

研究工作

若干铜配合物歧化超氧离子的活性

沈孟长 陈晓青* 罗勤慧

(南京大学配位化学研究所)

提 要

合成了若干含氮的铜配合物,用核黄素-蛋氨酸-光照法测定其歧化超氧离子的活性,与超氧化物歧化酶作了对照,发现双核的铜配合物比单核的铜配合物有较高的活性,铜的双核咪唑桥配合物的活性高于结构相近的单核配合物。

自从 1969 年 McCord 和 Fridovich^[1] 发现超氧化物歧化酶(简称 SOD)以来,许多学者从各个方面对它进行了广泛的研究,并已取得很大的进展。例如,将 SOD 试用于类风湿关节炎等疾病的治疗,取得了显著的效果^[2],在我国,也对 SOD 的作用进行了研究,取得了有意义的结果^[3]。

但是,市售的 SOD 系从动物血液中提取,手续麻烦,价格较贵,而且它在体内的寿命仅数小时,又不能透过细胞膜,用于治疗尚有其局限性。为了解决这些问题,一些生物化学家和配位化学家致力于用化学方法合成 SOD 的各种模拟化合物,研究它们歧化超氧离子的能力和对其结构的影响,以求了解 SOD 歧化超氧离子的机理,并探索用人工合成的化合物代替 SOD 用于临床治疗的可能性。国外已发现若干化合物具有一定的活性,但尚处于探索阶段。在国内,有关工作尚未见报道。我们合成了一些不同结构的含氮的铜配合物,观察到它们在不同程度上具有模拟 SOD 歧化超氧离子的作用。

一、实验方法

SOD,军事医学科学院放射医学研究所提供,比活力为 3000 单位/mg 蛋白质。

1. 配合物的制备

$\text{Na}_2[\text{Cu}(\text{sal})_2]$ 和 $[\text{Cu}_2(\text{dien})_2(\text{im})](\text{ClO}_4)_3$ 分别按文献 [4] 和 [5] 的方法制备,元素分析合格,电导值与结构式符合。

$[\text{Cu}(\text{dien})(\text{Him})](\text{ClO}_4)_2$ 的合成 对 50 ml 含 2.415g (10mmol) $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 的甲醇溶液,在不断搅拌下,依次加入 1.031g (10mmol) 二乙烯三胺,10ml 含 0.34g (5mmol) 咪唑的甲醇溶液,50ml 含 4.215g (30mmol) NaClO_4 的甲醇溶液,回流加热 8 小时,冷后过滤,沉淀溶于水后,滤去不溶物,蒸发滤液,析出紫色片状晶体,从水中重结晶二次。元素分析合格,电导值表明为 1:2 电解质。

5-氯-2-甲氧基-1,3-苯二甲醛缩(邻羟基苯亚胺) (H_2A) 和 5-溴-2-甲氧基-1,3-苯二甲醛缩(邻羟基苯亚胺) (H_2B) 按文献 [6] 的方法合成,熔点及红外光谱数据与文献值符合。

羟基·[2-羟基-5-氯-1,3-苯二甲醛缩(邻羟基苯亚胺)根]合二铜(II)乙酸盐 ($[\text{Cu}_2(\text{OH})\text{A}']\text{CH}_3\text{COO}$) 的合成 将 190mg (0.5mmol) H_2A 溶于 200ml 甲醇中,将 200mg

* 西北师范学院化学系。

** Sal 代表水杨酸根, dien 代表二乙烯三胺, im 代表咪唑根。

(1mmol) $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 溶于 300ml 甲醇中,完全溶解后,将此二份溶液混合,得棕黑色溶液,迴流 1 小时,析出棕黑色针状晶体,冷却后过滤。晶体用甲醇洗三次后,在室温下真空干燥。元素分析合格,电导值表明为 1:1 电解质。

羟基·[2-羟基-5-溴-1, 3-苯二甲醛缩(邻羟基苯亚胺)根]合二铜(II)乙酸盐 $[\text{Cu}_2(\text{OH})\text{B}']\text{CH}_3\text{COO}$ 的合成与 $[\text{Cu}_2(\text{OH})\text{A}']\text{CH}_3\text{COO}$ 的合成方法类似。元素分析合格,电导值表明为 1:1 电解质。

2. 活性的测定

我们采用核黄素-蛋氨酸光照法,参照 Beauchamp-Fridovich 法^[7]并作了改进。其主要手续为:用 pH7.8 的 0.05mol/L 混和磷酸盐缓冲溶液为溶剂,配制含 3.3×10^{-6} mol/L 核黄素, 0.01 mol/L 蛋氨酸, 4.6×10^{-5} mol/L NBT*, 及各种浓度的化合物或 SOD 的混合溶液。溶液均用空气饱和,在 30℃, 恒定光强下进行光照。光照数分钟后,用 721 型分光光度计在 560nm 处测定光照不同时间后溶液的光吸收。

二、实验结果

1. EDTA 存在下对光照还原的影响

鉴于游离 Cu^{2+} 对 O_2^- 也有歧化作用,在研究其它化合物作为模拟物时往往加入 EDTA 以掩蔽之。 $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ 浓度为 1.786×10^{-6} mol/L $\sim 1.786 \times 10^{-4}$ mol/L 时用光照法测定随时间变化的光吸收值,并在相同 Cu^{2+} 浓度的条件下加入 9.2×10^{-3} mol/L 的 EDTA,在波长 560nm 用同法测定光吸收值的变化,二者进行比较、现将所得的部分结果绘于图 1,其余从略。

由图 1 可见,在反应初期时测得反应物的光吸收值随光照时间线性地增加。这证明实验所用的装置是稳定的。当比较曲线 1、2 和 3 时,可见 Cu^{2+} 浓度增大则直线斜率减小,说明显色抑制程度增大,即 O_2^- 被歧化的作用增加。但加入 EDTA 后从曲线 5 和 6 可见, Cu^{2+} 被掩蔽,抑制程度减小。

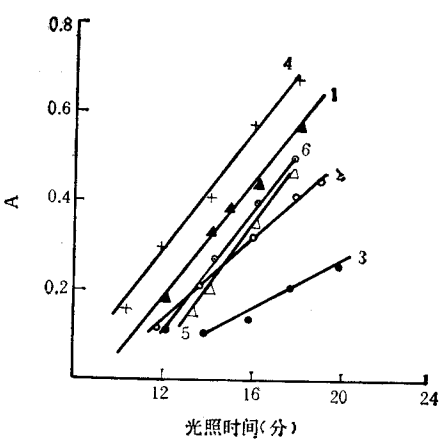


图 1 $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ 对 NBT 光照的抑制

- 1: $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 = 0$, EDTA = 0
- 2: $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 = 3.572 \times 10^{-6}$ mol/L, EDTA = 0
- 3: $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 = 1.786 \times 10^{-5}$ mol/L, EDTA = 0
- 4: $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 = 0$, EDTA = 9.2×10^{-3} mol/L
- 5: $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 = 1.786 \times 10^{-6}$ mol/L, EDTA = 9.2×10^{-3} mol/L
- 6: $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 = 1.786 \times 10^{-5}$ mol/L, EDTA = 9.2×10^{-3} mol/L

(均指溶液中总浓度)

现将不同 Cu^{2+} 浓度以及含有 9.2×10^{-3} mol/L EDTA 时对光照还原的影响列于表 1。

表 1 EDTA 对光照还原速率的影响
(每分钟光吸收改变值)

Cu^{2+} 总浓度 (mol/L)	EDTA 总浓度 (mol/L)	
	0	9.2×10^{-3}
0	0.067	0.067
1.786×10^{-6}	0.062	0.067
1.786×10^{-5}	0.028	0.065
1.786×10^{-4}	0.010	0.013

由表 1 可见,在不加 EDTA 时, Cu^{2+} 浓度约低于 1.8×10^{-6} mol/L 左右, 对还原速度几乎不发生影响。由于本实验所用配合物的浓度在 $10^{-6} \sim 10^{-4}$ mol/L 之间, 以最不稳定的单核 $[\text{Cu}(\text{sal})_2]^{2-}$ 配合物为例, 其 $\lg \beta_2 = 18.5^{[8]}$, 由此算出当所用 $[\text{Cu}(\text{sal})_2]^{2-}$ 为 10^{-4} mol/L 时, 游离的 Cu^{2+} 浓度为 2×10^{-8} mol/L。对其它稳定性更高的配合物, 及所用配合物浓度更低时, 溶液中存在的游离 Cu^{2+} 浓度会更低。故在

* NBT 为四氮兰唑。

本文所有实验中,均不加入 EDTA 以掩蔽游离的 Cu^{2+} 。

2. 配合物对 O_2^- 的歧化作用

当配合物在不同浓度时,在 560nm 测定光照时间和光吸收。现将一些配合物在某一浓度的结果绘于图 2。

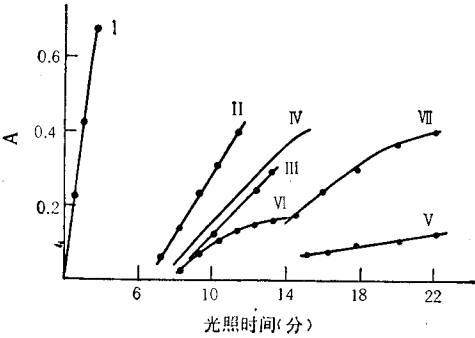


图 2 铜配合物 Q 对 NBT 光照还原的影响

每份溶液均含 $4.6 \times 10^{-5} \text{mol/L}$ NBT, $3.3 \times 10^{-6} \text{mol/L}$ 核黄素, 0.01mol/L 蛋氨酸, $\text{pH} = 7.8$, 在 30°C , 560nm 测定
I: 通 N_2 , 不加 Q; II: 空气平衡, 不加 Q;
III: 加 $[\text{Cu}(\text{dien})(\text{Him})](\text{ClO}_4)_2$,
[Q] = $9.89 \times 10^{-6} \text{mol/L}$;
IV: 加 $[\text{Cu}_2(\text{dien})_2(\text{im})](\text{ClO}_4)_3$, [Q] = $4.68 \times 10^{-6} \text{mol/L}$;
V: 加 $[\text{Cu}_2(\text{OH})\text{A}'](\text{CH}_3\text{COO})$, [Q] = $3.15 \times 10^{-6} \text{mol/L}$;
VI: 加 $\text{Na}_2[\text{Cu}(\text{Sal})_2]$, [Q] = $1.58 \times 10^{-5} \text{mol/L}$;
VII: 加 SOD, [Q] = $5.03 \times 10^{-8} \text{mol/L}$ 。

不存在歧化催化剂(配合物) Q, 溶液用空气平衡时,光吸收增加值为 0.085/分(图 2 曲线 II), 此时是利用 O_2^- 作为传递电子的中间体。由于核黄素受光照产生 O_2^- 需要一定的时间, 故在光照开始数分钟后溶液才开始有颜色的改变(黄色→无色→蓝色)。若溶液通氮气 15—20 分钟以驱除氧气后再光照, 光吸收增加值为 0.448/分。此时核黄素能与 NBT 相互作用, 没有滞后期(图 2 曲线 I), 故在我们所有实验中, 溶液均用空气饱和。

存在歧化催化剂 Q, 溶液用空气饱和时, 由于光照产生的 Q_2^- 被 Q 部分分解, 降低了 O_2^- 的浓度, 使 NBT 还原为甲臌的速度减小, 因此在 560nm 波长处的光吸收变化减小(图 2, 曲线 III—VII)。溶液中存在 $9.89 \times 10^{-6} \text{mol/L}$ 的 $[\text{Cu}(\text{dien})(\text{Him})](\text{ClO}_4)_2$ 时, 光吸收的改

变减小到 0.058/分, 与不存在此配合物时相比, 对 NBT 的还原速率抑制了 31.8%。用同样的方法, 在 $2 \times 10^{-4} \text{mol/L}$ — $4 \times 10^{-7} \text{mol/L}$ 的浓度范围, 测得此配合物在不同浓度时每分钟光吸收的改变值, 求得抑制百分数(见表 2)。其它配合物的数据从略。以 $-\lg C_{\text{Cu}}$ 对抑制百分数作图, 得图 3 的曲线。

表 2 $[\text{Cu}(\text{dien})(\text{Him})](\text{ClO}_4)_2$ 对 NBT 光照还原的抑制

$C_{\text{Cu}}(\mu\text{mol/L})$	$-\lg C_{\text{Cu}}$	每分钟光吸收改变	抑制百分数
216.3	3.66	0.013	84.7
123.6	3.91	0.017	80.0
61.8	4.21	0.021	75.3
30.9	4.51	0.026	69.4
15.5	4.81	0.045	47.1
9.89	5.00	0.058	31.8
4.94	5.31	0.068	20.0
1.98	5.70	0.072	15.3
0.40	6.40	0.079	7.1
0		0.085	0

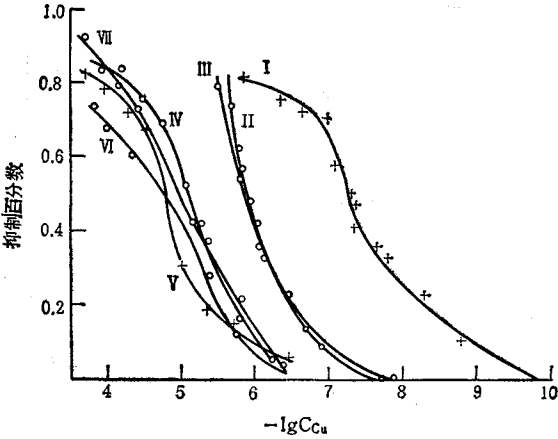


图 3 铜配合物 Q 对 NBT 光照还原的抑制

I: SOD;
II: $[\text{Cu}_2(\text{OH})\text{B}']\text{CH}_3\text{COO}$;
III: $[\text{Cu}_2(\text{OH})\text{A}']\text{CH}_3\text{COO}$;
IV: $[\text{Cu}_2(\text{dien})_2(\text{im})](\text{ClO}_4)_3$;
V: $[\text{Cu}(\text{dien})(\text{Him})](\text{ClO}_4)_2$;
VI: $\text{Na}_2[\text{Cu}(\text{Sal})_2]$;
VII: $[\text{Cu}(\text{dien})](\text{NO}_3)_2$;

为了证实光照还原法的正确性, 我们用北京军事医学科学院所制的 SOD, 并合成了前人已经研究过的 $\text{Na}_2[\text{Cu}(\text{sal})_2]$ 来进行活性测定, 所得结果见图 2 中曲线 VI 和 VII 及图 3

中曲线 I 和 VI。

将图 3 中曲线 I 与其余曲线比较,可见达到同一抑制率所需 SOD 的浓度最小,所以 SOD 有较高的活性。

三、讨 论

将各种方法与本实验所得的 SOD 及

表 3 不同方法测定超氧离子歧化活性
(抑制 50% 时的 $C_{Cu}(\mu\text{mol/L})$) 的比较

方 法	细胞色素 C 还原法	黄嘌呤-黄嘌呤 氧化酶法	KO ₂ 法	光照法
SOD	0.002	0.04	0.06	0.06
Na ₂ [Cu(Sal) ₂]	10.500	16.00	1.30	15.1

表 4 铜配合物为 1 个活性单位时的浓度

配合物	结 构 式	抑制 50% 时的 C_{Cu} ($\mu\text{mol/L}$)
SOD (活性中心)		0.06
[Cu(dien)](NO ₃) ₂		13.2
[Cu(dien)(Him)] (ClO ₄) ₂		15.9
[Cu ₂ (dien) ₂ (im)] (ClO ₄) ₃		8.32
Na ₂ [Cu(Sal) ₂]		15.1
[Cu ₂ (OH)A'] CH ₃ COO R = Cl		1.41
[Cu ₂ (OH)B'] CH ₃ COO R = Br		1.26

随着加热时间延长, O.D 值仍有上升(见曲线 II), 其原因尚有待进一步探讨。为了测试结果有较好的重复性, 必须严格控制加热时间, 加热 12 分钟后应立即将试管放入冰水浴中冷却, 以终止反应。

2. 待测膜悬浮液务必充分混合均匀, 并需

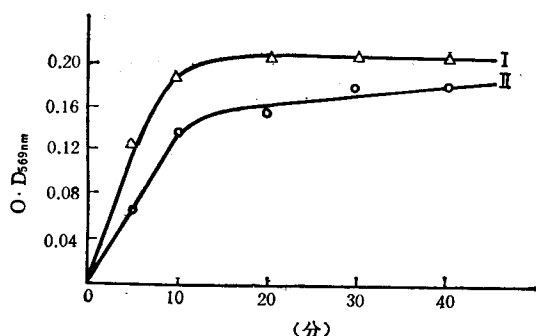


图 2 显色反应进程曲线

新鲜, 膜样品制备后应立即测定, 若 4℃ 保存 2 天以上则唾液酸量减少。

3. 本法不宜测定完整红细胞表面唾液酸, 因为大量血红蛋白对比色有干扰。

何学民同志参加部分工作, 谨此致谢。

参 考 文 献

- [1] Warren, L.: *Journal of Biological Chemistry*, **234**, 1971, 1959.
- [2] Aminoff, D. et al.: *Biochem. J.*, **81**, 384, 1961.
- [3] Seaman, G. V. F.: *Archives of Biochem and Biophy.*, **100**, 493, 1963.
- [4] Dodge, J. T. et al.: *Archives of Biochem and Biophy.*, **100**, 119, 1963.
- [5] Murphy, J. R.: *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, **82**, 334, 1973.
- [6] 秦德安等: 《华东师范大学学报》(自然科学版), **3**, 92, 1985.
- [7] Kahane, I. et al.: *Nature*, **271**, 2674, 1978.
- [8] 董伟等: 《生物化学与生物物理进展》, **2**, 66, 1985.

[本文于 1986 年 10 月 3 日收到]

(上接第 42 页)

$\text{Na}_2[\text{Cu}(\text{sal})_2]$ 的活性数据加以比较, 可以看出, 黄嘌呤-黄嘌呤氧化酶法与光照法测得的数据很接近, 故证明了本实验的可靠性, 见表 3。其中光照法数据引自表 4, 其余引自 Weser 的报告^[9]。

由图 3 可得到各种配合物 1 个活性单位时的浓度, 见表 4。

由表 4 可见, 双核配合物较单核配合物有较高的活性。当配体均为咪唑和二乙烯三胺时, 铜的双核咪唑桥配合物的活性高于结构相近的单核配合物, 这可能是由于前者的结构与 SOD 的活性中心的结构较为相近之故。

铜的两种双 Schiff 碱配合物具有较高的歧化超氧离子的活性, 可能是由于具有大的共轭体系, 便于传递电子, 因而有利于超氧离子的歧化。这两种配合物的结构基本相同, 只有苯环上的取代基不同, 所以两者的抑制曲线几乎重

合, 歧化超氧离子的活性很相近。

参 考 文 献

- [1] McCord, J. M. and Fridovich, I.: *J. Biol. Chem.*, **244**, 6049, 1969.
- [2] Matkovis, B.: In "Superoxide and Superoxide Dismutase" edited by Michelson, A. M. et al., p. 501, Academic Press, New York, 1977.
- [3] 方允中等: 《超氧化物歧化酶对辐射所致细胞溶血及其酯类过氧化影响的初步观察》, 1980.
- [4] Louis, R. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **69**, 687, 1976.
- [5] Haddad, M. S., et al.: *Inorg. Chem.*, **18**, 141, 1979.
- [6] 胡跃飞, 胡宏纹: 《高等学校化学学报》, **1**, 132, 1986.
- [7] Beauchamp, C. et al.: *Anal. Biochem.*, **44**, 276, 1971.
- [8] Sillen, L. G. and Martell, A. E.: *Stability Constants of Metal-ion Complexes*, P. 534, Metcalfe & Cooper. Ltd., London, 1964.
- [9] Weser, U. and Schubotz: *Agents Actions Suppl.* **8**, 108, 1981.

本工作为中国科学院科学基金资助课题。

[本文于 1986 年 9 月 8 日收到]