

山柰苷-钴配合物的合成、表征及其与 DNA 的相互作用

欧阳熙林¹, 朱志仁², 潘英明^{2*}

(1. 右江民族医学院, 广西 百色 533000; 2. 广西师范大学化学化工学院, 广西 桂林 541004)

[摘要] 目的: 合成山奈酚-3,7-*O*- α -L-二鼠李糖苷(KR)与钴的配合物 $[Co(KR)(H_2O)_3(NH_3)]^+ \cdot NO_3^-$, 对其结构进行表征, 并研究其与 DNA 的相互作用。方法: 合成 KR 与钴的配合物, 采用元素分析、红外光谱、热重分析和质谱表征其结构, 紫外吸收光谱、荧光发射光谱和圆二色谱分析 KR 及其金属配合物与 DNA 的相互作用。结果: KR 及其配合物与 DNA 均以插入方式嵌入到 DNA 双链的碱基对之间; 配合物表现出比 KR 更强的插入键合作用。结论: KR 的钴配合物比 KR 有更强的与 DNA 结合的能力, 揭示配合物具有更好的活性。

[关键词] 钴配合物; 山柰苷; 合成; 表征

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)04-0049-05

[doi] 10.11653/syfy2014040049

Synthesis, Characterization and DNA-binding Properties of Co(II) Complex of Kaempferitrin

OUYANG Xi-lin¹, ZHU Zhi-ren², PAN Ying-ming^{2*}

(1. Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, China;
2. School of Chemistry & Chemical Engineering of Guangxi Normal University, Guilin 541004, China)

[Abstract] **Objective:** To synthesize and characterize a Co(II) complex of kaempferitrin and to perform its interaction with DNA. **Method:** A Co(II) complex of kaempferitrin was synthesized and characterized by elemental analysis, IR, TG-DTG and ESI-MS. The interactions of the Co(II) complex and kaempferitrin with DNA were investigated by UV-Vis, fluorescence spectra and CD spectra. **Result:** Experimental results indicated that Co(II) complex and kaempferitrin can both bind to DNA by intercalation modes, but the binding affinity of Co(II) complex is much higher than that of kaempferitrin. **Conclusion:** KR-Co(II) complex with DNA interactions was stronger than KR, suggesting KR-Co(II) complex with greater activity than KR.

[Key words] Co(II) complex; kaempferitrin; synthesis; characterization

[收稿日期] 20130411(019)

[基金项目] 国家“973”计划前期研究专项(2011CB512005); 广西自然科学基金项目(2012GXNSFAA053027); 广西药用资源化学与药物分子工程教育部重点实验室主任基金项目(CMEMR2001-15); 广西植物功能物质研究与利用重点实验室开放基金项目(FPRU2011-1)

[第一作者] 欧阳熙林, 硕士, 高级实验师, 从事中草药成分分离和质量评价研究, Tel: 0776-2849495, E-mail: oyx-l-xg@163.com

[通讯作者] * 潘英明, 博士, 教授, 从事生物活性物质的提取与改性研究, Tel: 0773-5846279, E-mail: panym2005@sina.com

中药有效成分的配位学说表明, 中药的有机成分如黄酮类化合物, 常与生命必需元素形成配合物。这类配合物是中药中真正整体意义上的有效成分, 代表中药的活性作用核心^[1]。黄酮配合物不仅具有比原黄酮表现更强的抗氧化^[2-3]、抗癌^[4]等活性, 而且还可增强水溶性^[5]、降低毒副作用^[6]。寻找新型、高效、低毒的黄酮金属配合物已成为现代药物研究的热门领域^[7-9]。

山奈酚-3,7-*O*- α -L-二鼠李糖苷(kaempferol-3,7-*O*- α -L-dirhamnopyranoside, 亦称山柰苷 kaempferitrin, KR), 是一种常见的黄酮苷, 具有抑制巨噬细胞、提高葡萄糖摄取、降低血糖水平^[10]、抑制

脂质过氧化和清除自由基等作用,广泛应用于医学、化学、食品科学等领域。钴是人体中一种重要的微量元素,它能刺激促红细胞生成素的生成,促进胃肠道内铁的吸收,通过维生素 B₁₂ 参与核糖核酸及造血有关物质的代谢。此外,钴还参与核酸、胆碱、蛋氨酸的合成及脂肪与糖代谢,用于防治甲状腺肿瘤^[11]。目前,山奈苷的钴配合物尚未见报道。

基于山奈苷和钴对人体重要的生理作用和结构上存在的配合作用,本研究以 KR 为配体,Co(II) 为配位金属,合成 KR 和 Co(II) 的配合物,采用红外光谱、元素分析、质谱、热重分析手段表征该配合物的结构。同时,以 DNA 为作用靶,采用紫外、荧光、圆二色谱等手段,比较 KR 及其配合物与 DNA 之间的相互作用,探讨其作用机制,从而快速有效地评价和筛选化合物活性,促进该类配合物在药物领域的应用。

1 材料与方法

1.1 仪器及试剂 PE2400II 型元素分析仪、Optima 2000 DV 型等离子体发射光谱仪和 Pris Diamond 差热/热重综合分析仪(美国 PE 公司),美国 Nicolet 360 型 E. F. P 傅立叶红外分光光度计(KBr 压片),CARY-100 型紫外-可见分光光度计(美国 Varian 公司),FL3-P-TCSPC 型时间分辨荧光光谱仪(法国 Horiba Jobin),J-180 型圆二色光谱仪(日本 Jasco 分光株式会社)。

KR 为自制备,从罗汉果叶中分离、纯化并经核磁鉴定结构^[12]; Co(NO₃)₂·6H₂O, CH₃CH₂OH, NH₃·H₂O 等均为国产分析纯试剂;小牛胸腺 DNA(ct-DNA,北京华美生物工程有限公司);三羟甲基氨基甲烷(Tris,美国 Sigma 公司);所有溶液均用二次去离子水配制。

1.2 DNA 溶液的配制 将适量的 DNA 溶于 Tris-HCl-NaCl 缓冲液(取 Tris 5 mmol 和 NaCl 50 mmol 等量,用盐酸调节 pH 7.38)中,经紫外吸收光谱测定,吸光度符合:A₂₆₀/A₂₈₀≈1.8。用 DNA 浓度由其在 260 nm 处 ε=6 600 L·cm⁻¹·mol⁻¹来确定^[13]。KR 及其 Co(II) 配合物溶液分别配制成 2×10⁻³ mol·L⁻¹。

1.3 KR-Co(II) 的合成 称取 0.115 6 g (0.2 mmol) KR,加入 10 mL CH₃CH₂OH,搅拌,待配体溶

解后,滴加氨水-乙醇溶液(m_{NH₃·H₂O}-m_{CH₃CH₂OH} = 1:1)调节溶液 pH 8~9。然后,边搅拌边滴加 5 mL 2.4×10⁻² mol·L⁻¹ Co(NO₃)₂ 溶液,此时立即产生黄绿色沉淀。室温搅拌 8 h,离心分离,沉淀经无水乙醇和蒸馏水反复洗涤,真空干燥,得红褐色配合物。

1.4 KR-Co(II) 与 DNA 的作用

1.4.1 紫外吸收光谱测定 在紫外-可见光谱仪的参比池中加入 3.00 mL Tris 缓冲溶液,样品池放置同体积 2.0×10⁻⁵ mol·L⁻¹ KR(或其配合物)溶液,然后分别加入同体积的 DNA 溶液,使 DNA 与样品浓度比值按一定比例等梯度变化。每次混匀 10 min 后,在 200~600 nm 扫描,直至吸收峰不再减色。

1.4.2 荧光光谱测定 在荧光光谱仪样品池中加入 3.00 mL 2.0×10⁻⁵ mol·L⁻¹ KR(或其配合物)溶液,然后加入一定体积的 DNA 溶液,使 DNA 与样品浓度比值按一定的比例递增,混和均匀 10 min 后,用最佳波长的光源激发,狭缝 E_x = E_m = 10 nm,在 220~800 nm 扫描待测物的发射光谱。

1.4.3 圆二色谱测定 在 10 mL 的比色管中依次加入 2.00 mL 2.0×10⁻⁴ mol·L⁻¹ 的 DNA 溶液,2.00 mL 4.0×10⁻⁵ mol·L⁻¹ 的 KR(或其配合物)溶液,混合作用 1 h 后,以同等浓度的样品溶液做参比,扫描其 CD 谱,记录反应前后 DNA 的 CD 吸收光谱的变化。

2 结果与讨论

2.1 KR 及其 Co(II) 配合物的结构表征

2.1.1 理化性质及元素分析 KR 易溶于甲醇、乙醇、不溶于水;而其钴配合物溶于 DMSO,难溶于甲醇、乙醇、水,在空气中性质稳定。元素分析结果(表 1)符合分子式 C₂₇H₃₈O₂₀N₂Co, 相对分子量为 769.55。

2.1.2 红外光谱分析 从表 2 可知,KR 的 C=O 振动位于 1 659 cm⁻¹,形成 Co(II) 配合物后移至 1 627 cm⁻¹,向低波数位移了 32 cm⁻¹。由此可见,C=O 上的氧与金属离子之间形成配位键后引起 C=O 成键电子密度更加偏离键的几何中心而移向氧原子,使 C=O 电子云密度降低,降低了羰基的双键性,故 C=O 的伸缩振动吸收谱带向低频位移。苯环 π 键共轭体系 ν(C=C) 由配体的 1 603 cm⁻¹

表 1 KR-Co(II) 配合物的元素分析数据

配合物	C		H		N		Co	
	实测值	理论值	实测值	理论值	实测值	理论值	实测值	理论值
KR-Co	42.23	42.14	4.91	4.94	3.59	3.64	7.02	7.66

表 2 KR 及其 Co(II) 配合物的主要红外吸收频率及归属

化合物	$\nu(\text{C}=\text{O})$	$\nu(\text{C}=\text{C})$	$\nu(\text{C}-\text{OH})$	$\nu(\text{C}-\text{O}-\text{C})$	$\nu(\text{O}-\text{H})$
KR	1 659	1 603	1 355	1 180	3 435
L-Co	1 627	1 575	1 347	1 177	3 435

下降了 28 cm^{-1} ,到配合物中的 $1\,575\text{ cm}^{-1}$,这是由于配合物中形成一个新的环而使共轭效应增强所致。配体中酚羟基的 $\nu(\text{O}-\text{H})$ 和 $\nu(\text{C}-\text{OH})$ 在形成配合物后的位置变化不大。分子中的 $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ 键的振动频率基本未变,表明该环醚键在此络合条件下未发生开环。因此,从配合物的红外谱图推断 $\text{Co}(\text{II})$ 与配体的结合位点是 KR 中的 $\text{C}=\text{O}$ 与 $7-\text{OH}$ 。

2.1.3 TG-DTG 分析 在氮气气氛中,调节升温速率为 $10\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$,得配合物在 $25\sim 900\text{ }^\circ\text{C}$ 的 TG-DTG 曲线(图 1)。配合物主要有 3 个失重阶段:第一个阶段($57.6\sim 113.5\text{ }^\circ\text{C}$)由于分解快,平台不明显;第二个阶段($114\sim 284\text{ }^\circ\text{C}$)失重率为 28.57% ,与失去 3 个配位水、氨、硝酸根离子及鼠李糖基失水量相当(理论失重率为 29.13%);第三个阶段($288\sim 535\text{ }^\circ\text{C}$)是配体继续分解,失重率为 25.4% ,由于配体的糖碳化,故反应进行到 $900\text{ }^\circ\text{C}$ 也未达到恒重。

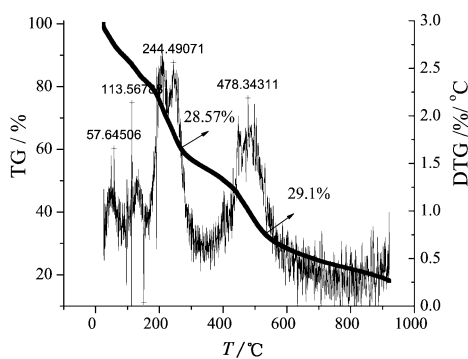


图 1 KR-Co(II) 的 TG-DTG 分析

2.1.4 ESI-MS 分析 ESI-MS 图谱正离子模式下显示: $m/z\ 601.19$ 离子峰为 $[\text{KR} + \text{Na}]^+$; $m/z\ 791.98$ 为分子离子峰 $[\text{KR} + \text{Co} + \text{NO}_3 + 3\text{H}_2\text{O} + \text{NH}_3 + \text{Na}]^+$ 。结合元素分析、红外、热重分析和质谱,推测该配合物为 $[\text{Co}(\text{KR})(\text{H}_2\text{O})_3(\text{NH}_3)]^+ \cdot \text{NO}_3^-$,结构如图 2。

2.2 KR-Co(II) 与 DNA 相互作用的紫外吸收光谱 KR 属于黄酮醇类化合物(flavonol),在 263 nm (峰带 II,苯甲酰基 benzoyl 所致)和 342 nm (峰带 I,桂皮酰基 cinnamoyl 所致)处有最大吸光。图 3A 为 KR 与 DNA 相互作用后的紫外光谱图。由图可

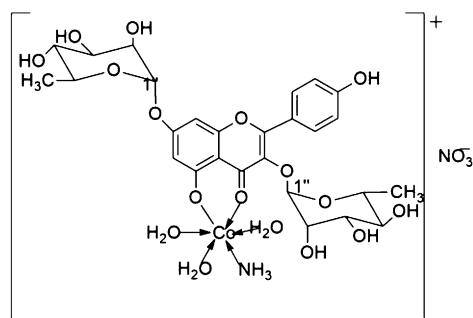
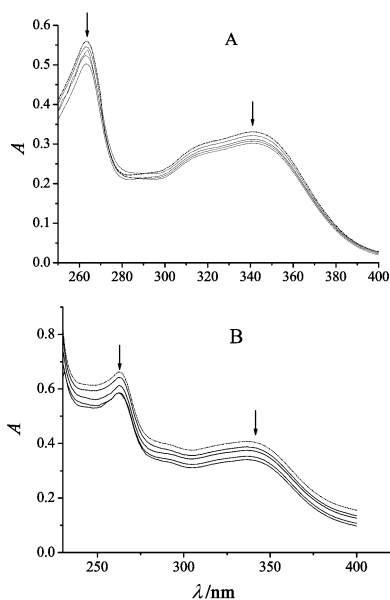


图 2 KR-Co(II) 配合物化学结构



A. KR; B. KR-Co(II) (图 4~5 同)

图 3 KR-Co(II)/KR 与 DNA 相互作用的紫外吸收光谱

(虚线表示未加入 DNA 时,配体或者配合物在缓冲溶液体系中的紫外吸收光谱)

见,随着 DNA 浓度的逐渐增加,KR 的最强吸光均出现了一定程度的减色效应,没有明显的红移现象。在 $C_{\text{DNA}}/C_{\text{KR}}$ 从 $0\sim 4$ 的滴定过程中,KR 在 263 nm 处的最强吸收峰的吸光度从 0.545 降至 0.503 ,减色 7.7% ;带 I 在 342 nm 处吸收峰的吸光度从 0.331 降至 0.302 ,减色 8.8% 。通常小分子化合物与 DNA 以插入作用方式结合时,小分子化合物的紫外吸收峰会发生减色效应,并伴有一定程度的红移现象。图中显示 KR 的减色效应并不明显,故 KR 很可能以微弱的插入方式嵌入到 DNA 双链的碱基对之间。

如图 3B 所示,配合物与 DNA 相互作用时,随着

DNA 浓度的逐渐增加,配合物的最大紫外吸收均出现了一定程度的减色效应,没有明显的红移现象。在 $C_{DNA}/C_{KR-Co(II)}$ 从 0 ~ 4 的滴定过程中,配合物在 263 nm 处的最强吸收峰的吸光度从 0.662 降 0.584,减色 11.8%;带 I 在 342 nm 处的宽吸收峰的吸光度从 0.403 降至 0.336,减色 11.6%,相比 KR 与 DNA 的作用,减色效应明显增强。由此可见,配合物可能以插入方式嵌入到 DNA 双链的碱基对之间,但作用力较 KR 强。

2.3 KR-Co(II)与 DNA 相互作用的荧光光谱 图 4 为 KR 或配合物与 DNA 相互作用后荧光发射光谱图,虚线表示未加 DNA 时在 Tris 缓冲溶液中的荧光发射曲线。

如图 4A 所示,当激发波长为 330 nm (Slit width = 10 nm/10 nm) 时, KR 在 346 nm ($I_{max} = 261.805$) 附近出现荧光发射峰,在 450 nm 附近存在一弱发射峰;随着 DNA 溶液不断加入,上述荧光发射峰的荧光强度逐渐增强。从定量滴定分析结果看,当 $C_{DNA}/C_{KR} = 6$ 时,在 346 nm 处的最大发射峰的荧光强度增加为原来的 1.34 倍,增强幅度均匀,荧光并未出现增长饱和的趋势,因此可以推断 KR 分子应该是凭借其刚性平面以插入方式进入到 DNA 双链的碱基对之间的疏水环境中,避免了 DMSO 和 H_2O 等溶剂分子的动态猝灭作用,从而引起自身荧光发射强度的显著增强。

由图 4B 可见,当激发波长为 390 nm (Slit width = 10 nm/10 nm) 时,该配合物在 455 nm 附近出现荧光发射峰;随着 DNA 溶液不断滴入,上述荧光发射峰的荧光强度逐渐增强。从定量滴定分析结果看,当 $C_{DNA}/C_{KR-Co(II)} = 3$ 时,在 455 nm 处的最大发射峰的荧光强度 ($I_{max} = 170.167$) 增加为未加 DNA 荧光强度 ($I_0 = 135.456$) 的 1.26 倍;当 $C_{DNA}/C_{KR-Co(II)} > 3$ 时,荧光强度不再显著增长。

2.4 KR-Co(II)与 DNA 相互作用的圆二色谱 圆二色吸收光谱 (CD) 是一种研究化合物分子手性特征的有力工具,对 DNA 分子的构型转变十分敏感。一般来说,在化合物分子与 DNA 分子的非共价结合方式中,沟面键合和静电结合并不能显著影响 DNA 的二级结构,因此不引起 CD 光谱的变化,而插入方式由于很大程度上改变了 DNA 的二级结构,从而可以在 CD 光谱上反映出来,主要表现为吸收强度的增大/减小和吸收波长的红移/蓝移。

图 5 中虚线为 DNA 的 CD 吸收曲线,表现为在 275, 245 nm 处附近分别存在正吸收和负吸收,其中

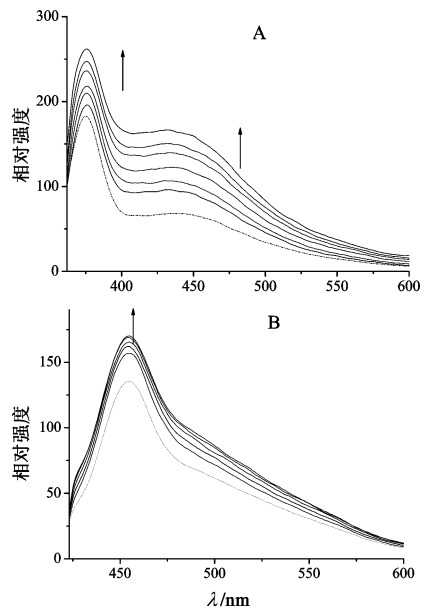


图 4 KR-Co(II)/KR 与 DNA 相互作用的荧光发射光谱

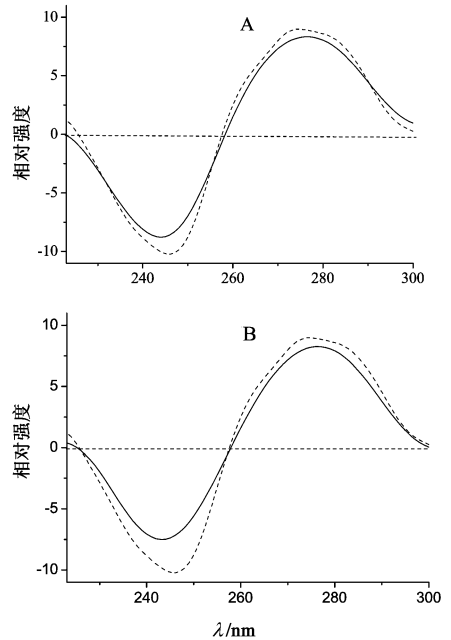


图 5 KR-Co(II)/KR 与 DNA 相互作用的 CD 光谱

正吸收归属于 DNA 碱基对之间的堆积作用,而负吸收则为 DNA 分子的右手螺旋特征。实线为 KR 及其配合物与 DNA 作用后 DNA 分子的 CD 吸收曲线。加入 KR 和配合物后,可以看到其正、负吸收强度均有所减弱。由此可以推测, KR 及其配合物对 DNA 的作用引起了 DNA 分子构象的改变。由于 275 ~ 280 nm 处的正吸收归属于 DNA 碱基对之间的 $\pi-\pi^*$ 跃迁,因此正吸收强度的减弱对应其 $\pi-\pi^*$ 跃迁的能量的降低,从而表明化合物分子均在不同程度上表现出了对 DNA 的插入键合作用。同时,

插入方式增大 DNA 邻近碱基对之间的间距,引起 DNA 超螺旋的松弛化,246 nm 处的负吸收强度减弱表明了这一趋势。

3 结论

目前,药物筛选主要有体内和体外两种方法。体内法虽然准确可靠,但耗费大、周期长。体外法在操作上相对简单,实验的干扰因素少且易控制,结果与体内方法吻合度较高,因而得到广泛使用。常见体外法以 DNA 为作用靶标,药物小分子与之结合后干扰 DNA 的合成与复制,从而抑制病变细胞的恶性生长。

本研究通过山奈昔钴配合物的合成,得到一种 KR-Co(II) 1:1 的配合物,并表征结构。采用紫外、荧光、圆二色谱综合比较该配合物和 KR 与 DNA 的作用,评价其相互作用机制,以期获得高活性、低毒副作用的新型有机钴化合物。结果表明配合物与 DNA 作用表现出比 KR 稍强的插入键合作用,作用方式可能是以常见的插入方式嵌入到 DNA 双链的碱基对之间^[14]。通过研究山奈昔-钴的配合物,可筛选其药物活性和探索作用机制,促进天然药物的深度研制与开发,也为阐明中药药理提供一定的理论依据。

[参考文献]

[1] 何军,梁国刚. 配位化学在中药研究中的应用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2008, 14(12):77.

[2] Birjees Bukhari S, Memon S, Mahroof Tahir M, et al. Synthesis, characterization and investigation of antioxidant activity of cobalt-quercetin complex [J]. J Mol Struct, 2008, 892(1/3):39.

[3] Souza R F V, De Giovanni W F. Synthesis, spectral and electrochemical properties of Al(III) and Zn(II) complexes with flavonoids [J]. Spectrochim Acta, Part A, 2005, 61(9):1985.

[4] Zhou J, Wang L, Wang J, et al. Synthesis, characterization, antioxidative and antitumor activities of solid quercetin rare earth(III) complexes [J]. J Inorg Biochem, 2001, 83(1):41.

[5] 张辉,喻莉萍,彭国荏,等. 芦丁铋二元配合物微囊

制备工艺优选及其质量评价 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(13):31.

[6] Kosmider B, Zawlik I, Liberski P P, et al. Evaluation of P53 and BAX gene expression and induction of apoptosis and necrosis by the cis-Pt(II) complex of 3-aminoflavone in comparison with cis-diamminedichloroplatinum(II) (cis-DDP) in human lymphocytes [J]. Mutat Res-Gen Tox En, 2006, 604(1/2):28.

[7] Zeng Y B, Yang N, Liu W S, et al. Synthesis, characterization and DNA-binding properties of La(III) complex of chrysin [J]. J Inorg Biochem, 2003, 97(3):258.

[8] Zurowska B, Erxleben A, Glinka L, et al. Synthesis, spectroscopy and magnetism of novel metal complexes of 3-aminoflavone (3-af). X-ray crystal structure of 3-af and [Cu(3-af)₂(NO₃)₂] [J]. Inorg Chim Acta, 2009, 362(3):739.

[9] 康敬万,苏碧泉,卢小泉,等. 芦丁配合物的合成、表征及其与 DNA 作用的电化学研究 [J]. 西北师范大学学报:自然科学版, 2006, 42(1):54.

[10] Cazarolli L H, Zanatta L, Jorge A P, et al. Follow-up studies on glycosylated flavonoids and their complexes with vanadium:their anti-hyperglycemic potential role in diabetes [J]. Chem Biol Interact, 2006, 163(3):177.

[11] 李青仁,苏斌,李胜钊. 微量元素钴,镍与人体健康 [J]. 广东微量元素科学, 2008, 15(1):66.

[12] Liang Y, Wei L, Zhu Z, et al. Isolation and purification of kaempferol-3, 7-O-α-L-dirhamnopyranoside from *Siraitia grosvenori* leaves by High-Speed Counter-Current Chromatograph and its free radical scavenging activity [J]. Sep Sci Technol, 2011, 46(9):1528.

[13] Reichmann M E, Rice S A, Thomas C A, et al. A further examination of the molecular weight and size of desoxypentose nucleic acid [J]. J Am Chem Soc, 1954, 76(11):3047.

[14] 宋玉民,康敬万,高锦章,等. 钴(III)配合物与 DNA 作用的研究 [J]. 无机化学学报, 2000, 16(1):53.

[责任编辑 邹晓翠]