

研究简报

双(4,5-二氮杂芴酮)缩对,对'-二氨基二苯甲烷桥联
的二(邻菲咯啉合铜(II))的合成及其与DNA作用的光谱研究

钟文添 吴建中*

(华南师范大学化学系, 广州 510631)

关键词: Cu(II)双核配合物 邻菲咯啉 小牛胸腺 DNA

双-(4,5-二氮杂芴酮)缩对,对'-二氨基二苯甲烷

分类号: O614.121

研究金属配合物与核酸的作用方式和识别机理对深入了解核酸结构, 功能及某些抗肿瘤药物机理有着重要意义。自1982年Barton^[1]报道了第一个具有立体选择性的DNA插入剂——Zn(phen)₃²⁺(phen为邻菲咯啉)之后, 金属多吡啶配合物与DNA的相互作用成为国际上较活跃的研究领域之一。以邻菲咯啉为代表的多吡啶配体的四面体铜, 八面体钯、铑、钴等配合物已广泛地被用于该领域的研究。近年来, 多吡啶配体的过渡金属多核配合物与核酸的作用的研究也逐渐增多^[2]。自从Sigman等人首先发现四面体配合物Cu(phen)₂²⁺能够在O₂和还原剂存在时产生活性氧攻击脱氧核糖环上的C₁并夺去其上的氢, 从而使DNA链氧化断裂以来, 为数不少的多吡啶铜(I)配合物已被研究用作人工核酸切割酶^[3], 但对多吡啶铜(I)和铜(II)配合物用作核酸光谱探针方面的研究却很少。我们实验室报道了平面型的多吡啶铜(II)双核配合物^[4][(phen)Cu(μ-dpcat)Cu(phen)](ClO₄)₂(dpcat为邻菲咯啉-5,6-二酚负离子)

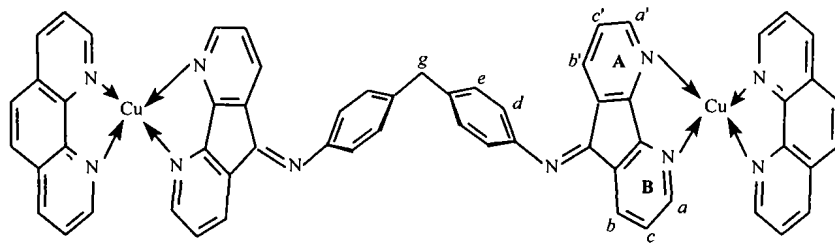
与DNA的作用情况, 最近又用bdmp作为桥联配体合成了一种新的铜(II)双核配合物, 并用紫外可见光谱、荧光光谱方法对其与DNA的作用进行了研究。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Elementar Vario EL 元素分析仪; Pekin-Elmer 1730 傅立叶变换红外光谱仪; 天美 UV-8500 紫外-可见分光光度计; HITACHI F-2500 荧光分光光度计; Bruker DRX-400 核磁共振波谱仪。

试剂均为国产分析纯, 用前未作进一步处理。研究配合物与DNA作用时, 样品均溶解在含4.8% DMSO的5mmol·L⁻¹ Tris(三羟甲基氨基甲烷)和50mmol·L⁻¹ NaCl的二次蒸馏水缓冲液(用盐酸调节pH值为7.2)中, 实验中所用小牛胸腺DNA的A₂₆₀:A₂₈₀ > 1.85, 表明其中不含蛋白质^[5], DNA的浓度以ε₂₆₀ = 6600L·mol⁻¹·cm⁻¹来确定^[6]。



收稿日期:2002-07-30。收修改稿日期:2002-11-11。

广东省自然科学基金资助项目(No. 984193)。

* 通讯联系人。E-mail: wujzh@senu.edu.cn

第一作者: 钟文添, 男, 21岁, 本科生; 研究方向: 金属配合物与生物大分子的作用。

1.2 配体和配合物的合成

1.2.1 bdmp

往 0.100g (0.5mmol) 对, 对'-二氨基二苯甲烷和 0.200g (1.1mmol) 4,5-二氮杂芴酮^[7]中加入 12.5 mL 甲醇和 1mL 冰醋酸, N₂ 保护下搅拌回流 8h, 冷却后抽滤得亮黄色固体。用大量沸水充分洗涤以除去未反应的芴酮。无水乙醇重结晶得橘黄色针晶, 产率约 65%。配体 bdmp(双-(4,5-二氮杂芴酮)缩对, 对'-二氨基二苯甲烷)可溶于常见的有机溶剂, 如甲醇、乙醇、二氯甲烷、DMSO、DMF 等。熔点 304~305℃。元素分析: C 78.01, H 4.325, N 16.14; C₃₅H₂₂N₆ · 0.5H₂O 理论值 C 78.78, H 4.320, N 15.69%。¹H NMR, δ: 8.802(dd, 2H, Ha), 8.649(dd, 2H, Ha'), 8.295(dd, 2H, Hb), 7.544(dd, 2H, Hc), 7.396(dd, 4H, Hd), 7.193(dd, 2H, Hc'), 7.033(d, 4H, He), 6.865(dd, 2H, Hb'), 4.108(s, 2H, Hg)。UV, λ_{max}/nm(ε/(L · mol⁻¹ · cm⁻¹))(甲醇溶液): 206.7(96400), 231.0(140050), 301.4(37850), 314.2(33170), 402.2(8400)。IR/cm⁻¹: 1657.6(s, Schiff 碱 ν_{C=N}), 1592.3(s, ν_{C=C}), 1560.6(s, 吡啶环 ν_{C=N}), 1400.8(s, δ_{CCH})。

1.2.2 [(phen)Cu(μ-bdmp)Cu(phen)](ClO₄)₄ · 2H₂O

称取 Cu(phen)Cl₂^[8] 0.095g (0.3mmol) 和 bdmp 0.08g (0.15mmol), 加入 10mL 乙醇、5mL 甲醇和 5mL 水, 室温搅拌反应 48h。抽滤, 滤液静置使未反应的配体完全析出。过滤, 往绿色滤液中滴加饱和 NaClO₄ 溶液, 使配合物完全析出, 抽滤, 用乙腈-甲醇-丙酮 (2:1:1) 溶液溶解, 乙醚蒸气向其中扩散 (重复两次), 得深绿色针状晶体产物, 产率约 45%。元素分析: C 48.91, H 3.483, N 9.582; [(phen)Cu(bdmp)Cu(phen)](ClO₄)₄ · 2H₂O 理论值 C 48.94, H 2.924, N 9.674%。UV, λ_{max}/nm(ε/(L · mol⁻¹ · cm⁻¹)): 270.4(123000)。发射峰 365nm。IR/cm⁻¹: 1625.2(m, Schiff 碱 ν_{C=N}), 1607.3(m, ν_{C=C}), 1519.6(s, 吡啶环 ν_{C=N}), 1429.8(s, δ_{CCH})。1087.4(s, ν_{ClO₄}), 622.4(m, δ_{ClO₄})。

1.3 配合物与 DNA 的作用

1.3.1 电子吸收光谱滴定

取 3.00mL 1.5μmol · L⁻¹ 的配合物溶液于 1cm 石英比色皿中, 以相应空白溶液作参比, 分别滴加相同量 (以数微升为间隔) 的 22mmol · L⁻¹ 的 DNA, 在

紫外-可见分光光度计上记录其吸收光谱。

1.3.2 荧光光谱滴定

取 2.00mL 1.5μmol · L⁻¹ 的配合物溶液于 1cm 荧光比色皿中, 滴加 22mmol · L⁻¹ 的 DNA, 在激发波长 271nm 下测定 310~450nm 间的荧光。

1.3.3 荧光猝灭实验

[Cu₂] (配合物浓度) = 1.5μmol · L⁻¹, [DNA]/[Cu₂] = 140, [Fe(CN)₆]⁴⁻ 的浓度在 0~1.0mmol · L⁻¹ 之间变化, 在激发波长 271nm 下测定 310~450nm 间的荧光。

2 结果与讨论

2.1 合成与表征

制备 bdmp 时, 由于 4,5-二氮杂芴酮易溶于热水, 而 bdmp 不溶于热水, 故用热水浸取、洗涤的方法可以完全除去反应中过量的 4,5-二氮杂芴酮。4,5-二氮杂芴酮在 1717cm⁻¹ 处显示 C=O 伸缩振动峰, 而 bdmp 则在 1658cm⁻¹ 处出现 C=N 伸缩振动峰, 这是两种物质的特征红外吸收峰, 可以很方便地用于判断反应和除杂的程度。

配体 bdmp 的核磁共振氢谱显示有九组信号。化学位移为 4.108ppm 的单峰对应于亚甲基, 包含两个 H。两组二重峰 (7.396 和 7.033ppm) 归属为苯环上的两组 H, 每组包含四个 H。另外六组分别包含两个 H 的双重峰则应属于氮杂环的两个非等价的吡啶环。由于氮杂环的非等价的 A 和 B 两个吡啶环中以 A 环离苯环近, 受其电子环流屏蔽的影响大于 B 环, 因此 A 环上质子的化学位移值要小于相应的 B 环上质子。双核配合物的氢谱显示出强烈的谱线增宽, 无法归属, 这是由 Cu(II) 的顺磁性引起的。从 bdmp 和配合物的 IR 谱可以看出, 配合物在 1520cm⁻¹ 和 1625cm⁻¹ 附近的两种 C=N 伸缩振动峰, 与配体 bdmp 相比, 分别红移了 32 和 41cm⁻¹, 说明 phen 和 bdmp 上的 N 原子参与了配位。

2.2 电子吸收光谱

LC(Ligand-Centered) 或 MLCT(Metal to Ligand Charge Transfer) 吸收峰的红移和减色效应可作为衡量配合物与 DNA 是否以插入模式相结合的判据^[9]。因为插入配体与 DNA 碱基对可发生 π 电子堆积, 插入配体的 π* 空轨道与碱基的 π 电子轨道发生偶合, 使能级下降, 导致 π → π* 跃迁能量减少, 从而产生红移现象; 同时, 偶合后的 π* 轨道因

部分填充电子, 光通量减小, 使 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁几率减少, 产生减色效应^[10]。图 1 是 $[(\text{phen})\text{Cu}(\mu\text{-bdmp})\text{Cu}(\text{phen})]^{4+}$ 配合物与 DNA 作用的电子吸收光谱, 随着 DNA 的加入, 该配合物产生明显的减色效应, 表明可能已嵌入 DNA 的碱基对平面中。

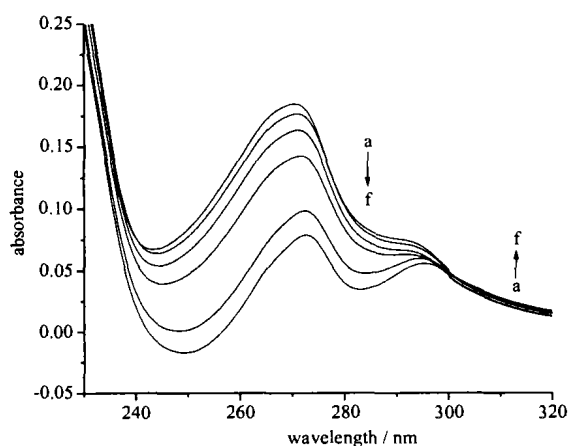


图 1 Cu_2 配合物与 DNA 作用的电子吸收光谱

Fig. 1 Electronic absorption spectra of the Cu_2 complex ($1.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) interacting with DNA
[DNA]/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) = (a) 0; (b) 8.8;
(c) 17.6; (d) 35.2; (e) 70.4; (f) 88

2.3 荧光光谱

使用 271nm 激发光时, $[(\text{phen})\text{Cu}(\mu\text{-bdmp})\text{Cu}(\text{phen})]^{4+}$ 在 365nm 左右产生较强、较宽的荧光发射峰。峰的位置和形状与配体有关, 由于该配合物中含两个邻菲咯啉环, 因此它的荧光发射峰与邻菲咯啉^[11]和 $[(\text{phen})\text{Cu}(\mu\text{-dpcat})\text{Cu}(\text{phen})]^{2+}$ ^[14] 十分接近, 但与后两者均为单峰的情况不同的是, 该配合物在 365nm 左、右出现肩峰, 表明 bdmp 配体也参与了荧光发射。在 DNA 的作用下, 该配合物的荧光发射明显减弱, 但是光谱形状基本不变, 如图 2 所示。荧光光谱滴定实验表明该配合物的相对发光强度 (相对于未加 DNA) 随着 DNA 含量的增加, 逐渐减弱至仅为原来的 12% (如图 3 所示), 这说明该配合物与 DNA 有很强作用。刚性平面的 $[(\text{phen})\text{Cu}(\mu\text{-dpcat})\text{Cu}(\text{phen})]^{2+}$ 配合物在 367nm 左右的荧光发射峰也能被小牛胸腺 DNA 强烈猝灭, 但是同时光谱形状发生了明显的变化^[4], 这与本文研究的 $[(\text{phen})\text{Cu}(\mu\text{-bdmp})\text{Cu}(\text{phen})]^{4+}$ 配合物不同, 说明两种配合物与 DNA 的作用方式有所不同。dpcat 配合物的平面刚性结构使得它可以典型的插入方式与双链 DNA 结合, 而 bdmp 则可能是部分插入结合。

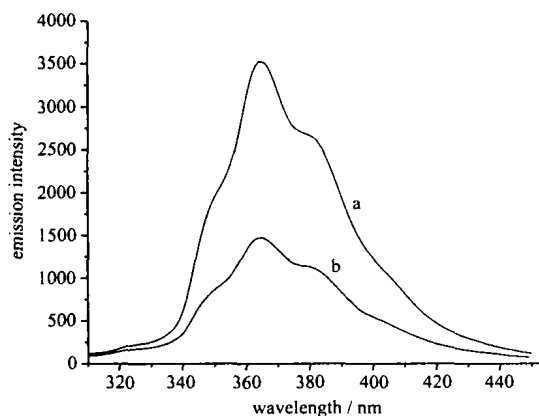


图 2 DNA 对 Cu_2 配合物荧光光谱的影响

Fig. 2 Fluorescence spectra of the Cu_2 complex ($1.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) in the absence of DNA (a) and presence of DNA (b, $92 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)

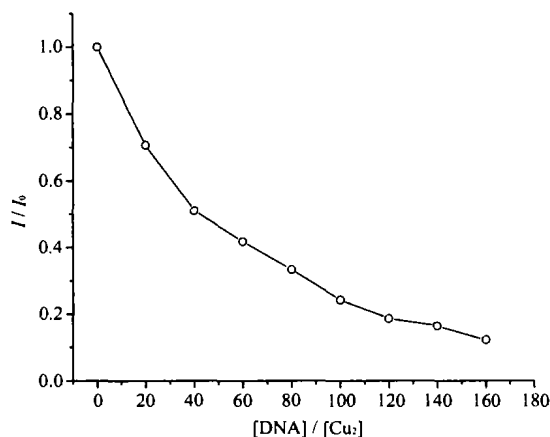


图 3 Cu_2 配合物荧光强度在 DNA 作用下的变化

Fig. 3 Effect of the concentration ratio of calf thymus DNA vs the Cu_2 complex on the emission intensity of the complex

I_0 and I are the emission intensities without DNA and with DNA, respectively

2.4 荧光猝灭

用阴离子猝灭剂研究配合物阳离子在结合 DNA 前后发光猝灭情况的差异, 是研究配合物与 DNA 的结合方式及作用强度的一种重要的常用手段。因为游离或水合状态的正电荷配离子可以很容易被负电荷阴离子 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 猝灭; DNA 由于其磷酸骨架带有负电荷而成为多聚阴离子, 对 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 有强烈的排斥作用, 以插入方式与 DNA 结合的配离子, 会受到某种程度的保护, 被 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 猝灭的可能性减少^[10, 12]。 $[(\text{phen})\text{Cu}(\mu\text{-bdmp})\text{Cu}(\text{phen})]^{4+}$ 配合物在加入和不加入 DNA

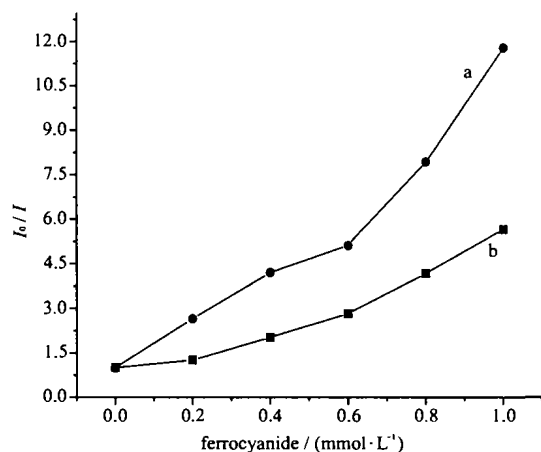


图 4 DNA 对 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 猝灭 Cu_2 配合物荧光的影响

Fig. 4 Influence of ferrocyanide on the induced emission quenching of the Cu_2 complex ($1.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) without DNA (a) or with 160 equivalent DNA (b) I_0 and I are the emission intensities without and with ferrocyanide, respectively.

两种情况下的相对发光强度 (I_0/I) 随猝灭剂 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 浓度变化的猝灭曲线如图 4 所示。由图 4 可见, 加入 DNA 后该配合物荧光猝灭的程度有相当程度的减弱, 但其荧光强度仍然能被猝灭超过 50% 的事实表明 DNA 的这种保护并不完全。这很可能是由于该配合物与 DNA 之间并非以完全插入结合的方式, 而是以部分插入结合的方式作用的, 该铜(II)双核配合物桥联分子如此之长以致于只有其中一端的 phen 和 bdmp 的一部分才能深深地插入到 DNA 分子中, 而另一端的 phen 和 bdmp 的部分结构留在了 DNA 沟中, 裸露在外带部分正电性的 phen 较能被 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 接近而导致荧光猝灭。很多八面体钌(II)多吡啶类配合物分子与 DNA 分子插入结合时, 是以其中一个配体插入到 DNA 分子中而其余两个辅助配体留在 DNA 沟外的方式进行的, 但它们对于被 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 猝灭的情况却不同于本文研究的铜(II)双核配合物, 能很好地被 DNA 分子保护^[10, 12]。这是由于钌(II)配合物的荧光发射基于 MLCT^[13], 而铜(II)双核配合物的荧光发射却是基于上面所提到的 phen 和 bdmp。

3 结 论

本文合成了一种新的铜(II)双核配合物 $[(\text{phen})$

$\text{Cu}(\text{bdmp})\text{Cu}(\text{phen})](\text{ClO}_4)_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 电子吸收、稳态荧光、荧光猝灭等一系列实验结果表明该铜(II)双核配合物可以与双链 DNA 产生较强烈的作用, 作用方式可能是部分插入结合, 这与其结构特点是一致的。

参 考 文 献

- [1] Barton J. K., Dannenberg J. J., Raphael A. L. *J. Am. Chem. Soc.*, **1982**, *104*, 4967.
- [2] (a) LIU Jing-Gang(刘劲刚), JI Liang-Nian(计亮年) *Wuji Huaxue Xuebao (Chin. J. Inorg. Chem.)*, **2000**, *16*, 195;
(b) WU Jian-Zhong(吴建中) *Wuji Huaxue Xuebao (Chin. J. Inorg. Chem.)*, **2000**, *16*, 697.
- [3] (a) Sigman D. S., Mazumder A., Perrin D. M. *Chem. Rev.*, **1993**, *93*, 2295;
(b) McMillin D. R., McNett K. M. *Chem. Rev.*, **1998**, *98*, 1201.
- [4] WU J. -Z., Li H., ZHANG J. -G., XU J. -H. *Inorg. Chem. Commun.*, **2002**, *5*, 71.
- [5] Marmur J. *J. Mol. Biol.*, **1961**, *3*, 208.
- [6] Reichmann M. E., Rice S. A., Thomas C. A., Doty P. *J. Am. Chem. Soc.*, **1954**, *76*, 3047.
- [7] Henderson L. J., Fronczek Jr. F. R., Cherry W. R. *J. Am. Chem. Soc.*, **1984**, *106*, 5876.
- [8] PEM Zheng-He(彭正合), PAN Zheng-Cai(潘正才) *Wuhan Daxue Xuebao (J. Natural Sci. Wuhan Univ.)*, **1998**, *44*, 433.
- [9] Pyle A. M., Rehmann J. P., Meshoyrer R., Kumar C. V., Turro N. J., Barton J. K. *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, *111*, 3051.
- [10] WU Jian-Zhong(吴建中), YANG Guang(杨光), WANG Lei(王雷), ZENG Tian-Xian(曾添贤), JI Liang-Nian(计亮年) *Gaodeng Xuexiao Huaxue Xuebao (Chem. J. Chin. Univ.)*, **1996**, *17*, 1010.
- [11] WEI Yi-Nan(魏亦男), LI Yuan-Zong(李元宗), CHANG Wen-Bao(常文保), CI Yun-Xiang(慈云祥) *Fenxi Huaxue (Chin. J. Anal. Chem.)*, **1998**, *26*, 1178.
- [12] Barton J. K., Goldberg J. M., Kumar C. V., Turro N. J. *J. Am. Chem. Soc.*, **1986**, *108*, 2081.
- [13] Juris A., Blazani V., Barigelletti F., Campagna S., Belser P., Zewelsky A. Von *Coord. Chem. Rev.*, **1988**, *84*, 85.

**Synthesis and Spectroscopic DNA Binding Studies of
1, 1'-Bis(nitrilomethylidyne-4, 5-diazafluoren)-4, 4'-(μ -methylene)bisphenyl
Bridged Bis(1, 10-phenanthroline)copper (II) Complex**

ZHONG Wen-Tian WU Jian-Zhong*

(*Department of Chemistry, South China Normal University, Guangzhou 510631*)

A new bimetallic Cu (II) complex, $[(\text{phen})\text{Cu}(\mu\text{-bdmp})\text{Cu}(\text{phen})](\text{ClO}_4)_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, where phen and bdmp denote 1, 10-phenanthroline and 1, 1'-bis(nitrilomethylidyne-4, 5-diazafluoren)-4, 4'-(μ -methylene)bisphenyl respectively was synthesized and its DNA binding behavior was studied by photophysical methods. It has been found that calf thymus DNA could result in significant decrease both in electronic absorption and fluorescent emission of the complex. The fluorescence quenching by ferrocyanide could be reduced to some extent for the complex in presence of DNA. These facts suggest that this dicopper (II) complex binds to double helix DNA by partial intercalation.

Keywords: **dinuclear copper (II) complex** **1, 10-phenanthroline** **calf thymus DNA**
1, 1'-bis(nitrilomethylidyne-4, 5-diazafluoren)-4, 4'-(μ -methylene)bisphenyl