



熊亚红, 黄显才, 何金锋, 等. 5-氯甲基水杨醛缩 L-酪氨酸锰(II)配合物的合成及生物活性的研究[J]. 华南农业大学学报, 2015, 36(4): 129-136.

5-氯甲基水杨醛缩 L-酪氨酸锰(II)配合物的合成及生物活性的研究

熊亚红^{1,2}, 黄显才¹, 何金锋¹, 钟志伟¹, 王子莞¹, 黄嘉琪¹, 郑嘉雯¹

(1 华南农业大学 材料与能源学院, 广东 广州 510642; 2 华南农业大学 生物材料研究所, 广东 广州 510642)

摘要:【目的】在甲醇溶剂体系中合成 5-氯甲基水杨醛缩 L-酪氨酸 Schiff 碱配体及其 Mn(II) 配合物。【方法】通过元素分析、摩尔电导、红外光谱、紫外光谱及差热-热重方法确定它们的分子组成; 采用滤纸片法、光还原 NBT 法及荧光猝灭法测定该配合物的抗菌活性、SOD 活性及其与牛血清白蛋白(BSA)的相互作用。【结果和结论】5-氯甲基水杨醛缩 L-酪氨酸 Schiff 碱配体及其 Mn(II) 配合物的分子组成分别为 $K_2L \cdot 3H_2O$ ($L = C_{17}H_{14}NO_4Cl^{2-}$) 和 $K[MnL(CH_3COO)] \cdot 2H_2O$, 配合物中 Schiff 碱配体上的亚胺基 N、羧基 O 及酚羟基 O 均与 Mn(II) 配位。该配合物的抗菌活性高于配体, 且对革兰阴性菌大肠埃希菌的抗菌活性高于对革兰阳性菌金黄色葡萄球菌的; 该配合物具有较高的 SOD 活性, 其 IC_{50} 为 $1.616 \mu mol \cdot L^{-1}$; 基于静态猝灭机理, 该配合物能有效猝灭 BSA 的内源荧光, 并与 BSA 结合形成 1 种基态复合物, 25 °C 条件下与 BSA 的结合位点数 n 约为 1, 结合常数 K_A 为 $1.62 \times 10^6 L \cdot mol^{-1}$, 且分子内可能发生非辐射能量转移。

关键词: Mn(II) 配合物; 5-氯甲基水杨醛缩 L-酪氨酸; 抗菌活性; SOD 活性; 牛血清白蛋白

中图分类号: O641.4; O644.17

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2015)04-0129-08

Synthesis and biological activities of manganese(II) complex with 5-(chloromethyl) salicylaldehyde-tyrosine

XIONG Yahong^{1,2}, HUANG Xiancai¹, HE Jinfeng¹, ZHONG Zhiwei¹, WANG Ziyuan¹,
HUANG Jiaqi¹, ZHENG Jiawen¹

(1 College of Materials and Energy, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

2 Institute of Biomaterial, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract:【Objective】To synthesize a novel Schiff base, 5-(chloromethyl) salicylaldehyde-tyrosine and its manganese(II) complex with methanol solvent. 【Method】The ligand and complex were characterized by elemental analysis, molar conductance, IR, UV and TG-DTA. Antibacterial activity, SOD activity of the complex and its interaction with bovine serum albumin (BSA) were examined by filter paper method, photoreduction of nitro-blue tetrazolium (NBT) and fluorescence quenching technique, respectively. 【Result and conclusion】The ligand and complex formula were $K_2L \cdot 3H_2O$ ($L = C_{17}H_{14}NO_4Cl^{2-}$) and $K[MnL(CH_3COO)] \cdot 2H_2O$, respectively. The nitrogen atom of imino group and the oxygen atoms of phenol group and carboxyl group in the ligand and one acetate ion were coordinated with the central metal Mn(II). The antibacterial experiments *in vitro* showed that the complex had higher antibacterial activity than the Schiff base. The antibacterial activity against *Escherichia coli* as a gram-negative bacterium was higher than *Staphylococcus aureus* as a gram-positive bacterium. The complex had

收稿日期: 2014-05-21 优先出版时间: 2015-06-10

优先出版网址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/44.1110.s.20150610.1635.021.html>

作者简介: 熊亚红(1976—), 女, 副教授, 博士, xiongyahong@scau.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金(青年科学基金)(21207041); 广东省自然科学基金团队项目(S2013030012842)

<http://xuebao.scau.edu.cn>

high SOD activity and its IC_{50} value was $1.616 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. The complex effectively quenches the intrinsic fluorescence of BSA via static quenching mechanism, and forming a ground-state complex with BSA. The number of binding sites (n) and the binding constant (K_A) at $25\text{ }^\circ\text{C}$ are about 1 and $1.62 \times 10^6 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ respectively, and non-radiation energy is transferred red from BSA to the complex possibly.

Key words: maganesium(II) complex; 5-(chloromethyl) salicylaldehyde-tyrosine; antibacterial activity; SOD activity; bovine serum albumin

水杨醛类 Schiff 碱是由水杨醛类化合物上的活泼醛基与伯氨缩合形成的一类含有亚胺基— $\text{RC}=\text{N}$ —的化合物. 这类化合物具有抗菌、抗病毒、抗癌、抗氧化等药理活性. 氨基酸 Schiff 碱具有多个 N、O 原子, 是一类重要的生物配体, 其分子含有活泼的氨基酸基团, 引入其他不同的结构和活性基团, 尤其与过渡金属形成配合物后, 很多生物活性得到加强, 而且这类配合物广泛应用于载氧体模型化合物、抗癌、抑菌化合物以及仿酶催化物等方面^[1]. 这类配合物通过促进生物体内的 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 分解, 对肿瘤、病菌等有一定的抑制作用^[2].

绝大部分小分子药物通过血液循环到达治疗靶点, 而小分子药物能与血液中富含的血清白蛋白相互作用而影响药效, BSA 常用于研究小分子药物与蛋白质大分子的相互作用^[3].

5-氯甲基水杨醛[5-(chloromethyl) salicylaldehyde, Cmsa]是一种用途广泛的取代型的水杨醛, 笔者曾对它的合成方法进行了改进^[4], 并报道了它与 L-苯丙氨酸(L-phenylalanine, L-Phe)形成的 Schiff 碱及其部分金属配合物的抗菌活性^[5]. L-酪氨酸(L-Tyrosine, L-Tyr)是一种芳香族氨基酸, 是神经递质的前体之一, 可以增加体液内神经递质, 特别是多巴胺和去甲肾上腺素的含量, 医药上用作治疗甲状腺功能亢进, 也可作为食品添加剂. 本文在甲醇溶剂中合成了 5-氯甲基水杨醛缩 L-酪氨酸 Schiff 碱配体及其 Mn(II) 配合物, 对配体和配合物的组成、结构进行了表征, 测定了它们的抗菌活性、SOD 活性及其与 BSA 的相互作用. 本研究有助于拓宽抗菌药物和 SOD 模拟物的研究范围, 为探索和开发新型的抗菌药物及抗氧化药物奠定一定的理论和试验基础.

1 材料与方法

1.1 材料

大肠埃希菌(*Escherichia coli*, G^-)和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, G^+)均由广东省植物分子育种重点实验室(华南农业大学)提供并自行保藏. 平板培养基为 $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 MH 琼脂, 液体培养

基 $w = 2.5\%$ 的 MH 肉汤粉.

Vario EL 元素分析仪, 德国 ELEMENTAR 公司; AVATAR 360 型 FT-IR 光谱仪, 美国 Nicolet 公司; UV-2550 型紫外可见分光光度计, 日本 Shimadzu 公司; RF-5301PC 型荧光分光光度计, 日本 Shimadzu 公司; DGT-60 型差热热重分析仪, 日本 Shimadzu 公司.

Cmsa 根据文献[4]自行制备, 熔点为 $85 \sim 86\text{ }^\circ\text{C}$. L-Tyr、MH 琼脂、MH 肉汤、酪蛋白、核黄素(VB_2)、氯化硝基四氮唑蓝(NBT)均为国产分析纯试剂, 牛血清白蛋白(BSA)为 Sigma 公司分装试剂, 试验用水为二次蒸馏水.

1.2 方法

1.2.1 5-氯甲基水杨醛缩酪氨酸 Schiff 碱配体(Cmsatyr)和 Mn(II) 配合物(MnCmsatyr)的合成 Cmsatyr 的合成参照文献[6], 边搅拌边将 50 mL 溶有 5 mmol 的 L-Tyr 和 10 mmol KOH 的无水甲醇溶液滴加到 20 mL 溶有 5 mmol 5-氯甲基水杨醛(Cmsa)的无水甲醇溶液中, $50\text{ }^\circ\text{C}$ 搅拌反应 1 h, 旋转蒸发溶剂至约 30 mL, 然后加入 30 mL 异丙醇, 出现大量黄色沉淀, 静置、抽滤、无水乙醚洗涤 2 次, 真空干燥后得产品, 产率为 81.0%.

MnCmsatyr 的合成参照文献[6], 边搅拌边将 10 mL 溶有 1 mmol $\text{Mn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ 的无水甲醇溶液滴加到 25 mL 溶有 1 mmol 上述 Schiff 碱配体的无水甲醇溶液中, $70\text{ }^\circ\text{C}$ 搅拌 1 h, 旋转蒸发溶剂至约 10 mL, 加入 10 mL 异丙醇, 静置过夜, 析出大量的黄褐色沉淀, 抽滤、无水乙醚洗涤 2 次, 真空干燥后得产品, 产率为 63.2%.

1.2.2 抗菌活性和 SOD 活性测定 抗菌活性的测定采用滤纸片法测定配体和配合物对 *E. coli* 和 *S. aureus* 的抑菌圈大小^[5], 试验结果为 3 次平行试验的均值, 相对平均偏差均在 5% 以内.

采用改进的核黄素(VB_2)光还原 NBT 法检测模拟物的 SOD 活性^[7]. 将盛有 3.00 mL 空白反应液且光径为 1 cm 的比色皿于 $25\text{ }^\circ\text{C}$ 恒温, 待光强稳定后对比色皿进行照射, 第 1 次照射 60 s, 以后每次照射 30 s, 测 $D_{560 \text{ nm}}$. 同样方法测定空白液中加入不同浓

度 SOD 或 SOD 模拟物溶液后的 $D_{560\text{ nm}}$. 试验重复 3 次.

1.2.3 与 BSA 的相互作用 以 $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7.4 的 Tris/HCl 缓冲溶液配制 BSA 溶液. 移取 $8.0\times 10^{-7}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 BSA 3.00 mL 于 1 cm 石英比色池中, 用微量注射器逐次加入配合物溶液进行荧光滴定(滴定剂累加体积 $< 50\text{ }\mu\text{L}$), 每次加入溶液后混合均匀, $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 作用 5 min , 于激发波长 280 nm 、激发和发射缝宽均为 5.0 nm 、高灵敏度、快速扫描的条件下, 在 RF-5301 荧光分光光度计上记录 $290\sim 450\text{ nm}$ 的发射光谱.

2 结果与分析

2.1 配合物 MnCmsatyr 的组成与结构表征

目标配体 Cmsatyr 的元素分析结果为(括号内为计算值): C 44.01% (44.17%), H 4.34% (4.59%), N 3.02% (3.06%); 目标配合物 MnCmsatyr 的元素分析结果为(括号内为计算值): C 43.81% (43.73%), H 4.06% (4.15%), N 2.69% (2.60%). 可见配体和配合物的元素分析试验值和计算值是吻合的. 试验测得该配体和配合物在 DMSO

中的摩尔电导率分别为 102.0 和 $67.8\text{ S}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{mol}^{-1}$, 根据 Geary 的观点^[8], 可判断该配体为 2:1 型电解质, 配合物为 1:1 型电解质. 图 1 为该配体和配合物的差热-热重图, 配体和配合物都在 $90\sim 120\text{ }^{\circ}\text{C}$ 出现吸热峰, 这是脱去结晶水而产生的脱水峰, 图中配体和配合物的脱水失质量率分别为 11.87% 和 6.52% , 与它们的理论脱水失质量率 11.65% 和 6.92% 接近, 表明配体含有 3 分子结晶水、配合物含 2 分子结晶水. 该配体和配合物的红外图(图 2), 在 3400 cm^{-1} 附近宽吸收峰表明配体和配合物中存在水分子, 对比发现 $\nu_{\text{C}\equiv\text{N}}$ 峰位由 1611 cm^{-1} 红移至 1598 cm^{-1} , $\nu_{\text{as}-\text{COO}^-}$ 也由 1588 cm^{-1} 红移至 1578 cm^{-1} , Cmsa 的 $\nu_{\text{Ar-O}}$ 由 1157 cm^{-1} 蓝移至 1165 cm^{-1} , 而 Tyr 的 $\nu_{\text{Ar-OH}}$ 峰在 1245 cm^{-1} 处未发生移动, 表明来自 Tyr 的 $-\text{COO}^-$ 和 Cmsa 的酚氧基与 Mn(II) 发生配位, 而 Tyr 中的酚羟基并未与 Mn(II) 发生配位. 配体和配合物中 $\nu_{\text{s}-\text{COO}^-}$ 峰位未见移动, 基本位于 1330 cm^{-1} 处. 据文献^[9-10]报道, $\Delta\nu$ ($\nu_{\text{as}-\text{COO}^-} - \nu_{\text{s}-\text{COO}^-}$) 值大于 200 cm^{-1} 时, 可判断羧基为单齿配位方式, 显然图 2 中配体和配合物的 $\Delta\nu$ 值均大于 200 cm^{-1} , 表明配体中的羧基为单齿配位方式.

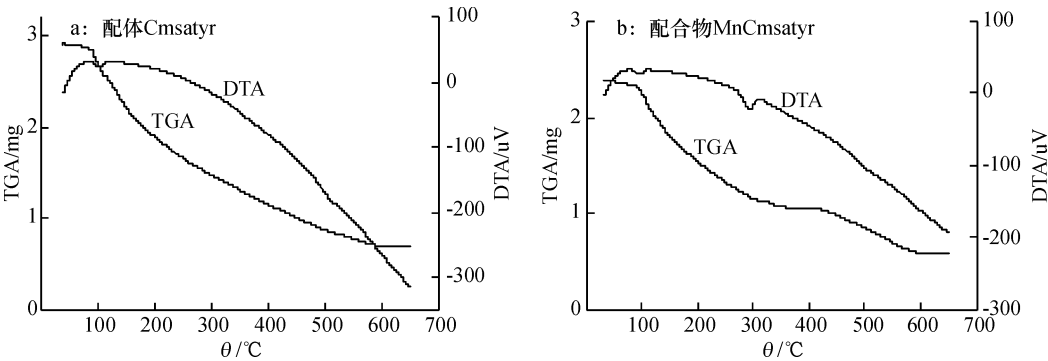


图 1 配体 Cmsatyr 和配合物 MnCmsatyr 的差热-热重图
Fig. 1 TG-DTA plots of Cmsatyr and MnCmsatyr

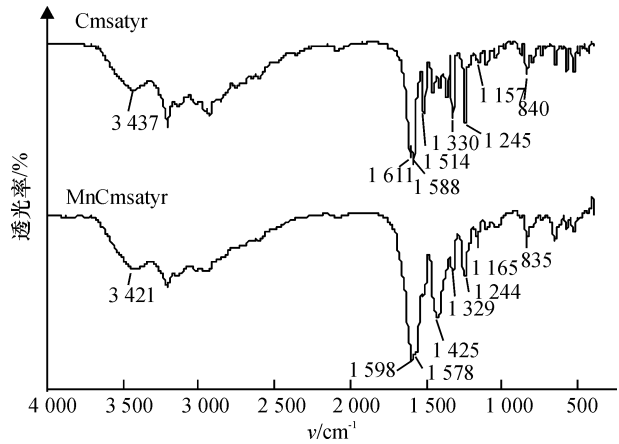


图 2 配体 Cmsatyr 和配合物 MnCmsatyr 的 FT-IR 图
Fig. 2 FT-IR spectra of Cmsatyr and MnCmsatyr

以二甲基亚砜(DMSO)为溶剂测定了该配体和配合物及金属盐 $\text{Mn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ 在室温下的 UV-Vis 光谱, 见图 3. 配体和配合物分别在 279 和 277 nm 处出现 1 个归属于苯环 $\pi\rightarrow\pi^*$ 跃迁吸收峰^[5], 金属盐 $\text{Mn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ 在 257 nm 处出现 1 个归属于 CH_3COO^- 的 $n\rightarrow\pi^*$ 跃迁吸收峰. 另外, 配体在 300 nm 附近存在 1 个肩峰, 这是由 $\text{C}\equiv\text{N}$ 键的 N 原子 p 轨道的孤对电子与苯环大 π 键发生 $p-\pi$ 共轭而产生的 $n\rightarrow\pi^*$ 跃迁吸收峰, 但在配合物中该峰红移至 348 nm , 红移幅度较大, 表明配合物中 $\text{C}\equiv\text{N}$ 键上的 N 原子与中心金属离子 Mn(II) 发生了配位^[5-6]. 与配体相比, 配合物在 400 nm 附近出现 1 个新峰, 归属

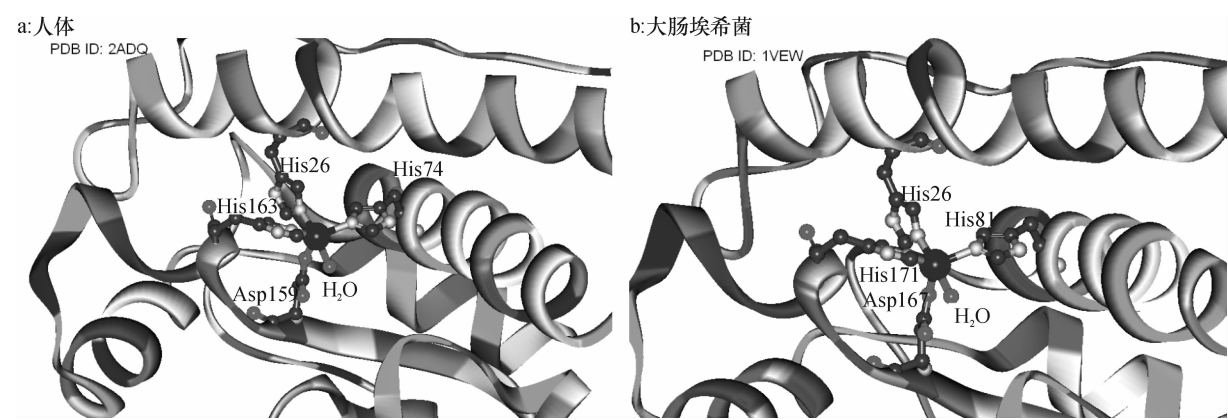


图5 来自人体和大肠埃希菌的天然 Mn-SOD 的活性中心结构

Fig.5 Active-site structure of native Mn-SOD from human and *Escherichia coli*

采用改进的核黄素(VB₂)光还原 NBT 法测定了配体 Cmsatyr 和配合物 MnCmsatyr 的 SOD 活性,测定机理为:在光照下,VB₂ 与四甲基乙二胺作用产生 O₂⁻,O₂⁻ 可以使 NBT 还原为蓝紫色的化合物甲簋,其 λ_{max} 为 560 nm;当存在 SOD 或其模拟物时,能够与 NBT 竞争 O₂⁻,从而抑制 NBT 还原为蓝紫色化合物. 试验未能测出配体 Cmsatyr 的 SOD 活性,图 6 为测定配合物 MnCmsatyr 的 SOD 活性时 D_{560 nm} 随时间的变化趋势图,线性相关系数 R 大于 0.99,说明该试验结果可信. 根据公式计算模拟物的抑制率(η):

$$\eta = (1 - k'/k) \times 100\%$$

式中,k'和 k 分别为加入和不加模拟物后 D_{560 nm} 与 t 直线的斜率.

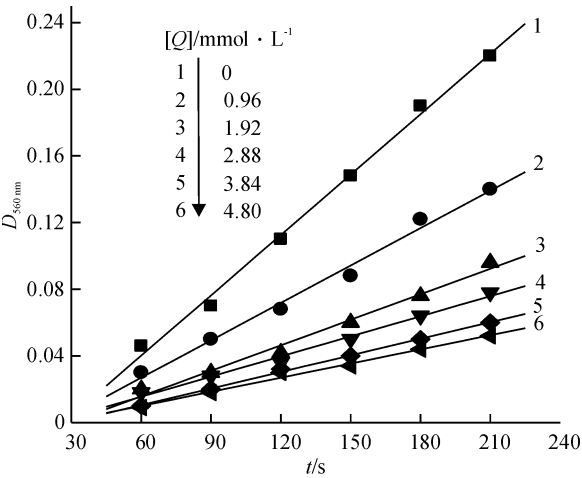


图6 25 °C下配合物 MnCmsatyr 的 D_{560 nm} 受时间影响图

Fig.6 Plot of D_{560 nm} for the complex along with the time at 25 °C

图 7 为配合物 MnCmsatyr 的抑制率 η 随其浓度 [Q] 变化的曲线图,由此求得抑制率 η 为 50% 时配合物的浓度,即半数抑制浓度 IC₅₀ 值为 1.62 μmol · L⁻¹. 根据公式计算配合物的催化速率常数:

$$K_{cat} = K_N[NBT](1/\rho - 1)/[Q]^{[14]}$$

式中,K_N 为 6.0 × 10⁴ L · mol⁻¹ · s⁻¹, [NBT] 和 [Q]

分别为氯化硝基四氮唑蓝和 SOD 或配合物的浓度 (mol · L⁻¹), ρ 为 k'/k 比值. 求得 K_{cat} 为 3.46 × 10⁶ L · mol⁻¹ · s⁻¹.

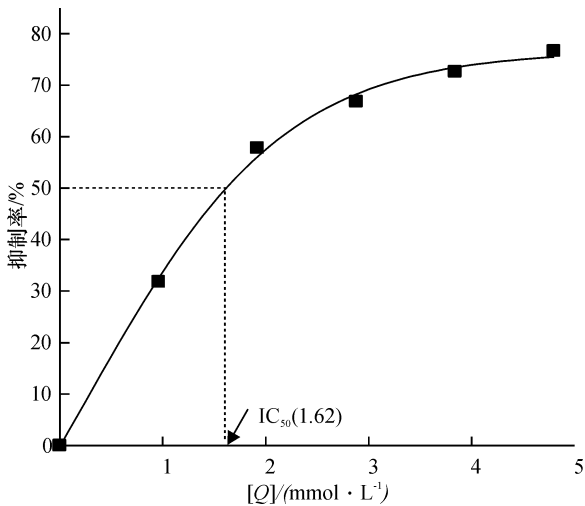


图7 25 °C下配合物 MnCmsatyr 抑制率与浓度关系

Fig.7 Relationship between the inhibition rate (η) and concentration of the complex at 25 °C

2.4 配合物与 BSA 的相互作用

固定 BSA 的总浓度,测定了不同浓度配合物 MnCmsatyr 对生物大分子 BSA 的荧光猝灭曲线,见图 8,发现随着配合物溶液浓度的增加,BSA 的内源性荧光强度有规律地降低,峰位置及峰形基本保持不变,这说明配合物 MnCmsatyr 与 BSA 之间发生的作用并未导致 BSA 的蛋白质结构发生破坏. 假设配合物 MnCmsatyr 对 BSA 的荧光猝灭过程为动态猝灭,则其作用过程应遵循 Stern-Volmer 方程:

$$F_0/F = 1 + K_{SV}[Q] = 1 + k_q\tau_0[Q],$$

式中,F₀、F 为加入配合物前后 BSA 溶液的荧光发射强度;[Q] 为配合物的浓度 (mol · L⁻¹);K_{SV} 为 Stern-Volmer 猝灭常数 (L · mol⁻¹);k_q 为由扩散控制的双分子动态猝灭速率常数 (L · mol⁻¹ · s⁻¹);τ₀ 是

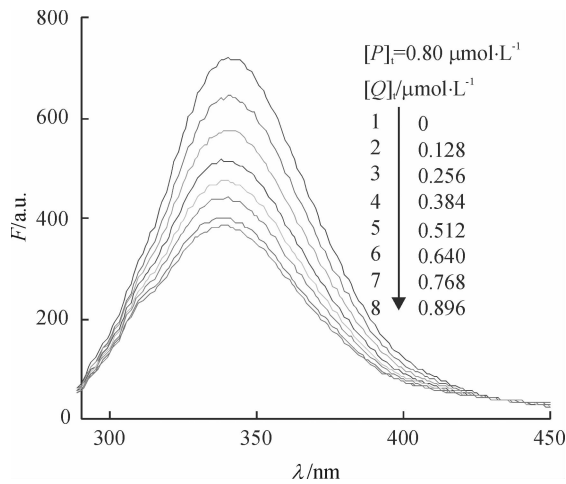


图 8 25 °C MnCmsatyr-BSA 体系的荧光猝灭曲线
Fig. 8 Fluorescence quenching spectra of MnCmsatyr-BSA system at 25 °C

内源生物大分子的荧光寿命,通常取 $\tau_0 = 10^{-8}$ s^[15]. 以 F_0/F 对 $[Q]$ 作图(图 9),图中线性回归的相关系数 R 为 0.998,直线斜率 K_{SV} 为 1.39×10^6 L · mol⁻¹. 由公式 $k_q = K_{sv}/\tau_0$ 计算得 k_q 为 1.39×10^{14} L · mol⁻¹ · s⁻¹,显然该值远远大于各类猝灭剂对生物大分子扩散碰撞过程的最大 k_q (2.0×10^{10} L · mol⁻¹ · s⁻¹)^[16],这意味着配合物 MnCmsatyr 对 BSA 的荧光猝灭不是动态猝灭,故推测静态猝灭是 BSA 发生荧光猝灭的主要原因^[17],即配合物 MnCmsatyr 与 BSA 结合形成新的基态复合物.

对于静态猝灭过程,存在如下关系式^[18]:
$$\lg \frac{F_0 - F}{F} = n \lg K_A + n \lg ([Q]_t - n[P]_t \frac{F_0 - F}{F_0})$$

式中, K_A 为结合常数, n 为结合位点数, $[Q]_t$ 和 $[P]_t$ 分别为是配合物和蛋白质的总摩尔浓度. $\lg((F_0 - F)/F)$ 与 $\lg([Q]_t - n[P]_t(F_0 - F)/F_0)$ 之间存在线性关系,由直线的斜率和截距可得出 n 和 K_A . 可以先假设 n 为 1,比较直线的斜率与 1 是否相等或非常接近,若相差较大,则以该斜率值作为 n 值,再次通过线性关系获得新的斜率值,经过多次迭代可得到准确的 n 和 K_A . 图 10 为经过 5 次迭代后得到的 $\lg((F_0 - F)/F)$ 与 $\lg([Q]_t - n[P]_t(F_0 - F)/F_0)$ 线性关系图,线性相关系数 R 为 0.986,由直线的斜率和截距计算得到的 n 为 0.901, K_A 为 1.62×10^6 L · mol⁻¹.

荧光能量转移分为辐射能量转移和非辐射能量转移,辐射能量转移会导致荧光光谱变形^[17]. 图 8 中的荧光猝灭曲线并未发生变形,这只能说明 MnCmsatyr 对 BSA 的荧光猝灭不是通过辐射能量转移的方

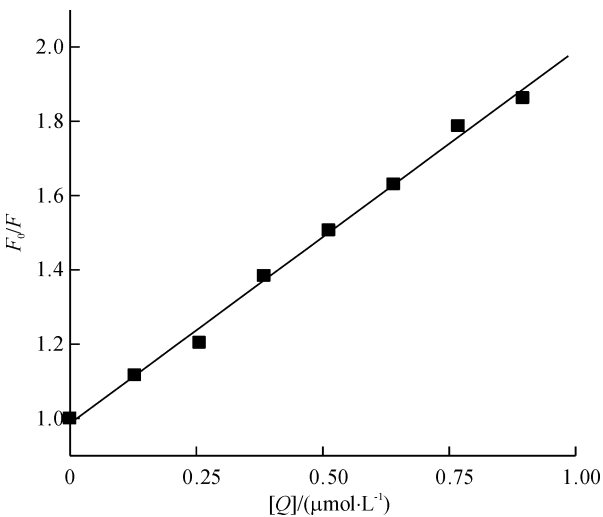


图 9 25 °C 下 MnCmsatyr-BSA 体系的 Stern-Volmer 关系图
Fig. 9 Stern-Volmer plot of MnCmsatyr-BSA system at 25 °C

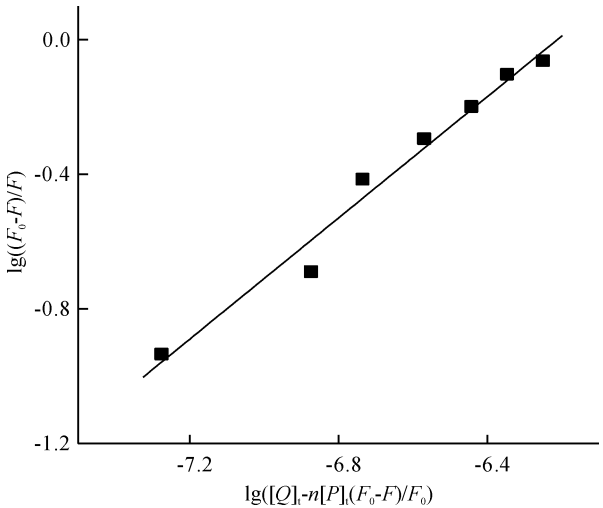


图 10 25 °C 下 MnCmsatyr-BSA 体系的 $\lg((F_0 - F)/F)$ 与 $\lg([Q]_t - n[P]_t(F_0 - F)/F_0)$ 关系图
Fig. 10 The relationship graph of $\lg((F_0 - F)/F)$ and $\lg([Q]_t - n[P]_t(F_0 - F)/F_0)$ plot in MnCmsatyr-BSA system at 25 °C

式发生的,因为生成复合物和非辐射能量转移都可导致荧光猝灭. 根据 Förster 能量转移理论,能量转移效率 E 、给体与受体间的距离 r 、临界能量转移距离 R_0 ($E = 50\%$)、给体的荧光发射光谱与受体的吸收光谱间的重叠积分 J 之间的关系如下^[17,19]:

$$E = 1 - F/F_0 = R_0^6/(R_0^6 + r^6),$$
$$R_0^6 = 8.79 \times 10^{-25} K^2 \varphi N^{-4} J,$$
$$J = \frac{\sum F(\lambda) \varepsilon(\lambda) \lambda^4 \Delta \lambda}{\sum F(\lambda) \Delta \lambda},$$

式中, K^2 为偶极空间取向因子,可取受体和给体各向同行的平均值 2/3; φ 为给体的量子产率,取 BSA 的荧光量子产率为 0.15; N 为介质的折射系数,取 1.336^[20]; $\varepsilon(\lambda)$ 为给体在波长为 λ 时的摩尔吸光系

数.

图 11 为 25 ℃ 下受体 MnCmsatyr 的紫外光谱与给体 BSA 的荧光光谱重叠图,根据公式求得重叠积分 J 为 $3.789 \times 10^{-15} \text{ cm}^3 \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$. 由 MnCmsatyr 与 BSA 摩尔比为 1:1 时体系的荧光强度求得能量转移效率 E 为 0.441,根据公式计算出 R_0 为 3.19, r 为 3.32 nm. 显然,BSA 与 MnCmsatyr 之间的距离 r 小于 8 nm,且 $0.5R_0 < r < 1.5R_0$,符合能量转移理论^[21],表明 MnCmsatyr 与 BSA 能发生非辐射能量转移.

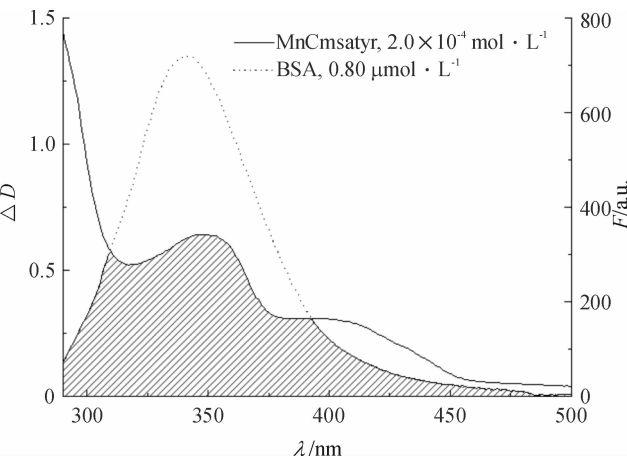


图 11 25 ℃ 条件下 MnCmsatyr 紫外光谱与 BSA 荧光光谱重叠图

Fig. 11 Overlapping between the UV-vis absorption spectrum of MnCmsatyr and fluorescence emission spectrum of BSA at 25 ℃

3 讨论与结论

本文合成了新的 Schiff 碱配合物 MnCmsatyr,其中 Mn(Ⅱ)与 Schiff 碱配体的亚胺基 N、酚基 O、羧基 O 及乙酸根的羧基 O 形成四配位方式,该配合物为 1:1 型电解质. 据文献报道, Schiff 碱及其配合物通常具有抗菌活性^[1,5],配合物 MnCmsatyr 也不例外,该配合物不仅表现出比其 Schiff 碱配体更高的抗菌活性,而且对革兰阴性菌 *E. coli* 表现出抗菌选择性,但从抑菌圈直径大小来看,该配合物的抗菌活性仍较弱. 通常配体与金属离子配位后抗菌活性增强与以下原因有关:一是配位后配体的共轭效应、脂溶性增强,更容易透过生物膜到达靶标部位,发挥更好的抗菌作用;二是中心金属离子的配位会增强药物与受体之间的电子迁移能力而提高抗菌效果^[22]. 配合物 MnCmsatyr 与前期报道的 5-氯甲基水杨醛缩苯丙氨酸锰配合物^[5]相比,在组成上的主要差异是 Schiff 碱配体中的氨基酸成分不同,前者中的 *L*-Tyr 比后者中的 *L*-Phe 多了 1 个—OH,表现在抗菌活性方面的差异是前者对 *E. coli* 和 *S. aureus* 的抑菌圈直径均

较后者大,该结果初步表明 Schiff 碱配体上引入吸电子基团—OH 有利于提高 Schiff 碱配合物的抗菌活性.

配合物 MnCmsatyr 与天然 SOD 酶活性中心的结构相似,这决定着该配合物具有催化超氧阴离子自由基($\text{O}_2^{\cdot -}$)发生歧化反应的 SOD 活性. IC_{50} 和 K_{cat} 是用来反映 SOD 活性大小的 2 个指标, IC_{50} 越小, K_{cat} 越大,则 SOD 活性越高. 与文献报道的 SOD 模拟物相比,配合物 MnCmsatyr 的 SOD 活性比文献[23-24]中的系列 Mn-SOD 模拟物的低,与文献[25-26]中几个 Schiff 碱配合物的相当,但与天然 CuZn-SOD 的 IC_{50} ($0.0147 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)^[10,16] 和天然 Mn-SOD 的 K_{cat} ($8.00 \times 10^8 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)^[17] 相差 2 个数量级. 考虑到配合物的相对分子质量 (520.9) 远低于天然 SOD 的相对分子质量 (CuZn-SOD, 32 000^[10,27]; Mn-SOD, 42 000 ~ 85 000^[28]),若将 IC_{50} 和 K_{cat} 中相应 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 单位换算成 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,则配合物 MnCmsatyr 的 IC_{50} 和 K_{cat} 值与天然 SOD 的相差不大. 由此可见,配合物 MnCmsatyr 具有良好的 SOD 活性,可作为 Mn-SOD 模拟物.

血清白蛋白在紫外光照射下能发出荧光,是因为它的结构中含有色氨酸 Trp、酪氨酸 Tyr 及苯丙氨酸 Phe 3 种芳香族氨基酸. Phe 的荧光往往不易观察到,而 Trp 与 Tyr 常常用作蛋白的内源荧光探针,天然蛋白质的内源荧光主要表现为分子内 Trp 残基的发射. 药物分子对蛋白质的荧光猝灭机制通常可分为动态猝灭、静态猝灭^[17]. 动态猝灭是指猝灭剂在荧光寿命期间扩散至荧光物且相互作用而导致荧光物由激发态返回到基态,不发射光子;静态猝灭是由于猝灭剂和荧光物质发生反应,形成不发荧光的配合物引起的^[17]. 血清白蛋白是大多数药物的体内载体,研究表明配合物 MnCmsatyr 能够通过静态猝灭机理有效猝灭 BSA 的内源荧光,且与给体间可发生非辐射能量转移. 其结合位点数 n 为 0.901、结合常数 K_A 分别为 $1.62 \times 10^6 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$. n 值与文献报道的大多数小分子化合物与 BSA 的结合位点数 (约为 1) 接近,但 K_A 值与文献中小分子化合物与 BSA 的结合常数 K_A 值相比^[19,21] 是较大的,这表明配合物 MnCmsatyr 与 BSA 的结合牢固程度较高,意味着该配合物若作为药物分子可被蛋白质运输和储存,而且具有良好的药效持久性,呈现出作为药物应用的潜质.

目前尚未明确配合物 MnCmsatyr 的抗菌活性是否与其 SOD 活性或与蛋白质的作用有直接关系,本研究结果将为后续设计和筛选高效低毒的抗菌药物及 SOD 模拟物提供一定的科学研究基础及理论依

据,同时也为这类药物的开发和应用提供了一些筛选和评价的参考依据.

参考文献:

- [1] 刘玉婷,张洁心,尹大伟. 氨基酸 schiff 碱及其金属配合物的性能研究进展[J]. 氨基酸和生物资源, 2008, 30(3):51-54.
- [2] 乔艳红,孙命. 邻香兰素-氨基酸席夫碱及其配合物对 O_2^- 的抑制作用[J]. 化学研究与应用, 2003, 15(4): 583-584.
- [3] BUJACZ A. Structures of bovine, equine and leporine serum albumin[J]. Acta Cryst D, 2012, 68(10):1278-1289.
- [4] 熊亚红,梁毅,陈洁霞,等. 5-氯甲基水杨醛合成方法的改进[J]. 广州化工,2009, 37(9):97-98.
- [5] 熊亚红,梁毅,陈祖强,等. 5-氯甲基水杨醛缩苯丙氨酸过渡金属(II)配合物的合成及抗菌活性[J]. 华南农业大学学报, 2013, 34(1):111-116.
- [6] 史卫良,陈德余. 水杨醛酪氨酸铜配合物合成和 EPR 波谱[J]. 物理化学学报, 2001, 17(2):181-184.
- [7] 自俊青,邓希贤. 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.
- [8] GEARY W J. The use of conductivity measurements in organic solvents for the characterization of coordination compounds[J]. Coord Chem Rev, 1971, 7(1):81-122.
- [9] 谢海泉,党元林,卓立宏. 过渡金属氨基酸席夫碱配合物的合成[J]. 合成化学, 2007, 15(3):362-364.
- [10] 廖升荣,乐学义,卢其明,等. 1,10-邻菲咯啉-铜(II)-氨基酸配合物的合成、表征及其 SOD 活性[J]. 华南农业大学学报, 2006, 27(3):122-124.
- [11] QUINT P, REUTZEL R, MIKULSKI R, et al. Crystal structure of nitrated human manganese superoxide dismutase: Mechanism of inactivation[J]. Free Radic Biol Med, 2006, 40(3):453-458.
- [12] EDWARDS R A, BAKER H M, WHITTAKER M M, et al. Crystal structure of *Escherichia coli* manganese superoxide dismutase at 2.1-Å resolution[J]. J Biol Inorg Chem, 1998, 3(2):161-171.
- [13] 江银枝,陈德余,陈伟国. 邻香草醛谷氨酸铜、锌配合物的合成、波谱及其抗 O_2^- 性能[J]. 化学研究与应用, 1999, 11(4):402-405.
- [14] 罗勤慧,沈孟长,高伟光. 光照法研究超氧化物歧化酶及其模型化合物与超氧离子的反应动力学[J]. 高等学校化学学报, 1990, 11(9):928-932.
- [15] LAKOWICA J R, WEBER G. Quenching of fluorescence by oxygen: Probe for structural fluctuations in macromolecules[J]. Biochemistry, 1973, 12(21):4161-4170.
- [16] WARE W R. Oxygen quenching of fluorescence in solution: An experimental study of the diffusion process[J]. J Phys Chem, 1962, 66(3):455-458.
- [17] LAKOWICZ J R. Principles of fluorescence spectroscopy [M]. 3 Ed. New York: Springer Verlag New York Inc., 2006:278-285.
- [18] BI S, DING L, TIAN Y, et al. Investigation of the interaction between flavonoids and human serum albumin[J]. J Mol Struct, 2004, 703(1):37-45.
- [19] RAY A, KOLEY SETH B, PAL U, et al. Nickel(II)-Schiff base complex recognizing domain II of bovine and human serum albumin: Spectroscopic and docking studies[J]. Spectrochim Acta A, 2012, 92:164-174.
- [20] YUE Y Y, CHEN X G, QIN J, et al. Characterization of the mangiferin-human serum albumin complex by spectroscopic and molecular modeling approaches[J]. J Pharm Biomed Anal, 2009, 49(3):753-759.
- [21] ZHANG H, LIU E. Binding behavior of DEHP to albumin: Spectroscopic investigation[J]. J Incl Phenom Macrocycl Chem, 2012, 74(1/2/3/4):231-238.
- [22] CHOHAN Z H, ARIF M, SARFRAZ M. Metal-based antibacterial and antifungal amino acid derived Schiff bases: Their synthesis, characterization and *in vitro* biological activity[J]. Appl Organomet Chem, 2007, 21(4):294-302.
- [23] 廖升荣,卢其明,刘小平,等. Mn(II)-氨基酸配合物的合成及其 SOD 活性[J]. 化学研究与应用, 2006, 18(2):173-177.
- [24] 廖升荣,毛小云,何文芬,等. Mn-SOD 模拟物的合成及其 SOD 活性[J]. 中国农学通报, 2008, 24(2):225-228.
- [25] PUGLISI A, TABBI G, VECCHIO G. Bioconjugates of cyclodextrins of manganese salen-type ligand with superoxide dismutase activity[J]. J Inorg Biochem, 2004, 98(6):969-976.
- [26] MORENO D, DAIER V, PALOPOLI C, et al. Synthesis, characterization and antioxidant activity of water soluble Mn^{III} complexes of sulphonato-substituted Schiff base ligands[J]. J Inorg Biochem, 2010, 104(5):496-502.
- [27] 廖升荣,乐学义,林庆斌,等. Phen-铜(II)-氨基酸配合物的合成、表征及其 SOD 活性[J]. 无机化学学报, 2006, 22(2):201-206.
- [28] HSU J L, HSIEH Y H, TU C, et al. Catalytic properties of human manganese superoxide dismutase[J]. J Biol Chem, 1996, 271(30):17687-17691.

【责任编辑 霍欢】