

三元甘氨酸-L-缬氨酸-铜(II)-多吡啶配合物 SOD活性及电化学性质

丁 杨, 任祥祥, 沈淑仪, 王彩霞, 刘英菊, 乐学义
(华南农业大学 理学院, 广东 广州 510642)

摘要:应用改进的氯化硝基四氮唑蓝(NBT)光照还原法研究了甘氨酸-L-缬氨酸-铜(II)-多吡啶型配合物:
[Cu(Gly-L-Val)(Phen)]·3H₂O (1)、[Cu(Gly-L-Val)(Tatp)]·2H₂O (2)、[Cu(Gly-L-Val)(Dppz)]·2H₂O (3)
[其中: Gly-L-Val = 甘氨酸-L-缬氨酸; Phen = 1,10-邻菲咯啉; Tatp = 1,4,8,9-四氮三联苯; Dppz = 二吡啶并(3,2-a:2',
3'-c)吩嗪]在水溶液中催化超氧阴离子自由基(O₂⁻·)歧化分解活性,并用循环伏安法研究了配合物的电化学性质. 结果
表明:3种配合物均具有良好的SOD活性,表观催化速率常数分别为1.03×10⁷、0.96×10⁷和0.79×10⁷ L·mol⁻¹·s⁻¹.

关键词:铜(II)配合物; 多吡啶配体; 甘氨酸-L-缬氨酸; 循环伏安法; SOD活性

中图分类号: O614.121

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2010)01-0108-04

SOD-Like Activities and Electrochemical Properties of Gly-L-Val -Copper(II) - Polypyridyl Complexes

DING Yang, REN Xiang-xiang, SHEN Shu-yi, WANG Cai-xia, LIU Ying-ju, LE Xue-yi
(College of Sciences, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: The SOD-like activities of complexes: [Cu(Gly-L-Val)(Phen)]·3H₂O (1), [Cu(Gly-L-Val)(Tatp)]·2H₂O (2), [Cu(Gly-L-Val)(Dppz)]·2H₂O (3) [Gly-L-Val = Glycyl-L-valine; Phen = 1,10-phenanthroline; Tatp = 1,4,8,9-tetranitrogen; Dppz = dipyrdo[3,2-a:2',3'-c]phenazine] were investigated in water solution by improved nitroblue tetrazolium (NBT)-illumination method. The electrochemical properties of the complexes were studied by cyclic voltammetry method. The results indicated that the complexes possess excellent SOD-like activities, and the rate constants (K_0) of complexes 1, 2 and 3 for catalyzing the dismutation of O₂⁻· are 1.03×10⁷, 0.96×10⁷, and 0.79×10⁷ L·mol⁻¹·s⁻¹, respectively.

Key words: copper(II) complex; polypyridyl; glycyl-L-valine; cyclic voltammetry; SOD-like activity

超氧化物歧化酶(SOD)是一类广泛存在于生物体内的重要金属酶,按其活性中心不同,可分为Cu-Zn-SOD、Fe-SOD、Mn-SOD和Ni-SOD等,其中Cu-Zn-SOD是存在最为普遍和最重要的一类^[1-2]. SOD能够催化超氧阴离子自由基发生歧化反应,从而清除生物体内过量的超氧阴离子自由基,平衡机体内的活性氧,不仅具有抗癌、抗炎、抗衰老及治疗自身免疫性疾病和心肌缺血与缺血再灌注综合征等疾病,同时也能提高植物的抗旱、抗盐碱、抗寒和抗病虫害能力^[3],在医学、食品、化妆品、农业等领域有着广泛

的应用前景. 然而,天然SOD存在着相对分子质量大、不易透过细胞膜、稳定性低、难以提纯和价格昂贵等不足,使其应用受到极大限制. 因此,研究既能避免天然SOD不足,又具有SOD催化活性的物质——SOD模型化合物成了生物无机化学界的热门研究课题^[4-7]. 依据多吡啶铜配合物具有一定的SOD活性,L-α-氨基酸是重要的生物配体,近年来华南农业大学生物无机化学研究室研究了系列L-α-氨基酸-铜(II)-多吡啶型SOD模型化合物,并发现这些化合物具有良好的SOD活性和生物活性^[8-13].

收稿日期: 2008-12-30

作者简介: 丁 杨(1983—),男,硕士;通讯作者: 乐学义(1961—),男,教授, E-mail: lexu@scau.edu.cn

基金项目: 华南农业大学校长基金(2007K031)

为了深入这方面的研究,最近把研究的重心转移到另一重要生物配体小肽方面,而开展二肽-铜(II)-多吡啶型 SOD 模拟物研究. 本文通过改进的氯化硝基四氮唑蓝(NBT)光照还原法研究了3个甘氨酸-L-缬氨酸-铜(II)-多吡啶配合物催化超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)歧化分解的作用,同时应用循环伏安法研究了这些配合物的电化学性质. 旨在为设计、合成新型 SOD 模拟物,开发具有应用前景的植物抗逆生长剂提供科学依据.

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

天然 SOD 酶(32000,比活力:6000 U/mg,纯度:98%,广东大洋生化技术研究所),核黄素(V_{B_2})(上海伯奥生物科技有限公司)、四甲基乙二胺(上海前进化学试剂厂)和氯化硝基四氮唑蓝(NBT)(国药集团化学试剂有限公司)均为生化试剂,其他试剂均为市售分析纯;整个试验过程均使用二次石英蒸馏水. 3个甘氨酸-L-缬氨酸-铜(II)-多吡啶配合物 $[Cu(Gly-L-Val)(Phen)] \cdot 3H_2O$ (1)、 $[Cu(Gly-L-Val)(Tatp)] \cdot 2H_2O$ (2)、 $[Cu(Gly-L-Val)(Dppz)] \cdot 2H_2O$ (3)[其中:Gly-L-Val = 甘氨酸-L-缬氨酸;Phen = 1,10-邻菲咯啉;Tatp = 1,4,8,9-四氮三联苯;Dppz = 二吡啶并[3,2-a:2',3'-c]吩嗪]由华南农业大学生物无机化学研究室制备与表征^[14].

SOD 活性测定所用仪器:721 型分光光度计(上海精密科学仪器有限公司),501 型超级恒温器(上海市实验仪器厂),TES-1332A 型照度计(台湾泰仕电子工业股份有限公司),26 W 节能冷光灯(江苏三雄极光照明公司),SVC-500 VA 高精度全自动交流稳压器(香港利泰集团深圳市利泰电子有限公司). 配合物电化学性质研究在 CHI660C 电化学工作站(上海辰华仪器有限公司)上进行.

1.2 SOD 活性测定

采用改进的 NBT 光照还原法测定配合物的 SOD 活性^[15]. 用磷酸缓冲液(pH7.8)配制含 6.80×10^{-6} mol/L 核黄素、 1.0×10^{-4} mol/L 四甲基乙二胺、 9.32×10^{-5} mol/L NBT 及系列浓度(0.1~0.8 $\mu\text{mol/L}$)配合物或天然 SOD 的混合溶液. 室温下用恒定光强 $[(50 \pm 500) \text{ lx}]$ 的冷光灯照射,固定波长 560 nm,用分光光度计测定混合溶液在不同光照时间的光密度. 每种混合溶液至少平行测定 3 次,取平均值.

1.3 电化学性质测定

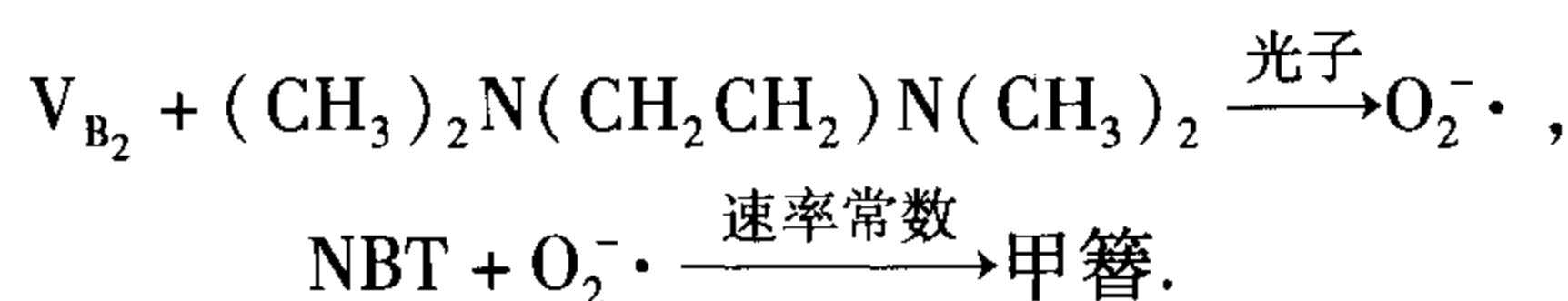
室温和氮气保护下,用 0.1 mol/L KCl 作为支持电解质,金电极作为工作电极,铂电极作为对电极,银/氯化银电极作为参比电极,控制扫描速度为 200 mV/s,使用电化学工作站测定 4×10^{-5} mol/L 配合

物水溶液的循环伏安图.

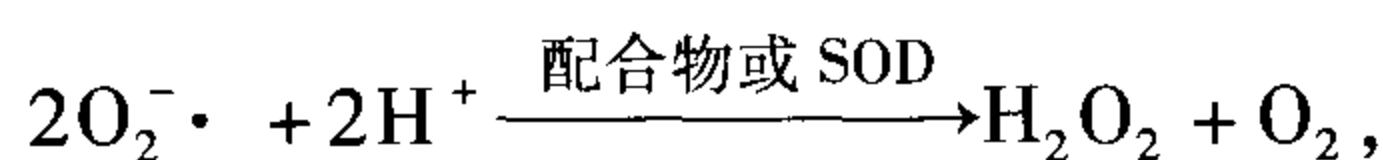
2 结果与分析

2.1 配合物 SOD 活性

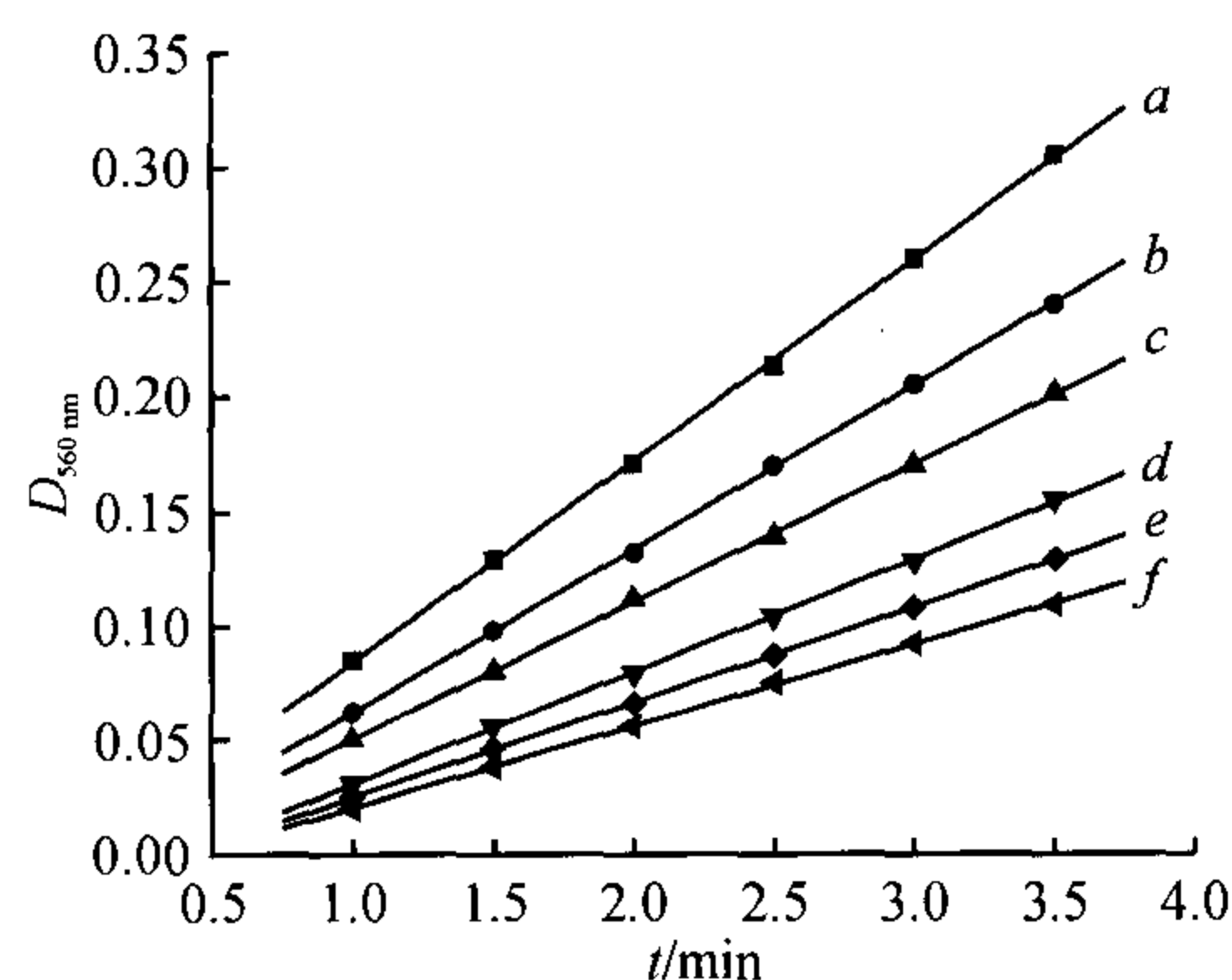
光照射下,四甲基乙二胺与 V_{B_2} 作用产生超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$),而 $O_2^{\cdot-}$ 使 NBT 还原为蓝紫色的化合物甲簪(Formazane),即:



甲簪在 560 nm 处具有最大光密度,且光密度与其浓度成正比,因此由试验测得不同时间光密度($D_{560 \text{ nm}}$)对光照时间(t)作图可得一直线(配合物 1 的 $D_{560 \text{ nm}}-t$ 图如图 1 所示,另 2 个配合物类似),直线斜率(k)的大小反映了甲簪产生的速度. 然而,当向上述反应体系中加入天然 SOD 或配合物时,这些化合物能催化 $O_2^{\cdot-}$ 歧化分解为 H_2O_2 和 O_2 ,即:



从而降低了 $O_2^{\cdot-}$ 还原 NBT 成甲簪的速度. 图 1 表明,随着反应体系中加入的配合物浓度增加(由直线 $a \sim f$),直线的斜率逐渐变小, $O_2^{\cdot-}$ 还原 NBT 为化合物甲簪的速度降低,表明配合物催化 $O_2^{\cdot-}$ 歧化分解速度随着浓度的增加而增加.



$a \sim f$: 配合物的浓度分别为 0、0.1、0.2、0.4、0.6 和 0.8 $\mu\text{mol/L}$

图 1 配合物 1 在不同浓度溶液的光密度随时间的变化曲线
Fig. 1 Absorbency of various concentrations of complex 1 in solution

由: $\eta = (1 - k'/k) \times 100\%$ 可求出配合物或 SOD 对 $O_2^{\cdot-}$ 的抑制率(η). 其中 k' 为加入配合物或 SOD 后 $D_{560 \text{ nm}}$ 对 t 所作直线(图 1 中 $b \sim f$)的斜率,而 k 为空白反应液直线(图 1 中 a)的斜率,即 $\Delta D_{560 \text{ nm}} / \Delta t$. 以配合物浓度 c 为 x 轴,抑制率为 y 轴作图可获得一曲线(配合物 1 对 $O_2^{\cdot-}$ 的抑制率随浓度变化曲线如图 2 所示,另 2 个配合物类似),由此曲线可求得抑制率为 50% 时所需配合物的浓度,即为一个活性单位值(IC_{50})(表 1). 另外,据下式可求出配合物对 $O_2^{\cdot-}$ 的表观催化速率常数 K_Q :

$$K_Q = K_N \cdot c_{\text{NBT}} \cdot (k/k' - 1)/c_Q,$$

其中, K_N 为 $6.0 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, c_{NBT} 和 c_Q 分别为 NBT 和配合物(或 SOD)的浓度, 计算结果见表 1.

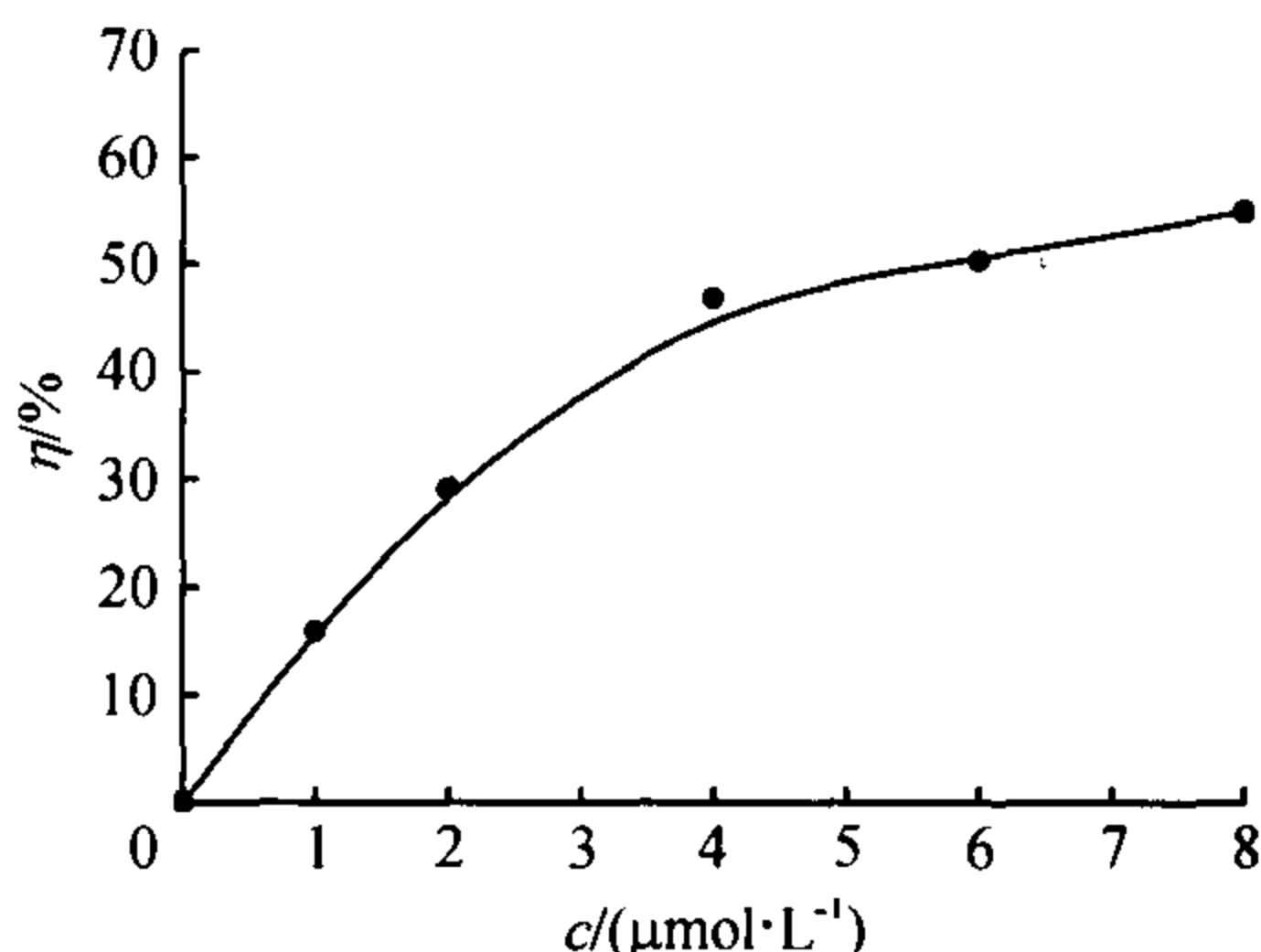


图2 抑制率(η)随配合物1的浓度(c)变化曲线

Fig.2 Relationship between the inhibition rate and concentration of complex 1

表1 配合物及天然 Cu-Zn-SOD 的 IC_{50} 和 K_Q 值

Tab.1 IC_{50} and K_Q values of the complexes and native Cu-Zn-SOD

化合物	$IC_{50}/$ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	$K_Q/$ ($\times 10^7 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)
天然 Cu-Zn-SOD	0.015	38.20
配合物 1	0.544	1.03
配合物 2	0.585	0.96
配合物 3	0.712	0.79
L - α -氨基酸-铜(II)-多吡啶 ¹⁾	0.225 ~ 0.854	0.57 ~ 3.27

1) L - α -氨基酸-铜(II)-多吡啶的数据源于文献[8-13]

天然 Cu-Zn-SOD 酶的 IC_{50} 实验值与文献[16]报道十分接近, 表明本实验方法可靠. 研究表明, 天然 Cu-Zn-SOD 酶的活性中心 Cu(II) 具有变形四方锥配位结构^[1], 在催化 $O_2^{\cdot -}$ 歧化分解过程中, Cu(II) 变形四方锥结构与 Cu(I) 变形四面体结构容易相互转化, 氧化还原循环容易进行, 从而能较快地催化歧化 $O_2^{\cdot -}$. 本文研究的 3 种配合物在水溶液中均具有类似于天然 Cu-Zn-SOD 酶活性中心的 Cu(II) 变形四方锥配位结构(图 3), 容易与 $O_2^{\cdot -}$ 作用转化成 Cu(I) 的变形四面体配位结构, 因此这些配合物与

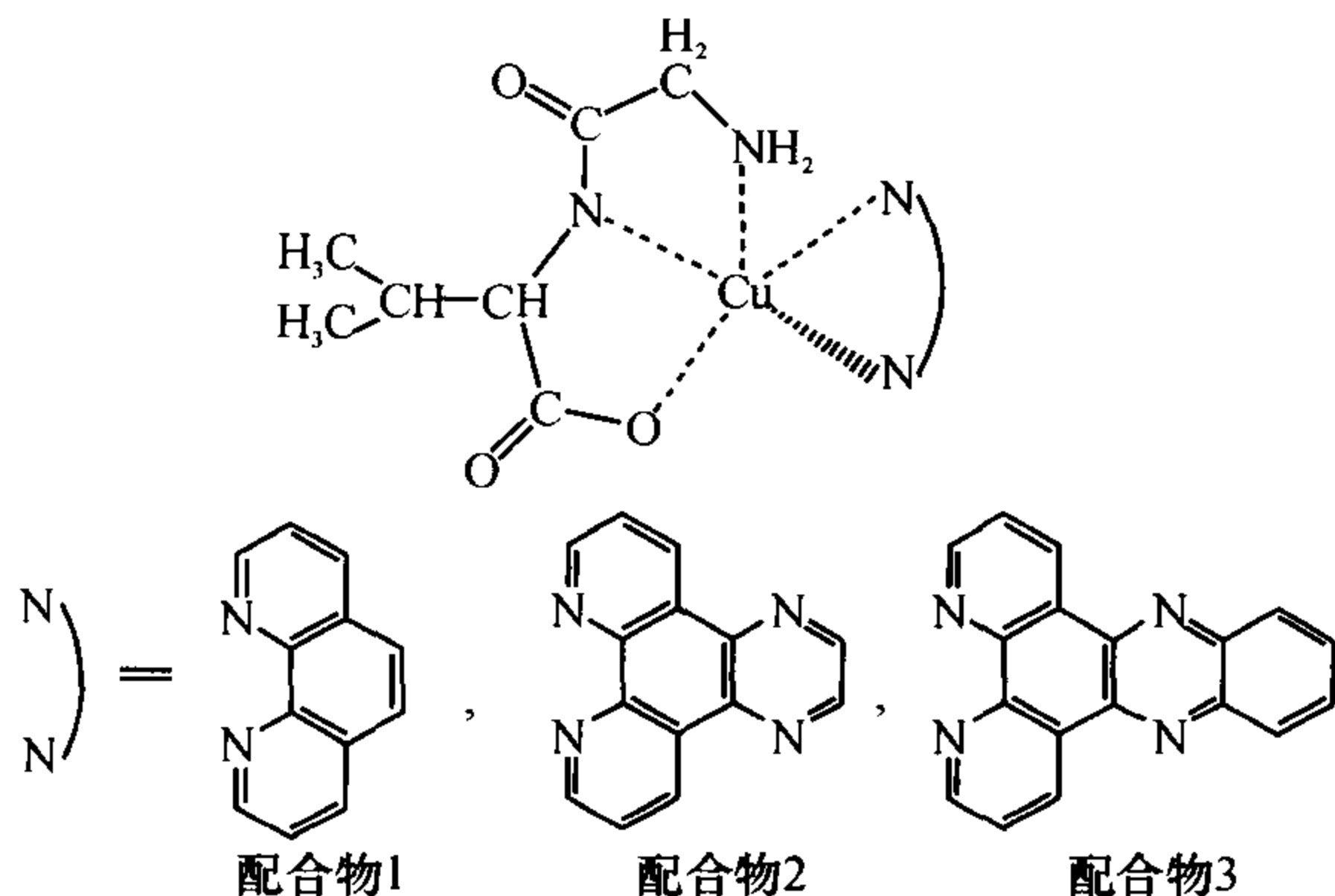


图3 配合物分子的配位结构

Fig.3 The molecular structure of the complexes

L - α -氨基酸-铜(II)-多吡啶型配合物类似^[8-13], 均具有较高的 SOD 活性.

所研究配合物 SOD 活性较 L - α -氨基酸-铜(II)-多吡啶型配合物^[8-13] 稍小, 推测可能主要归因于 2 个方面: 一方面, L - α -氨基酸-铜(II)-多吡啶型配合物在溶液中功能性结构为带有一正电荷的配离子 $[\text{Cu}(\text{L-}\alpha\text{-amino acid})(\text{polypyridyl})(\text{H}_2\text{O})]^+$, 而甘氨酸- L -缬氨酸-铜(II)-多吡啶型配合物为中性分子 $[\text{Cu}(\text{dipeptide})(\text{polypyridyl})]$, 因此前者更有利于带负电荷的 $O_2^{\cdot -}$ 接近; 另一方面, 相对于配位 H_2O , 甘氨酸- L -缬氨酸为多齿螯合配体, 结合能力较强, 因而配合物相对较难由四方锥配位结构转化为变形四面体结构. 另外, 所研究的 3 个配合物 SOD 活性彼此之间也有所差别. 由于配合物分子中中心金属铜(II)离子、二肽配体及测定条件均相同, 因此推测影响其 SOD 活性的主要因素是多吡啶配体的结构. Phen、Tatp 和 Dppz 均为疏水性配体, 且其疏水性作用随着芳环增大而增加, 即: Phen < Tatp < Dppz. 疏水性作用不利于带有负电荷的 $O_2^{\cdot -}$ 接近中心铜离子, 故推测配合物催化 $O_2^{\cdot -}$ 歧化分解的活性随着多吡啶配体芳环增大而减小, 即 3 个配合物催化歧化活性大小次序为: 配合物 1 > 配合物 2 > 配合物 3, 与上述实验测定结果一致.

2.2 配合物电化学性质

为了进一步深入研究配合物的 SOD 活性, 本文应用循环伏安法研究了配合物的电化学性质. 获得配合物的氧化峰电位(E_{pa})、还原峰电位(E_{pc})、氧化还原电位($E_{1/2}$)和峰电位差(ΔE_p)均列于表 2 中.

表2 配合物的 E_{pa} 、 E_{pc} 、 $E_{1/2}$ 和 ΔE_p 数据

Tab.2 The data of E_{pa} , E_{pc} , $E_{1/2}$ and ΔE_p of the complexes

配合物	E_{pa}/V	E_{pc}/V	$E_{1/2}/\text{V}$	$\Delta E_p/\text{V}$
1	0.315	-0.339	-0.012	0.654
2	0.389	-0.348	0.020	0.737
3	0.406	-0.102	0.152	0.508

从表 2 可知, 与 KCl 溶液对比, 配合物在 $-0.049 \sim 0.362 \text{ V}$ 内均有一对氧化还原峰, 结合表中 ΔE_p 数据推测配合物在实验条件下的氧化还原过程是一准可逆过程^[17]. 3 个配合物的峰电位比较接近, 可能归因于 3 个配合物分子在溶液中存在类似的变形四方锥铜(II)配位结构. 为了有效催化超氧阴离子自由基歧化分解 ($2O_2^{\cdot -} + \text{H}^+ \xrightarrow{\text{配合物}} \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$), 配合物的氧化还原电位必须处于 $-0.16 \sim 0.89 \text{ V}$ (相对于 NHE) 或 $-0.36 \sim 0.69 \text{ V}$ (相对于 Ag/AgCl) 范围之内^[18]. 因此, 推测这些配合物均具有催化超氧阴离子自由基歧化分解的 SOD 活性, 与上述配合物 SOD 活性测定结果一致.

3 讨论与结论

本文应用改进的 NBT 光照还原法研究了 3 个三元甘氨酸-L-缬氨酸-铜(II)-多吡啶配合物 SOD 活性. 结果表明, 这些配合物具有良好的 SOD 活性, 其活性大小与多吡啶芳环结构有关, 芳环愈大, 疏水性愈大, 不利于带有负电荷的 $O_2^{\cdot-}$ 接近中心铜离子, 导致 SOD 活性降低. 与对应的 L- α -氨基酸-铜(II)-多吡啶配合物相比, 由于所研究配合物中心铜原子正电荷减少、电子云密度增加以及甘氨酸-L-缬氨酸三齿配体螯合作用不利于配合物由四方锥铜(II)配位结构转化为变形四面体铜(I)配位结构, 反应过程所需活化能较高, 催化 $O_2^{\cdot-}$ 歧化分解速率较低, 因而表现出相对较小的 SOD 活性.

配合物的 SOD 活性通常与配合物的氧化还原电位有关, 只有当配合物的氧化还原电位处于 $-0.36 \sim 0.69$ V (相对于 Ag/AgCl) 范围之内时, 才能有效地催化 $O_2^{\cdot-}$ 歧化分解. 本文通过循环伏安法研究了配合物的电化学性质, 进一步证实了配合物所具有的 SOD 活性.

另外, 由于所研究配合物分子内含有对生物生长具有生理活性的二肽及微量元素 Cu^{2+} , 因此这些配合物可作为 SOD 模拟物而具有良好的应用前景. 有关配合物生物活性如植物生长抗逆性(抗干旱、抗盐碱和抗病虫害等)研究正在进行之中.

参考文献:

- [1] HOLM R H, KENNEPOHL P, SOLOMON E I. Structural and functional aspects of metal sites in biology[J]. Chem Rev, 1996, 96 (7): 2239-2314.
- [2] 刘元东, 刘楚干, 邱冠周. 嗜酸热原体菌的超氧化物歧化酶的结构建模和进化踪迹分析[J]. 现代生物医学进展, 2008, 8(6): 1057-1060.
- [3] 林庆斌, 廖升荣, 熊亚红, 等. 超氧化物歧化酶(SOD)的研究和应用进展[J]. 化学世界, 2006, 47(6): 378-381.
- [4] FU Heng, ZHOU Ying-hua, CHEN Wei-lin, et al. Complexation, structure, and superoxide dismutase activity of the imidazolate-bridged dinuclear copper moiety with -cyclodextrin and its guanidinium -containing derivative[J]. J Am Chem Soc, 2006, 128(15): 4924-4925.
- [5] CISNETTI F, PELOSI G, POLICAR C. Synthesis and superoxide dismutase-like activity of new manganese(III) complexes based on tridentate N_2O ligands derived from histamine[J]. Inorg Chim Acta, 2007, 360(2): 557-562.
- [6] LAHAYE D, MUTHUKUMARAN K, HUNG C H, et al. Design and synthesis of manganese porphyrins with tailored lipophilicity: Investigation of redox properties and superoxide dismutase activity[J]. Bioorg & Med Chem,

2007, 15(22): 7066-7086.

- [7] DEVEREUX M, SHEA D O, CONNOR M O, et al. Synthesis, catalase, superoxide dismutase and antitumour activities of copper(II) carboxylate complexes incorporating benzimidazole, 1, 10-phenanthroline and bipyridine ligands: X-ray crystal structures of $[Cu(BZA)_2(bipy)(H_2O)]$, $[Cu(SalH)_2(BZDH)_2]$ and $[Cu(CH_3COO)_2(5,6-DMBZDH)_2]$ ($SalH_2$ = salicylic acid; $BZAH$ = benzoic acid; $BZDH$ = benzimidazole and 5,6-DMBZDH = 5,6-dimethylbenzimidazole) [J]. Polyhedron, 2007, 26(15): 4073-4084.
- [8] LE Xue-yi, LIAO Sheng-rong, LIU Xiao-ping, et al. Synthesis, structure and SOD-like activity of ternary Cu(II) complex with 1, 10-phenanthroline and L-valinate[J]. J Coord Chem, 2006, 59(9): 985-995.
- [9] GU Qin, LE Xue-yi, LIN Qing-bin, et al. Synthesis, characterization and SOD activities of IP-copper(II)-L-amino acid complexes[J]. Chin J Chem, 2007, 25(8): 791-796.
- [10] 古琴, 林庆斌, 乐学义. TATP-铜(II)-L-氨基酸配合物的合成、表征及其 SOD 活性[J]. 化学通报, 2007, 70(6): 449-454.
- [11] LIAO Sheng-rong, LE Xue-yi, FENG Xiao-long. Synthesis, structure and SOD-like activities of ternary copper(II) complexes with 1, 10-phenanthroline and L-amino acid [J]. J Coord Chem, 2008, 61(6): 847-856.
- [12] 廖升荣, 毛小云, 张昭其, 等. SOD 模拟物对玉米幼苗抗盐害作用效果及机理研究[J]. 土壤通报, 2007, 38(5): 962-965.
- [13] 廖升荣, 任祥祥, 乐学义, 等. L-氨基酸-铜(II)-邻菲咯啉型 SOD 模拟物活性及对玉米幼苗抗盐害作用的影响[J]. 中国农学通报, 2008, 24(6): 237-242.
- [14] 丁杨, 任祥祥, 庄楚雄, 等. 甘缬二肽-铜(II)-多吡啶配合物合成、表征及与 DNA 的作用[J]. 无机化学学报, 2009, 25(4): 656-662.
- [15] 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.
- [16] BONOMO R P, BRUNO V, CONTE E, et al. Potentiometric, spectroscopic and antioxidant activity studies of SOD mimics containing carnosine [J]. Dalton Trans, 2003(23): 4406-4415.
- [17] 李薇, 李昶红, 杨颖群, 等. 配合物 $[Cu_2(m-MBA)_4(2,2'-bipy)_2(H_2O)] \cdot H_2O$ 的水热合成、晶体结构及电化学分析[J]. 无机化学学报, 2007, 23(7): 1264-1268.
- [18] LI Dong-feng, LI Shuan, YANG De-xi, et al. Syntheses, structures, and properties of imidazolate-bridged Cu(II)-Cu(II) and Cu(II)-Zn(II) dinuclear complexes of a single macrocyclic ligand with two hydroxyethyl pendants [J]. Inorg Chem, 2003, 42(19): 6071-6080.

【责任编辑 李晓卉】