

# 咪唑啉季铵盐与 fsDNA 作用的 共振光散射光谱分析及应用

石顺存,龙云飞,邓春风,喻娟娟,康玉佳

(湖南科技大学 化学化工学院 理论化学与分子模拟省部共建教育部重点实验室,  
分子构效关系湖南省普通高等学校重点实验室,湖南 湘潭 411201)

**摘要:**利用环烷酸、二乙烯三胺或三乙烯四胺、硫酸二乙酯为原料合成了 2 种咪唑啉季铵盐  $M_1$  和  $M_2$ ,  $M_1, M_2$  分别在 pH = 2.36 和 pH = 3.78 的 Britton - Robinson 缓冲溶液中与 fsDNA 相互作用后,体系的共振光散射(RLS)强度明显增强.研究了它们与 fsDNA 作用的影响因素,在优化条件下,RLS 强度增加值与 fsDNA 浓度之间呈良好的线性关系,拟定了新的测定 fsDNA 的 RLS 法.该法具有灵敏度高,操作简单,准确度高,线性范围宽等特点,用于合成样的测定,结果满意.

**关键词:**咪唑啉;咪唑啉季铵盐;fsDNA;共振光散射(RLS)

中图分类号:O657.3 文献标志码:A 文章编号:1672-9102(2014)03-0098-05

## The interaction between imidazoliny-quaternary-ammonium-salt and fsDNA and its analytical applications using resonance light scattering spectroscopy

SHI Shuncun, LONG Yunfei, DENG Chunfeng, YU Juanjuan, KANG Yujia

(Key Laboratory of Theoretical Chemistry and Molecular Simulation of Ministry of Education,  
Hunan Province College Key Laboratory of Quantitative Structure-Activity or Structure-Property Relationship,  
School of Chemistry and Chemical Engineering, Hunan University of Science and Technology, Xiangtan 411201, China)

**Abstract:** Two imidazoliny-quaternary-ammonium-salt  $M_1$  and  $M_2$  were synthesised using naphthenic acid, diethylene triamine (or triethylene tetramine), and diethyl sulfate. The interaction between fsDNA respectively with  $M_1$  and  $M_2$ , enhanced the intensities of resonance light scattering (RLS) significantly in Britton- Robinson buffer solution of the pH 2.36 for  $M_1$  and 3.78 for  $M_2$ . Also, it was studied the effect factors on the reaction between imidazoliny-quaternary-ammonium-salt and fsDNA. Under the optimum conditions, the enhanced intensities of RLS had good linear relationship with the concentration of fsDNA. Thus, a new RLS method for determination of fsDNA was established. The method has the properties of high sensitivity, simple operation, good accuracy and the wide range of linear. It can be used to the determination of fsDNA contain in the synthesized samples with the result of satisfying.

**Key words:** imidazoline, imidazoliny-quaternary-ammonium-salt, fsDNA, resonance light scattering

咪唑啉类化合物,因对碳钢等金属具有良好的缓蚀性能而在工业上得到了较广泛的应用<sup>[1]</sup>,本文工作发现,新合成的两种咪唑啉类化合物能和 DNA 发生强烈的相互作用并引起强烈的 RLS 强度

增强现象,利用这一现象不仅能建立 fsDNA 的定量分析新方法,还可为继续研究合成的两种咪唑啉类化合物对细菌的抑制作用提供重要的指导.

DNA 分析在临床及生物化学分析中具有十分

重要的意义,研究颇多的有分光光度法<sup>[2]</sup>和荧光光度法<sup>[3]</sup>.近来,共振光散射(RLS)光谱作为一种高灵敏的光谱分析新技术已应用于DNA等物质的定量测定<sup>[4-6]</sup>.本研究发现,所合成的表面活性剂咪唑啉季铵盐 M<sub>1</sub> 和咪唑啉季铵盐 M<sub>2</sub> 分别与 fsDNA 结合后,会引起 RLS 强度的急剧增强,并分别在 388 nm 和 398 nm 处产生 RLS 增强峰.在最佳反应条件下,其 RLS 信号的增强值与 fsDNA 的浓度呈良好的线性关系,据此建立了定量测定 fsDNA 的 RLS 新方法.

## 1 实验部分

### 1.1 仪器和试剂

#### 1) 仪器

LS50B 荧光分光光度计(美国 PE 公司), FI - PE Spectrumone 红外光谱仪, Varian INOVA - 400 核磁共振仪

#### 2) 试剂

鱼精 DNA(fsDNA)为生化试剂(上海伯奥生物科技有限公司 上海):配成 100 mg/L 的水溶液,并置于 0 ~ 4 °C 下保存,使用时稀释到适当浓度; M<sub>1</sub> 和 M<sub>2</sub>:均配成  $4.0 \times 10^{-4}$  mol/L 的水溶液;缓冲溶液:磷酸、硼酸、醋酸的浓度均为 0.04 mol/L 的三酸混合液,以浓度为 0.2 mol/L 的 NaOH 溶液分别调配成 pH 为 2.36 和 3.78;所用试剂均为分析纯,实验用水均为二次蒸馏水.

### 1.2 实验方法

#### 1) 咪唑啉及其季铵盐的合成

按  $n(\text{环烷酸}):n(\text{多胺}) = 1.00:1.05$  的物质的量比,加入平均分子量为  $M = 236.0$  的环烷酸<sup>[7]</sup>与二乙烯三胺或三乙烯四胺类多胺(CP, 含量  $\geq 98\%$ ),以二甲苯(AR)作携水剂,经两步缩合脱水反应<sup>[8]</sup>并脱除二甲苯溶剂及残余的多胺后,分别生成 1-胺乙基-2-环烷基-2-咪唑啉(咪唑啉 1)及 1-二乙烯二胺基-2-环烷基-2-咪唑啉(咪唑啉 2).

加入总反应物料量 20% (m/m) 的去离子水作溶剂,分别按  $n(\text{咪唑啉 1}):n(\text{硫酸二乙酯}) = 1.00:$

1.98 及  $n(\text{咪唑啉 2}):n(\text{硫酸二乙酯}) = 1.00:2.98$  的比例,搅拌下往上述合成的咪唑啉 1 或咪唑啉 2 中加入硫酸二乙酯(AR, 含量  $\geq 98\%$ ),控制温度 50 ~ 60 °C 下反应 2 ~ 3 h.经检测,产物胺值<sup>[9-10]</sup>  $\leq 5.0$  mg KOH /g、其 1% 水溶液 pH 值  $\leq 6.5$  时,即季铵化反应已完全,分别得到相应的纯度可达 98% 以上的咪唑啉季铵盐 M<sub>1</sub> 和咪唑啉季铵盐 M<sub>2</sub>.

#### 2) IR 谱及 <sup>13</sup>CNMR 谱分析

对合成好的中间产物咪唑啉及去除水溶剂后的咪唑啉季铵盐,用 KBr 涂片法,在 FI - PE Spectrumone 红外光谱仪上进行红外光谱分析,得到 IR 谱图及其有关特征吸收峰.采用 Varian INOVA - 400 核磁共振仪,直接将中间产物咪唑啉或咪唑啉季铵盐 M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub> 原液移入内径 5 mm 的测定专用管中,以氘代丙酮为溶剂、TMS(四甲基硅烷)为内标,在宽带去偶、脉冲宽度 4.6 μs 左右的条件下测定<sup>13</sup>CNMR.根据 IR 谱图特征吸收峰及<sup>13</sup>CNMR 特征化学位移,便可确定产物的结构<sup>[10-11]</sup>.

#### 3) 咪唑啉季铵盐与 fsDNA 的反应

在室温下,于 10 mL 的刻度试管中,依次加入 1.0 mL 的  $4.0(10^{-4} \text{ mol/L})$  咪唑啉季铵盐, M<sub>1</sub> 中加入 1.0 mL 缓冲溶液, M<sub>2</sub> 中加入 1.5 mL 缓冲溶液,都加入一定量稀释了的 fsDNA 溶液,用蒸馏水定容至刻度,轻微振荡,放置 10 min,用 1 cm 厚的石英比色皿,入射和出射狭缝宽度均为 3 nm 同步扫描,得 RLS 光谱. M<sub>1</sub> 和 M<sub>2</sub> 分别在 388 nm 和 398 nm 处测定 fsDNA 加入前后的 RLS 强度差 ( $I = I - I_0$  ( $I, I_0$  分别为 fsDNA 体系和试剂空白的 RLS 强度)).

## 2 结果与讨论

### 2.1 波谱分析

所合成咪唑啉,IR 谱  $1600 \text{ cm}^{-1}$  左右处出现了咪唑啉环 C = N 键强特征吸收峰,<sup>13</sup>C NMR 谱  $\delta 167.5$  左右处出现了咪唑啉环 C = N 键中 C 原子的强特征化学位移.结果与文献[10-11]报导一致.

所合成咪唑啉季铵盐, M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub> 结构式如图 1 所示.

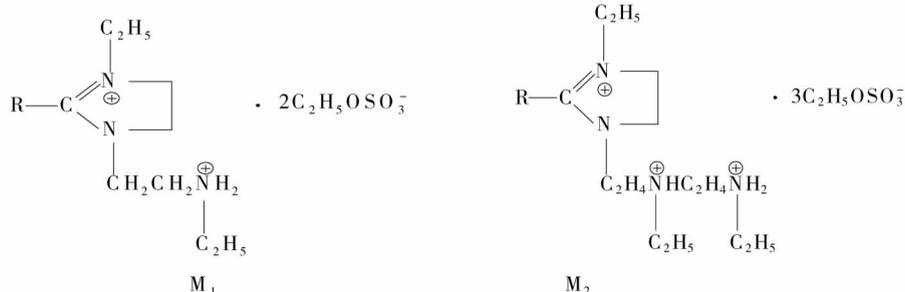


图 1 咪唑啉季铵盐结构式(R 为环烷酸衍生的烷基)

其 IR 谱  $1603\text{ cm}^{-1}$  左右处出现了咪唑啉季铵离子中  $\text{C}=\text{N}$  键的强特征吸收峰,  $^{13}\text{C}$  NMR 谱  $\delta 171$  左右处出现了咪唑啉季铵离子  $\text{C}=\text{N}$  键中  $\text{C}$  原子的强特征化学位移. 以  $\text{M}_1$  为例, 其 IR 谱图及  $^{13}\text{C}$  NMR 谱图分别如图 2 及图 3 所示.

这些结果与文献报导<sup>[10-11]</sup>是吻合的, 故目标化合物合成是成功的.

在  $\text{pH} = 2.36$  和  $\text{pH} = 3.78$  的缓冲溶液体系中, 对应的  $\text{M}_1 - \text{fsDNA}$  和  $\text{M}_2 - \text{fsDNA}$  体系的 RLS 光谱分别如图 4、图 5 所示.

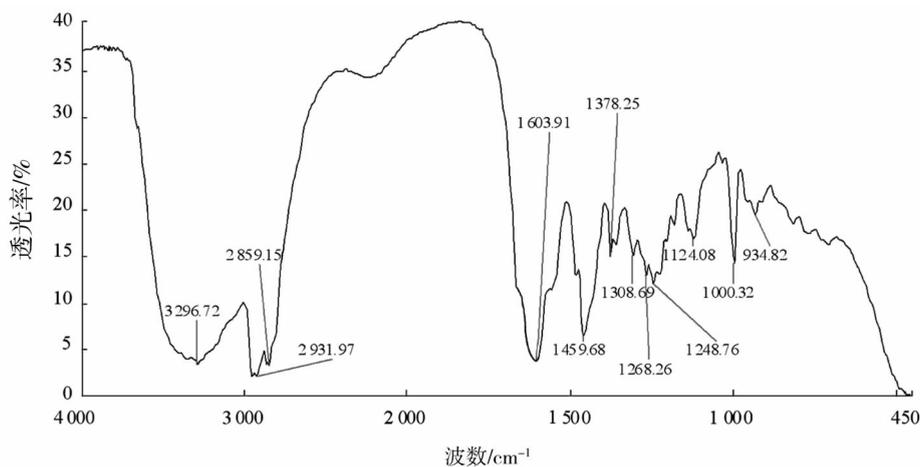


图 2 咪唑啉季铵盐 IR 谱图

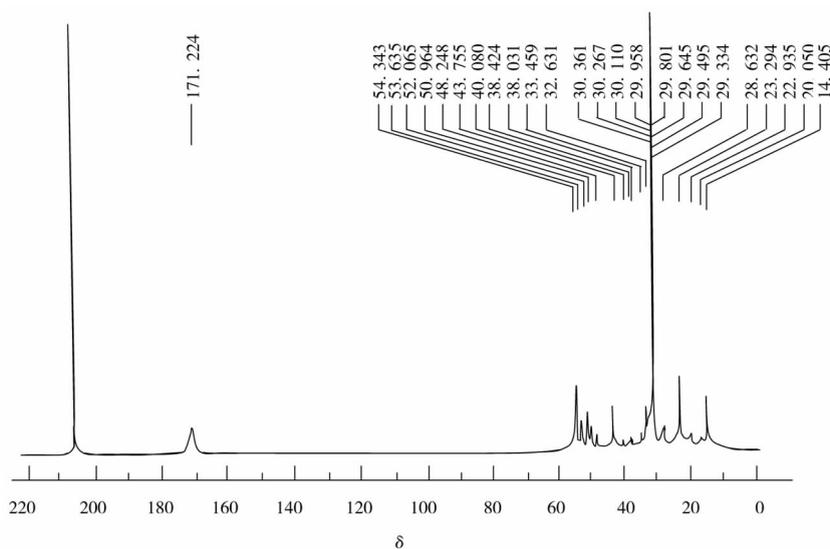


图 3 咪唑啉季铵盐  $^{13}\text{C}$  NMR 谱图

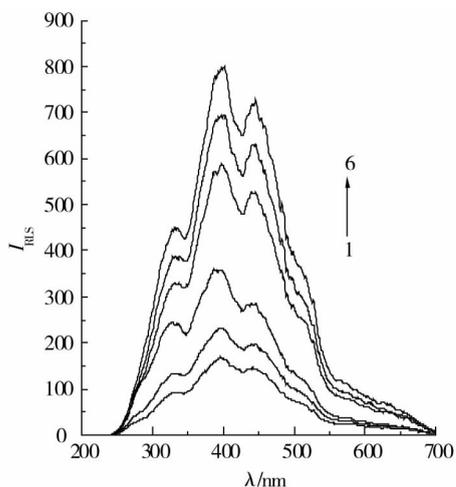


图 4  $\text{M}_1 - \text{fsDNA}$  的 RLS 光谱

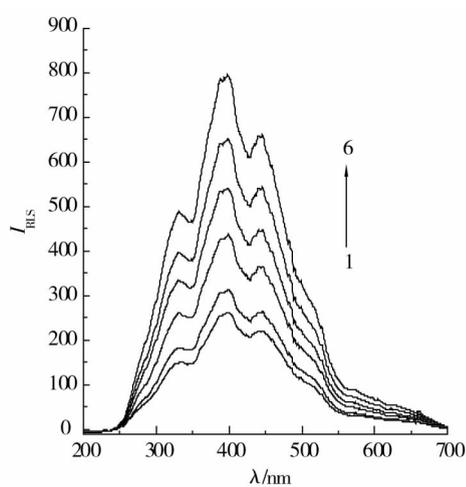


图 5  $\text{M}_2 - \text{fsDNA}$  的 RLS 光谱

上述图 4 中 1 为缓冲溶液 +  $M_1 4.0 \times 10^{-5}$  mol/L, 2~6 依次为  $1 + c_{fsDNA} 0.03$  mg/L,  $1 + c_{fsDNA} 0.5$  mg/L,  $1 + c_{fsDNA} 1.0$  mg/L,  $1 + c_{fsDNA} 1.5$  mg/L 和  $1 + c_{fsDNA} 2.0$  mg/L. 图 5 中 1 为缓冲溶液 +  $M_2 4.0 \times 10^{-5}$  mol/L, 2~6 依次为  $1 + c_{fsDNA} 0.01$  mg/L,  $1 + c_{fsDNA} 0.5$  mg/L,  $1 + c_{fsDNA} 1.0$  mg/L,  $1 + c_{fsDNA} 1.5$  mg/L 和  $1 + c_{fsDNA} 2.0$  mg/L.

由图可知,缓冲溶液和咪唑啉在测定条件下, 200~700 nm 的范围内 RLS 信号十分微弱,向缓冲溶液中加入 fsDNA 后体系的 RLS 强度有一定的增强,最大散射峰分别在 388 nm 和 398 nm 处. 从图 4 和图 5 中还可以看出, RLS 强度的增加值随 fsDNA 浓度的增大而增大.

### 2.2 实验条件的选择

#### 1) 最佳 pH 值的选择

按实验方法,以三酸 - NaOH 缓冲溶液调节体系的 pH 值,测定了不同酸度下的 RLS 强度,结果如图 6. 其中, fsDNA 浓度均为 1.0 mg/L,  $M_1, M_2$  浓度均为  $4.0 \times 10^{-5}$  mol/L.

由图 6 可知, B 线 ( $M_1$ ) 在  $pH < 4.35$  时;  $\Delta I$  值较大且较稳定,  $pH > 4.35$  时,  $\Delta I$  值随 pH 增加而减小; 当  $pH > 9.69$  时, RLS 改变很小,  $pH = 2.36$  时, 体系的  $\Delta I$  值最大. C 线 ( $M_2$ ) 表明,  $pH (5.02$  时, RLS 较平稳,  $pH = 3.78$  时, 体系的  $\Delta I$  值最大. 对应  $M_1$  和  $M_2$ , 分别在  $pH = 2.36$  和  $pH = 3.78$ , 体系的  $\Delta I$  值最大.

因此, 本实验分别选择  $pH = 2.36$  和  $pH = 3.78$  的三酸 - NaOH 缓冲溶液控制加入  $M_1$  和  $M_2$  体系的酸度.

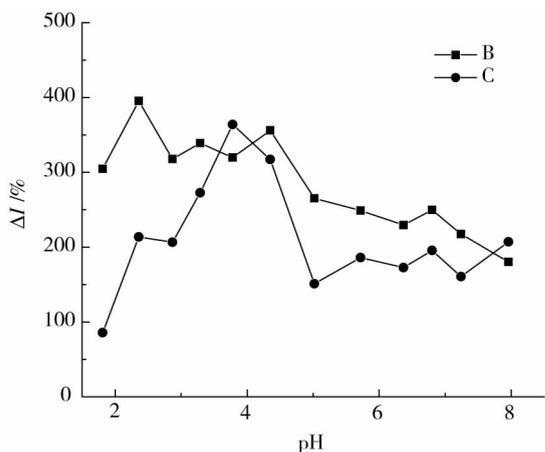


图 6 pH 对体系 RLS 强度的影响

#### 2) 缓冲溶液用量的选择

取  $M_1$  或  $M_2$  各 1 mL 后分别加入 1 mL 浓度为 10 mg/L 的 fsDNA, 改变缓冲溶液的用量, 结果表

明,  $M_1$  加入的缓冲溶液用量为 1 mL 和  $M_2$  加入的缓冲溶液用量为 1.5 mL 时结果最好.

#### 3) 共存物质对体系的影响

在最佳条件下, 固定 fsDNA 的浓度为 1.0 mg/L, 对常见阳离子和葡萄糖等多种物质进行了干扰实验, 结果如表 1.

表 1 共存物对测定 fsDNA 的影响

序号	共存物质	浓度 / (mmol/L)	$\Delta I_{RLS} / \%$	
			$M_1$	$M_2$
1	$K^+, NO_3^-$	1.0	5.14	3.97
2	$Ca^{2+}, NO_3^-$	0.1	4.71	4.58
3	$Na^+, NO_3^-$	1.0	5.08	8.78
4	$Pb^{2+}, NO_3^-$	0.1	9.30	4.46
5	$Hg^{2+}, NO_3^-$	0.1	-4.97	3.56
6	Cysteine	0.1	6.99	3.90
7	$Cu^{2+}, SO_4^{2-}$	0.1	-0.28	4.51
8	$Fe^{3+}, SO_4^{2-}$	0.1	-9.69	2.40
9	Glucose	0.1	0.90	5.78
10	$Sr^{2+}, NO_3^-$	0.1	-2.84	-0.85
11	$Ni^{2+}, NO_3^-$	0.1	4.63	-2.19

由表 1 可知, 表中所列的浓度范围内, 几种常见金属离子和葡萄糖等在较高的浓度下对测试体系影响较小, 这说明用新合成的咪唑啉季铵盐建立的测定 fsDNA 的方法有较好的实际应用价值.

#### 4) 线性范围和检出限

经实验测得 fsDNA 的标准曲线方程如表 2.

表 2 测定 fsDNA 的标准曲线

序号	线性范围 / (mg/L)	RLS 线性回归方程	相关系数	检出限 / (mg/L)
1	0.03 ~ 2.00	$\Delta I = 70.78 + 304.41 c$	0.991 9	0.003
2	0.01 ~ 2.00	$\Delta I = 48.06 + 236.96 c$	0.998 5	0.001

由表 2 看出, 在最佳条件下,  $M_1$  和  $M_2$  对 fsDNA 测定的线性范围分别是 0.03 ~ 2.00 mg/L 和 0.01 ~ 2.00 mg/L, 检出限分别为 0.003 和 0.001 mg/L. 这说明用这 2 种咪唑啉季铵盐来测定 fsDNA 的灵敏度较高.

#### 5) 样品和回收率的测定

根据表 1 所列共存物质对测定体系的影响特征, 合成了 3 个样品. 测定结果见表 3. 其中共存物质浓度依次为:  $NaNO_3 1.0 \times 10^{-4}$  mol/L,  $Cd(NO_3)_2 5.0 \times 10^{-6}$  mol/L,  $Pb(NO_3)_2 5.0 \times 10^{-6}$  mol/L,  $CuSO_4 1.0 \times 10^{-5}$  mol/L, Glucose  $1.0 \times 10^{-5}$  mol/L.

由表 3 可知, 回收率在 101.7% ~ 105.5%. 合成样的测定结果说明该方法可靠.

表3 合成样的测定结果( $n=3$ )

样品	共存物质	DNA 加入量/(mg/L)	DNA 回收量/(mg/L)	回收率/%	相对标准偏差/%
1	NaNO <sub>3</sub> , Cd(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> , Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	1.000	1.017	101.7	4.5
2	NaNO <sub>3</sub> , Cd(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> , CuSO <sub>4</sub>	1.000	1.050	105.0	3.8
3	NaNO <sub>3</sub> , CuSO <sub>4</sub> , Glucose	1.000	1.055	105.5	4.7

### 3 结论

以环烷酸为原料合成的2种咪唑啉季铵盐,在 Britton - Robinson 缓冲溶液中与 fsDNA 相互作用后,体系的共振光散射(RLS)强度明显增强.利用 RLS 强度增加值与 fsDNA 浓度之间呈现的线性关系,拟定了新的测定 fsDNA 的 RLS 法.该方法可靠,灵敏度高,操作简单,具有较好的实际应用价值.

#### 参考文献:

[1] 吴宇峰,周坤坪,梁劲翌.咪唑啉季铵盐水溶性缓蚀剂 NH-1 的合成及其性能研究[J].精细石油化工,2001(5):39-42.

[2] 方光荣,宋功武,李瑛.用结晶紫测定 DNA 的分光光度法[J].分析测试学报,2000,19(2):45-46.

[3] 俞英,吴霖,谭丽贤.碱性品红荧光法测定脱氧核糖核酸及其机理的研究[J].分析化学,2004,32(5):628-632.

[4] Huang C Z, Li K A, Tong S Y. determination of nucleic acids by a resonance light - scattering technique with  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  - tetrakis[4 - (trimethylammo - niumyl) phenyl] porphine[J]. Analytical Chemistry, 1996, 68(3):2259

-2263.

[5] Liu S P, Luo H Q, Li N B, et al. Resonance rayleigh scattering study of the interaction of heparin with some basic diphenyl naphthylmethane dyes [J]. Analytical Chemistry, 2001, 73(16):3907-3914.

[6] 吴会灵,李文友,何锡文.乙醇敏化钛黄与蛋白质作用的共振光散射光谱研究及其分析应用[J].化学学报,2002,60(10):1822-1827.

[7] 石顺存,张红.高纯环烷酸的制备[J].湘潭矿业学院学报,2001,16(3):47-50.

[8] 石顺存,易平贵,周秀林,等.环烷基咪唑啉衍生物多功能水处理剂的研究[J].工业水处理,2005,25(1):29-32.

[9] 石顺存,王学业,易平贵,等.咪唑啉季铵盐互变异构体稳定性的研究[J].石油学报(石油加工),2003,19(6):52-57.

[10] Shi S C, Wang X Y, Yi P Q, et al. Influence of the alkyl group of imidazoliny - quaternary - ammonium - salt on corrosion inhibition efficiency [J]. Journal of Central South University of Technology, 2006, 13(4):393-398.

[11] Martin J A, Valone F W. Spectroscopic techniques for quality assurance of oil field corrosion inhibitors [J]. Corrosion, 1985, 41(8):465-473.