

2,4-二氨基-6-(2'-吡啶基)均三嗪铜(II)配合物的结构、 抗菌活性及 DNA 作用

区志斌¹ 黄山华¹ 傅夏兵¹ 朱 丽¹ 乐学义^{*,1,2}

(¹ 华南农业大学理学院应用化学系, 广州 510642)

(² 华南农业大学生物材料研究所, 广州 510642)

摘要: 通过 2,4-二氨基-6-(2'-吡啶基)均三嗪和高氯酸铜(II)反应合成了一个配合物: $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})(\text{PyTA})_2](\text{ClO}_4)_2$ [PyTA=2,4-二氨基-6-(2'-吡啶基)均三嗪]。通过元素分析、红外光谱、紫外可见光谱、摩尔电导率和 X-射线单晶衍射等方法对其进行了表征。结果表明该配合物晶体属单斜体, $P2_1/c$ 空间群, 其晶体学参数: $a=0.980\ 24(6)\ \text{nm}$, $b=1.248\ 31(7)\ \text{nm}$, $c=2.157\ 27(11)\ \text{nm}$; $\beta=108.657(3)^\circ$; $Z=4$, $V=2.501\ 0(2)\ \text{nm}^3$, $R_1=0.054\ 3$, $wR_2=0.1506$ 。另外, 应用试管二倍稀释法测定了配合物的抗菌活性, 通过电子吸收光谱、荧光光谱、粘度测定及琼脂糖凝胶电泳等方法研究了配合物与 DNA 的作用。结果表明, 与 2,4-二氨基-6-(2'-吡啶基)均三嗪相比较, 该配合物具有良好的抗菌活性, 以插入模式与 CT-DNA 作用, 并且在抗坏血酸存在下通过羟基自由基 $\cdot\text{OH}$ 切割 pBR322DNA。

关键词: 铜(II)配合物; 2,4-二氨基-6-(2'-吡啶基)均三嗪; 晶体结构; 抗菌活性; DNA

中图分类号: O614.121 文献标识码: A 文章编号: 1001-4861(2014)05-1017-08

DOI: 10.11862/CJIC.2014.177

Structure, Antibacterial Activities and DNA Interaction of a Copper(II) Complex Derived from 2,4-Diamino-6-(2'-pyridyl)-1,3,5-triazine

OU Zhi-Bin¹ HUANG Shan-Hua¹ FU Xia-Bing ZHU Li¹ LE Xue-Yi^{*,1,2}

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

(²Institute of Biomaterial, South China Agricultural University, Guangzhou, 510642)

Abstract: A copper(II) complex: $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})(\text{PyTA})_2](\text{ClO}_4)_2$ [PyTA=2,4-diamino-6-(2'-pyridyl)-1,3,5-triazine], was synthesized and characterized by elemental analysis, molar conductivity, IR, UV-Vis and single crystal X-ray diffraction. The crystal belongs to monoclinic, space group $P2_1/c$, with the crystal cell parameters: $a=0.980\ 24(6)\ \text{nm}$, $b=1.248\ 31(7)\ \text{nm}$, $c=2.157\ 27(11)\ \text{nm}$; $\beta=108.657(3)^\circ$; $Z=4$, $V=2.501\ 0(2)\ \text{nm}^3$, $R_1=0.054\ 3$, $wR_2=0.150\ 6$. The complex was assayed against gram-positive (*S. aureus*, *B. subtilis*, *B. thuringiensis*) and gram-negative (*X. oryzae*, *Salmonella*, *E. coli*) bacteria by doubling dilutions method, and the interaction of the complex to DNA was investigated by electronic absorption, fluorescence, viscosity measurement and agarose gel electrophoresis assay. The results showed that the complex has good antibacterial activities, and could bind to CT-DNA by an intercalative mode, and cleave pBR322 DNA by hydroxyl radicals as the active species in the presence of Vit C. CCDC: 826631, $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})(\text{PyTA})_2](\text{ClO}_4)_2$.

Key words: copper(II) complex; 2,4-diamino-6-(2'-pyridyl)-1,3,5-triazine; crystal structure; antibacterial activity; DNA

铜是重要的生命元素。尤其是当铜离子形成配合物时,可进一步提高和丰富其生物活性,如与生物

配体(氨基酸、小肽、蛋白质、核苷酸和核酸等)形成稳定的混配配合物,在生命过程中(酶的催化、物质

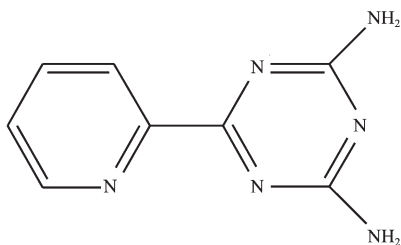
收稿日期:2013-05-05。收修改稿日期:2013-12-21。

华南农业大学 211 工程重点项目(No.2009B 010100001)。

*通讯联系人。E-mail:lexyfu@163.com;会员登记号:S060000184M。

的储存和运送以及铜离子的转运等)起着极其重要的作用^[1];与芳胺形成的配合物对 DNA 具有识别作用,显示出抗菌、抗病毒、抗氧化和抗癌生物活性等^[2-9],已成为生物无机化学界热门研究领域。

2,4-二氨基-6-(2'-吡啶基)-均三嗪(PyTA)(Scheme 1)具有类似于芳胺邻菲咯啉的配位性质,并且具有类似 DNA 碱基的结构,对生物分子具有良好的识别作用,因此研究该化合物铜配合物具有重要意义。本文通过 2,4-二氨基-6-(2'-吡啶基)均三嗪与高氯酸铜(II)反应合成了一个配合物:[Cu(H₂O)(PyTA)₂](ClO₄)₂ [PyTA=2,4-二氨基-6-(2'-吡啶基)均三嗪]。采用试管二倍稀释法测定了该配合物的抗菌活性,并用电子吸收光谱、荧光光谱、粘度测定及琼脂糖凝胶电泳等方法研究了配合物与 DNA 的作用。



Scheme 1 Molecular structure of 2,4-diamino-6-(2'-pyridyl)-1,3,5-triazine

1 实验部分

1.1 材料与仪器

2,4-二氨基-6-(2'-吡啶基)均三嗪按照文献方法^[10]合成。三羟甲基氨基甲烷、营养肉汤、抗坏血酸(Vit C)、溴化乙啶(EB)、小牛胸腺 DNA(CT-DNA)、Gold View、溴酚蓝、琼脂糖凝胶和 pBR322 质粒 DNA 为生化试剂,其它试剂为市售分析纯。研究配合物与 DNA 相互作用时,采用 Tris-HCl/NaCl 缓冲溶液(10 mmol·L⁻¹ Tris+50 mmol·L⁻¹ NaCl, pH=7.2)及 TBE 电泳缓冲液(4.5×10⁻² mol·L⁻¹ Tris+4.5×10⁻² mol·L⁻¹ H₃BO₃+1 mol·L⁻¹ EDTA, pH=8.3), CT-DNA 经 UV 谱测定 A₂₆₀/A₂₈₀>1.8, 浓度以 ε₂₆₀=6 600 L·mol⁻¹·cm⁻¹ 确定。试验所用菌株金黄色葡萄球菌 (*S. aureus*,

G+), 枯草杆菌(*B. subtilis*, G+), 苏云金芽孢杆菌(*B. thuringiensis*, G+), 沙门氏杆菌(*Salmonella*, G-), 水稻条斑病细菌(*X. oryzae*, G-)和大肠杆菌(*E. coli*, G-)由华南农业大学农学院-广东省植物分子育种重点实验室提供。整个实验过程均使用二次蒸馏水。

Vario EL 元素分析仪, ELEMENTAR 公司; Image Plate 衍射仪, 日本株式会社理学; ACATAR 360 FTIR 型红外光谱仪(KBr 压片), 美国 Nicolet 公司; Shimadzu UV-2550 型紫外/可见分光光度计, 日本 Shimadzu 公司; DDS-12A 型电导率仪, 上海宇隆仪器有限公司; F-4500 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; 凝胶成像系统, 意大利 BIO-RAD Laboratories-Segrate。

1.2 配合物合成

称取 1.0 mmol PyTA 溶于 20 mL 无水乙醇中, 加热搅拌下加入 1.0 mL 0.5 mol·L⁻¹ Cu(ClO₄)₂ 水溶液, 反应 15 min, 调节 pH 值至 3.8 左右, 加热搅拌回流 30 min; 反应结束后, 将混合液冷却至室温, 过滤, 静置滤液, 4 d 后析出深绿色晶体。过滤并依次用少量水、乙醇洗涤, 空气中干燥后置于干燥器中保存。IR(KBr), ν/cm⁻¹: 3 474 (s, br), 3 352 (w), 3 237 (w), 3 178 (w), 1 662 (w), 1 587 (w); UV-Vis, λ/nm (ε / (L·mol⁻¹·cm⁻¹)): 275 (89 983), 742 (127); 元素分析, Found(%): C, 25.38; H, 2.80; N, 29.40; Calcd. for C₁₆H₁₈CuCl₂N₁₂O₉ (%): C, 25.57; H, 2.74; N, 29.23。Λ(甲醇)/(S·cm²·mol⁻¹): 197.5。

1.3 晶体结构测定

选取大小为 0.15×0.20×0.25 mm³ 的晶体置于 Image Plate 衍射仪上, 以石墨单色化的 Mo Kα(λ=0.071 073 nm)辐射为光源, 在 293(2) K 下以 φ-ω 扫描方式收集数据。在 3.1°~25.5° 范围内收集到 12 981 个衍射数据, 其中独立衍射点(R_{int}=0.051)和 I≥2σ(I)的可观察点分别为 4 643 和 4 501 个。吸收校正、数据收集、晶胞修正和数据还原均采用 PROCESS-AUTO^[11]。晶体结构用直接法解出, 氢原子为理论加氢, 对非氢原子坐标及其各向异性热参数进行了全矩阵最小二乘法修正。所有计算均由

表 1 配合物[Cu(H₂O)(PyTA)₂](ClO₄)₂ 的晶体学数据
Table 1 Crystallographic data for [Cu(H₂O)(PyTA)₂](ClO₄)₂

Empirical formula	C ₁₆ H ₁₈ Cl ₂ CuN ₁₂ O ₉	F(000)	1 332
Formula weight	656.87	Crystal size / mm ³	0.15×0.20×0.25
Crystal system	Monoclinic	θ range for data collection / (°)	3.1 to 25.5
T / K	293(2)	Index ranges	-11≤h≤11; -14≤k≤15; -20≤l≤26

Continued Table 1

λ / nm	0.710 73	Reflections collected	12 981
Space group	$P2_1/c$	Independent reflections	4 643
a / nm	0.980 24(6)	R_{int}	0.051
b / nm	1.248 31(7)	Refinement method	Full-matrix least-squares on F^2
c / nm	2.157 27(11)	Data / restraints / parameters	450 1/0/434
β / °	108.657(3)	Goodness-of-fit on F^2	1.09
V / nm ³	2.501 0(2)	Final R indices [$I > 2\sigma(I)$]	$R_1=0.054\ 3$, $wR_2=0.150\ 6$
Z	4	R indices (all data)	$R_1=0.059\ 9$, $wR_2=0.164\ 3$
D_c / (g·cm ⁻³)	1.745	Largest diff. peak and hole / (e·nm ⁻³)	-46 and 142
μ / mm ⁻¹	1.161		

SHELX-97 程序完成^[12]。有关晶体学数据见表 1。

CCDC:826631, [Cu(H₂O)(PyTA)₂](ClO₄)₂.

1.4 抗菌试验

化合物抗菌活性用试管二倍稀释法测定,具体操作过程参照我们以前的报道^[13]。

1.5 配合物与 DNA 作用实验方法

1.5.1 电子吸收光谱测定

首先,用 Tris-HCl/NaCl 缓冲溶液作为空白对照液测定配合物在 200~400 nm 范围内的电子吸收光谱。然后,依次用微量加样器往空白池和样品池中加入等体积的 CT-DNA 溶液,使 DNA 与配合物的浓度比值不断增加,室温下反应 6 min 后在上述波长范围内扫描。

1.5.2 荧光光谱测定

将溴化乙啶(EB)与 CT-DNA 加入到 5 mL Tris-HCl/NaCl 缓冲溶液中,放置 4 h。在扫描速度为 240 nm·s⁻¹ 和激发波长为 525 nm 的条件下,测定 EB-CT-DNA 体系在 550~650 nm 波长区间的荧光强度。然后,依次增加配合物浓度,室温下反应 5 min 后在上述同样波长范围内扫描。

1.5.3 粘度测定

CT-DNA 浓度恒定为 0.2 mmol·L⁻¹ 下依次加大配合物浓度。待配合物与 CT-DNA 溶液混合均匀后,在 29.0 °C 恒温水槽中用乌氏粘度计测定其粘度。相对粘度据公式 $\eta=(t-t_0)/t_0$ (t 为含不同浓度配合物的 DNA 溶液流经毛细管所需的时间,而 t_0 为缓冲溶液流经毛细管所需时间)计算。最后,以 $(\eta/\eta_0)^{1/3}$ 对 $c_{\text{Complex}}/c_{\text{DNA}}$ (η_0 为未加配合物时 DNA 溶液的比粘度)作图。

1.5.4 琼脂糖凝胶电泳实验

混合 pBR322 DNA(200 ng)与不同浓度的配合物以及 50 倍于配合物浓度的还原剂抗坏血酸(Vit

C),然后用 Tris-HCl/NaCl 缓冲溶液定容至 17 μL 。28 °C 下,将上述定容液静置 2 h,随后加入 3 μL Loading buffer(含 0.25% 溴酚蓝和 50% 甘油的水溶液)使反应终止,并在 0.8% 琼脂糖凝胶和 TBE 电泳液(45 mmol·L⁻¹ Tris+45 mmol·L⁻¹ H₃BO₃+1 mol·L⁻¹ EDTA, pH=8.3) 中电泳 (100 V) 40 min。采用 Gold View(4~5 μL)作为凝胶着色剂,溴酚蓝作为电泳过程指示剂,电泳结果在 BIO-RAD 紫外检测仪下观察并拍照。

在探索配合物切割 DNA 作用机理实验中,先分别将二甲基亚砜(DMSO, 4 μL)、2,2,6,6-四甲基-4-哌啶酮(TMP, 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)和 NaN₃(100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)与 pBR322 DNA(200 ng)混合作用 15 min,再加入配合物及抗坏血酸(Vit C),在 37 °C 下放置 30 min 后再加入 3 μL Loading buffer 终止反应,然后在 0.8% 琼脂糖凝胶和 TBE 电泳液中电泳(100 V) 40 min。电泳结果使用 BIO-RAD 凝胶成像系统观察并拍照。

2 结果与讨论

2.1 配合物表征

测得配合物在甲醇溶液中(1.0 mmol·L⁻¹)的摩尔电导率为 197.5 S·cm²·mol⁻¹,表明该配合物为 1:2 型电解质^[14],与单晶 X-射线测定结果一致。

在配合物红外光谱中,3 474 cm⁻¹ 处弱而宽吸收带归属于配位水的 ν_{OH} ^[15],3 352,3 237 和 3 178 cm⁻¹ 处吸收带归属于 2,4-二氨基-6-(2'-吡啶基)均三嗪中-NH₂ 基团的 $\nu_{\text{N-H}}$;此外,1 440 cm⁻¹ 处弱吸收可归属于 2,4-二氨基-6-(2'-吡啶基)均三嗪芳环上的 C=N 的 $\nu_{\text{C=N}}$ ^[16]。

在配合物甲醇溶液的紫外可见光谱中,紫外区 303 nm 处强吸收峰归属于配体 2,4-二氨基-6-(2'-吡

啉基)均三嗪芳环的 π - π^* 跃迁,而 742 nm 处弱而宽的吸收峰可归因于配合物分子中中心 Cu(II)离子的 d - d 跃迁。

2.2 配合物晶体结构

配合物属于单斜晶系, $P2_1/c$ 空间群。晶体由配阳离子 $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})(\text{PyTA})_2]^{2+}$ 和阴离子 ClO_4^- 堆积而成。配合物分子结构如图 1 所示,部分键参数列于表 2 中。

在配合物分子中,每个中心 Cu(II)离子与 2 个 PyTA(1 个吡啶 N 和 1 个均三嗪 N)配体、1 个 $\text{H}_2\text{O}(\text{O})$ 作用形成五配位的变形三角双锥构型。其中 2 个

PyTA 配体吡啶 N 和配位水处于三角双锥平面上,而 2 个 PyTA 配体的均三嗪 N 位于轴向配位。中心 Cu(II)离子与 PyTA 键合较强, Cu1-N1 、 Cu1-N2 、 Cu1-N7 和 Cu1-N8 键长分别为 0.198 5 (3)、0.205 4(3)、0.198 4(3)和 0.207 6(3) nm。 Cu1-O1W 键长为 0.219 0(3) nm,表明配体 H_2O 对中心铜离子(II)结合能力较 PyTA 弱,但比芳胺-铜(II)- L - α -氨基酸型配合物中 Cu(II)-O(水)键(>0.225 nm)^[13,16-19]要强。晶体结构中两个高氯酸根同时存在着比较严重的无序现象,两套无序位置所占的比例分别为 53%和 47%。

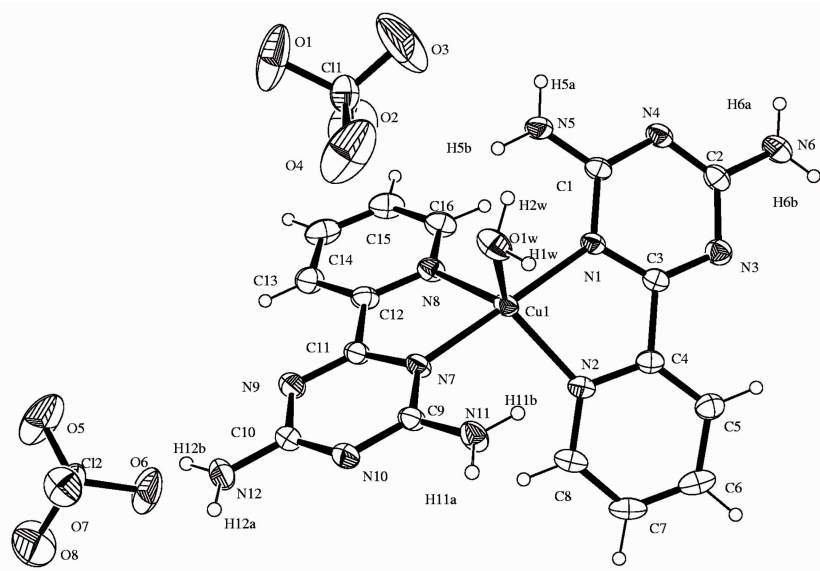


图 1 配合物分子结构(椭球几率为 30%)

Fig.1 Molecular structure for $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})(\text{PyTA})_2](\text{ClO}_4)_2$ with thermal ellipsoids at the 30% probability level

表 2 配合物的部分键长(nm)和键角($^\circ$)

Table 2 Selected bond lengths (nm) and angles ($^\circ$) for $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})(\text{PyTA})_2](\text{ClO}_4)_2$

Cu1-O1W	0.219 0(3)	Cu1-N2	0.205 4(3)	Cu1-N1	0.198 5(3)
Cu1-N7	0.198 4(3)	Cu1-N8	0.207 6(3)		
O1W-Cu1-N1	89.37(10)	N1-Cu1-N2	80.94(11)	O1W-Cu1-N2	123.15(11)
N1-Cu1-N7	175.11(12)	O1W-Cu1-N7	85.98(10)	N1-Cu1-N8	102.69(11)
O1W-Cu1-N8	111.62(12)	N2-Cu1-N7	100.37(11)	N7-Cu1-N8	80.47(11)
N2-Cu1-N8	125.20(12)				

表 3 中数据表明,配合物晶体中配阳离子 $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})(\text{PyTA})_2]^{2+}$ 彼此之间存在着丰富的氢键(氨基之间,以及配位水与氨基之间)及芳环堆积作用(平面间距离均为 0.37 nm),这些作用稳定了配合物的堆积结构(图 2)。

2.3 配合物抑菌活性

将 $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2$ 、PyTA 和配合物均配成浓度为 1

$\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的原液,然后通过二倍稀释法配制成系列浓度溶液。细菌最终接种量为 $5 \times 10^6 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$, 37°C 下恒湿($\text{RH} > 80\%$)培养 24 h,测定上述化合物抑制细菌生长最低浓度(MIC)^[20]。测得 $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2$ 、PyTA 和配合物抑制金黄色葡萄球菌(*S. aureus*, G+)、枯草杆菌(*B. subtilis*, G+)、苏云金芽孢杆菌(*B. thuringiensis*, G+)、沙门氏杆菌(*Salmonella*, G-),水稻条斑病细菌

表 3 配合物部分氢键参数

Table 3 Selected hydrogen bond parameters for $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})(\text{PyTA})_2](\text{ClO}_4)_2$

D-H...A	$d(\text{D-H}) / \text{nm}$	$d(\text{H}\cdots\text{A}) / \text{nm}$	$d(\text{D}\cdots\text{A}) / \text{nm}$	$\angle \text{DHA} / ^\circ$
O1W-H1W...O6 ⁱ	0.085	0.251	0.279 0(13)	100
O1W-H1W...O5 ⁱⁱ	0.085	0.212	0.290 7(11)	154
O1W-H2W...N5	0.085	0.257	0.322 1(4)	134
O1W-H2W...O6 ⁱⁱⁱ	0.085	0.226	0.279 0(13)	120
N5-H5A...N10 ^{iv}	0.086	0.229	0.300 2(4)	141
N6-H6A...O7 ^v	0.086	0.222	0.300 7(10)	151
N6-H6B...O2 ⁱⁱ	0.086	0.242	0.323 0(14)	157
N11-H11A...N4 ^v	0.086	0.240	0.306 3(4)	135
N11-H11B...O5 ⁱⁱ	0.086	0.240	0.315 3(12)	147
N12-H12B...O7	0.086	0.234	0.309 8(11)	147

Symmetry transformations used to generate equivalent atoms: ⁱ 1-x, -1/2+y, 1/2-z; ⁱⁱ x, 1/2-y, 1/2+z; ⁱⁱⁱ -1+x, y, z; ^{iv} -1+x, 1/2-y, 1/2+z; ^v 1+x, y, z

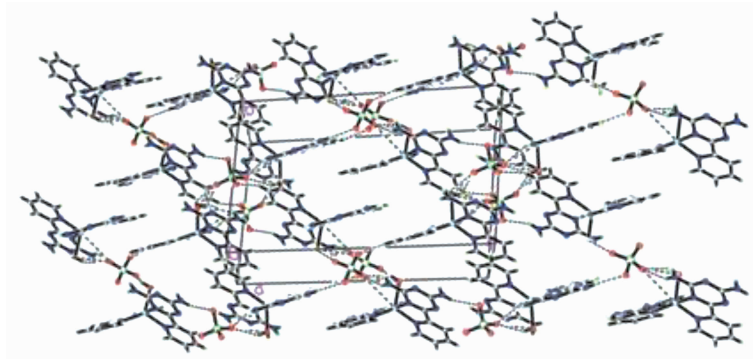


图 2 配合物分子堆积图

Fig.2 Molecular packing diagram for $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})(\text{PyTA})_2](\text{ClO}_4)_2$ 表 4 化合物抑制细菌生长的最低浓度(MIC, $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)Table 4 Minimal inhibitory concentrations(MIC, $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) of the compounds for the assayed bacteria

Compound	<i>S. aureus</i> (G+)	<i>B. subtilis</i> (G+)	<i>B. thuringiensis</i> (G+)	<i>Salmonella</i> (G-)	<i>X. oryzae</i> (G-)	<i>E. coil</i> (G-)
$\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2$	500	500	500	250	250	250
PyTA	500	500	500	500	500	500
$[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})(\text{PyTA})_2](\text{ClO}_4)_2$	125	125	125	125	62.5	125

(*X. oryzae*, G-)和大肠杆菌(*E. coil*, G-)等 6 个细菌最低抑制浓度如表 4 所示。

结果表明,对于同一种菌种,配合物抑制其生长的最低浓度明显小于 $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2$ 及 PyTA,表明配合物有相对较强的抗菌活性,这可能主要与中心金属铜(II)离子与配体 PyTA 之间的螯合作用有关^[2]。这种螯合作用分散了中心金属铜(II)离子的正电荷进而增加了其脂溶性而易于通过半透膜和干扰正常细胞的生长。

另外,配合物对 6 种菌种具有相近的最小抑制浓度,表明该配合物具有抗菌广谱性。

2.4 配合物与 DNA 的作用

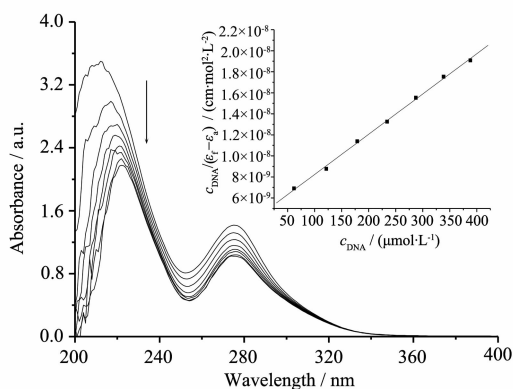
金属配合物生物活性通常与其对生物大分子如

DNA、蛋白质的作用有关,因此研究主题配合物与 DNA 之间相互作用对探索其抗菌作用机理有重要意义。本文通过电子吸收光谱、荧光光谱、粘度测定及琼脂糖凝胶电泳等方法研究了配合物与 DNA 的作用。

2.4.1 电子吸收光谱

电子吸收光谱是研究小分子化合物与 CT-DNA 相互作用的最常用和最有效的方法之一。测得标题配合物与 CT-DNA 相互作用的电子吸收光谱滴定曲线如图 3 所示。

图 3 表明,随着 CT-DNA 浓度增加,配合物吸收带强度减弱,并且发生了明显的红移(~10 nm),表明



Arrows show the absorbance changing upon the increase in CT-DNA concentration. $c_{\text{complex}} = 50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $c_{\text{DNA}} / (\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$: 0, 6.20, 12.15, 17.89, 23.41, 28.73, 33.86, 38.81. Inset: plots of $c_{\text{DNA}} / (\epsilon_f - \epsilon_a)$ vs c_{DNA} for the titration of the complex with DNA

图 3 配合物在不同 DNA 浓度下的电子吸收光谱图

Fig.3 Electronic absorption spectra of $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})(\text{PyTA})_2](\text{ClO}_4)_2$ upon addition of CT-DNA

配合物以插入模式与 DNA 作用^[22]。另外,通过 CT-DNA 对配合物的电子光谱滴定试验,能够根据以下方程式求得配合物与 CT-DNA 的结合常数:

$$c_{\text{DNA}} / (\epsilon_a - \epsilon_f) = c_{\text{DNA}} / (\epsilon_b - \epsilon_f) + 1 / [K_b(\epsilon_b - \epsilon_f)]$$

其中, c_{DNA} 表示 CT-DNA 的浓度, ϵ_a 、 ϵ_f 和 ϵ_b 分别表示 $A_{\text{obsd}}/c_{\text{Cu}}$ 、自由配合物的摩尔吸光系数和完全结合后的配合物的摩尔吸光系数。以 $c_{\text{DNA}} / (\epsilon_f - \epsilon_a)$ 对 c_{DNA} 作图,斜率与截距的比值即为配合物与 DNA 的结合常数 K_b ^[30]。获得标题配合物的 K_b 值为 $8.69 \times 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, 比经典插入试剂 EB 的 K_b 值 ($1.4 \times 10^6 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$)^[23] 小得多,表明该配合物对 DNA 的插入作用较弱,这可能主要归因于配合物分子中插入配体 PyTA 芳环相对较小。

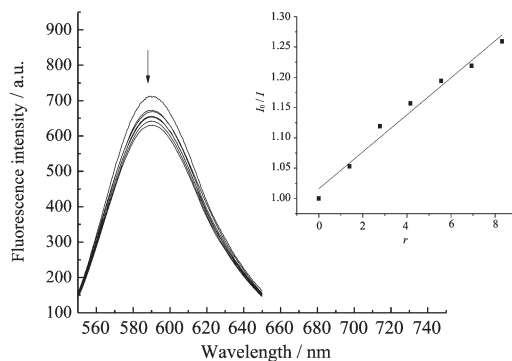
2.4.2 荧光光谱

荧光光谱也被广泛地应用于研究配合物与 DNA 之间的相互作用。配合物与 CT-DNA 作用的溴化乙锭(EB)荧光光谱如图 4 所示。

从图 4 可见,随着配合物浓度增加,EB-CT-DNA 体系的荧光强度发生了淬灭,表明配合物可能以插入模式与 DNA 作用^[24]。通过配合物对 EB-DNA 体系荧光光谱的滴定实验,可以应用经典 Stern-Volmer 方程求得配合物取代 EB 而与 CT-DNA 作用的淬灭常数 K_{sq} ^[25-26]

$$I_0/I = 1 + K_{\text{sq}}r$$

其中, I 和 I_0 分别表示滴加和未滴加配合物时 EB-CT-DNA 体系的荧光强度, r 表示配合物与 CT-



Arrows show the fluorescence intensity changing upon the increase in complex concentration. $c_{\text{EB}} = 4.8 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $c_{\text{CT-DNA}} = 5.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $c_{\text{complex}} / (\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$: 5.92, 11.84, 17.7, 23.6, 29.5, 35.4, 41.3. Inset: plots of I_0/I vs r for the titration of DNA with $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})(\text{PyTA})_2](\text{ClO}_4)_2$

图 4 配合物对 EB-CT-DNA 体系荧光光谱的影响

Fig.4 Effects of $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})(\text{PyTA})_2](\text{ClO}_4)_2$ on the fluorescence spectra of EB-CT-DNA system

DNA 的浓度比。以 I_0/I 对 r 作图获得一条直线(图 4 中插图),直线的斜率即 K_{sq} 值。由此获得配合物的 K_{sq} 值为 0.015 1,进一步证实该配合物对 DNA 插入作用较弱^[26]。

2.4.3 粘度测定

在缺乏晶体结构数据情况下,粘度测定被认为是确定配合物与 DNA 键合模式最有力的证据之一^[27]。粘度对分子长度变化非常敏感,当配合物等小分子以部分插入模式与 DNA 作用时, DNA 溶液的粘度减小;以静电、沟面结合等非插入模式与 DNA 作用时, DNA 溶液的粘度无明显变化;而通过插入模式与 DNA 作用时, DNA 溶液的粘度增加。测得 CT-DNA 相对比粘度随配合物加入量的变化如图 5 所示。

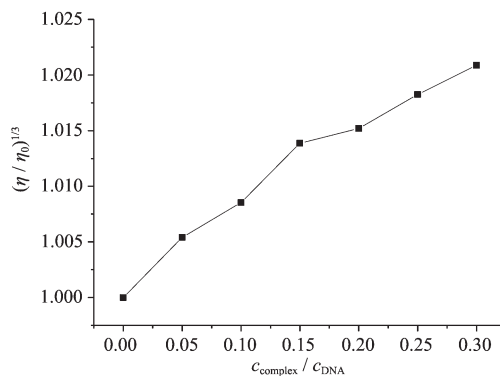


图 5 CT-DNA 相对粘度随配合物加入量的变化

Fig.5 Effect of increasing amounts of $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})(\text{PyTA})_2](\text{ClO}_4)_2$ on the relative viscosity of CT-DNA

结果表明,随着配合物加入量的增加,CT-DNA 溶液的相对比粘度逐渐增加,但上升幅度较小,由此推测配合物与 DNA 发生了弱的插入作用^[28],与上述电子吸收光谱及荧光光谱分析的结果一致。

2.4.4 琼脂糖凝胶电泳

为了进一步研究配合物对 DNA 的作用,本文应用琼脂糖凝胶电泳方法研究了配合物对 pBR322DNA 的切割作用。

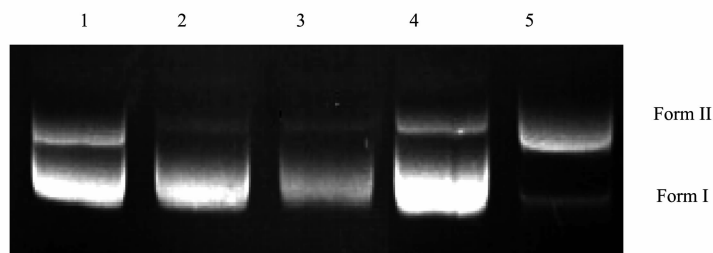
完整的 pBR322 DNA 通常呈超螺旋型(I型),当其中一条链上出现一个切口(即单链断裂)时就变为切口环形(II型),而当两条链在同一位置都发生断裂时就变为线型(III型)。这3种构型 pBR322DNA 在电泳过程中具有不同的迁移速率,通常 I 型迁移速率最快,III型次之,II型最慢。标题配合物对 pBR322DNA 的切割作用如图6所示。

结果表明,抗坏血酸或配合物单独存在下不能明显切割 pBR322 DNA,但在抗坏血酸存在下,随着配合物浓度增加,切割 pBR322 DNA 作用增强。当

浓度达到 $30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,配合物几乎将闭环的超螺旋构型(Form I)pBR322 DNA 完全切割成了缺刻构型(Form II)。

为进一步探索配合物对 DNA 切割的作用机制,在活性氧 $\cdot\text{OH}$ 自由基清除剂(DMSO)及单线态氧 $^1\text{O}_2$ 清除剂(NaN_3 和TMP)存在下,研究了标题配合物对 pBR322 DNA 的切割作用。结果如图7所示。

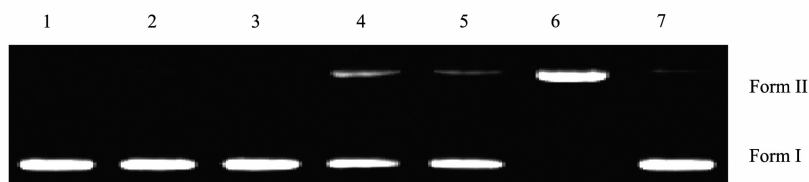
由图7可知,在没有 NaN_3 、TMP或DMSO存在的条件下,配合物能将 pBR322 DNA 共价闭环的超螺旋构型(Form I)切割成缺刻构型(Form II)(第4泳道),加入羟自由基 $\cdot\text{OH}$ 抑制剂 DMSO 可明显抑制配合物对 pBR322 DNA 的切割能力(第7泳道),而加入单线态氧 $^1\text{O}_2$ 抑制剂 NaN_3 (第5泳道)、TMP(第6泳道)后,对配合物切割 pBR322 DNA 的影响较小甚至有助于切割,由此推测配合物切割 pBR322 DNA 涉及羟自由基 $\cdot\text{OH}$ 的参与^[29-30],而不涉及单线态氧 $^1\text{O}_2$ 或类似物,与我们以前报道的配合物类似^[31]。



Lane1: pBR322 DNA; Lane 2: pBR322 DNA+ $1.25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Vit C; Lane3: pBR322 DNA+ $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})(\text{PyTA})_2](\text{ClO}_4)_2$; Lane 4: pBR322 DNA+ $1.25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Vit C+ $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})(\text{PyTA})_2](\text{ClO}_4)_2$; Lane 5: pBR322 DNA+ $1.25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Vit C+ $30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})(\text{PyTA})_2](\text{ClO}_4)_2$ ($m_{\text{DNA}}=200 \text{ ng}$)

图6 配合物切割 pBR322 DNA 的凝胶电泳图

Fig.6 Gel electrophoresis diagram showing the cleavage of $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})(\text{PyTA})_2](\text{ClO}_4)_2$ to pBR322DNA



Lane 1: pBR322 DNA; Lane 2: pBR322 DNA+ $1.25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Vit C; Lane 3: pBR322 DNA+ $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})(\text{PyTA})_2](\text{ClO}_4)_2$; Lane 4: pBR322 DNA+ $1.25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Vit C+ $30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})(\text{PyTA})_2](\text{ClO}_4)_2$; Lane 5: pBR322 DNA+ $1.25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Vit C+ $30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})(\text{PyTA})_2](\text{ClO}_4)_2$ + $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaN_3 ; Lane 6: pBR322 DNA+ $1.25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Vit C+ $30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})(\text{PyTA})_2](\text{ClO}_4)_2$ + $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TMP; Lane 7: pBR322 DNA+ $1.25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Vit C+ $30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})(\text{PyTA})_2](\text{ClO}_4)_2$ + $4 \mu\text{L}$ DMSO. ($m_{\text{DNA}}=200 \text{ ng}$, $c_{\text{Cu}}=4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $c_{\text{vit C}}:c_{\text{Cu}}=50:1$)

图7 加入抑制剂后配合物切割 pBR322 DNA 的凝胶电泳图

Fig.7 Gel electrophoresis diagram showing the cleavage of $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})(\text{PyTA})_2](\text{ClO}_4)_2$ to pBR322DNA in the presence of inhibitor NaN_3 , TMP, or DMSO

3 结 论

本文通过2,4-二氨基-6-(2'-吡啶基)均三嗪和高氯酸铜(II)反应合成了新的配合物:[Cu(H₂O)(PyTA)₂](ClO₄)₂, 该配合物中心铜(II)离子具有变形三角双锥配位结构。研究表明,与 Cu(ClO₄)₂ 和游离配体 2,4-二氨基-6-(2'-吡啶基)均三嗪相比较,该配合物对金黄色葡萄球菌、枯草杆菌、苏云金芽孢杆菌、大肠杆菌、水稻条斑病细菌以及沙门氏杆菌具有良好的抑制作用,能够通过插入模式与 DNA 作用,并且在抗坏血酸存在下通过羟基自由基·OH 切割 pBR322 DNA。

参考文献:

- [1] JI Liang-Nian(计亮年), MAO Zong-Wan(毛宗万), HUANG Jin-Wang(黄锦汪), et al. *Introduction to Bioinorganic Chemistry*(生命无机化学导论). Beijing: Science Press, **2010**.
- [2] Jiang Q, Xiao N, Shi P F, et al. *Coord. Chem. Rev.*, **2007**, **251**(15/16):1951-1972
- [3] Bencini A, Lippolis V. *Coord. Chem. Rev.*, **2010**, **254**(17/18):2096-2180
- [4] FU Xia-Bing(傅夏兵), LIN Zi-Hua(林子华), LE Xue-Yi(乐学义). *Chinese J. Inorg. Chem.*(无机化学学报), **2013**, **29**(2):215-230
- [5] WEN Xiao-Ming(文小明), HU Hong(胡虹), ZHOU Hong(周红). et al. *Chinese J. Inorg. Chem.*(无机化学学报), **2012**, **28**(9):1985-1996
- [6] Sayen S, Carlier A, Tarpin M, et al. *J. Inorg. Biochem.*, **2013**, **120**:39-43
- [7] GU Hai-Bin(辜海彬), WANG Zhi-Yuan(王治远), CHEN Wu-Yong(陈武勇). *Chinese J. Inorg. Chem.*(无机化学学报), **2012**, **28**(3):591-600
- [8] Ghosh M, Fleck M, Mahanti B, et al. *J. Coord. Chem.*, **2012**, **65**(22):3884-3894
- [9] Desbouis D, Troitsky I P, Belousoff M J, et al. *Coord. Chem. Rev.*, **2012**, **256**(11/12):897-937
- [10] Case F H. *J. Heterocycl. Chem.*, **1968**, **5**(2):223-226
- [11] Rigaku. *CrystalClear*. Rigaku Corporation, Tokyo, Japan, **2002**.
- [12] Sheldrick G M. *SHELXL-97, Program for X-ray Crystal Structure Determination*, Göttingen University, Germany, **1997**.
- [13] Ou Z B, Lu Y H, Lu Y M, et al. *J. Coord. Chem.*, **2013**, **66**(12):2152-2165
- [14] Geary W J. *Coord. Chem. Rev.*, **1971**, **7**(1):81-122
- [15] Nakamoto K. *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds: Part B*. 6th Edition. New York: John Wiley and Sons Inc., **2009**:58
- [16] Bravo-Gómez M E, García-Ramos J C, Gracia-Mora I, et al. *J. Inorg. Biochem.*, **2009**, **103**(2):299-309
- [17] Subramanian P S, Suresh E, Dastidar P, et al. *Inorg. Chem.*, **2001**, **40**(17):4291-4301
- [18] ZHANG Xue-Mei(张雪梅), OU Zhi-Bin(区志钺), CHEN Shi(陈实), et al. *Chinese J. Inorg. Chem.*(无机化学学报), **2012**, **28**(12):2667-2678
- [19] LU Yan-Mei(卢艳梅), LE Xue-Yi(乐学义). *Chinese J. Inorg. Chem.*(无机化学学报), **2011**, **27**(2):199-213
- [20] Efthimiadou E K, Thomadaki H, Sanakis Y, et al. *J. Inorg. Biochem.*, **2007**, **101**(1):64-73
- [21] Lu Y M, Chen Y H, OU Z B, et al. *Chin. J. Chem.*, **2012**, **30**(2):303-310
- [22] Cui S H, Jiang M, Li Y T, et al. *J. Coord. Chem.*, **2011**, **64**(23):4209-4224
- [23] Lepecq J B, Paoletti C. *J. Mol. Biol.*, **1967**, **27**(1):87-106
- [24] WANG Chong-Zhi(王翀之), FENG Xi-Mei(冯喜梅), SHI Meng-Lu(侍孟璐), et al. *Chinese J. Inorg. Chem.*(无机化学学报), **2012**, **28**(4):839-845
- [25] Ren X X, Chen J Y, Le X Y. *Chin. J. Chem.*, **2011**, **29**(7):1380-1388
- [26] Liu J, Zhang T X, Lu T B, et al. *J. Inorg. Biochem.*, **2002**, **91**(3/4):269-276
- [27] Satyanarayana S, Dabrowiak J C, Chaires J B. *Biochemistry*, **1992**, **31**(39):9319-9324
- [28] Liu F, Meadows K A, McMillin D R. *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, **115**(15):6699-6704
- [29] Zhang S C, Zhu Y G, Tu C, et al. *J. Inorg. Biochem.*, **2004**, **98**(12):2099-21
- [30] Rao R, Patra A K, Chetana P R. *Polyhedron*, **2007**, **26**(18):5331-5338
- [31] LU Yan-Mei(卢艳梅), OU Zhi-Bin(区志钺), HU Wei(胡伟), et al. *Acta Chim. Sinica*(化学学报), **2012**, **70**(8):973-979