

1, 10-邻菲咯啉-铜(II)-氨基酸配合物的合成、表征

及其 SOD 活性

廖升荣, 乐学义, 卢其明, 刘小平, 熊亚红, 林庆斌

(华南农业大学理学院, 广东 广州 510642)

摘要: 合成了 4 个新的配合物: $[\text{Cu}(\text{Phen})(\text{L-Phe})(\text{H}_2\text{O})]\text{Cl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ $[\text{Cu}(\text{Phen})(\text{Gly})(\text{H}_2\text{O})]\text{Cl} \cdot 2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ $[\text{Cu}(\text{Phen})(\text{L-Arg})(\text{Cl})]\text{Cl} \cdot 2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ $[\text{Cu}(\text{Phen})(\text{L-Ile})(\text{H}_2\text{O})]\text{Cl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Phen: 1, 10-邻菲咯啉; L-Phe: 苯丙氨酸; Gly: 甘氨酸; L-Arg: 精氨酸; L-Ile: 异亮氨酸). 用元素分析、红外光谱、紫外-可见光谱、热重等方法对配合物的结构进行了表征, 并用改进的氯化硝基四氮唑蓝 (NBT) 光还原法测定了这 4 个配合物催化歧化超氧阴离子 ($\text{O}_2^{\cdot -}$) 的能力. 结果表明, 这些配合物在 10^{-8} ~ $10^{-7}\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的浓度范围内对 NBT 光还原速率均能达到 50% 以上的抑制率.

关键词: SOD; 模型化合物; SOD 活性; 铜(II); 氨基酸

中图分类号: O614. 121 文献标识码: A 文章编号: 1001-411X(2006)03-0122-03

Synthesis, Characterization and SOD-Like Activity

of 1,10-Phenanthroline.Cu(II)-Amino Acid Complexes

LIAO Sheng-rong, LE Xue-yi, LU Qi-ming, LIU Xiao-ping, XIONG Ya-hong, LIN Qing-bin

(College of Sciences, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: Four new complexes of Cu(II) with phenanthroline and L-amino acid (L-Phenylalanine, Glycinate, L-Arginine, L-Ileucinate) were synthesized and characterized by elemental analysis, infrared spectra, UV-vis absorption spectra and thermal gravimetric analyses. The catalytic activity of the complexes for the disproportionation of $\text{O}_2^{\cdot -}$ was determined by NBT method. The result shows that the complexes have a high SOD-like activity, and their concentrations of 50% inhibition are in the range of 10^{-8} ~ $10^{-7}\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

Key words: SOD; mimic compound; SOD-like activity; copper(II); amino acid

超氧化物歧化酶(SOD)能快速催化歧化植物体内的超氧阴离子($\text{O}_2^{\cdot -}$),从而维持植物体内正常生理过程.但当植物受到病菌、低温等不良影响时, $\text{O}_2^{\cdot -}$ 就可能在植物体内积累,植物的生长就会受阻^[1].此情况下行之有效的方法是对处于上述逆境中的植物施用外源 SOD 来提高植物的抗逆性.由于天然 SOD 存在膜透性差、抗原性、价格昂贵等缺点,使其应用受到了限制.因此研究低分子量的 SOD 模拟物成了生物无机化学领域中的热门研究课题^[2].本研究合成和表征了 4 个新的 1,10-邻菲咯啉-Cu(II)-氨

基酸配合物,并用 NBT 光还原法测定了配合物的 SOD 活性.结果表明,这些配合物均具有较高的 SOD 活性,有望成为药肥合一的植物生长抗逆剂.

1 材料与方法

1.1 仪器与药品

Elementar 240C 型元素分析仪, Nicolet 170SX 型红外分光光度计(KBr 压片), Shimadzu UV-260 型紫外-可见光谱仪,热重分析仪(日本 Shimadzu 公司),721 分光光度计.

收稿日期:2005-03-26

作者简介:廖升荣(1979-),男,硕士研究生;通讯作者:乐学义(1961-),男,教授,博士, E-mail:lexy@scau.edu.cn

基金项目:广东省自然科学基金重点项目(04105986)

天然 SOD 纯品粉(比活力 6 000 U/mg, 纯度 98%, $M_r = 32\,000$), 广东大洋生化技术研究所; 苯丙氨酸(L-Phe)、甘氨酸(Gly)、精氨酸(L-Arg)、异亮氨酸(L-Ile)、1,10-邻菲咯啉(Phen), 均为上海伯奥公司产品; 氯化硝基四氮唑蓝(NBT)、核黄素(V_{B2}), 市售生化试剂; 四甲基乙二胺、 $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 均为市售分析纯。

1.2 配合物的合成

4 个配合物(a、b、c 和 d)的合成方法相似。加热搅拌下, 将等量(0.5 mmol) $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 和 Phen 溶解在 10 mL 无水乙醇中, 然后将中和过的 0.5 mmol 氨基酸(L-Phe, Gly, L-Ile 或 L-Arg) 水溶液加入到上述溶液中, 用 NaOH 调节 pH 至 4 ~ 5, 继续搅拌 10 min, 室温冷却过滤, 滤液在室温下放置。含 Gly 的溶液于 3 d 后出现蓝色针状晶体, 其余 1 个月后析出晶体。将晶体过滤, 乙醇洗涤 3 次, 室温下干燥, 并保存于干燥器中。

1.3 SOD 活性(抑制率)的测定

用改进的 NBT 光还原法测定了配合物催化歧化超氧阴离子的活性^[3]。用 pH7.8 的磷酸盐缓冲液配制含 $9.32 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NBT、 $6.80 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ V_{B2} 、 $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 四甲基乙二胺的混合液作为空白反应液。取 3.0 mL 空白液于光径为 1 cm 的比色皿中用荧光灯恒温(25 °C)照射, 第 1 次照射 60 s, 以后每次照射 30 s, 并测定 $D_{560 \text{ nm}}$ 。用上述空白液配制一系列浓度的 SOD 或模型化合物溶液, 并用相同的方法测定 SOD 及这些模型化合物 $D_{560 \text{ nm}}$ 。每次试验平行测定 3 次, 取平均值。

2 结果与分析

2.1 配合物的组成

元素分析结果(% , 括号内为计算值)为配合物 a($\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{ClCuN}_3\text{O}_5$): C50.93(50.70), H4.78(4.86), N8.45(8.45); 配合物 b($\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{ClCuN}_3\text{O}_{5.5}$): C40.23(40.38), H4.46(4.60), N10.05(10.09); 配合物 c($\text{C}_{18}\text{H}_{27}\text{Cl}_2\text{CuN}_6\text{O}_{4.5}$): C40.43(40.49), H5.13(5.10), N15.70(15.74); 配合物 d($\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{ClCuN}_3\text{O}_5$): C46.52(46.65), H5.79(5.66), N8.99(9.07)。

热重分析结果(% , 括号内为计算值)为配合物 a: 在 51 °C 失重 10.80(10.86), 相当于失去 3 H_2O ; 配合物 b: 在 61 °C 失重 13.41(15.16), 相当于失去 3.5 H_2O ; 配合物 c: 在 74 °C 失重 7.95(8.43), 相当于失去 2.5 H_2O ; 配合物 d: 在 63 °C 失重 13.08(11.65), 相当于失去 3 H_2O 。4 个配合物均易溶于水、乙醇、甲醇、二甲基甲酰胺(DMF), 而难溶于苯和

乙腈。

2.2 电子光谱

测定了配合物水溶液在 200 ~ 800 nm 范围内的 UV-vis 吸收光谱。配合物 a、b、c、d 在 204 nm[摩尔吸光系数(ϵ)分别为 40 300、38 200、39 500 和 35 750 $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$]、223 nm(ϵ 分别为 28 050、32 100、31 000、28 900 $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)、273 nm(ϵ 分别为 26 850、32 350、30 450、29 150 $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)附近出现了 3 个归属于配体 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁的较强吸收。Phen 的 $\pi \rightarrow \pi^*$ 吸收波长在形成配合物前后基本未变, 但配合物中相应的 ϵ 减小, 这归因于 Phen 分子中 2 个 N 原子与 Cu^{2+} 配位后其芳环上电子云向 Cu^{2+} 转移, 使 Phen 环的共轭性减小。配合物 a、b、c 和 d 分别在 619 nm(ϵ 为 72.10 $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)、619 nm(ϵ 为 49.30 $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)、613 nm(ϵ 为 58.80 $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) 和 616 nm(ϵ 为 69.00 $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) 处产生了 1 个弱而宽的 d $\rightarrow$ d 跃迁吸收峰。

2.3 红外光谱

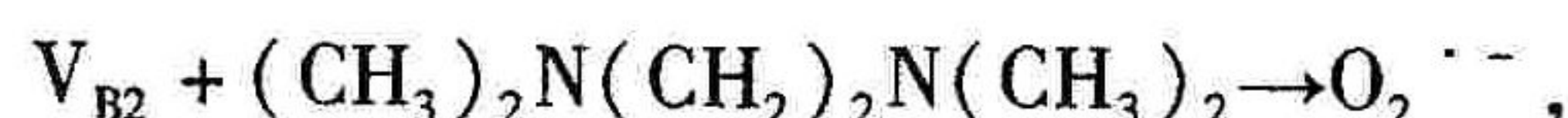
在 400 ~ 4 000 cm^{-1} (KBr 压片) 范围内测定了配合物的红外吸收光谱。与游离 Phen 相比, 配合物分子中 Phen 环上 $\delta_{\text{C}-\text{C}}$ (854 cm^{-1}) 和 $\delta_{\text{C}-\text{H}}$ (740 cm^{-1}) 向低波数方向移动, 表明 Phen 2 个 N 原子参与了配位。与游离 L-氨基酸相比, 配合物中 L-氨基酸的 ν_{NH_2} 发生了位移, 且出现了 $\nu_{\text{NH}_2}^{\text{as}}$ 和 $\nu_{\text{NH}_2}^{\text{s}}$ 吸收峰, 表明 L-氨基酸中 $-\text{NH}_2$ 与 $\text{Cu}(\text{II})$ 配位。1 700 ~ 1 750 cm^{-1} 范围内未出现任何吸收带, 且 L-氨基酸分子中 $-\text{COO}^-$ 的 $\nu_{\text{COO}^-}^{\text{as}}$ 和 $\nu_{\text{COO}^-}^{\text{s}}$ 发生较大分裂($\Delta\nu > 200 \text{ cm}^{-1}$), 表明 $-\text{COO}^-$ 参与配位且是单齿配体。430 cm^{-1} 处出现弱吸收带, 归属于 $\nu_{\text{Cu}-\text{O}(\text{H}_2\text{O})}$, 表明有水分子参与了配位。

综合上述几种方法的分析结果, 初步推测 4 个配合物分子式: a 为 $[\text{Cu}(\text{Phen})(\text{L-Phe})(\text{H}_2\text{O})]\text{Cl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, b 为 $[\text{Cu}(\text{Phen})(\text{Gly})(\text{H}_2\text{O})]\text{Cl} \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$, c 为 $[\text{Cu}(\text{Phen})(\text{L-Arg})(\text{Cl})]\text{Cl} \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$, d 为 $[\text{Cu}(\text{Phen})(\text{L-Ile})(\text{H}_2\text{O})]\text{Cl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 配合物分子均为变形四方锥结构^[4], Phen(N,N) 和 L-氨基酸(N,O) 位于四方锥赤道平面, 水分子在轴向上参与配位。

2.4 配合物 SOD 活性

在光照下, V_{B2} 与四甲基乙二胺作用产生 $\text{O}_2^{\cdot -}$, $\text{O}_2^{\cdot -}$ 可以使 NBT 还原为蓝紫色的化合物甲腈; 当存在 SOD 或模型化合物时, 能够与 NBT 竞争 $\text{O}_2^{\cdot -}$, 从而抑制 NBT 还原为蓝紫色化合物。所涉及的化学反

应如下:



检测体系: $O_2^{\cdot -} + NBT \rightarrow$ 甲臍(蓝紫色); 竞争体系: $O_2^{\cdot -} + SOD$ 或模型化合物 $\rightarrow$ 产物(P). 甲臍在 560 nm 处有最大光吸收, 且 $D_{560\text{ nm}}$ 与甲臍的浓度成正比, 由试验测得不同时间的 $D_{560\text{ nm}}$ 对时间(t)作图可得一直线, 并由此可求得直线的斜率 k . 然后, 应用公式 $\eta = (1 - k'/k) \times 100\%$ (k' 和 k 分别为加入和不加模型化合物或 SOD 后 $D_{560\text{ nm}}-t$ 直线的斜率) 可求得配合物的抑制率(η). η 对配合物浓度(c)作图得一曲线(图 1), 由此曲线可求得 η 为 50% 时配合物的浓度(表 1), 其值愈小, 配合物 SOD 活性愈大.

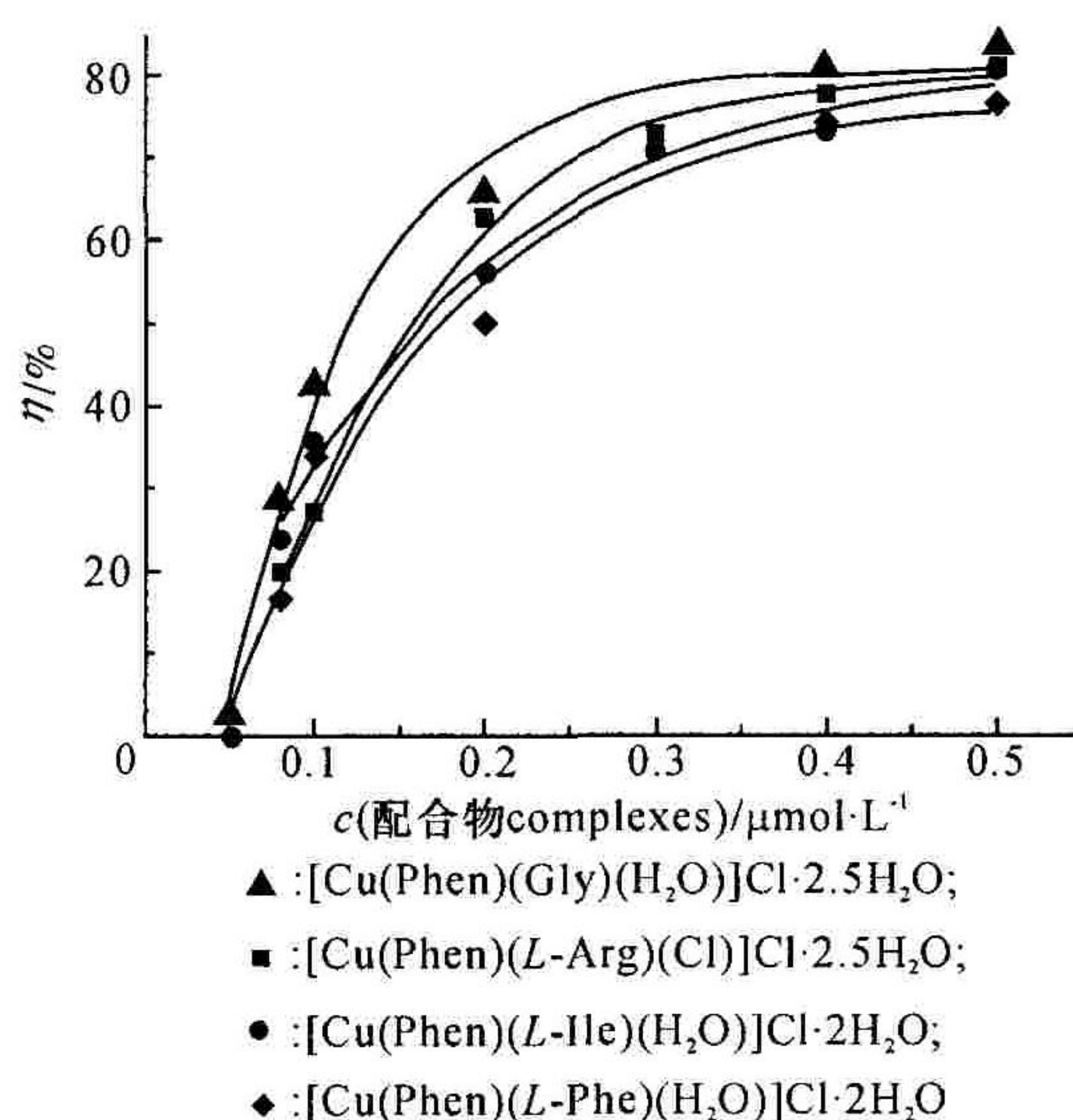


图 1 配合物抑制率(η)随浓度变化曲线

Fig. 1 Relationship between the inhibition rate(η) and concentration of the complexes

表 1 配合物具有 50% 抑制率时的浓度(c)

Tab. 1 The concentrations of 50% inhibition of the complexes for disproportionation of $O_2^{\cdot -}$

配合物 complexes	$c/\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
天然 SOD native CuZnSOD	0.014 7
a	0.174 0
b	0.139 0
c	0.156 0
d	0.166 0
胺基咪唑铜配物	
$[(\text{tren})\text{Cu}(\text{E-ImH})](\text{ClO}_4)_2$	175 ^[5]
铜氨基酸 $\text{Cu}(\text{amino acid})_2$	0.3 ~ 6.0 ^[6]

所测得天然 SOD 对 $O_2^{\cdot -}$ 50% 时抑制率的浓度与文献报道^[7] 十分接近, 表明本试验方法可靠. 4 个配合物 SOD 活性均比文献报道的相关配合物^[5-6] 的要高. 4 个配合物中, 含甘氨酸的配合物 b 的活性最

大, 可能归因于甘氨酸分子没有支链, 位阻较小, 有利于 $O_2^{\cdot -}$ 向铜离子靠近; 配合物 c 分子中氨基酸支链较长, 由于支链上带有正电荷, 促使 $O_2^{\cdot -}$ 向中心离子靠近, 活性排在第 2 位; 配合物 a 分子中氨基酸支链较长, 且为电子云密度较大的苯环, 位阻最大, 其活性在 4 个配合物中最弱. 因此, 4 个配合物的催化歧化活性大小次序为: $b > c > d > a$.

3 讨论

由上述结构分析、推测配合物分子可能为变形四方锥结构. 氨基酸羧基氧、氨基氮及 Phen 2 个 N 原子位于配合物分子的赤道平面上, 而水分子在配合物分子轴向上参与配位. 水分子配位能力较弱, 很容易被 $O_2^{\cdot -}$ 取代, 因此 $O_2^{\cdot -}$ 能够从配合物分子平面上下两侧进攻 Cu^{2+} , 使得 4 个配合物具有较高的 SOD 活性, 并且由于这些配合物合成方法简单、条件温和、稳定性高、分子中含有植物生长所需要的微量元素及营养成分氨基酸, 因而这些配合物有可能成为良好的 SOD 模型而用作药肥合一的植物生长抗逆增产剂. 有关作物抗逆试验正在进行之中.

参考文献:

- [1] 覃鹏, 刘飞虎, 梁雪妮. 超氧化物歧化酶与植物抗逆性[J]. 黑龙江农业科学, 2002(1): 31-34.
- [2] 廖展如, 陈战芬, 孟祥高, 等. 金属拟酶抗逆剂的设计与合成[J]. 华中师范大学学报: 自然科学版, 2003, 37(3): 336-342.
- [3] 自俊青, 邓希贤, 金虬, 等. 氮蓝四唑光照法实验操作的改进及效果[J]. 北京师范大学学报: 自然科学版, 1998, 34(1): 101-104.
- [4] 乐学义, 童明良. 1,10-邻菲咯啉-铜-L-蛋氨酸配合物的合成、表征及其分子结构[J]. 无机化学学报, 2002, 18(10): 1 023-1 027.
- [5] PATEL R N. X-band electron paramagnetic resonance, optical spectra and somebiological (SOD and antimicrobial activity) studies of the copper(II) complexes: a plausible model for superoxide dismutase[J]. Spectrochimica Acta Part A, 2004, 60: 2 201-2 208.
- [6] 李大珍, 程志明, 金虬. 几种 $\text{Cu}(\text{II})$ -氨基酸络合物的 SOD 样活性及配体结构对活性的影响[J]. 北京师范大学学报: 自然科学版, 1996, 32(2): 251-256.
- [7] RAFFAELE P B, VALERIA B, ENRICO C, et al. Potentiometric, spectroscopic and antioxidant activity studies of SOD mimics containing carnosine[J]. J Chem Soc Dalton Trans, 2003, 19(23): 4 406-4 415.

【责任编辑 李晓卉】