二茂铁-肽 Fc-Gly-Pro-Arg(NO₂)-OMe 的合成及其与 Cu(II)作用

刘晓芳 李学强 叶武龙 周彬彬 刘又年*

(中南大学化学化工学院, 长沙 410083)

摘要: 以二茂铁甲酸、甘氨酸(H-Gly-OMe)、脯氨酸(Boc-Pro-OH)、精氨酸(H-Arg(NO₂)-OMe)等为原料, 苯并三唑-1-四甲基六磷酸酯(HBTU)和 1-羟基苯并三唑(HOBT)为缩合剂, 采用液相法合成了二茂铁-肽 Fc-Gly-Pro-Arg(NO₂)-OMe (简称 Fc-GPR), 其总收率为 48.1%。并对目标产物进行了红外(IR)光谱、核磁共振氢谱(¹H-NMR)、质谱(ESI-MS)等表征。通过电化学方法研究了目标产物与 Cu(II)之间的相互作用。结果表明: 目标产物在溶液中的电化学行为表现为可逆氧化还原反应, 氧化和还原峰电位分别为 0.624 和 0.552 V(*vs* Ag/AgCl), 氧化和还原峰电流之比 I_{pa}/I_{pc} 为 1.13, 电极反应过程为扩散控制。目标产物与 Cu(II)形成配位比为 2:1 的配合物。Fc-GPR 与 Cu(II)的电极反应过程符合电化学-化学-电化学(ECE)历程。

关键词: 二茂铁-肽; 液相合成; Gly-Pro-Arg; 电化学-化学-电化学历程; 铜离子

中图分类号: O641

Synthesis of Ferrocenoyl-Labeled Tripeptide Fc-Gly-Pro-Arg(NO₂)-OMe and Its Interaction with Cu(II)

LIU Xiao-Fang LI Xue-Qiang YE Wu-Long ZHOU Bin-Bin LIU You-Nian*

(College of Chemistry and Chemical Engineering, Central South University, Changsha 410083, P. R. China)

Abstract: *N*-ferrocenoyl-labeled tripeptide Fc-Gly-Pro-Arg(NO₂)-OMe(Fc-GPR) was synthesized from ferrocene-carboxylic acid, glycine (H-Gly-OMe), proline (Boc-Pro-OH) and arginine (H-Arg(NO₂)-OMe) by solution synthesis with a yield of 48.1%. The synthesized Fc-GPR was characterized by infrared spectroscopy (IR), proton nuclear magnetic resonance spectroscopy (¹H-NMR) and electrospray ionization mass spectroscopy (ESI-MS). The electrochemical behavior of Fc-GPR was investigated using electrochemical methods. We observed a pair of well-defined voltammetric peaks with cathodic E_{pc} and anodic peak potentials E_{pa} , at 0.552 and 0.624 V (*vs* Ag/AgCl), respectively. The ratio of oxidative to reductive peak current is 1.13 and the peak currents were found to be proportional to the square root of the scan rates suggesting that Fc-GPR undergoes a reversible electron transfer reaction. The molar ratio of Fc-GPR to Cu(II) was found to be 2:1 by the molar ratio method. Furthermore, the electrode reaction of Fc-GPR with Cu(II) is an electrochemical-chemical-electrochemical (ECE) process.

Key Words: Ferrocene-peptide; Solution synthesis; Gly-Pro-Arg; Electrochemical-chemical-electrochemical process; Cu(II)

二茂铁是一种具有一定厚度的夹心结构和芳香性的富电子体系, 热稳定性好, 电化学氧化还原可逆且易受环境影响。目前二茂铁衍生物的研究越来越引起科学家的兴趣。它具有良好的亲脂性, 能顺利通

过细胞膜, 从而与细胞内的各种酶、DNA 等物质作用, 它的低毒性、稳定性使其广泛应用于药物研究。例如在青霉素和先锋霉素中引入二茂铁基时可使抗菌活性提高^[1]。此外, 二茂铁衍生物及其配合物具有

Received: March 9, 2010; Revised: April 18, 2010; Published on Web: June 25, 2010.

*Corresponding author. Email: liuyoun@mail.csu.edu.cn; Tel: +86-731-88836964.

The project was supported by the National Natural Science Foundation of China (20876179).

国家自然科学基金(20876179)资助项目

抗癌^[2-3]、抗疟疾^[4]、抗炎等生物活性;二茂铁还可标记 DNA 和多肽^[5-6]作为电化学探针,应用于特定序列 DNA 片段和蛋白的识别和检测等^[7-8]。

Gly-Pro-Arg (GPR)寡肽是一种能够抑制由 β -淀粉样蛋白(β -amyloid peptide, 简称 A β)导致的神经元细胞毒性的活性肽^[9],它能减少 A β 对海马神经元的损伤;此外, Furlan 等^[10-11]发现 GPR 可以抑制纤维蛋白原的聚集,从而阻止纤维蛋白的形成。但是, GPR 对 A β 的抑制机理尚不明确。生物电化学方法具有快速、灵敏、简单的优点,但 GPR 不具有电化学活性,因此,可以将 Fc-GPR 作为电化学探针来研究 GPR 抑制阿尔默海次病(Alzheimer's disease, 简称 AD 病)的治疗机理。此外,引入疏水性二茂铁基团,可以增加寡肽的稳定性和脂溶性,使其能够顺利地透过血脑屏障而到达给药靶点。

铜是一些酶的重要组成部分,在人体大脑新陈代谢中起着重要的作用,铜离子参与了许多生化反应过程,但是体内过高的 Cu(II)浓度能产生毒性^[12],如改变细胞内的氧化还原状态,与某些氨基酸残基的侧链发生非特异的反应,导致蛋白质的错误折叠。有文献报道^[13-14]铜积累可促进阿尔默海次病患者脑中 A β 聚集而导致老年斑的形成: A β 可以结合 Cu(II),引起氧化损伤^[15],导致细胞死亡,这可能是引发 AD 病的原因之一。此外, Freedman 等^[16-18]利用电子顺磁共振(EPR),单晶 X 射线衍射分析等方法研究了 Cu(II) 与短肽分子的配位应用。如在中性条件下,三肽 Gly-His-Lys (GHK)与 Cu(II)形成 1:1 的络合物,该络合物具有生物活性,可用于治疗伤口和皮肤的损伤。

多肽分子与金属离子配位作用的研究方法主要有:单晶 X 射线衍射分析、圆二色(CD)谱、EPR、

NMR、MS 等。但是多肽作为配体与金属离子的络合物不易得到单晶,难以用单晶 X 射线衍射分析。另外, CD、EPR、NMR 和 MS 等方法又存在操作繁琐、仪器昂贵等不足,而电化学方法具有快速、简单、灵敏的特点。将具有电化学活性的二茂铁基引入到多肽中,可以通过电化学方法研究多肽与金属离子的配位和电化学反应机理。在本文中,采用液相合成法合成二茂铁-肽 Fc-GPR,利用电化学方法研究该化合物与 Cu(II)作用,并对其机理进行探讨。

1 实验

1.1 主要仪器与试剂

AVATAR360 傅里叶变换红外光谱仪(美国 Nicolet 公司), INOVA400 核磁共振仪(美国 Varian 公司), LCQ Advantage 离子阱质谱仪(美国菲尼根公司), CHI440 电化学工作站(上海辰华仪器有限公司)。

H-Gly-OMe, Boc-Pro-OH, H-Arg(NO₂)-OMe 均为分析纯且购自吉尔生化(上海)有限公司;二茂铁甲酸、苯并三唑-1-四甲基六磷酸酯(HBTU)、1-羟基苯并三唑(HOBT)均为分析纯,购自上海生工生物工程技术有限公司; CuCl₂·2H₂O 和四丁基高氯酸胺(TBAP)为色谱纯,购自美国 Alfa Aesar 公司;二氯甲烷经氢化钙干燥重蒸,甲醇为色谱纯,其它试剂均为分析纯,所有水均为二次蒸馏水。

1.2 目标产物合成

用参考文献[19-21]报道的合成二茂铁-多肽方法合成目标产物,以二茂铁甲酸为原料, HBTU/HOBT 为缩合剂,采用液相合成的方法得到二茂铁-三肽化合物: Fc-Gly-Pro-Arg(NO₂)-OMe。其合成路线如图 1 所示。

图 1 Fc-Gly-Pro-Arg(NO₂)-OMe(Fc-GPR)的合成

Fig.1 Synthesis of ferrocenoyl-labeled Fc-Gly-Pro-Arg(NO₂)-OMe (Fc-GPR)

i) *N*-hydroxybenzotriazole (HOBT)/*o*-benzotriazol-1-yl-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium hexafluorophosphate (HBTU), Et₃N, CH₂Cl₂;
ii) NaOH; iii) HCl, CH₃COOCH₂CH₃

1.2.1 H-Pro-Arg(NO₂)-OMe (2)的合成

称取 Boc-Pro-OH(4.0 mmol, 0.86 g)溶于无水 CH₂Cl₂, 于 0 °C 下缓慢滴入 1.5 mL Et₃N, 并依次加入 HBTU(4.4 mmol, 1.52 g), HOBT(4.4 mmol, 0.60 g), 反应 1 h 后, 加入 H-Arg(NO₂)-OMe(4.0 mmol, 1.08 g), 0 °C 恒温反应 1 h, 移入室温反应, 用薄层色谱法(TLC)检测反应进程. 待反应完全, 依次用 10%盐酸, 饱和 NaHCO₃ 溶液和蒸馏水洗涤; 有机相用无水硫酸钠脱水, 真空干燥即得粗产物 1.59 g, 产率为 85%.

将化合物 Boc-Pro-Arg(NO₂)-OMe 溶于无水乙酸乙酯, 0 °C 下缓慢通入干燥的 HCl 气体搅拌反应 1 h, 移入室温反应 1 h 后, 真空干燥, 除去过量 HCl 气体, 得产物 H-Pro-Arg(NO₂)-OMe (2).

1.2.2 二茂铁-甘氨酸及目标产物(Fc-GPR)的合成

(1) 化合物 Fc-Gly-OH (4)的合成

称取化合物 3 (5.65 mmol, 1.3 g)溶于无水 CH₂Cl₂, 冰浴下搅拌缓慢滴加 2.0 mL Et₃N, 再依次加入 HBTU (6.19 mmol, 2.4 g), HOBT(6.19 mmol, 0.84 g), 反应 1 h 后, 加入 H-Gly-OMe(8.02 mmol, 1.00 g), 0 °C 恒温反应 1 h; 移入室温反应, 用 TLC 检测反应. 待反应完全, 依次用 10%盐酸, 饱和 NaHCO₃ 溶液, 蒸馏水洗涤; 有机相用无水硫酸钠干燥, 过滤, 真空干燥, 柱层析法纯化[展开剂 V(CH₂Cl₂):V(CH₃COOC₂H₅):V(CH₃OH)=2:1], 即可得化合物 Fc-GlyOMe 1.56 g.

将 1.56 g Fc-GlyOMe 溶于 50 mL 四氢呋喃, 用少量的蒸馏水溶解 0.18 g NaOH, 加入反应液中冰浴下反应 0.5 h, 移入室温下反应 12 h; 反应结束后将反应液蒸干, 加水 50 mL, 用乙酸乙酯洗三次, 取水相用体积比为 1:1 的 HCl 调节 pH 为 1-2, 再用乙酸乙酯洗三次, 取油相, 无水硫酸钠干燥, 抽滤蒸干后即得产物(4)1.04 g, 产率为 78%.

(2) Fc-Gly-Pro-Arg(NO₂)-OMe 的合成

称取二茂铁-甘氨酸(3.614 mmol, 1.04 g)溶于无水 CH₂Cl₂, 0 °C 下缓慢滴入 1.5 mL Et₃N, 依次加入 HBTU(3.975 mmol, 1.51 g), HOBT(3.975 mmol, 0.54 g), 反应 1 h 后, 加入化合物 4 (3.4 mmol, 1.45 g), 0 °C 恒温反应 1 h, 移入室温反应, 用 TLC 检测反应进程. 待反应完全, 依次用 10%盐酸、饱和 NaHCO₃ 溶液、蒸馏水洗涤, 有机相用无水硫酸钠干燥, 过滤, 真空干燥即可得粗产物 1.73 g. 用柱层析法[展开剂的体积比为 V(CH₂Cl₂):V(CH₃COOC₂H₅):V(CH₃OH)=90:30:5, R_f=0.37]进行纯化, 真空干燥, 得到产物 1.60 g.

总收率为 48.1%. IR (cm⁻¹): 1105, 824 cm⁻¹ (ν(Fc)); 1740 cm⁻¹ (ν(C=O)); 3307 cm⁻¹ (ν(N—H)); 1438 cm⁻¹ (ν(C—N)); 1539 cm⁻¹ (δ(N—H)); 1629 cm⁻¹ (ν(C=N Arg)). ¹H-NMR (CDCl₃, δ): 8.206(s, H, HNCO, Arg), 7.38(s, H, H—N, Gly), 7.021(s, H, NHC=NH, Arg), 4.627(quint, H, CH, Arg), 4.398(s, 2H, H-2', H-5', Fc), 4.351(s, 2H, H-3', H-4', Fc), 4.215(s, 2H, Gly), 3.792(s, 3H, OCH₃, Arg), 3.241(s, 5H, Fc_{unsubst}). ESI-MS, m/z: 622.6[M+Na]⁺.

1.2.3 Boc-Gly-Pro-Arg(NO₂)-OMe 的合成

称取 Boc-Gly-OH (4.0 mmol, 0.69 g) 溶于无水 CH₂Cl₂, 0 °C 下缓慢滴入 1.5 mL Et₃N, 依次加入 HBTU (4.4 mmol, 1.52 g), HOBT(4.4 mmol, 0.6 g), 反应 1 h 后, 加入化合物 2(3.0 mmol, 1.40 g), 0 °C 恒温反应 1 h, 移入室温反应, 用 TLC 检测反应 [展开剂体积之比 V(CH₂Cl₂):V(CH₃COOC₂H₅):V(CH₃OH)=90:30:3], 待反应完全. 依次用 10%盐酸、饱和 NaHCO₃ 溶液、蒸馏水洗涤, 有机相用无水硫酸钠干燥, 过滤, 真空干燥即可得粗产物 1.73 g. 用柱层析法对粗产物进行纯化, 展开剂体积之比为 V(CH₂Cl₂):V(CH₃COOC₂H₅):V(CH₃OH)=90:30:5, R_f=0.42. 真空干燥, 得到产物(GPR)1.60 g. 总收率为 56.1%(对 Boc-Gly-OH). FT-IR(KBr, cm⁻¹): 742 cm⁻¹ (ν(C=O, —COOCH₃)); 3309 cm⁻¹ (ν(N—H)); 1453 cm⁻¹ (ν(C—N)); 1537 cm⁻¹ (δ(N—H)); 1644 cm⁻¹ (ν(C=N)), 1255 (ν(NO₂)). ¹H-NMR (CDCl₃, δ): 8.420 (s, 1H, HNCO, Arg), 7.762 (s, H—N, Gly), 7.211, 6.13 (s, 1H, NHC=NH, Arg), 7.271 (s, 1H, CDCl₃), 4.625 (sxt, 2H, CH, Arg), 3.767 (s, 3H, OCH₃, Arg), 3.357, 3.251 (s, 2H, CH₂, Pro), 3.523, 3.492 (s, 2H, CH₂, Gly), 1.435 (s, 9H, Boc).

1.2.4 电化学实验

将配好的 4 mmol·L⁻¹ 的 Fc-GPR 溶液中移取 0.75 mL 加入 10 mL 的培养皿中, 再用移液管移取不同配比的 CuCl₂ 的甲醇溶液, 摇匀反应过夜. 12 h 后用移液管加入 0.3 mL 配好的 1 mol·L⁻¹ 的 TBAP 溶液作为支持电解质, 再加入一定量的甲醇, 使得测量体系的溶剂的总体积为 6 mL, 轻微晃动至均匀, 避光静置过夜, 室温下进行电化学测试, 以玻碳电极为工作电极, Ag/AgCl 电极为参比电极, 铂丝(Pt)电极为对电极, 支持电解质为 0.05 mol·L⁻¹ 的 TBAP, 扫描速率为 100 mV·s⁻¹, 每次测定前电解池通入 10 min 氮气除氧.

2 结果与讨论

2.1 化合物的表征

二茂铁基团上的质子化学位移一般在 4–5 之间, 目标化合物在化学位移 4.351–4.40 之间出现被取代的环戊二烯环上的 4 个质子峰, 3.24 出现另外一个茂环上的 5 个质子峰. 4.627 可指认为精氨酸次甲基上的 1 个质子峰, 化学位移为 7.02 的峰可指认为精氨酸胍基上的质子峰, 胍基上的另外两个质子峰未能观察到, 可能是胍基上的两个质子与硝基形成六元环的分子内氢键, 而化学位移 7.38 的单峰可指认为二茂铁甲酸与甘氨酸所结合酰氨键上氨基的质子峰, 化学位移为 8.21 的单峰可指认为精氨酸酰胺键上的 1 个质子峰. 亚甲基的化学位移一般在 2–4 之间出现.

2.2 电化学性质

通过循环伏安(CV)方法对目标产物 Fc-GPR 进行电化学性能测试, 结果如图 2 所示. 当扫描速率为 $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ 时, 在 0.4–0.8 V 范围内出现了一对可逆性较好的氧化还原峰, 氧化峰和还原峰电位分别为 0.624 和 0.552 V, 峰电位差为 $\Delta E_p = 72 \text{ mV}$, 峰电流之比 $i_{pa}/i_{pc} = 1.13$, 表明 Fc-GPR 在溶液中的良好的电子传递能力. 当改变扫描速率, 发现其峰电流随扫描速率的增加而增加, 且峰电流和扫描速率的平方根成正比比例关系, 说明该电极反应步骤受扩散控制.

2.3 目标产物与铜离子络合的电化学性质

根据经典的测定络合物配比的摩尔比列法^[22], 即通过固定溶液中 Fc-GPR 的浓度, 改变 Cu(II) 的浓度, 根据二茂铁阳极峰电流发生改变的情况计算出 Cu(II) 与 Fc-GPR 的配位比. 如图 3 所示, 曲线转折点 m 对应的摩尔浓度比 $c(\text{Fc-GPR})/c(\text{Cu}^{2+}) = 2:1$, 即

图 2 Fc-GPR 的循环伏安图

Fig.2 Cyclic voltammogram of Fc-GPR
scan rate: $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$

Fc-GPR 与 Cu(II) 形成配合物 $[\text{Cu}(\text{Fc-GPR})_2]\text{Cl}_2$.

由图 4 可知: 当 $c(\text{Fc-GPR})/c(\text{Cu}^{2+}) = 1:2$ 时, 电对 Cu(II)/Cu(I) 的峰电位差随着扫描速率的增加而增大, 表明 Cu(I) 离子在配位环境中比游离的 Cu(I) 能够更稳定地存在, 主要是因为 Cu(I) 离子在配位环境

图 3 Fc-GPR 与 Cu(II) 作用的微分脉冲伏安(DPV)图(A)及阳极峰电流 i_{pa} 与 $c(\text{Fc-GPR})/c(\text{Cu}^{2+})$ 比值关系(B)
Fig.3 Differential pulse voltammograms on carbon electrode of Fc-GPR ($0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) in the present of Cu^{2+} (A) and the anodic peak current (i_{pa}) vs the $c(\text{Fc-GPR})/c(\text{Cu}^{2+})$ (B)

$c(\text{Cu}^{2+})/(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$: a) 0.17, b) 0.25, c) 0.5, d) 1.0, e) 1.5

图 4 当 $c(\text{Fc-GPR})/c(\text{Cu}^{2+}) = 1:2$ 时不同扫描速率下的峰电位差的变化图

Fig.4 Relationship of peak potential with the scan rate under $c(\text{Fc-GPR})/c(\text{Cu}^{2+}) = 1:2$

图5 0.5 mmol·L⁻¹ Fc-GPR 与 0.5 mmol·L⁻¹ Cu²⁺溶液的循环伏安(CV)图

Fig.5 Cyclic voltammogram of Fc-GPR (0.5 mmol·L⁻¹) with Cu²⁺ (0.5 mmol·L⁻¹)

中的电化学过程发生了重排,则相对较高的还原电位表明 Cu(I)在 FcGPR 的配位作用下更稳定^[23].

2.4 ECE 耦合反应机理

如图 5 所示目标产物(Fc-GPR)与 Cu(II)的作用是一个单电子两步反应,根据 ECE^[24-27]反应机理,其电化学过程^[28-30]为:

$$E_2 - E_1 = -249 \text{ mV}$$

对于两步单电子反应, ΔE 比 $-(RT/nF)\ln 2 = -35.6 \text{ mV}$ 正时,表示正相互作用(即第二步电子转移受到第一步反应的促进); ΔE 比 $-(RT/nF)\ln 2 = -35.6 \text{ mV}$ 负时,表示负相互作用。当 $c(\text{Fc-GPR})/c(\text{Cu}^{2+}) = 1:1$ 时,

图6 不同浓度 GPR 与 Cu(II)作用的微分脉冲伏安图

Fig.6 Differential pulse voltammogram on carbon electrode of Cu(II) with GPR

$c(\text{Cu}^{2+}) = 0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; $c(\text{GPR})/(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$: a) 0, b) 0.5, c) 1.0

$\Delta E = E_2 - E_1 = 0.3395 \text{ V} - 0.5885 \text{ V} = -249 \text{ mV} < -35.6 \text{ mV}$, 可以明显观察到此时 CV 图有两个波形^[29-30]。因此,当 Fc-GPR 的量不变,加入的铜离子的量增加时,溶液中游离的 Fc-GPR 的量减少,使得反应(1)难发生,二茂铁的氧化还原反应受到抑制,使得其峰电流减小直到消失(见图 5)。此外,随着铜离子的量增加,铜离子的阳极峰电位正移动。实验结果证实该电化学反应过程符合 ECE 反应机理。而另一方面,单独的 GPR 与铜离子作用,其电化学信号无明显变化,峰电位基本不变(如图 6 所示)。说明二茂铁基团具有良好的电化学活性, GPR 三肽与 Cu(II)作用可以通过其电化学性质的变化而得到。

3 结论

(1) 以二茂铁甲酸、H-Gly-OMe、Boc-Pro-OH、H-Arg(NO₂)-OMe 为原料,合成了一种目前尚未报道的新的化合物 Fc-Gly-Pro-Arg(NO₂)-OMe。经 IR、¹H-NMR 和 MS 表征确定其结构;利用循环伏安研究了该化合物在甲醇溶液中的电化学性质。

(2) 利用循环伏安法和微分脉冲伏安法研究了 Fc-GPR、GPR 与铜离子的作用,采用摩尔比列法,得到 Fc-GPR 与 Cu(II)的配位比为 2:1。当 Fc-GPR 与 Cu(II)络合物的循环伏安图是一个典型的双波图,其电化学反应过程符合耦合均相电化学反应的 ECE 机理。

(3) 将具有良好氧化还原活性的二茂铁基团标记三肽 GPR,为研究金属离子与多肽的相互作用机制提供了一种新的方法。目前,我们正将 Fc-GPR 作为电化学探针,研究 Cu(II)与 A β 的相互作用机制;并将其作为螯合肽与人体内过量铜离子结合,抑制因过量铜离子引起的 A β 聚集,从而达到治疗阿尔茨海默病的目的。

References

- 1 van Staveren, D. R.; Metzler-Nolte, N. *Chem. Rev.*, **2004**, *104*: 5931
- 2 Duivenvoorden, W. C. M.; Liu, Y. N.; Schatte, G.; Kraatz, H. B. *Inorg. Chim. Acta*, **2005**, *358*: 3183
- 3 Miklán, Z.; Szabó, R.; Zsoldos-Mády, V.; Reményi, J.; Bánóczi, Z.; Hudecz, F. *Biopolymer*, **2007**, *88*: 108
- 4 Paitayatat, S.; Tamchompoo, B.; Thebtaranonth, Y.; Yuthavong, Y. *J. Med. Chem.*, **1997**, *40*: 633
- 5 Chen, C. H.; Li, H.; Zhu, W.; Zhang, Q. X. *Acta Phys.-Chim. Sin.*, **2005**, *21*: 1067 [陈灿辉, 李红, 朱伟, 张全新. 物理化学学报, **2005**, *21*: 1067]

- 6 Goswami, T. K.; Roy, M.; Nethaji, M.; Chakravarty, A. R. *Organometallics*, **2009**, *28*: 1992
- 7 Mahmoud, K. A.; Luong, J. H. T. *Anal. Chem.*, **2008**, *80*: 7056
- 8 Deng, X. H.; Kan, X. W.; Yu, Y.; Zhang, W. Z.; Liu, H. Y.; Fang, B. *Acta Phys. -Chim. Sin.*, **2005**, *21*: 1399 [邓湘辉, 阚显文, 尉 艳, 张文芝, 刘红英, 方 宾. 物理化学学报, **2005**, *21*: 1399]
- 9 Ioudina, M.; Uemura, E. *Exp. Neurol.*, **2003**, *184*: 923
- 10 Furlan, M.; Rupp, C.; Beck, E. A. *BBA-Protein. Struct. M.*, **1983**, *742*: 25
- 11 Furlan, M.; Rupp, C.; Beck, E. A.; Svendsen, L. *Thromb. Haemost.*, **1982**, *47*: 118
- 12 Brewer, G. J. *Chem. Res. Toxicol.*, **2009**, *10*: 1021
- 13 Multhaup, G. *Biomed. Pharmacother.*, **1997**, *51*: 105
- 14 Donnelly, P. S.; Xiao, Z.; Wedd, A. G. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2007**, *11*: 128
- 15 Meloni, G. *J. Biol. Chem.*, **2007**, *282*: 16068
- 16 Freedman, J. H.; Pickart, L.; Weinstein, B.; Mims, W. B.; Peisach, J. *Biochemistry*, **1982**, *21*: 4540
- 17 Pickart, L.; Freedman, J. H.; Loker, W. J.; Peisach, J.; Perkins, C. M.; Steinkamp, R. E.; Weinstein, B. *Nature*, **1980**, *288*: 715
- 18 Freedman, J. H.; Ciriolo, M. R.; Peisach, J. *J. Biol. Chem.*, **1989**, *264*: 5598
- 19 Barišić, L.; Čakić, M.; Mahmoud, K. A.; Liu, Y. N.; Kraatz, H. B.; Pritzkow, H.; Kirin, S. I.; Metzler-Nolte, N.; Rapić, V. *Chem. Eur. J.*, **2006**, *12*: 4965
- 20 Xiang, J.; Peng, Y.; Schatte, G.; Yang, Q.; Liu, Y. N. *Z. Kristallogr.*, **2009**, *224*: 551
- 21 Wang, F. B.; Peng, Y.; Fan, M. Y.; Liu, Y. N.; Hung, K. L. *Acta Phys. -Chim. Sin.*, **2009**, *25*: 1125 [王芳斌, 彭 勇, 范美意, 刘又年, 黄可龙. 物理化学学报, **2009**, *25*: 1125]
- 22 Momoki, K.; Sekino, J.; Sato, H.; Yamaguchi, N. *Anal. Chem.*, **1969**, *41*: 1286
- 23 Muller, E.; Bernardinelli, G.; Reedijk, J. *Inorg. Chem.*, **1996**, *35*: 1952
- 24 Woltman, S. J.; Alward, M. R.; Weber, S. G. *Anal. Chem.*, **1995**, *67*: 541
- 25 Delavaux-Nicot, B.; Bigeard, A.; Bousseksou, A.; Donnadieu, B.; Commenges, G. *Inorg. Chem.*, **1997**, *36*: 4789
- 26 Taha, A. *Spectrochim. Acta A*, **2003**, *59*: 1373
- 27 Meng, R.; Weber, S. G. *J. Electroanal. Chem.*, **2007**, *600*: 325
- 28 Feldberg, S. W. *J. Phys. Chem.*, **1971**, *75*: 2377
- 29 Polcyn, D. S.; Shain, I. *Anal. Chem.*, **1966**, *38*: 370
- 30 Bard, A. J.; Faulkner, L. R. *Electrochemical methods: fundamentals and applications*. 2nd ed. New York: Wiley, 2001: 471–528