溶液中氯化钌的羰基化反应, 成功制备了

CORM-2^[5]。随后，D. Roberto 等人发现，将 $\text{RuCl}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ 负载到硅胶后，羰基反应所需的 CO 压力降低到 5atm。此外，采用活性更高的多钌簇合物前体可有效提高氯桥多聚羰基簇合物的合成效率^[6]。J. D. Cotton 等^[7]在液氨中先后用钠和磷酸处理 $\text{Ru}_3(\text{CO})_{12}$ ，得到了羰基钌的氢化物 $\text{H}_2\text{Ru}(\text{CO})_4$ 。该氢化物可与 CCl_4 低温反应得到 CORM-02。B. F. G. Johnson 等^[8]发展了氯气氧化 $\text{Ru}_3(\text{CO})_{12}$ ，制备单核、双核、三核和多核卤化物衍生物的方法。A. Mautovanig 采用氯仿为氯源溶剂，实现了 $\text{Ru}_3(\text{CO})_{12}$ 向 CORM-2 高效转化，产率 60%^[9]。综上，这些 CORM-2 的合成方法，都无可避免地要通入高压 CO 气体，大幅度增加了 CORM-02 的危险性，而羰基钌簇合物前体昂贵不易获得，难以应用于 CORM-02 的大规模制备。

1. Conventional Heterogenous Carbonylation with Carbon Monoxide



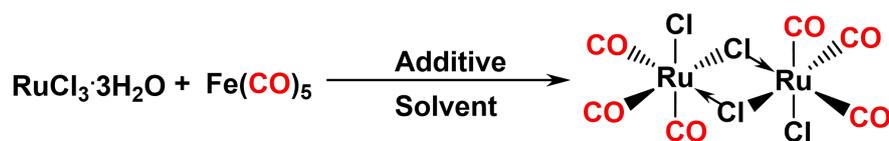
2. Formic Acid Promoted Carbonyl Transfer



图二、三氯化钌的非气体式均相羰基化反应创新

从三氯化钌的还原羰基化是目前大批量制备 CORM-02 的最可行路线，其合成过程主要涉及三价钌的还原、羰基化反应。传统羰基化技术必须使用不锈钢高压釜以保证高压一氧化碳气氛，提高溶液中一氧化碳浓度，从而保证羰基化速率。本课题组前期研究发展一系列基于羰基金属的一氧化碳释放体系，实现了溶液体系的非气体式羰基化过程^[10]。基于此，本文报道了一种使用二元金属羰基化合物为羰基源的 CORM-02 大批量安全合成方法。在常规玻璃烧瓶中，采用 $\text{Fe}(\text{CO})_5$ 即可替代高压一氧化碳气体，实现三氯化钌的还原羰基化反应。实验发现了甲酸对于羰基化反应的关键促进作用。相比传统合成方法的危险苛刻反应条件， $\text{Fe}(\text{CO})_5$ 作为液体羰基源可实现还原、羰基化的协同作用，不但大幅度提高了反应效率；同时简化了分离过程，降低了对反应设备和操作的要求。本研究发展的非气体式羰基化反应是 CORM-02 的大批量合成的安全保障，其中甲酸氧化配位提供了一种全新的 $\text{Fe}(\text{CO})_5$ 释放一氧化碳历程。

2. 研究内容



表一、溶剂对于非气体式羰基化反应的影响

	$\text{RuCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	$\text{Fe}(\text{CO})_5$	$T/^\circ\text{C}$	Solvent	t/h	yield
1	0.4mmol	0.8mmol	55	H_2O	6	N.D
2	0.4mmol	0.8mmol	55	HCl	6	N.D
3	0.4mmol	0.8mmol	55	THF	6	8%
4	0.4mmol	0.8mmol	55	CH_3OH	6	N.D
5	0.4mmol	0.8mmol	55	CH_3CN	6	trace
6	0.4mmol	0.8mmol	55	乙二醇甲醚	6	trace

文献调研发现，选择合适溶剂是成功制备 CORM-02 的关键因素^[11]。我们首先研究了溶剂对于三氯化钌羰基化反应的影响。实验发现，低沸点、易挥发的溶剂有利于产物分离。实验称取 100 mg 的 $\text{RuCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 于反应瓶，滴入常见溶剂，震荡后，基本均可溶解，THF、 CH_3CN 、 HCOOH 、乙二醇甲醚较符合初期条件。基于此，我们研究了 $\text{Fe}(\text{CO})_5$ 对三氯化钌的非气体式羰基化反应，实验结果列于表一。根据反应颜色的变化，可基本确定绿色三氯化钌与五羰基铁反应历程。经历约六小时后，反应液颜色经历原料三氯化钌的深棕色、中间状态深绿色、直至淡黄色的变换后，反应基本结束。停止反应，除去反应溶剂出去后得到固体不溶物，然后加入二氯甲烷溶解萃取。红外分析结果表明，使用 THF、 CH_3CN 为溶剂的所获得的固体产物含有 CORM-02，其中 THF 为溶剂的羰基化反应产率为 8%。THF 与 CH_3CN 均为配位性溶剂，可以羰基钌单元配位，这样的配位对于三价钌的还原羰基化十分有利。

表二、酸促进剂对于非气体式羰基化反应的影响

	$\text{RuCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	$\text{Fe}(\text{CO})_5$	$T/^\circ\text{C}$	Solvent	t/h	catalyst	yield
1	0.4mmol	0.8mmol	55	THF	6	HCl	N.D
2	0.4mmol	0.8mmol	55	THF	6	CH_3COOH	N.D
3	0.4mmol	0.8mmol	55	THF	6	HNO_3	N.D
4	0.4mmol	0.8mmol	55	THF	6	HCOOH	15%
5	0.4mmol	0.8mmol	55	CH_3CN	6	HCl	N.D
6	0.4mmol	0.8mmol	55	CH_3CN	6	CH_3COOH	N.D
7	0.4mmol	0.8mmol	55	CH_3CN	6	HNO_3	N.D
8	0.4mmol	0.8mmol	55	CH_3CN	6	HCOOH	N.D

为了进一步提高非气体羰基化反应的转化率，我们研究了酸促进剂对于 CORM-02 收率的影响。实验结果（表二）表明，在两种配位型溶剂四氢呋喃和乙腈中，甲酸可大幅度提高羰基化反应效率，而其他酸添加剂则明显抑制了 $\text{Fe}(\text{CO})_5$ 的还原羰基化作用。值得注意的是，甲酸的促进作用与溶剂相关。在乙腈中，甲酸添加剂对于羰基化反应没有明显促进作用。在四氢呋喃中，添加 5 当量的甲酸可将 CORM-02 的收率提高至 15%，这可能与四氢呋喃与羰基钌的配位作用更强有关。

表三、甲酸添加的化学计量与羰基化反应的关系

	$\text{RuCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	$\text{Fe}(\text{CO})_5$	HCOOH	Solvent	t/h	T/°C	yield
1	0.4mmol	0.8mmol	0.5mmol	THF	6	55	5%
2	0.4mmol	0.8mmol	1mmol	THF	6	55	10%
3	0.4mmol	0.8mmol	2mmol	THF	6	55	76%
4	0.4mmol	0.8mmol	3mmol	THF	6	55	30%
5	0.4mmol	0.8mmol	4mmol	THF	6	55	15%
6	0.4mmol	0.8mmol	5mmol	THF	6	55	12%
7	0.4mmol	0.8mmol	10mmol	THF	6	55	3%
8	0.4mmol	0.8mmol	50mmol	THF	6	55	N.D

J. Halpern 等^[12]研究发现，甲酸分子可将三价钌选择性还原为羰基钌(I)阴离子 $[\text{Ru}(\text{CO})(\text{H}_2\text{O})\text{Cl}_4]^{2-}$ 。由此推断，甲酸添加很可能启动了三氯化钌的还原和羰基化过程，进而提高 CORM-02 的收率。该非气体式羰基化反应中，甲酸与五羰基铁的化学计量关系直接影响着 CORM-02 的收率（表三）。甲酸的添加量与 CORM-02 的收率之间呈现先增加后减少的关系。当甲酸：五羰基铁为 2:0.8 时，CORM-02 收率可达 76%，而过量的甲酸则不利于 CORM-02 的生成。XRD 研究发现，三氯化钌羰基化反应副产物固体粉末的主要成分为甲酸铁 $\text{Fe}(\text{HCOO})_2$ 。由此不难看出，甲酸可氧化配位羰基铁中铁原子，促进其解离配位一氧化碳；另一方面，甲酸可选择性还原三氯化钌，保证了钌原子与原位产生的 CO 有效配位。

3. 结论

本研究发展了一种使用二元羰基金属化合物为羰基源的 CORM-02 安全合成方法。针对 $\text{Fe}(\text{CO})_5$ 与 RuCl_3 的还原羰基化反应，系统研究了溶剂、酸促进剂等反应因素对于非气体式羰基化反应的影响。实验发现，甲酸可有效促进 $\text{Fe}(\text{CO})_5$ 原位产生一氧化碳，实现三价钌的还原羰基化。在最优反应条件下，控制三氯化钌羰基化反应中甲酸与羰基铁的比例为 2:0.8，即实现 CORM-02 的克级制备。此方法反应条件温和、操作简便， $\text{Fe}(\text{CO})_5$ 作为液体

羰基源成功替代了高压一氧化碳气体，为 CORM-02 大批量安全制备提供了一种的新合成方法。

实验部分：

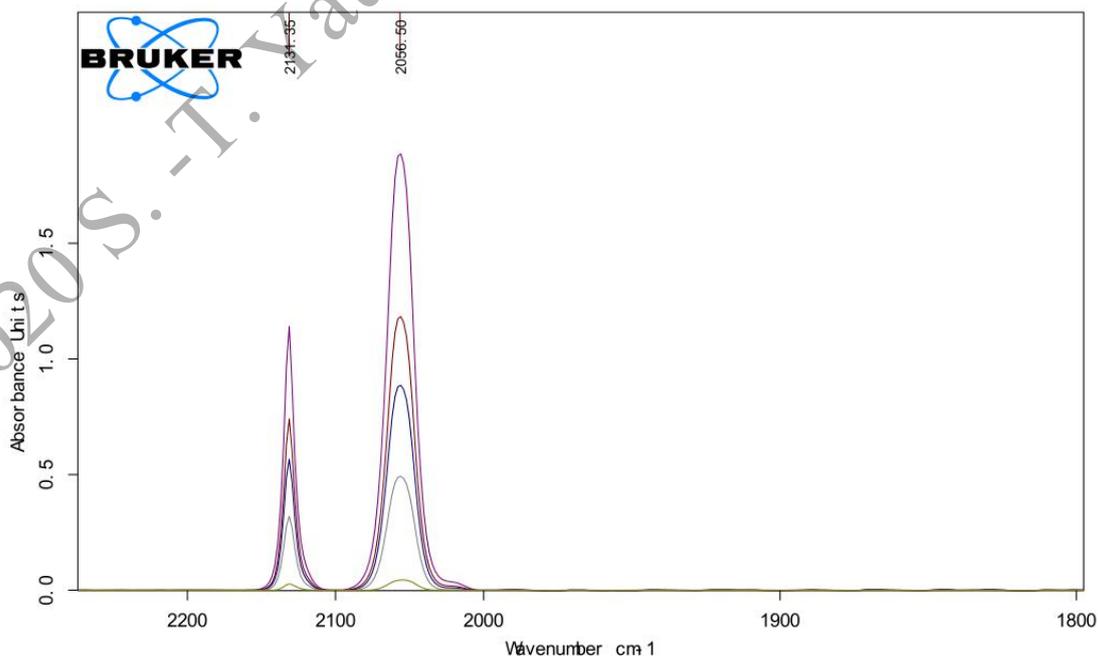
1. CORM-02 的克级制备

以克级反应为例，将 $\text{RuCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (2.61g, 10mmol)，用 THF 充分溶解。然后，向反应液中依次加入 $\text{Fe}(\text{CO})_5$ (20mmol, 2.56ml)、甲酸 (50mmol, 1.85ml)。反应溶液搅拌加热至 55°C ，反应下 6h。反应液溶液由深红色经历绿色，最终变为黄色。反应结束后，冷却反应液，分离出白色固体副产物草酸铁。将滤液旋干溶剂，加入二氯甲烷溶解后提取产物后，再将所得滤液加入正戊烷，低温下重结晶，最终得到目标产物 CORM-2，1.95g，收率:76%。

IR(KBr, cm^{-1}): 2144s, 2095s, 2064vs。

2. 红外光谱法测定 CORM-02 的收率

根据朗博-比尔定律 $A=\epsilon bc$ ，红外光谱吸光度与反应液中产物浓度正相关，当每次反应所加入的 THF 为定量时，吸光度与反应液中生成的产物量有了正比关系。以 CORM-2 配制不同浓度的溶液，分别得到特征羰基峰的吸光度之后，拟合吸光度关于浓度的直线。之后即可依据反应液特征羰基峰的吸光度反推出产率。CORM-2 在 THF 溶剂中的吸光度特征羰基峰在 2056cm^{-1} 和 2131cm^{-1} 处， 2056cm^{-1} 处吸光度随浓度变化拟合曲线方程为 $A=95.291c-0.0591$ ($R^2=0.9782$)， 2131cm^{-1} 处 $A=58.14c-0.0288$ ($R^2=0.9786$)



此页开始为参考文献部分

参考文献:

- [1] a) U. Schatzschneider, *Br. J. Pharm.* **2015**, *172*, 1638; b) L. E. Otterbein, *Antioxidants & redox signal.* **2002**, *4*, 309; c) K. Bojakowski, Z. Gaciong, T. Grochowiecki, J. Szmidt, *Transplant. Proceed.* **2007**, *39*, 2928; d) J. Wang, D. Zhang, X. Fu, L. Yu, Z. Lu, Y. Gao, X. Liu, J. Man, S. Li, N. Li, X. Chen, M. Hong, Q. Yang, J. Wang, *J. Neuroinflam.* **2018**, *15*, 188.
- [2] R. Motterlini, J. E. Clark, R. Foresti, *Circ Res.* **2002**, *90*, 17-24.
- [3] a) R. Motterlini, L. E. Otterbein, *Nat. Rev. Drug Discovery*, **2010**, *9*, 728; b) C. Steiger, T. Luhmann, L. Meinel, *J. Controlled Release* **2014**, *189*, 46; c) L. Vitek, H. Gbelcova, L. Muchova, K. Vanova, J. Zelenka, R. Konickova, J. Suk, M. Zadinova, Z. Knejzlik, S. Ahmad, T. Fujisawa, A. Ahmed, T. Ruml, *Digest. Liver Disease* **2014**, *46*, 369.
- [4] a) P. Mony, B. Spingler, R. Motterlini. *Organ. Bio. Chem.*, **2010**, *8*, 4849; b) L.A.P. Antony, T. Slanina, P. Sebej, *Org. Lett.*, **2013**, *15*, 4552; c) R. Cini, S. Defazio, G. Tamasi, *Inorg. Chem.*, **2007**, *46*, 79; d) B. Therrien, G. Süß-Fink, *Coord. Chem. Rev.*, **2009**, *253*, 2639.
- [5] M. I. Bruce, F. G. A. Stone, *J. Chem. Soc. (A)*, **1967**, 1238-1241
- [6] B. F. G. Johnson, R. D. Johnston, P. L. Josty, J. Lewis, I. G. Williams, *Nature*, **1967**, 213,901.
- [7] J. D. Cotton, M. I. Bruce, F.G.A.Stone, *J. Chem. Soc. (A)*, **1968**, 2162-2165
- [8] B. F. G. Johnson, R. D. Johnston, J. Lewis, *J. Chem. Soc. (A)*, **1969**, 792-797
- [9] A. Trovati, A. Araneo, P. Uguagliati, F. Zingales, *Inorg. Chem.*, **1970**, 671-672
- [10] a) W. Zhang, A. J. Atkin, A. C. Wood, I. J. S. Fairlamb, J. M. Lynam, *Organometallics*, **2011**, *30*, 4643; b) W. Zhang, A. C. Wood, I. J. S. Fairlamb, J. M. Lynam. *Inorg. Chem.*, **2010**, *49*, 8941; c) W. Zhang, A. J. Atkin, R. J. Thatcher, A. C. Whitwood, I. J. S. Fairlamb, J. M. Lynam, *Dalton Trans.*, **2009**, *38*, 4351; e) S. Yang, M. Chen, L. Zhou, G. Zhang, Z. Gao, W. Zhang, *Dalton Trans.*, **2016**, *45*, 3727
- [11] R. B. King, P. N. Kapoor, *Inorg. Chem.*, **1972**, *11*(2), 336-342
- [12] J. Halpern, B. R. James, A. L. W. Kemp, *J. Amer. Chem. Soc.*, **1966**, *88*(21):5142-5147

致谢

感谢国家自然科学基金面上项目((21371112, 非离子水溶性过渡金属羰基化合物的合成及可控缓释一氧化碳研究), 陕西省自然科学基金重点研发项目(2017SF-064, 医用一氧化碳释放分子合成研究)对于本项目的经费支持。感谢张伟强老师的学术指导及其团队张晓协助红外光谱以及 XRD 测试。