

• 研究论文 •

壳寡糖希夫碱金属配合物的合成及其对烟草花叶病毒的抑制活性

杨楠^a, 徐翠莲^{* b}, 杨国玉^b, 赵铭钦^a, 刘善宇^a

(河南农业大学 a 烟草学院 国家烟草栽培生理生化研究基地, b 理学院, 郑州 450002)

摘要:以壳寡糖为原料,与取代水杨醛反应先生成壳寡糖希夫碱后再接枝金属离子,合成了18个壳寡糖希夫碱的金属配合物,其化学结构经紫外吸收(UV)、红外光谱(IR)、元素分析或电感耦合等离子体(ICP)分析确认。初步的生物活性测定结果表明,该类化合物在100 μg/mL下具有良好的诱导烟草抗烟草花叶病毒(TMV)的作用,其中5m在预防作用中的抑制率高达78.86%。

关键词:壳寡糖希夫碱配合物;合成;烟草花叶病毒

DOI 10.3969/j.issn.1008-7303.2010.01.04

中图分类号:O641.4.0625.632 文献标志码:A 文章编号:1008-7303(2010)01-0031-06

Synthesis and biological activity of chitooligosaccharides Schiff base metal complexes

YANG Nan^a, XU Cui-lian^{* b}, YANG Guo-yu^b, ZHAO Ming-qin^a, LIU Shan-yu^a

(a National Tobacco Cultivation & Physiology & Biochemistry Research Center, College of Tobacco,

b College of Science, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract Eighteen chitooligosaccharides Schiff base metal complexes were synthesized from chitooligosaccharides with substituted salicylaldehyde and metal ion. Their structures were confirmed by UV, IR and elemental analysis or ICP spectroscopy. Preliminary bioassay results showed that these compounds were effective in anti-TMV at 100 μg/mL, and local lesion inhibition rate of compound 5m reached 78.86%.

Key words chitooligosaccharides Schiff base metal complexes; synthesis; TMV

壳寡糖(chitooligosaccharides, COS)也称几丁寡糖,是以壳聚糖为原料,经生物技术降解而成的相对分子质量较低、聚合度为2~20的低聚β-(1,4)-2-脱氧-2-氨基葡萄糖,具有水溶性好、功能作用强、生物活性高的特点^[1]。壳寡糖是植物识别病原真菌入侵的非特异性信号,对许多植物显示出强烈的免疫诱导活性,可以激发植物的抗病基因表达^[2],

产生抗病的甲壳素酶、壳聚糖酶、植保素和免疫蛋白^[3],这些物质能抑制或杀灭病菌^[4-5],达到抗病的目的。目前已有其在农业上应用的相关研究报道^[6-7],其诱导抗病活性已成功应用于多种植物病害的防治中^[1],如对土传病害^[8]和植物病毒病^[9]这些生产中难以防治的病害具有良好的防治效应。

希夫碱以及希夫碱金属配合物是一类具有广泛

收稿日期:2009-09-17 修回日期:2009-11-03

作者简介:杨楠(1985-),男,河南平顶山人,硕士研究生,*通讯作者:徐翠莲(1965-),女,河南西平人,博士,教授,硕士生导师,从事有机合成研究,电话:0371-63558138, E-mail: xucuilian66@126.com

基金项目:国家烟草专卖局重大科技攻关项目(110200401004)。

寡糖希夫碱合铜(II), **5b** 水杨醛壳寡糖希夫碱合钴(II), **5c** 水杨醛壳寡糖希夫碱合银(I), **5d** 水杨醛壳寡糖希夫碱合镍(II), **5e** 水杨醛壳寡糖希夫碱合锰(II), **5f** 水杨醛壳寡糖希夫碱合锌(II); **5g** 5-氯水杨醛壳寡糖希夫碱合铜(II), **5h** 5-氯水杨醛壳寡糖希夫碱合钴(II), **5i** 5-氯水杨醛壳寡糖希夫碱合银(I), **5j** 5-氯水杨醛壳寡糖希夫碱合镍(II), **5k** 5-氯水杨醛壳寡糖希夫碱合锰(II), **5l** 5-氯水杨醛壳寡糖希夫碱合锌(II); **5m** 3,5-二氯水杨醛壳寡糖希夫碱合铜(II), **5n** 3,5-二氯水杨醛壳寡糖希夫碱合钴(II), **5o** 3,5-二氯水杨醛壳寡糖希夫碱合银(I), **5p** 3,5-二氯水杨醛壳寡糖希夫碱合镍(II), **5q** 3,5-二氯水杨醛壳寡糖希夫碱合锰(II), **5r** 3,5-二氯水杨醛壳寡糖希夫碱合锌(II)。将18种壳寡糖希夫碱配合物配制成100 μg/mL的水溶液供试。

1.3 生物活性测定^[2]

1.3.1 TMV 毒源 TMV 病毒于普通烟叶上繁

殖获得。称取0.5 g病烟叶磨碎,用pH=7的0.01 mol/L的磷酸缓冲溶液配制成25 mL溶液,在波长200~300 nm下进行紫外扫描以确定其纯度和浓度。

1.3.2 壳寡糖希夫碱金属配合物诱导珊西烟草(Xanthi)抗TMV病毒的活性^[14]

1.3.2.1 预防效果 采用半叶法。在25℃室温中,选用移栽后3个月长势一致的盆栽珊西烟,先进行喷药处理,24 h后按常规汁液摩擦接种法接种TMV病毒,以先喷洒清水后接种的处理为对照(CK1),每个处理重复3次。于接种后10 d左右观察发病情况,按(2)式计算枯斑抑制率。

1.3.2.2 治疗效果 采用半叶法。在25℃室温中,选用移栽后3个月长势一致的盆栽珊西烟,先按常规汁液摩擦法接种TMV病毒,12 h后进行喷药处理,以接种后喷洒清水的处理为对照(CK2),每个处理重复3次。于接种后7 d左右观察发病情况,按(2)式计算枯斑抑制率。

$$\text{枯斑抑制率} \% = \frac{\text{喷药处理枯斑数} - \text{对照处理枯斑数}}{\text{对照处理枯斑数}} \times 100 \quad (2)$$

2 结果与讨论

2.1 目标化合物的结构表征

2.1.1 紫外吸收分析 由壳寡糖(COS)及壳寡糖希夫碱(S-COS)的紫外吸收光谱数据(表1)可以看出: COS在212和205 nm处有2个强而窄的吸收峰,在大于212 nm波长范围无明显吸收。S-COS在297~325 nm处的吸收峰为酚亚胺基团的吸收^[15],属于从苯环到亚氨基的电荷转移跃迁,其特点是跃迁几率小,吸收强度弱;241~257 nm处的吸收峰为芳香类化合物特有的B带吸收峰,这是由 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁和苯环振动的重叠引起的;215~219 nm处是苯环的K带吸收峰,其特点是吸收强度大,是由共轭双键中 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁产生的。当S-COS与金属M形成配合物后(表2),酚亚氨基的吸收峰大致表现出

紫移态势,表明C=N双键中的N原子参与了配位,而且苯环的B带和K带也发生了紫移,这也是由于C=N双键的N原子参与了配位,破坏了分子的有序性,从而使跃迁能级增大,吸收光谱发生了紫移。

表2 壳寡糖希夫碱金属配合物(S-COS-M)中C=N的吸收峰位置

Table 2 UV-V is data of C=N in Schiff base metal complexes of COS (S-COS-M)

化合物 Compd	UV-V is/nm
5a	313
5b	321
5c	315
5d	315
5e	317
5f	314
5g	293
5h	296
5i	290
5j	294
5k	295
5l	293
5m	285
5n	293
5o	292
5p	294
5q	294
5r	293

表1 壳寡糖(COS)及壳寡糖希夫碱(S-COS)的紫外吸收光谱数据

Table 1 UV data of COS and S-COS

化合物 Compd	UV-V is /nm	UV-V is/nm	UV-V is/nm	UV-V is /nm
COS	212	205		
3a	325	257	215	
3b	299	241	219	
3c	297	250	211	207

2.1.2 红外光谱分析 表 3 是 COS 及 S-COS 的红外光谱数据。在 COS 的红外谱中, $3\ 416\ \text{cm}^{-1}$ 是 O—H 的伸缩振动, $3\ 237\ \text{cm}^{-1}$ 是 N—H 的伸缩振动, $1\ 082\ \text{cm}^{-1}$ 是 C—O 的伸缩振动; 在 S-COS 的红外光谱中, O—H 和 N—H 上的伸缩振动与 COS 相比发生了红移, 在 $1\ 635\sim 1\ 637\ \text{cm}^{-1}$ 附近出现了 C=N 的伸缩振动峰, 这是希夫碱酚亚胺的特征吸收^[16], 并且在 $1\ 452\sim 1\ 493$ 和 $1\ 510\sim 1\ 617\ \text{cm}^{-1}$ 附近出现了苯环的骨架振动, 在 $1\ 270\ \text{cm}^{-1}$ 附近出现了酚羟基的弯曲振动吸收, 这些新峰均是由取代水杨醛与 COS 反应生成的希夫碱所产生的。另外, S-COS 在 $2\ 820\sim 2\ 720\ \text{cm}^{-1}$ 处无吸收峰, 即没有 CHO 基团里的 C—H 键^[12], 说明经过洗涤、回流等操作已经将过量的醛完全除去, 目标化合物结构准确。

表 3 壳寡糖 (COS) 及壳寡糖希夫碱 (S-COS) 的
红外光谱数据 (ν/cm^{-1})

Table 3 IR data of COS and S-COS (ν/cm^{-1})

化合物 Compd	$\nu_{\text{O-H}}$	$\nu_{\text{N-H}}$	$\nu_{\text{C=N}}$	ν_{Ar}	$\nu_{\text{Ar-OH}}$	$\nu_{\text{C=O}}$
COS	3 416	3 237	-	-	-	1 082
3a	3 413	3 233	1 637	1 617, 1 493	1 274	1 078
3b	3 408	3 081	1 635	1 578, 1 513, 1 481	1 275	1 069
3c	3 409	3 101	1 634	1 510, 1 452	1 273	1 074

表 4 是壳寡糖希夫碱金属配合物 (S-COSM) 中酚亚胺的红外光谱特征吸收峰的位置, 与 S-COS 相比, 其发生了红移, 而且 S-COS 在 $1\ 270\ \text{cm}^{-1}$ 附近出现的酚羟基的弯曲振动吸收峰也消失了, 说明氮原子和酚羟基上的氧原子参与了配位, 这表明金属 M 与壳寡糖希夫碱之间形成了螯合物。

表 4 壳寡糖希夫碱金属配合物 (S-COSM) 中
C=N 键位置 (ν/cm^{-1})

Table 4 IR data of C=N of S-COSM (ν/cm^{-1})

化合物 Compd	$\nu_{\text{C=N}}$
5a	1 631
5b	1 625
5c	1 630
5d	1 629
5e	1 629
5f	1 629
5g	1 628
5h	1 629
5i	1 629
5j	1 628
5k	1 631
5l	1 631
5m	1 611
5n	1 620
5o	1 621
5p	1 621
5q	1 621
5r	1 619

2.1.3 元素分析与电感耦合等离子体 (ICP) 光谱测定 元素分析测试结果 (表 5) 表明, S-COS 中主要元素的含量随着水杨醛取代基的变化而变化, 进一步确定了取代水杨醛与壳寡糖发生了反应。ICP 光谱测试结果 (表 6) 表明, S-COSM 中含有少量金属离子, 这也进一步说明了金属 M 与壳寡糖希夫碱之间形成了螯合物, 但由于壳寡糖的部分氨基 ($-\text{NH}_2$) 与乙酰基结合, 使得测量的金属含量值略低于理论估计值。

表 5 壳寡糖希夫碱 (S-COS) 的元素分析数据

Table 5 Elemental analysis data of S-COS

化合物 Compd	元素分析 (计算值) % Elemental analysis (Calc.) %			C/N
	C	H	N	
COS	44.91 (44.72)	7.13 (6.88)	8.01 (8.69)	5.61
3a	58.99 (60.46)	6.47 (6.24)	5.00 (5.42)	11.80
3b	53.42 (53.34)	5.44 (5.17)	4.45 (4.79)	12.00
3c	48.15 (47.73)	4.62 (4.31)	4.01 (4.28)	12.01

表 6 壳寡糖希夫碱金属配合物 (S-COS-M) 中金属含量的 ICP 光谱数据

Table 6 ICP spectroscopy analysis of metal content of S-COS-M

化合物 Compound	电感耦合等离子体 (计算值) % ICP (Calcd) %					
	Cu ²⁺	Co ²⁺	Ag ⁺	Ni ²⁺	Mn ²⁺	Zn ²⁺
5a	6.21(10.99)					
5b		5.43(10.28)				
5c			7.71(17.33)			
5d				5.45(10.24)		
5e					5.95(9.65)	
5f						5.93(11.28)
5g	7.05(9.82)					
5h		6.31(9.17)				
5i			7.32(15.60)			
5j				5.89(9.14)		
5k					5.85(8.61)	
5l						6.34(10.08)
5m	7.00(8.88)					
5n		6.04(8.29)				
5o			7.95(14.19)			
5p				6.31(8.26)		
5q					5.97(7.77)	
5r						6.09(9.11)

2.2 S-COS-M 对 TMV 病毒的抑制效应

结果(表 7)表明,几种供试药剂对 TMV 病毒均具有显著的抑制效果,而且预防效果好于治疗效果。就不同金属的配合物来说,随着金属离子的改变,预防效果中药剂对 TMV 病毒的抑制率大致表现出铜盐 > 银盐 > 钴盐 > 镍盐 > 锌盐 > 锰盐的趋势,而治疗效果中大致表现出铜盐 > 银盐 > 钴盐 > 镍盐 > 锰盐 > 锌盐的趋势,可见无论是预防作用还是治疗

作用,铜配合物的抑制效果始终最好。就不同希夫碱取代基的配合物来说,在预防效果和治疗效果中均大致表现出 3,5-二氯水杨醛壳寡糖希夫碱 > 5-氯水杨醛壳寡糖希夫碱 > 水杨醛壳寡糖希夫碱的趋势。总体来说,3,5-二氯水杨醛壳寡糖希夫碱合铜对 TMV 的抑制效果最为显著,预防作用中的抑制率高达 78.86%;治疗作用中达到 44.09%。

表 7 18种壳寡糖希夫碱金属配合物对珊西烟上 TMV 的抑制效应

Table 7 Effect of eighteen chitooligosaccharides Schiff base metal complexes on lesion numbers of inoculated Xanxi tobacco leaves

供试药剂 Test reagent (100 μg/mL)	预防效果 Preventive effect		治疗效果 Therapeutic effect	
	枯斑数/(个/cm ²) Lesion numbers in one cm ² leave	抑制率 Inhibition rate %	枯斑数/(个/cm ²) Lesion numbers in one cm ² leave	抑制率 % Inhibition rate %
	5a	0.124 9	66.20 abcd	0.239 0
5b	0.145 7	60.58 abcd	0.252 6	35.19 bed
5c	0.115 5	68.75 bed	0.242 5	37.78 cd
5d	0.169 4	54.17 abc	0.288 1	26.10 abcd
5e	0.210 1	43.16 a	0.323 5	17.02 ab
5f	0.200 3	45.81 ab	0.338 0	13.28 a
5g	0.101 6	72.52 cd	0.230 0	40.99 d
5h	0.147 3	60.16 abcd	0.252 4	35.26 bed
5i	0.126 5	65.77 abcd	0.231 1	40.70 d
5j	0.154 5	58.19 abcd	0.257 2	34.02 bed
5k	0.163 5	55.77 abcd	0.268 4	31.14 abcd
5l	0.160 4	56.61 abcd	0.326 5	16.25 ab

续表 (Continued)

供试药剂 Test reagent (100 μg/mL)	预防效果 Preventive effect		治疗效果 Therapeutic effect	
	枯斑数/(个/cm ²)	抑制率	枯斑数/(个/cm ²)	抑制率/%
	Lesion numbers in one cm ² leave	Inhibition rate/%	Lesion numbers in one cm ² leave	Inhibition rate/%
5m	0.078 1	78.86d	0.217 9	44.09d
5n	0.097 9	73.52cd	0.244 3	37.33cd
5o	0.094 4	74.46cd	0.239 7	38.50cd
5p	0.128 7	65.17abcd	0.281 8	27.70abcd
5q	0.171 7	53.55abc	0.312 1	19.93abc
5r	0.150 0	59.41abcd	0.308 9	20.76abc
对照 (CK)	0.369 6	-	0.389 8	-

注: 表中同一列数据后标相同小写字母者表示经 Duncan氏新复极差测验, 在 P_{0.05} 水平上差异不显著。

Note: Data in a column followed by the same small letters are not significantly different at P_{0.05} by Duncan's multiple range test respectively.

本研究结果表明, 利用微波辐射可以方便快捷地合成壳寡糖希夫碱金属配合物, 同时该化合物能有效地诱导烟草产生抗病反应, 调节植物生理活性, 使用方便, 不污染环境, 符合我国生态农业的要求。有关其他与活性相关的评价试验仍在进行中。

参考文献:

- [1] LU Xing-hai(刘幸海), LI Zheng-ming(李正名), WANG Bao-ke(王宝雷). 具有农业生物活性壳寡糖的研究进展[J]. *Chin J Pestic Sci* (农药学报), 2006, 8(1): 1-7
- [2] CHEN Y F, ZHAN Y, ZHAO X M, et al. Functions of oligochitosan induced protein kinase in tobacco mosaic virus resistance and pathogenesis related proteins in tobacco[J]. *Plant Physio Biochem*, 2009, 47: 724-731
- [3] XU Q S, DOU J L, WEI P, et al. Chito oligosaccharides induce apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells via up-regulation of Bax[J]. *Carbohydr Polym*, 2008, 71: 509-514
- [4] JEON Y J, PARK P J, KIM S K. Antimicrobial effect of chito oligosaccharides produced by bioreactor[J]. *Carbohydr Polym*, 2001, 44: 71-76
- [5] JEON Y J, KIM S K. Production of chito oligosaccharides using an ultrafiltration membrane reactor and their antibacterial activity[J]. *Carbohydr Polym*, 2000, 41: 133-141
- [6] PROMET J. Signalling events elicited in plants by defined oligosaccharide structures[J]. *Curr Opin Struct Biol*, 1996, 6: 671-678
- [7] KOLLAROVA K, RICHTEROVA D, SLOVAKOVA L, et al. Impact of galactoglucosamin oligosaccharides on elongation growth in intact mung bean plants[J]. *Plant Sci*, 2009, 177: 324-330
- [8] QIU Di-hong(裘迪红), WU Han-mi(吴汉民). 甲壳低聚糖制备及在农业上的应用[J]. *J Ningbo Univ: Nsee* (宁波大学学报: 理工版), 2001, 14(2): 60-63
- [9] ZHAO X M, SHE X P, DU Y G, et al. Induction of antiviral resistance and stimulatory effect by oligochitosan in tobacco[J]. *Pestic Biochem Phys*, 2007, 87: 78-84
- [10] NYARKU S, MAVUSO E, NGCAMPALALA S. Preparation, characterisation and biological evaluation of a chromim(III) Schiff base complex derived from o-nitrobenzaldehyde and p-aminophenol[J]. *S Afr J Chem*, 1998, 51(4): 168-170
- [11] JIN X X, WANG J T, BAI J. Synthesis and antimicrobial activity of the Schiff base from chitosan and citra[J]. *Carbohydr Res*, 2009, 344: 825-829
- [12] LI Hai-hong(李海虹). 壳聚糖与正丁醛缩合反应的研究[J]. *Chem Res Appl* (化学研究与应用), 2007, 19(2): 230-232
- [13] GUO Z Y, XING R, LIU S, et al. Antifungal properties of Schiff bases of chitosan N-substituted chitosan and quaternized chitosan[J]. *Carbohydr Res*, 2007, 342: 1329-1332
- [14] MA Di(马迪), ZHAO Xi-xiang(赵秀香), WU Yuan-hua(吴元华). 壳寡糖对烟草花叶病毒的抑制作用及其对烟草酶活性的影响[J]. *Chin J Biol Control* (中国生物防治), 2008, 24(2): 154-158
- [15] WEN Yan-mei(温燕梅), LI Si-dong(李思东), ZHONG Jie-ping(钟杰平), et al. 壳聚糖希夫碱铜配合物的制备及其催化性能[J]. *J Zhanjiang Ocean Univ* (湛江海洋大学学报), 2006, 26(4): 63-66
- [16] SUN Wei(孙伟), XIA Chun-gu(夏春谷), WANG Ai-qin(王爱勤). 壳聚糖希夫碱铜多相催化剂催化苯乙烯环丙烷反应研究[J]. *Acta Chim Sinica* (化学学报), 2002, 60(1): 162-165

(责任编辑: 金淑惠)