

铜(II)-天冬氨酸-咪唑类配合物的合成及其与DNA作用的光谱研究与比较

张芳, 张前前*, 陆小兰, 江涛, 王修林

中国海洋大学化学化工学院, 山东 青岛 266003

摘要 合成了两种新的铜(II)-天冬氨酸-咪唑类混配配合物 $[\text{Cu}(\text{HAsp})\text{ImH}_2\text{O}]\text{SO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 与 $[\text{Cu}(\text{Asp})\text{Im}(\text{OH})]\cdot 4\text{H}_2\text{O}$, HAsp 代表天冬氨酸分子, Asp 代表天冬氨酸离子, Im 代表咪唑。以元素分析、红外光谱及热重-差热分析对其进行表征;以电子吸收光谱法及荧光分析法研究了这两种配合物与DNA的作用。结果表明:两种铜(II)-天冬氨酸-咪唑类混配配合物与DNA的作用方式明显不同: $[\text{Cu}(\text{HAsp})\text{ImH}_2\text{O}]\text{SO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 为伴随着静电作用的插入结合;而 $[\text{Cu}(\text{Asp})\text{Im}(\text{OH})]\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 主要与DNA的碱基N发生配位作用,造成了DNA双螺旋的破坏。分析了两种配合物因结构不同而导致的与DNA作用方式不同的原因。

关键词 铜(II)-天冬氨酸-咪唑类混配配合物; 鱼精DNA; 作用模式; 结构影响

中图分类号: O614.1 **文献标识码**: A **文章编号**: 1000-0593(2007)02-0302-04

引言

近年来,过渡金属配合物作为DNA结构和构象的探针一直是比较活跃的研究领域^[1-7]。铜是生命体必需的元素,以有机酸等作为配体的Cu(II)配合物广泛的存在于生物体内,并在化学和生物化学催化系统中起着很重要的作用^[8];铜氨基酸配合物具有催化超氧阴离子自由基(O_2^-)歧化分解的作用,有望成为防治辐射病、免疫性疾病、心血管疾病、癌症等疾患的药用酶^[9, 10]。在多种金属蛋白(金属酶)中,咪唑环中的氮原子是一个常见且很重要的键合点,如在蓝色的铜蛋白中,都有一个或多个咪唑环键合到铜或其他金属离子上,对其生物活性造成极强的影响^[11]。本文合成了配合物 $[\text{Cu}(\text{HAsp})\text{ImH}_2\text{O}]\text{SO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (I)与 $[\text{Cu}(\text{Asp})\text{Im}(\text{OH})]\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (II),以电子吸收及荧光光谱法研究了这两种配合物与鱼精DNA的作用方式,分析了两种配合物因结构不同而造成的与DNA作用方式有所差别的原因。希望为设计合成具有应用前景的低毒有效的抗菌、抗肿瘤药物提供一定的科学研究基础及理论依据。

1 实验部分

1.1 试剂

DL-天冬氨酸(生化试剂,层析纯,中国科学院上海生物

化学研究所), 鲑鱼精DNA(生化试剂,上海华舜生物工程有限公司,其纯度用UV谱检测, $A_{260}/A_{280} > 1.8$, 浓度用260 nm处的摩尔消光值检测($\epsilon = 6600 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), 三羟甲基氨基甲烷(分析纯,天津市福晨化学试剂厂), 溴化乙锭(生化试剂,美国Amresco公司); Tris-NaCl缓冲溶液(pH 7.40); 试验用水均为二次水。

1.2 配合物的合成

将 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 或 $\text{Cu}(\text{Ac})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 与DL-天冬氨酸及咪唑按照1:2:2的摩尔比溶于水中,以氢氧化钠溶液调体系的pH为6.5~7.0之间,70℃水浴加热,搅拌,回流6 h,得天蓝色或青蓝色混浊状物,过滤后以少量甲醇洗涤,干燥后产物分别呈蓝灰色或青灰色晶状粉末。

1.3 测试仪器及条件

Perkin-Elmer 240C型元素分析仪; Nicolet-ATAR360型红外光谱仪, KBr压片; TGDTA分析测试: 用ZRY-2P型差热分析仪, 空气气氛, Al_2O_3 为参比物, 升温速率为 $10^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$; 岛津UV-2550型紫外-可见分光光度计; 日立F-4500型荧光光谱仪, 激发波长为525 nm, 激发和发射狭缝宽均为5 nm, 发射光谱扫描速度 $15 \text{ nm} \cdot \text{s}^{-1}$ 。

1.4 配合物对DNA作用的电子吸收光谱

以相应浓度的配合物Tris-NaCl缓冲溶液(pH为7.40)为参比, 固定DNA的浓度为 $1.06 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 分别加入配合物I或II, 室温下反应10 min后, 在190~400 nm波

收稿日期: 2005-11-16, 修订日期: 2006-02-26

基金项目: 国家自然科学基金项目(20371043)资助

作者简介: 张芳, 女, 1982年生, 中国海洋大学化学化工学院硕士研究生

*通讯联系人

e-mail: qqzhang@mail.ouc.edu.cn

长范围内扫描。

1.5 配合物对EBDNA体系作用的荧光光谱

以 pH 为 7.40 的 Tris-NaCl 作为缓冲溶液,使 EB 的浓度为 $4.9 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,将 DNA 的浓度分别固定在 0 及 $1.1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,在 500~700 nm 范围内测其发射光谱;再分别依次增加配合物 I 或 II 的浓度,以相同的条件进行扫描。

2 结果与讨论

2.1 配合物组成的确定

2.1.1 元素分析(括号内数据为计算值,%)

配合物 I: $\text{C}_7\text{H}_{20}\text{CuN}_3\text{O}_{13}\text{S}$, C 18.80 (18.65), H 4.74 (4.74), N 9.23 (9.32); 配合物 II: $\text{C}_7\text{H}_{18}\text{CuN}_3\text{O}_9$, C 24.01 (23.90), H 4.94 (5.16), N 11.66 (11.94)。

2.1.2 配合物的红外光谱数据分析

Table 1 IR data of the ligands and complex (unit: cm^{-1})

配体及配合物	ν_{OH}	ν_{NH}	-COO ⁻			Im	
			ν_{as}	ν_{s}	$\Delta\nu$	ν_{ring}	$\nu_{\text{C=N}}$
HA _{sp}	3 138	3 022~2 500	1 618	1 506	112	-	-
Im	-	3 124~2 617	-	-	-	1 542~1 445	1 670
配合物 I	3 480~3 263	3 038	1 593	1 409	184	-	1 625
配合物 II	3 480~3 259	3 127	1 602	1 409	193	-	-

2.1.3 两种配合物的热分析

如图 1 所示,在 0~600 °C 的范围内,配合物 I, II 均有 3 次失重,在 DTA 曲线上均有 3 个明显的分解放热峰,配合物 I 所对应的峰顶温度依次为: 124.9, 223.7, 324.8 °C; 配合物 II 为 174.6, 231.2, 426.3 °C。对配合物 I 而言依次对应着 4 个结晶水分子和 1 个 SO_4^{2-} 以及 1 个配位水(理论值为 41.33 %), 1 个天冬氨酸分子(理论值为 29.60 %), 1 个咪唑

如表 1 中数据所示,在两配合物中, 3 500~3 250 cm^{-1} 范围内的峰为水的吸收峰; 3 100 cm^{-1} 附近的峰为 ν_{NH} 吸收峰。与游离天冬氨酸相比,配合物 I 的 ν_{NH} 吸收峰的波数几乎未变,而配合物 II 的 ν_{NH} 吸收峰发生紫移,表明配合物 II 中的氨基氮参与了配位^[11]; 两配合物中 -COO⁻ 基团的 ν_{as} 与 ν_{s} 的特征峰位置均发生红移, $\Delta\nu(-\text{COO}^-) < 200 \text{ cm}^{-1}$, 因此推测在形成两配合物时,天冬氨酸均以与 αC 相连的羧基氧与 Cu^{2+} 双齿配位^[12, 13]; 与游离咪唑相比,配合物 I 中的 ν_{ring} 吸收峰及配合物中的 $\nu_{\text{C=N}}$ 吸收峰均与 ν_{as} 形成了很强的包络峰,而配合物 I 中的 $\nu_{\text{C=N}}$ 发生了紫移,表明咪唑环参与了配位; 另外,两配合物在 550 cm^{-1} 附近出现的内面摇摆振动峰说明配位水的存在^[14], 而配合物 II 在 1 087 cm^{-1} 出现的 $\text{Cu}-\text{OH}$ 的弯曲振动峰,说明羟基参与了配位^[14]。因此配合物 I 的 $\text{Cu}(\text{II})$ 为常见的四配位,而配合物 II 中 $\text{Cu}(\text{II})$ 为五配位^[15]。

分子(理论值为 14.91 %)。对于配合物 II 则分别对应于 4 个结晶水分子和配位羟基(理论值为 25.31 %), 1 个天冬氨酸负离子(理论值为 37.56 %); 1 个咪唑分子(理论值为 19.06 %)。两配合物的最终残余物分别为 10.68 % 及 13.97 %, 均呈黑色。因此推测两配合物的可能分解过程如下所示。

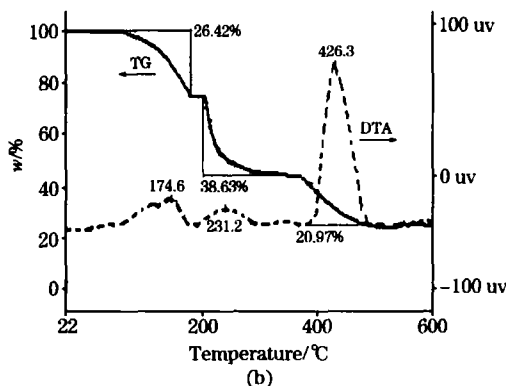
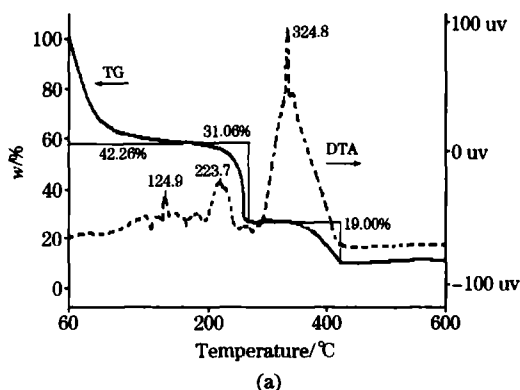
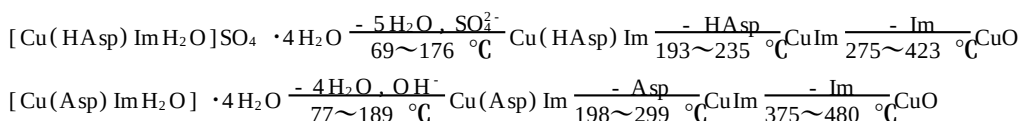


Fig 1 TG-DTA curves of complex I (a) and complex II (b)



配合物 II 与配合物 I 相比, 羟基代替了水分子与铜配位, 天冬氨酸以负离子形式代替了分子形式, 且其氨基参与了配位, 使得中心铜离子由四配位变为五配位, 与配体间的配位键增强, 从而使配合物 II 的热分解温度升高。

2.2 配合物与 DNA 作用的电子吸收光谱分析

DNA 的碱基及磷酸氧是许多药物的作用位点, 与药物作用后会导致其特征峰发生位移, 增色及减色效应是 DNA 特有的与其双螺旋结构密切相关的光谱性质, 因而在 DNA 溶液中加入很少量的化合物后观察 DNA 的电子吸收光谱是否发生上述变化, 可粗略判断化合物是否与 DNA 发生了作用^[7, 16]。由图 2 可知, 在分别加入两配合物后, DNA 在 203 nm 处的吸收峰分别红移 2 nm 和紫移 2.5 nm; 而在 258 nm 处的吸收峰位置虽未变, 但其吸收强度的有所降低, 表明这两种配合物可能以不同的方式与 DNA 发生了作用: 配合物 I 以离子形式存在, 推测为静电结合^[6, 16]; 配合物 II 为内盐, 由于存在羟基而与磷酸氧以氢键相结合, 由于氢键本质上仍属于静电吸引作用, 推测该作用同样使 DNA 轴向收缩, 碱基发光基团内陷, 从而造成了 DNA 吸光度的下降^[17]。

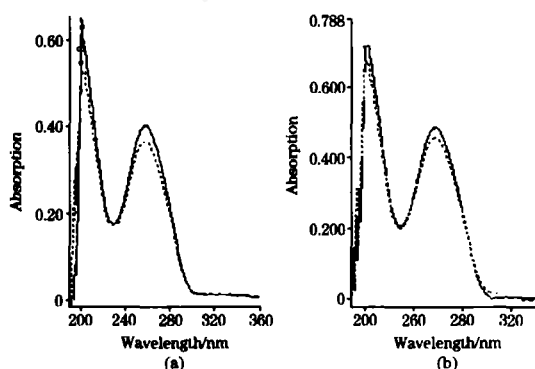


Fig 2 Effect of the two complexes on the electronic absorption spectra of DNA

(a): Complex I, $c \text{ I} / c_{\text{DNA}} = 0$ (—), $c \text{ I} / c_{\text{DNA}} = 19.7\%$ (···);
(b): Complex II, $c \text{ II} / c_{\text{DNA}} = 0$ (—), $c \text{ II} / c_{\text{DNA}} = 20.4\%$ (···)

2.3 配合物对 EB-DNA 体系荧光光谱影响的分析

EB (溴化乙锭) 可作为配合物与 DNA 作用的结构探针,

当它从 DNA 碱基对间被挤出或 DNA 的双螺旋遭到破坏时, EB-DNA 体系的荧光将发生猝灭^[7]。由图 3 可知, 当配合物 I 与 EB-DNA 体系相作用时, 除荧光强度在的浓度比为 0.2 处存在“扰动”外, 荧光强度随着配合物浓度的逐渐增加而降低。从该配合物的结构可以推测: 配阳离子与 DNA 的磷酸基团先以静电作用相结合 ($\text{Complex I} / c_{\text{DNA}} = 0.2$ 时), 造成 DNA 分子的轴向收缩, 将 EB 从 DNA 的碱基对间挤出, 引起体系荧光强度的降低; 而静电作用使 DNA 构象更加稳定, 随后 EB 重新插入到 DNA 的碱基对间, 使荧光强度重新提高, 但此时配合物阳离子仍结合在磷酸氧上^[12]; 该配合物在此之后仍能逐步降低 EB-DNA 体系的荧光强度, 表明该配合物能取代 EB 分子插入到 DNA 的碱基对之间。而配合物 II 先与 DNA 发生氢键作用 ($\text{Complex II} / c_{\text{DNA}} = 0.2$ 时), 使 DNA 的分子构象发生一定变化, 再进一步与 DNA 的碱基 N 发生配位作用, 导致 DNA 双螺旋解开, 二级结构被破坏^[18]。

可见, 两配合物与 DNA 的作用方式存在明显的不同, 配合物 I 为伴随着静电作用的插入结合, 由于一部分的配合物结合在磷酸氧上, 当其于 DNA 浓度之比为 98.7% 时, 仅能使 EB-DNA 体系的荧光强度降低 32.7%; 配合物 II 主要与 DNA 的氨基氮发生了配位作用, 造成了 DNA 双螺旋的破坏, 当它与 DNA 浓度之比为 82.0% 时, 即可使 EB-DNA 体系的荧光强度降低 37.6%。合成时, 由于所用铜盐酸根的不同造成了两种配合物组成和配位方式的不同, 而后者又成为两种配合物与 DNA 作用方式有所差别的原因。可见, 配合物的组成与结构对其与 DNA 的作用存在很强的影响。

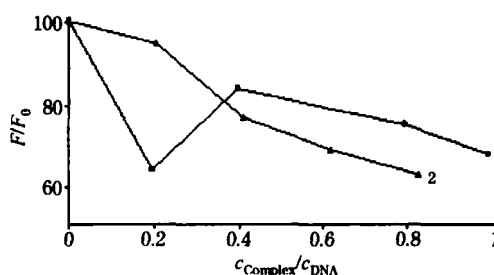


Fig 3 Relation between fluorescence intensity and the concentration ratio of complexes and DNA
1: Complex I; 2: Complex II

参 考 文 献

- [1] Laura Santagostini, Michele Gullotti, Roberto Pagliarin, et al. Tetrahedron: Asymmetry, 1999, 10(1): 281.
- [2] WANG Zhong-ming, ZHOU Zhi-fen, LIN Hua-kuan, et al (汪中明, 周志芬, 林华宽, 等). Chinese Journal of Inorganic Chemistry (无机化学学报), 2000, 16(3): 503.
- [3] Liu Jie, Zhang Ti-xiang, Lu Tongbu, et al. Journal of Inorganic Biochemistry, 2002, 91: 269.
- [4] LI Hong, LE Xue-yi, WU Jian-zhong, et al (李红, 乐学义, 吴建中, 等). Acta Chimica Sinica (化学学报), 2003, 61(2): 245.
- [5] Hirohama Tomoya, Yuko Kuranuki, Ebina Ebina, et al. Journal of Inorganic Biochemistry, 2005, 99: 1205.
- [6] ZHOU Qing-hua, YANG Pin (周庆华, 杨频). Acta Chimica Sinica (化学学报), 2005, 63: 71.
- [7] ZHANG Fang, ZHANG Qian-qian, ZHU Chen-jian, et al (张芳, 张前前, 祝陈坚, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis (光谱学与光谱分析), 2005, 25(9): 1439.
- [8] WANG Y Y, SHI Q, SHI Q Z. Polyhedron, 1999, 18(5): 2009.
- [9] Török I, Surdy P. Journal of Inorganic Biochemistry, 1998, 71: 7.
- [10] ZHAO Guang-chao, ZHU Jun-jie, CHEN Hong-yuan (赵广超, 朱俊杰, 陈洪渊). Chemical Journal of Chinese Universities (高等学校化

- 学学报), 2003, 24: 414.
- [11] LI Rui-ping, FAN Qiong-fang, GUO Jian-xiong (李瑞萍, 范琼芳, 郭建雄). Spectroscopy and Spectral Analysis (光谱学与光谱分析), 2003, 23(2): 288.
- [12] Laila H A R, Luigi P B, Daniele C. Polyhedron 1996, 15(11): 1783.
- [13] Latif A Abuhijleh, Clifton Woods. Inorganic Chemistry Communications, 2001, 4(3): 119.
- [14] Nakamoto K. Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds, 3rd ed., New York: John Wiley & Sons, 1978, 214.
- [15] Thomas N S, William E A, White S P. Journal of Inorganic Biochemistry, 1995, 59: 659.
- [16] Han Gaoyi, Yang Pin. Journal of Inorganic Biochemistry, 2002, 91: 230.
- [17] YANG Pin, GUO Mao-lin, YANG Bin-sheng (杨 频, 郭茂林, 杨斌盛). Chinese Science Bulletin (科学通报), 1994, 39: 997.
- [18] GUO Mao-lin, YANG Pin, YANG Bin-sheng, et al (郭茂林, 杨 频, 杨斌盛, 等). Chinese Science Bulletin (科学通报), 1995, 40: 1187.

Synthesis and DNA Binding Spectroscopic Studies of Cu(II)-HAsp-Im Complexes

ZHANG Fang, ZHANG Qian-qian*, LU Xiao-lan, JIANG Tao, WANG Xiu-lin

College of Chemistry and Chemical Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, China

Abstract Two novel complexes of $[\text{Cu}(\text{HAsp})\text{ImH}_2\text{O}]\text{SO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ and $[\text{Cu}(\text{Asp})\text{Im}(\text{OH})] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (HAsp = Aspartic acid molecule, Asp = Aspartic acid ion, Im = Imidazole) were synthesized and characterized by elemental analysis, IR spectroscopy and TG-DTA. The interactions of the complexes with sperm DNA were studied by electronic absorption and fluorescence spectra. Results showed that the reactions of the two complexes with DNA are obviously different: for $[\text{Cu}(\text{HAsp})\text{ImH}_2\text{O}]\text{SO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, it is intercalation companied by electrostatic effect, while $[\text{Cu}(\text{Asp})\text{Im}(\text{OH})] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ mainly cooperates with the nitrogen atom of the DNA base pair, which induces the breakage of DNA double helix. The reasons for these differences in their DNA binding modes were also discussed.

Keywords Cu(II)-HAsp-Im complexes; Sperm DNA; Binding mode; Structure effect

(Received Nov. 16, 2005; accepted Feb. 26, 2006)

* Corresponding author