

环丙沙星-铜(II)-TBZ/HPB 配合物的合成、抗菌活性及与 DNA 作用

任祥祥¹ 王彩霞¹ 卢艳梅¹ 庄楚雄² 乐学义^{*,1}

(¹ 华南农业大学应用化学系, 广州 510642)

(² 华南农业大学生命科学院, 广州 510642)

摘要: 合成并表征了两个新的配合物: $[\text{Cu}(\text{HCP})(\text{TBZ})](\text{NO}_3)_2 \cdot (\text{H}_2\text{O})_2$ (**1**) 和 $[\text{Cu}(\text{HCP})(\text{HPB})](\text{NO}_3)_2 \cdot (\text{H}_2\text{O})_{1.5}$ (**2**) [HCP =环丙沙星, TBZ =2-(4'-噻唑基)苯并咪唑, HPB =2-(2-吡啶)-苯并咪唑]。配合物 **1** 属于三斜晶系, $P\bar{1}$ 空间群, $a=0.909\,5(2)$ nm, $b=1.330\,1(3)$ nm, $c=1.355\,2(3)$ nm, $\alpha=93.518(3)^\circ$, $\beta=97.192(3)^\circ$, $\gamma=106.361(3)^\circ$, $V=1.552\,6(6)$ nm³, $Z=2$, $D_c=1.598$ g·cm⁻³, $\mu=0.849$ mm⁻¹。用二倍稀释法研究了配合物的抗菌活性, 发现配合物对大肠杆菌(*Escherichia coli*, G-), 沙门氏杆菌(*Salmonella*, G-)和枯草杆菌(*Bacillus subtilis*, G+)具有良好的抑制作用。应用电子吸收光谱、荧光光谱、粘度测定及凝胶电泳研究了配合物与 DNA 的作用, 结果表明配合物以插入方式与 DNA 作用, 在维生素 C 存在下通过·OH 切割 pBR322 DNA 双螺旋结构。

关键词: 铜(II)配合物; 环丙沙星; 2-(4'-噻唑基)苯并咪唑; 2-(2-吡啶)-苯并咪唑; DNA; 抗菌活性

中图分类号: O614.121

文献标识码: A

文章编号: 1001-4861(2010)05-0891-08

Synthesis, Antibacterial Activities of Copper(II) Complexes with Ciprofloxacin and TBZ or HPB and Their DNA Interactions

REN Xiang-Xiang¹ WANG Cai-Xia¹ LU Yan-Mei¹ ZHUANG Chu-Xiong² LE Xue-Yi^{*,1}

(¹Department of Applied Chemistry, South China Agricultural University, Guangzhou 510642)

(²College of Life-Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642)

Abstract: Two new complexes: $[\text{Cu}(\text{HCP})(\text{TBZ})](\text{NO}_3)_2 \cdot (\text{H}_2\text{O})_2$ (**1**) and $[\text{Cu}(\text{HCP})(\text{HPB})](\text{NO}_3)_2 \cdot (\text{H}_2\text{O})_{1.5}$ (**2**), where HCP =ciprofloxacin, TBZ =2-(4'-thiazolyl)benzimidazole, and HPB =2-(2-pyridyl) benzimidazole, were synthesized and characterized. Complex **1** crystallizes in the triclinic space group $P\bar{1}$ in a unit cell of $a=0.909\,5(2)$ nm, $b=1.330\,1(3)$ nm, $c=1.355\,2(3)$ nm, $\alpha=93.518(3)^\circ$, $\beta=97.192(3)^\circ$, $\gamma=106.361(3)^\circ$, $V=1.552\,6(6)$ nm³, $Z=2$, $D_c=1.598$ g·cm⁻³, $\mu=0.849$ mm⁻¹. The complexes were assayed against gram-positive and gram-negative bacteria by doubling dilutions method, and the interaction of the complexes to DNA was investigated by electronic absorption spectroscopy, fluorescence spectroscopy, viscosity measurement and agarose gel electrophoresis. The results show that the complexes have good antibacterial activities, could interact with DNA by an intercalative mode, and cleave pBR322DNA in the presence of vitamin C in the involvement of the hydroxyl radical in the cleavage process. CCDC: 762717.

Key words: copper(II) complexes; ciprofloxacin; 2-(4'-thiazolyl)benzimidazole; 2-(2-pyridyl) benzimidazole; DNA; antibacterial activity

环丙沙星(HCP)(图 1)(1-环丙基-6-氟-1,4-二氢-4-氧代-7-(1-哌嗪基)-3-喹啉羧酸)是一种重要的喹诺酮类抗菌化合物, 它主要通过抑制 DNA 旋转酶和

拓扑异构酶 II 使核酸及蛋白质的合成受到干扰, 导致双螺旋 DNA 断裂及细胞死亡而具有抗菌性^[1-2]。并且研究发现, 金属离子尤其是过渡金属离子(铜、

收稿日期: 2009-09-14。收修改稿日期: 2009-12-26。

广东省科技计划项目资助(No.2009B020312010)。

*通讯联系人。E-mail: lexifu@163.com, Tel: 08620-85287010

第一作者: 任祥祥, 男, 26 岁, 硕士研究生; 研究方向: 生物无机化学。

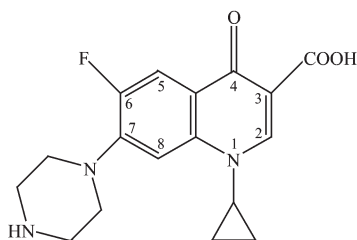


图 1 环丙沙星分子结构式

Fig.1 Molecular structure of ciprofloxacin

锌等)可与 HCP 分子中 3 位羧基和 4 位酮基配位形成配合物,并对其活性有重要影响,因此研究环丙沙星金属配合物结构、抗菌活性及其与 DNA 作用具有重要意义^[3-9]。

本文以环丙沙星(HCP)为第一配体,以与蛋白质咪唑配位基具有类似配位性质的苯并咪唑衍生物[2-(4'-噻唑基)苯并咪唑(TBZ)或 2-(2-吡啶)-苯并咪唑(HPB)]为第二配体,合成了两种新的环丙沙星铜(II)配合物。用元素分析、红外光谱、电子光谱、摩尔电导率以及单晶 X-射线衍射等方法对配合物进行了组成和结构分析;通过二倍稀释法研究了配合物的抗菌活性;应用紫外光谱、荧光光谱、粘度测定和凝胶电泳等方法研究了配合物与 DNA 的作用,以初步探索配合物抗菌作用机制。结果对研究开发新型抗菌剂有重要意义。

1 实验部分

1.1 试剂及仪器

配体 2-(2-吡啶)苯并咪唑(HPB)参照文献方法^[10]合成,环丙沙星(AR,华南农业大学兽药厂),2-(4'-噻唑基)苯并咪唑(TBZ)、抗坏血酸(Vit C)、琼脂糖凝胶、溴化乙锭(EB)、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、小牛胸腺 DNA(CT-DNA)及质粒 pBR322 DNA 均为生化试剂,其他试剂为市售分析纯,用前未做进一步处理;溶剂为二次蒸馏水。研究配合物与 DNA 相互作用时,底液为 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris+ $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 缓冲溶液 ($\text{pH}=7.2$),TBE 电泳缓冲液为: $4.5 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl+ $4.5 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_3BO_3 + $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA ($\text{pH}=8.3$),参照文献方法^[11]确定 CT-DNA 浓度。

ACATAR 360 FTIR 型红外光谱仪 (KBr 压片),美国 Nicolet 公司;Vario EL 元素分析仪,德国 Elementar 公司;DDS-12A 型电导率仪,上海宇隆仪器有限公司;4000 UV-Vis 紫外/可见分光光度计,瑞士 Amersham Pharmacia Biotech 公司;F-4500 型荧光光谱仪,日本 Hitachi 公司;乌氏粘度计,上海晶

菱玻璃有限公司;BIO-RAD 凝胶成像系统,BIO-RAD Laboratories-Segrade 意大利米兰。

1.2 配合物的合成

称取 1 mmol HCP 溶于 10 mL 水并用等量 NaOH 中和,再加入 1 mmol $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$,室温搅拌混合后将溶有 1 mmol TBZ(HPB)的 40 mL 甲醇溶液加入到上述溶液中,用 NaOH($0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)调节 pH 值至 5~6,继续搅拌 0.5 h ,过滤,滤液在室温下放置,数周后有绿色晶体析出。过滤并依次用少量水、甲醇洗涤,空气中干燥后置于干燥器中保存。

配合物 1:IR(KBr), ν/cm^{-1} : $3440(\text{s},\text{br})$, $3259(\text{m})$, $3083(\text{m})$, $2920(\text{m})$, $1632(\text{vs})$, $1381(\text{s})$, $1521(\text{vs})$;UV-Vis, $\lambda/\text{nm}(\epsilon/(\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}))$: $203(209700)$, $274(122460)$, $675(32)$;EA(%),Found:C,43.02;H,3.93;N,14.78;Calc for $\text{C}_{27}\text{H}_{29}\text{O}_{11}\text{N}_8\text{SFCu}$:C,42.88;H,3.87;N,14.81。

配合物 2:IR(KBr), ν/cm^{-1} : $3419(\text{s},\text{br})$, $3245(\text{m})$, $3080(\text{m})$, $2920(\text{m})$, $1633(\text{vs})$, $1384(\text{s})$, $1551(\text{vs})$;UV-vis, $\lambda/\text{nm}(\epsilon/(\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}))$: $204(163830)$, $275(83970)$, $660(32)$;EA(%),Found:C,47.11;H,4.05;N,15.03;Calc for $\text{C}_{29}\text{H}_{30}\text{O}_{10.5}\text{N}_8\text{FCu}$:C,47.00;H,3.97;N,15.12。

1.3 配合物 1 结构测定

室温下,选取一颗大小为 $0.47 \text{ mm} \times 0.41 \text{ mm} \times 0.39 \text{ mm}$ 配合物 1 的晶体置于 Bruker SMART Apex II CCD 单晶衍射仪上,用经石墨单色器单色化的 $\text{Mo K}\alpha(\lambda=0.071073 \text{ nm})$ 辐射为光源收集衍射数据。在 $2.1^\circ \leq \theta \leq 25.5^\circ$ 范围内收集到 8205 个衍射数据,其中独立衍射点($R_{\text{int}}=0.014$)和 $I \geq 2\sigma(I)$ 的可观察点分别为 5654 和 4671 个。吸收校正采用 SADABS 程序^[12],数据收集、晶胞修正采用 Smart 程序,SAINT+程序用于数据还原^[13],晶体结构用直接法解出,各向异性热参数进行全矩阵最小二乘法修正。氢原子由理论加氢,全部非氢原子的坐标及各向异性温度因子修正至收敛。所有计算均在 PC 计算机上用 SHELX-97 程序进行^[14]。

1.4 抗菌试验

采用试管二倍稀释法测定配合物最小抑菌浓度(MIC)。所用菌株为:大肠杆菌(*Escherichia coli*, G-),沙门氏杆菌(*Salmonella*, G-)和枯草杆菌(*Bacillus subtilis*, G+),G+为革兰氏阳性,G-为革兰氏阴性。取 9 支(10 mL)消毒试管并进行编号。取 0.8 mL 待测样品滴加到 1 号管内,再加入 2 滴吐温 80,混匀后加入 3.2 mL 肉汤蛋白胨培养液,振荡摇匀。其余各管分别加入培养液 2.0 mL 。然后从 1 号

管吸取 2.0 mL 溶液加入 2 号管,从 2 号管吸取 2.0 mL 溶液加入 3 号管,一直到 8 号管,再从 8 号管内吸取 2.0 mL 溶液弃去,9 号管不加待测样品。

向 1 号至 9 号管中分别加入 0.1 mL 菌液,其中 9 号作为阳性对照管,然后将 9 支试管放入恒温(37 °C)恒湿(RH>80%)培养箱中培养 24 h 后取出观察,记录实验现象。

1.5 配合物与 DNA 作用

1.5.1 配合物与 CT-DNA 作用的电子吸收光谱

在样品池和空白池中分别加入 0.05 mmol·L⁻¹ 标题配合物溶液和 3 mL Tris-HCl/NaCl 缓冲溶液,200~400 nm 范围内扫描。然后,每次往样品池和空白池中加入相同体积的 CT-DNA 溶液,使样品池中 CT-DNA 与配合物的浓度比值不断增加。充分摇匀并静置 6 min 后在 200~400 nm 范围内扫描。

1.5.2 配合物与 CT-DNA 作用的荧光光谱

扫描速度为 240 nm·s⁻¹ 和 525 nm 为激发波长下,在 550~650 nm 波长区间扫描记录系列配合物/CT-DNA/溴化乙锭(EB)体系的荧光强度变化。在系列试样溶液中,依此增加配合物的浓度,分别为:0, 9.76, 19.3, 28.7, 38.0, 55.9, 73.2, 89.8, 106 和 165 μmol·L⁻¹,而 EB 和 CT-DNA 的浓度分别恒定为 4.8 μmol·L⁻¹ 和 5.5 μmol·L⁻¹。

1.5.3 配合物与 CT-DNA 作用的粘度实验

在恒定温度(29±0.1 °C)下,固定 CT-DNA 浓度为 0.2 mmol·L⁻¹,逐渐增大配合物浓度。相对粘度按照公式: $\eta=(t-t_0)/t_0(t_0$ 为缓冲溶液流经毛细管所需时间, t 为 CT-DNA 溶液(含浓度不等的配合物流经毛细管所需的时间)计算。以 $(\eta/\eta_0)^{1/3}$ 对 $C_{\text{Complex}}/C_{\text{DNA}}(\eta_0$ 为未加配合物时 CT-DNA 溶液的相对粘度)作图即为 CT-DNA 相对粘度随配合物加入量的变化^[15]。

1.5.4 配合物对 pBR 322 DNA 的切割作用

将 150 ng pBR322 DNA 与不同浓度的配合物(配体)以及 50 倍于配合物(配体)浓度的还原剂抗坏血酸混合,然后用 Tris-HCl/NaCl 缓冲溶液定容至 20 μL,反应 5 min 后在 0.8%琼脂糖凝胶和 pH 值为 8.3 的 TBE 电泳缓冲液中电泳(100 V) 60 min。以溴酚蓝作为电泳过程指示剂,Gold View (4~5 μL)作为凝胶着色剂,结果在 BIO-RAD 紫外检测仪下观察并拍照。

在研究配合物切割 DNA 作用机理试验中,先将 4 μmol·L⁻¹ 的 DMSO(或 NaN₃)与 150 ng 的 pBR322 DNA 反应 15 min,然后再加入配合物溶液及抗坏血酸,反应 5 min 后进行电泳。

2 结果与讨论

2.1 配合物 1 晶体结构

晶体结构解析表明,配合物 1 化学式为:C₂₇H₂₉CuFN₈O₁₁S,式量为 756.18,分子式为[Cu(HCP)(TBZ)](NO₃)₂·(H₂O)₂,属三斜晶系,空间群 $P\bar{1}$, $a=0.909\ 5(2)$ nm, $b=1.330\ 1(3)$ nm, $c=1.355\ 2(3)$ nm, $\alpha=93.518(3)^\circ$, $\beta=97.192(3)^\circ$, $\gamma=106.361(3)^\circ$, $V=1.552\ 6(6)$ nm³, $Z=2$, $D_c=1.598$ g·cm⁻³, $\mu=0.849$ mm⁻¹, $F(000)=768$,GOF=1.10,最终偏差因子 $R[I>2\sigma(I)]:R_1=0.044\ 9,wR_2=0.137\ 5;R(\text{全部数据}):R_1=0.055\ 4,wR_2=0.151\ 2$,差值 Fourier 图上最高和最低峰分别为:870 e·nm⁻³ 和 -144 e·nm⁻³。该配合物分子中部分键长和键角列于表 1,其分子结构及晶体堆积分别列于图 2 和图 3。

CCDC:762717。

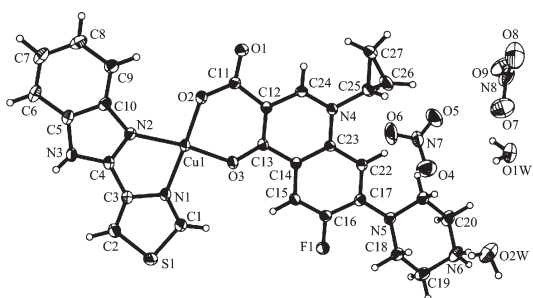
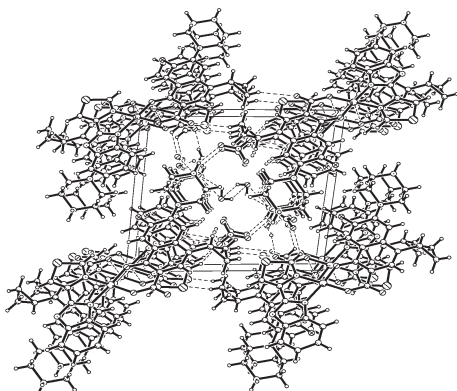
配合物晶体由阳离子[Cu(TBZ)(HCP)]⁺、阴离子 NO₃⁻及结晶 H₂O 分子组成。中心 Cu(II)离子与来自环丙沙星分子中 3 位上 1 个羧基氧(O2)及 4 位上羰基氧(O3)原子、TBZ 分子中 2 个氮(N1、N2)原子配位,构成了 1 个变形平面正方形结构,其中分子中键长

表 1 配合物 1 部分键长和键角

Table 1 Selected bond lengths (nm) and angles(°) of complex 1

Cu1-O2	0.189 1(3)	Cu1-O3	0.190 2(2)	Cu1-N1	0.198 3(3)
Cu1-N2	0.198 7(3)	O1W...O7	0.291 5(5)	N6...O5(a)	0.298 6(5)
N6...O7(a)	0.303 9(5)	N6...O9(a)	0.303 2(5)	N6...O2W	0.276 3(3)
O2W...O8(b)	0.279 5(5)	N3...O4(d)	0.322 3(5)	O2W...O1(c)	0.271 5(2)
N3...O6(d)	0.286 3(5)				
O2-Cu1-O3	95.43(10)	O2-Cu1-N1	175.92(12)	O2-Cu1-N2	95.27(11)
O3-Cu1-N1	87.91(10)	O3-Cu1-N2	166.91(10)	N1-Cu1-N2	81.74(11)

Symmetry transformations used to generate equivalent atoms, a: 2-x, 1-y, 1-z; b: 1-x, 1-y, 1-z; c: 1+x, 1+y, z; d: 1-x, -y, 2-z.

图 2 配合物 $[\text{Cu}(\text{HCP})(\text{TBZ})](\text{NO}_3)_2 \cdot (\text{H}_2\text{O})_2$ 分子结构图Fig.2 Perspective view of the molecular structure for complex $[\text{Cu}(\text{HCP})(\text{TBZ})](\text{NO}_3)_2 \cdot (\text{H}_2\text{O})_2$ 图 3 配合物 $[\text{Cu}(\text{HCP})(\text{TBZ})](\text{NO}_3)_2 \cdot (\text{H}_2\text{O})_2$ 的晶体结构堆积图Fig.3 Molecular packing view in complex $[\text{Cu}(\text{HCP})(\text{TBZ})](\text{NO}_3)_2 \cdot (\text{H}_2\text{O})_2$

Cu1-O2 , Cu1-O3 , Cu1-N1 和 Cu1-N2 分别为: 0.189 1(3)、0.190 2(2)、0.198 3(3) 和 0.198 7(3) nm; 键角 O2-Cu1-O3 , O2-Cu1-N2 , O3-Cu1-N1 , N1-Cu1-N2 , O2-Cu1-N1 和 O3-Cu1-N2 分别为 $95.43(10)^\circ$, $95.27(11)^\circ$, $87.91(10)^\circ$, $81.74(11)^\circ$, $175.92(12)^\circ$ 和 $166.91(10)^\circ$; 分子中 O2 , O3 , N1 , N2 和 Cu1 这 5 个原子所处的二乘平面方程为 $-6.358x + 10.939y + 4.226z = 2.7345$, 它们的偏离二乘平面值分别为: 0.007 14, -0.009 56, 0.008 55, -0.009 63 和 -0.003 52 nm。

另外, 从配合物 **1** 的堆积图可以看出, 晶体中除了存在配合物阳离子 $[\text{Cu}(\text{HCP})(\text{TBZ})]^+$ 与阴离子 NO_3^- 之间的静电作用外, 还存在着多种主要由嘧啶基上 N6 、 NO_3^- 中 O 及结晶水之间所形成的氢键作用, 如: 氢键 $\text{N6} \cdots \text{O7}(2-x, 1-y, 1-z)$, $\text{O1W} \cdots \text{O7}$, $\text{N6} \cdots \text{O9}(2-x, 1-y, 1-z)$, $\text{O2W} \cdots \text{O8}(1-x, 1-y, 1-z)$, $\text{N6} \cdots \text{O2W}$, $\text{O2W} \cdots \text{O1}(1+x, 1+y, z)$, $\text{N6} \cdots \text{O5}(2-x, 1-y, 1-z)$, $\text{N3} \cdots \text{O4}(1-x, -y, 2-z)$ 和 $\text{N3} \cdots \text{O6}(1-x, -y, 2-z)$ 分别为 0.303 9(5), 0.291 5(5), 0.303 2(5), 0.279 5(5), 0.276 3(3), 0.271 5(2), 0.298 6(5), 0.322 3(5) 和 0.286 3(5)

nm。虽然配合物分子间不存在芳环间 $\pi \cdots \pi$ 堆积作用, 但配体 TBZ 中噻唑基上的 S 与相邻配合物分子中的喹啉环之间存在 $p \cdots \pi$ 堆积作用, S 到喹啉环中心的距离为 0.359 2 nm。以上分子间的作用使配合物 **1** 晶体具有较高的稳定性。

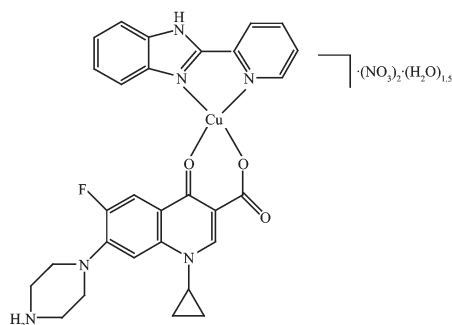
2.2 配合物表征

测得配合物 **1, 2** 在甲醇溶液中的摩尔电导率值分别为 182.1 和 195.3 $\text{S} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$, 表明配合物均为 2:1 型电解质^[16]。

用 KBr 压片测得配合物红外光谱。结果表明, 同自由 HCP 相比, 配合物没有出现 HCP 中 $-\text{COO}^-$ 的 3 个特征吸收峰: $1725 \text{ cm}^{-1}(\nu_{\text{C=O}})$, $1436 \text{ cm}^{-1}(\nu_{\text{C-OH}})$ 和 $1227 \text{ cm}^{-1}(\delta_{\text{OH}})$, 而在 1632 cm^{-1} 及 $1381 \text{ cm}^{-1}(\text{s})$ 附近出现 2 个强峰分别归属于 $-\text{COO}^-$ 的不对称伸缩振动 $\nu_{\text{as}}(-\text{COO}^-)$ 和对称伸缩振动 $\nu_{\text{s}}(-\text{COO}^-)$, 表明 HCP 配体是通过 COO^- 阴离子单齿与中心铜(II)离子配位^[17]。自由 HCP 和配合物在 3000 cm^{-1} 以上的吸收峰归属于嘧啶基上 N-H 伸缩振动 ν_{NH} 及水分子的 $\nu_{\text{O-H}}$ 。配合物未出现自由 HCP 配体在 3350 cm^{-1} 处的 ν_{NH} , 而在 2920 cm^{-1} 附近出现了 $\nu_{\text{NH}_2}^+$, 表明环丙沙星是以内盐的形式参与配位^[18]。另外, 配合物在 1521 (或 1551 cm^{-1}) 处吸收归属于配体 TBZ(HPB) 中 $\text{C}=\text{N}$ 伸缩振动^[17]。

电子光谱表明, 配合物甲醇溶液在紫外区均有 2 个较强的吸收峰, 归属于配体的 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁。与自由配体相比, 最大吸收峰的位置未发生改变, 但强度有所减弱, 归因于 TBZ/HPB 上的氮原子配位后引起配体上电子云密度的降低。与配体相比, 配合物在可见区 675 (或 660) nm 处出现了一个弱而宽的吸收峰, 归属于配合物分子中心 Cu(II) 离子的 $d \rightarrow d$ 跃迁。

综合上述配合物 **2** 的元素分析、摩尔电导率、

图 4 配合物 **2** 可能的分子结构图Fig.4 Possible molecular structure of complex **2**

红外和电子光谱结果,并参考配合物 **1** 分子结构,可推测配合物 **2** 分子式为: $[\text{Cu}(\text{HCP})(\text{HPB})](\text{NO}_3)_2 \cdot (\text{H}_2\text{O})_{1.5}$,可能的分子结构如图 4 所示。

2.3 配合物抗菌活性

本文采用试管双倍稀释法,将配合物配成 $512 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 原液,通过 2 倍稀释形成浓度梯度最低为 $0.03 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,用 MH 培养基,细菌最终接种量为 $5 \times 10^5 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$, 37°C 下培养 24 h,测得配合物抑制

细菌最低浓度(MIC),结果见表 2。

表 2 中实验数据表明:配合物抗菌活性均高于 $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ 及苯并咪唑衍生物配体(TBZ/HPB),而接近于 HCP,与文献报道的金属离子对 HCP 活性影响及相关金属配合物的研究结果一致^[1,19-20]。对所有细菌,两配合物的 MIC 值相近,并且由于两配合物分子的配位结构类似,表明配合物抗菌作用主要决定于 HCP 配体。

表 2 配合物抑制细菌生长最低浓度(MIC, $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)

Table 2 Minimal inhibitory concentration (MIC, $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) of the complexes for the assayed bacteria

Compound	Bacteria		
	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella</i>
$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$	256	128	256
HPB	128	128	128
TBZ	512	512	512
HCP	0.5	0.5	1
Complex 1	0.5	0.5	2
Complex 2	0.5	1	1

2.4 配合物与 DNA 的相互作用

研究配合物与 DNA 之间相互作用对探索配合物抗菌作用机理有重要意义,本文通过光谱学、流体力学等方法研究了配合物与 DNA 的作用。

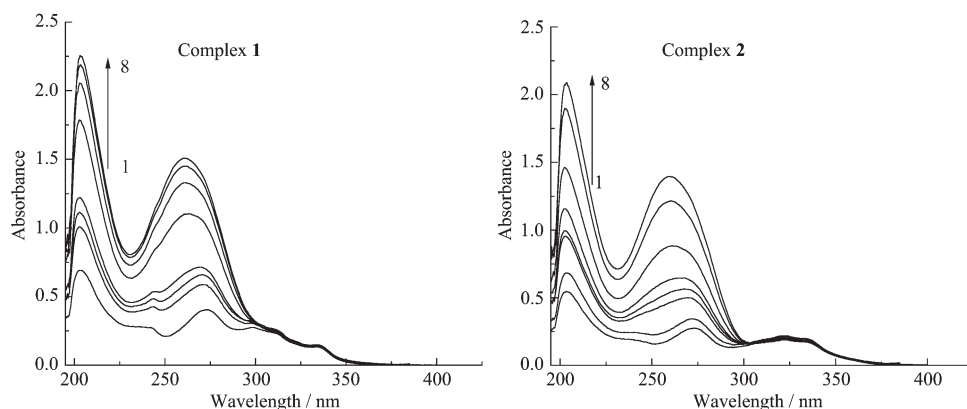
2.4.1 配合物与 DNA 作用的电子吸收光谱

电子吸收光谱是研究小分子化合物与 DNA 相互作用的最常用和最有效的方法之一。标题配合物与 CT-DNA 相互作用的电子吸收光谱如图 5 所示。结果表明,随着 DNA 浓度增加,配合物在 200~400 nm 波长范围内的 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁吸收带都发生了一定程度的兰移和增色效应,表明配合物分子与 DNA

发生了作用^[21],并且这种作用有可能导致了配合物聚集体以及配合物分子间氢键的破坏^[22],详细机理有待于进一步研究。另外,从图中可以看出,在增加相同 DNA 浓度时,配合物 **2** 吸收强度变化较配合物 **1** 大,如对于 270 nm 处吸收峰,当 DNA 浓度由 0 增加到 $313 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,配合物 **1** 吸收峰强度增加了 3.23 倍,而配合物 **2** 的增加了 3.79 倍,由此可初步判断配合物 **2** 与 DNA 的作用强于配合物 **1**。

2.4.2 配合物与 DNA 作用的荧光光谱

EB 为一共轭平面分子,其本身荧光很弱,但当插入到 DNA 双螺旋结构碱基之间时其荧光显著增



Arrows denote the increase direction in DNA concentration; $C_{\text{complex}} = 30 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $C_{\text{DNA}} / (\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$: 0, 33.1, 65.8, 98.0, 130, 192, 253, 313

图 5 配合物在不同 DNA 浓度下的电子吸收光谱图

Fig.5 Absorption spectra of the complexes upon addition of DNA

强。然而,当 EB 被其他分子从 DNA 双螺旋结构中挤出来时,其荧光强度显著降低^[23-24],因此可通过研究配合物对 DNA-EB 体系荧光强度的影响来判断配合物对 DNA 的作用。配合物对 EB-DNA 体系荧光光谱的影响如图 6 所示。

图 6 表明,随着配合物浓度增加,EB-DNA 体系荧光强度下降,表明 EB 被配合物分子从 DNA 双螺旋结构中挤出。荧光强度下降趋势大小为配合物 2>

1,如当配合物浓度由 0 增加到 $165\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,配合物 1 使体系荧光强度减少到原来的 0.147 倍,而配合物 2 使体系荧光强度减少到原来的 0.078 倍,表明配合物 2 对 EB-DNA 荧光体系的淬灭程度大于配合物 1。这可能主要归因于配体 HPB 的芳环面积大于配体 TBZ,面积越大对 DNA 的插入作用愈大,与电子吸收光谱研究结果一致。

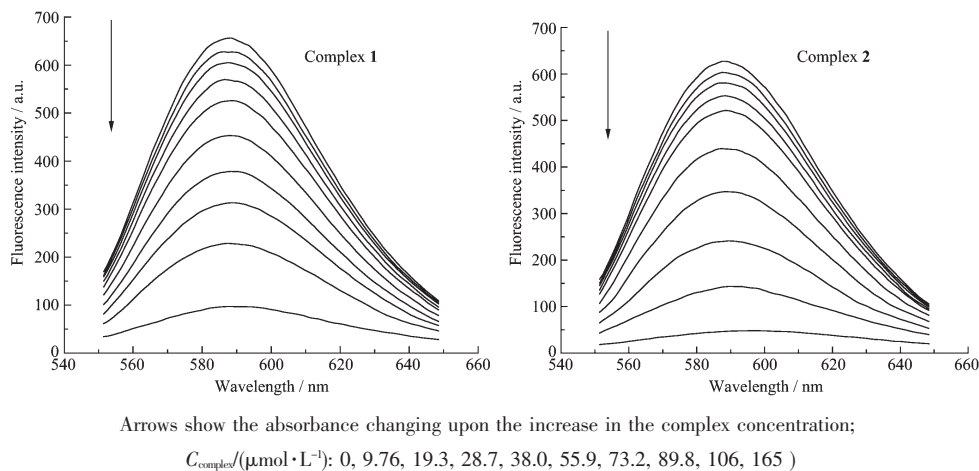


图 6 配合物对 EB-DNA 体系荧光光谱的影响

Fig.6 Effects of the complexes on the fluorescence spectra of EB-DNA system

2.4.3 配合物与 DNA 作用的粘度测定

在缺少晶体结构数据时,粘度测定是判断配合物与 DNA 作用方式的最有效的方法之一^[25]。配合物以部分插入方式与 DNA 结合时,DNA 溶液的粘度降低;以静电或沟面方式结合时,DNA 溶液的粘度变化不大;而通过经典插入方式与 DNA 作用时,DNA 溶液的粘度增加。DNA 相对粘度随配合物加入量的变化如图 7 所示。结果表明,随着配合物加

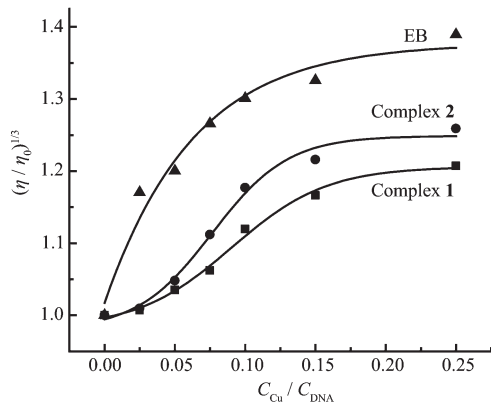


图 7 DNA 相对粘度随配合物/EB 加入量的变化

Fig.7 Effect of increasing amounts of complexes on the relative viscosity of DNA

入量增加,DNA 的相对粘度增加,表明配合物可能以经典插入方式与 DNA 作用,作用强度为:EB>配合物 2>配合物 1,与上述光谱方法测定结果一致。

2.4.4 配合物对 pBR 322 DNA 的切割作用

pBR322DNA 分子具有 3 种构型,即超螺旋(Form I)、开环缺刻(Form II)和线形(Form III)。这 3 种构型在电泳过程中迁移速率不同,其中超螺旋型最快,线型次之,开环缺刻型最慢^[26]。室温下,研究了配合物对 pBR322 DNA 的切割作用(图 8)。

结果表明,在抗坏血酸存在下, $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ 、配体(HCP,HPB,TBZ)对 pBR 322 DNA 均未显示出明显的切割作用,但 2 个配合物都能将 pBR322 DNA 共价闭环的超螺旋构型(Form I)切割成缺刻构型(Form II)。

为了进一步探索配合物对 DNA 切割的作用机制,在活性氧清除剂 DMSO 或 NaN_3 存在下,研究了配合物对 pBR322 DNA 的作用(图 9)。

由图 9 可知,在没有 DMSO 或 NaN_3 存在的条件下,配合物均能将 pBR322 DNA 切割成 II 型,而在加入 DMSO 或 NaN_3 后,带 5~8 中没有出现 II 型的 pBR322 DNA,表明配合物对 DNA 的切割活性被

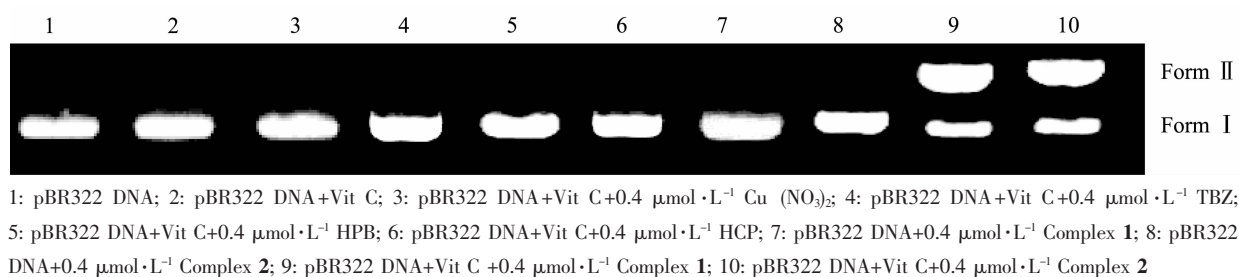


图8 配合物切割 pBR322 DNA 的凝胶电泳图

Fig.8 Agarose gel eletrophoresis for the cleavage of pBR322 DNA by the two complexes in the presence of Vit C

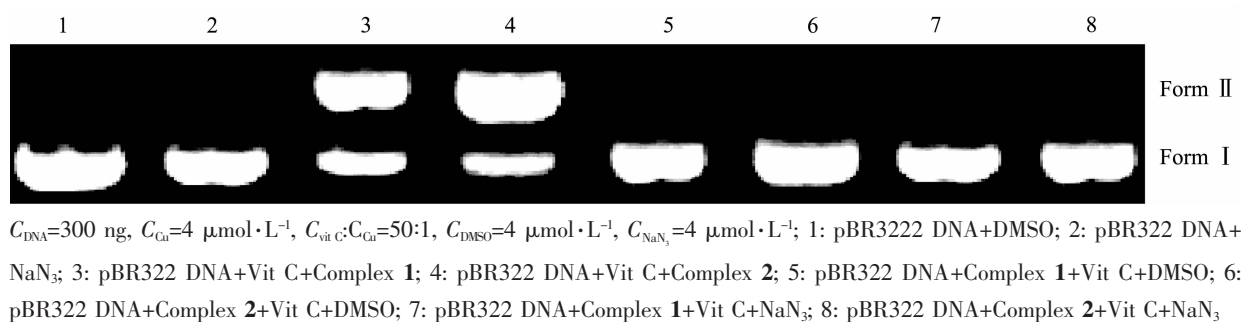


图9 加入抑制剂后配合物切割 pBR322 DNA 的凝胶电泳图

Fig.9 Cleavage of pBR322 DNA in the presence of the complexes and inhibitor DMSO or NaN₃

DMSO 或 NaN₃ 抑制。由此推测两配合物切割 pBR322 DNA 涉及到羟基自由基·OH 及单线态 ¹O₂ 等活性氧,配合物切割 pBR322 DNA 可能的反应历程如下:

首先,配合物(L)Cu(II)通过插入作用与 DNA 形成(L)Cu(II)-DNA 体系,在还原剂 Vit C 作用下,

$(\text{L})\text{Cu}(\text{II})\text{-DNA} + \text{e}^-(\text{Vit C}) \rightarrow (\text{L})\text{Cu}(\text{I})\text{-DNA}$
而(L)Cu(I)-DNA 被空气中 O₂ 氧化产生 O₂^{·-}:

$(\text{L})\text{Cu}(\text{I})\text{-DNA} + \text{O}_2 \rightarrow (\text{L})\text{Cu}(\text{II})\text{-DNA} + \text{O}_2^{\cdot-}$

配合物能催化 O₂^{·-}歧化分解为 H₂O₂ 和 O₂:

$(\text{L})\text{Cu}(\text{II}) + \text{O}_2^{\cdot-} + \text{H}^+ \rightarrow \text{O}_2 + (\text{L})\text{Cu}(\text{I})$

$(\text{L})\text{Cu}(\text{I}) + \text{O}_2^{\cdot-} + \text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + (\text{L})\text{Cu}(\text{II})$

然后,通过 Fenton 反应:

$(\text{L})\text{Cu}(\text{I}) + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow (\text{L})\text{Cu}(\text{II}) + \text{OH}^- + \cdot\text{OH}$

$(\text{L})\text{Cu}^*(\text{I}) + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow (\text{L})\text{Cu}^+ + \text{OOH}^- + \text{H}^+$

和 Haber-Weiss 反应:

$\text{O}_2^{\cdot-} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{OH}^- + \cdot\text{OH} + {}^1\text{O}_2$

产生·OH 自由基。最后,·OH 自由基进攻并切割 pBR322 DNA 双螺旋结构,类似于文献报道的结果^[27-28]。

3 结 论

本文合成了 2 个新的 HCP-Cu(II)-TBZ/HPB 型配合物。用元素分析、摩尔电导率、电子光谱、红外

光谱、单晶 X-射线衍射等方法对配合物进行了组成及结构分析;配合物分子中中心 Cu(II)离子与配体环丙沙星分子中喹啉环上的 2 个氧原子(O2、O3)、TBZ/HPB 中的 2 个氮原子(N1、N2)配位,构成了一个变形的平面正方形结构。配合物对枯草杆菌、大肠杆菌和沙门氏菌等具有良好的抑制活性,大小为:配合物 2>1,这种活性可能与其 DNA 作用有关,有关详细作用机制有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] Wolfson J S, Hooper D C. *Clin. Microbio. Rev.*, **1989**,**2**(4): 378-424
- [2] Herbold B A, Brendler-Schwaab S Y, Ahr H J. *Mut. Res., Gene. Tox. Environ. Mut.*, **2001**,**498**(1/2):193-205
- [3] Psomas G. *J. Inorg. Biochem.*, **2008**,**102**(9):1798-1811
- [4] Turel I. *Coord. Chem. Rev.*, **2002**,**232**(1):27-47
- [5] Psomas G, Tarushi A, Efthimiadou E K. *Polyhedron*, **2008**, **27**(1):133-138
- [6] WANG Guo-Ping(王国平), FU Xu-Chun(傅旭春), ZHOU Long-Guan(朱龙观). *Chinese J. Inorg. Chem.(Wuji Huaxue Xuebao)*, **2003**,**19**(9):1001-1005
- [7] Hernández-Gil J, Perelló L, Ortiz R, et al. *Polyhedron*, **2009**, **28**(1):138-144
- [8] Vieira L M M, de Almeida M V, Louren M C S, et al. *Eur. J. Med. Chem.*, **2009**,**44**(10):4107-4111

- [9] Curman D, Zivec P, Leban I, et al. *Polyhedron*, **2008**,**27**(5): 1489-1496
- [10] Yue S M, Xu H B, Ma J F, et al. *Polyhedron*, **2006**,**25**(3): 635-644
- [11] Cater M T, Rodriguez M, Bard A J. *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, **111**(24):8901-8911
- [12] Blessing R. *Acta Crystallog.*, **1995**,**A51**:33-38
- [13] Brucker AXS, SAINT+ Version 6.0, Brucker AXS, Madison, WI, USA, **1999**.
- [14] Sheldrick G M. *SHELXTL*, Version 5.10 ed., Bruker AXS Inc., Madison, Wisconsin, USA, **1997**.
- [15] Satyanarayana S, Dabrowiak J C, Chaires J B C. *Biochemistry*, **1993**,**32**(10):2573-2584
- [16] Gear W J. *Coord. Chem. Rev.*, **1970**,**7**(1):81-119
- [17] Nakamoto K. *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds*, 4th Ed. New York: John Wiley and Sons Inc., **1986**.257
- [18] Sadeek A S. *J. Mol. Struct.*, **2005**,**753**(1/2/3):1-12
- [19] Garrido N J, Perelló L, Ortiz R, et al. *J. Inorg. Biochem.*, **2005**,**99**(3):677-689
- [20] Gameiro P, Rodrigues C, Baptista T, et al. *Int. J. Pharm.*, **2007**,**334**(1/2):129-136
- [21] Ghosh K S, Sahoo B K, Jana D, et al. *J. Inorg. Biochem.*, **2008**,**102**(9):1711-1718
- [22] Chao T, Wu X F, Liu Q, et al. *Inorg. Chim. Acta*, **2004**,**357**(1):95-102
- [23] Barton J K, Danishefsky A T, Goldberg J M. *J. Am. Chem. Soc.*, **1984**,**106**(7):2172-2176
- [24] HUANG Juan(黄娟), CHEN Qiu-Yun(陈秋云), WANG Ling-Yun(王玲昀), et al. *Chinese J. Inorg. Chem. (Wuji Huaxue Xuebao)*, **2009**,**25**(6):1077-1083
- [25] Satyanarayana S, Dabrowiak J C, Chaires J B. *Biochemistry*, **1992**,**31**(39):9319-9324
- [26] Arias M S, González-álvarez M, Fernández M J, et al. *J. Inorg. Biochem.*, **2009**,**103**(6):1067-1073
- [27] DING Yang(丁杨), REN Xiang-Xiang(任祥祥), ZHUANG Chu-Xiong(庄楚雄), et al. *Chinese J. Inorg. Chem. (Wuji Huaxue Xuebao)*, **2009**,**25**(4):656-662
- [28] Jiang Q, Xiao N, Shi P F, et al. *Coord. Chem. Rev.*, **2007**, **251**(15):1951-1972