

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810054579.4

[51] Int. Cl.

C07F 5/00 (2006.01)
A01N 55/02 (2006.01)
A61K 31/555 (2006.01)
A01P 1/00 (2006.01)
A61P 31/10 (2006.01)

[43] 公开日 2008 年 8 月 6 日

[11] 公开号 CN 101235048A

[22] 申请日 2008.2.29

[21] 申请号 200810054579.4

[71] 申请人 河北师范大学

地址 050016 河北省石家庄市裕华东路 113 号

[72] 发明人 赵宝华 王瑞芬 杨楠 赵娜
马亚娟 刘金玲

[74] 专利代理机构 石家庄新世纪专利商标事务所有
限公司
代理人 董金国

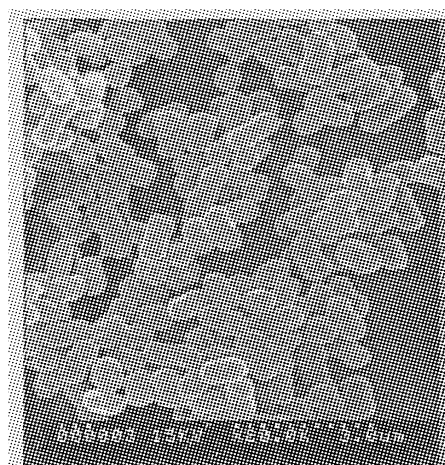
权利要求书 1 页 说明书 8 页 附图 1 页

[54] 发明名称

萘酸、1,10-邻菲啰啉稀土配合物、制备方法
及其抗真菌的应用

[57] 摘要

本发明公开了萘酸、1,10-邻菲啰啉稀土配合物及其抑制酵母菌的作用。稀土配合物结构式为： $RE L_3 phen \cdot nH_2O$ ；其中 RE 是稀土元素 Eu^{3+} 、 Tb^{3+} 、 Gd^{3+} 、 La^{3+} 、 Y^{3+} 中的任何一种；L 是 α -Naphthoic acid, β -Naphthoic acid, α -Naphthylacetic acid, β -Naphthylacetic acid 四种萘酸中的一种； $n=0$ 或 1。以 L 为第一配体，邻菲啰啉为第二配体，按照 $RE^{3+} : L : phen = 1 : 3 : 1$ 的物质的量的比，加乙醇溶解，混合两种配体，加入到稀土氯化物溶液中，搅拌反应合成配合物；采用滤纸片法对真菌进行抑菌实验，发现稀土配合物对酵母菌有显著抑制效果，比单纯的离子、配体抑菌效果好，而且配合物的抑制酵母菌作用有浓度剂量效应。本发明为研发微生物抑菌剂提供了有益的借鉴。



1、一种以萘酸、1,10-邻菲啰啉为配体的稀土配合物，其特征在于结构式为： $RE L_3phen \cdot nH_2O$ ；其中 RE 是稀土元素 Eu^{3+} 、 Tb^{3+} 、 Gd^{3+} 、 La^{3+} 、 Y^{3+} 中的任何一种；L 是 α -Naphthoic acid, β -Naphthoic acid, α -Naphthlactic acid, β -Naphthlactic acid 四种萘酸中的一种；Phen 是 1,10-邻菲啰啉； $n=0$ 或 1。

2、如权利要求 1 所说的稀土配合物的制备方法，其特征在于包括以下步骤：

(1) 分别将 Eu_2O_3 、 Tb_4O_7 、 Gd_2O_3 、 La_2O_3 、 Y_2O_3 稀土氧化物溶于浓盐酸中，蒸发水分，浓缩结晶，制得相应的稀土氯化物 $EuCl_3 \cdot 6H_2O$ 、 $TbCl_3 \cdot 6H_2O$ 、 $GdCl_3 \cdot 6H_2O$ 、 $LaCl_3 \cdot 6H_2O$ 、 $YCl_3 \cdot 6H_2O$ ；

(2) 以 L 为第一配体选用 α -萘酸，1,10 邻菲啰啉为第二配体，五种稀土氯化物都按照 $RECl_3 \cdot 6H_2O:L(\alpha\text{-萘酸}):phen=1:3:1$ 的物质的量的比称取，分别用 95% 的乙醇溶解，得到五种稀土氯化物的乙醇溶液、两种配体 L (α -萘酸) 和 phen 乙醇溶液；

(3) 将两种配体溶液混合，调节 pH 值至 6~7，将混合溶液逐滴加入到 $RECl_3 \cdot 6H_2O$ 稀土氯化物溶液中，搅拌反应 3~5h；

(4) 混合液静置 12h，抽滤，用 95% 的乙醇洗涤 3 次，在红外干燥箱中烘干，得到以 α -萘甲酸和 1, 10-邻菲啰啉为配体的五种配合物。

3、根据权利要求 2 所述的制备方法，其特征在于步骤 (2) 中：第一配体 L 分别用 β -萘甲酸、 α -萘乙酸、 β -萘乙酸替换，制备的稀土氯化物为： $EuCl_3 \cdot 6H_2O$ 、 $TbCl_3 \cdot 6H_2O$ 、 $GdCl_3 \cdot 6H_2O$ 、 $LaCl_3 \cdot 6H_2O$ 、 $YCl_3 \cdot 6H_2O$ 。

4、一种如权利要求 1 所述的稀土配合物的应用，其特征是稀土配合物在抑制真菌中的应用。

萘酸、1,10-邻菲啰啉稀土配合物、制备方法及其抗真菌的应用

技术领域

本发明涉及一种稀土配合物，特别是一种以萘酸、1,10-邻菲啰啉为配体的稀土配合物，属于微生物抑菌技术领域。

背景技术

稀土，我国储备资源占世界 80%左右，稀土有着独特的电子层和核结构，并具有很好的抗菌、消炎、抗肿瘤等作用。二十世纪以来，有关稀土在生命科学领域的研究不断被报道。由于低毒特性，使其抗菌性能在农业、医疗卫生方面有着很好的应用前景。如硝酸铈由于对烧伤有很好的治疗作用已经作为杀菌消炎剂而应用到临床。稀土通过抑制病原菌的生长和繁殖来提高作物的抗病性等。随着高新技术的日益发展，配位化学的研究也迈向了一个新的台阶，其中，具有特殊物理、化学和生物化学功能的配位化合物不断合成，从而为医学界发现真正独特而新颖的药物提供了基础。考虑到稀土离子有很好的配位能力，所以其配合物的合成及活性的研究受到人们的重视。大量实验表明稀土有机配合物具有抗菌、抗炎、抗肿瘤等作用，且多数稀土配合物的抗菌活性高于配体及稀土离子，主要是由于稀土与配体发生了协同作用，并且比许多有机合成物或过渡金属配合物的毒性低，为开发稀土抗菌剂提供了理论依据。现有技术中公开的研究成果主要集中在简单的稀土无机或者有机盐类对细菌的抑制作用，虽然其抑菌性强，抑菌谱广，但溶液的酸性较强，对真菌的生长呈双重效应，其抗真菌性能有待进一步研究。因多数稀土配合物具有杀菌能力强，抑菌谱广，溶液酸性接近生理 pH 等优点，研制新的稀土配合物将有利于抑菌剂研发，对微生物工业领域的应用将提供有益的借鉴。为此，研制一种具有强的抗真菌性，价格低廉，且能广泛应用到微生物、农业、医疗、环境等方面的稀土配合物具有重要意义。

发明内容

本发明的目的是提供一种以萘酸、1,10-邻菲啰啉为配体,抑菌效果优于单纯的稀土离子的稀土配合物,其制备方法以及其在抑制真菌中的应用。

本发明采取的技术方案是这样的:

本发明提供的稀土配合物的结构式为: $RE L_3phen \cdot nH_2O$; 其中 RE 是稀土元素 Eu^{3+} 、 Tb^{3+} 、 Gd^{3+} 、 La^{3+} 、 Y^{3+} 中的任何一种; L 是 α -Naphthoic acid、 β -Naphthoic acid、 α -Naphthlactic acid、 β -Naphthlactic acid 四种萘酸中的一种,四种萘酸的中文名称分别为 α -萘甲酸、 β -萘甲酸、 α -萘乙酸、 β -萘乙酸,英文简写为 α -NMA、 β -NMA、 α -NAA、 β -NAA,化学式分别是, α - $C_{11}H_7O_2$ 、 β - $C_{11}H_7O_2$ 、 α - $C_{12}H_9O_2$ 、 β - $C_{12}H_9O_2$; Phen 是 1,10-邻菲啰啉(1,10-phenanthroline)的缩写,化学式为 $C_{12}H_8N_2$; $n=0$ 或 1。

本发明所说的稀土配合物的制备方法包括以下步骤:

(1) 分别将 Eu_2O_3 、 Tb_4O_7 、 Gd_2O_3 、 La_2O_3 、 Y_2O_3 溶于浓盐酸中,蒸发水分,浓缩结晶,制得相应的五种稀土氯化物 $EuCl_3 \cdot 6H_2O$ 、 $TbCl_3 \cdot 6H_2O$ 、 $GdCl_3 \cdot 6H_2O$ 、 $LaCl_3 \cdot 6H_2O$ 、 $YCl_3 \cdot 6H_2O$;

(2) 以 L 为第一配体,选择 α -萘酸,1,10 邻菲啰啉为第二配体,上述五种稀土氯化物都按照 $RECl_3 \cdot 6H_2O:L:phen=1:3:1$ 的物质的量的比称取,分别用 95%的乙醇溶解,得到五种稀土氯化物的乙醇溶液、两种配体 α -萘酸和 phen 乙醇溶液;

(3) 将两种配体溶液混合,调节 pH 值至 6~7; 将混合溶液逐滴加入到 $RECl_3 \cdot 6H_2O$ 稀土氯化物溶液中,期间有白色沉淀生成,搅拌反应 3~5h; $RECl_3 \cdot 6H_2O$ 代表 $EuCl_3 \cdot 6H_2O$ 、 $TbCl_3 \cdot 6H_2O$ 、 $GdCl_3 \cdot 6H_2O$ 、 $LaCl_3 \cdot 6H_2O$ 、 $YCl_3 \cdot 6H_2O$ 中的一种;

(4) 混合液静置 12h,抽滤,用 95%的乙醇洗涤 3 次,在红外干燥箱中烘干,即为合成的配合物,分别得到以 α -萘甲酸和 1,10-邻菲啰啉为配体的五种配合物;

以另外三种萘酸配合物为第一配体的配合物的合成方法与 α -萘甲酸、

1,10-邻菲啰啉稀土配合物的合成方法相同,将第一配体 α -萘甲酸分别用

β -萘甲酸、 α -萘乙酸、 β -萘乙酸替换即可。

按以上方法所合成物质的化学式为：

$\text{Eu}(\alpha\text{-C}_{11}\text{H}_7\text{O}_2)_3\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{Tb}(\alpha\text{-C}_{11}\text{H}_7\text{O}_2)_3\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$ 、
 $\text{Gd}(\alpha\text{-C}_{11}\text{H}_7\text{O}_2)_3\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{La}(\alpha\text{-C}_{11}\text{H}_7\text{O}_2)_3\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2$ 、 $\text{Y}(\alpha\text{-C}_{11}\text{H}_7\text{O}_2)_3\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2$ 、
 $\text{Eu}(\beta\text{-C}_{11}\text{H}_7\text{O}_2)_3\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2$ 、 $\text{Tb}(\beta\text{-C}_{11}\text{H}_7\text{O}_2)_3\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2$ 、 $\text{Gd}(\beta\text{-C}_{11}\text{H}_7\text{O}_2)_3\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2$ 、
 $\text{Y}(\beta\text{-C}_{11}\text{H}_7\text{O}_2)_3\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2$ 、 $\text{Eu}(\alpha\text{-C}_{12}\text{H}_9\text{O}_2)_3\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2$ 、 $\text{Tb}(\alpha\text{-C}_{12}\text{H}_9\text{O}_2)_3\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2$ 、
 $\text{Gd}(\alpha\text{-C}_{12}\text{H}_9\text{O}_2)_3\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2$ 、 $\text{La}(\alpha\text{-C}_{12}\text{H}_9\text{O}_2)_3\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2$ 、 $\text{Y}(\alpha\text{-C}_{12}\text{H}_9\text{O}_2)_3\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2$ 、
 $\text{Eu}(\beta\text{-C}_{12}\text{H}_9\text{O}_2)_3\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2$ 、 $\text{Tb}(\beta\text{-C}_{12}\text{H}_9\text{O}_2)_3\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2$ 、 $\text{Gd}(\beta\text{-C}_{12}\text{H}_9\text{O}_2)_3\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$ 、
 $\text{La}(\beta\text{-C}_{12}\text{H}_9\text{O}_2)_3\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2$ 、 $\text{Y}(\beta\text{-C}_{12}\text{H}_9\text{O}_2)_3\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2$ 。共 19 种。

稀土配合物抑菌实验

(1) 比较稀土配合物、配体、稀土离子的抑菌效果

用滤纸片法对典型的真菌进行抑菌实验：将活化好的菌接种于液体培养基中，30℃培养 16~18h（约 10^9 个/ml）；取 YPD 酵母膏胨葡萄糖琼脂培养基（Yeast Peptone Dextrose Agar）培养基融化后冷却至 48~50℃，每 20ml 加入 500 μ l 菌液迅速摇匀，倒板，贴滤纸片在平板上，每个滤纸片加 20 μ l 待测溶液；置于 30℃恒温生化培养箱培养 2~3d；并做三组平行实验，观察结果，统计数据，计算平均值；

(2) 测定配合物对酵母菌的浓度效应，配制浓度梯度药品，同样采用滤纸片法进行测定；

(3) 用钼酸-戊二醛双固定法固定菌体，通过扫描电镜观察配合物对菌体的作用。结果显示药品对其细胞壁有破坏作用，而且配合物的抑制酵母菌作用有浓度剂量效应。

本发明取得的有益效果是：本发明给出的稀土配合物合成方法简单；经对合成的稀土配位化合物进行抑菌测定，证明稀土配合物对酵母菌有显著抑制效果，比单纯的离子、配体抑菌效果显著。

附图说明

图 1 给出的是酵母菌的扫描电镜照片。

图 2 给出的是用稀土离子 Eu 处理以后酵母菌的扫描电镜照片。

图3给出的是用1,10-邻菲啰啉处理以后酵母菌的扫描电镜照片。

图4给出的是用 $\text{Eu}(\alpha\text{-NMA})_3\text{phen}\cdot\text{H}_2\text{O}$ 处理以后酵母菌的扫描电镜照片。

具体实施方式

以下实施例用于说明本发明。

实施例1 稀土配合物的合成

本发明提供的稀土配合物的结构式为： $\text{RE L}_3\text{phen}\cdot n\text{H}_2\text{O}$;

其中 RE: 可以是稀土元素中 Eu^{3+} 、 Tb^{3+} 、 Gd^{3+} 、 La^{3+} 、 Y^{3+} 的任何一种;
 $n=0$ 或 1;

L 为第一配体: 可用 α -Naphthoic acid, β -Naphthoic acid, α -Naphthlactic acid, β -Naphthlactic acid 四种萘酸中的一种, 四种萘酸的中文名称分别为 α -萘甲酸、 β -萘甲酸、 α -萘乙酸、 β -萘乙酸;

Phen 为第二配体: Phen 是 1,10-邻菲啰啉(1,10-phenanthroline) 的缩写, 化学式为 $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2$; 一共是 19 种配合物, 稀土配合物的组成和化学式由下表列出:

表一: 合成的稀土配合物的组成和化学式列表

序号	稀土配合物的组成	化学式
1	$\text{Eu}(\alpha\text{-NMA})_3\text{phen}\cdot\text{H}_2\text{O}$	$\text{Eu}(\alpha\text{-C}_{11}\text{H}_7\text{O}_2)_3\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$
2	$\text{Eu}(\beta\text{-NMA})_3\text{phen}$	$\text{Eu}(\beta\text{-C}_{11}\text{H}_7\text{O}_2)_3\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2$
3	$\text{Eu}(\alpha\text{-NAA})_3\text{phen}$	$\text{Eu}(\alpha\text{-C}_{12}\text{H}_9\text{O}_2)_3\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2$
4	$\text{Eu}(\beta\text{-NAA})_3\text{phen}$	$\text{Eu}(\beta\text{-C}_{12}\text{H}_9\text{O}_2)_3\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2$
5	$\text{Tb}(\alpha\text{-NMA})_3\text{phen}\cdot\text{H}_2\text{O}$	$\text{Tb}(\alpha\text{-C}_{11}\text{H}_7\text{O}_2)_3\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$
6	$\text{Tb}(\beta\text{-NMA})_3\text{phen}$	$\text{Tb}(\beta\text{-C}_{11}\text{H}_7\text{O}_2)_3\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2$
7	$\text{Tb}(\alpha\text{-NAA})_3\text{phen}$	$\text{Tb}(\alpha\text{-C}_{12}\text{H}_9\text{O}_2)_3\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2$
8	$\text{Tb}(\beta\text{-NAA})_3\text{phen}$	$\text{Tb}(\beta\text{-C}_{12}\text{H}_9\text{O}_2)_3\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2$
9	$\text{Gd}(\alpha\text{-NMA})_3\text{phen}\cdot\text{H}_2\text{O}$	$\text{Gd}(\alpha\text{-C}_{11}\text{H}_7\text{O}_2)_3\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$
10	$\text{Gd}(\beta\text{-NMA})_3\text{phen}$	$\text{Gd}(\beta\text{-C}_{11}\text{H}_7\text{O}_2)_3\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2$
11	$\text{Gd}(\alpha\text{-NAA})_3\text{phen}$	$\text{Gd}(\alpha\text{-C}_{12}\text{H}_9\text{O}_2)_3\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2$
12	$\text{Gd}(\beta\text{-NAA})_3\text{phen}\cdot\text{H}_2\text{O}$	$\text{Gd}(\beta\text{-C}_{12}\text{H}_9\text{O}_2)_3\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$
13	$\text{La}(\alpha\text{-NMA})_3\text{phen}$	$\text{La}(\alpha\text{-C}_{11}\text{H}_7\text{O}_2)_3\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2$
14	$\text{La}(\alpha\text{-NAA})_3\text{phen}$	$\text{La}(\alpha\text{-C}_{12}\text{H}_9\text{O}_2)_3\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2$
15	$\text{La}(\beta\text{-NAA})_3\text{phen}$	$\text{La}(\beta\text{-C}_{12}\text{H}_9\text{O}_2)_3\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2$
16	$\text{Y}(\alpha\text{-NMA})_3\text{phen}$	$\text{Y}(\alpha\text{-C}_{11}\text{H}_7\text{O}_2)_3\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2$
17	$\text{Y}(\beta\text{-NMA})_3\text{phen}$	$\text{Y}(\beta\text{-C}_{11}\text{H}_7\text{O}_2)_3\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2$
18	$\text{Y}(\alpha\text{-NAA})_3\text{phen}$	$\text{Y}(\alpha\text{-C}_{12}\text{H}_9\text{O}_2)_3\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2$
19	$\text{Y}(\beta\text{-NAA})_3\text{phen}$	$\text{Y}(\beta\text{-C}_{12}\text{H}_9\text{O}_2)_3\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2$

稀土配合物的合成步骤如下：

(1) 稀土氯化物的制备：准备五个烧杯做好标记，依次加入 Eu_2O_3 、 Tb_4O_7 、 Gd_2O_3 、 La_2O_3 、 Y_2O_3 。稀土氧化物的纯度均为 99.99%。然后都加入浓盐酸；蒸发水分，浓缩结晶；分别制得氯化稀土 $\text{EuCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{TbCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{GdCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{LaCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{YCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ，备用；

(2) 以 α -萘甲酸为第一配体，1,10-邻菲啰啉为第二配体，稀土氯化物按照 $\text{RECl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}:\alpha\text{-萘甲酸:phen}=1:3:1$ 的物质的量的比分别称取；取五个烧杯标号 1, 2, 3, 4, 5，将称取的稀土氯化物 $\text{EuCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{TbCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{GdCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{LaCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{YCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ，依次放入五个烧杯中。再取两个烧杯标号 6, 7 分别称取 α -萘甲酸、1,10-邻菲啰啉；7 个烧杯的药品都分别用适量 95% 的乙醇溶解；

(3) 将两种配体溶液混合，在电磁搅拌情况下用 $1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}\text{NaOH}$ 溶液调节配体混合溶液 pH 值至 6~7；然后将配体溶液分别逐滴加入到以上五个烧杯的稀土氯化物溶液中，期间有白色沉淀生成，搅拌反应 3~5h。

(4) 将混合物静置 12h，抽滤，用 95% 的乙醇洗涤 3 次，在红外干燥箱中烘干，得到以 α -萘甲酸和 1, 10-邻菲啰啉为配体的五种配合物；1 号烧杯得到 $\text{Eu}(\alpha\text{-NMA})_3\text{phen} \cdot \text{H}_2\text{O}$ ；2 号烧杯得到 $\text{Gd}(\alpha\text{-NMA})_3\text{phen} \cdot \text{H}_2\text{O}$ ；3 号烧杯得到 $\text{Tb}(\alpha\text{-NMA})_3\text{phen} \cdot \text{H}_2\text{O}$ ；4 号烧杯得到 $\text{La}(\alpha\text{-NMA})_3\text{phen}$ ；5 号烧杯得到 $\text{Y}(\alpha\text{-NMA})_3\text{phen}$ ；

(5) 以另外三种萘酸配合物为配体的配合物的合成方法与 α -萘甲酸、1,10-邻菲啰啉稀土配合物的合成方法相同。第二配体不变，第一配体 α -萘甲酸分别用 β -萘甲酸、 α -萘乙酸、 β -萘乙酸替换即可。

实施例 2 配体，DMF (N,N-二甲基甲酰胺)，稀土离子，稀土配合物抑菌性的比较

以 DMF 为溶剂，配制 0.012mol/L 的 1,10-邻菲啰啉、四种萘酸、 EuCl_3 、 TbCl_3 、 GdCl_3 、 LaCl_3 、 YCl_3 以及 $\text{Eu}(\alpha\text{-NMA})_3\text{phen} \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{Tb}(\alpha\text{-NMA})_3\text{phen} \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{Gd}(\alpha\text{-NMA})_3\text{phen} \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{La}(\alpha\text{-NMA})_3\text{phen}$ 、 $\text{Y}(\alpha\text{-NMA})_3\text{phen}$ 、 $\text{Eu}(\beta\text{-NMA})_3\text{phen}$ 、 $\text{Tb}(\beta\text{-NMA})_3\text{phen}$ 、 $\text{Gd}(\beta\text{-NMA})_3\text{phen}$ 、 $\text{Y}(\beta\text{-NMA})_3\text{phen}$ 、 $\text{Eu}(\alpha\text{-NAA})_3\text{phen}$ 、

Tb(α -NAA)₃phen、Gd(α -NAA)₃phen、La(α -NAA)₃phen、Y(α -NAA)₃phen、Eu(β -NAA)₃phen、Tb(β -NAA)₃phen、Gd(β -NAA)₃phen·H₂O、La(β -NAA)₃phen、Y(β -NAA)₃phen 溶液。用滤纸片法 (d=0.6cm) 比较配体、DMF、稀土离子、配合物对酵母菌生长的影响。

配制 YPD(酵母膏胨葡萄糖培养基, 英文名 Yeast Peptone Dextrose)培养基, 1000mL(蛋白胨 20g 酵母粉 10g)定溶至 950mL 调 PH=6.5 灭菌 121℃ 20min。液体培养基冷却后加入 40%灭过菌的葡萄糖 50ml。固体培养基用时再加葡萄糖。选取酵母菌保藏菌种, 活化 3~4 次, 得到活性较好的菌。

将活化好的菌接种于 YPD(酵母膏胨葡萄糖培养基, 英文名 Yeast Peptone Dextrose)液体培养基中, 30℃ 180rpm 摇培 16~18h (约 10⁹ 个/ml)。取 YPD 酵母膏胨葡萄糖琼脂培养基(Yeast Peptone Dextrose Agar)融化后冷却至 48~50℃, 加入灭过菌的 40%葡萄糖 (950mL/ 50mL) 摇匀。然后每 20ml 加入 500 μ l 菌液迅速摇匀, 倒板, 贴滤纸片在平板上, 每个滤纸片加 20 μ l 待测溶液。置于 30℃恒温生化培养箱培养 2~3d。并做三组平行实验, 观察结果, 统计数据, 计算平均值。

实验结果表明: 配合物有显著抑菌效果, 对照有机溶剂 DMF (N,N-二甲基甲酰胺)、 α -NMA 等羧酸配体没有抑菌性。稀土离子有弱抑菌性, Phen 抑菌性没有配合物抑菌效果显著。

实施例 3 药品浓度对酵母菌生长影响的测定

采用滤纸片法(d=0.6cm)进行定量抑菌实验: 配制浓度梯度 (0.004mol/L、0.008mol/L、0.01mol/L、0.012mol/L) 的各种配合物, 将有同种药品不同浓度的滤纸片贴在同一平皿上观察药品浓度对真菌生长的影响。

培养基的配制与实例 2 相同。选取酵母菌保藏菌种, 活化 3~4 次, 得到活性较好的菌。将活化好的菌接种于液体培养基中, 30℃ 180rpm 培养 18h (约 10⁹ 个/ml)。取 YPD 酵母膏胨葡萄糖琼脂培养基(Yeast Peptone Dextrose Agar)培养基融化后冷却至 48~50℃, 每 20ml 加入 500 μ l 菌液迅速摇匀, 倒板, 贴滤纸片在平板上, 每个滤纸片点加 20 μ l 待测溶液。置于 30℃恒温生化培养箱培养 2~3d。观察结果。做三组平行实验, 并统计结果, 计算平均值。

实验结果表明：稀土配合物的浓度与其对酵母菌的抑制作用成正比关系，药品浓度越大对酵母菌的抑制性越显著。

表 2 奈甲酸稀土配合物对酵母菌的抑菌圈直径列表

药品/浓度	0.004mol/l	0.008mol/l	0.010mol/l	0.012mol/l
Eu(α -NMA) ₃ phen·H ₂ O	2.30	2.50	2.80	2.80
Gd(α -NMA) ₃ phen·H ₂ O	1.70	1.90	2.00	2.20
Tb(α -NMA) ₃ phen·H ₂ O	1.80	2.00	2.20	2.30
La(α -NMA) ₃ phen	1.60	1.80	1.90	2.10
Y(α -NMA) ₃ phen	1.70	1.90	2.10	2.50
Eu(β -NMA) ₃ phen	1.90	2.20	2.40	2.60
Gd(β -NMA) ₃ phen	2.40	2.65	2.70	2.80
Tb(β -NMA) ₃ phen	2.30	2.50	2.60	2.80
Y(β -NMA) ₃ phen	1.60	1.70	2.00	2.20
Eu(α -NAA) ₃ phen	1.80	2.00	2.30	2.40
Gd(α -NAA) ₃ phen	1.60	1.90	2.20	2.30
Tb(α -NAA) ₃ phen	2.00	2.30	2.40	2.70
La(α -NAA) ₃ phen	2.20	2.50	2.70	2.90
Y(α -NAA) ₃ phen	2.30	2.70	2.80	3.00
Eu(β -NAA) ₃ phen	1.30	2.00	2.20	2.30
Gd(β -NAA) ₃ phen·H ₂ O	1.70	1.80	1.90	2.00
Tb(β -NAA) ₃ phen	1.30	1.50	2.00	2.00
La(β -NAA) ₃ phen	1.65	1.85	2.00	2.10
Y(β -NAA) ₃ phen	1.50	1.60	1.90	2.10

实施例 4 扫描电镜观察

本实验采用钨酸—戊二醛双重固定法进行电镜样品的制备。

(1) 取培养好的新鲜菌悬液各 1000 μ L 装入 1.5ml EP 管，分三组。并加一管做对照。

(2) 取上述其中三管菌液离心，弃上清，各组分别加 EuCl₃·6H₂O、Phen、Eu(α -NMA)₃phen·H₂O 500 μ l 进行处理。

(3) 将处理好的菌株及其对照离心，弃上清，用制备好的磷酸缓冲液清洗 3 次（清洗时轻轻吹吸，离心，弃上清）。

(4) 加戊二醛 400 μ l 固定 2~3h，再用磷酸缓冲液清洗 3 次（方法同 3）。

(5) 换用钨酸固定 0.5~1h，磷酸缓冲液清洗 3 次（同上）。

(6) 乙醇梯度脱水，取梯度 30%，50%，70%，90%，100%（100%两次）。

(7) 叔丁醇置换两次，将叔丁醇处理好悬浊液适量均匀涂在事先裁好的盖玻片上，一起固定在载物台上。

(8) 抽真空干燥, 彻底干燥的样品经离子溅射仪溅射 4 分钟, 进行电镜观察。

结果分析: 在照片中可以看到未处理过的酵母菌表面光滑, 用 Phen 配体处理后菌体表面没有可见的变化。用离子处理后菌体表面有少量的沉积物, 配合物处理后的酵母菌菌体表面有大量的沉积物。这可能与配合物的较好脂溶性有关。

稀土元素及其配合物对菌体细胞形态有不同程度的破坏, 较之单纯的稀土盐离子或相应的配体, 稀土配合物对菌体细胞形态破坏作用尤其明显, 从 SEM 图片上可以看出, 配合物使菌体粘连, 并大量沉积在菌体表面, 破坏细胞壁, 使细胞壁变形, 菌体死亡。认为配合物的抗菌性可能是由于配合物脂溶性较好, 易于和细胞壁上 $C=O$ 、 $P=O$ 结合, 浓度较大时, 细胞壁通透性被破坏, 不再是菌体完整的屏障。配合物进入细胞影响胞内酶的活性, 影响 DNA 的复制。

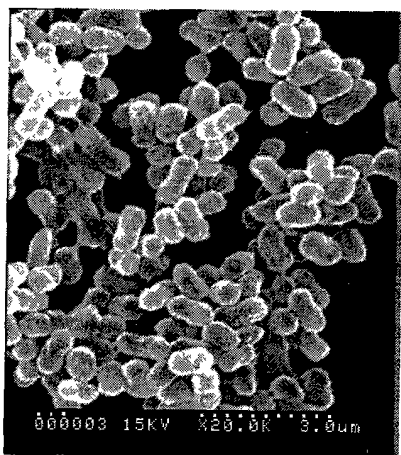


图 1

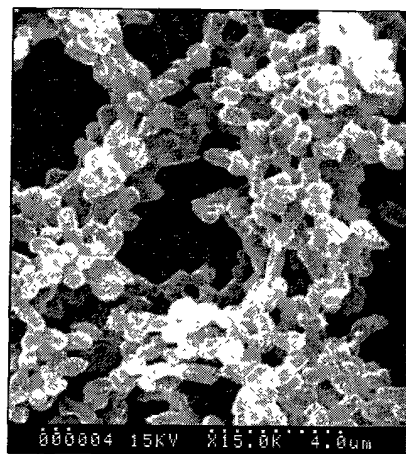


图 2

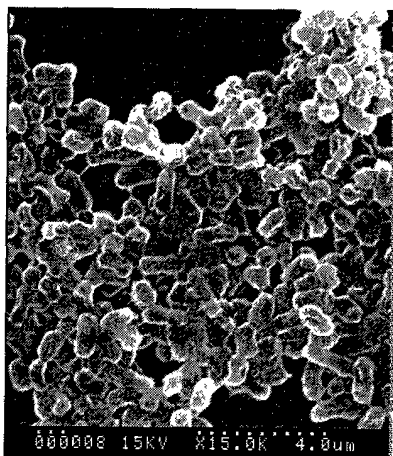


图 3

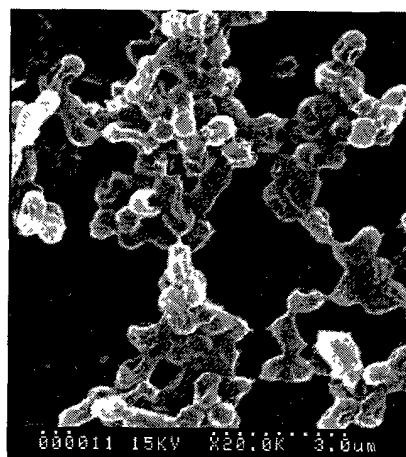


图 4