

doi:10.3969/j.issn.1001-4616.2020.01.021

二氢卟吩铁溶液的基本性质初探

陈 洋¹, 王乐天², 李文玘¹, 任 勇¹

(1.南京师范大学生命科学学院,江苏省医药超分子材料及应用重点实验室,江苏 南京 210023)
(2.南京百特生物工程有限公司,江苏 南京 211161)

[摘要] 研究二氢卟吩铁溶液基本性质,为产品制剂改进提供技术支持.高效液相测定二氢卟吩铁溶液稳定性;光度法测定溶解度、分析溶液状态;计算机模拟分子结构,计算各种缔合方式的体系能量.结果表明:二氢卟吩铁难溶或基本不溶于常规溶剂,固体长期放置后溶解度亦有明显下降;其甲醇及碱溶液较稳定,而乙醇中不稳定;此外,溶液中二氢卟吩铁存在明显分子缔合,其中甲醇、甲-乙醇(1:1)及碱溶液中主要为二分子缔合,乙醇中主要为四分子缔合;分子模拟计算发现,二氢卟吩铁分子具有较高缔合能,其中键角能和范德华力为主要作用力.研究表明,二氢卟吩铁分子的缔合作用可能是影响产品溶解性、稳定性的重要原因.

[关键词] 二氢卟吩铁,分子缔合,稳定性,溶解性

[中图分类号] S482.8 [文献标志码] A [文章编号] 1001-4616(2020)01-0143-06

Preliminary Study on the Basic Properties of Iron Chlorin Solution

Chen Yang¹, Wang Letian², Li Wending¹, Ren Yong¹

(1.School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Key Laboratory for Supramolecular Medicinal Materials and Applications, Nanjing 210023, China)
(2.Nanjing Better Biology Co., Ltd., Nanjing 211161, China)

Abstract: The basic properties of iron chlorin solution, were studied to provide technical support for the improvement of product preparation. Iron chlorin solution stability was determined by HPLC. The solubility and solution state were determined by spectrophotometry. The molecular structure is simulated by computer to calculate the system energy of various association modes. The results showed that iron chlorin was indissolvable or insoluble in conventional solvents, and the solubility of solid was decreased after long-term placement. The methanol and alkali solutions were stable, while the ethanol was unstable. In addition, there was obvious molecular association of iron chlorin in the solution, in which there were mainly two molecular associations in methanol, methanol-ethanol (1:1) and alkali solution, and there were mainly four molecular associations in ethanol. Molecular simulation showed that iron chlorin had higher association energy, in which bond angle energy and Van der Waals force were the main forces. The study shows that the association of iron chlorin may be an important reason that affects the solubility and stability of product.

Key words: iron chlorin, molecular association, stability, solubility

二氢卟吩铁是江苏省医药超分子材料及应用重点实验室设计、发明研制的一种新型植物生长调节剂,本品具有抑制叶绿素酶,延缓叶绿素降解而增强光合作用,促进根系生长,提高发芽率,增加抗逆性等特点^[1]. 大田实验首次发现,二氢卟吩铁(亦称叶绿酸铁)能促进小麦生长,促进对肥料的吸收,减少肥料的用量,对作物品质无不良影响,且不易积累残留,增产增收效果显著^[2]. 植物生理研究表明,本品可通过提高盐胁迫下绿豆叶片的抗氧化能力来缓解氧化损伤,对逆境植物有抗氧化作用^[3]. 本品由南京百特生物工程有限公司产业化,经农业部多省区大田试验验证表明,油菜苗期进行茎叶喷雾,株高、分枝、角果数和角粒数显著增加,增产达 8.35%~41.6%. 郭丽华等在油菜越冬期和返青期喷洒本品,可提高 1 次分枝数、每株角数、每角粒数,增产效果明显,且对油菜安全^[4]. 本产品于 2018 年 12 月获得国家农药正式登记^[5],

收稿日期:2019-04-02.

基金项目:江苏省科技发展计划项目(BM2007205).

通讯作者:任勇,博士,副教授,研究方向:药物设计与药物超分子研究. E-mail:renyongphd@126.com

登记名称:二氢卟吩铁,登记制剂:可溶粉剂.

二氢卟吩是叶绿素和血红素等植物内源性成分的结构母核,以焦脱镁叶绿酸、紫红素及多种二氢卟吩成分为主配体,不同酸根或氢氧根为轴向配体与三价铁离子螯合构成的多组分二氢卟吩铁的螯合物,统称为二氢卟吩铁,属于叶绿素类衍生物^[5],研究表明,此类卟啉母核结构物易聚集(缔合),并且具有独特的理化性质^[6].二氢卟吩铁为墨绿色疏松粉末状固体,光稳定性差,且基本不溶于水^[7],因此,研究二氢卟吩铁溶液性质及溶解特性对于研制溶解性好、溶解迅速、使用方便、稳定性好的高质量水溶性新型二氢卟吩铁产品具有重要意义.

1 材料、试剂与仪器

1.1 材料与试剂

二氢卟吩铁母药(批号:20180112,南京百特生物工程有限公司);氢氧化钠(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);十二水合磷酸氢二钠(分析纯,上海凌峰化学试剂有限公司);四甲基氯化铵(分析纯,上海源叶生物科技有限公司);超纯水;磷酸(分析纯,天津市科密欧化学试剂有限公司);乙醇(分析纯,上海久亿化学试剂有限公司);甲醇、乙腈(色谱纯,国药集团化学试剂有限公司).

1.2 仪器

LCMS-2020 型高效液相色谱仪(日本岛津公司);UV-2450 型紫外可见分光光度计(日本岛津公司);Explorer 电子分析天平(美国 Ohaus 公司);KQ-250DB 数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);DHG-9123A 电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司).

2 方法

2.1 溶解度测定

各称取适量二氢卟吩铁(简称样品)分别溶于不同溶剂,超声 10 min 后定容至 20 mL,用 0.45 μm 的微孔滤膜过滤,得到样品的甲醇、乙醇、甲-乙醇(1:1)、0.1 mol/L 氢氧化钠及纯水溶液,编号溶液 1~5,取适当滤液,稀释,紫外 200 nm~800 nm 扫描,确定最大吸收波长,将样品溶液适当稀释后的吸光度控制在 1 左右,以样品中氯化二氢卟吩- $\epsilon 6$ 合铁的摩尔吸收系数($\epsilon = 4.2 \times 10^4$)、相对分子质量 685.9^[8]、样品吸光值以及稀释倍数,计算样品溶解度.

样品 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光放置 6 个月(180 d)后重复上述测定,相同方法计算溶解度.

2.2 稳定性检测

取上述样品溶液 1~5 进行高效液相检测. 色谱条件:色谱柱:Agilent HC-C18(250 mm \times 4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈-PBS 缓冲液(50:50)(PBS:500 mL 水、3 mL 磷酸、3.58 g 十二水合磷酸氢二钠、1.09 g 四甲基氯化铵);柱温:30 $^{\circ}\text{C}$;流速:1.0 mL/min;检测波长:397 nm~402 nm;进样量:20 μL . 样品溶液室温避光,分别于 0 h、1 h、2 h 进样,记录峰面积,比较峰面积变化.

2.3 溶液中分子状态的观察

测定样品各溶液紫外最大吸收波长下在不同浓度 C_i 时的吸光度 A_i ,计算摩尔吸收系数 ϵ_i 值($\epsilon_i = A_i/C_i$),以 ϵ_i 对 C_i 作图. 根据 ϵ_i 与 C_i 关系图,观察样品在不同溶剂体系中是否存在缔合现象.

2.4 缔合度的计算

上述 ϵ_i 若不为定值,表示体系存在缔合现象,应定义 ϵ_i 为有效摩尔吸收系数 ϵ_{eff} ;作 ϵ_{eff} 与 $(\epsilon_{\text{eff}}^n \cdot C_M^{n-1})$ 关系图, n (正整数)为缔合数, C_M 为物质单体的初始总浓度. 关系图为直线时,所设 n 值即为体系的分子缔合度^[9].

2.5 分子模拟缔合计算

使用 Cache WorkSystem Pro 6.1 程序组建分子初始模型,PM5 半经验量子化学方法进行结构优化,获得稳定的二氢卟吩铁分子模型. 采用同种分子的对接方法模拟多分子不同的缔合形式(J-缔合和 H-缔合),以分子动力学程序 MM-MM3_Geo 计算不同缔合体系的能量,对比孤态体(非缔合)能量,计算缔合前后的能量变化^[10-11].

3 结果与讨论

3.1 溶解度测定

样品各溶液紫外吸光度变化如图 1,二氢卟吩铁在甲醇、乙醇、甲-乙醇(1:1)、0.1 mol/L 氢氧化钠中最大吸收波长分别为 397 nm、402 nm、398 nm、400 nm,相比甲醇液,其他溶剂的最大吸收波长均发生不同程度红移。

样品在不同溶剂中的溶解度见表 1,其溶解度大小顺序:甲醇>甲-乙醇(1:1)>乙醇>0.1 mol/L 氢氧化钠>纯水. 样品 4 ℃ 避光放置 180 d 后,除纯水中基本不溶外,各溶剂中溶解度均明显降低,降低幅度达 50%以上.

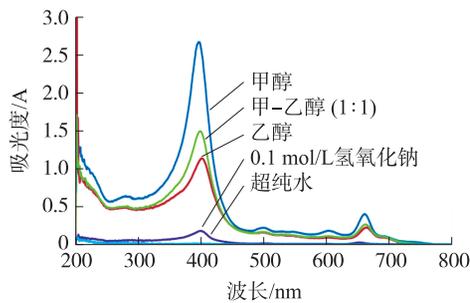


图 1 二氢卟吩铁在各溶液中紫外吸光度变化

Fig. 1 UV absorbance of iron chlorin in different solvents

表 1 二氢卟吩铁在不同溶剂中的溶解度

Table 1 The solubility of iron chlorin in different solvents

溶剂	溶解度/(g/L)	
	0 d	180 d
甲醇	0.870 8	0.488 6
乙醇	0.352 1	0.132 3
甲-乙醇(1:1)	0.480 1	0.219 5
0.1 mol/L 氢氧化钠	0.057 8	0.023 2
超纯水	0.000 2	0.000 2

3.2 稳定性测定

样品溶液高效液相色谱检测结果如图 2(甲醇溶液)。

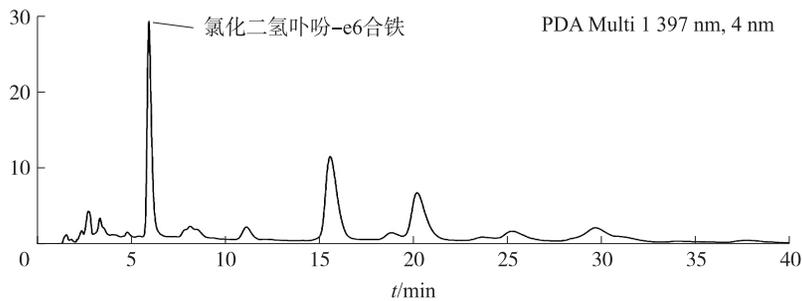


图 2 二氢卟吩铁甲醇溶液高效液相色谱图

Fig. 2 HPLC graph of iron chlorin in methanol solution

样品各溶液以氯化二氢卟吩-e6 合铁含量为标定峰,0 h 的初始峰面积为 100%,2 h 内峰面积变化见表 2.

表 2 氯化二氢卟吩-e6 合铁在不同溶液中 HPLC 峰面积变化

Table 2 Peak area changes of iron chlorin e6 in different solutions by HPLC

时间	氯化二氢卟吩-e6 合铁含量/%			
	甲醇	乙醇	甲-乙醇(1:1)	0.1 mol/L 氢氧化钠
0	100	100	100	100
1	99.40	41.09	76.26	99.95
2	99.21	31.97	75.47	97.48

3.3 溶液中分子状态观察

若溶液物质只存在单体,摩尔吸光系数 ε_i 应为定值($\varepsilon_i = A_i/C_i$);反之,若 ε_i 不为定值,则表明体系中存在状态变化^[9,12-13]. 为验证体系是否存在缔合现象,以最大吸收波长下各浓度 C_i 时样品溶液的吸光度 A_i 计算 ε_i ,作 ε_i-C_i 关系图.

结果表明,在甲醇中(图 3-A),随样品初始浓度 C_i 增大, ε_i 呈上升趋势,在乙醇、甲-乙醇(1:1)及 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液中(图 3-B/C/D), ε_i 随浓度 C_i 增大而逐步降低,即各体系中均有状态变化,表明样

品在上述溶剂体系中存在明显的分子缔合现象,且随二氢卟吩铁浓度增加,溶液最大吸收波长均出现不同程度蓝移,其中甲醇中蓝移 4 nm;乙醇 3 nm;甲-乙醇(1:1)4 nm;0.1 mol/L 氢氧化钠溶液 2 nm,蓝移表明:溶液中样品主要以 H-缔合“面-面”(Plane-to-Plane)的方式存在^[6].

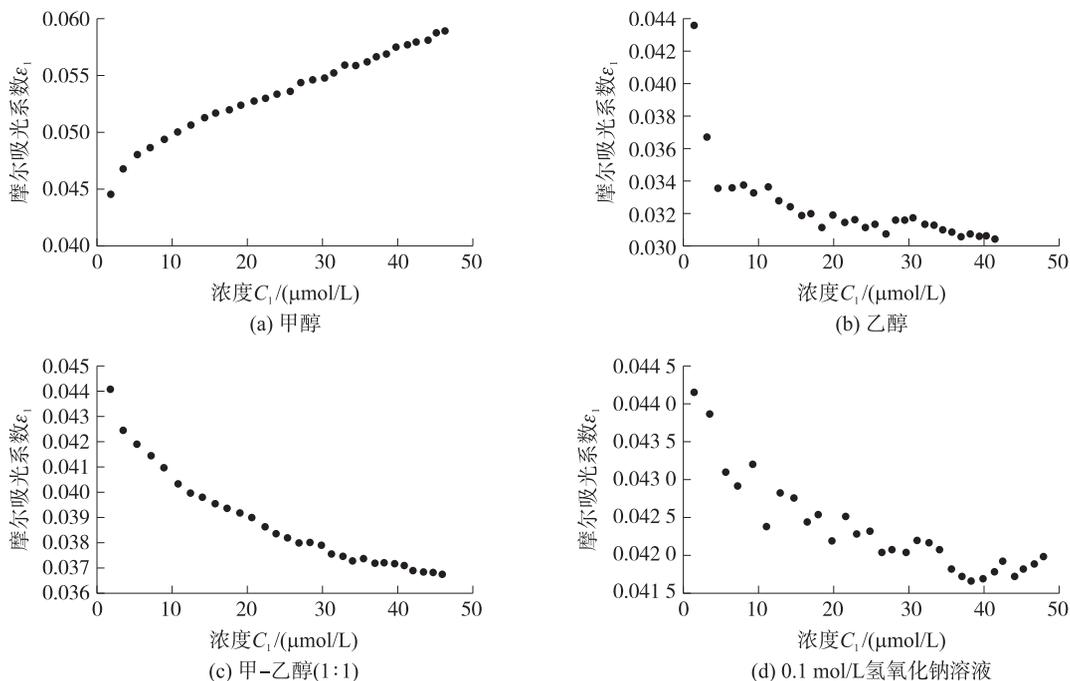


图 3 二氢卟吩铁不同溶液中摩尔吸光系数与浓度相关性

Fig. 3 Relativity between molar absorptivity and concentration of iron chlorin in different solutions

3.4 缔合度计算

对存在分子缔合现象的体系,以 ϵ_{eff} 对 $(\epsilon_{\text{eff}}^n \cdot C_M^{n-1})$ 作图,将 n 以不同数值代入计算,所得函数为直线时,所取 n 值即为缔合数,即在此体系中有分子的 n 聚态形式.测定计算表明:甲醇、甲-乙醇(1:1)及 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液中主要存在二分子缔合,乙醇中存在四分子缔合.

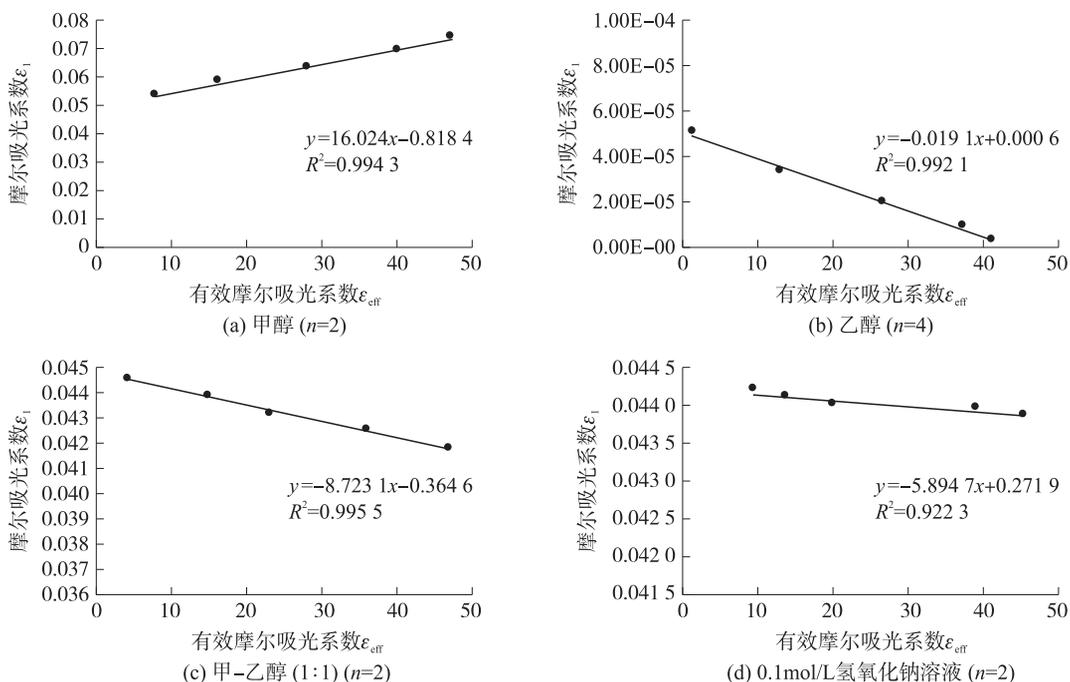


图 4 二氢卟吩铁在不同溶液中的分子缔合状态

Fig. 4 Molecular association state of iron chlorin molecules in different solutions

3.5 分子模拟及能量计算

Cache 程序可方便地实现小分子-大分子的分子对接及计算^[10-11],本研究使用同结构的小分子-小分子方式对接,通过几何匹配和能量匹配相互识别而找到最佳匹配模式,匹配过程在已经建立的分子稳定结构信息基础上进行,通过空间结构互补和能量最小化原则以搜寻体系(缔合)最佳存在形式或结构状态.二氢卟吩铁的多分子模拟计算发现,孤立态(非缔合)能量均明显高于缔合态,显示二氢卟吩铁具有明显的缔合能量优势.其中二分子孤立态(非缔合)能量达 90.126 4 kcal/mol,而缔合态的 J-缔合及 H-缔合两种典型方式中,“头-尾”(Head-to-Tail)方式的 J-缔合体总能量 55.730 3 kcal/mol,而“面-面”(Plane-to-Plane)方式的 H-缔合体总能量 38.513 4 kcal/mol,说明溶液体系中,二氢卟吩铁分子将以 H-缔合方式为主,以使体系达到最大程度的稳定,其模拟计算的结果与光度法测定溶液缔合状态的结果是一致的.

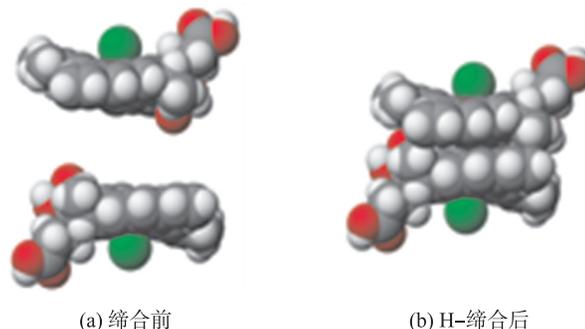


图 5 二氢卟吩铁二分子 H-缔合前后的状态模拟
Fig. 5 State simulation of two iron chlorin molecules before and after H-association

表 3 二氢卟吩铁二分子 H-缔合前后体系能量变化

	缔合前	H-缔合后	Δ
Stretch	10.161 0	14.662 0	4.501 0
Stretch bend	-1.582 0	-1.481 0	0.101 0
Improp torsion	1.010 0	0.186 0	-0.824 0
Bend bend	7.298 0	6.869 0	-0.429 0
Electrostatics	-177.319 0	-165.304 0	12.015 0
Angle	219.322 0	184.267 0	-35.055 0
Dihedral	13.830 0	7.443 0	-6.387 0
Torsion stretch	-2.482 0	-2.628 0	-0.146 0
Van der Waals	11.659 0	-10.583 0	-22.242 0
Hydrogen bond	11.659 0	5.083 0	-6.576 0
Total energy	90.126 4	38.513 4	-51.613 0

一般而言,溶液中二分子缔合过程释放的能量约 15 kcal/mol~30 kcal/mol,如平面结构的百草枯分子,溶液中存在多种明显的缔合分子^[12],其中二分子缔合释放能量仅为 27.263 kcal/mol.表 3 中,本试验的样品分子二分子缔合释放 51.613 kcal/mol 的总能量,其中键角能和范德华力是其主要来源,二面角能和氢键也有一定的作用,但电子总能量因缔合而出现明显的增加.

在本文所测试的溶剂中,样品 Soret 带波长范围为 397 nm~402 nm,与脱镁叶绿酸紫外吸收波长 406 nm~411 nm^[14],叶绿酸铁(亚铁)408 nm^[15]的特征吸收(Soret 带)存在明显差异,其中 0.1 mol/L NaOH 溶液发生明显红移,表明样品中心铁为三价铁并且与 OH⁻存在轴向配位作用^[16].卟啉分子聚集大多数是由分子之间的相互作用引起的,如静电作用、疏水作用、氢键作用等^[6].表 3 中 H-缔合体分子模拟计算发现,键角能对缔合稳定化能的贡献最大(达 35.055 kcal/mol),显示缔合过程中分子存在较大的变形、缔合分子的离域 π 电子离域化/稳定化程度与孤立的基态相比有所降低、 π 电子极化度增强,同时电子总能量有明显升高,这些结果不仅是体系最大吸收出现蓝移的基本原因,而且可能是导致分子稳定性下降的重要因素.

范德华力的降低是分子缔合的另一主要因素;氢键能量的降低主要因为二氢卟吩铁分子存在羟基、羧基,缔合后相互结合.物质的溶解度涉及到晶格能、水合能等许多因素,从能量变化看,极化程度高会诱导分子缔合并释放大量能量,增大分子晶格能,导致样品难以溶解,而且溶液状态难以呈单分子状态存在.

4 结论

(1)本文所测试溶剂中,二氢卟吩铁均为难溶,甲醇中溶解度相对较大,纯水中基本不溶;另外还观察到,样品室温放置 6 个月测定出更低的溶解度,而且样品溶解更加缓慢,其结果与本实验室前期的相关研

究一致^[17].

(2)以氯化二氢卟吩-e6合铁为有效成分测定稳定性时,甲醇及0.1 mol/L氢氧化钠溶液中样品较稳定,乙醇及甲-乙醇(1:1)体系中则稳定性差,结合溶解性实验,其稳定性变化与二氢卟吩铁长时间放置后溶解度的降低以及溶解速度的下降有一定关联.实际应用中可采用甲醇或稀碱液防止样品可能出现的再沉淀,以提高二氢卟吩铁水溶性和稳定性.

(3)缔合实验结果发现,二氢卟吩铁在各溶液体系中均存在明显的分子缔合,其中乙醇以四分子缔合为主,其余溶液中以二分子缔合为主.

(4)二氢卟吩铁分子的缔合性质,明显影响了溶解性及稳定性,而且随放置时间,溶解度进一步降低,溶液稳定性亦显著下降.另一方面,缔合后相对大的分子簇体积,喷洒作物过程中将影响药物的扩散、透过及吸收,降低药效的发挥,大量分子的缔合会导致药物活性钝化.消除二氢卟吩铁分子缔合或降低分子缔合度,不仅对提高样品溶解性和稳定性具有重要意义,对增强产品有效性和研发高品质水溶性产品也具有极高的实用价值.

[参考文献]

- [1] 任勇,张列峰,蒋慧,等.含有叶绿素及其水解产物的金属衍生物作为植物生长调节剂的应用:CN102273467A[P].2011-12-14.
- [2] 王一凡,张列峰,蒋慧,等.不同肥力条件下小麦施用叶绿酸铁的效果[J].江苏农业科学,2012,40(6):78-79.
- [3] 蒋慧,任勇,王一凡,等.叶绿酸铁对盐胁迫下绿豆幼苗生长和氧化损伤的影响[J].江苏农业科学,2011,39(5):96-99.
- [4] 郭丽华,唐为爱,李万梅.0.02%二氢卟吩铁DP调节油菜生长的药效试验[J].上海蔬菜,2016(2):53-54.
- [5] 白小宁,李友顺,王宁,等.2017年我国登记的新农药[J].农药,2018,57(2):79-84.
- [6] 史婷婷,姬东方,于艳敏.卟啉聚集行为的研究进展[J].材料导报,2017,31(5):46-52.
- [7] 陈黎明.植物生长调节剂二氢卟吩铁[J].农药科学与管理,2018,39(3):67-68.
- [8] NONOMURA Y, YAMAGUCHI M, HARA T, et al. High-performance liquid chromatographic separation of iron(III) chlorophyllin[J]. Journal of chromatography A, 1996, 721(2):56-59.
- [9] 何锡文,史长虹,张贵珠,等.用光度法测定物种溶液状态的缔合数和缔合度[J].高等学校化学学报,1993(6):766-770.
- [10] MÁRCIA V G de A, ELZE K B V, GILDERMAN S L, et al. Sulfadiazine/hydroxypropyl- β -cyclodextrin host-guest system: characterization, phase-solubility and molecular modeling[J]. Bioorganic & medicinal chemistry, 2008, 16(10):105-109.
- [11] OSMIR F L M, GEORGE R S A, LEILA S C, et al. Physicochemical study and characterization of the trimethoprim/2-hydroxypropyl- γ -cyclodextrin inclusion complex[J]. Spectrochimica acta part A: molecular and biomolecular spectroscopy, 2011, 86.
- [12] 张敏敏,卜文程,高茜,等.溶液中百草枯分子缔合现象[J].江苏农业科学,2014,42(1):106-108.
- [13] 吕玲玉,何金东,王利敏,等.三七总皂苷在不同溶液体系中的分子缔合[J].时珍国医国药,2016,27(3):625-627.
- [14] 纪平雄,张廿六,陈芳艳,等.三种脱镁叶绿酸a的分离与鉴定方法探讨[J].中国蚕业,2001(1):13-14.
- [15] 刘淑萍,李玲美,赵晓玲,等.叶绿酸Fe²⁺的稳定性及在功能性糖果中的应用[J].食品科技,2016,41(12):231-234.
- [16] 徐海,于道永,阙国和,等.金属卟啉在不同溶剂中紫外可见吸收光谱的研究[J].石油大学学报(自然科学版),2003(2):110-113.
- [17] 孙俊梅,曾建,任勇.叶绿酸铁与环糊精包合性质的初步研究[J].湖北大学学报(自然科学版),2012,34(1):86-88.

[责任编辑:黄敏]