

# 光谱法研究 2-(4-二甲氨基苯基)-5-氟-6-吗啉-1-氢-苯并咪唑与 小牛胸腺 DNA 的相互作用

唐凌天, 王毅, 刘新起, 胡少文, 褚泰伟, 王祥云\*

北京大学化学与分子工程学院应用化学系, 北京 100871

**摘要** 研究了 2-(4-二甲氨基苯基)-5-氟-6-吗啉-1-氢-苯并咪唑(1)在不同 pH 条件下的紫外-可见吸收光谱, 采用非线性最小二乘法得出分子 1 的三级加质子常数  $\lg\beta_1$ ,  $\lg\beta_2$ ,  $\lg\beta_3$  分别为  $4.96 \pm 0.03$ ,  $5.72 \pm 0.07$  和  $7.95 \pm 0.10$ 。当 pH 3.40 时, 分子 1 主要以一价离子状态存在, 紫外-可见吸收光谱及荧光光谱表明该条件下分子与小牛胸腺 DNA 存在明显的相互作用, 并得出分子 1 与 DNA 的结合常数  $K_b$  为  $(2.30 \pm 0.10) \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L}$ 。当分子浓度为  $10^{-8} \sim 1.2 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 荧光强度随 DNA 含量的增加而线性增强, 分子 1 是一种潜在的测定 DNA 的定量试剂。

**主题词** 2-(4-二甲氨基苯基)-5-氟-6-吗啉-1-氢-苯并咪唑; 小牛胸腺 DNA; 紫外-可见吸收光谱; 荧光光谱  
**中图分类号:** O657.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-0593(2005)10-1618-04

苯并咪唑是一类重要的药物中间体。许多取代苯并咪唑类化合物具有抗菌、抗病毒等生物活性, 可作为杀菌剂、驱虫药、质子泵抑制剂、药物前体等而被广泛应用于医药、生物化学以及分析化学等领域<sup>[1, 2]</sup>。苯并咪唑类分子具有独特的  $\pi$ -共轭结构, 在紫外-可见光区有较强的特征吸收, 还有一些取代苯并咪唑类分子具有独特的荧光性质并可作为分子探针<sup>[3]</sup>。

2-(4-二甲氨基苯基)-5-氟-6-吗啉-1-氢-苯并咪唑(1)是一种潜在的药物分子且具有特征的紫外吸收谱带和荧光发射峰。光谱法研究发现, 该分子能与  $\text{H}^+$  结合, 随着溶液酸度的改变而以不同的形态存在; 当 pH 9.50 时, 与环糊精形成 1:1 的包合物<sup>[4]</sup>。通常含有活泼氢或带一定正电荷且具有平面结构的芳香化合物可通过嵌插或氢键与 DNA 产生相互作用<sup>[5]</sup>。在弱酸性条件下, 分子 1 具备与 DNA 分子相互作用的条件, 因此, 本文通过紫外-可见吸收光谱、荧光光谱进一步研究了分子 1 在不同 pH 条件下的存在形态及其与小牛胸腺 DNA 作用的光谱学性质。

## 1 实验部分

### 1.1 试剂及仪器

按文献<sup>[4]</sup>的方法合成, 2-(4-二甲氨基苯基)-5-氟-6-吗啉-1-氢-苯并咪唑(分子 1), 小牛胸腺 DNA(北京百泰生化技术公司), 纯度  $>99\%$  ( $I_{260}/I_{280} = 1.75$ ), 柠檬酸, 柠檬酸钠, 磷酸, 盐酸, NaCl, NaOH 等均为分析纯试剂, 实验用水均

为三次蒸馏水。

日本 Shimadzu UV-2401 型紫外-可见吸收光谱仪; Hitachi F-4500 荧光光度计; PHS-3C 型精密 pH 计(上海雷磁仪器厂)。

### 1.2 实验方法

配制分子 1 的乙醇储备液及小牛胸腺 DNA-生理盐水储备液备用, DNA 浓度通过光谱法测定 ( $\epsilon_{260} = 6\ 600 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$ )<sup>[6]</sup>。变性 DNA 是上述 DNA 水溶液依文献方法在沸水中水浴 15 min 制得<sup>[7]</sup>。分别配制总浓度为  $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , pH 3.40 的柠檬酸-柠檬酸钠和磷酸-磷酸二氢钠缓冲溶液备用。配制一系列不同 pH 的水溶液, 分子 1 的浓度为  $1.2 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 测定其紫外吸收光谱。配制一系列不同浓度的 DNA 溶液, 分子 1 浓度分别为  $5 \times 10^{-7}$ ,  $1.2 \times 10^{-6}$ ,  $6 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 测定其紫外和荧光光谱。

## 2 结果与讨论

### 2.1 pH 值对分子 1 存在形态的影响

从结构上看, 分子 1(见图 1)含有 4 个氮原子, 在酸性条件下可能与氢离子结合。实验发现, 当  $\text{pH} > 1.1$  时, 随着溶液 pH 的变化, 紫外-可见光谱图上有两个明显的等吸光度点和 3 个吸收峰<sup>[4]</sup>。随着溶液酸度的进一步增强, 位于 322 nm 附近的吸收峰强度减弱, 在 300 nm 处出现新的吸收峰且随着溶液酸度的增加而增强, 同时在 316 nm 附近出现新的等吸光度点。结果表明, 在讨论的酸度范围内, 分子 1 有 4 种

收稿日期: 2004-02-26, 修订日期: 2004-05-28

基金项目: 国家自然科学基金(20171005)资助项目

作者简介: 唐凌天, 女, 1974 年生, 北京大学化学与分子工程学院应用化学系博士研究生 \* 通讯联系人

存在形态, 即游离碱状态(B), 一价、二价和三价离子状态。

由于分子 1 有 4 种状态, 且在一定 pH 范围内以多种状

态共存。根据朗伯-比尔定律, 溶液平均摩尔消光系数  $\bar{\epsilon}(\lambda)$  可表示为:

$$\bar{\epsilon}(\lambda) = \frac{\epsilon_0(\lambda) + \epsilon_1(\lambda)\beta_1[\text{H}^+] + \epsilon_2(\lambda)\beta_2[\text{H}^+]^2 + \epsilon_3(\lambda)\beta_3[\text{H}^+]^3}{1 + \beta_1[\text{H}^+] + \beta_2[\text{H}^+]^2 + \beta_3[\text{H}^+]^3}$$

其中  $\epsilon_0(\lambda)$ ,  $\epsilon_1(\lambda)$ ,  $\epsilon_2(\lambda)$ ,  $\epsilon_3(\lambda)$ , 分别表示游离分子 1 及其一价、二价、三价离子的摩尔消光系数。当溶液  $\text{pH} > 7$  时, 分子 1 主要以游离状态存在,  $\epsilon_0(\lambda)$  值可据此求出。溶液平均摩尔消光系数  $\bar{\epsilon}(\lambda)$  由溶液吸光度  $A_{\text{obs}}$  与分子 1 总浓度之比得出。依据不同 pH 时, 不同波长的溶液平均摩尔消光系数, 采用非线性最小二乘法对数据进行拟合, 得到分子 1 与氢离子的三级结合常数对数值  $\lg\beta_1$ ,  $\lg\beta_2$ ,  $\lg\beta_3$  分别为  $4.96 \pm 0.03$ ,  $5.72 \pm 0.07$  和  $7.95 \pm 0.10$ 。当  $\text{pH} > 1$  时,  $\text{H}^+$  浓度与溶液 pH 的关系可表示为  $[\text{H}^+] = 10^{-\text{pH}}$ , 则溶液平衡时分子 1 不同状态的摩尔分数(F)与溶液 pH 的关系如图 1 所示, 其中:

$$\begin{aligned} F[\text{B}] &= \frac{1}{1 + \beta_1(10^{-\text{pH}}) + \beta_2(10^{-\text{pH}})^2 + \beta_3(10^{-\text{pH}})^3}; \\ F[\text{BH}^+] &= \beta_1(10^{-\text{pH}}) \times F[\text{B}]; \\ F[\text{BH}_2^{2+}] &= \beta_2(10^{-\text{pH}})^2 \times F[\text{B}]; \\ F[\text{BH}_3^{3+}] &= \beta_3(10^{-\text{pH}})^3 \times F[\text{B}]. \end{aligned}$$

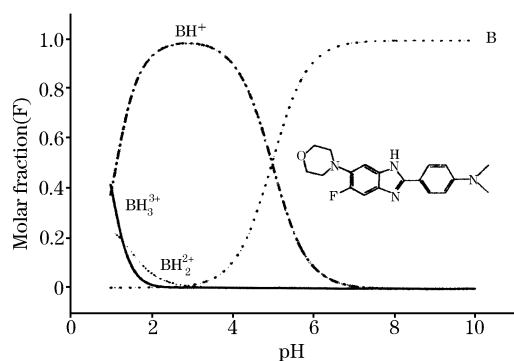


Fig. 1 Relationship between the molar fraction of each species of compound 1 and the pH value of the solution

## 2.2 紫外光谱法研究分子 1 与小牛胸腺 DNA 的相互作用

由图 1 可见, 当溶液  $\text{pH} > 7$  时, 分子 1 主要以游离碱状态存在; 当溶液  $2 < \text{pH} < 4$  时, 分子 1 主要以一价离子状态存在。随着溶液酸度的继续增强, 一价、二价和三价离子同时存在。通常含有活泼氢或带有部分正电荷且具有共轭结构的芳香化合物可通过嵌插或氢键与 DNA 产生相互作用<sup>[5]</sup>。从结构上看, 分子 1 不含活泼氢, 但其一价离子状态满足与 DNA 作用的必要条件, 因此本文考察了溶液 pH 3.40 时, 分子 1 与小牛胸腺 DNA 作用的光谱学行为。

当分子 1 浓度为  $1.2 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 分子 1 与 DNA 作用的紫外-可见光谱如图 2 所示。由图可见, 在 327 和 376 nm 附近, 有两个明显的等吸光度点, 这表明分子 1 与 DNA 有较明显的相互作用。假定分子 1 与 DNA 的结合常数为  $K_b$ , 由于 DNA 在  $330 \sim 400 \text{ nm}$  范围内无吸收, 则 DNA 浓度与溶液的消光系数存在如下关系<sup>[8]</sup>:

$[\text{DNA}]/(\epsilon_a - \epsilon_f) = [\text{DNA}]/(\epsilon_b - \epsilon_f) + 1/(K_b(\epsilon_b - \epsilon_f))$   
其中  $\epsilon_a$ ,  $\epsilon_b$  和  $\epsilon_f$  分别表示溶液平均摩尔消光系数(即吸光度与分子 1 浓度的比值); 完全结合分子 1 的摩尔消光系数及自由分子 1 的摩尔消光系数。 $\epsilon_a$  和  $\epsilon_f$  可根据溶液及分子 1 在 370 nm 处的吸光度计算得到。以  $[\text{DNA}]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$  对  $[\text{DNA}]$  作图, 由斜率与截距之比得出  $K_b$  为  $(2.30 \pm 0.10) \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L}$ 。

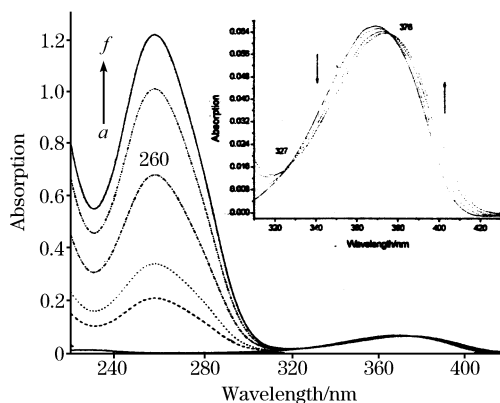


Fig. 2 Effect of the concentration of DNA on the absorption intensity of the solutions in the range from 220 to 420 nm

a, 0; b, 31.29; c, 52.15; d, 104.29;  
e, 156.44; f, 187.73  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

## 2.3 DNA 浓度对分子荧光强度的影响

分子 1 浓度为  $1.2 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时, DNA 浓度对分子荧光强度的影响如图 3 所示。由图可见, 分子 1 的一价离子

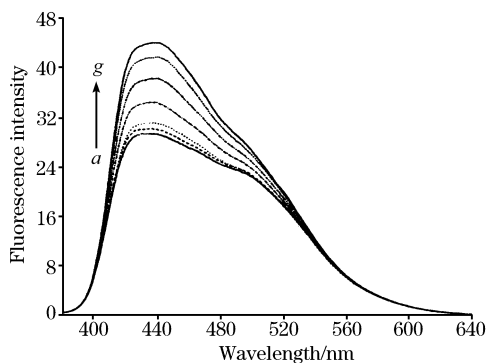


Fig. 3 Effect of calf thymus DNA on the fluorescence intensity of compound 1

Concentration of DNA: a, 0; b, 2.07; c, 6.21; d, 12.43; e, 20.71; f, 28.99; g, 37.28  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; citric acid/sodium citrate buffer, pH 3.40; compound 1,  $1.2 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

态特征荧光发射峰位于 433 nm 附近, 峰强随着溶液 DNA 浓

度的增加而增强。本文继续探讨了分子浓度不同时, DNA 浓度对荧光强度的影响, 结果表明, 分子 1 浓度低于  $1.2 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 荧光强度与溶液 DNA 浓度呈线性关系。当分子 1 浓度较高, 超出自身荧光线性范围时, 荧光强度随着 DNA 浓度的增加而增强, 但逐渐偏离线性关系。分子 1 浓度为  $5 \times 10^{-7}$ ,  $1.2 \times 10^{-6}$ ,  $6 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 荧光强度与 DNA 浓度关系分别如图 4(a, b, c) 所示。以上结果表明, 当分子 1 浓度在荧光线性范围内 ( $10^{-8} \sim 1.2 \times 10^{-6} \text{ mol}$

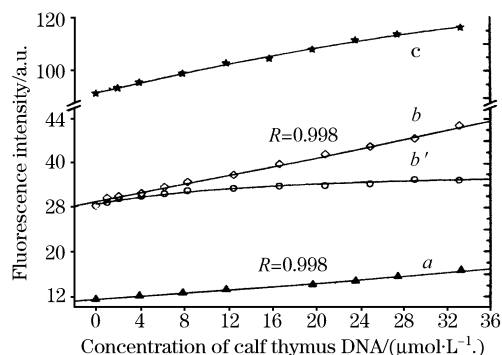


Fig. 4 Effect of calf thymus DNA on the fluorescence intensity of compound 1

Concentration of compound 1 in DNA systems: a,  $5 \times 10^{-7}$ ; b,  $1.2 \times 10^{-6}$ ; c,  $6 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; in Denatured DNA system: b',  $1.2 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; pH 3.40 with a citric acid/sodium citrate buffer

$\cdot \text{L}^{-1}$ )时<sup>[4]</sup>, 该分子可用于测定 DNA 浓度。

通常平面型分子与 DNA 间的作用是通过嵌插作用或氢键产生的, 为进一步探讨分子 1 与 DNA 的作用模式, 本文继续研究了变性 DNA(在沸水中水浴 15 min<sup>[7]</sup>)对分子荧光的影响, 结果如图 4(b')所示。由图 4(b')可见, 变性 DNA 仍对分子荧光有增强作用, 但作用相对减弱, 表明分子 1 与 DNA 间存在嵌插作用, DNA 变性解旋后, 嵌插作用减弱, 导致分子荧光强度相对下降。但分子荧光仍随着 DNA 浓度的增加而增强, 这表明 DNA 与分子间仍可能存在氢键作用, 或因 DNA 水解不完全, 分子荧光仍有增强的趋势。

### 3 结 论

本文研究了 2-(4-二甲氨基苯基)-5-氟-6-吗啉-1-氢-苯并咪唑(1)在不同 pH 条件下的紫外-可见吸收光谱, 用非线性最小二乘法从吸光度数据求得分子 1 的三级加质子常数  $\lg\beta_1$ ,  $\lg\beta_2$ ,  $\lg\beta_3$  分别为  $4.96 \pm 0.03$ ,  $5.72 \pm 0.07$  和  $7.95 \pm 0.10$ 。进一步采用紫外-可见吸收光谱、荧光光谱研究了分子 1 与小牛胸腺 DNA 的相互作用, 当 pH 3.40 时, 分子 1 与 DNA 的结合常数  $K_b$  为  $(2.30 \pm 0.10) \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L}$ 。当分子浓度为  $10^{-8} \sim 1.2 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 分子 1 是一种潜在的测定 DNA 的定量试剂。

致谢: 感谢北京大学化学与分子工程学院高宏成教授、李娜教授的有益讨论与帮助。

## 参 考 文 献

- [1] Singh M P, Sasmal S, Lu Wei, et al. *Synthesis*, 2000, 10: 1380.
- [2] WANG Jin-yi, ZHOU Jing, CHENG Dong-liang, et al(王进义, 周 晶, 程东亮, 等). *Chem. J. Chinese Univ. (高等学校化学学报)*, 2000, 21(12): 1861.
- [3] Loontjies F G, Regenfuss P, Zechel A, et al. *Biochemistry*, 1990, 29: 9029.
- [4] TANG Ling-tian, WANG Xiang-yun, LIU Xin-qi, et al(唐凌天, 王祥云, 刘新起, 等). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱学分析)*, 2004, 24(5): 588.
- [5] SUN Ying-ji, CHENG Peng, YAN Shi-ping, et al(孙英姬, 程 鹏, 阎世平, 等). *Chinese Sci. Bull. (科学通报)*, 2000, 45(22): 2357.
- [6] Reichmann M E, Rice S A, Thomas C A, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 1954, 76: 3047.
- [7] Stout D L, Becker F F. *Analytical Biochemistry*, 1982, 127: 302.
- [8] Sortino S, Condorelli G. *New J. Chem.*, 2002, 26: 250.

## Spectroscopic Research on the Interaction of 2-(4-Dimethylaminophenyl)-5-Fluoro-6-(Morpholin-4-yl)-1H-Benzimidazole and Calf Thymus DNA

TANG Ling-tian, WANG Yi, LIU Xin-qi, HU Shao-wen, CHU Tai-wei, WANG Xiang-yun\*

College of Chemistry and Molecular Engineering, Peking University, Beijing 100871, China

**Abstract** UV-Vis spectra of the aqueous solutions of 2-(4-dimethylaminophenyl)-5-fluoro-6-(morpholin-4-yl)-1H-benzimidazole (1) at different pH values revealed that compound 1 is a tertiary base, which can combine three protons. Through the non-linear least square method, the logarithm of the three accumulative protonation constants of compound 1, namely,  $\lg\beta_1$ ,  $\lg\beta_2$  and  $\lg\beta_3$ , were determined to be  $4.96 \pm 0.03$ ,  $5.72 \pm 0.07$  and  $7.95 \pm 0.10$ , respectively. UV-Vis and the steady-state fluorescence spectra indicated that a special interaction occurs between compound 1 and calf thymus DNA at the pH value of 3.40, of which the binding constant,  $K_b$ , is  $(2.30 \pm 0.10) \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L}$ . Compound 1 in the concentration range of  $10^{-8}$  to  $1.2 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  has a potential application to the quantitative determination of DNA.

**Keywords** 2-(4-dimethylaminophenyl)-5-fluoro-6-(morpholin-4-yl)-1H-benzimidazole; Calf thymus DNA; UV-Vis spectrum; Fluorescence spectrum

(Received Feb. 26, 2004; accepted May 28, 2004)

\* Corresponding author