

一种新型钌(II)多吡啶配合物的制备 及其与 ctDNA 的作用研究

李明田^{1,2}

(1. 四川理工学院材料与化学工程学院, 四川 自贡 643000; 2. 材料腐蚀与防护四川省高校重点实验室, 四川 自贡 643000)

摘 要:以 1,10-邻菲罗啉、对硝基苯胍和三氯化钌等为原料合成一种新型钌(II)多吡啶配合物-高氯酸[二(2,2'-联吡啶)(4,5-二氮杂芴-9-对硝基苯胍)]合钌(II) [Ru(bipy)₂DAFND](ClO₄)₂。采用元素分析、红外光谱、核磁和质谱等手段对其进行了表征。采用电子吸收光谱法、荧光法和粘度法等手段研究了配合物与 ctDNA 的相互作用,实验结果表明配合物以插入的方式与 DNA 键合,键合常数为 8.91×10^5 L/mol。

关键词:钌(II)多吡啶配合物; ctDNA; 键合模式

中图分类号: O652.7; O614.82⁺¹

文献标识码: A

钌(II)多吡啶配合物不仅结构特殊而且热力学性质稳定,光化学和光物理信息丰富。既可以作 DNA 的结构探针又可以作 DNA 分子光开关。这类配合物与 DNA 相互作用时,包括荧光性质在内的很多性质都会发生变化,研究这些性质的变化能够获得配合物与 DNA 作用的强度和方式^[1-4]。

本文以 1,10-邻菲罗啉、对硝基苯胍和三氯化钌等为原料,合成了一种新型钌(II)多吡啶配合物高氯酸[二(2,2'-联吡啶)(4,5-二氮杂芴-9-对硝基苯胍)]合钌(II) [Ru(bipy)₂DAFND](ClO₄)₂,并对其进行了表征;采用电子吸收光谱法、荧光法和粘度法等手段研究了配合物与 ctDNA 的相互作用。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

1,10-邻菲罗啉,氢氧化钾,对硝基苯胍,高锰酸钾,高氯酸钠,小牛胸腺 DNA 等均为分析纯;4,5-二氮杂芴-9-芴酮(DAFO)^[5]和 *cis*-[Ru(bipy)₂Cl₂]·2H₂O^[6]按文献合成。缓冲溶液 pH 值为 7.1 的 5 mmol/L Tris-HCl 和 50 mmol/L NaCl 缓冲溶液(Tris 缓冲溶液)。

UV-2450 型紫外分光光度计, F-4500 型荧光光

谱仪,乌氏粘度计,60SXB 型付里叶变换红外光谱仪, API2000 型电喷雾质谱仪, Vario EL 元素分析仪, JENCO Model 电导仪。

1.2 配合物的合成

(1) 4,5-二氮杂芴-9-对硝基苯胍(DAFND)的合成

在三口烧瓶中加入 0.234 g (12 mmol) DAFO 的甲醇溶液 10 mL,加热搅拌条件下缓慢加入对硝基苯胍 0.230 g (15 mmol) 和 4 滴冰醋酸,75 °C 回流反应 5 h。冷却,有少量土黄色固体出现,抽滤,滤饼用甲醇、乙醇和乙醚各 50 mL 洗涤,真空干燥。产率: 0.284 g (90%)。

元素分析:计算值(C₁₇H₁₁N₅O₂) (%): C 74.98, H 4.44, N 20.58; 实验值(%): C 74.37, H 4.65, N 20.87。IR (KBr 压片, cm⁻¹): 3413 s, 3322 s, 1584 s, 1324 m, 1299 m, 1276 m, 1256, 1108 m, 838 w, 749 w, 692 w。¹H NMR (600 MHz, CDCl₃, δ): 9.14 (s, 1H), 8.82 (d, 1H, J = 4.8 Hz), 8.75 (d, 1H, J = 4.8 Hz), 8.31 (d, 2H, J = 8.4 Hz), 8.24 (s, 2H), 7.38 - 7.44 (m, 4H)。

(2) [Ru(bipy)₂DAFND](ClO₄)₂ 的合成

把 *cis*-[Ru(bipy)₂Cl₂]·2H₂O 0.226 g 和 DAFND

0.156 g 的混合物溶解到 15 mL 乙二醇, N_2 保护回流 8 h, 冷却至室温, 用 4 倍量的 $NaClO_4$ 饱和水溶液沉淀反应产物, 有红色沉淀产生。抽滤, 所得固体 80°C 干燥后, 以适量甲醇溶解, 用中性氧化铝柱分离。用 3:1:0.1 的乙腈-甲醇-甲苯混合溶液作洗脱液, 收集红色组分。将该组分减压蒸干, 乙醚转移并洗净, 真空干燥, 得纯度较高的配合物 $[Ru(bipy)_2DAFND](ClO_4)_2 (Ru-DAFND)$ 。m. p. > 300 °C。产率约 75%。元素分析: 计算值 ($C_{37}H_{27}N_9Cl_2O_{10}Ru$) (%): C 47.78, H 2.91, N 13.56; 实验值 (%): C 47.27, H 3.35, N 13.90。IR (KBr 压片, cm^{-1}): 3120 w, 1603 m, 1467 m, 1444 m, 1424 m, 1091 s, 771 s, 728 m, 621 s。摩尔电导率 (DMF): $1590 S \cdot cm^2 \cdot mol^{-1}$ 。质谱 (ES-MS CH_3OH), 计算值: m/z 829.7 ($[M-ClO_4]^+$), 365.1 ($[M-2ClO_4]^{2+}$); 实验值: m/z 829.5 ($[M-ClO_4]^+$), 365.4 ($[M-2ClO_4]^{2+}$)。

1.3 配合物与 DNA 作用的研究方法

1.3.1 溶液的配制

称取适量的 ctDNA 溶于 Tris 缓冲溶液, 抽滤, 滤液稀释至一定浓度。测量 260 nm 和 280 nm 的吸光度, 若 $I_{260}/I_{280} > 1.8$, 说明 DNA 基本不含蛋白质, 不需进一步处理。ctDNA 浓度以碱基对的物质的量浓度计, 由 260 nm 处的吸光度计算得到, $[DNA] = K \times I_{260}/6600 mol/L$ ^[7], 其中 K 为稀释倍数。

1.3.2 电子吸收光谱测定

用 Tris 缓冲溶液准确配制一定体积的配合物浓度为 25 $\mu mol/L$ 的缓冲溶液, 取 2.5 mL 为测试液, 以相应的缓冲溶液为参比, 用 UV-2450 光谱程序记录配合物的电子吸收光谱, 记录范围 200 nm-600 nm。然后用微量移液器向测试液和参比中分别加入相同体积相同浓度的 ctDNA 溶液, 混匀约 5 min 后, 记录配合物的电子吸收光谱, 重复进行此操作, 直至配合物的特征峰不再改变。

1.3.3 荧光光谱测定

用 Tris 缓冲溶液准确配制配合物浓度为 3.5 $\mu mol/L$ 的溶液 1.5 mL 为测试液, 置入荧光皿, 在 F-4500 型荧光光谱仪上设定激发光波长为 466 nm, 记录 400 nm-650 nm 范围配合物的发射光谱; 然后用微量移液器向测试液中逐次加入一定体积的 ctDNA 溶液, 每次混匀时间约 5 min, 记录配合物的发射光谱, 直至 ctDNA 的浓度饱和。

1.3.4 粘度的测定

用 Tris 缓冲溶液准确配制一定浓度的配合物溶液。固定 ctDNA 溶液的浓度为 4.5 mmol/L, 置于乌氏粘度

计并在 SYP-II 型玻璃缸恒温水浴槽中恒温 ($28 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0.1 \text{ }^\circ\text{C}$), 恒温时间不少于 10 min。使用秒表记录 ctDNA 溶液流经粘度计毛细管所需时间, 重复测试 3 次, 误差小于 0.3 s, 取 3 次的平均值为 t_0 。测试配合物对 ctDNA 溶液粘度的影响时, 逐次增加配合物的浓度, 重复上述操作, 记录 ctDNA 和配合物的混合溶液流经粘度计毛细管所需时间, 重复测试 3 次, 误差小于 0.3 s, 取平均值为 t 。相对粘度按公式 (1) 计算^[8]。

$$\eta = \frac{t - t_0}{t_0} \quad (1)$$

式中 t_0 为缓冲溶液流经毛细管所需的时间, t 为 ctDNA 溶液 (含浓度不等的配合物) 流经毛细管所需的时间。以 $(\eta/\eta_0)^{1/3}$ 对配合物浓度作图。 η_0 为未与配合物混合的 ctDNA 溶液的相对粘度。

2 结果与讨论

2.1 配合物的表征

Vario EL 元素分析仪测定所合成的化合物的 C、H、N 含量。元素分析的结果见实验部分, 实验值与理论值符合, 说明所合成的配体和配合物的纯度较高。采用 JENCO Model 3010 电导率仪在 DMF 溶剂中测试配合物的电导率, 实验结果表明, 配合物的摩尔电导率为 1590 $S \cdot cm^2 \cdot mol^{-1}$, 说明配合物为二价的电解质型化合物^[9]。

红外光谱, 化合物 DAFO, 1722 cm^{-1} 强吸收峰为 C=O 的伸缩振动 $\nu_{C=O}$; 916 cm^{-1} , 760 cm^{-1} 为苯环氢的面外弯曲振动 ω_{Ar-H} ; 苯环的伸缩振动位于 1562 cm^{-1} 和 1402 cm^{-1} 处^[10]。在配体 DAFND 中, DAFO 的 1722 cm^{-1} 强吸收峰消失, 在 1584 cm^{-1} 处出现强的吸收峰, 为 C=N 的伸缩振动, 说明羰基与 NH_2 发生缩合反应, 形成了 C=N 双键; 1324 cm^{-1} 属于硝基的不对称伸缩振动峰, 而硝基的对称伸缩振动峰应出现 1560 cm^{-1} 附近, 但是与 1584 cm^{-1} 强的强吸收峰重叠而未显示出; 3413 cm^{-1} , 3322 cm^{-1} 中等强度的较宽谱带表明有氢键。配合物 Ru-DAFND, 1091 cm^{-1} 左右有一非常强的较宽谱带和 621 cm^{-1} 左右的一个强的尖峰分别属于 ClO_4^- 的 ν_d 和 δ_d ; 771 cm^{-1} 左右的一个中强峰是 bipy 的特征伸缩振动峰; 1600 cm^{-1} - 1620 cm^{-1} 的谱带属 $\nu_{C=C}$; 730 cm^{-1} - 745 cm^{-1} 的谱带属 $\delta_{C=C}$; 1420 cm^{-1} - 1440 cm^{-1} 的谱带属 δ_{C-CH} 。

配合物的电喷雾质谱测试结果表明, 所合成配合物没有出现分子离子峰, 相应的分子碎片离子峰能够与理论值基本吻合。

以 Tris 缓冲溶液作溶剂, 使用 UV-2450 型紫外分

光光度计记录 Ru - DAFND 的电子吸收光谱, 测试浓度分别为 $2.5 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$, 其测试结果如图 1 所示。配合物 Ru - DAFND 的最大特征峰位于在可见光区 456 nm 处, 对应于金属到配体的 $d\pi - \pi^*$ 荷移跃迁 (MLCT, metal to ligand charge transfer), 说明 DAFND 发生了配位作用^[11-12], 由于是混配配合物, 分子的对称性比 $[\text{Ru}(\text{bipy})_3]^{2+}$ 低, MLCT 峰出现分裂, 表现在吸收光谱图上 456 nm 处的吸收峰往往为一宽峰或带有肩峰的吸

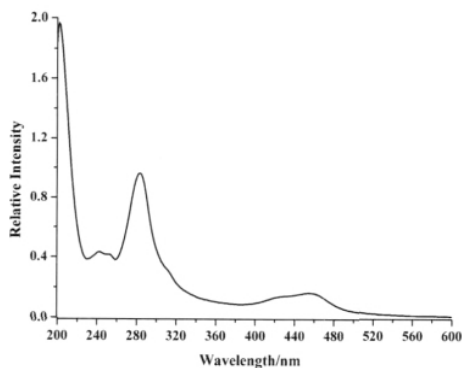


图 1 Ru - DAFND 在 Tris 缓冲溶液中的电子吸收光谱

收峰。285 nm 左右的吸收峰为 2,2'-bipy 的 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁。分别以 DMF 和 Tris 缓冲溶液作溶剂, 使用 F - 4500 型荧光光谱仪测试 DAFND 和 Ru - DAFND 的发射光

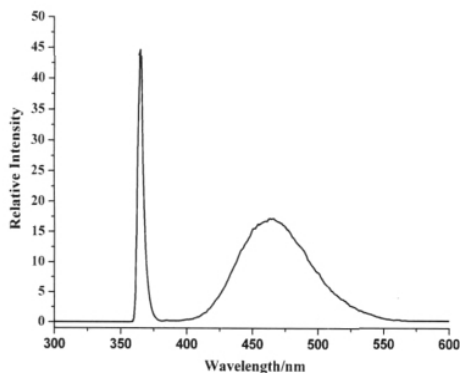


图 2 DAFND 在 DMF 中的发射光谱

谱, 浓度均为 $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$, 结果如图 2 和图 3 所示。乙醇溶液中, DAFO 在 321 nm 光源激发下的发射光谱为 406 nm^[13]; 在 DMF 中, DAFND 的发射光谱波长为 464 nm, 激发光波长为 346 nm; 在 Tris 缓冲体系 Ru - DAFND 激发光和荧光波长分别为 466 nm 和 596 nm, 发射峰是由 Ru(II) 和 DAFND 间的电荷转移引起的, 激发波长和发射波长都在可见光范围内, 具有较大的斯托克斯跃迁值, 较强的发光效果, 适合光电检测。

2.2 配合物与 DNA 作用的电子吸收光谱

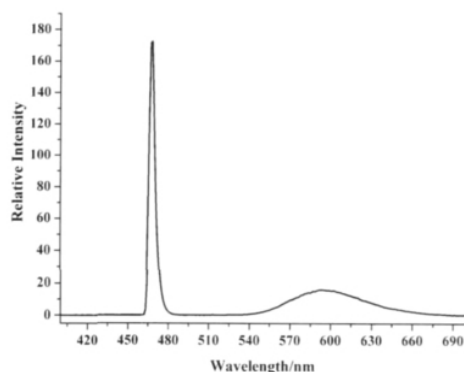


图 3 Ru - DAFND 在 Tris 溶液中的发射光谱

$[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{DAFND}](\text{ClO}_4)_2$ 在室温下与 ctDNA 相互作用的电子吸收光谱变化如图 4 所示。

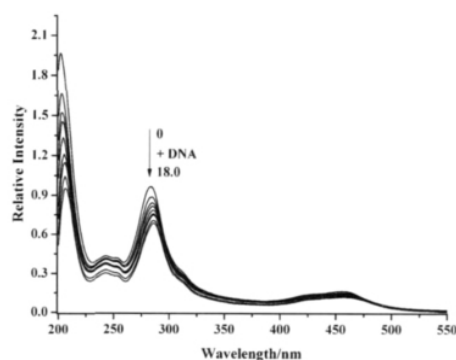


图 4 DNA 浓度增加时配合物电子吸收光谱的变化

由图 4 可知, 与 DNA 相互作用时, $[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{DAFND}]^{2+}$ 的电子吸收光谱发生了明显的变化。随着 DNA 浓度的增大, $[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{DAFND}]^{2+}$ 在 243 nm, 284 nm 和 456 nm 处特征吸收峰的红移分别为 3 nm, 3 nm 和 5 nm; 其减色率分别为 30.3%、29.0% 和 28.1%, 表明配合物可能以插入方式与 DNA 相键合^[14]。为定量地衡量配合物与 DNA 键合程度的强弱, 通过方程 (2) 计算了配合物与 DNA 的平衡键合常数 K_b 。

$$\frac{[\text{DNA}]}{\varepsilon_a - \varepsilon_f} = \frac{[\text{DNA}]}{\varepsilon_b - \varepsilon_f} + \frac{1}{K_b(\varepsilon_b - \varepsilon_f)} \quad (2)$$

采用 $[\text{DNA}]/(\varepsilon_a - \varepsilon_f)$ 对 $[\text{DNA}]$ 作图, 拟合直线的斜率为 $1/(\varepsilon_b - \varepsilon_f)$, 截距为 $1/K_b(\varepsilon_b - \varepsilon_f)$, K_b 为斜率与截距之比, 如图 5 所示。由模拟曲线计算的配合物与 DNA 键合常数 K_b 为 $8.91 \times 10^5 \text{ L/mol}$, 大于部分插入方式键合的 $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ 的键合常数^[15], 是以插入模式键合 $[\text{Ru}(\text{bipy})_2(\text{aip})]^{2+}$ 与 DNA 作用的键合常数的 3 倍, 但比 $[\text{Ru}(\text{bipy})_2(\text{cpip})]^{2+}$ 和 $[\text{Ru}(\text{bipy})_2(\text{Hcip})]^{2+}$ 的键合常数小^[16], 说明增大插入配体的共轭平面, 配合物与 DNA 的键合作用增强。

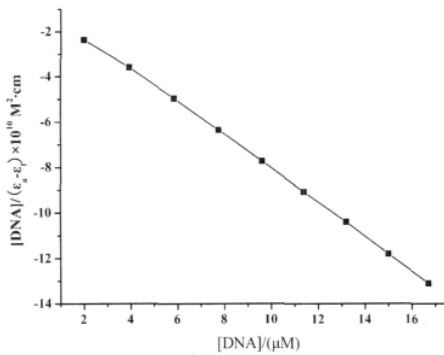


图 5 配合物吸收峰的 $[DNA]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$ 与 $[DNA]$ 的关系

2.3 配合物与 DNA 相互作用的荧光光谱

在水溶液中,钌(II)多吡啶配合物的荧光会被水分子猝灭,发光强度有所下降。配合物如果通过插入模式与 DNA 作用,由于插入配体的振动受到限制,就会减少其激发态电子通过非辐射途径散失能量,同时配合物插入到 DNA 后,溶剂分子对其碰撞减少,荧光猝灭的机会也会减少,配合物的荧光一般会得到增强;而以静电吸引与 DNA 作用的配合物如 $[Ru(bipy)_3]^{2+}$,因结合能力较弱,不能有效地防止水分子的猝灭,故加 DNA 前后,其荧光强度变化不大^[16]。

$[Ru(bipy)_2DAFND]^{2+}$ 与 ctDNA 作用前后的荧光光谱如图 6 所示。由图 6 可以看出,配合物受到 466 nm 光激发后,在 596 nm 附近产生一明显的荧光发射峰。加入 ctDNA 以后,发射光谱发生变化,发光度随着 ctDNA 浓度的增加而逐渐增大,直至一定程度至不再改变。

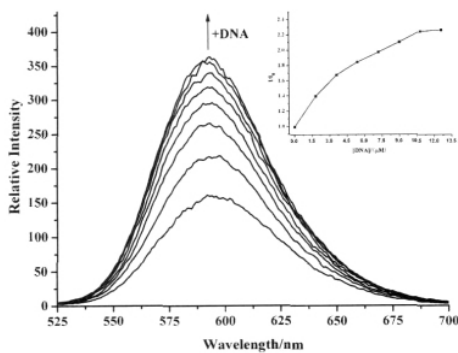


图 6 DNA 浓度增加时配合物荧光光谱的变化

配合物荧光增大的幅度大致可以反映 DNA 对配合物的“保护”程度,即配合物与 DNA 键合的程度。DNA 的加入引起配合物荧光强度增加的现象,与已知的一些插入试剂在 DNA 存在时荧光强度增加的现象是一致的^[11],由此推测,配合物可能插入到 DNA 的碱基对中。图 6 中插图配合物的相对发光强度 I/I_0 (有、无 DNA 存在时配合物在 596 nm 处发光强度的比值) 随 DNA 浓

度的增加而变化的曲线。可以看出,在 ctDNA 的存在下,配合物的荧光强度有较大的增加,即产生了明显的荧光增强现象,并且随着 $[ctDNA]/[Ru]$ 的增大, I/I_0 先呈线性增大,达到饱和时荧光强度大约增加到原始荧光强度的 2.6 倍,之后再增大 ctDNA 的浓度,其荧光强度不再改变。

2.4 配合物与 DNA 作用的粘度法研究

分别测试了含有不同浓度的配合物和 EB 影响下的 ctDNA 溶液的粘度,实验结果如图 7 所示。EB 是典型的 DNA 插入试剂,其测试结果可以作为参照。可以看出,随着配合物浓度的增大,ctDNA 溶液的相对粘度发生了明显的增大,与增加 EB 浓度影响 ctDNA 溶液的相对粘度的趋势一致,但其增加程度相对较小,仍然表明配合物是通过经典插入方式与 DNA 相键合,与光谱法测定结果一致。由图 7 中曲线还可以看出,ctDNA 溶液的相对粘度在配合物浓度较低时接近于直线增大,在浓度较高时,则增加幅度相对较小。

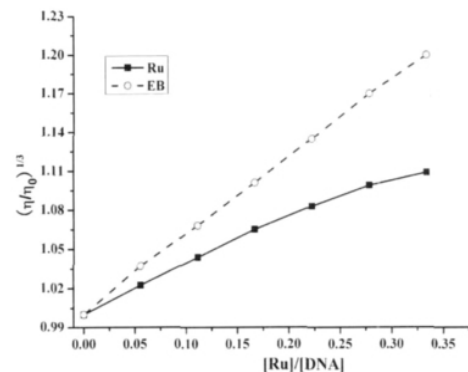


图 7 Tris 缓冲溶液中配合物/EB 浓度的增加对 ctDNA 相对粘度的影响

3 结论

本文合成并表征了一种新型钌(II)多吡啶配合物 $[Ru(bipy)_2DAFND](ClO_4)_2$ 。通过光谱法和粘度法研究了配合物与 ctDNA 的相互作用,结果表明:

(1) $[Ru(bipy)_2DAFND](ClO_4)_2$ 具有明晰的物质结构和荧光效应。

(2) 配合物以插入的方式与 ctDNA 键合,插入配体为 DAFND,键合常数 K_b 为 $8.91 \times 10^5 L/mol$ 。

(3) 在 ctDNA 的存在下,配合物的荧光强度有较大的增加。

参考文献:

- [1] Dupureur C M, Barton J K. Structural Studies of Λ - and $[Ru(phen)_2dppz]^2+$ Bound to d(GTCGAC)₂: Characterization of enantioselective intercalation [J]. Inorg.

- Chem. ,1997 ,36:33-43.
- [2] Turro N J ,Barton J K ,Tomalia D A. Molecular recognition and chemistry in restricted reaction spaces. Photophysics and photoinduced electron transfer on the surfaces of micelles ,polyelectrolytes ,dendrimers and DNA [J]. Acc. Chem. Res. ,1991 ,24: 332-336.
- [3] 邹立科,赵彬,何林芯. 光谱法研究 Ni [S₂P(OCH₂CH₂Ph)₂]₂ 与 2,2'-联吡啶加合反应[J]. 四川理工学院学报:自然科学版 2010 23(3):303-307.
- [4] Zhang Y Y ,Tang Z W ,Wang J ,et al. Hairpin DNA Switch for Ultrasensitive Spectrophotometric Detection of DNA Hybridization Based on Gold Nanoparticles and Enzyme Signal Amplification [J]. Anal Chem. , 2010 ,82: 6440-6446.
- [5] Henderson L J ,Fronczek J F R. Selective perturbation of ligand field excited states in polypyridine ruthenium (II) complexes [J]. J. Am. Chem. Soc. ,1984 ,106: 5876-5879.
- [6] Sullivan B P ,Salmon D J ,Meyer T J. Mixed phosphine 2,2'-bipyridine complexes of ruthenium [J]. Inorg. Chem. ,1978 ,17: 3334-3341.
- [7] Reichmann M E ,Rice S A ,Thomas C A ,et al. A further examination of the molecular weight and size of deoxypentose nucleic acid [J]. J. Am. Chem. Soc. , 1954 ,76: 3047-3053.
- [8] Satyanarayana S ,Dabrowiak J C. Tris(phenanthroline) Ru(II) enantiomer interactions with DNA: mode and specificity of binding [J]. Biochem ,1993 ,32: 2573-2584.
- [9] Geary W J. The use of conductivity measurements in organic solvents for the characterization of coordination compounds [J]. Coord. Chem. Rev. ,1971 ,7: 81-122.
- [10] 张秀兰,谢斌,冯建申,等. dmit 配合物的合成与应用 [J]. 四川理工学院学报:自然科学版 2008 , 21(2):71-78.
- [11] Xiong Y ,Ji L N. Synthesis ,DNA-binding and DNA-mediated luminescence quenching of Ru(II) polypyridine complexes [J]. Coord. Chem. Rev. ,1999 ,185-186: 711-733.
- [12] Niu S Y ,Wang S J ,Shi C ,et al. Studies on the fluorescence fiber-Optic DNA biosensor using p-hydroxyphenylimidazo [f] 1 ,10-phenanthroline ferrum(III) as Indicator [J]. J. Fluoresc. 2008 ,18: 227-235.
- [13] Plater M J ,Kemp S ,Lattmann E. Heterocyclic free radicals. Part 1 [J]. J. Chem. Soc. ,Perkin Trans. 1 , 2000 971-979.
- [14] Deng H ,Cai J W ,Xu H. Ruthenium(II) complexes containing asymmetric ligands: synthesis ,characterization ,crystal structure and DNA-binding [J]. Dalton Trans. 2003 325-330.
- [15] Barton J K ,Danishefsky A T. Tris(phenanthroline) ruthenium(II) : stereoselectivity in binding to DNA [J]. J. Am. Chem. Soc. ,1984 ,106: 2172-2174.
- [16] Kielkopf C L ,Erkkila K E ,Hudson B P ,et al. Structure of a photoactive rhodium complex intercalated into DNA [J]. Nat Struct Biol. 2000 7:117-121.

Synthesis and Interaction with ctDNA Properties of a Novel Polypyridyl Ru(II) Complex

LI Ming-tian^{1,2}

(1. School of Materials Science and Chemistry Engineering ,Sichuan University of Science & Engineering ,Zigong 643000 , China; 2. Key Laboratory of Material Corrosion and Protection of Sichuan College and University ,Zigong 643000 , China)

Abstract: A novel complex , [Ru(bipy)₂DAFND](ClO₄)₂(Ru-DAFND , bipy is 2,2'-bipyridine , DAFND is 4,5-diazafluorene-9-*p*-nitrophenylhydrazone) , was synthesized. And it was characterized by IR ,¹H NMR , ES-MS and elemental analysis. Interaction of Ru-DAFND with calf thymus DNA (ctDNA) was investigated by spectrophotometric and viscosity measurements. The results indicate that Ru-DAFND bound to ctDNA by intercalation with the binding constant of 8.91 × 10⁵ L/mol l in buffer of 50 mmol/L 1 NaCl and 5 mmol/L 1 Tris-HCl (Tris buffer , pH 7.1) at room temperature.

Key words: polypyridyl Ru(II) complex; ctDNA; binding model