

2,4-二羟基苯甲酰肼 Cu(II)配合物的合成、表征及其 与 DNA 的相互作用研究

王 慧¹ 甘国庆¹ 瞿 阳^{*,1} 陈 浩¹ 林志东²

(¹ 华中农业大学,理学院化学系,生物化学研究所,武汉 430070)

(² 武汉工程大学,材料科学与工程学院,武汉 430070)

摘要: 合成了 2,4-二羟基苯甲酰肼缩对硝基苯甲酰肼 Cu(II)配合物,通过红外、紫外、X-射线单晶衍射对其组成结构进行了表征。配合物属单斜晶系, $C2/c$ 空间群,晶胞参数为 $a=1.573\ 6(3)$ nm, $b=0.715\ 82(14)$ nm, $c=3.171\ 2(6)$ nm, $\beta=96.631(3)^\circ$, $V=3.548\ 3(12)$ nm³, $Z=4$, $D_c=1.639$ g·cm⁻³。配合物通过弱的分子间氢键 C—H···O 构筑三维结构。利用溴化乙锭(EB)荧光猝灭分析法研究了其与小牛胸腺 DNA(ct-DNA)的相互作用。结果说明配合物与 ct-DNA 可能发生插入作用,是潜在的抗癌药物。

关键词: 2,4-二羟基苯甲酰肼缩对硝基苯甲酰肼;铜(II)配合物;晶体结构;插入作用

中图分类号: O614.121

文献标识码: A

文章编号: 1001-4861(2012)06-1217-05

Synthesis, Characterization and DNA Interactions of 2,4-Dihydroxybenzoylhydrazone Coordinated to Cu(II)

WANG Hui¹ GAN Guo-Qing¹ QU Yang^{*,1} CHEN Hao¹ LIN Zhi-Dong²

(¹Biochemical Institute, Department of Applied Chemistry, College of Science,

Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

(²School of Materials Science and Engineering, Wuhan Institute of Technology, Wuhan 430070, China)

Abstract: Cu(II) complex derived from 2,4-dihydroxybenzaldehyde *p*-nitrobenzoylhydrazone was synthesized and characterized by IR, UV-Vis and X-ray single crystal diffraction respectively. The complex crystallizes in monoclinic, space group $C2/c$ with cell parameter $a=1.573\ 6(3)$ nm, $b=0.715\ 82(14)$ nm, $c=3.171\ 2(6)$ nm, $\beta=96.631(3)^\circ$; $V=3.548\ 3(12)$ nm³, $Z=4$, $D_c=1.639$ g·cm⁻³. The complex forms 3D structure through weak hydrogen bonds C—H···O. The interaction of complex with calf thymus (CT) DNA was studied by ethidium bromide (EB) fluorescence spectroscopy. The result indicates that the interaction of this complex with ct-DNA may be intercalation, and the complex may be used as a potential antitumor drug. CCDC: 836564.

Key words: 2,4-dihydroxybenzaldehyde *p*-nitrobenzoylhydrazone; Cu(II) complex; crystal structure; intercalation

DNA 与过渡金属配合物相互作用的研究一直是生物无机化学研究领域的热门课题^[1]。深入研究 DNA 与这些靶向分子相互作用的规律,可以阐述一些抗肿瘤、抗病毒药物及致癌物的作用机理,对于体外筛选抗癌药物,以及研究抗癌药物在生物体内

治疗疾病的本质具有重要意义^[2-4]。酰肼类化合物因其含有 -CO-NH-N=C- 基团具有很强的配位能力、它是以氮和氧原子为配位原子,与生物环境较接近,与金属离子形成的配合物可抑制许多酶催化反应,故酰肼配位后生物活性明显增加,不但具有抗癌、

收稿日期:2011-09-25。收修改稿日期:2012-03-03。

中央高校基本科研业务费专项资金(No.52902-0900202115)资助项目。

*通讯联系人。E-mail: doctor-qu@126.com

抑止肿瘤的作用,还有抗菌、抗病毒等特殊的生物活性^[5-8]。铜是生命必需的微量元素之一,在生命体系中,铜的配合物广泛存在,由于铜具有可变价态,在生命中可以参与电子的传递,氧化还原等一系列过程,具有特殊的生物活性。因此研究酞肟铜配合物与DNA的结合方式对研究过渡金属配合物的生物学作用具有重要意义。本文以对硝基苯甲酸为原料合成了2,4-二羟基苯甲醛缩对硝基苯甲酞肟铜配合物[CuL(DMF)]。通过X-单晶衍射确定了配合物结构,并通过荧光猝灭光谱法考察了其与人DNA的作用模式。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

溴化乙锭(EB,上海国药集团)、三羟甲基氨基甲烷(Tris,天津博迪化工公司)、小牛胸腺DNA(ct-DNA,上海索宝生物科技有限公司)。缓冲溶液含有5 mmol·L⁻¹ Tris和50 mmol·L⁻¹ NaCl的水溶液,用HCl调节pH=8.0。小牛胸腺DNA的浓度以 $\varepsilon_{260}=6600 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ 来确定。

对硝基苯甲酸乙酯参照文献^[9]的方法合成。产率:87%;IR(KBr, cm⁻¹):3 119(w, Ar-H),3 057,2 990,(w, C-H),1 716(s, C=O),1 282(m, -NO₂)。

对硝基苯甲酞肟的合成参照文献^[10],所需原料对硝基苯甲酸乙酯由本实验室合成。产率:74%。IR(KBr, cm⁻¹):3 331 (m, -NH₂),3 107 (w, Ar-H),1 519(s, C=O),1 343(m, -NO₂)。

Elementar Vario EL 元素分析仪。Perkin-Elmer 983 型红外光谱仪;UV-2450 型紫外-可见分光光度计;武汉高仕睿联 EC550 电化学工作站;岛津 RF-5301 型荧光光谱仪;SMART APEX CCD 型 X-射线单晶衍射仪。

1.2 配体(H₂L)的合成

配体的合成:将1.93 g(14 mmol) 2,4-二羟基苯甲醛与2.54 g (14 mmol) 对硝基苯甲酞肟在70 mL 无水乙醇中搅拌回流3 h,有橘黄色固体析出,冷却、抽滤、乙醇洗涤,得橘黄色粉末。真空干燥至恒重,产率:90%。计算得到配体化学式为C₁₄H₁₁N₃O₅,理论值(%):C 55.81,H 3.65,N 13.95,实验值(%):C 54.67,H 4.85,N 13.77。

1.3 配合物的合成

称取15 mg (0.05 mmol) 的配体溶于5 mL 的DMF中,加入5 mL 含有18 mg (0.05 mmol) CuSO₄·

5H₂O 的DMF溶液中,充分振荡,室温下静置。约一个星期后发现黑色的晶体析出。元素分析,实验值(%):C 45.56,H 4.81,N 11.58,计算得到配合物化学式为C₁₇H₁₆CuN₄O₆,理论值(%):C 45.10,H 3.45,N 11.87。

1.4 晶体结构测定

选取大小0.16 mm×0.12 mm×0.10 mm 配合物单晶,在295(2) K 放置于Bruker SMART APEX CCD 衍射仪上,用Mo K α 射线($\lambda=0.071\ 073 \text{ nm}$),以 φ - ω 扫描方式在 $5.19^\circ\leq 2\theta\leq 56^\circ$ 范围内共收集13 043 个衍射点。其中独立衍射点4 420($R_{\text{int}}=0.037\ 2$)。3 513 个 $I\geq 2\sigma(I)$ 的可观测衍射点用于结构解析。全部数据经 L_p 因子和经验吸收校正。晶体结构采用直接法解析。对所有非氢原子坐标和各项异性温度因子采用了全矩阵最小二乘法修正。该化合物属于单斜晶系,C2/c 空间群,晶胞参数: $a=1.573\ 6(3) \text{ nm}$, $b=0.715\ 82(14) \text{ nm}$, $c=3.171\ 2(6) \text{ nm}$, $\beta=96.631(3)^\circ$, $V=3.548\ 3(12) \text{ nm}^3$, $Z=4$, $D_c=1.639 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$, $F(000)=1\ 784$, $R_1=0.056\ 2$, $wR_2=0.129\ 8$, $(I>2\sigma(I))$,GOF=1.067,残余电子密度最高峰和最低峰分别为 $(\Delta\rho)_{\text{max}}=611 \text{ e}\cdot\text{nm}^{-3}$, $(\Delta\rho)_{\text{min}}=-357 \text{ e}\cdot\text{nm}^{-3}$ 。

CCDC:836564。

1.5 配合物与DNA 相互作用荧光猝灭实验

用EB 水溶液预处理ct-DNA 的缓冲溶液。将二者混合物置于暗处30 min 以上,使其充分反应。在样品池中加入2~3 mL 的EB-DNA 复合物,每次往样品池中加入250 μL 浓度为 $3.88\times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 配合物溶液,直到荧光强度不再明显变化为止。在激发波长为522 nm,发射波长为540~650 nm 的条件下测定荧光数据。

2 结果与讨论

2.1 红外光谱与紫外光谱

由IR 数据(见表1)可知,配合物在1 667 cm⁻¹ 的强吸收峰是酰胺的C=O 伸缩振动,在形成配合物后发生了明显的红移。配合物在1 625 cm⁻¹ 处的较强吸收峰,归属于C=N 的伸缩振动,与自由配体C=N 的伸缩振动峰1 618 cm⁻¹ 比较,红移7 cm⁻¹,表明配体上的亚胺基上的N 原子与Cu(II)离子发生了配位作用^[11]。配体的Ar-O 伸缩振动峰出现在1 262 cm⁻¹ 和1 220 cm⁻¹ 处,形成配合物后1 220 cm⁻¹ 处的吸收峰蓝移至1 230 cm⁻¹,可能是配体中的一个酚羟基上的氧原子参与了配位作用导致酚氧键增

表 1 配体和配合物的红外特征吸收峰
Table 1 IR spectral data of ligand and complex

	$\nu(\text{C}=\text{O})$	$\nu(\text{C}=\text{N})$	$\nu(\text{Ar}-\text{O})$	$\nu(\text{M}-\text{O})$	$\nu(\text{M}-\text{N})$
H_2L	1 667	1 625	1 262; 1 220		
$[\text{CuL}(\text{DMF})]$	1 650	1 618	1 265; 1 230	570	465

强^[12]。另外,配合物在 465 和 570 cm^{-1} 处出现了 N-Cu 吸收峰和 O-Cu 吸收峰,进一步说明了配体上的氧原子和氮原子与金属离子发生了配位作用。

配体和配合物的紫外光谱在甲醇溶液(浓度为 $4 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)中,在 200~600 nm 的范围内进行扫描。配体和配合物的紫外光谱如图 1 所示,配体在 203、241、291 和 344 nm 有 4 个主要的吸收峰,配合物也有 4 个主要吸收峰分别为:203、258、311 和 408 nm。

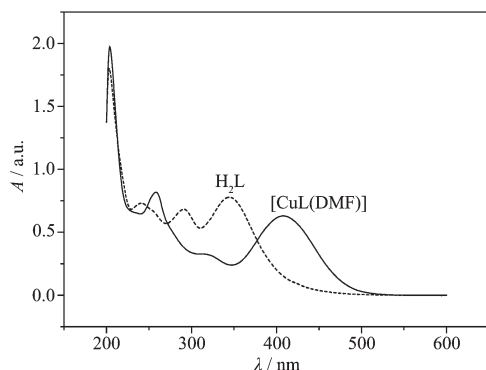


图 1 配体和配合物的紫外吸收光谱

Fig.1 UV-Vis spectral of ligand and the complex

203 nm 处的吸收峰归属于苯环的 E_2 带吸收^[13],配位前后无变化。

酰肼配体在紫外区 241、291 nm 处的吸收峰归属为亚胺基团 $\text{C}=\text{N}$ 的 $n-\pi^*$ 跃迁和 $\pi-\pi^*$ 电子跃迁^[14],配位后移至 258、311 nm,发生明显的红移现象,这两处红移可能是由于配体上的亚胺 N 原子与 Cu^{2+} 发生了配位,导致共轭体系的共轭性增大。

配合物中出现 400 nm 以上的新吸收带,可认为是 M-L 间的电荷跃迁。

2.2 晶体结构描述

配合物的晶体结构见图 2,部分键长键角数据列于表 2。X-单晶衍射测定结果表明:该配合物的分子式为 $[\text{CuL}(\text{DMF})]$,属单斜晶系, $C2/c$ 空间群。中心 $\text{Cu}(\text{II})$ 离子采用四配位形式与 1 个失去质子的 2,4-二羟基苯甲酰肼缩对硝基苯甲酰肼配体和 1 个 DMF 分子配位。配体上的酚羟基失去 2 个质子与 Cu^{2+} 保持电荷平衡。该配体 L 为三齿配体,分别通过羰基

氧 O(3),亚氨基氮 N(3)和酚羟基氧 O(4)与铜离子进行配位,形成了稳定的五元环和六元环结构,即 $\text{Cu}(1)-\text{O}(3)-\text{C}(7)-\text{N}(2)-\text{N}(3)$ 和 $\text{Cu}(1)-\text{O}(4)-\text{C}(10)-\text{C}(9)-\text{C}(8)-\text{N}(3)$ 。O(4)、O(5)、O(3)、N(3)组成了以铜离子为中心的不规则的平面四边形。 $\text{Cu}(1)-\text{O}(4)$ 、 $\text{Cu}(1)-\text{O}(3)$ 、 $\text{Cu}(1)-\text{O}(5)$ 键长分别为 1.888(2)、1.918(2)、1.949(2) nm, $\text{Cu}(1)-\text{N}(3)$ 的键长为 1.910(3) nm。四边形的对角线夹角 $\text{O}(4)-\text{Cu}(1)-\text{O}(3)$ 、 $\text{N}(3)-\text{Cu}(1)-\text{O}(5)$ 的键角分别为 $176.12(9)^\circ$ 和 $174.78(10)^\circ$ 。铜离子仅偏离 4 个配位原子最小二乘面 0.006 4 pm。配合物通过分子间弱的 $\text{C}-\text{H} \cdots \text{O}$ 氢键(见图 3): $\text{C}(11)-\text{H}(11) \cdots \text{O}(6)^A$ 3.192(4), $\text{C}(11)-\text{H}(11) \cdots \text{O}(6)^B$ 3.192(4), $\text{C}(17)-\text{H}(17C) \cdots \text{O}(6)^C$ 3.325(5)形成了三维网状结构。有关分子间弱的 $\text{C}-\text{H} \cdots \text{O}$ 氢键的键长和键角数据见表 3。

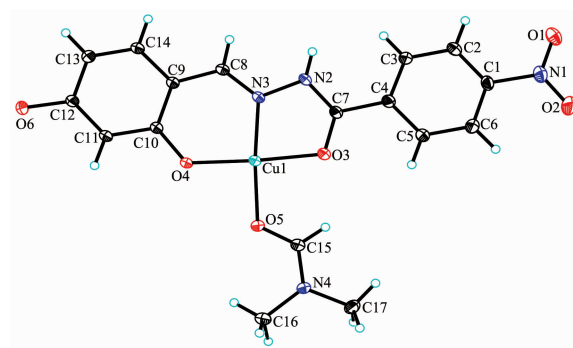
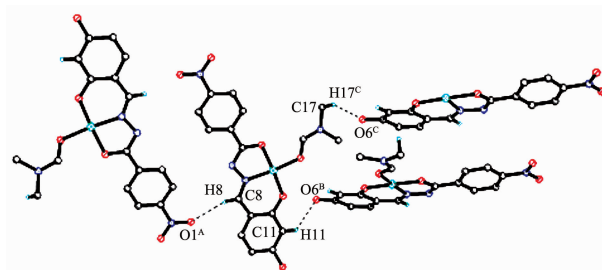


图 2 标题配合物的分子结构

Fig.2 Molecular structure of the title complex, show the atom-labing scheme and 30% thermal ellipsoids



Dashed lines show weak weak hydrogen bonds: $\text{C}-\text{H} \cdots \text{O}$; symmetry codes: ^A $1-x, 1-y, -z$; ^B $1/2-x, -1/2+y, 1/2-z$; ^C $1/2-x, -3/2+y, 1/2-z$

图 3 标题配合物的分子间弱的氢键

Fig.3 Weak hydrogen bonds in title complex

表 2 配合物的部分化学键的键长与键角

Table 2 Selected bond lengths (nm) and bond angles ($^{\circ}$) of the title complex

Cu(1)-O(4)	0.188 8(2)	Cu(1)-N(3)	0.191 0(3)	Cu(1)-O(3)	0.191 8(2)
Cu(1)-O(5)	0.194 9(2)	C(7)-O(3)	0.129 6(4)	C(10)-O(4)	0.133 1(3)
C(15)-O(5)	0.124 5(4)	C(7)-N(2)	0.131 4(4)	C(8)-N(3)	0.129 0(4)
C(15)-N(4)	0.129 8(4)				
O(4)-Cu(1)-N(3)	95.01(10)	O(4)-Cu(1)-O(3)	176.12(9)	N(3)-Cu(1)-O(3)	81.11(10)
O(4)-Cu(1)-O(5)	90.18(9)	N(3)-Cu(1)-O(5)	174.78(10)	O(3)-Cu(1)-O(5)	93.70(10)

表 3 配合物的氢键的键长与键角

Table 3 Hydrogen bond lengths and bond angles of the title complex

D-H $\cdots$ A	d(D-H) / nm	d(H $\cdots$ A) / nm	d(D $\cdots$ A) / nm	$\angle$ DHA($^{\circ}$)
C(8)-H(8) $\cdots$ O(1) ^A	0.093	0.255	0.344 1(4)	160
C(11)-H(11) $\cdots$ O(6) ^B	0.093	0.251	0.319 2(4)	131
C(17)-H(17C) $\cdots$ O(6) ^C	0.096	0.248	0.332 5(5)	147

Symmetry codes: ^A 1-x, 1-y, -z; ^B 1/2-x, -1/2+y, 1/2-z; ^C 1/2-x, -3/2+y, 1/2-z.

2.3 配合物与 DNA 相互作用的稳态荧光淬灭研究

荧光淬灭实验可用来检测配合物与 DNA 相互作用。这一方法可作为配合物与 DNA 作用强弱的一种判据。

溴化乙锭(EB)是 DNA 常用的荧光探针。它可以插入到 DNA 双链的碱基对之间,使其发出红色荧光。EB-DNA 复合物中,EB 发出的荧光比游离的 EB 试剂本身的荧光强度大 10 倍^[15]。用 Tris 缓冲溶液配制 EB-DNA 复合体系($c_{\text{DNA}}=8.83\times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $c_{\text{EB}}=4.02\times 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。将配合物逐步滴加到 EB-DNA 复合体系中,相应的系列滴定曲线如图 4 所示。随着配合物的不断加入,EB-DNA 复合体系在 590 nm 处的荧光逐步淬灭。当配合物与 DNA 发生有效结合后,EB 从 EB-DNA 复合体系中解离下来,成为游

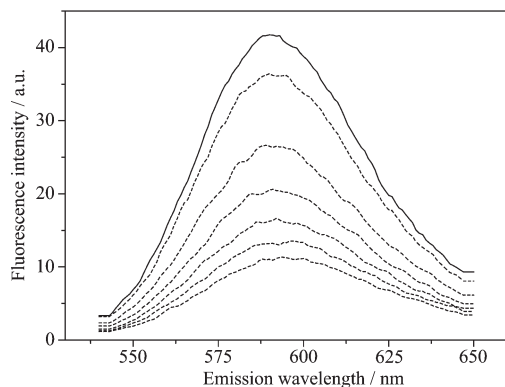


图 4 配合物的 EB-DNA 荧光滴定图谱

Fig.4 Fluorescence plots for EB-DNA titrated by title complex

离的溴化乙锭分子,说明配合物很可能与 EB 和 DNA 相互作用的方式相同,即为插入作用。

以加入和不加入淬灭剂(配合物)的 EB-DNA 复合体系发光强度的比值 F_0/F 为纵坐标。淬灭剂浓度为横坐标。作出 Stern-Volmer 曲线^[16]。如图 5 所示。自由配合物的淬灭曲线基本满足 $F_0/F=1+K_{\text{sv}}Q_c$ 。

Q_c :代表淬灭剂的浓度, K_{sv} :是 Stern-Volmer 淬灭常数,其在数值上等于滴定实验 F_0/F 对 Q_c 拟合线的斜率与截距的比值。

本实验由 F_0/F 对 Q_c 作图得到如图 5 的一条直线($R=0.991$),得到的 $K_{\text{sv}}=5.76\times 10^5 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$ 。

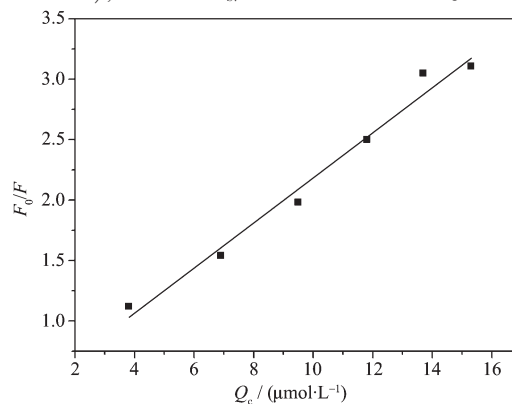


图 5 配合物的 Stern-Volmer 图

Fig.5 Stern-Volmer plots for complex

参考文献:

- [1] LIU Jing-Gang (刘劲刚), JI Nian-Liang (计亮年). *Chinese J. Inorg. Chem. (Wuji Huaxue Xuebao)*, **2000**, *16*(2):195-203

- [2] LIN Qiu-Yue(林秋月), HU Rui-Ding(胡瑞定), ZHENG Xiao-Hua (郑孝华). *Spectrosc. Spect. Anal. (Guangpuxue Yu Guangpu Fenxi)*, **2004**,**28**(8):988-990
- [3] Nair M S, Arish D, Joseyphus R S. *Journal of Saudi Chemical Soci.*, **2012**,**16**(1):83-88
- [4] SONG Yu-Ming(宋玉民), KANG Jin-Wan(康敬万), GAO Jin-Zhang(高锦章). *Chinese J. Inorg. Chem. (Wuji Huaxue Xuebao)*, **2000**,**16**(1):53-57
- [5] Ainscough E W, Brodie A. M, Dobbs A J, et al. *Inorg. Chim. Acta*, **1998**,**267**(1):27-38
- [6] Nawar N, Hosny N M. *Trans. Met. Chem.*, **2000**,**25**(1):1-8
- [7] Satyanarayan P, Samudranil P J. *Chem. Crystal*, **2000**,**30**(5): 329-333
- [8] Satyanarayan P, Samudranil P J. *Dalton Trans.*, **2002** (9): 2102-2108
- [9] CHEN Dan-Dan(陈丹丹), NIE Liang-Deng(聂良邓), REN Xu-Kang(任旭康), et al. *Journal of Zhejiang University of Science and Technology (Zhejiang Keji Xueyuan Xuebao)*, **2006**,**18**(4):277-279
- [10] LI De-Jiang(李德江), HUANG Ming-Quan(黄明权), GE Zheng-Hong(葛正红). *Fine Chemicals (Jingxi Huagong)*, **2005**,**22**(4):283-286
- [11] LU Wen-Guan(卢文贯), PENG Cui-Hong(彭翠红), LIU Hong-Wen(刘宏文), et al. *Chinese J. Inorg. Chem. (Wuji Huaxue Xuebao)*, **2003**,**19**(11):1222-1226
- [12] WANG Ming-Ming(王明明), XIE A-Gui(谢阿贵), WANG Hui(王慧), et al. *Chinese J. Inorg. Chem. (Wuji Huaxue Xuebao)*, **2009**,**25**(5):942-945
- [13] Golcu A, Tumer M, Demirelli H, et al. *Inorganica Chimica Acta*, **2005**,**358**(6):1785-1797
- [14] YU Zhi-Gang(俞志刚), LIU Bo(刘波), JIANG Zhao-Hua(姜兆华). *Chinese J. Org. Chem. (Youji Huaxue)*, **2009**,**29**(8): 1217-1222
- [15] LU Sheng-Dong(卢圣栋). *Current Protocols for Molecular Biology* (现代分子生物学实验技术). Beijing: Higher Education Press, **1993**.
- [16] LIU Mi(刘敏), YUAN Wen-Bing(袁文兵), ZHANG Qi(张岐), et al. *Chinese J. Appl. Chem. (Yingyong Huaxue)*, **2008**,**25** (10):1193-1196