

TỔNG HỢP PHỨC CHẤT RUTHENI(II) POLYPYRIDYL ỨNG DỤNG LÀM ĐẦU DÒ HUỖNH QUANG PHÁT HIỆN MỘT SỐ PHÂN TỬ SINH HỌC

Đến tòa soạn 28 - 2 - 2016

Hoàng Thị Thuận

Khoa Dược, Trường Cao đẳng Y tế Hà Đông

Trần Quang Tùng, Nguyễn Xuân Trường

Viện Kỹ thuật Hóa học, Trường Đại học Bách khoa Hà Nội

SUMMARY

SYNTHESIS OF THE RUTHENIUM(II) POLYPYRIDYL COMPLEX USED AS THE FLUORESCENT PROBE FOR DETECTION OF BIOMOLECULES

*Ruthenium(II) polypyridyl complex, $[Ru(dpq)_2(bxbg)]Cl_2$ where dpq is dipyrido[3,2- $d:2',3'$ - f]quinoxaline and $bxbg$ is bis(*o*-xylene)bipyridine glycoluril, is synthesized. Intermediates and the final product are confirmed by their melting-point measurements and 1H -NMR characterizations. Molecular spectral of the complex are recorded with UV-Vis and time-resolved fluorescent spectroscopy. It shows that $[Ru(dpq)_2(bxbg)]Cl_2$ complex has a basic electronic transition (MLCT) at $\lambda_{max} = 457$ nm, fluorescent lifetime $\tau = 590$ ns and Stokes's shift $\Delta\lambda = 163$ nm. All analyzed photophysical properties reveal the synthesized complex is an appropriate design used as the fluorescent probe for detection of biomolecules.*

1. MỞ ĐẦU

Trong khoảng 20 năm trở lại đây, phức chất rutheni(II) polypyridyl nhận được rất nhiều sự quan tâm của các nhà khoa học bởi vì chúng được ứng dụng rộng rãi trong các lĩnh vực quang hóa học[1,2], xúc tác quang hóa[3], pin mặt trời hữu cơ[4] và

dùng làm đầu dò huỳnh quang phát hiện một số phân tử sinh học[5-8]. Đặc biệt, phức chất rutheni(II) polypyridyl cho cường độ tín hiệu huỳnh quang lớn, thời gian phát xạ huỳnh quang “dài” và độ dịch chuyển Stokes lớn nên chúng được xem là lựa chọn tối ưu để thiết kế làm đầu dò

quang học phát hiện phân tử sinh học: amino axit, peptit, protein và ADN[9,10]. Phức tris(bipyridyl)rutheni(II) chloride – $\text{Ru}(\text{bpy})_3\text{Cl}_2$ từ lâu được xem là “chất chuẩn” để so sánh với các loại phức rutheni(II) polypyridyl. Ion kim loại chuyển tiếp trung tâm Ru^{2+} có cấu hình electron d⁶ ở trạng thái spin thấp tạo thành phức bát diện với ba phối tử 2,2'-bipyridyl (bpy). Phối tử bpy vừa có khả năng cho electron (σ -donor) do có cặp electron tự do ở nguyên tử N, vừa có khả năng nhận electron (π -acceptor) do orbital π không định vị ở vòng thơm. Orbital phản liên kết π^* của bpy có mức năng lượng thấp hơn orbital phản liên kết σ^* của Ru^{2+} , nên ở trạng thái cơ bản phức $\text{Ru}(\text{bpy})_3\text{Cl}_2$ rất dễ hấp thụ năng lượng để chuyển lên trạng thái kích thích do bước chuyển dời điện tử kim loại-phối tử. Do đó phức chất của rutheni(II) có khả năng phát xạ huỳnh quang với hiệu suất lượng tử huỳnh quang lớn. Mặt khác, phụ thuộc vào bản chất và cấu hình điện tử của phối tử, tính chất quang hóa & quang lý của phức chất rutheni(II) polypyridyl sẽ khác nhau. Người ta chia phức chất rutheni(II) polypyridyl thành hai loại phụ thuộc vào khả năng cho/nhận electron của phối tử sử dụng so với bpy. Loại A là phức chứa phối tử với σ -donor yếu nhưng π -acceptor mạnh hơn bpy, chẳng hạn như 2,2'-bipyrazine; 2,2'-bipyrimidine; và 2,2'-biquinoline. Ngược lại, loại B là phức chứa phối tử với σ -donor mạnh nhưng π -acceptor yếu hơn bpy, chẳng hạn như 2-(pyridin-2-yl)-imidazole; 3-(pyridin-2-yl)-pyrazole; và 3-(pyridin-2-yl)-1,2,4-triazole. Phức rutheni(II) polypyridyl với phối tử

loại A có khả năng tương tác chọn lọc với một số phân tử sinh học như amino axit, peptit, protein và ADN thông qua phản ứng cho nhận electron. Hơn nữa, bằng cách mang những nhóm chức hoạt tính phụ trợ lên phối tử, phức rutheni(II) polypyridyl được thiết kế như những chiếc “kẹp” gắn kết ở cấp độ phân tử cho một số phân tử sinh học[11].

Như vậy với mục đích thiết kế phức rutheni(II) polypyridyl ứng dụng làm đầu dò huỳnh quang cho một số phân tử sinh học và tham khảo tài liệu hiện có, trong bài báo này chúng tôi nghiên cứu đưa ra quy trình tổng hợp phức rutheni(II) polypyridyl với phối tử loại A gồm dipyrido[3,2-d:2,3-f]quinoxaline (dpq) và bis(o-xylene)bipyridine-glycoluril (bxbg) (phức bis(heteroleptic)). Đặc điểm của các sản phẩm trung gian và sản phẩm cuối cùng được nghiên cứu, chứng minh bằng phương pháp đo điểm chảy và các phương pháp phân tích phổ hiện đại như phổ cộng hưởng từ proton (¹H-NMR), phổ hấp thụ phân tử UV-Vis, phổ huỳnh quang phân tử.

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Hóa chất

Các hóa chất sử dụng trong nghiên cứu là tinh khiết của hãng Sigma-Aldrich gồm: 1-10-Phenanthroline, KBr, HNO₃ 65%, H₂SO₄ 98%, NaOH, CHCl₃, MgSO₄, ethanol, ethylene diamine, methanol, urea, toluen, trifluoroacetic acid, diethyl ether, RuCl₃.xH₂O, LiCl, DMF, acetone, DMSO, KOH, 1,2-bis(bromomethyl)benzene, NaCl bão hòa, ethylene glycol.

2.2. Dụng cụ và thiết bị

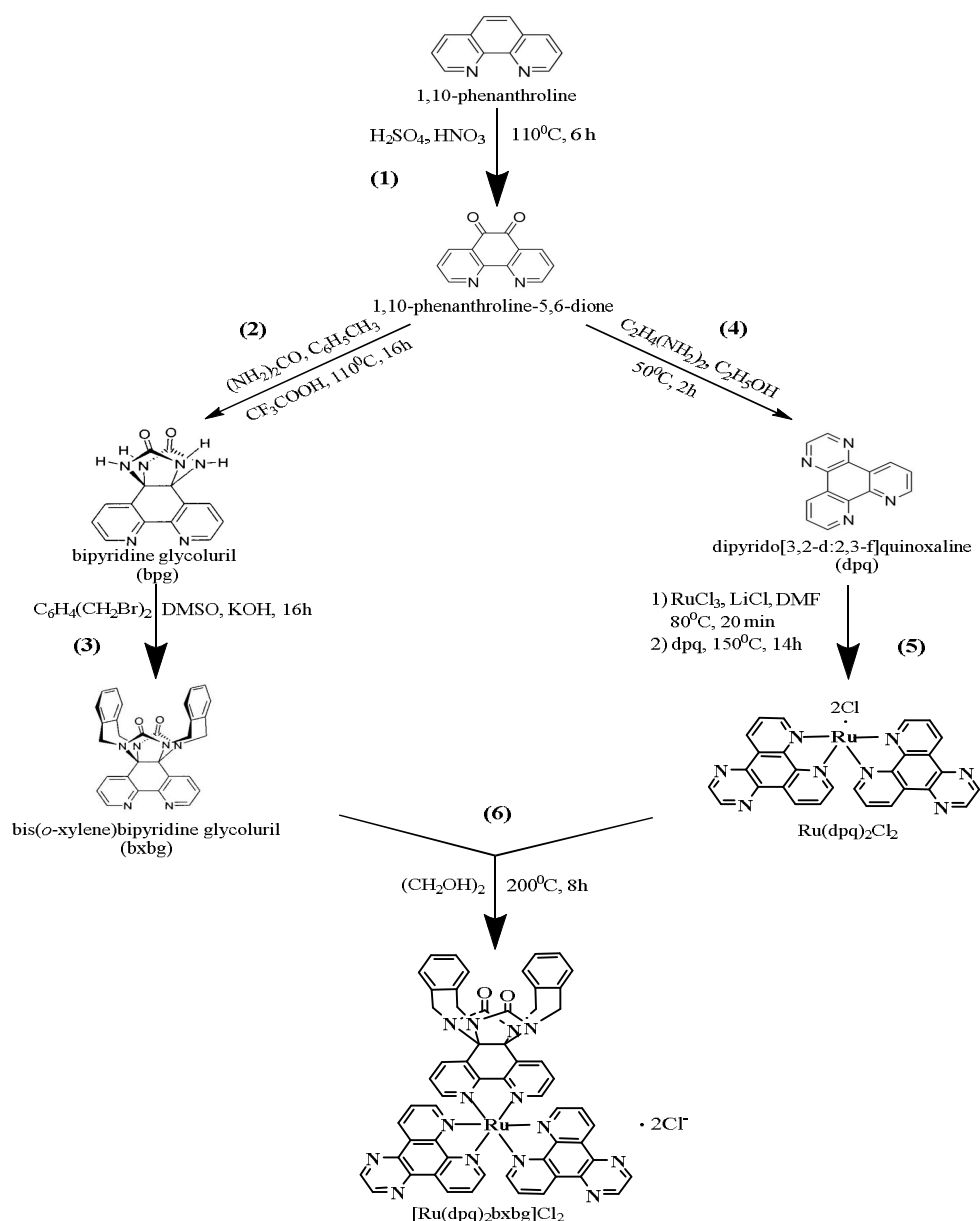
Các loại cốc thủy tinh, bình nón, sinh hàn, bình cầu (1, 2 và 3 cổ), nhiệt kế,

bếp điện, bình khí Ar, máy hút chân không, máy cô quay chân không, tủ sấy. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân $^1\text{H-NMR}$ của các sản phẩm được ghi trong môi DMSO- d_6 trên máy JEOL 400MHz tại Trường Đại học Bách Khoa Hà Nội và

máy BRUKER 500MHz tại Viện Hàn Lâm Khoa học Việt Nam.

Phổ hấp thụ phân tử UV-Vis ghi trên máy Agilent 8453 và phổ huỳnh quang phân tử ghi trên hệ thiết bị huỳnh quang phân giải thời gian tại Trường Đại học Bách Khoa Hà Nội.

2.3. Sơ đồ tổng hợp phức chất Rutheni(II) polypyridyl



Hình 1: Sơ đồ tổng hợp phức chất Rutheni(II) polypyridyl - $[\text{Ru}(\text{dpq})_2\text{bxbg}]\text{Cl}_2$

2.4. Cách tiến hành tổng hợp

Giai đoạn (1), tổng hợp 1,10-

Phenanthroline-5,6-dione[12]:

Cho 1,10-phenanthroline (2.5792g, 14.3mmol) và KBr (2.5348g, 21.3mmol) vào bình 3 cổ có gắn sinh hàn đun hồi lưu. Nhỏ từ từ hỗn hợp axit (25ml HNO₃ 65% và 25ml H₂SO₄ 98%) đã được làm lạnh vào bình 3 cổ. Đun hỗn hợp ở nhiệt độ 110°C trong 6h. Hỗn hợp được làm lạnh bằng nước đá sau đó được trung hòa bởi NaOH đến pH = 5. Chiết lấy sản phẩm bằng CHCl₃, sau đó làm khô bằng MgSO₄. Làm bay hơi dung môi ta thu được sản phẩm hữu cơ. Sản phẩm hữu cơ sau đó được kết tinh lại trong ethanol.

Giai đoạn (2), tổng hợp bipyridine-glycoluril (bpg)[13]:

Hỗn hợp 1,10-phenanthroline-5,6-dione (0.4378g, 2.1mmol) và urea (0.2534g, 4.2mmol) được cho vào bình 3 cổ chứa 10ml toluen. Thêm tiếp 0,7ml CF₃COOH rồi khuấy đều và đun sôi hỗn hợp 16h trong khí quyển Ar. Sau khi làm nguội, chất rắn màu nâu được lọc ra và đun sôi với 10ml ethanol trong vòng 1h. Sau khi làm lạnh, kết tủa được lọc, rửa bằng ethanol (25ml) và diethyl ether (25ml), sau đó sấy khô chân không.

Giai đoạn (3), tổng hợp phối tử bis(o-xylene)bipyridine-glycoluril (bxbg)[13]:

Sục khí Ar vào 10ml DMSO trong bình 3 cổ trong vòng 30 phút, thêm tiếp KOH (300mg, 5.3mmol) rắn và khuấy đều trong vòng 30 phút, thêm tiếp bpg (300mg, 1mmol) và 1,2-

bis(bromomethyl) benzene (540mg, 2mmol) đồng thời giữ hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ 15°C. Hỗn hợp được khuấy đều trong vòng 16h ở nhiệt độ phòng. Rót hỗn hợp vào 150ml NaCl bão hòa, sau đó chiết với CH₂Cl₂ (2x200ml), phần hữu cơ sau đó được rửa bằng dung dịch NaCl bão hòa (150ml), nước (150ml) và làm khô bằng MgSO₄ khan. Làm bay hơi dung môi rồi kết tinh sản phẩm trong methanol.

Giai đoạn (4), tổng hợp phối tử dipyrido[3,2-d:2,3-f]quinoxaline (dpq)[14]:

Cho 1,10-phenanthroline-5,6-dione (0.5050g, 2.4mmol) và ethylene diamine (0.2325g, 3.9mmol) vào bình 3 cổ chứa ethanol (175ml). Đun hỗn hợp trong vòng 2h ở 50°C. Làm bay hơi dung môi thu được sản phẩm để qua đêm. Sản phẩm dpq tinh khiết được kết tinh từ hỗn hợp methanol/nước (tỉ lệ 1:9), sau đó kết tinh lại bằng methanol.

Giai đoạn (5), tổng hợp tiền phức chất Ru(dpq)₂Cl₂[11]:

Cho RuCl₃.xH₂O (0.1761g) và LiCl (0.2015g) vào bình 3 cổ chứa DMF (10ml). Hỗn hợp phản ứng được đun nóng trong vòng 20 phút ở 80°C trong khí quyển Ar. Thêm tiếp phối tử dpq (0.3248g) rồi đun tiếp hỗn hợp trong vòng 14h. Làm lạnh hỗn hợp tới nhiệt độ phòng, sau đó rót vào bình đựng acetone (50ml) giữ ở -4°C qua đêm. Kết tủa được lọc và rửa bằng acetone (20ml) và nước cất đến khi nước lọc trở nên không màu, thu được sản phẩm có màu đen tím đem sấy khô.

Giai đoạn (6), tổng hợp phức chất
[Ru(dpq)₂bxbg]Cl₂[11]:

Cho Ru(dpq)₂Cl₂ (0.1464g) và phối tử
bxbg (0.1083g) vào bình 3 cổ chứa
ethylene glycol (50ml). Hỗn hợp được
đun sôi trong vòng 8h, khi đó dung dịch
chuyển từ màu đen sang đỏ thẫm. Lọc
nóng hỗn hợp sau phản ứng, phần nước

lọc được làm nguội đến nhiệt độ phòng.
Làm bay hơi dung môi thu được chất
rắn màu đỏ. Sản phẩm được tinh chế
bằng sắc ký cột (alumina,
acetone/methanol theo tỉ lệ 1:1).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

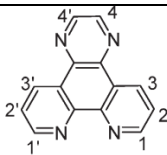
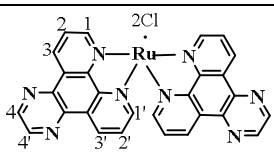
3.1. Đặc điểm vật lý của các chất đã tổng hợp

Bảng 1: Đặc điểm vật lý của các chất đã tổng hợp

Hợp chất	Dạng bề ngoài	Khối lượng sản phẩm (mg)	Hiệu suất %	Nhiệt độ nóng chảy (Mp – °C)
1,10-Phenanthroline-5,6-dione	Chất rắn màu vàng	20669	70	271
Bipyridine glycoluril (bpg)	Chất rắn màu vàng	320,6	60	> 400
Bis(o-xylene)bipyridine glycoluril (bxbg)	Chất rắn màu vàng	108,3	31	354
Dipyrido[3,2-d:2,3- f]quinoxaline (dpq)	Chất rắn màu kem	429,5	70	331
Ru(dpq) ₂ Cl ₂	Chất rắn màu đen tím	292,5	62	-
[Ru(dpq) ₂ bxbg]Cl ₂	Chất rắn màu đỏ đỏ	90,25	55%	-

3.3. Đặc điểm phổ cộng hưởng từ proton ¹H-NMR của các chất đã tổng hợp được

Bảng 2: Độ chuyển dịch hóa học (δ - ppm) của phối tử dipyrido[3,2-d:2,3-
f]quinoxaline (dpq) và tiền phức chất Ru(dpq)₂Cl₂

Chất		
¹ H - NMR	dipyrido[3,2-d:2,3- f]quinoxaline (dpq – sp ₂)	Ru(dpq) ₂ Cl ₂ – sp 4
H1, H1'	9.45 ÷ 9,41	9.48 ÷ 9.47
H3, H3'	9.22 ÷ 9.19	9.23
H4, H4'	9.14	9.19
H2, H2'	7.94 ÷ 7.90	7.97

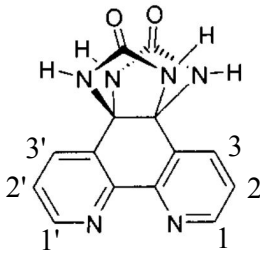
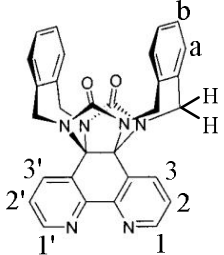
Phân tích phổ cộng hưởng từ proton của dipyrido[3,2-d:2,3-f]quinoxaline (dpq) và phức chất $Ru(dpq)_2Cl_2$:

Trên phổ 1H -NMR của dpq xuất hiện tín hiệu với độ chuyển dịch hóa học $\delta = 9.45 \div 9.41$ ppm tách thành 2 nhóm 2 vạch (dạng doublet doublet – dd) với hằng số tương tác $J = 1.8$ Hz và $J = 7.8$ Hz được quy kết cho proton H1 và H1'. Proton H3 và H3' có tín hiệu ứng với $\delta = 9.22 \div 9.19$ ppm (dd) với $J = 1.8$ Hz và $J = 4.6$ Hz. Tín hiệu phổ một vạch

(dạng singlet) cường độ lớn với $\delta = 9.14$ ppm được quy kết cho proton H4 và H4'. Tín hiệu xuất hiện tại $\delta = 7.94 \div 7.90$ ppm dạng dd với $J = 7.8$ Hz và $J = 4.6$ Hz được quy kết cho proton H2 và H2'.

Phổ 1H -NMR của phức tạo thành giữa ruteni(II) và phối tử dpq ($Ru(dpq)_2Cl_2$) có các tín hiệu đặc trưng với độ chuyển dịch hóa học giống như của phối tử dpq (Bảng 2).

Bảng 3: Độ chuyển dịch hóa học (δ - ppm) của bipyridine glycoluril (bpg) và phối tử bis(o-xylene)bipyridine glycoluril (bxbg)

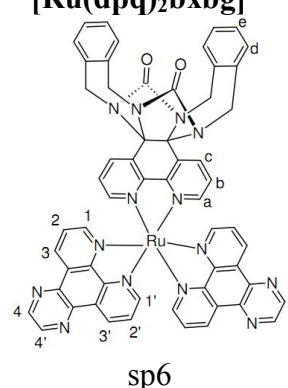
Chất		
1H - NMR	bipyridine glycoluril (bpg – sp3)	Bis(o-xylene)bipyridine glycoluril (bxbg – sp5)
H1, H1'	8.70 ÷ 8.67	8.90
H3, H3'	8.04 ÷ 8.02	8.75
H2, H2'	7.53 ÷ 7.48	7.55
H(N)	8.27	-
Ha	-	7.35
Hb	-	7.20
H(NCH ₂ Ar)	-	5.07; 4.96; 4.70; 4.52

Phân tích phổ cộng hưởng từ proton của bipyridine glycoluril (bpg) và phối tử bis(o-xylene)bipyridine glycoluril (bxbg):

Trên phổ $^1\text{H-NMR}$ của bpg xuất hiện tín hiệu với độ chuyển dịch hóa học $\delta = 8.70 \div 8.67$ ppm dạng dd với hằng số tương tác $J = 1.8$ Hz và $J = 4.6$ Hz được quy kết cho proton H1 và H1'. Tín hiệu phổ một vạch cường độ lớn với $\delta = 8.27$ ppm được quy kết cho proton liên kết với N. Proton H3 và H3' có tín hiệu ứng với $\delta = 8.04 \div 8.02$ ppm (d) với $J = 7.8$ Hz. Tín hiệu xuất hiện tại $\delta = 7.53 \div 7.48$ ppm dạng dd với $J = 4.6$ Hz và $J = 7.8$ Hz được quy kết cho proton H2 và H2'.

Phổ $^1\text{H-NMR}$ của phối tử bxbg cũng xuất hiện những tín hiệu với độ chuyển dịch hóa học tương tự cho các proton H1&H1', H2&H2', H3&H3' (Bảng 3). Mặt khác, trên phổ $^1\text{H-NMR}$ của bxbg không còn thấy xuất hiện tín hiệu tại $\delta \sim 8.27$ ppm, điều này phù hợp do không còn proton liên kết với N. Bên cạnh đó, tín hiệu dạng phổ chân rộng (broad-br) xuất hiện tại $\delta = 7.35$ ppm được quy kết cho proton Ha. Proton Hb có tín hiệu ứng với $\delta = 7.20$ ppm (br). Ngoài ra, các tín hiệu xuất hiện tại $\delta = 5.07$ (br); 4.96 (d); 4.70 (d); 4.52 (d) ppm với $J \sim 16$ Hz được quy kết cho các proton của nhóm $-\text{CH}_2$ liên kết với vòng thơm và N.

Bảng 4: Độ chuyển dịch hóa học (δ - ppm) của phức chất $[\text{Ru}(\text{dpq})_2\text{bxbg}]\text{Cl}_2$

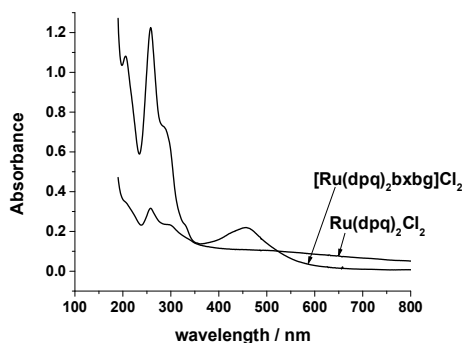
$^1\text{H-NMR}$		Phức chất $[\text{Ru}(\text{dpq})_2\text{bxbg}]^{2+}$	
			
H1	9.54 (d)	Ha	8.31 (d)
H4	9.39 (br)	Hc	7.92 (br)
H3	8.31 (d)	Hb	7.86 (br)
H2	7.92 (br)	Hd	7.27 (br)
		He	7.20 (br)
		H(NCH ₂ Ar)	4.61 (d); 4.01 (s)

Phổ $^1\text{H-NMR}$ của phức tạo thành giữa ruteni(II) với hai phối tử dpq và bxbg ($[\text{Ru}(\text{dpq})_2\text{bxbg}]\text{Cl}_2$) có các đặc trưng phổ (Bảng 4) là sự kết hợp của phối tử dpq (Bảng 2) và bxbg (Bảng 3). Tuy nhiên phổ phức tạp và có sự giảm độ chuyển dịch hóa học của hầu hết các proton do sự tạo thành liên kết giữa kim loại-phối tử.

3.4. Phổ hấp thụ phân tử UV-Vis của phức $\text{Ru}(\text{dpq})_2\text{Cl}_2$ và $[\text{Ru}(\text{dpq})_2\text{bxbg}]\text{Cl}_2$

Phổ hấp thụ phân tử của phức $\text{Ru}(\text{dpq})_2\text{Cl}_2$ và $[\text{Ru}(\text{dpq})_2\text{bxbg}]\text{Cl}_2$ được chỉ ra ở Hình 2. Bước chuyển dời điện tử $\pi-\pi^*$ của phối tử dpq và bxbg tại bước sóng $\lambda = 258$ nm. Bước chuyển dời điện tử đặc trưng kim loại-phối tử (MLCT) của phức chất quan sát thấy tại

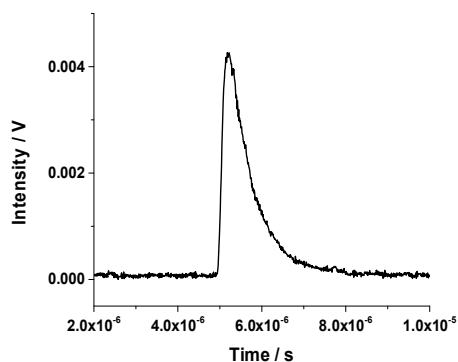
$\lambda = 457$ nm với $[\text{Ru}(\text{dpq})_2\text{bxbg}]\text{Cl}_2$ nhưng không rõ ràng với $\text{Ru}(\text{dpq})_2\text{Cl}_2$.



Hình 2: Phổ hấp thụ phân tử của phức $\text{Ru}(\text{dpq})_2\text{Cl}_2$ và $[\text{Ru}(\text{dpq})_2\text{bxbg}]\text{Cl}_2$ trong nước

3.5. Phổ huỳnh quang phân tử của phức chất $[\text{Ru}(\text{dpq})_2\text{bxbg}]\text{Cl}_2$

Phổ phát xạ huỳnh quang phân giải thời gian của $[\text{Ru}(\text{dpq})_2\text{bxbg}]\text{Cl}_2$ được chỉ ra ở Hình 3. Phức chất có thời gian phát xạ huỳnh quang (lifetime) là tương đối “dài”, $\tau = 590$ ns và độ dịch chuyển Stokes lớn, $\Delta\lambda = 163$ nm. Phức $[\text{Ru}(\text{dpq})_2\text{bxbg}]\text{Cl}_2$ tổng hợp được phù hợp cho ứng dụng làm đầu dò huỳnh quang.



Hình 3: Phổ huỳnh quang phân tử của phức $[\text{Ru}(\text{dpq})_2\text{bxbg}]\text{Cl}_2$ trong nước. $\lambda_{\text{ex}} = 460$ nm; $\lambda_{\text{obs}} = 620$ nm.

4. KẾT LUẬN

Thực hiện quy trình gồm 6 giai đoạn tổng hợp thành công phức chất $[\text{Ru}(\text{dpq})_2\text{bxbg}]\text{Cl}_2$ nhằm ứng dụng cho nghiên cứu làm đầu dò huỳnh quang phát hiện một số phân tử sinh học. Đặc điểm của các sản phẩm trung gian và sản phẩm cuối cùng được nghiên cứu, chứng minh dựa trên nhiệt độ nóng chảy, đặc trưng phổ cộng hưởng từ proton $^1\text{H-NMR}$ và phổ hấp thụ phân tử UV-Vis. Phức $[\text{Ru}(\text{dpq})_2\text{bxbg}]\text{Cl}_2$ có bước chuyển dời điện tử kim loại-phối tử (MLCT) tại $\lambda_{\text{max}} = 457$ nm, thời gian phát xạ huỳnh quang $\tau = 590$ ns và độ dịch chuyển Stokes $\Delta\lambda = 163$ nm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Zhang, M.-T. and L. Hammarström (2011), *J. Am. Chem. Soc.*, 133, p. 8806–8809.
- [2] Zhang, M.-T., et al. (2011), *J. Am. Chem. Soc.*, 133, p. 13224–13227.
- [3] Lei, P., et al. (2008), *J. Am. Chem. Soc.*, 130, p. 26–27.
- [4] Freys, J.C., et al. (2012), *Dalton Trans.*, 41, p. 13105–13111.
- [5] Lo, K.K.-W., A.W.-T. Choi, and W.H.-T. Law (2012), *Dalton Trans.*, 41, p. 6021–6047.
- [6] Ryan, E., *Thesis* 1991, Dublin City University: Dublin.
- [7] Friedman, A.E., et al. (1990), *J. Am. Chem. Soc.*, 112, p. 4960–4962.

(xem tiếp trang 126)