

子化合物以及含量极微的成分方面加以重视。这在国外也正在开始。海洋生物过去研究较少,从中发掘新类型化合物的可能性较大,也应引起重视。另外,实践证明,与中医药经验相结合的途径,是我国中草药化学研究的有利条件,应继续充分发扬、利用。同时对国外从科属出发的研究方式也应作参考。为了进行上述研究工作,技术要求越来越高。精细的分离、测定手段,尚有待我们去学习、利用和创新。对于分子

量较大、结构复杂或涉及复杂立体化学的化合物的合成,要大力开展起来。这是比分离提取和结构测定更艰巨的工作。至于结构改造工作,是通向应用和各种机制研究的必经途径,应继续加强。

我国有广阔的海域,地跨寒带、温带、亚热带,中草药资源十分丰富,相信我国的中草药化学工作者,在新长征的进程中,必能共同努力,在这一领域为人类做出更大的贡献。

化学模拟生物固氮的新里程

蔡 启 瑞

(厦 门 大 学)

大气中大约含有四千万亿吨的氮气。但是,地球上动植物的细胞却没有本领直接吸收它来转化为蛋白质、核酸等含氮的生命基础物质。迄今我们所知道的,只有自然界里的固氮微生物,能在常温常压下,高效率地固氮成氨。它们每年为地球上所有的生物提供约二亿吨的生命所必需的固定氮。微生物是怎样固氮的呢?人类能不能用化学方法模拟其中的某些原理,研制出能在温和条件下操作的固氮催化剂呢?这便是化学模拟生物固氮所要探讨的一些科学问题。

(一)

化学模拟生物固氮,在国际上是本世纪六十年代才开拓起来的一个边缘学科研究领域。到了1972年已取得不少进展:

(1) 生物化学工作者发现从多种多样的固氮微生物分离出来的固氮酶,都是由大同小异的 MoFe-蛋白和不同小异的 Fe-蛋白所组成; MoFe-蛋白分子量约 20 多万,含 2 个 Mo、24—33 个 Fe 和 24—27 个 S* (无机硫),它起着络合 N₂ 的作用; Fe-蛋白分子量为 5.5—6.5 万,含 4 个 Fe 和 4 个 S*,它主要起着电子传递体的作

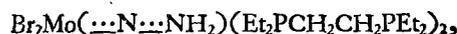
用。还发现能在固氮酶催化作用下被还原的底物至少有 N₂、H⁺、RC≡CH、RC≡N、RN≡C、C≡N⁻、N₃⁻、N₂O 和 CH₂=C=CH₂ 等八、九种;这些底物的酶促还原反应都是与 MgATP⁻² 酶促水解为 MgADP⁻ 和 HPO₄⁻² (H₂PO₄⁻¹) 的反应偶联着进行的; ATP 与还原剂消耗量之比 (ATP/2e⁻) 一般约为 4—5。

(2) 化学工作者发现 Mo^{III} 或 V^{II} 水溶液加碱沉淀氢氧化物时能还原 N₂ 为 NH₃ 或 N₂H₄; 又 V^{II} 的邻-苯二酚络合物能作为阴极电催化还原 N₂ 制肼的催化剂。还发现了,半胱氨酸铝盐碱性水溶液体系对于固氮酶各种底物的还原反应,都有些催化作用。

(3) 合成出 200 个左右的单核和双核的分子氮络合物;其中有几个含零价 W 或 Mo 和膦配位体的分子氮络合物,如



能加质子而转化为含 2-亚肼基的络合物,如



这可视为 N₂ 配位体还原加氢的第一步。

近二、三年来,国际上在化学模拟生物固氮的研究方面,取得了一些突破性的进展:

(1) 1977 年, Shah 和 Brill 采用溶剂

(HCONHCH₃) 萃取法,从 MoFe-蛋白分离出分子量小于 2 千的 FeMo-辅基,其中 Mo:Fe:S* 含量比约为 1:~8:~6;它能显出 MoFe-蛋白的特征 EPR 讯号,对于 NaBH₄ 还原乙炔为乙烯的反应具有很高的催化活性,比已知的最好的化学模拟体,如 [Mo₂O₄(cys)₂]⁻²,活性高达 600 倍。

(2) Hodgson 等成功地运用 Mo 的外延 x-光吸收谱精细结构 (EXAFS) 法,推断出 Mo 的近邻有 4 个 S*、2—3 个 Fe,此外可能还有 1—2 个—SR,但无 Mo=O 键,也无其它重金属原子,因此 Mo—Mo 核间距应在 3 Å 之外。

(3) Orme-Johnson 和 Münck 等,根据 EPR 谱和穆斯鲍尔谱,推断 FeMo-辅基很可能是含单个 Mo 和 6 个 Fe 的 Mo~Fe~S* 原子簇,而且与另一个 FeMo-辅基距离大概在 12 Å 以外。又根据“配位体取代挤出法”的实验结果,Holm 等推断 Fe-蛋白分子中含有一个 Fe₄S₄* 原子簇;而 Orme-Johnson 等推断 MoFe-蛋白分子中含有 3—4 个 Fe₄S₄* 原子簇。此外,在分子氮络合物和固氮酶新底物的研究等方面,也有重要的进展。

(二)

国内化学模拟生物固氮的研究工作,是在敬爱的周总理再次强调指出要重视自然科学基础研究之后,于 1972 年初由中国科学院带头组织国内跨学科、跨系统的大协作,开始搞起来的。到了 1973 年,在棕色固氮菌固氮酶的高活性结晶状 MoFe-蛋白的制备、分子氮络合物化学键理论、以及固氮酶活性中心模型和酶催化机理的研究等方面,都取得了较快的进展。福建物质结构研究所固氮研究组讨论了单核和双核络合 N₂ 的各种可能的方式,从而指出了单端基加多侧基络合活化 N₂ 以及防止络合物构型异构化的必要性。吉林大学化学系固氮研究组,用 HMO 法处理分子氮端基单核络合物和双端基双核络合物,得到了能级、电荷密度和键序的表达式。结果表明,单核低价络合物以金属电子组态为 d⁶ 的分子氮络合物为最稳定,而且外

端 N 带较大的负电荷,有利于质子等亲电子试剂的进攻。厦门大学固氮研究组以固氮酶八、九种已知的底物和抑制剂 CO 当作化学探针,并根据络合催化原理,讨论了固氮酶活性中心结构和 ATP 驱动的电子传递机理,并提出了电子倒流使 ATP 消耗过大的概念。在这一年里,福建物质结构所固氮研究组和厦门大学固氮研究组不约而同地提出(后于 1974、1975、1976 年发表)大同小异的固氮酶活性中心模型,即网兜型原子簇结构 (Fe₃S₃*Mo) 的活性中心模型与并联双座立方烷型原子簇结构 (Fe₂S₂* Mo₂O₂) 的活性中心模型,和 N₂ 的单端基加多侧基络合活化方式,并用以阐明固氮酶各种底物的酶促还原反应机理。

近二、三年来,随着国际上化学模拟生物固氮研究工作的突破,国内研究工作也取得了一些可喜的进展。中国农业科学院原子能利用研究所的工作者,用葡聚糖凝胶柱过滤法,证实了棕色固氮菌固氮酶的 MoFe-蛋白(半还原态)单独不能与 MgATP⁻² 结合,而一个 Fe-蛋白分子能与 2 个分子 MgATP⁻² 结合(结合常数为 13.3—15.6 μM)。结合后 Fe-蛋白构象发生变化,使得每分子的 12 个半胱氨酸残基中仅有 2 个(—SH)能被羧甲基化;而不加 MgATP⁻² 的 Fe-蛋白每分子有 4 个—SH 能被羧甲基化。MgATP⁻² 也能掩蔽 Fe-蛋白的一部份与活性有关的一SH 基,使其不被氯汞苯甲酸所汞基化。上海有机化学研究所和吉林大学化学系等单位与固氮有关的工作者,在分子氮络合物的合成等方面也取得了一些进展。吉林大学固氮研究组在前段的工作基础上,用 HMO 和图论方法处理单核、双核和三核的几种可能的分子氮络合物构型。结果表明,对于单核和双核的分子氮络合物, N₂ 的单端基或双端基络合物相应地比单侧基或双侧基络合物稳定;而对于三核络合物,分子氮的单端基加双侧基络合物,比全端基络合物稳定,一般也比双端基加单侧基络合物略为稳定, NN 键序也较低;当三核价态低而且前沿 d 电子总数多(如 d⁶)时,单端基加双侧基络合活化的 N₂ 配位体外端 N 一般带有较大

的负电荷,从而有利于质子的进攻。这一结果,从理论上支持了国内提出的关于单端基加多侧基络合活化 N_2 的看法。在固氮酶活性中心模型的研究方面,通过国际学术交流,参考了国外关于固氮酶的科学实验新成就,国内所提出的两个模型(即“福州模型”和“厦门模型”)于第三届国际固氮会议(1978年6月,美国威斯康辛-麦迪逊)前后,各经过了两次修正和演进,最后在构型上基本上统一地认为很可能是桥联双座立方烷型原子簇结构



只是对于这双立方烷原子簇的可相对旋转程度,以及对于 N_2 、 $RC\equiv N$ 、 $RN\equiv C$ 等底物分子的络合活化方式究竟是“投网式”的以端基络合在兜底的 Fe^{II} 上,还是“架炮式”的以端基络合在 $Mo^{III(IV)}$ 上,还保留着不同的看法,体现了学术争鸣和互相促进的精神。国内最初提出的两个大同小异的原子簇结构活性中心模型,在国际上可以说是比较早提出的,经过五年来的两次演进,基本上仍保留着桥联双座立方烷原子簇结构的特征和 N_2 的单端基加多侧基的络合活化方式。当然,进一步还要看看能否根据这桥联双座立方烷原子簇结构模型的启示,合成出高活性的 $FeMo$ -辅基模型化合物;这可以说是最终的和最重要的检验。而且由于 $FeMo$ -辅基的 $Mo:Fe:S^*$ 含量比的准确分析数据还未见发表,上述模型也要先经过这分析关的考验。但是,所提出的酶促反应机理和 ATP 驱动的电子传递机理,有一些看法已从国外后来报导的实验事实(如下面括号内注明的)获得了一些支持。例如:(1) 炔键的双侧基加假端基 $\mu_3(\eta^2)$ 型络合活化,或双侧基 $\mu_2(\eta^2)$ 型络合活化,有利于高选择性的顺式加氢为相应的烯键;又 $RN\equiv C$ 也能在三核中心形成 $\mu_3(\eta^2)$ 型的络合(E. L. Muetterties 等, 1976—1977)。(2) N_2 的酶促还原加氢反应大概不经过 $NH=NH$ 和 NH_2-NH_2 中间态(R. R. Eady 等, 1978年)。(3) 丙二烯的酶促还原加氢是直接的,没有先在配位上异构化为丙炔(R. H. Burns 等, 1975年)。(4) CO 只能占据钼离子上相邻的两个

配位之一,但它能诱导地削弱另一个配位络合 N_2 或其它 $\sigma\pi$ -配位体的能力(J. Chatt 等, 1978年)。(5) $RN\equiv C$ 在固氮酶活性中心钼离子上的还原加氢缩合反应中间经过卡宾配位体中间态($RN\equiv C$ 在钼离子上的邻位插入反应, R. D. Adams 等, 1976年)。(6) 过渡金属离子上的电子传递(还原态变成氧化态),能大大促进(催化)配位 $MgATP^{-2}$ 外端磷酸键的水解(G. P. Haight, Jr. 等, 1974—1977年)。这也间接支持了关于电子倒流可能是造成 ATP 消耗过大的主要原因这一看法。

国内关于固氮酶活性中心模型和 N_2 络合活化机理的研究工作,也促进了对于 EDA 型催化剂作用机理的理解和氨合成铁催化剂活性中心模型的理论探讨。有趣的是,南京大学化学系和厦门大学化学系的工作者分别提出的 N_2 在 $\alpha-Fe(III)$ 晶面上活性中心的单端基加多侧基多核络合活化的两种方式,恰好对应于上述的 N_2 在固氮酶活性中心的“投网式络合”和“架炮式络合”。关于 $\alpha-Fe$ 活性中心按这两种方式络合活化 N_2 的理论探讨,已有了 EHMO 计算的初步结果。

(三)

国内工作者,自从 1972 年开展化学模拟生物固氮的研究以来,对于国际上在这段期间迈步跨过的里程碑,虽也作出了一点贡献,但由于物质条件所限,特别是缺乏现代化的实验手段,实验工作开展得比较少,因而模型和机理方面的理论研究,基本上全部建立在国外报导的有关科学实验成果的基础上,工作未能取得主动性。有时虽有了一些比较好的设想,也未能及时通过实验加以验证和发展。今后有必要进一步搞好跨学科、跨系统的大协作,加强国内以及与国外的学术交流,及时掌握科研动态和国外的先进经验,大胆创新,分工建立必要的现代化实验手段,使实验工作也能很好地开展起来。

化学模拟生物固氮的研究,在国际上正在酝酿新的突破。关于 $FeMo$ -辅基的结构与性能,模拟化合物的合成、催化性能及其化学调

变的研究,在近期内会显得很活跃。通过这类型的原子簇络合物的研究,有可能发展出选择加氢催化剂和电催化固氮催化剂。但是,FeMo-辅基没有 Fe-S* 原子簇的配合,看来还不能有效地对固氮反应产生催化作用。下一步还要研究MoFe-蛋白中的一些Fe₄S₄*原子簇在MgATP⁻²驱动的电子传递(甚至质子传递)过程中究竟是怎样起作用的。这对于了解能量与电子(和质子)偶联传递的其它生理生化过程可能也有重

要的意义。了解这方面的机理,对于设计不用ATP和Fe-S*的模拟体系也会增加能动性。

最后,对于象兰绿藻那样的光合固氮体系的研究,也值得注意,因为光催化固氮可能是长远的将来固氮工业解决氢源问题的根本办法。也就是说,化学模拟生物固氮的研究,将来可与光合作用的研究串联起来搞。国内在1972年就提出了这样的设想,最近一些研究单位也开始进行这方面的探索。

我国化学模拟生物固氮的研究

忻新泉 戴安邦

(南京大学络合物化学研究所)

合成氨工业已有六十多年的历史,对于促进农业生产起着巨大的作用。但工业固氮催化剂把氮和氢合成为氨须在高温高压下进行,而生物固氮菌中的固氮酶则能在常温常压下把氮转化为氨的化合物。1965年,在常温常压条件下合成了第一个氮分子络合物以后,各国的许多化学家认为固氮工业的革新指日可待。因而兴起了化学模拟生物固氮研究的热潮。对于这项研究的成功并使成果工业化未免过于乐观,但从此开辟了一个新的重要研究领域。我国在这方面的研究是从1972年开始的。由中国科学院组织了近十个有关学科参加。几年来通力协作,相互促进,有了不少进展,引起了国内外的重视。

一、棕色固氮菌固氮酶的研究

开展化学模拟生物固氮研究工作,必需首先知道固氮酶的结构、组成、活性中心和作用机理。有关这方面的研究,我国生物化学工作者在其它学科的配合下早就作出了有意义的成果。1953年从土壤中分离出棕色固氮菌。1962年制备了该菌的无细胞抽提液,成功地实现了N₂还原成氨的试验。这是我国对固氮酶作用

研究的先驱。1972年后,从事固氮酶工作的生物化学部门进行了几次协作会战,取得了以下几方面的进展:

1. 从棕色固氮菌无细胞抽提液中分离提纯了钼铁蛋白和铁蛋白。所得蛋白的活性、纯度和得率都达到了较高水平。测定钼铁蛋白的分子量为225,000,钼铁蛋白中Mo、Fe、S各元素的比值为1.7:23:23。

2. 钼铁蛋白晶体的培养。用X-射线衍射方法研究固氮酶的结构,必需提供较大的结晶。我国的生物固氮科研工作者试验了多种培养晶体的方法,目前已用微量透析法制得长200μ宽5μ的钼铁蛋白针状微晶。

3. 铁钼辅基的分离。应用酒石酸处理的方法,从钼铁蛋白中分离了分子量约为2000的铁钼辅基,对于了解固氮酶活性中心的结构和功能迈进了一步。但铁钼辅基本身没有固氮能力,故不能作为模拟固氮模型的完全张本。还必需考虑到铁钼辅基之外的有效残基的协同作用。

4. 钼铁蛋白的聚合态问题。从棕色固氮菌提取液中分离出两种状态的钼铁蛋白,分子量分别为150,000和300,000,二者的含钼量不