

含有席夫碱配体的钌配合物的合成、表征及抗肿瘤活性

贾士芳 郝秀丽 温艳珍 张燕*
(太原科技大学化学与生物工程学院, 太原 030021)

摘要: 设计并合成了3个含有席夫碱基团的配体(BL^n , $n=1\sim3$)及相应的双核联吡啶钌配合物 $[Ru(BL^n)(bpy)_2](ClO_4)_4$, 其中 $bpy=2,2'$ -联吡啶, $BL^n=((PyCHN)-Ph-O-C_6H_4)_2R(PyCHN=N-2$ -吡啶亚甲基, $R=none$ (**Ru1**), $-C(CH_3)_2$ (**Ru2**), $-SO_2$ (**Ru3**)). 通过元素分析、核磁氢谱、红外光谱、质谱等方法对配体和配合物进行了表征。通过体外细胞毒性实验研究了 **Ru1~Ru3** 对宫颈癌细胞(Hela)、胃癌细胞(BGC823)、胃癌细胞(SGC-7901)三种肿瘤细胞和人正常胚肺成纤维细胞 MRC-5 的细胞毒性, 实验结果表明 **Ru3** 的抗肿瘤活性最好, 而 **Ru1~Ru3** 均对 BGC823 具有选择性。

关键词: 席夫碱配体; 双核钌配合物; 细胞毒性

中图分类号: O614.82⁺1

文献标识码: A

文章编号: 1001-4861(2022)10-1919-08

DOI: 10.11862/CJIC.2022.191

Synthesis, Characterization, and Antitumor Activity of Ruthenium(II) Complexes Based on Schiff Base Ligand

JIA Shi-Fang HAO Xiu-Li WEN Yan-Zhen ZHANG-Yan*

(School of Chemical and Biological Engineering, Taiyuan Science and Technology University, Taiyuan 030021, China)

Abstract: A series of new Schiff base ligands (BL^n , $n=1-3$) and complexes have been synthesized. Binuclear ruthenium complexes $[Ru(BL^n)(bpy)_2](ClO_4)_4$, where $bpy=2,2'$ -bipyridine, $BL^n=((PyCHN)-Ph-O-C_6H_4)_2R$ ($PyCHN=N-2$ -pyridylmethylene, $R=none$ for **Ru1**, $-C(CH_3)_2$ for **Ru2** and $-SO_2$ for **Ru3**), have been prepared and characterized by element analysis, 1H NMR, IR, and mass spectrometry methods. The cytotoxicity to cervical cancer cells (Hela), gastric cancer cells (BGC823), gastric cancer cells (SGC-7901), and human normal embryonic lung fibroblasts cells (MRC-5) of the three complexes *in vitro* was evaluated using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay. It is worth noting that **Ru1~Ru3** showed excellent antitumor effects in a cellular study for BGC823 *in vitro*. However, **Ru3** exhibited the highest cytotoxicity to any cancer cells than **Ru1** and **Ru2**.

Keywords: Schiff base ligand; binuclear ruthenium complexes; cytotoxicity

随着顺铂类配合物作为抗肿瘤药物的发现及临床应用^[1], 金属配合物作为抗肿瘤药物的研究成为了一个热门课题。金属钌配合物是继铂类配合物后被认为最具有潜力的低毒高效的抗肿瘤药物^[2-7]。目前部分金属钌配合物已被证实对某一种肿瘤细胞有效甚至进入临床研究阶段。1987年, Keppler等合成了对结肠癌有明显效果的 $[HL][trans-$

$Ru(III)L_2Cl_4]$ (其中L为含氮杂环配体)配合物^[8]。1998年, 第一个进入临床研究的对转移瘤有明显抑制作用的NAMI型钌配合物由Alessio^[9]合成并已进入临床二期研究。2008年, 德国的Schatzschneider^[10]报道合成的金属钌配合物 $[Ru(bpy)_2(dppn)]^{2+}$ 通过插入模式与DNA结合后, 具有与传统顺铂类药物对人乳腺癌及结肠癌细胞相近的半抑制率。2009年,

收稿日期: 2021-11-25。收修改稿日期: 2022-06-06。

山西省高等学校科技创新项目(No.2020L0334)资助。

*通信联系人。E-mail: yanzhang872010@163.com

Keppler 等发现已经进入临床一期的钌配合物 KP1019^[11]对 Lewis 肺癌和原发性直肠癌有明显作用。

随着合成技术的发展,不断涌现出各种新型席夫碱类化合物。席夫碱类化合物可以应用到生物分析技术、金属有机配体、荧光探针^[12-13]、抗肿瘤^[14-19]

等方面。我们以 4,4'-二(4-氨基苯氧基)联苯、2,2'-二(4-氨基苯氧基)苯基丙烷、4,4'-二(4-氨基苯氧基)二苯砜为原料,分别与 2-吡啶甲醛反应生成对应的席夫碱配体。原料都具有对称结构,生成的配体都是对称的双齿配体,配体与二氯二联吡啶钌以 1:2 反应,生成了对应的双核金属钌配合物。

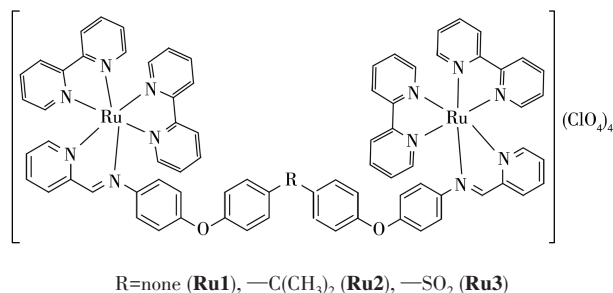


图1 含有不同桥基团的席夫碱的三种双核金属钌配合物结构图

Fig.1 Structure of three dinuclear metal ruthenium complexes of Schiff bases with different bridging groups

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

三水合三氯化钌、2,2'-联吡啶(bpy)、4,4'-二(4-氨基苯氧基)联苯、2,2'-二(4-氨基苯氧基)苯基丙烷、4,4'-二(4-氨基苯氧基)二苯砜、2-吡啶甲醛、氘代三氯甲烷、氘代二甲基亚砜等均为市售分析纯试剂,购于武汉申试化工有限公司。所有试剂都未经纯化直接使用,使用的水为蒸馏水。胎牛血清购自美国 Gibco 公司。

主要仪器有 AL204 分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司)、DF-101B 恒温磁力搅拌器(郑州长城科工贸有限公司)、SHB-III 循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司)、PE20005 型元素分析谱仪(美国 PE 公司)、Varian Mercury VX-300 型核磁共振仪(瑞士 Bruker 公司)、Nicolet38 型傅里叶红外光谱仪(Thermo Electron Corporation)、TU-1901 型紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司)、Trace MS 2000GC/MS ESI 质谱仪(德国 NETZSCH 公司)、Shimadzu RF-5301 PC 荧光分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司)、CHI630E 电化学工作站(上海辰华仪器有限公司)、EPICS XL-MCL 型酶标仪(美国 Beckman Coulter 公司)、Varioskan Flash 型多功能酶标仪(美国 Thermo Scientific 公司)。

1.2 目标配合物的合成

1.2.1 合成路线图

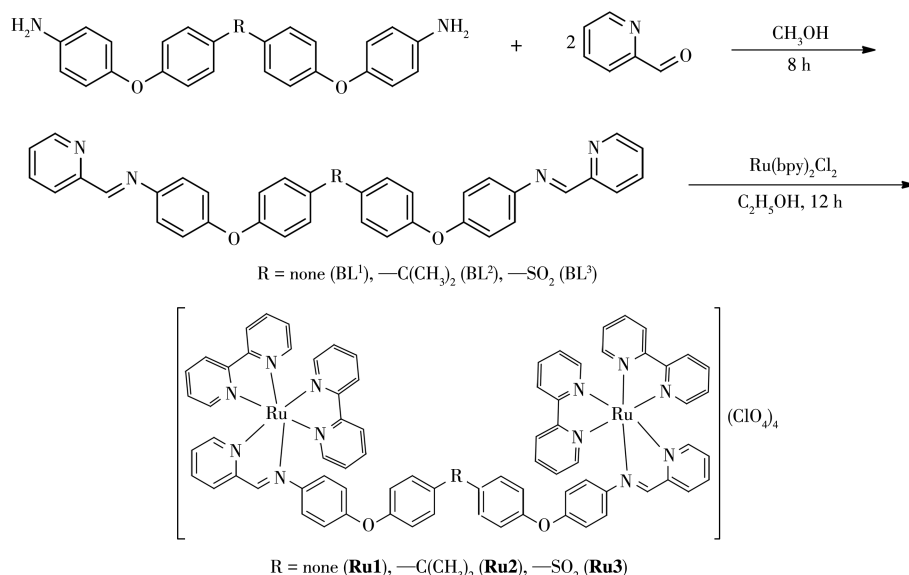
配体及对应配合物的具体合成路线如图 2

所示。

1.2.2 配体及配合物的合成

配体 BL¹ 的合成:称取 0.37 g(1 mmol) 4,4'-二(4-氨基苯氧基)联苯和 0.54 g(5 mmol) 2-吡啶甲醛放入 100 mL 的圆底烧瓶中,加入 35 mL 甲醇,加热搅拌回流 8 h,有黄色固体产生,过滤得到黄色固体,用甲醇和蒸馏水各洗 3 次,真空干燥,得到 0.48 g 配体 BL¹,产率为 88%。元素分析($\text{C}_{36}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_2$)计算值(%):C, 79.1;H, 4.8;N, 10.3。实验值(%):C, 79.2;H, 4.8;N, 10.4。¹H NMR(CDCl_3): δ 8.80(2H, d, $J=3.0$ Hz, Py), 8.64(2H, s, CH), 8.19(2H, d, $J=6.0$ Hz, Py), 7.81(2H, t, $J=9.0$ Hz, Py), 7.54(4H, d, $J=6.0$ Hz, Ph), 7.37(2H, t, $J=3.0$ Hz, Py), 7.36(4H, d, $J=6.0$ Hz, Ph), 7.12(8H, d, $J=3.0$ Hz, Ph)。IR(cm^{-1}): 3 060($\nu_{\text{C-H}}$), 1 625, 1 578, 1 476, 1 463, 1 279($\nu_{\text{C=C}}$, $\nu_{\text{C=N}}$, $\nu_{\text{C-N}}$), 1 243, 1 279($\nu_{\text{Ph-O}}$), 833, 777, 739($\delta_{\text{C-H}}$)。

配体 BL² 的合成:称取 0.41 g(1 mmol) 2,2'-二(4-氨基苯氧基)苯基丙烷和 0.54 g(5 mmol) 2-吡啶甲醛,加入 35 mL 甲醇,加热回流 4.5 h。反应结束后,用旋转蒸发仪将溶液蒸至 5 mL,然后加入 15 mL 石油醚,待温度冷却到 0 °C,有黄色固体析出。过滤,真空干燥得到 BL² 固体 0.42 g,产率为 72%。元素分析($\text{C}_{39}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{O}_2$)计算值(%):C, 79.6;H, 5.5;N, 9.5。实验值: C, 79.6; H, 5.4; N, 9.6。¹H NMR(CDCl_3): δ 8.80 (2H, s, Py), 8.64(2H, s, CH), 8.19(2H, d, $J=6.0$ Hz, Py), 7.81(2H, t, $J=9.0$ Hz, Py), 7.54(4H, d, $J=6.0$ Hz, Ph), 7.37(2H, t, $J=3.0$ Hz, Py), 7.36(4H, d, $J=6.0$ Hz,

图2 席夫碱配体BL¹~BL³及对应的配合物Ru1~Ru3的合成路线Fig.2 Synthesis of Schiff base ligands BL¹-BL³ and complexes Ru1-Ru3

Ph), 7.12(8H, d, $J=3.0$ Hz, Ph), 1.70(6H, s, CH₃)。IR (cm⁻¹): 3 060(ν_{C-H}), 1 625, 1 578, 1 476, 1 463, 1 279 ($\nu_{C=C}$, $\nu_{C=N}$, ν_{C-N}), 1 243, 1 279(ν_{Ph-O}), 833, 777, 739 (δ_{C-H})。

配体BL³的合成:称取0.44 g(1 mmol) 4,4'-二(4-氨基苯氧基)二苯醚和0.54 g(5 mmol) 2-吡啶甲醛,加入35 mL甲醇,加热回流4.5 h,反应结束后,用旋转蒸发仪将溶液蒸至5 mL,有黄色固体析出。过滤,真空干燥得到0.51 g固体BL³,产率为83%。元素分析(C₃₆H₂₆N₄O₄S)计算值(%): C, 70.8; H, 4.3; N, 9.2。实验值(%): C, 70.7; H, 4.3; N, 9.3。¹H NMR(CDCl₃): δ 8.64(2H, d, $J=3.0$ Hz, Py), 8.23(2H, s, CH), 7.98(2H, d, $J=6.0$ Hz, Py), 7.86(4H, d, $J=6.0$ Hz, Ph), 7.83(2H, t, $J=9.0$ Hz, Py), 7.41(4H, d, $J=6.0$ Hz, Ph), 7.36(8H, d, $J=3.0$ Hz, Ph)。IR(cm⁻¹): 1 629, 1 585, 1 488, 1 296 ($\nu_{C=C}$, $\nu_{C=N}$, ν_{C-N}), 1 243(ν_{Ph-O}), 833, 777, 742(δ_{C-H})。

配合物Ru1的合成:称取0.52 g(1 mmol) Ru(bpy)₃Cl₂·2H₂O和0.34 g(2 mmol) AgNO₃,放入250 mL圆底烧瓶中,加入100 mL乙醇,磁力搅拌加热回流2 h,趁热过滤,除去AgCl沉淀,得到棕红色滤液A。称取0.27 g(0.5 mmol)配体BL¹于250 mL三颈烧瓶中,将滤液A加入烧瓶中,反应液在N₂保护下回流搅拌12h。停止反应,旋转蒸发至有固体出现,以CH₃CN/饱和KNO₃水溶液(1:1, V/V)的混合溶剂作为洗脱剂,在硅胶柱上分离,得到的黄色溶液通过旋转蒸发除去大部分溶剂,然后加入过量的NaClO₄的

饱和乙醇溶液,沉淀出黄色固体,过滤,用热的甲醇和水(10 mL)各洗3次,真空干燥,得到黄色固体0.63 g,产率72%。元素分析(C₇₆H₅₈N₁₂O₁₈Cl₄)计算值(%): C, 51.5; H, 3.3; N, 9.5。实验值(%): C, 51.6; H, 3.4; N, 9.7。¹H NMR(DMSO-d₆): δ 8.89(2H, t, $J=3.0$ Hz, Py), 8.69(2H, d, $J=6.0$ Hz, Py), 8.64~8.67(2H, m, Py), 8.51(2H, t, $J=6.0$ Hz, bpy), 8.21~8.24(6H, m, bpy), 8.01(4H, t, $J=9.0$ Hz, Py), 7.86(2H, d, $J=3.0$ Hz, Py), 7.79(2H, s, CH), 7.72(12H, m, bpy), 7.50(4H, d, $J=6.0$ Hz, Ph), 7.38(4H, d, $J=9.0$ Hz, Ph), 6.80~7.00(4H, m, bpy), 6.69(4H, d, $J=3.0$ Hz, bpy), 6.64(4H, d, $J=3.0$ Hz, bpy)。IR(cm⁻¹): 1 603, 1 489($\nu_{C=C}$, $\nu_{C=N}$), 1 240 (ν_{Ph-O} , ν_{C-N}), 768, 625(δ_{C-H}), 1 106(ν_{Cl-O})。

配合物Ru2的合成:0.29 g(0.5 mmol) BL²和0.52 g(1 mmol) Ru(bpy)₃Cl₂·2H₂O在乙醇溶液里回流12 h,硅胶柱分离,以乙腈/硝酸钾的饱和溶液(1:1, V/V)为洗脱剂,得到黄色产品0.65g,产率74%。元素分析(C₇₉H₆₄N₁₂O₁₈Cl₄)计算值: C, 52.3; H, 3.5; N, 9.3。实验值(%): C, 52.4; H, 3.9; N, 9.1。¹H NMR(DMSO-d₆): δ 8.89(2H, t, $J=3.0$ Hz, Py), 8.66(2H, d, $J=6.0$ Hz, Py), 8.62(2H, d, $J=6.0$ Hz, Py), 8.49(2H, d, $J=6.0$ Hz, bpy), 8.24~8.28(8H, m, bpy), 7.96~8.00(4H, m, Ph), 7.86(2H, s, CH), 7.79(2H, d, $J=9.0$ Hz, Py), 7.69(6H, m, bpy), 7.64(4H, m, bpy), 7.54(4H, d, $J=6.0$ Hz, Ph), 7.35(4H, d, $J=3.0$ Hz, Ph), 7.27(4H, d, $J=9.0$ Hz, Ph), 6.76(6H, d, $J=3.0$ Hz, bpy), 6.67~6.70(6H, m, bpy),

1.65(6H, s, CH₃)。IR(cm⁻¹): 1 625, 1 578, 1 476, 1 463, 1 279($\nu_{\text{C}=\text{C}}$, $\nu_{\text{C}=\text{N}}$, $\nu_{\text{C}-\text{N}}$), 1 243, 1 279($\nu_{\text{Ph}-\text{O}}$), 833, 777, 739($\delta_{\text{C}-\text{H}}$), 1 118($\nu_{\text{Cl}-\text{O}}$)。

配合物 **Ru3** 的合成: 0.30 g(0.5 mmol) BL³ 和 0.52 g(1 mmol) Ru(bpy)₂Cl₂·2H₂O 在乙醇溶液里回流 12 h, 硅胶柱分离, 以乙腈/硝酸钾的饱和溶液(1:1, V/V)为洗脱剂, 用 NaClO₄ 的饱和乙醇溶液沉降, 得到黄色产品 0.75 g, 产率 82%。元素分析(C₇₆H₅₈N₁₂SO₂₀Cl₄)计算值(%): C, 49.7; H, 3.2; N, 9.2。实验值(%): C, 49.7; H, 3.2; N, 9.2。¹H NMR(DMSO-d₆): δ 8.87(2H, t, $J=3.0$ Hz, Py), 8.67(2H, d, $J=6.0$ Hz, Py), 8.62(2H, d, $J=6.0$ Hz, Py), 8.50(4H, t, $J=9.0$ Hz, bpy), 8.22~8.29(8H, m, bpy), 8.01(4H, d, $J=6.0$ Hz, Ph), 7.96~7.99(4H, m, bpy), 7.86(2H, d, $J=9.0$ Hz, Py), 7.79(2H, d, $J=3.0$ Hz, CH), 7.72(4H, d, $J=9.0$ Hz, bpy), 7.68(4H, d, $J=6.0$ Hz, Ph), 7.64(4H, d, $J=6.0$ Hz, Ph), 7.53(4H, d, $J=3.0$ Hz, Ph), 7.35(2H, t, $J=9.0$ Hz, bpy), 6.90(2H, d, $J=6.0$ Hz, bpy), 6.84(4H, d, $J=9.0$ Hz, bpy), 6.69(4H, d, $J=3.0$ Hz, bpy)。IR(cm⁻¹): 1 603, 1 583, 1 487, 1 465, 1 294($\nu_{\text{C}=\text{C}}$, $\nu_{\text{C}=\text{N}}$, $\nu_{\text{C}-\text{N}}$), 1 244($\nu_{\text{Ph}-\text{O}}$), 1 108($\nu_{\text{Cl}-\text{O}}$), 768, 626, 558($\delta_{\text{C}-\text{H}}$)。

1.3 生物活性检测

按照标准的 MTT 测试方法进行活性检测^[20-21], 分为 4 步: (1) 种入细胞。在 96 孔板的第 3~11 列用排枪分别加入悬有细胞的 200 μL 培养基, 第 2 列作为溶剂空白, 96 孔板周围加培养基防止挥发, 使每孔细胞数大约为 1×10^4 个, 将 96 孔板放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 、CO₂ 体积分数 5% 的培养箱中过夜, 观察细胞生长情况, 待 80% 细胞贴壁后, 进行下一步。(2) 加药。在 24 孔板的 10 个孔中各加入 3 mL 培养基, 将所加药物稀释到不同浓度梯度, 用排枪将孔中原有的培养液吸掉, 每一列加入相同浓度的药物, 加完后, 放入培养箱培养 48 h。(3) 加 MTT。在药物与细胞相互作用结束前 4 h, 吸去培养液, 用磷酸缓冲盐溶液(PBS)洗涤 2 次, 然后每孔加入 180 μL PBS, 再加入 20 μL 5 mg·mL⁻¹ 的 MTT, 放入培养箱继续培养 4 h。(4) 加 DMSO。4 h 后拿出 96 孔板, 吸掉上清液, 每孔加入 150 μL DMSO, 放入摇床内摇 10 min, 将紫色结晶物充分溶解, 放入酶标仪卡槽内, 在 490 nm 波长处扫描, 得到光密度(OD), OD 可以间接地反映活细胞的数量(式 1), 以此来求出半数抑制浓度 IC₅₀。

$$R = \text{OD}_{\text{exp}} / \text{OD}_{\text{control}} \times 100\% \quad (1)$$

其中, R 表示细胞存活率(即细胞活力), OD_{exp} 表示实

验组 OD, $\text{OD}_{\text{control}}$ 表示对照组 OD。

2 结果与讨论

2.1 配体的合成

通过 2-吡啶甲醛和对应的二元胺以 2:1 的物质的量之比在甲醇中加热回流, 可以得到黄色固体, 用热的甲醇洗涤 3 次, 得到黄色产品。元素分析得到的测试值与计算值基本符合, 3 个配体的红外光谱图中在 1 625 cm⁻¹ 处均有吸收带, 说明配体中有 C=N 键存在, 以 CDCl₃ 为溶剂, 对 BL¹~BL³ 进行了 ¹H NMR 表征。BL¹ 的 ¹H NMR 谱图中有 8 组峰(图 S1, Supporting information), 苯环上 H_a 和 H_b 的 $\delta=7.12$, 是双重峰; 另一个苯环上 H_c 和 H_d 的 δ 为 7.36 和 7.54, 是 2 组双重峰; —CH=N 氢的 $\delta=8.64$, 是一个单峰; 吡啶环上氢的 δ 分别为 7.37、7.81、8.19 和 8.80, H_g 和 H_h 是三重峰, H_i 和 H_j 是双重峰。由于 py-CH=N 是一个吸电子基团, H_c 和 H_d 离 py-CH=N 近, 所以 H_c 和 H_d 的化学位移与 H_a 和 H_b 相比向低场移动。BL² 和 BL³ 的 ¹H NMR 谱图与 BL¹ 相似。

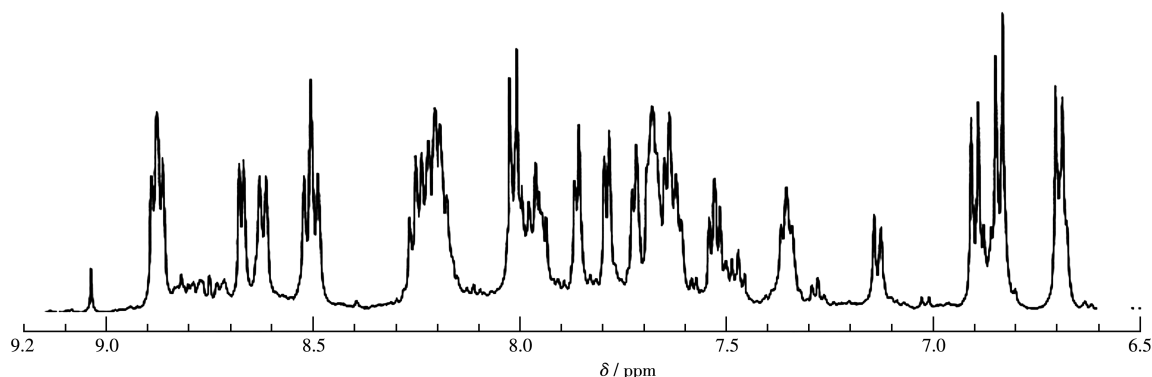
2.2 配合物的合成

配合物 **Ru1**~**Ru3** 分别通过 Ru(bpy)₂Cl₂·2H₂O 和相应的配体 BL¹、BL² 和 BL³ 以 2:1 的物质的量之比反应, 用 NaClO₄ 饱和溶液沉降出产物, 元素分析结果表明, 所生成的配合物是双核配合物。配合物 **Ru1**~**Ru3** 的 ¹H NMR 在 DMSO-d₆ 中测定, 配合物 **Ru3** 的 ¹H NMR 谱图如图 3 所示。金属配合物的图谱相比配体较复杂, 一是因为芳香环上氢的电子云密度相近, 以至于它们的化学位移接近, 芳香环区域光谱比较复杂, 很难指认是哪个氢的化学位移; 另一方面, 因为金属离子与配体反应时生成一对对映体, 所以配合物的核磁图谱比较复杂。但是, 3 个配合物在 $\delta=9.0$ 处都有一个明显的单峰, 这个峰对应 CH=N 上氢的化学位移。

为了进一步确认配合物的结构, 以 CH₃CN-CH₃OH 为溶剂, 测定了配合物的电喷雾质谱。电喷雾质谱对于证明分子量比较大的过渡金属配合物的分子量是非常可靠的。3 个配合物的 MS 谱图中都只有一个强的离子峰, 它们的 m/z 值分别为 343.6 ([Ru(BL²)(bpy)₂]₂⁴⁺)、354.2 ([Ru(BL¹)(bpy)₂]₂⁴⁺) 和 359.3 ([Ru(BL³)(bpy)₂]₂⁴⁺), 与计算值相符(图 S2)。这一结果表明双核钌配合物在溶液中是稳定的。

2.3 配合物的电化学性质

采用微分脉冲伏安法(differential pulse voltam-

图3 配合物 **Ru3** 在 DMSO-d₆ 中的 ¹H NMR 谱图Fig.3 ¹H NMR spectrum of complex **Ru3** in DMSO-d₆

metry, DPV)来测定配合物的氧化还原电位,将配合物溶解在乙腈里,进行DPV测试,数据列于表1中。3个配合物在0~1.5 V范围内均有2个氧化还原峰,而在外界条件相同的情况下测定配体的氧化还原电位,发现配体在0~1.5 V内没有明显的峰,所以这些峰为金属中心的氧化-还原峰。从图4可以看出,**Ru3**的2个氧化还原峰分别在0.90和1.28 V,分别对应于 $[\text{Ru}(\text{BL}^3)(\text{bpy})_2]_2^{5+}/[\text{Ru}(\text{BL}^3)(\text{bpy})_2]_2^{4+}$ 和 $[\text{Ru}(\text{BL}^3)(\text{bpy})_2]_2^{6+}/[\text{Ru}(\text{BL}^3)(\text{bpy})_2]_2^{5+}$ 电对,2个半波电位的差值

为380 mV。

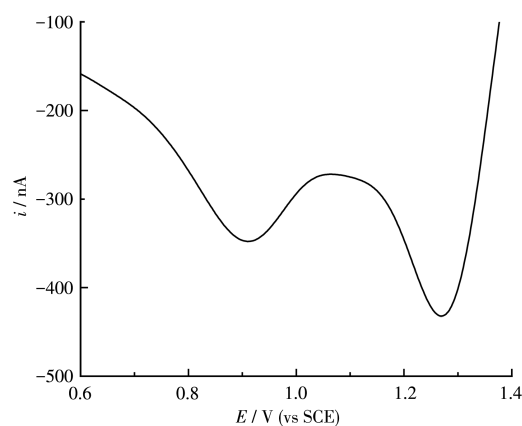
图4 配合物 **Ru3** 在 CH₃CN 中的 DPV 图Fig.4 DPV diagram of complex **Ru3** in CH₃CN

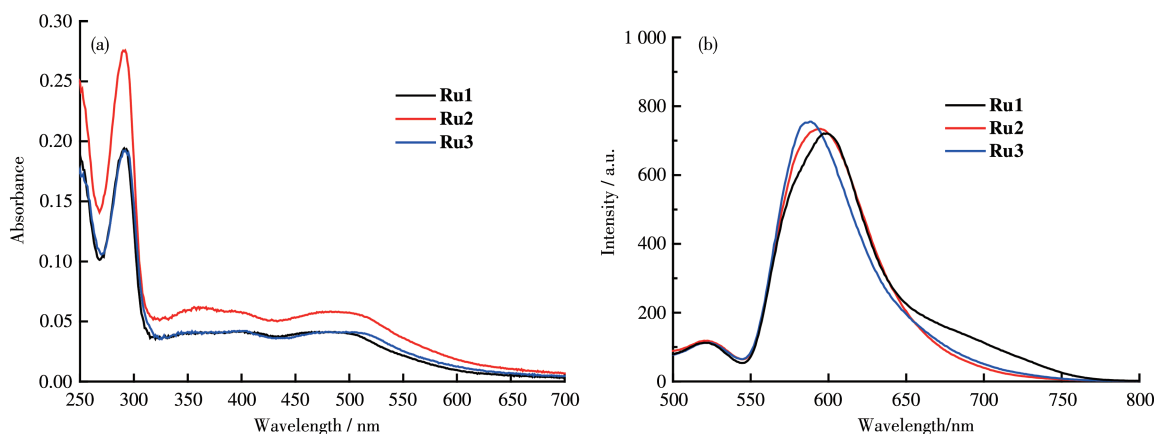
表1 **Ru1~Ru3**的光谱学、电化学数据及脂水分
系数(lg *P*)

Table 1 Spectroscopic, electrochemistry data and
fat-water partition coefficient (lg *P*) of
Ru1-Ru3

Complex	<i>E</i> / V	λ_{max} / nm	λ_{em} / nm	lg <i>P</i>
Ru1	1.13, 1.35	293, 355, 490	600	-1.6
Ru2	1.12, 1.20	293, 359, 492	594	-1.9
Ru3	0.90, 1.28	292, 349, 507	587	-1.1

2.4 配合物的光谱性质

将3个配合物分别配制成10 μmol·L⁻¹的乙腈溶液,测定其UV-Vis光谱,所得谱图如图5a所示。表1列出了3个配合物**Ru1**、**Ru2**和**Ru3**的最大吸收波

图5 配合物 **Ru1~Ru3** 在 CH₃CN 中的(a) UV-Vis 和(b) 荧光光谱图Fig.5 (a) UV-Vis and (b) fluorescence spectra of complexes **Ru1-Ru3** in CH₃CN

长。3个配合物的UV-Vis光谱相似,均有3个吸收峰,各个配合物对应的最大吸收峰波长值非常接近,分别在290、360和490 nm附近。每个吸收峰都可以找到相应归属:290 nm对应为一个又窄又强的吸收带,归属为未带任何取代基的联吡啶的 $\pi-\pi^*$ 电子跃迁产生的吸收;360 nm对应于电子从金属跃迁到配体的单重态吸收,即为 $^1\text{MLCT}$ 吸收;490 nm对应的较宽谱带归属为电子从金属跃迁到配体的三重态吸收,即为 $^3\text{MLCT}$ 吸收。

将配合物溶解在乙腈中,配成浓度为 $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的溶液,对配合物进行荧光光谱测试,以450 nm作为激发波长,扫描发射光谱,结果如图5b所示。3个配合物的发射波长均在600 nm左右,配体没有荧

光,说明该系列配合物的荧光是金属钌发射出来的。

2.5 生物活性检测

以人宫颈癌细胞Hela、胃癌细胞BGC823、胃癌细胞SGC-7901和人正常胚肺成纤维细胞MRC-5为对象,通过MTT法检测了3个配合物对肿瘤细胞的细胞毒性。配合物对各细胞作用48 h后能够看到较明显的肿瘤细胞死亡变化。图6显示了配合物Ru1~Ru3对Hela、BGC823、SGC-7901和MRC-5的细胞毒性结果。

从表2可以看出,3个配合物对3种肿瘤细胞的毒性大小排序均为 $\text{Ru3} > \text{Ru1} > \text{Ru2}$,可能的原因是配合物Ru3含有亚砷结构,配合物疏水性强,亲脂

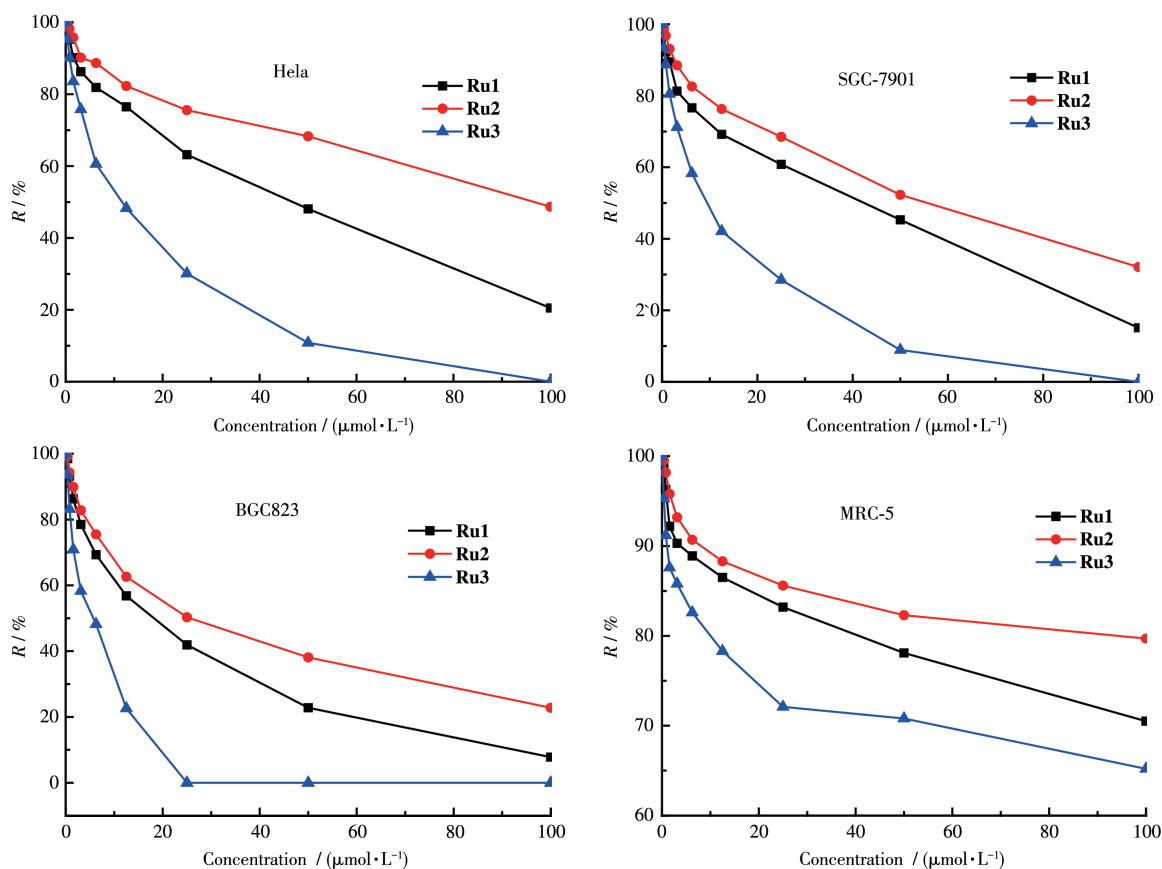


图6 配合物Ru1~Ru3对Hela、BGC823、SGC-7901和MRC-5的细胞毒性

Fig.6 Cytotoxicity of complexes Ru1-Ru3 on Hela, BGC823, SGC-7901, and MRC-5

表2 Ru1~Ru3对Hela、BGC823、SGC-7901和MRC-5的 IC_{50}

Table 2 IC_{50} of Ru1-Ru3 against Hela, BGC823, SGC-7901, and MRC-5

Complex	$\text{IC}_{50} / (\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$			
	Hela	SGC-7901	BGC823	MRC-5
Ru1	46.51	41.61	18.82	>100
Ru2	93.61	53.60	24.81	>100
Ru3	10.53	9.52	5.62	>100

性大,溶解度低,使得配合物容易累积到线粒体内^[22]。还可以看到,该系列配合物对BGC823的毒性均为最强。而3个配合物对MRC-5的 IC_{50} 都大于 $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,说明配合物对正常细胞没有细胞毒性。

2.6 配合物的脂水分配系数

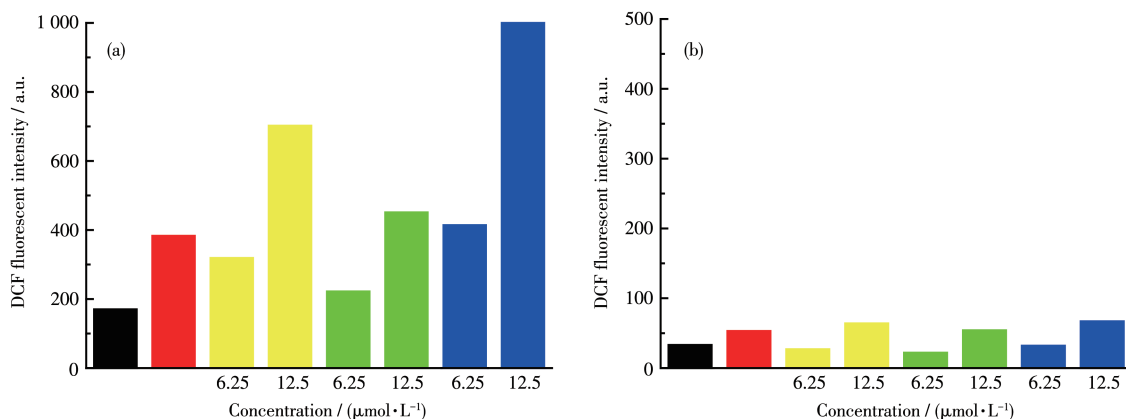
抗癌药物的活性通常与它们的亲脂性有关,由此产生的疏水性可能有助于增加细胞对药物的摄取,从而增强其抗癌活性^[23-27]。我们测试了**Ru1~Ru3**的标准辛醇-水分配系数($\lg P$),结果见表2。 $\lg P$ 的大小顺序与上面得到的配合物的细胞毒性强弱呈一致关系,也间接地证明了我们的推测有一定的道理。这一结果初步表明钌配合物的抗癌活性与 $\lg P$ 有直接关系,其抗癌活性随配合物亲脂性的增加而增强。

2.7 活性氧检测

通过MTT实验得出的结论是配合物对肿瘤细

胞有毒性而对正常细胞没有毒性,为了证实这一点我们做了活性氧(ROS)检测实验。ROS是生物体代谢过程中产生的含氧自由基或者容易形成自由基的过氧化物的总称。肿瘤细胞内ROS水平要高于正常细胞,这使得抗氧化酶对ROS的耐受性达到了极限,如果ROS再升高则会导致肿瘤细胞的凋亡^[28],即使ROS水平下降也对肿瘤细胞的增值造成负面影响。

将配合物**Ru1~Ru3**分别作用于BGC823和MRC-5,每个配合物设置2个浓度(6.25和12.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。培养24 h后用DCFH-DA作为荧光探针检测细胞内ROS的变化(图7)。结果发现配合物**Ru1~Ru3**能增加肿瘤细胞内ROS的水平,并且配合物浓度越高,增强作用越明显。配合物的作用强度为**Ru3>Ru1>Ru2**,与MTT实验结果一致。但是,配合物**Ru1~Ru3**对正常细胞内ROS的水平并没有明显的影响。



Black: control; Red: exposed to Rosup as positive control; Yellow: **Ru1**; Green: **Ru2**; Blue: **Ru3**; Incubation time: 24 h

图7 配合物**Ru1~Ru3**对BGC823 (a)和MRC-5 (b)内ROS水平的影响

Fig.7 Effect of complexes **Ru1~Ru3** on ROS level in (a) BGC823 and (b) MRC-5

3 结 论

以4,4'-二(4-氨基苯氧基)联苯、2,2'-二(4-氨基苯氧基)苯基丙烷、4,4'-二(4-氨基苯氧基)二苯醚和2-吡啶甲醛为原料,合成了3个双齿配体,并在此基础上合成了3个双核钌配合物**Ru1~Ru3**。通过元素分析、核磁共振氢谱、红外光谱、电喷雾质谱对配体及配合物进行了结构表征,证实了配合物结构的正确性。此外,通过MTT法测试了**Ru1~Ru3**对Hela、BGC823、SGC-7901和MRC-5四种细胞的毒性,结果显示**Ru3**的抗肿瘤活性强于**Ru1**和**Ru2**,而在所测的3种肿瘤细胞中,**Ru1~Ru3**均表现出对

BGC823有很好的选择性(**Ru3**毒性最强),说明**Ru3**可能成为治疗癌症的潜在药物。

Supporting information is available at <http://www.wjhxxb.cn>

参考文献:

- [1]Rosenberg B, Vancamp L. Platinum Compounds: A New Class of Potent Antitumour Agents. *Nature*, **1969**,**222**:385-386
- [2]Esref Alkis M, Kelestemür Ü, Alan Y, Turan N, Buldurun K. Cobalt and Ruthenium Complexes with Pyrimidine Based Schiff Base: Synthesis, Characterization, Anticancer Activities and Electrochemotherapy Efficiency. *J. Mol. Struct.*, **2021**,**1226**:129402

- [3] Jiang G B, Zhang W Y, He M, Gu Y Y, Bai L, Wang Y J, Qiao Y, Du F. Anticancer Activity of Two Ruthenium(II) Polypyridyl Complexes toward Hepatocellular Carcinoma HepG-2 Cells. *Polyhedron*, **2019**, *169*:209-218
- [4] Małecka M, Skoczynska A, Goodman D M, Hartinger C G, Budzisz E. Biological Properties of Ruthenium(II/III) Complexes with Flavonoids as Ligands. *Coord. Chem. Rev.*, **2021**, *436*:213849
- [5] Jiang G B, Zhang W Y, He M, Gu Y Y, Bai L, Wang Y J, Yi Q Y, Du F. Systematic Evaluation of the Antitumor Activity of Three Ruthenium Polypyridyl Complexes. *J. Inorg. Biochem.*, **2021**, *225*:111616
- [6] Savić A, Gligorićević N, Arandjelović S. Antitumor Activity of Organoruthenium Complexes with Chelate Aromatic Ligands, Derived from 1, 10 - Phenantroline: Synthesis and Biological Activity. *J. Inorg. Biochem.*, **2020**, *202*:110869
- [7] Jana D, Zhao Y L. Strategies for Enhancing Cancer Chemodynamic Therapy Performance. *Exploration*, **2022**(2):20210238
- [8] Hartinger C G, Jakupca M A, Zorbas S, Groessl M, Egger A, Berger W, Zorbas H, Dyson P J, Keppler B K. KP1019, A New Redox-Active Anticancer Agent-Preclinical Development and Results of a Clinical Phase I Study in Tumor Patients. *Chem. Biodivers.*, **2008**, *5*(10):2140-2155
- [9] Leigen S, Burgers S A, Baas P, Pluim D, Tibben M, Werkhoven E, Alessio E, Sava G, Beijnen J H, Schellens J H M. Phase I / II Study with Ruthenium Compound NAMI - A and Gemcitabine in Patients with Non - small Cell Lung Cancer after First Line Therapy. *Invest. New Drugs*, **2015**, *33*(1):201-214
- [10] Schatzschneider U, Niesel J, Ott I, Gust R, Alborzinia H, Wölfl S. Cellular Uptake, Cytotoxicity, and Metabolic Profiling of Human Cancer Cells Treated with Ruthenium(II) Polypyridyl Complexes. *ChemMedChem*, **2008**, *3*(7):1104-1109
- [11] Lentz F, Drescher A, Lindauer A, Henke M, Hilger R A, Hartinger C G, Scheulen M E, Dittrich C, Keppler B K, Jaehde U. Pharmacokinetics of a Novel Anticancer Ruthenium Complex (KP1019, FFC14A) in a Phase I Dose-Escalation Study. *Anti-Cancer Drugs*, **2009**, *20*(2):97-103
- [12] Zhong Y W, Wu S H, Burkhardt S E, Yao C J, Abruña H D. Mononuclear and Dinuclear Ruthenium Complexes of 2,3-Di-2-pyridyl-5,6-diphenylpyrazine: Synthesis and Spectroscopic and Electrochemical Studies. *Inorg. Chem.*, **2011**, *50*(2):517-524
- [13] Huang W K, Cheng C W, Chang S M, Lee Y P, Eric W G. Synthesis and Electron-Transfer Properties of Benzimidazole-Functionalized Ruthenium Complexes for Highly Efficient Dye - Sensitized Solar Cells. *Chem. Commun.*, **2010**, *46*(47):8992-8994
- [14] Garza-Ortiz A, Maheswari P U, Lutz M, Siegler M A, Reedijk J. Tuning the Cytotoxic Properties of New Ruthenium(III) and Ruthenium(II) Complexes with a Modified Bis(arylimino)pyridine Schiff Base Ligand Using Bidentate Pyridine - Based Ligands. *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2014**, *19*:675-689
- [15] Selvamurugan S, Viswanathamurthi P, Endo A, Hashimoto T, Natarajan K. Synthesis, Spectral Characterization, Antioxidant, Anticancer *In Vitro*, and DNA Cleavage Studies of a Series of Ruthenium(II) Complexes Bearing Schiff Base Ligands. *J. Coord. Chem.*, **2013**, *66*(22):4052-4066
- [16] Sathiyaraj S, Sampath K, Butcher R J. Designing, Structural Elucidation, Comparison of DNA Binding, Cleavage, Radical Scavenging Activity and Anticancer Activity of Copper(I) Complex with 5 - Dimethyl-2-phenyl-4-[(pyridin-2-ylmethylene)-amino]-1,2-dihydropyrazol-3-one Schiff Base Ligand. *Eur. J. Med. Chem.*, **2013**, *64*:81-89
- [17] Garza-Ortiz A, Maheswari P U, Siegler M, Spek A L, Reedijk J. A New Family of Ru(II) Complexes with a Tridentate Pyridine Schiff-Base Ligand and Bidentate Co-ligands: Synthesis, Characterization, Structure and *In Vitro* Cytotoxicity Studies. *New J. Chem.*, **2013**, *37*:3450-3460
- [18] Sathiyaraj S, Butcher R J, Jayabalakrishnan C. Synthesis, Characterization, DNA Interaction and *In Vitro* Cytotoxicity Activities of Ruthenium(II) Schiff Base Complexes. *J. Mol. Struct.*, **2012**, *1030*:95-103
- [19] Raja G, Butcher R J, Jayabalakrishnan C. Studies on Synthesis, Characterization, DNA Interaction and Cytotoxicity of Ruthenium(II) Schiff Base Complexes. *Spectrosc. Acta Pt. A-Molec. Biomolec. Spectr.*, **2012**, *94*:210-215
- [20] Mosmann T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods*, **1983**, *65*(1/2):55-63
- [21] 白信法, 马宣, 解晓霞, 邵明莎, 郭宁宁, 严宁, 姚雷. 微管菌素类似物的合成及抗肿瘤活性. 高等学校化学学报, **2017**, *38*(1):47-55
BAI X F, MA X, XIE X X, SHAO M S, GUO N N, YAN N, YAO L. Synthesis and Anti-tumor Activity of Tubulysins Analogues. *Chem. J. Chinese Universities*, **2017**, *38*(1):47-55
- [22] Zhang Y, Cai P, Hu P C, Yang F, Cheng G Z. Synthesis, Characterization, Crystal Structure, Cytotoxicity, Apoptosis and Cell Cycle Arrest of Ruthenium(II) Complex [Ru(bpy)₂(adpa)](PF₆)₂ (bpy=2,2'-Bipyridine, adpa=4-(4-Aminophenyl) diazenyl-N-(pyridin-2-ylmethylene)aniline). *RSC Adv.*, **2015**, *5*:11591-11598
- [23] Mendoza-Ferri M G, Hartinger C G, Mendoza M A, Groessl M, Egger A E, Eichinger R E, Mangrum J B, Farrell N P, Maruszak M, Bednarski P J, Klein F, Jakupca M A, Nazarov A A, Severin K, Keppler B K. Transferring the Concept of Multinuclearity to Ruthenium Complexes for Improvement of Anticancer Activity. *J. Med. Chem.*, **2009**, *52*:916-925
- [24] Giannini F, Paul L E H, Furrer J, Therrien B, Süss-Fink G. Highly Cytotoxic Diruthenium Trithiolato Complexes of the Type [(η^6 -p-MeC₆H₄Pr)₂Ru₂(μ_2 -SR)₃]⁺: Synthesis, Characterization, Molecular Structure and *In Vitro* Anticancer Activity. *New J. Chem.*, **2013**, *37*:3503-3511
- [25] Mulyana Y, Weber D K, Buck D P, Motti C A, Collins J G, Keene F R. Oligonuclear Polypyridylruthenium(II) Complexes Incorporating Flexible Polar and Non-polar Bridges: Synthesis, DNA-Binding and Cytotoxicity. *Dalton Trans.*, **2011**, *40*:1510-1523
- [26] Gorle A K, Ammit A J, Wallace L, Keene F R, Collins J G. Multinuclear Ruthenium(II) Complexes as Anticancer Agents. *New J. Chem.*, **2014**, *38*:4049-4059
- [27] DeBerardinis R J, Lum J J, Hatzivassiliou G, Thompson C B. The Biology of Cancer: Metabolic Reprogramming Fuels Cell Growth and Proliferation. *Cell Metab.*, **2008**, *7*(1):11-20
- [28] Liu H Y, Yuan Y Z, Guo H Y, Mitchelson K, Zhang K, Xie L, Qin W Y, Lu Y, Wang J, Guo Y, Zhou Y X, He F C. Hepatitis B Virus Encoded X Protein Suppresses Apoptosis by Inhibition of the Caspase-Independent Pathway. *J. Proteome Res.*, **2012**, *11*(10):4803-4813