

• 基础研究 •

小分子化合物 Salen Mn 的合成及其结构测定

郭金兰 张澄波

[摘要] 目的 合成一种化合物,并对其结构及活性进行测定。方法 采用回流方法,在实验室合成化合物,并通过质谱、红外光谱、核磁共振氢谱分析法对其结构进行检测,并用黄嘌呤氧化酶法测定此化合物的超氧化物歧化酶(SOD)酶活性。结果 质谱分析确定此化合物分子量为 356,红外光谱分析此化合物含有的官能团有-OH、C=N 和苯环的存在,核磁共振氢谱分析证明有金属顺磁性物质锰(Mn)的存在,并具有一定的 SOD 酶活性。结论 可合成一种低分子量的具有 SOD 酶活性的物质。

[关键词] 超氧化物歧化酶;自由基;合成

Synthesis and structure of the Salen Mn compound GUO Jin-lan, ZHANG Cheng-bo. *Institution of Rehabilitation Medicine, Chinese Rehabilitation Research Centre, Beijing 100068, China*

[Abstract] **Objective** To synthesize metal complex that exhibits superoxide dismutase (SOD)-like activity and determine its structure. **Methods** This chemical compound was synthesized by means of reflux in laboratory. Its structure was examined by infrared spectra (IR), nuclear magnetic resonance hydrogen spectra ($^1\text{H-NMR}$) and mass spectra (MS). The activity of the SOD was determined by xanthine oxidase (XOD). **Results** The IR indicated that this complex showed a typical absorption band of -OH, C=N and benzene. The $^1\text{H-NMR}$ reveals the existence of metal ion manganese (Mn^{3+} , paramagnetic). The molecular weight was 365, which was obtained by EI-MS analysis. And this complex showed SOD-like activity. **Conclusion** A metal complex with low molecular weight and SOD-like activity has been synthesized.

[Key words] superoxide dismutase (SOD); free radical; complex synthesis

中图分类号:R972 文献标识码:A 文章编号:1006-9771(2004)05-0281-02

[本文著录格式] 郭金兰,张澄波.小分子化合物 Salen Mn 的合成及其结构测定[J].中国康复理论与实践,2004,10(5):281—282.

自由基是一类存在于生物系统内种类多、数量大、活性极高的过渡性中间代谢产物^[1]。在病理状态下,自由基的生成速率大于体内的清除速率,会导致机体过氧化损伤,如心脑血管疾病、癌症、呼吸系统疾病、衰老等。超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)是机体内清除自由基而起保护细胞作用的重要抗氧化酶,但它的作用效果受到半衰期短、分子量大、抗原性等因素的影响。由于它是一种大分子酶,不易迅速透过细胞膜及血脑屏障而发挥抗自由基作用。因而在临床上治疗由于机体内自由基的积累而导致的疾病时,超氧化物歧化酶则存在着很大的局限性。由此,本实验参考国外文献合成了一种低分子量的、能清除自由基的化合物 Salen Mn,并对此化合物的物理性质、结构、SOD 酶活性及稳定性进行研究。为进一步应用于大鼠脑缺血^[2-4]、缺氧损伤模型评价此化合物的抗自由基功能建立必要的条件。

1 材料和方法

1.1 Salen Mn 的合成

1.1.1 材料 乙二胺、水杨醛购自 Aldrich 公司,丙酮、乙醇、乙酸锰、氯化钾购自北京化学试剂公司,SOD 酶活性测试试剂盒(100 人份)购自南京生物工程研究所。

作者单位:1.100068 北京市,中国康复医学研究所(郭金兰);2.100054 北京市,首都医科大学生物化学教研室(张澄波)。作者简介:郭金兰(1964),女,甘肃兰州市人,硕士,主管技师,主要研究方向:脑损伤。

1.1.2 配体的形成^[5,6] 称取乙二胺溶于无水乙醇中,与水杨醛在回流瓶中加热 1 h,用滤纸过滤,无水乙醇洗涤 3 次,吹风机吹干,产率为 48.2%。

1.1.3 化合物的合成 将配体溶于 95%乙醇溶液中,与 $\text{Mn}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 加热回流 3 h,混合物在空气中蒸干,沉淀溶于 500 ml 热蒸流水(60℃)中,过滤。称固体 KCl 加入上述溶液中混合,出现棕红色沉淀;将沉淀过滤,烘干,用丙酮洗涤 1 次,风干,即生成所需化合物 Salen Mn,产率为 55.8%。将丙酮洗涤过的沉淀放入 4℃冰箱保存,备用。

1.2 Salen Mn SOD 活性及稳定性测定^[7] 将合成的 Salen Mn 用高纯水配成 0.5 mg/ml,分装在两支试管中,将两支试管分别编号为 A、B,当天测定 A、B 的 SOD 酶活性,每份样品重复 3 次,然后将 A 管放入 4℃冰箱保存,B 管室温保存。1 天、1 周、1 个月、3 个月时进行活性检测。

1.3 Salen Mn 的结构测定

1.3.1 纯度测定 薄层分析:支持剂选用硅胶 G,称薄层硅胶 G 3 g,加 5%羧甲基纤维素钠(CMC)溶液 9 ml,铺板,105℃烘干 2 h 待用。

点样:称 5 mg 样品加丙酮溶解,点 5 μl ,用展开剂(石油醚:丙酮=3:2)展开、显色。喷 5%磷钼酸乙醇溶液显色,呈兰褐色。

1.3.2 红外光谱分析(IR) 参数为:3450(宽水峰 ν_{OH}),1622($\nu_{\text{C}=\text{N}}$),1600 和 1440(苯环 $\text{C}=\text{C}$),1300($\nu_{\text{C-O}}$),908($\nu_{\text{Mn-O}}$),778(1,2 取代苯环 $\nu_{\text{C-H}}$)。

1.3.3 核磁共振氢谱[¹H-NMR(DMSO-d₆), δppm]
溶剂:DMSO-d₆;观察核:¹H;内标:TMS。

1.3.4 质谱分析[MS(m/e)] 离子源:EI源(电子轰击离子源);电子轰击能:70 eV,加速电压:8 kV。

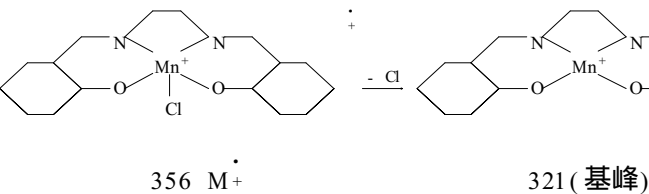
2 结果

2.1 Salenr Mn SOD 活性及稳定性测定 结果见表 1。

表 1 Salenr Mn SOD 酶活性及稳定性 (NU/ml)		
时间	4 ℃	室温
1 天	102.50 ±3.41	102.08 ±1.47
1 周	100.40 ±3.15	98.39 ±2.46
1 个月	86.25 ±1.28	50.13 ±5.40
3 个月	未检出	未检出

结果表明,Salenr Mn 具有一定 SOD 酶活性,在溶液状态下,4 ℃可保存 1 个月,室温可保存 1 周。

2.2 纯度测定 R_f = 0.6 时展开图谱显示,Salenr Mn 的纯度基本达到了测普的纯度,可以进行结构测定。



3 讨论

近几年,国外科学家发现并合成了一类低分子量的,具有 SOD 酶活性和过氧化氢酶活性的化合物^[8,9],此化合物为 N,N'-二水杨叉氨乙烷-Mn 复合物,简称 Salenr Mn 复合物。这类复合物的共同特征是 1 个 Mn 原子配位两个氮和两个氧,其中包含有 3 个咪唑环。它们与天然 Mn SOD 的活性位点是相同的。

由于 Mn 原子附近存在有芳香环,因而,所有的 Salenr Mn 复合物都有较强的亲脂性。这一现象与天然 Mn SOD 是一致的:在 SOD 的金属结构中心附近如果有芳香环则 SOD 活性增强。由于 Salenr Mn 是一类小分子化合物,并且具有与天然 Mn SOD 相同的活性位点,所以,此类化合物能否替代天然 Mn SOD 而发挥它的抗自由基功能受到国内外学者广泛关注。在这一类 Salenr Mn 复合物中,国外科学家研究最多的为 C₇ 复合物,我们称之为小分子(Salenr Mn)化合物。

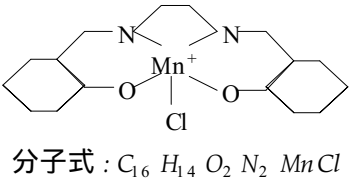
本实验参考国外文献合成了 Salenr Mn(C₇ 复合物),实验结果表明:此化合物呈深褐色粉末,易溶于甲醇、水等极性溶剂,微溶于丙酮、乙酸乙酯等低极性溶剂,在室温下不很稳定,通过薄层分析证明此化合物的纯度基本达到了测谱的纯度;通过红外光谱分析确定了此化合物含有的官能团有-OH、C=N 和苯环的存在;在核磁共振氢谱的分析中未出现样品峰,证明顺磁

2.3 红外光谱分析 光谱图分析表明,该化合物中存在-OH、C=N、苯环、N-Mr-O 等功能团。

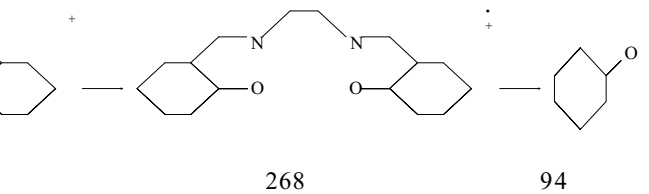
2.4 核磁共振氢谱 光谱图除 δ2.5 溶剂峰和 δ3.5 水峰,未出现样品峰。

2.4 质谱分析 质谱分析可见样品裂解所产生的大而稳定的碎片峰及分子离子峰碎片,在 321 为基峰(首先在 Mn 与 Cl 之间断开)。其分子量为 356。

综合以上分析,并参考有关文献^[5]最终确定其结构式为:



通过其结构式可以推断出它的裂解规律为:



性 Mn 的存在,并产生屏蔽作用。通过质谱分析确定了它的分子量为 356;并且以上 4 谱支持了本实验确定的结构式及分子式。此化合物具有较高的 SOD 酶活性,在溶液中不稳定,在固体状态下、室温下及 4 ℃时稳定性都比较好。

[参考文献]

[1] Matsushashi T, Liu X, Karbowski M, et al. Role of free radicals in the mechanism of the hydrazine-induced formation of megamitochondria [J]. Free Radic Biol Med, 1997, 23(2): 285 - 293.

[2] Baudry M, Musleh W, Bruce A. Effects of Euk-8, a synthetic catalytic superoxide scavenger, on hypoxia and acidosis-induced damage in hippocampus slices [J]. Neuropharmacology, 1996, 33(7): 929 - 934.

[3] Milford B, Doctrow SR, Orr PL. Prevention and suppressions of autoimmune encephalomyelitis by Euk-8, a synthetic catalytic scavenger of oxygen reactive metabolites [J]. Cellular Immunology, 1997, 177: 62 - 68.

[4] Tanguy S, Boucher FR, Bernard M. Free radicals in reperfusion-induced arrhythmias: Study with Euk-8 A novel nonprotein catalytic antioxidant [J]. Free Radical Biol Med, 1996, 21(7): 945 - 954.

[5] Baudry M, Musleh W, Bruce A. Salenr manganese complexes are superoxide dismutase mimics [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1993, 192(2): 235 - 248.

[6] Boucher LJ. Manganese Schiff's base complexes- II synthesis and spectroscopy of Manganese(III) [J]. J Inorg Nucl Chem, 1974, 36: 531 - 536.

[7] 张志德. 自由基检测的临床应用与展望 [J]. 火箭兵医药, 1997, 2(3): 63 - 67.

[8] Douglas D, Kathy A. A mimic of superoxide dismutase activity based upon desferrioxamine B and manganese(IV) [J]. Arch Biochem Biophys, 1987, 258(2): 351 - 355.

[9] Wayne F, Beyer JR, Irwin F. Characterization of a superoxide dismutase mimic prepared from desferrioxamine and MnO₂ [J]. Arch Biochem Biophys, 1989, 271(1): 149 - 156.

(收稿日期: 2003-12-01)