

# 1,4-二氢吡啶衍生物与 CT DNA 相互作用的电化学研究

徐飞<sup>1</sup>, 李静<sup>2</sup>, 杜江燕<sup>2</sup>, 王炳祥<sup>2</sup>, 陆天虹<sup>2,3</sup>

(1. 南京中医药大学药学院, 210029, 江苏, 南京)

(2. 南京师范大学化学与环境科学学院, 210097, 江苏, 南京)

(3. 中国科学院长春应用化学研究所, 130022, 吉林, 长春)

**[摘要]** 用电化学方法研究了1,4-二氢吡啶衍生物(1,4-DHP)与小牛胸腺DNA(CT DNA)作用前后在玻碳电极上的电化学行为。结果表明,1,4-DHP在GC电极上的氧化峰电位( $E_{pa}$ )随着C-4取代基的吸电子能力增强而升高,氧化反应越来越难进行。1,4-DHP与CT DNA结合后,氧化峰电流降低和峰电位正移程度随着C-4取代基的空间位阻增大而减小。

**[关键词]** 1,4-DHP, CT-DNA, 相互作用, 电化学行为

**[中图分类号]** O646.1, **[文献标识码]** A, **[文章编号]** 1001-4616(2005)03-0056-05

## Electrochemical Studies of Interaction Between 1,4-Dihydropyridine Derivatives and CT DNA

Xu Fei<sup>1</sup>, Li Jing<sup>2</sup>, Du Jiangyan<sup>2</sup>, Wang Bingxiang<sup>2</sup>, Lu Tianhong<sup>2,3</sup>

(1. College of Pharmacy Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, 210029, Nanjing, China)

(2. School of Chemistry and Environmental Science, Nanjing Normal University, 210097, Nanjing, China)

(3. Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Sciences, 130022, Changchun, China)

**Abstract:** The electrochemical behavior of the 1,4-Dihydropyridine Derivatives(1,4-DHP) on the GC electrode was studied by cyclic voltammetry in the absence and presence of calf thymus DNA (CT DNA). The results show that the potential of the oxidation peak of 1,4-DHP ( $E_{pa}$ ) becomes more positive, and the oxidation process is more difficult with an increase in the electron-attractive ability of the substituent at the C-4 position. The oxidation peak current of 1,4-DHP is decreased and the peak position is shifted to the positive direction when bound with CT DNA, while the degree of these phenomena is decreased with the increase of the steric hindrance of the substituent at the C-4 position.

**Key words:** 1,4-DHP, CT-DNA, interaction, electrochemical behavior

## 0 引言

1,4-DHP衍生物尤其是4-芳基-1,4-DHP衍生物,是一类高效的钙离子通道拮抗剂,具有选择性抑制心肌和血管平滑肌的跨膜钙离子运转,降低心肌收缩力,扩张血管,使外周血管阻力下降等药理作用。自从硝苯地平作为第一个1,4-DHP衍生物类药物在1975年由德国Bayer公司推出上市以来,此类化合物已成为世界各国广泛使用的临床治疗高血压、冠心病等心血管疾病的首选药物<sup>[1]</sup>。1,4-DHP类药物在人体内的代谢过程是通过肝脏中的细胞色素P-450氧化成吡啶衍生物<sup>[2]</sup>,因此1,4-DHP衍生物的氧化过程引起

收稿日期: 2005-03-10.

基金项目: 江苏省教育厅自然科学基金(02KJB150006)、国家“211”工程重点学科建设资助项目。

作者简介: 徐飞,女,1980—,助教,主要从事电化学的教学与研究, E-mail: bornkilled@zlen.com

通讯联系人: 陆天虹,1943—,教授,博士生导师,主要从事物理化学的教学与研究. E-mail: lutianhong@njnu.edu.cn

了研究者的关注.近年来,已开始用电化学方法来研究这类化合物的氧化还原机理<sup>[3,4]</sup>.本文用电化学方法研究了1,4-DHP衍生物与CT DNA相互作用前后的电化学行为,以及1,4-DHP衍生物C-4取代基对相互作用的影响.

## 1 实验部分

### 1.1 试剂和仪器

CT DNA(42% GC含量,北京华美生物工程公司)使用前未经进一步提纯.溶液用25 mmol/L磷酸缓冲液(含50 mmol/L NaCl, pH=6.8)配制,浓度由紫外分光光度计标定( $\epsilon_{260}=6\,600\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ )<sup>[5]</sup>.  $A_{260}/A_{280}\approx 1.9$ ,表明CT DNA内不存在干扰测定的蛋白质<sup>[6]</sup>.溶液置于4℃冰箱保存,使用时间不超过4 d.

文中所用的1,4-DHP衍生物按文献<sup>[7]</sup>合成,所得产品熔点、IR光谱均与文献相符.由于1,4-DHP衍生物难溶于水,配制溶液时加入一定量的DMSO使其溶解,然后加入25 mmol/L磷酸缓冲液(pH=6.8)稀释至25 mL,配制成样品浓度为 $1.0\times 10^{-3}\text{ mol/L}$ 含DMSO的磷酸缓冲溶液.室温下避光保存,使用时用磷酸缓冲液稀释至所需浓度.其它试剂均为分析纯.所有溶液均用三次蒸馏水配制.

循环伏安测量用M273型恒电位仪(美国EG&G公司)和传统的三电极电化学池进行.铂丝为对电极,饱和甘汞电极(SCE)为参比电极,文中所用的电位都是相对于SCE,工作电极为GC电极.

### 1.2 实验样品结构式

图1为合成的6个C-4取代基不同的1,4-DHP衍生物结构式.

### 1.3 循环伏安实验

工作电极依次用03#砂纸、0.3和0.05  $\mu\text{m}$   $\text{Al}_2\text{O}_3$ 粉末抛光至呈镜面,在三次蒸馏水中清洗后,分别在无水乙醇及三次蒸馏水中各超声3 min.循环伏安测量在室温下进行.在测量前,通入高纯氮气5 min以除去溶液中的氧,测量过程中通氮气保护.电位扫描范围为-0.8~1.3 V,扫描速率为100 mV/s.连续扫描3次,文中给出的循环伏安曲线都是第三次扫描的曲线.

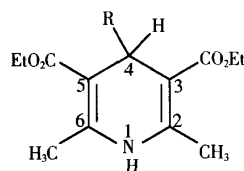


图1 1,4-DHP衍生物的结构式

R: I. H, II.  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ , III.  $p\text{-CH}_3\text{O-C}_6\text{H}_4$ , IV.  $p\text{-Cl-C}_6\text{H}_4$ ,  
V.  $m\text{-O}_2\text{N-C}_6\text{H}_4$ (尼群地平), VI.  $o\text{-O}_2\text{N-C}_6\text{H}_4$ (硝苯地平)

## 2 结果与讨论

### 2.1 1,4-DHP在GC电极上的电化学行为

图2中,曲线a为化合物VI在GC电极上的循环伏安曲线.在0.81 V处可观察到一个氧化峰,而没有观察到还原峰,说明电极反应为不可逆氧化过程.同样的实验条件下,化合物I-VI在GC电极上循环伏安曲线相似,均仅出现一个氧化峰而无还原峰.化合物I-VI的氧化峰峰电位 $E_{\text{pa}}$ 数据列于表1中.

首先,从表1数据可以看出,化合物III-VI在GC电极上的氧化峰峰电位( $E_{\text{pa}}$ )与C-4取代基R的吸电子能力有关,随着取代基的吸电子能力增强, $E_{\text{pa}}$ 升高,氧化反应越来越难进行.这是由于1,4-DHP在酸性溶液中氧化反应符合ECE机理<sup>[3]</sup>,如图3所示.化合物I被氧化过程中,先失去一个电子形成正离子自由基中间体,该中间体随后发生脱氢的化学反应生成自由基,该自由基

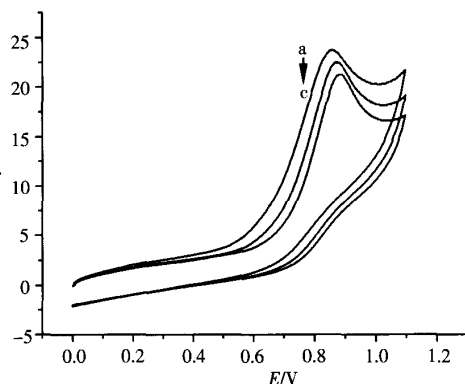






图2 含(a)0 (b)  $7.6\times 10^{-4}$  (c)  $1.52\times 10^{-3}$  mol/L CT DNA的  $5.0\times 10^{-4}$  mol/L 化合物VI在GC电极上的循环伏安曲线

被氧化且不稳定,最终再失去一个电子形成相应的吡啶衍生物.由于反应(1)是速率决定步骤,C-4上吸电子取代基减少了二氢吡啶环上的电子云密度,使反应(1)的失电子过程难于进行,因此,峰电位随取代基

吸电子能力增强而升高.

其次,从表 1 可见,C-4 上 H 取代的化合物 I 氧化峰峰电位最低. 由于化合物 I 分子体积较小而使分子的共平面性较好,空间位阻较小,所以最容易被氧化. 因此,取代基空间位阻大小也影响  $E_{Pa}$ .

表 1 化合物 I-VI 与 DNA 作用前后的氧化峰峰电位  $E_{Pa}$

化合物	R	<sup>a</sup> $E_{Pa}/V$	<sup>b</sup> $E_{Pa}/V$	<sup>c</sup> $\Delta E_{Pa}/V$
I	-H	0.48	0.59	0.11
II	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	0.58	0.65	0.07
III		0.71	0.74	0.03
IV		0.72	0.76	0.04
V		0.73	0.77	0.04
VI		0.81	0.86	0.05

a: 1,4-DHP 衍生物的  $E_{Pa}$ ; b: 加入 DNA ( $7.6 \times 10^{-4}$  mol/L) 后 1,4-DHP 衍生物  $E_{Pa}$ ,

c: 加入 DNA 前后 1,4-DHP 衍生物的  $E_{Pa}$  之差.

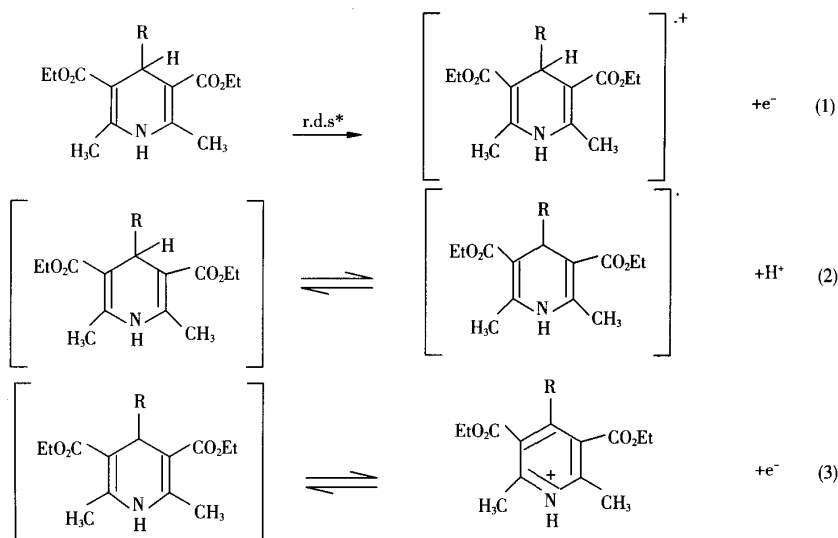


图 3 1,4-DHP 衍生物氧化反应机理

\* rate determining step

## 2.2 加入 DNA 后 1,4-DHP 在 GC 电极上的电化学生行为

在化合物 VI 溶液中加入  $7.6 \times 10^{-4}$  mol/L CT DNA 后,在电位扫描范围内未出现新峰,但氧化峰峰电流降低(图 2,曲线 b),峰电位从 0.81 V 正移至 0.86 V. 随着溶液中加入 CT DNA 浓度增加,峰电流及峰电位均进一步降低、正移(图 2,曲线 c),说明化合物 VI 与 CT DNA 之间存在相互作用. 其它几个化合物与 CT-DNA 作用后的循环伏安图基本与化合物 VI 的变化情况相同,即在扫描电位范围内均未出现新峰,原有

的氧化峰电流都出现减小,峰电位存在不同程度的正移. 化合物 I-VI 与 DNA 作用前后的氧化峰峰电位  $E_{pa}$  数据列于表 1 中.

按照 Bard 等对化合物与 DNA 的相互作用的电化学研究结果<sup>[8]</sup>, 化合物与 DNA 发生的嵌插结合会使化合物的氧化还原式电位正移. 依据表 1 中氧化峰电位的正移程度, 上述化合物与 CT-DNA 嵌插结合作用强度依次为:

化合物 I > 化合物 II > 化合物 III  $\approx$  化合物 IV  $\approx$  化合物 V  $\approx$  化合物 VI.

根据文献报道<sup>[9]</sup>, C-4 未取代的 1,4-DHP 是平面结构, 而当 1,4-DHP 环的 C-4 上一个氢被苯基取代后, 二氢吡啶环为信封式结构, C-4 上苯取代基位于 1,4-DHP 环平面外侧, 基本垂直于 1,4-DHP 环平面. 因此由于化合物 I 具有平面结构, 使其更容易嵌插到 CT DNA 双螺旋结构中, 与 CT-DNA 结合方式主要表现为嵌插作用, 所以与 CT-DNA 作用后峰电位正移程度最大. 化合物 II 由于取代基空间位阻小, 为近似平面结构, 与 CT-DNA 的嵌插作用也较强. 化合物 III、IV、V、VI 由于结构的非平面性, 不能完全嵌插到 DNA 的碱基对中, 只能以部分嵌插方式与 CT-DNA 作用, 与 CT-DNA 作用后峰电位正移程度相对较小.

### 2.3 电子转移系数和标准速率常数

按照 Laviron 理论<sup>[10]</sup>, 对于不可逆吸附的电化学反应, 峰电位应遵循:

$$E_p = E^0 - RT/(1-\beta)nF \ln[RTk_s/(1-\beta)nF] + RT/(1-\beta)nF \ln v \quad (1)$$

式中,  $\beta$  为电子传递系数,  $k_s$  为反应的标准速率常数,  $E^0$  为式电位. 图 4 是溶液中不含 CT-DNA 时, 化合物 III 的  $E_p$  对  $\ln v$  关系曲线, 由直线的斜率计算得到  $\beta_f \approx 0.085$ . 在低扫速下,  $E_p$  与  $v$  成线性关系, 将  $E_p$  与  $v$  作图并延长至  $v=0$ , 从直线的截距可求得  $E^0$ . 图 5 是溶液中不含 CT-DNA 时, 化合物 III 的  $E_p$  与  $v$  的关系曲线, 从直线的截距求得  $E^0 = 0.64$  V. 在已知  $\beta$  和  $E^0$  的基础上, 从  $E_p$  对  $\ln v$  作图(图 4)所得的直线的截距计算求得  $k_s = 2.49$  s<sup>-1</sup>.

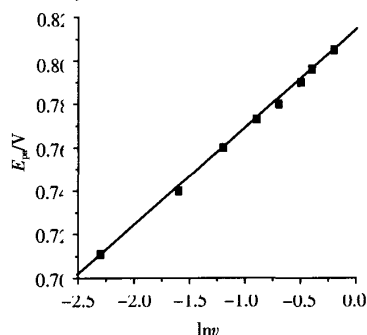


图 4 由 GC 电极在  $5.0 \times 10^{-4}$  mol/L 化合物 III + 50 mmol/L NaCl + 25 mmol/L 磷酸缓冲液中的循环伏安曲线得到的  $E_p$  对  $\ln v$  关系曲线

(扫速范围: 0.1~0.8 V/s)

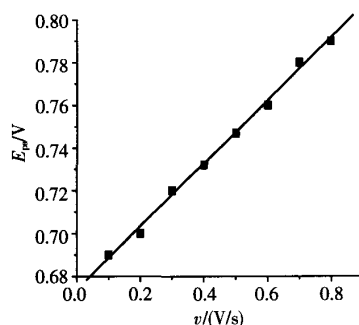


图 5 由 GC 电极在  $5.0 \times 10^{-4}$  mol/L 化合物 III + 50 mmol/L NaCl + 25 mmol/L 磷酸缓冲液中的循环伏安曲线得到的  $E_p$  对  $v$  关系曲线

(扫速范围: 0.1~0.8 V/s)

当溶液中加入 CT DNA 后, 同样的计算方法可得到化合物 III 与 DNA 结合后的  $\beta_b = 0.06$ ,  $E^0 = 0.69$  V,  $k_s = 2.21$  s<sup>-1</sup>.

对于化合物 I-VI, 将计算所得的  $E^0$ 、 $k_s$  及  $\beta$  列于表 2 中.

表 2 化合物 I-VI 加入 CT DNA 前后  $E^0$ 、 $k_s$  及  $\beta$  值

化合物	未加入 CT DNA			加入 CT DNA		
	$E^0$ /V	$k_s$ /s <sup>-1</sup>	$\beta_f$	$E^0$ /V	$k_s$ /s <sup>-1</sup>	$\beta_b$
I	0.53	4.17	0.065	0.55	3.56	0.06
II	0.61	3.24	0.08	0.63	3.19	0.055
III	0.64	2.49	0.085	0.69	2.21	0.06
IV	0.67	2.06	0.15	0.70	2.01	0.08
V	0.71	1.99	0.10	0.76	1.95	0.07
VI	0.77	1.55	0.12	0.79	1.50	0.09

测定结果表明, 体系中加入 CT DNA 后, 化合物 I-VI 的电化学性质发生了变化, 导致  $E^0$  升高, 而  $k_s$ 、 $\beta$  万方数据

减小. 这是由于 1,4-DHP 与 CT-DNA 结合后,形成的加合物扩散系数减小,使电子转移系数 $\beta$ 和标准速率常数 $k_s$ 降低,从而使其在电极上的氧化过程受阻,导致其氧化峰电位升高,氧化峰电流减小.

### 3 结论

本文通过对 6 种 C-4 取代基不同的 1,4-DHP 衍生物与 CT-DNA 相互作用的研究,讨论了 C-4 取代基吸电子能力及空间位阻对 1,4-DHP 与 CT-DNA 作用前后电化学性质的影响. 化合物 I-VI 在 GC 电极上具有相似的电化学行为,电化学过程为两电子的不可逆氧化过程. 氧化峰电位与 C-4 位取代基吸电子能力有关,C-4 位取代基吸电子能力越强,氧化峰电位越高,氧化反应越不易进行. 与 CT-DNA 作用时,化合物 I-VI 均出现氧化峰电流减小及峰电位正移,正移的程度随 C-4 位取代基空间位阻增大而减少.

### [参考文献]

- [1] Sambongi Y, Nitta H, Ichihashi K, *et al.* A novel water-soluble hantzsch 1,4-dihydropyridine compound that functions in biological processes through NADH regeneration[J]. *J Org Chem*, 2002, 67(5):3499—3501.
- [2] Bossert F, Meyer H, Wehinger E. A new class of highly active calcium antagonists[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 1981, 20(11):762—766.
- [3] Arguello J, Núñez-Vergara L J, Sturm J C, *et al.* Voltammetric oxidation of Hantzsch 1,4-dihydropyridines in protic media: substituent effect on positions 3,4,5 of the heterocyclic ring[J]. *Electrochimica Acta*, 2004, 49(7):4849—4856.
- [4] 张立新,王炳祥,朱世民,等. 1,4-二氢吡啶及其衍生物电化学反应机理研究[J]. *高等学校化学学报*,1997,18(11):1779—1782.
- [5] Kumar C V, Asuncion E H. DNA binding studies and site selective fluorescence sensitization of an anthryl probe[J]. *J Am Chem Soc*, 1993, 115(2):8547—855.
- [6] Zhao G C, Zhu J J, Zhang J J, *et al.* Voltammetric studies of the interaction of methylene blue with DNA by means of  $\beta$ -cyclodextrin[J]. *Analytica Chimica Acta*, 1999, 394(7):337—344.
- [7] Hinkel L E, Cremer H W. The condensation of ethyl acetoacetate P-dimethylamino benzaldehyde[J]. *J Chem Soc*, 1920, 117(8):137—142.
- [8] Rodriguez M, Bard A J. Electrochemical studies of the interaction of metal chelates with DNA 4. voltammetric and electro-generated chemiluminescent studies of the interaction of tris (2,2'-bipyridine) osmium (II) with DNA[J]. *J Anal Chem*, 1990, 62(3):2658—2662.
- [9] 赵炳筠,朱晓晴,何家骥. 1,4-二氢 Hantzsch 吡啶衍生物的合成及其 $^1\text{H}$  NMR 和荧光光谱研究[J]. *高等学校化学学报*,1999,20(11):1733—1737.
- [10] Laviron E. General Expression of the linear potential sweep Voltammogram in the case of diffusionless electrochemical systems[J]. *J Electroanal Chem*,1979,101(4):19—28.

[责任编辑:孙德泉]