

卵磷脂与四乙酰氧基苯基卟啉金属配合物的相互作用

邵子厚 喻 诚 王金晔 朱育平

(南京大学配位化学国家重点实验室, 南京 210008)

本文用 ^{31}P NMR 和 ^1H NMR 谱分析了卵磷脂的组分和结构, 并以小角 X 射线散射法(SAXS)研究了所合成的六种四乙酰氧基卟啉金属配合物与卵磷脂的相互作用, 发现卟啉分子镶嵌于磷脂双层的疏水链之间, 使双分子层间距变大, 而金属卟啉分子因其与磷脂的极性头基的静电相互作用, 所形成的磷脂双分子层的间距介于纯卵磷脂和含有卟啉分子的卵磷脂所构成的双分子层之间。

关键词: 卵磷脂 四乙酰氧基苯基卟啉 金属配合物 核磁共振 小角 X 射线散射

膜生物化学的中心问题是膜生物能学, 而膜生物能学的最重要的问题则是膜内及膜界面上所进行的一系列电子传递过程⁽¹⁾。不同的电子递体在双层脂膜内不同位置上的精确排列和取向, 则是完成电子传递过程不可缺少的条件。鉴于生物膜组成和结构极其复杂, 人们想要在原位了解其中所发生的一切是相当困难的。因此, 常常借助于合成一些具有电子传递功能的化合物作为模型, 在体外去研究它们与磷脂分子的相互作用。

卟啉金属配合物作为许多生物电子传递的辅基, 与生命过程有着非常密切的联系, 尤其是在光合成和氧化磷酸化的过程中起着十分关键的作用⁽²⁾。本文报道了四乙酰氧基苯基卟啉及其 Fe、Co、Ni、Cu、Zn、Mg 配合物的合成, 并用 SAXS 研究了它们在磷脂双层中的分布。

材料与方 法

一.四乙酰氧基苯基卟啉 T(4AOP)P 及其金属配合物的合成与表征

1.T(4AOP)P 的合成⁽³⁾: 在 500ml 三颈瓶中, 将 21.3g 对乙酰氧基苯甲醛溶于 300ml 丙酸中, 加热至微沸, 滴加 8.7g 新蒸出的吡咯, 回流 2 小时后放置过夜, 过滤得紫色结晶, 并在氯仿-甲醇中重结晶两次。

2.T(4AOP)PFeCl 的合成⁽⁴⁾: 在 100ml 三颈瓶中, 取 0.2gT(4AOP)P, 加入 0.08g 还原铁粉和 0.1gNaCl, 再加入 50ml 冰乙酸, 加热并回流两小时, 冷却过滤, 经乙醇洗涤, 水洗, 硅胶柱分离提纯。

3.T(4AOP)P 的 Co、Ni、Cu、Zn 配合物的合成⁽⁴⁾: 在 100ml 三颈瓶中, 取 0.2gT(4AOP)P, 加入约 3-4 倍过量的金属醋酸盐, 溶于 30ml 丙酸中, 加热回流 1 小时, 冷却, 倾入 150ml 冰水中, 过滤后用硅胶柱分离提纯。

4. T(4AOP)PMg 的合成⁽⁴⁾: 在 100ml 三颈瓶中, 取 0.2g T(4AOP)P, 加入 10 倍过量的醋酸镁, 再加入 50ml DMF, 回流 4 小时, 冷却, 倾入 200ml 冰水中, 抽滤、水洗、干燥, 将所得到的产物再溶于 50ml DMF 中, 加入 50ml 醋酐, 在室温下搅拌反应 2 小时, 倾入 150ml 冰水中得絮状沉淀, 抽滤、水洗后经硅胶柱分离提纯。

经元素分析, NMR, IR, UV 确定了 T(4AOP)P 及其金属配合物的组成和结构, 数据列于表 1-3 中。

表 1 T(4AOP)P 及其金属配合物元素分析

Table 1 Elementary Analysis of T(4AOP)P and its Complexes

complex	formula	C [*]	H	N
T(4AOP)P	C ₅₂ H ₃₈ N ₄ O ₈	74.10(73.90)	4.44(4.49)	6.70(6.62)
T(4AOP)PFeCl	C ₅₂ H ₃₆ N ₄ O ₈ FeCl	67.03(66.77)	4.00(3.88)	5.72(5.98)
T(4AOP)Co	C ₅₂ H ₃₆ N ₄ O ₈ Co	69.07(69.10)	4.23(4.02)	6.80(6.20)
T(4AOP)Ni	C ₅₂ H ₃₆ N ₄ O ₈ Ni	69.34(69.12)	4.11(4.02)	6.55(6.20)
T(4AOP)Cu	C ₅₂ H ₃₆ N ₄ O ₈ Cu	68.84(68.75)	4.26(4.00)	6.55(6.17)
T(4AOP)Zn	C ₅₂ H ₃₆ N ₄ O ₈ Zn	68.04(68.62)	4.18(3.99)	6.01(6.16)
T(4AOP)Mg	C ₅₂ H ₃₆ N ₄ O ₈ Mg	72.26(71.86)	4.43(4.17)	6.68(6.45)

* Data in brackets are theoretical values.

表 2 T(4AOP)P 光谱数据

Table 2 Spectral Data of T(4AOP)P

NMR (ppm, CDCl ₃)	UV(CHCl ₃ , nm)	IR (KBr, cm ⁻¹)
-2.79(2H, N-H) 2.44(12H, CH ₃) 7.44-8.16(16H, benzene) 8.53-8.82(8H, pyrrole)	644, 588 548, 512 416	3315(N-H), 1753(C=O) 1583(C=O), 1473(C=N) 993, 966 (π ring skeletal deformation)

表 3 T(4AOP)P 金属配合物光谱数据

Table 3 Spectral Data of T(4AOP) Metal Complexes

compound spectra	T(4AOP)FeCl	T(4AOP)PCo	T(4AOP)PNi	T(4AOP)PCu	T(4AOP)PZn	T(4AOP)Mg
	UV (CHCl ₃ , nm)	580, 509 415, 378	527 408	527 415	537 414	586, 545 416
IR (KBr, cm ⁻¹)	1756(C=O) 1604(C=C) 999(M-N)	1757(C=O) 1001(M-N)	1757(C=O) 1004(M-N)	1735(C=O) 999(M-N)	1755(C=O) 997(M-N)	1755(C=O) 996(M-N)

二. 卵磷脂的 ^{31}P 、 ^1H NMR 与 SAXS 谱

卵磷脂从南京药物研究所购得, ^{31}P 和 ^1H NMR 谱图在 Bruker AM-500 核磁共振仪上获得。我们参照文献的方法^[6,7], 用 ^{31}P NMR 对卵磷脂做了组成的分析, 先将 100mg 卵磷脂溶于 2ml 氘代氯仿中, 再加入 1ml 甲醇溶液 (EDTA 钾盐的重水溶液 / 甲醇, 1/4(V/V)), 配制为样品, 共振频率为 202.4MHz, 组合脉冲质子去偶, 脉冲宽度 45° , 脉冲间隔 10s。氢谱样品是将 5mg 卵磷脂溶于 0.5ml 氘代氯仿中配制而成的, 脉冲宽度 45° , 脉冲间隔 4s, 以 TMS 为内标。卵磷脂双层与卟啉金属配合物的相互作用研究在 Rigaku D/Max-RA 旋转阳极 X 射线衍射仪上进行。

结果与讨论

一. 卵磷脂的组成分析

天然的卵磷脂实际上是由各种磷脂所组成的复杂体系^[5], 以往常常采用薄层层析(TLC)或高压液相色谱(HPLC)的方法来检测。由于生物膜类脂的种类太多, 例如动物细胞膜一般就有 50-100 种不同的类脂, 不管用紫外、荧光、折射率或红外作为检测的方法, 最好都要用已知的类脂组分作为标准来加以校正, 方可确定未知样品。因而, 在实际定量时受到很多的限制。近年来, 随着核磁共振法在生物体系中的应用, ^1H 和 ^{13}C 谱对于磷脂分子提供了许多有用的数据。特别是用 ^{31}P NMR 很容易确定磷脂中磷的摩尔含量, 这对于生物膜体系的结构测定是十分有用的^[6], 它已成功地用于磷脂头基的构象与动态研究以及磷脂分子相变研究。

图 1 为本实验所用卵磷脂的 ^{31}P NMR 谱, 参照在相同条件下对二油酰磷脂酰胆碱(DOPC)样品所测得的化学位移确认, 图中的大峰为磷脂酰胆碱(PC)。再取 PC 的化学位移为 0, 则另两个峰的化学位移则为 0.57 和 0.76ppm, 可分别归属于溶血磷脂酰胆碱(LPC)和神经鞘磷脂(SPH), 而借助于这些峰的积分面积即可确定三者的含量分别为 PC 87%、LPC 9%、SPH 4%^[6]。

由图可知, 尽管化学位移受到氢键、介电常数、磷原子周围的环境以及磷脂的浓度和温度等诸多因素的影响, 然而, 在温度、浓度等基本恒定的情况下, 所测得的 ^{31}P NMR 谱峰清晰, 化学位移也区分得很好。

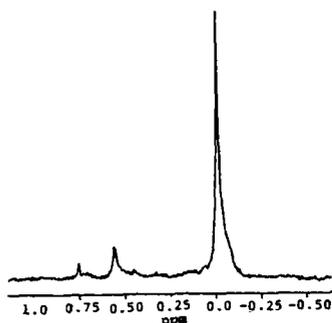
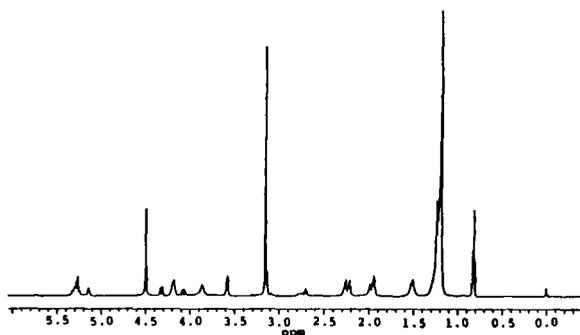


图 1 卵磷脂的 ^{31}P NMR 谱

Fig. 1 ^{31}P NMR spectrum of lecithin

我们参照 M.Casu 等的方法^(6,8), 对所测得的卵磷脂¹H NMR 谱图进行了标识, 并以甲基 0.78–0.94ppm 的总摩尔分数为 100%, 则 =CH–CH₂–CH₃^{*} (0.87–0.94ppm) 为 2%, =CH–CH₂^{*}–CH₂^{*}–CH₂–COO⁻ (分别为 1.58–1.64ppm 和 2.02–2.08ppm) 为 30%; =CH–CH₂^{*}– (1.90–2.00ppm) 为 100%, =CH–CH₂^{*}–CH= (2.68–2.72ppm) 为 16%, –CH=CH–(CH₂^{*}–CH=CH)_n– (2.74–2.82ppm) 为 10%, –CH^{*}=CH^{*}– (5.26–5.36ppm) 为 152%。由于每个不饱和脂肪酸碳链中含有两个 =CH–CH₂– 基团, 所以, 所用的卵磷脂中的脂肪酸链一半是饱和的, 一半是不饱和的。从 =CH–CH^{*}–CH₂– 量可知, 9,12–十八碳烯酸约为 16%, 从 =CH–CH₂^{*}–CH₂^{*}–CH₂–COO⁻ 和 =CH–CH₂–CH₃^{*} 的量可知, 5,8,11,14–廿碳烯酸和 5,8,11,14,17–廿碳烯酸的含量分别为 1% 和 2%, 油酸则为 31%。

图 2 卵磷脂的¹H NMR 谱Fig. 2 ¹H NMR spectrum of lecithin

二. 卵磷脂与四乙酰氧基苯基卟啉化合物的 SAXS

M.Kodama 等⁽⁹⁾ 对二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)在水体系中的相图做了深入的研究, 发现随着含水量的不同, 存在着 L_α(液晶相), L_β、L_β'(凝胶相), P_β'(波相)和 L_c(凝聚胶相)。而在生理条件下, 当含水量 < 40% 时, PC 分子处于 L_α 相, 该相与有序性更高的 P_β'、L_β 和 L_β' 之间具有主相转移温度 T_m。相转变具有阶段的细微结构的变化, 影响相变的因素很多, 除去含水量、温度之外, 溶于膜内的物质(蛋白质及各种辅基)的种类及其浓度亦是必须考虑的。从 ³¹P 和 ¹H NMR 的结果可知, 我们所用的卵磷脂的主要成分为磷脂酰胆碱 PC, 它没有 P_β' 相的前相变, 而直接发生 L_β→L_α 的相变⁽¹⁰⁾。

孙润广等⁽¹¹⁾ 用 SAXS 的方法研究了在不同含水量的条件下, 金属卟啉对磷脂双层的层间距的变化, 发现随着含水量的增加, 脂双层的流动性也增大, 液晶态很快消失, SAXS 图谱上的散射峰也随之消失。

我们将 100mg 卵磷脂(含水量 < 5%)放入试管中, 加入四乙酰氧基苯基卟啉 10mg, 用适量氯仿充分搅匀, 溶解后铺展到透明的涤纶薄膜上, 待其挥发后测定 SAXS 谱。测试条件为: Cu 靶、石墨滤片、管压 40kV, 管流 150mA, 入射狭缝/防散狭缝 0.07°, 接受狭缝 0.14mm, 实验结果列于表 4 之中。

表4 卵磷脂与四乙酰氧基苯基卟啉化合物的 SAXS 数据

Table 4 SAXS Data of Lecithin and Tetrakis-(4-Acetoxyphenyl)-Porphine

compound parameter	PC	PC+T(4AOP)P	PC+T(4AOP)PFeCl	PC+T(4AOP)PCo
2θ	1.760	1.560	1.600	1.600
	1.900	1.720	1.760	1.780
d (Å)	50.19	56.63	55.21	55.21
	46.50	51.36	50.19	49.63
	PC+T(4AOP)PNi	PC+T(4AOP)PCu	PC+T(4AOP)PZn	PC+T(4AOP)PMg
	1.580	1.600	1.600	1.600
	1.740	1.780	1.760	1.780
	55.91	55.21	55.21	55.21
	50.77	49.63	50.19	49.63

从表4中可知,当卵磷脂中分别溶入卟啉化合物时,卵磷脂的层间距发生了改变。卵磷脂直链双分子层间距为50.19Å,曲链双分子层间距为46.50Å,当在卵磷脂中加入四乙酰氧基苯基卟啉时,发现第一强峰由46.50Å增加到51.36Å,第二强峰由50.19Å增加到56.63Å,这是由于卟啉分子本身的疏水性质,当其嵌入磷脂分子的疏水链所形成的双层中,扩大了双分子层的间距。

至于四乙酰氧基苯基卟啉金属配合物,因其电荷分布不是均匀的,金属离子上的电荷相对集中,所以,当金属卟啉加入到磷脂双层内后,存在着卟啉骨架的疏水性质和金属离子的亲水性质的共同作用,而磷脂酰胆碱的两性离子头基会通过相邻的相反电荷的离子基团之间的静电相互作用来稳定双层表面的,从而导致了金属卟啉化合物更有利于位于脂膜表面的区域,使所测得的双分子层间距的数值也介于纯卵磷脂和溶有T(4AOP)P的卵磷脂这两者之间。在所合成的六种金属卟啉配合物中,尽管金属的种类有所不同,但它们均为两价的,反映在实测的卵磷脂双分子层间距变化不大。

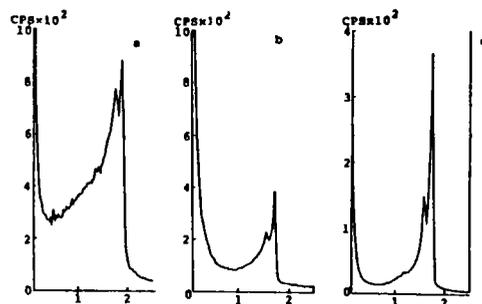


图3 卵磷脂(a), 卵磷脂及四乙酰氧基苯基卟啉(b), 卵磷脂及四乙酰氧基苯基卟啉镍(c)的 SAXS 图谱

Fig. 3 SAXS spectra of (a) lecithin, (b) lecithin and tetrakis-(4-acetoxyphenyl)-porphine and

(c) nickel complex of tetrakis-(4-acetoxyphenyl)-porphine

参 考 文 献

- (1) 邵子厚, 化学通报, **3**, 23(1991).
- (2) Ochiai, E. I., *Bioinorganic Chemistry*, Allyn and Bacon, Inc. Boston, (1977).
- (3) 黄泽兴等, 分析化学, **14**, 881(1986).
- (4) Adler, A. D. et al., *J. Inorg. Nucl. Chem.*, **32**, 2443(1976).
- (5) 见里朝正, 油化学, **27**, 65(1978).
- (6) Menceses, P. et al., *J. Lipid. Res.*, **29**, 679(1988).
- (7) Sotirhos, M. et al., *J. Lipid. Res.*, **27**, 386(1986).
- (8) Casu, M., *Magn. Reson. in Chem.*, **29**, 594(1991).
- (9) Kodama, M. et al., *Biochim. Biophys. Acta*, **689**, 567(1982).
- (10) 木村初男, 表面, **29**, 171(1991).
- (11) 孙润广等, 生物化学与生物物理学报, **22**, 293(1990).

INTERACTIONS BETWEEN LECITHIN AND 4-ACETOXY-PHENYL PORPHYRIN METAL COMPLEXES

Tai Zihou Yu Cheng Wang Jinxi Zhu Yuping

(State Key Laboratory of Coordination Chemistry, Nanjing University, Nanjing 210008)

The lipid compositions of the lecithin were analysed qualitatively and quantitatively by ^{31}P and ^1H NMR. The interactions between the lecithin and 4-acetoxy-phenyl porphyrin metal complexes were studied by small angle X-ray scattering (SAXS).

We have found that the porphyrin molecules and their complexes interacted in the hydrophobic region of phospholipid bilayer and the space of lipid bilayer was enlarged. When the porphyrin complexes inlaid in lecithin bilayer, the space was situated between two values which obtained from the lecithin and lecithin-porphyrin bilayer respectively. This is because the porphyrin complexes also can interacted with the hydrophilic heads of phospholipids by electrostatic forces.

Keywords: lecithin 4-acetoxy-phenyl-porphyrin metal complex NMR SAXS