

钴(Ⅲ)的联吡啶类混配配合物的合成,表征及其与DNA键合的光谱研究

陈绘丽, 杨 频*

山西大学分子科学研究所, 山西 太原 030006

摘 要 合成了两种新的钴多吡啶类混配配合物。通过元素分析, 红外, 紫外, 核磁方法对其进行表征, 应用吸收及发射光谱, DNA 熔点技术, 循环伏安法, 研究了其与小牛胸腺 DNA 的作用。结果显示, 混配配合物与 DNA 作用时, 使紫外吸收明显减色, 荧光显著增强, DNA 熔点升高。循环伏安法研究表明, 配合物仅有还原峰, 与 DNA 作用后, 还原峰电流明显下降。这些结果证明配合物与 DNA 存在插入结合, $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 猝灭实验也支持这一结论。峰电位有位移, 说明配合物与 DNA 分子中带负电荷的磷酸基团可能存在静电结合, 进而计算得到配合物与 DNA 的键合常数分别为 1.8×10^4 , 4.37×10^4 。

主题词 钴(Ⅲ); HPIP; 小牛胸腺 DNA; 键合模式

中图分类号: O523 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-0593(2002)06-0983-04

近年来, 过渡金属配合物作为 DNA 结构和构象的探针一直是人们关注的、比较活跃的研究领域。其特点是通过变换不同的配体和中心金属离子, 以达到和 DNA 有效作用的目的, 其中以邻菲咯啉, 联吡啶为配体形成的手性金属配合物尤为引人注目。目前这方面的报道较多^[1-3], 但是配合物与 DNA 的作用机理仍不十分清楚, 并且还存在着争议^[4,5]。人们提出“形状选择”规则作为识别 DNA 的基础^[6], 即配合物是根据本身的形状、对称性及其旋光性质与核酸特定部位相匹配的原则对 DNA 或 RNA 进行识别。因此, 合成功能各异的配合物, 对于了解 DNA-配合物键合模式及寻找新型 DNA 识别、切割试剂均有重要意义。

多数金属多吡啶类配合物呈正电性, 在低离子强度下可与单链或双股螺旋 DNA 以静电结合; 配合物可以一个平面配体插入双螺旋碱基对间, 所以配体的体积、形状、亲性和配合物所带电荷、中心金属离子, 都对插入结合有很大影响。为使配合物有效插入 DNA, 必须选择平面芳香环较大的配体, 使得配体在插入时其芳香环平面与 DNA 碱基对紧密地堆积。据此, 本文合成了两种新的八面体钴的联吡啶类 PIP 和 HPIP 的大平面配合物, 并对其与小牛胸腺 DNA 的相互作用进行了研究, 发现配合物与 DNA 有插入式和静电式两种结合模式。

1 实验部分

1.1 材料与仪器

收稿日期: 2001-11-16, 修订日期: 2002-03-28

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(批准号: 29871020)

作者简介: 陈绘丽, 女, 1976 年生, 山西大学分子科学研究所博士研究生 * 通讯联系人

研究配合物与 DNA 的作用时, 样品均溶解在 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris·HCl 和 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 的二次蒸馏水缓冲液(pH = 7.2)中。将小牛胸腺 DNA(北京华美公司产品)的缓冲溶液用 UV 谱测定 $A_{260}/A_{280} = 1.84$, 其浓度用 260 nm 处的摩尔消光值监测。

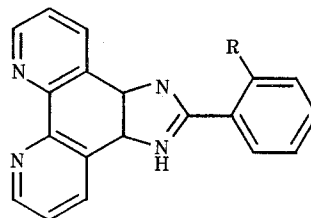
$[\text{Co}(\text{phen})_2\text{Cl}_2]\text{Cl}$ 按文献^[7]方法制备及纯化, 其他试剂均为分析纯, 用前未作处理。PIP 和 HPIP 按文献^[8]方法制备, 用丙酮和水的混合溶剂重结晶。

PERKIN-ELMER 240C 型元素分析仪, SHIMADU-FI-IR-8300 红外仪(KBr 压片), Bruker DRX-300MHz 核磁共振仪, HEWLETT PACKARD HP-8453 紫外检测仪, PERKIN/ELMER LS 50B 荧光仪(激发和发射狭缝分别为 10 和 8 mm), BAS-100A 电化学分析仪。

1.2 配合物的合成与表征

配体 PIP 和 HPIP 的结构如下:

HPIP: R = —OH, PIP: R = —H



1.2.1 $[\text{Co}(\text{phen})_2\text{HPIP}](\text{ClO}_4)_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 的合成

PIP 和 HPIP 的钌配合物已见报道, 但它的钴配合物尚未见报道。我们将 $[\text{Co}(\text{phen})_2\text{Cl}_2]\text{Cl}$ 和 HPIP 在水-甲醇 (1:2, v) 的混合溶剂中回流 5 h, 溶液呈深红色, 减压除去大部分甲醇溶剂, 滴加饱和 NaClO_4 溶液, 橙黄色沉淀析出, 过滤, 用乙腈/乙醚重结晶, 真空干燥。配合物组成为 $[\text{Co}(\text{phen})_2\text{HPIP}](\text{ClO}_4)_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 。

元素分析 (%: 括号内为计算值): C: 48.84(48.41), H: 3.13(3.00), N: 11.20(10.88)。

IR, ν/cm^{-1} : 3 421 br, w(ν_{NH} , ν_{OH}), 3 101 w(ν_{CH}), 1 471 m (δ_{CCH}), 1 363 m(ν_{HPIP}), 1 089 vs (ν_{ClO_4}), 623 s(δ_{ClO_4}), 405 w (ν_{CoN_6});

UV, $\lambda_{\text{max/nm}}$ ($\log \epsilon$): 220 (4.539), 275 (4.369), 281 (4.374)。

$^1\text{H NMR}$ (CD_3CN) ppm (10^{-6}): 17.51 (s, 1H), 9.43 (t, 2H), 9.00 (t, 2H), 8.56 (d, 1H), 8.43~8.38 (t, 4H), 7.87~7.79 (m, 6H), 7.61~7.55 (m, 2H), 7.38~7.18 (m, 8H), 7.02 (d, 2H)。

1.2.2 $[\text{Co}(\text{phen})_2\text{PIP}](\text{ClO}_4)_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 的合成

用与上述相同的方法, 以 PIP 代替 HPIP, 即可制得 $[\text{Co}(\text{phen})_2\text{PIP}](\text{ClO}_4)_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 。

元素分析 (%: 括号内为计算值): C: 50.26(50.00), H: 3.35(2.91), N: 11.41(11.05)。

IR, ν/cm^{-1} : 3 421 br, w(ν_{NH} , ν_{OH}), 3 074 w(ν_{CH}), 1 627 m ($\delta_{\text{H}_2\text{O}}$), 1 460 m(δ_{CCH}), 1 361 m(ν_{PIP}), 1 091 vs (ν_{ClO_4}), 626 s (δ_{ClO_4})。

UV, $\lambda_{\text{max/nm}}$ ($\log \epsilon$): 224(4.269), 272(4.149)。

$^1\text{H NMR}$ (CD_3CN) ppm (10^{-6}): 17.51 (s, 1H), 11.03 (d, 1H), 10.92 (d, 1H), 9.41 (d, 2H), 9.18~9.05 (m, 4H), 8.72 (m, 3H), 8.55 (d, 1H), 8.41 (d, 2H), 7.86 (d, 2H), 7.77 (d, 2H), 7.55~7.46 (m, 2H), 7.38~7.24 (m, 4H), 7.21~7.17 (d, 2H)。

2 结果与讨论

2.1 配体及配合物的光谱性质

配体 PIP, HPIP 的 $^1\text{H NMR}$ 谱表明, 咪唑环 N 上的 H 可在咪唑环 2 个 N 之间快速交换, 在低场 13~14 ppm 区间显示出宽峰, 因而整个分子在溶液中是对称的。配合物在更低场 (17.51 ppm 附近) 出现宽峰, 表明配体配位使咪唑环 N-H 上的电子云密度降低, 从而降低了它与负电性 DNA 的排斥作用, 使之与 DNA 发生更强的作用。

配合物在 200~300 nm 附近出现的一个较强的紫外吸收峰, 归属为配体 $\pi-\pi^*$ 跃迁。把两种配合物的结构相比较, 可以清楚地看到 $[\text{Co}(\text{phen})_2\text{HPIP}]^{3+}$ 在 281 nm 处的强吸收, 这是由于 HPIP 内部氢键的生成, 共轭面增大, 致使 π 轨道能量降低, 吸收峰红移。在 350 nm 附近较弱的吸收峰为金属-配体电荷转移 (MLCT), 这是由于 $d-\pi^*$ 能量间隔较大, 所需能量大, 电子不易跃迁所致。

配合物 $[\text{Co}(\text{phen})_2\text{PIP}]^{3+}$, $[\text{Co}(\text{phen})_2\text{HPIP}]^{3+}$ 在室温溶液状态下发荧光, 发射峰分别为 361 和 363 nm, 一般认为配合物荧光发射是由 $^3\text{MLCT}$ 激发态到基态的跃迁所致, 在此, 配合物的荧光也应属此类型。

比较配体与配合物的红外光谱, $\nu_{\text{C}-\text{C}}$ 伸缩共振, ν_{CCH} 及环伸缩振动均发生一定程度的红移, 表明配体参与了金属配位。

2.2 DNA 对配合物特征吸收峰的减色效应

将配合物 ($c = 10^{-5} \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 与 DNA 以不同的摩尔比混合 ($c_{\text{DNA}}/c_{\text{drug}} = 0, 1.0, 2.0, 6.0, 8.0, 10.0$) (曲线自上而下), 室温下反应 30 min, 以同浓度 DNA 溶液作参比, 测定了不同摩尔比的配合物与 DNA 作用的 (在 200~900 nm 区间内) 紫外吸收谱 (图 1)。配合物与 DNA 的结合常数 K 可由方程 (1)^[9] 求出

$$[\text{DNA}]/(\epsilon_A - \epsilon_F) = [\text{DNA}]/(\epsilon_B - \epsilon_F) + 1/K(\epsilon_B - \epsilon_F) \quad (1)$$

式中 $[\text{DNA}]$ 为 DNA 浓度, ϵ_A 为配合物的表观摩尔消光系数, ϵ_B , ϵ_F 分别为键合的和自由的配合物的摩尔消光系数, K 为配合物与 DNA 的键合常数。

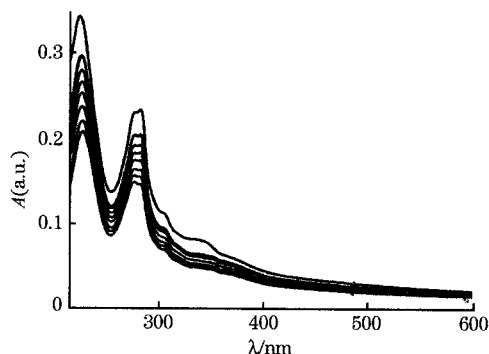


Fig. 1 UV absorption spectra of $[\text{Co}(\text{phen})_2\text{HPIP}]^{2+}$ with DNA increasing concentration

由图 1 可见, 配合物与 DNA 作用后的吸收光谱发生减色, 且减色程度随着 DNA 浓度的增大而增大, 这表明配合物与 DNA 发生了反应, 求得 $[\text{Co}(\text{phen})_2\text{HPIP}]^{3+}$ 与 DNA 的键合常数为 4.37×10^4 , $[\text{Co}(\text{phen})_2\text{PIP}]^{3+}$ 与 DNA 的键合常数为 1.8×10^4 , 这些特征与 $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dppz}]^{2+}$ 相似, 表明配合物与 DNA 的键合模式与 $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{DPPZ}]^{2+}$ 相同, 为插入式键合^[10]。氢键效应使得 HPIP 比 PIP 插入 DNA 碱基对更深。

3.3 荧光法研究配合物与 DNA 的作用

配合物与 DNA 作用, 使配合物荧光增强。在水溶液中, 这两种配合物分别在 361, 363 nm 产生荧光, 加入 DNA 后, 荧光强度大大增强 (图 2), 表明配合物的发光基团进入一疏水环境中, 被水分子猝灭较弱。因此, 我们推测 PIP 及 HPIP 插入 DNA 碱基对而受到保护。

$\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 作为猝灭剂的荧光猝灭实验也证实了这一点。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。插入结合的配离子深入 DNA, 受保护程度大, 被 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$

猝灭的可能性小,而沿沟表面结合的配离子则比较容易受到 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 的进攻。以未加入 (I_0) 对加入 (I) 猝灭剂 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 的发光强度比值为纵坐标, $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 浓度 c 为横坐标作图如图 3。由图 3 可见, F 对 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 浓度作图不是直线关系。根据猝灭理论,无论是动态猝灭还是静态猝灭,都能得到直线,因此, $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 对配合物-DNA 的猝灭既不是动态猝灭,又不是静态猝灭,而是一种特殊类型的猝灭,这说明配合物和 DNA 的结合方式极有可能不止一种,即除插入方式结合以外还伴有静电结合。

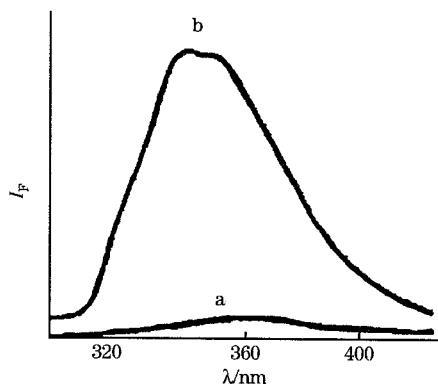


Fig. 2 Fluorescence spectra of $[\text{Co}(\text{phen})_2\text{HPIP}]^{2+}$ in the absence (below) and presence (above) of DNA

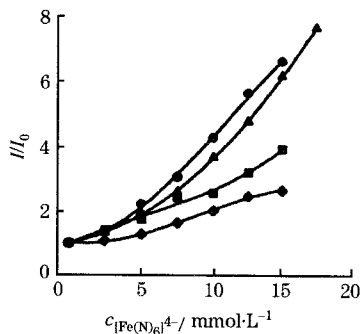


Fig. 3 Luminescence quenching of complexes bound to DNA with increasing of $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$

(●): $\text{Co}(\text{phen})_2\text{PIP}^{3+}$ (■): $\text{Co}(\text{phen})_2\text{PIP}^{3+} + \text{DNA}$

(▲): $\text{Co}(\text{phen})_2\text{HPIP}^{3+}$ (◆): $\text{Co}(\text{phen})_2\text{HPIP}^{3+} + \text{DNA}$

2.4 DNA 熔点实验

配合物以插入方式键合 DNA 亦可通过 DNA 的熔点实验证明^[11]。小分子化合物插入 DNA 双螺旋碱基对中,使得

双螺旋结构破坏,260 nm 处紫外吸收值升高,从而引起 DNA 的熔点升高,因此,我们可以根据 DNA 在 260 nm 处的吸收值来确定 DNA 的熔点。DNA 的变性是爆发式的,有一个相变过程,通常把 ϵ 值达最高值的 1/2 时温度称为熔点,用 T_m ^[12] 表示。由 DNA 与配合物作用前后的紫外吸收值得变化可以看出,在 Co 配合物存在下, DNA 的熔点升高。

2.5 循环伏安法研究配合物与 DNA 的作用方式

在缓冲溶液中,配合物与 DNA 反应 30 min 后,以 $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ 的扫描速度测其循环伏安谱。由于双股螺旋 DNA 在 $-0.400 \sim -1.00 \text{ V}$ 无氧化还原峰,而配合物则表现出特征的还原峰。图 4 为 $[\text{Co}(\text{phen})_2\text{HPIP}]^{3+}$ 与 DNA 作用前后的 CV 谱。

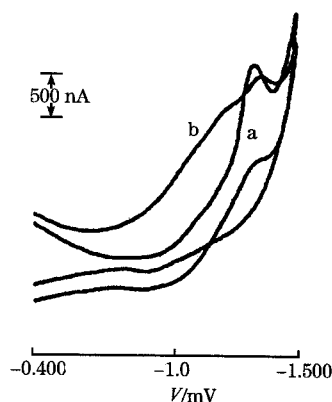


Fig. 4 Cyclic voltammograms of $\text{Co}(\text{phen})_2\text{HPIP}^{3+}$ in the absence (a) and presence (b) of DNA

可见,当 DNA 存在时,配合物还原峰电流下降,且峰电位有位移。循环伏安法是研究药物与 DNA 作用方式的有力工具之一,当药物分子中存在插入基团且以插入方式与 DNA 结合时,由于药物的扩散系数大幅度下降,则导致其还原峰电流下降。峰电位的移动也表明,药物与 DNA 分子中带负电荷的磷酸基团可能存在静电结合^[13]。

Barton^[14] 提出含平面配体配合物与 DNA 的作用存在插入和静电结合两种模式;本研究结果支持 Barton 观点。即应用 Barton 的观点,可以解释我们以上的实验事实。我们的结论是:含平面配体配合物与 DNA 的作用方式,两种结合模式确实存在,并且是决定这类配合物与 DNA 结合行为的主要因素之一。我们将用二维核磁共振法更深入地研究这类配合物与核酸的作用位点。

参 考 文 献

- [1] JIN Lan, YANG Pin. *Chinese Journal of Chemistry*, 1997, **15**(2):107.
- [2] JIN Lan, YANG Pin. *Chem. Research in Chinese University*, 1998, **14**(1): 12.
- [3] JIN Lan, YANG Pin. *Microchemical Journal*, 1998, **58**: 144.
- [4] J C Murphy, J K Barton. *Methods Enzymol*, 1993, **226**:576.
- [5] S Satyanarayana, J C Dabrowiak, J B Chaires. *Biochemistry*, 1993, **32**:2573.
- [6] A Sitlani, E C Long, A M Pyle, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 1992, **114**: 2303.
- [7] G Grassini-Strazza, S Isola. *J. Chromatogr*, 1978, **15**(8):127.
- [8] Xiong Ya, Zou Xiao-hua, et al. *Synth. React. Inorg. Metorg. Chem.*, 1998, **28**(9):1445.

- [9] A M Pyle, J P Rehmann, R Meshoyrer, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 1989, **111**:3051.
- [10] C Hiort, P Lincoln, B Norden. *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, **115**: 3448.
- [11] D J Patel. *Acc. Chem. Res.*, 1979, **12**:118.
- [12] 沈 同等主编,生物化学(上册),高等教育出版社,1980.
- [13] a) A T Bard. *Pure and Appl. Chem.*, 1992, **2**:185.
b) PENG Dai-gao, et al(庞代高等). *Chemistry Bulletin(化学通报)*,1994,(2):3.
c) J Sun, D K T Solaiman. *J. Inorg. Biochem.*, 1990,271.
- [14] J P Rehman, J K Barton. *Biochemistry*, 1990,**29**:1701.

Synthesis Characterization and DNA Binding Spectroscopy Studies of Cobalt(III) Mixed-polypyridyl Complex

CHEN Hui-li, YANG Pin*

Institute of Molecular Science, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

Abstract Two complexes of $[\text{Co}(\text{phen})_2\text{PIP}](\text{ClO}_4)_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ and $[\text{Co}(\text{phen})_2\text{HPIP}](\text{ClO}_4)_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ have been synthesized (PIP = 2-imidazo[4,5-f][1,10]phenanthroline, HPIP = 2-(2-hydroxyphenyl)-imidazo[4,5-f][1,10]phenanthroline) and characterized by elemental analysis, UV, IR and ^1H NMR spectroscopy. The interaction of the complexes with calf thymus DNA have been studied using absorption and emission spectroscopy, DNA melting techniques and cyclic voltammetric. The compounds show absorption hypochromicity, fluorescence enhancement, DNA melting increasement when binding to CT-DNA. CV measurement shows that the shift in reduction potential and the change in peak current with addition of DNA. These results prove the compounds insert DNA base pairs. The shift of peak potential indicates the ion interaction mode between the drug and DNA. The binding constants of the compounds to DNA are 1.8×10^4 and 4.37×10^4 respectively.

Keywords Cobalt(III); HPIP; CT-DNA; Binding mode

(Received Nov. 16,2001;accepted March 28,2002)