

摘要

由于锌离子在生命过程中起着许多重要作用，分析和检测细胞中的锌离子成为近年来的研究热点。但普通的分析方法，如紫外-可见光谱、核磁共振光谱、电子顺磁共振光谱等都不能用于检测这种生物体系中特殊的金属离子。荧光分子探针检测法不仅简便，而且灵敏度、选择性、时间分辨、实时原位检测方面均有突出优点。因此，应用荧光探针体系在一个比较宽的浓度范围内定量检测和反映 Zn^{2+} 的流量和水平，对进一步了解 Zn^{2+} 在生物体系内的作用具有重要意义。

基于碳酸酐酶 (CA) - 芳香碘酰胺抑制剂相互作用的原理，设计合成了 3 个化合物 **D1**、**D2** 和 **D3**。其中，在生理条件下 (pH 7.4)，**D2** 与 Zn^{2+} 结合后， λ_{em} 从 540nm 蓝移到 520nm，荧光强度增大近 4 倍。表观解离常数 (K_d) 在纳摩尔范围内，在生物应用中具有足够的敏感性。另外，多种生物体中重要的金属离子（如 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} ）等对 **D2** 的荧光没有影响。

基于 PET 原理，设计合成了以 4-氨基-1, 8-萘酰亚胺为荧光团的化合物 **N1**、**N2** 和 **N3**。在 tris-HCl 中性缓冲溶液中，**N2** 的最大吸收和发射波长都在可见光区，加入 Zn^{2+} 后，荧光强度增大 5 倍， K_d 为 0.8nM，活细胞中的显微成像表明，**N2** 能够很好地进入细胞中并对 Zn^{2+} 表现出荧光增强。

设计合成了三个以酰胺 N 原子为反应位点的 1, 8-萘酰亚胺化合物 **N4**、**N5** 和 **N6**。水溶液中 pH 7.4 时，**N4** 和 **N5** 的荧光量子产率均为 0.004，加入饱和 Zn^{2+} 后， Φ 分别增大 43 和 23 倍；pH 5 时，加入 Zn^{2+} 后， Φ 分别增大 30 和 10 倍。这样，**N4** 和 **N5** 相对 H^+ ，对 Zn^{2+} 表现出良好的选择性荧光增强。理论计算表明，分子内氢键可抑制 H^+ 对荧光强度的影响，这为 PET 探针克服 H^+ 的影响提供了一个全新的思路。

基于 PET 原理，设计合成了 1,3,5,7-四甲基-8-苯基化硼为荧光基团、DPA 为识别基团的 Zn^{2+} 荧光分子探针 **B1**。中间体 **2** 分子模型的二吡咯甲基硼是平面结构，而 **B1** 的这部分结构表现弯曲的构型。加入 Zn^{2+} 前后的荧光量子产率增大 11 倍，达到 0.857。 $pK'a$ 低至 2.1，是目前发现 $pK'a$ 最低的 Zn^{2+} 荧光探针。**B1-Zn²⁺** 络合物的荧光强度在 pH 宽达 3-10 范围内不受 H^+ 的影响。活细胞内荧光显微成像表明该探针能够穿透细胞并反映细胞内 Zn^{2+} 的分布状况。

关键词： 荧光，荧光分子探针，光诱导电子转移， Zn^{2+} ，二（2-吡啶甲基）胺，氢质子

Abstract

Analysis and detection of Zn^{2+} in cells is very significant as it has multiple and important roles in living process. But many normal analysis techniques, for examples, UV-Vis spectrum, NMR and EPR cannot be used to detect the special metal ions in living things. The fluorescence method is not only simple but also excellent in real space, real time, high sensitivity and selectivity. There is important significance to understand the multiple roles of zinc with availability of fluorescent probe systems permitting quantitative determination and imaging of zinc fluxes and levels over a broad concentration range.

Based on carbonic anhydrase (CA)-sulfonamide inhibition, three fluorescent probes **D1**, **D2** and **D3** were designed and synthesized. Under physiological conditions, the emission maximum wavelength of **D2** was blue shifted from 540nm to 520nm upon addition of Zn^{2+} , and the fluorescence intensity enhanced nearly 4-fold. The apparent dissociation constant (K_d) is in the sub-nM range, and its fluorescence was not induced by other biologically important cations such as Ca^{2+} and Mg^{2+} under physiological conditions.

Three compounds **N1**, **N2** and **N3** based on 4-amino-1,8-Naphthalimide were designed and synthesized. In tris-HCl neutral buffers, both the absorption and emission maximum wavelength of **N2** are in the visible range. Upon addition Zn^{2+} , the fluorescence enhancement is 5-fold and K_d is 0.8nM. Using fluorescence microscopy, the probe is shown to be capable of imaging intracellular Zn^{2+} changes.

A series of fluorescent probes **N4**, **N5** and **N6** based on PET were designed and synthesized with imide as reaction position of 1,8-Naphthalimide. In pH 7.4 aqueous solution, both quantum yields of **N4** and **N5** are 0.004. Upon addition of saturating Zn^{2+} , the quantum yields increased 43 and 23-fold, respectively. At pH 5, they are 30 and 10-fold, respectively. So, compared to H^+ , the fluorescence intensity can be enhanced selectively by Zn^{2+} . Theoretical calculations show that intramolecular hydrogen bonding can inhibit the fluorescence intensity, which provides a new idea to avoid the affects of H^+ for PET fluorescent probes.

A PET fluorescence probe **B1** for Zn^{2+} that utilizes 1,3,5,7-tetramethyl-8-phenyl-boron dipyrromethene as a reporting group and di(2-picoly)amine as a chelater for Zn^{2+} was synthesized and characterized.

Molecular model of intermediate **2** gives a planar conformation of the boron dipyrromethene moiety, while that of **B1** exhibits a curved conformation. Upon addition of saturating Zn^{2+} , the quantum yield of **B1** increased 11-fold, and up to 0.857. With pK'_a of 2.1, up to now, **B1** has the lowest pK'_a in all the Zn^{2+} probes. The fluorescence intensity of **B1-Zn²⁺** complex is pH-independent in the range of pH 3-10. Using fluorescence microscopy, the probe is shown to be capable of penetrating into living cells and imaging intracellular Zn^{2+} distribution.

Keywords: fluorescence, fluorescent probes, photoinduced electron transfer (PET), Zn^{2+} , bis(2-picolyl)amine, proton

独创性说明

作者郑重声明：本博士学位论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写的研究成果，也不包含为获得大连理工大学或其他单位的学位或证书所使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的贡献均已在论文中做了明确的说明并表示了谢意。

作者签名: _____ 日期: _____

第一章 前言

1.1 概述

化学、生物学和材料科学中至关重要的识别事件往往发生在一个为人们所不熟知的微观世界里。但这些识别事件的信号可以通过建立具有特殊目的的分子器件以光的形式表达出来。所以，人们设计、合成了大量能够将分子识别事件通过分子的荧光信号来有效表达的复杂荧光分子，这些分子也就是所谓的荧光分子探针^[1]。

荧光分子探针 (fluorescent molecular probe)、荧光分子开关 (fluorescent molecular switch) 和荧光分子传感器 (fluorescent molecular sensor) 是在荧光分子识别 (fluorescent molecular recognition) 中经常使用的概念。荧光分子探针是其中内涵最广的一个概念，一般说来，凡是在一定体系内，当某种物质或体系的某一物理性质发生变化时，该分子的荧光信号能发生相应的改变，这种分子就可称为某一物质或物理性质的荧光分子探针；荧光分子开关是指在识别过程中荧光信号有明显强弱变化的荧光分子探针；荧光分子传感器是指在识别过程中分子荧光信号能够快速、可逆响应的荧光分子探针。所谓分子识别是指分子之间（主体与客体或称之为受体与底物）选择性地结合并产生某种特定功能的过程。单纯的结合不是识别，识别是有目标的结合，它是通过一系列结构确定的分子间相互作用而组成的模式识别过程。结合形成的识别体系的稳定性和选择性，是由形成过程中的能量和信息量来表征的^[2,3]。

荧光分子探针的设计在分析化学、临床生物化学、医学以及环境科学等众多学科中都占有重要的地位。很多化学和生物化学领域的被分析物都可以用荧光方法测得，如阳离子(H^+ 、 Li^+ 、 Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Al^{3+} 和 Cd^{2+} 等)，阴离子（卤离子、柠檬酸根、羧酸根、磷酸根和 ATP 等），中性分子（糖类）和气体（ O_2 、 CO_2 和 NO 等）^[4]。本论文主要研究的是阳离子（过渡金属离子 Zn^{2+} 、重金属离子以及氢离子）的荧光探针，所以本章主要介绍荧光分子探针的作用原理以及近年来报道的过渡金属、重金属和 Zn^{2+}

荧光分子探针取得的最新进展。

K. Rurack 对已有的过渡金属及重金属离子络合促进的荧光发射探针的原理进行了如下描述^[5]：在过去的几年中，利用荧光分子传感器，实时、原位分析过渡金属和重金属离子的研究受到了广泛的关注。由于这类金属离子多数都对有机染料分子的荧光具有内在的猝灭作用，最近的许多研究多致力于设计具有金属络合诱导荧光增强的探针分子。这种探针在增强选择性和敏感性方面被寄予厚望。然而，到目前为止，虽然在这个研究领域中利用了多种多样的光物理和光化学机理以及传感器分子的化学结构，但很少有关于建立理性分子探针设计基本观念的尝试。E. Kimura 认为理想的传感器分子应具有以下特征：荧光探针分子自身稳定，对某种金属离子高选择性、高敏感性、快速可逆响应（实时）、微米水平上原位响应并易于操作^[6,7]。荧光分子探针的主要应用领域是生物、医学和环境监测，所以在水溶液中的识别更具有潜在的广泛应用价值。另外，许多探针分子的荧光性质会受质子的影响，在水溶液中可通过缓冲溶液控制稳定的 pH 值，使识别研究的结果更可靠。但由于水分子对金属离子较强的水合作用以及水分子和探针分子识别基团较强结合能力，使水溶液中的金属离子识别比有机溶剂中具有更大的难度^[8]。

综上所述，通常评价荧光分子探针的性能应主要考虑其灵敏性、选择性、实时性和原位检测性能等四方面因素。其中，影响灵敏性的因素有许多：首先，探针分子与被检测物的结合强度是识别灵敏性的前提；其次，识别信息的荧光信号转换效率同样影响识别灵敏性，荧光增强的探针一般会比荧光猝灭的探针灵敏性高；另外，荧光团的发射波长、量子产率、斯托克斯位移、背景荧光干扰等也会影响探针的检测灵敏性；灵敏性还与仪器性能有关。而选择性则主要取决于探针与被检测物特异性的结合；有时某些被结合的客体可直接影响荧光团的发射性能，这种情况下识别选择性还与被结合的客体性质有关；专一选择性是最好的。实时性主要包括识别响应的速度和可逆性两方面，如果可逆响应的速度快于或与被检测客体的变化速度相匹配，则可称之为实时响应探针；原位检测性能主要取决于探针分子与被检测体系的相溶性，探针能以独立的分子状态分散于被检测体系并发出识别信号；从目前的

实际情况来看，水溶性探针比非水溶性探针好；在一定限度内，荧光探针检测的空间分辨率取决于仪器^[9]。

1.2 荧光分子探针识别原理

1.2.1 光诱导电子转移^[1,10,11] (PET, photoinduced electron transfer)

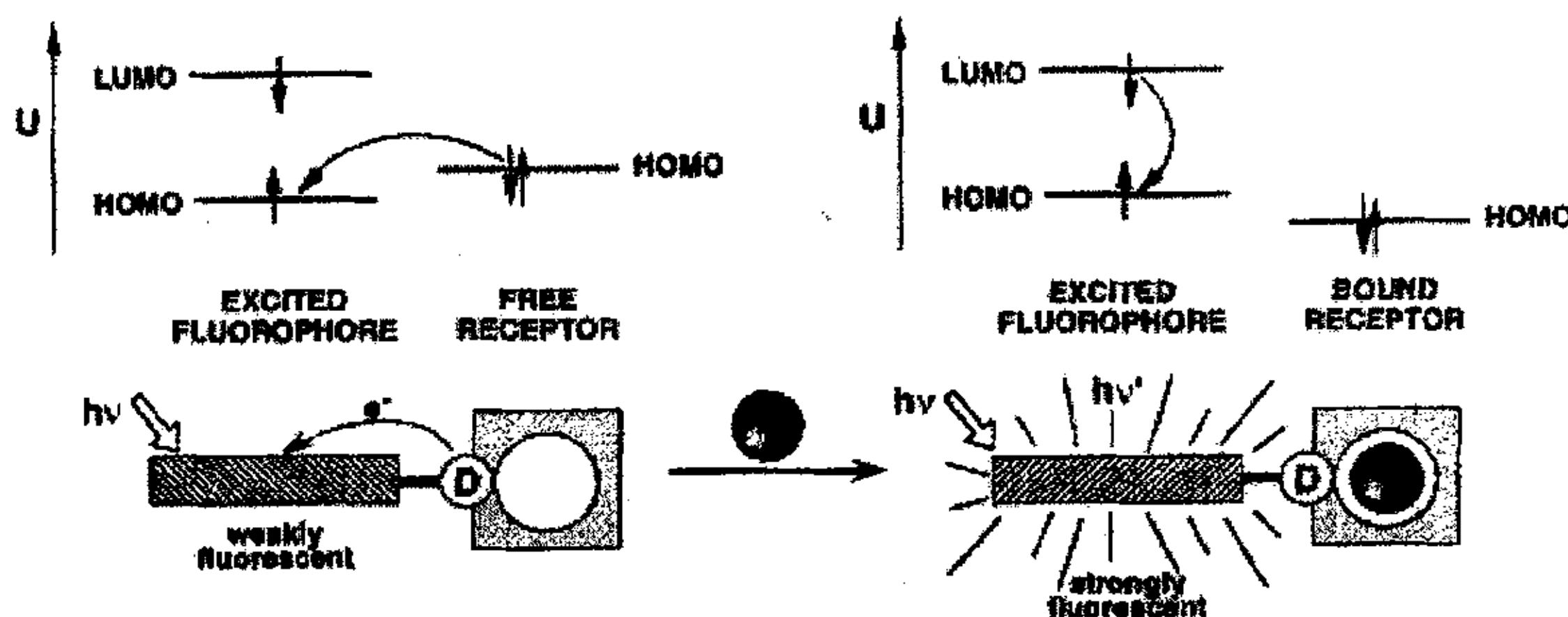


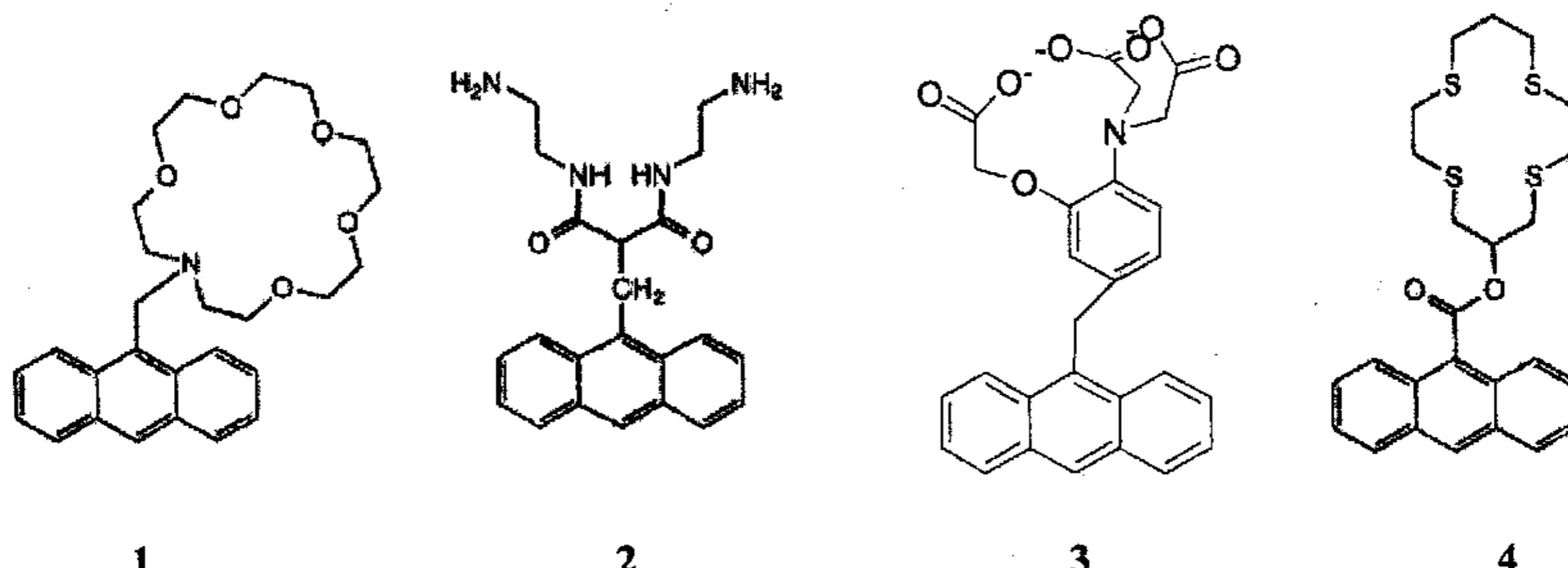
图 1-1 PET 荧光分子探针识别金属离子的理论示意图

Figure 1-1 Principle of cation recognition by fluorescent PET sensors

在各种阳离子荧光分子探针中以 PET 为设计原理的荧光分子探针是人们最为广泛研究的。如图 1-1 所示，典型的 PET 体系是由包含电子给体的受体部分 Receptor，通过间隔基 Spacer (如-CH₂-CH₂-) 和荧光团 Fluorophore 相连而构成的。其中荧光团部分是光能吸收和荧光发射的场所，受体部分则结合客体，这两部分被间隔基隔开，又靠间隔基相连而成一个分子，构成了一个在选择性识别客体的同时又给出光信号变化的分子体系。PET 荧光分子探针中，荧光团与受体单元之间存在着光诱导电子转移，对荧光有非常强的淬灭作用。因此在未结合客体之前，探针分子不发射荧光或荧光很弱。一旦受体与客体相结合，光诱导电子转移作用受到抑制，甚至被完全阻断，荧光团就会发射荧光。由于与客体结合前后的荧光强度差别很大，呈明显的“关”、“开”状态，这类探针又被称作荧光分子开关。PET 分子探针设计原理明确，特别是对于碱金属、碱土金属和氢离子，通常都可获得荧光增强效果。PET 荧光

分子探针的作用机制可由前线轨道能量来说明(图 1-1), 具体工作过程如下: 激发荧光团, 具有电子给予能力的识别基团能够将其处于最高能级的电子转入激发态荧光团因电子激发而空出的电子轨道, 使被光激发的电子无法直接跃迁回原基态轨道, 导致荧光团荧光淬灭。识别基团结合金属离子后, 其氧化还原电位升高致使相应的最高能级能量低于荧光团, 也就降低了识别基团的给电子能力, PET 过程被减弱或不能发生, 荧光团的荧光恢复。

很多研究小组包括 Czarnik^[12,13], Fabbrizzi^[14-16], Tsien^[17,18], Kuhn^[19], Desvergne 和 Bouas-Laurent^[20,21], Shinkai^[22,23]以及 de Silva^[1,24-26]等对 PET 荧光探针的研究都作出了贡献。已报道的 PET 荧光开关分子中, 多数是以脂肪氨或氮杂冠醚作为受体单元。式 1-1 中所示的四个分子都是以蒽作为荧光母体, 亚甲基或酰胺键作为间隔基连接不同的受体所构成的 PET 荧光分子探针。**1** 在甲醇中和 K^+ 络合后, 荧光量子产率从 0.003 增加至 0.14^[27]。**化合物 2** 能和 Cu^{2+} 及 Ni^{2+} 络合, 并把它们从二价氧化到三价, 蕤荧光的淬灭是由于一个电子从还原态的二价金属转移到蒽上^[28]。**de Silva** 利用类似 EDTA 结构的氨基羧酸基设计的化合物 **3**^[29] 是一种螯合型的 PET 探针分子, 识别基羧酸基团形成的空穴可以有效地螯合碱土金属 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 。



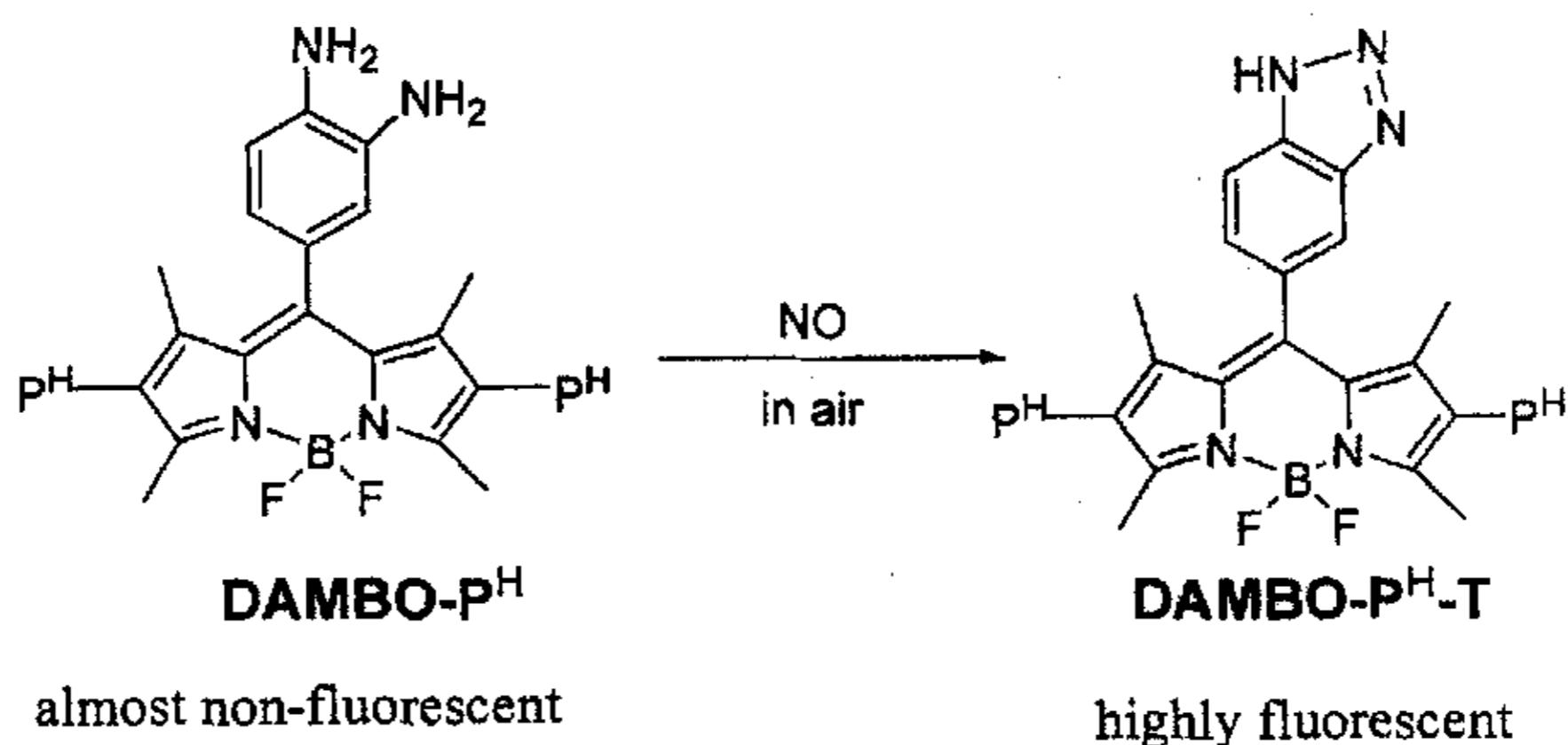
式 1-1 PET 荧光探针

Scheme 1-1 Four PET fluorescent probes

大多数 PET 荧光探针分子的设计是基于受体与客体的结合, 使光诱导电

子转移受到抑制，荧光团荧光恢复的原理设计的（图 1-1）（“off-on”开关），但对于过渡金属，其它的 PET 机理也可能起作用。由于过渡金属离子的 3d 电子的氧化还原行为，可以发生从荧光团到键合的过渡金属的电子转移，或者从过渡金属向荧光团的电子转移，因此可以通过无辐射能量转移导致荧光淬灭。化合物 4^[30]的受体为硫杂冠醚。虽然硫杂冠醚与 Cu^{2+} 之间有很强的亲和能力，该分子的设计也是基于 PET 过程，但不同的是，与 Cu^{2+} 配位后，产生了从荧光团到金属离子的 PET 过程，导致荧光淬灭。这也是 de Silva 所介绍的 PET 过程的另一种表现形式，“on-off”开关。值得注意的是，4 与 2 在和 Cu^{2+} 络合后，都是发生荧光淬灭，它们淬灭的机理就是上述所描述的两种反 PET 行为。

PET 探针不仅可以识别阳离子, 也越来越多地用来识别中性分子。Nagano 等设计了识别单线态氧及 NO 的 PET 荧光分子探针。DAMBO- P^H ^[31] 荧光量子产率是 0.002, 这是由于光激发后, 电子从氨基转移到吡咯环, 荧光猝灭。当 DAMBO- P^H 和 NO 反应后, 光诱导电子转移不能发生, 荧光恢复, DAMBO- P^H -T 的荧光量子产率达到 0.74。



式 1-2 识别 NO 的 PET 荧光探针

Scheme 1-2 PET fluorescent probe for NO

1.2.2 分子内共轭电荷转移^[1,10,11] (ICT, intramolecular charge transfer)

文献中将这一原理也称为光诱导电荷转移 (PCT photoinduced charge transfer)。典型的 ICT 荧光分子探针是由荧光团与识别基团直接相连构成。在荧光团的两边分别连有吸电子基团 (电子受体) 与供电子基团 (电子给体)，并且供电子基或吸电子基本身又充当识别基团或识别基团的一部分。当荧光团被光激发后，会进一步增加分子内从电子给体到电子受体的电荷转移。当识别基团与客体结合后，会对荧光团的推-拉电子体系产生影响 (增强或减弱电荷转移)。随之发生的荧光团偶极距的变化，会导致荧光光谱的变化，主要表现为荧光光谱红移或蓝移 (如图 1-2 所示)。一般情况下，ICT 荧光分子探针对荧光强度的影响不如 PET 探针那么显著。

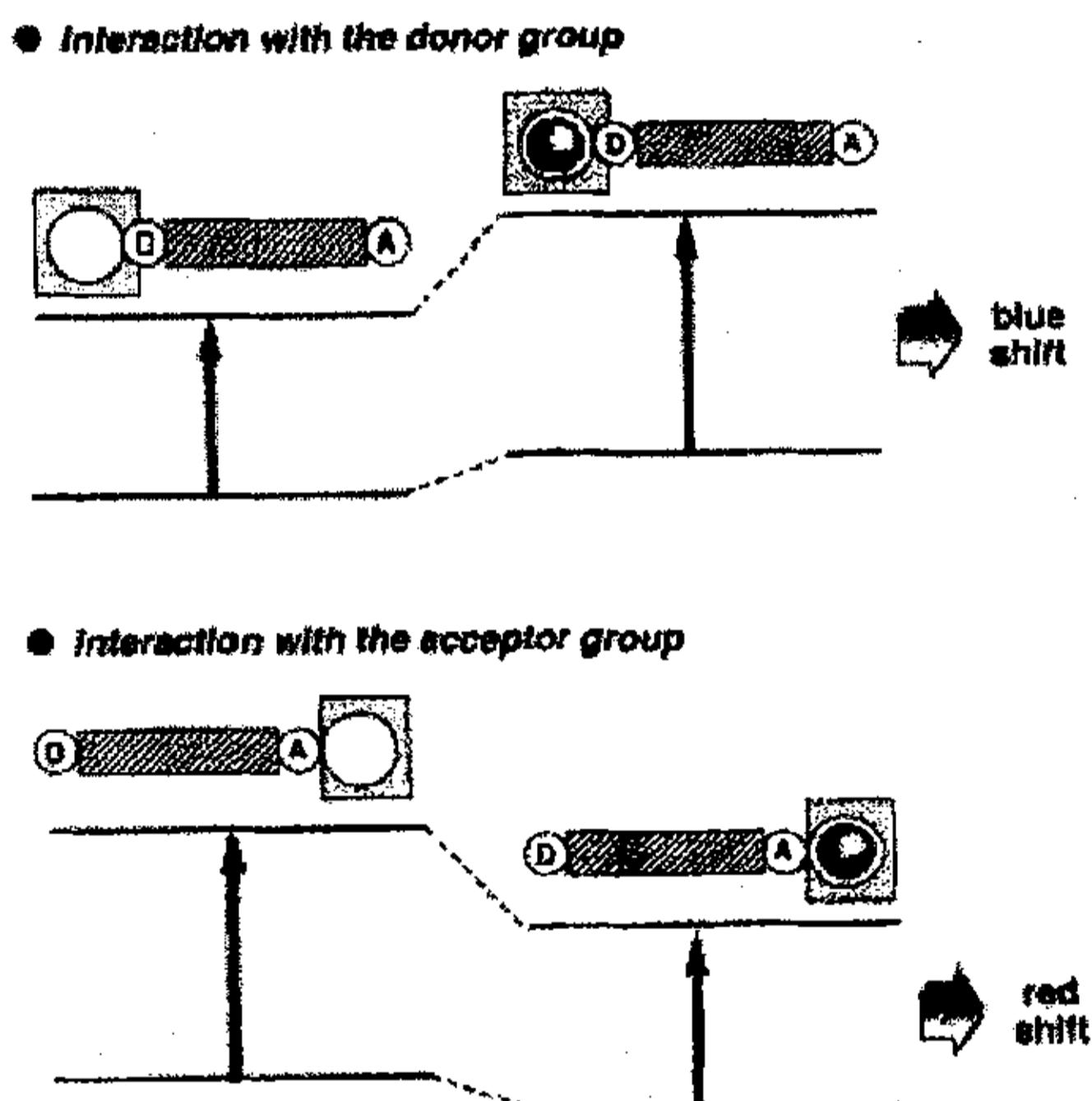
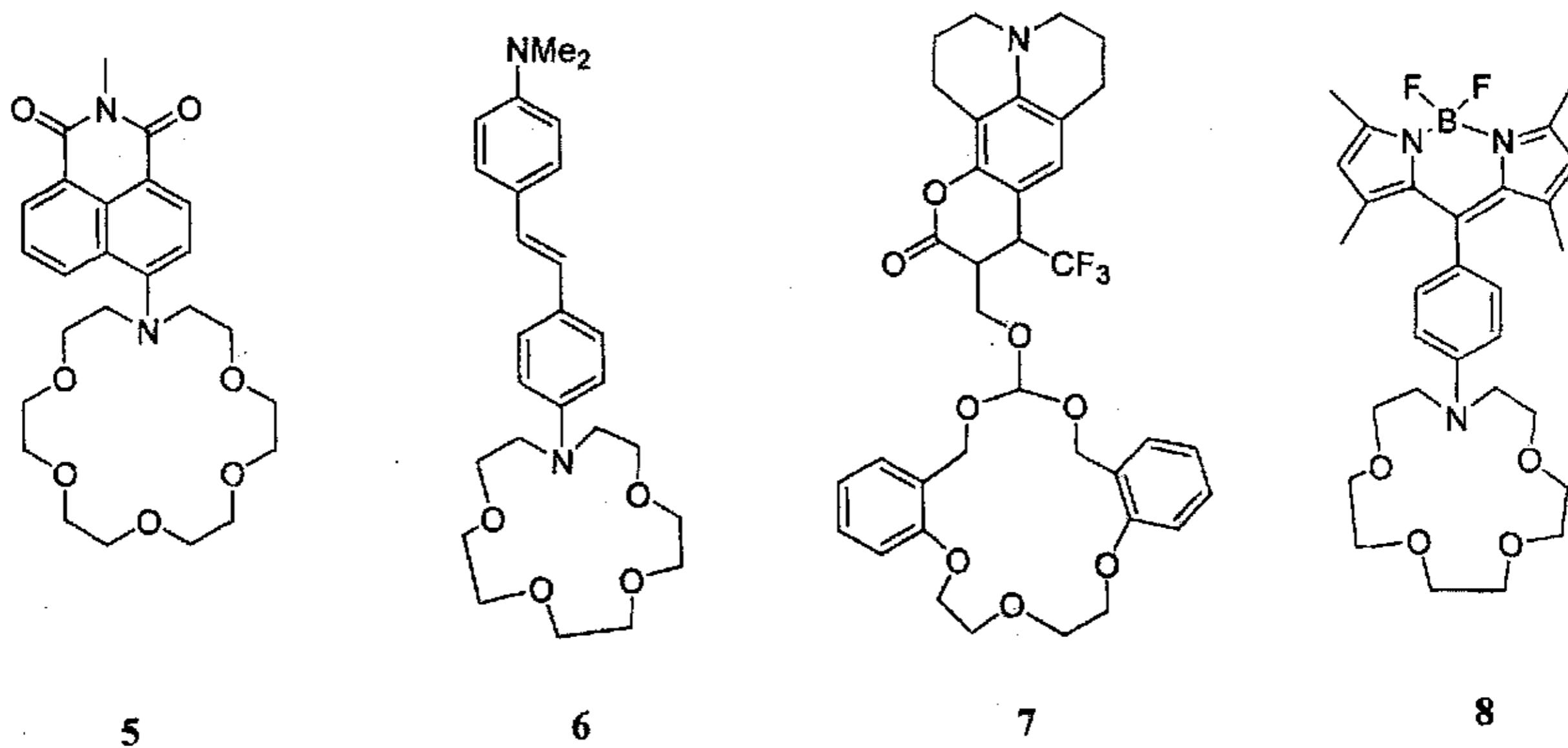


图 1-2 ICT 荧光分子探针在金属离子与其电子给体或电子受体结合作用后荧光光谱移动方向

Figure 1-2 Spectral displacements of PCT sensors resulting from interaction of a bound cation with an electron-donating or electron-withdrawing group.

5是典型的 ICT 荧光探针^[32]，氮杂冠醚既是推拉电子体系中的电子给体，又是探针分子中的识别基团。当冠醚与碱土金属离子如 Ca^{2+} 络合时，由于金属离子的拉电子效应，降低了氮杂冠醚中氮原子的供电子能力，因此发生荧光蓝移，并且荧光增强。识别基团是电子受体的 ICT 荧光探针如化合物 6^[33]，分子中二甲氨基与氮杂冠醚均为电子给体。当冠醚与碱土金属 Ca^{2+} 结合后，冠醚的拉电子能力增强，使整个体系成推-拉电子体系，因此荧光发生红移。化合物 7^[11]中的苯并冠醚与香豆素之间有氧桥相连，在乙腈中与 Ca^{2+} 结合后吸收光谱显著红移，荧光略有下降。这种现象可解释为由于桥基的长度，使结合后的金属离子有可能以一种更接近于羧基氧的构型存在，促进了荧光团向苯并冠醚的电荷转移。多数 ICT 荧光分子探针在结合金属离子后，荧光强度的变化不如 PET 探针分子明显，但 8^[34]是一个特例，它与 Li^+ 络合后荧光强度增大 90 倍，而与 Mg^{2+} 络合后荧光强度增大 2250 倍。

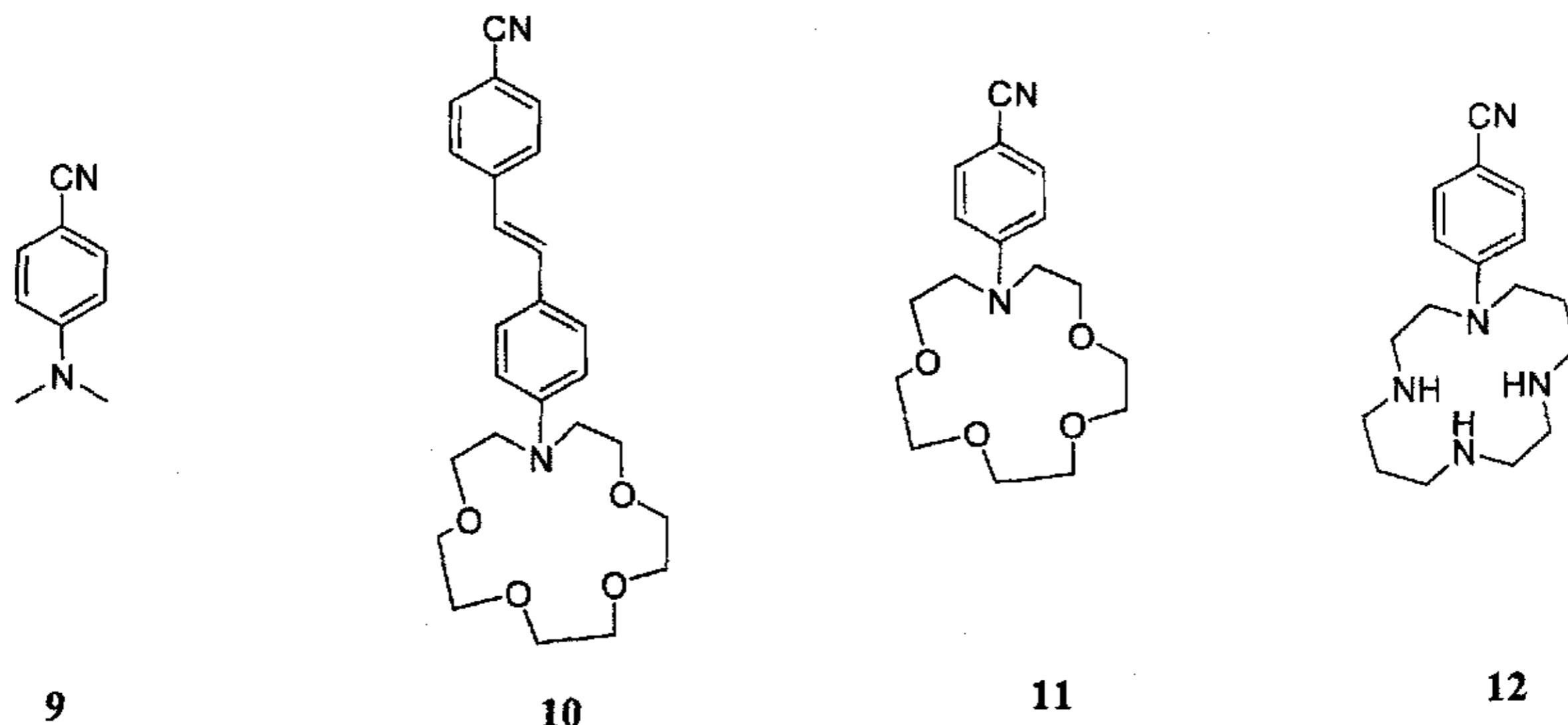


式 1-3 ICT 荧光探针

Scheme 1-3 ICT fluorescent probes

在 ICT 中，有一种情况被称为扭曲的分子内电荷转移 (TICT, twisted intramolecular charge transfer)。具有推-拉电子共轭体系的荧光分子中，如果推电子基（如二甲亚胺）通过可旋转的单键与荧光团相连，当荧光团被光激发时，由于强烈的分子内光诱导电荷转移，连接电子给体与荧光团的单键会

发生扭转，使原来与芳环共平面的电子给体与芳环平面处于正交状态，原来的共轭体系被破坏，部分电荷转移变为完全的电子转移，形成 TICT 激发态，原有的 ICT 荧光则被淬灭。TICT 态往往无荧光或者发射非常弱的长波长荧光，少数情况下出现 ICT 与 TICT 双重荧光现象^[35,36]。



式 1-4 TICT 荧光探针

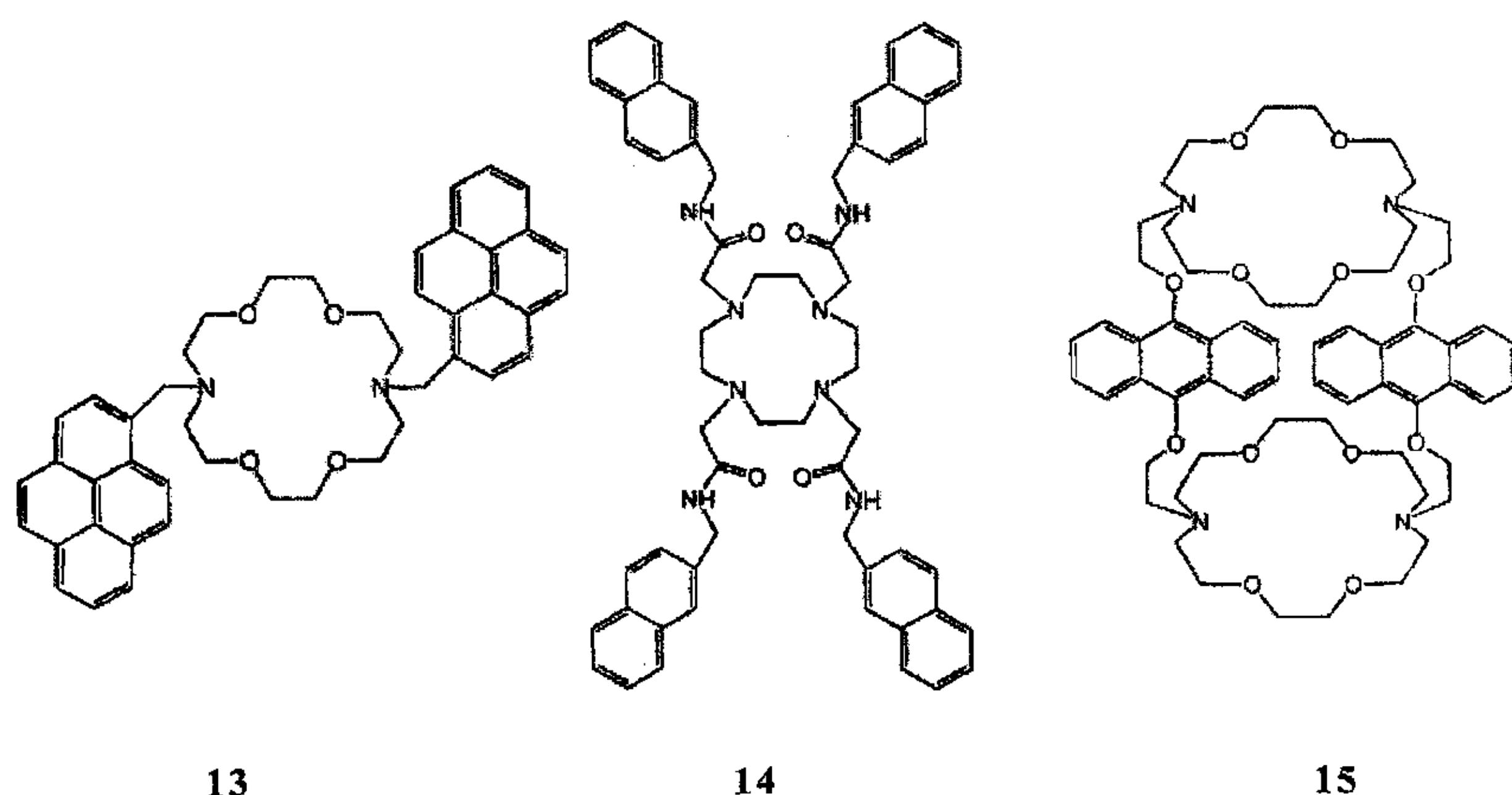
Scheme 1-4 TICT fluorescent probes

化合物 **9**^[36] 是典型的能够发生双荧光的 TICT 荧光分子探针, 以该化合物为母体的衍生物被广泛地用于 TICT 双荧光现象的各种研究中^[37], 多年来该化合物一直倍受关注^[38]。化合物 **10** 表现为单重荧光^[39]。化合物 **11**^[40] 表现为双重荧光, 短波发射带是局部激发态产生的, 长波发射带来源于 TICT 态, 与阳离子结合后, 由于氮杂冠醚与阳离子的相互作用, 长波吸收带强度下降。化合物 **12**^[41] 表现出非常特殊的三重荧光。第三重荧光的产生取决于溶剂、pH 和键合阳离子的微扰作用。

1.2.3 激基缔合物^[11,42] (excimer)

当两个相同的荧光团,如多环芳烃萘、蒽和芘等连接到一个受体分子的合适位置时,其中一个被激发的荧光团(单体)会和另一个处于基态的荧光团形成分子内激基缔合物,它的发射光谱不同于单体,表现为一个新的、强而宽、长波、无精细结构的发射峰。由于形成这种激基缔合物需要激发态分

子与基态分子达到“碰撞”距离 $\sim 3.5\text{\AA}$ ，因此荧光团间的距离是激基缔合物的形成和被破坏的关键。所以可以利用各种分子间作用力改变两个荧光团之间的距离，如用结合客体前后单体/激基缔合物的荧光光谱变化表达客体被识别的信息。萘、蒽等荧光团由于具有较长的激发单线态寿命，易形成激基缔合物，常常被用于此类探针中。



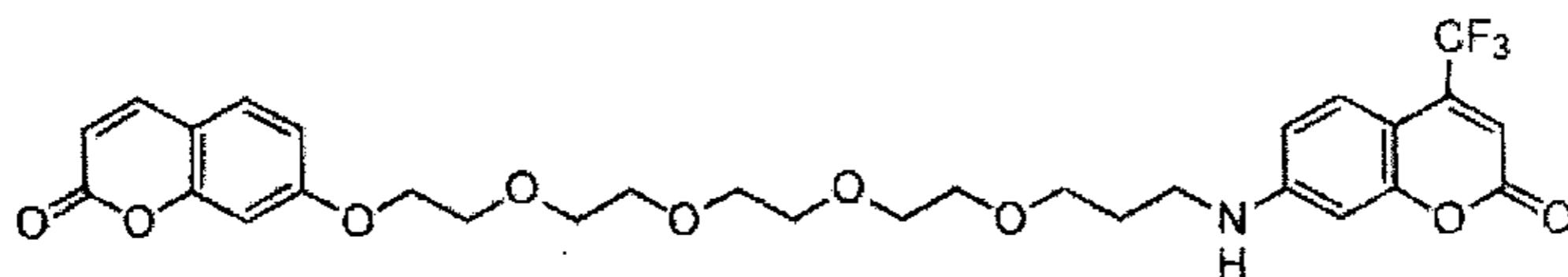
式 1-5 基于激基缔合物原理的探针

Scheme 1-5 The probes based on monomer-excimer mechanism

化合物 13^[43]具有双芘荧光发色团，氮杂冠醚络合 K^+ 或 Ba^{2+} 后，荧光强度增大，同时单体/激基缔合物的荧光强度比发生变化。化合物 14^[44]，通过酰胺连接了四个萘分子，在乙腈中以质子化的形式存在并表现出激基缔合物荧光光谱。络合 Cd^{2+} 或 Pb^{2+} 后，荧光强度降低。化合物 15^[45,46]是识别 α ， ω 链状二铵离子的一个非常好的双识别配体设计。当向 15 的甲醇溶液中加入 $\text{H}_3\text{N}^+(\text{CH}_2)_7\text{N}^+\text{H}_3\text{Cl}^-$ 后，单体荧光强度增强，激基缔合物发射消失。

1.2.4 荧光共振能量转移^[42,47,48] (FRET, fluorescence resonance energy transfer)

当能量给体荧光团 D 与能量受体荧光团 A 相隔的距离远大于 D-A 的碰撞直径时, 只要 D 与 A 的基态和第一激发态两者的能级间能量差相当, 或者说 D 的发射光谱与 A 的吸收光谱能有效重叠, 就可能发生从 D 到 A 的非辐射能量转移, 又称为长距离能量转移(甚至相距远达 70-100Å)。实际上 D-A 发生能量转移时, 两者除了光谱重叠外, 还必须以适当的方式排列。A 可以是荧光团, 也可以是荧光淬灭团。前一种情形, 激发 D 时, 由于能量转移, 将观察到 A 的荧光发射。而后一种情形, 则只能观察到 D 的荧光变化, 多用于核酸的检测。



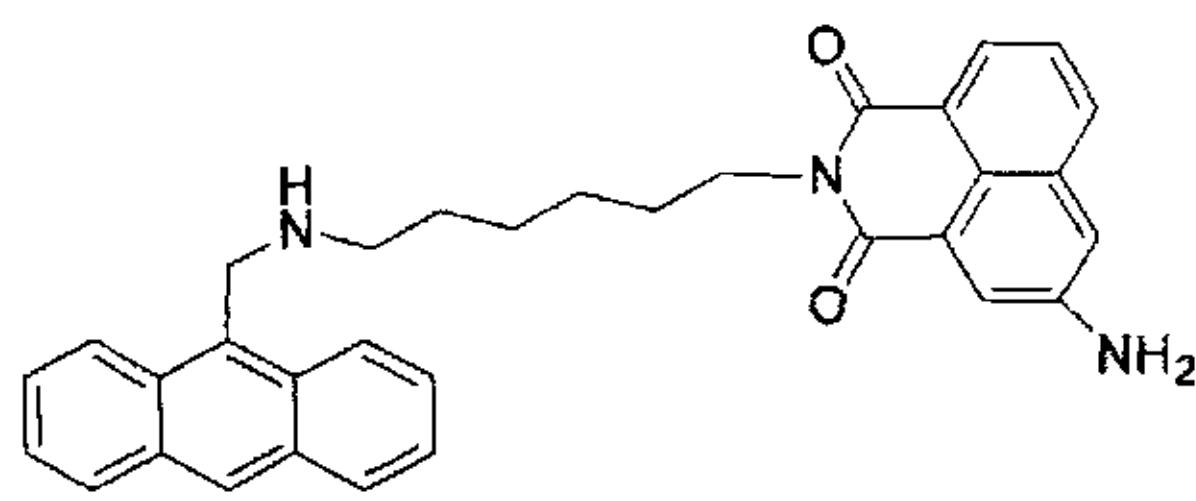
16

式 1-6 有两种香豆素构成的 FRET 荧光探针

Scheme 1-6 A FRET fluorescent probe with two kinds of coumarins

化合物 16^[49]由两种香豆素分子通过醚链连接。香豆素基团间距离较远, 能量共振转移效率低。当用短波激发时, 只能观察到 D 香豆素的荧光, 加入 Pb^{2+} 时, Pb^{2+} 与开链聚醚形成络合物, 拉近了 D-A 距离, FRET 效率得以提高, 激发 D 时, 能够观察到较强的 A 的荧光发射。

化合物 17^[50]由萘酰亚胺与蒽通过烷基链相连, 二者间距离较远, FRET 效率低, 当用长波激发时, 只能观察到 D 萘酰亚胺在 550nm 发射的荧光。当用短波激发时, 可以同时观察到蒽在 400-450 nm 和萘酰亚胺在 550nm 处两个荧光发射峰。随着 pH 的增加, 蒽的发射峰强度急剧降低, 而萘酰亚胺的荧光强度变化很小, 可以用于氢质子的识别。



式 1-7 由苝与苯酰亚胺构成的 FRET 带光探针

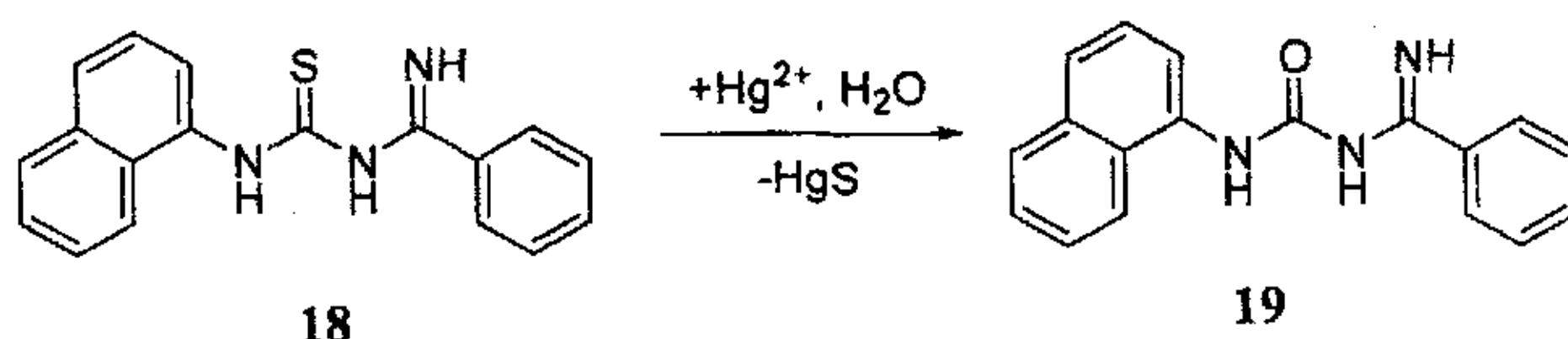
Scheme 1-7 A FRET fluorescent probe with two kinds of fluorescent groups.

FRET 类型荧光分子探针还广泛地应用于生物大分子的动态分析中。生物大分子不仅结构复杂，而且多变，用 X-射线衍射法或 ¹H-NMR 法都不能满足生物大分子的多样性和动态研究的要求。当生物功能大分子，比如酶，引入 D-A 荧光团后，观察二者的能量转移可以间接检测功能激活前后的结构变化^[51]。

1.2.5 基于其它原理的荧光分子探针

大多数金属离子荧光分子探针是基于上述几种原理设计合成，但有些分子探针是按照其它原理设计，甚至是意外所得，但效果却常常很好。

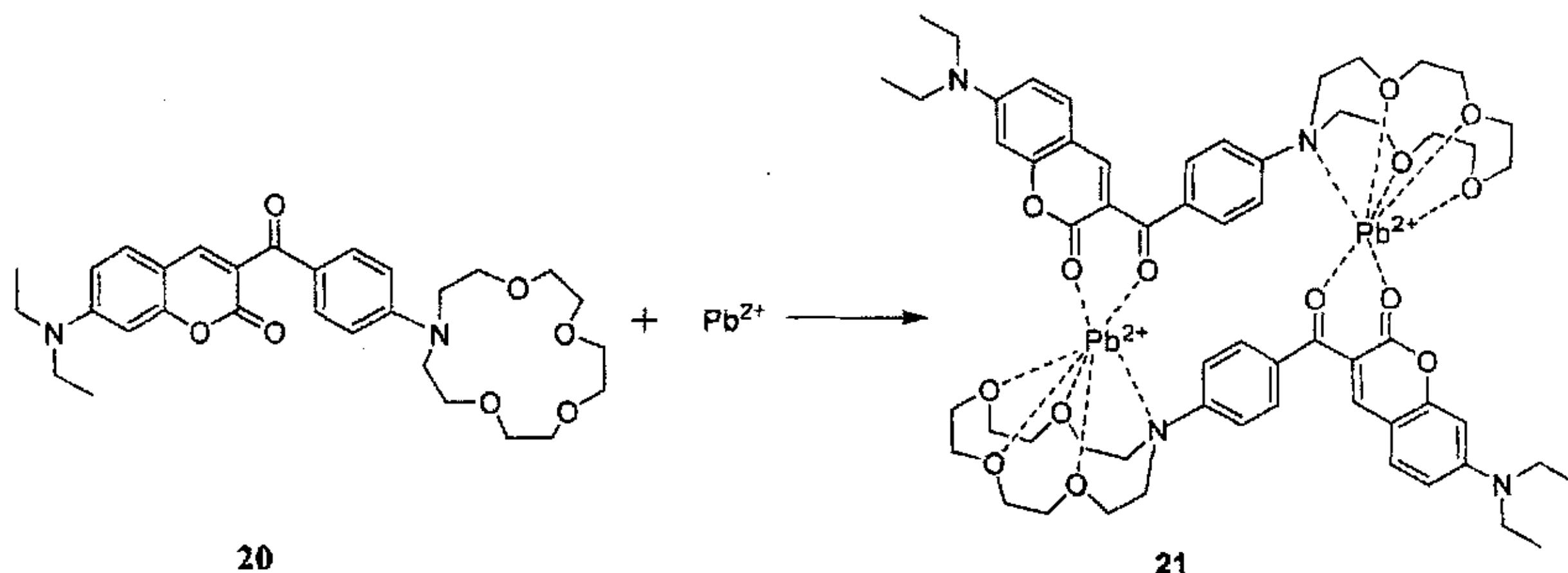
化合物18的乙腈溶液中加入汞离子后荧光强度显著增强（34倍）并伴有光谱红移，用质子检测发现生成了脱硫产物19。化合物18是对汞离子有选择性的化学反应荧光分子探针，这类不可逆的化学计量型的识别分子也被称为化学计量计（chemdosimeter）^[52]。



式 1-8 一种反应性荧光探针

Scheme 1-8 A reactive fluorescent probe

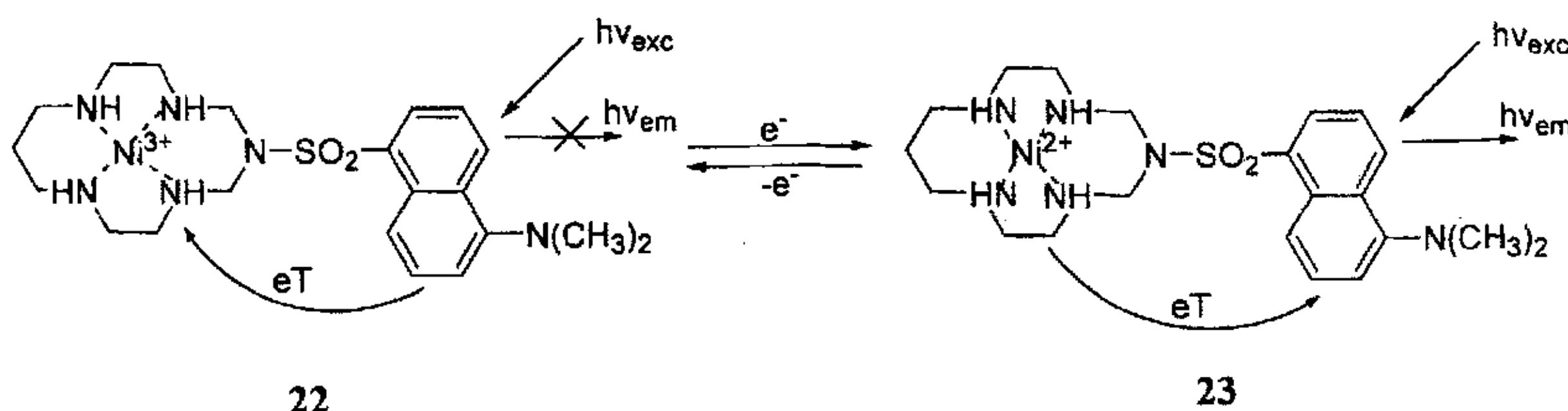
化合物 **20** 在乙腈溶液中对铅离子具有选择性荧光增强识别效果。识别过程中荧光增强40倍并伴有15nm的荧光光谱红移，这种识别现象是铅离子配位时影响了探针分子的光诱导分子内电荷转移及分子的构象刚性的结果^[53]。



式 1-9 酮氨基香豆素荧光探针

Scheme 1-9 A ketoaminocoumarin fluorescent probe

有些荧光分子开关是通过结合某些过渡金属离子的氧化或还原态(Ni^{III}/Ni^{II} , Cu^{II}/Cu^{I})淬灭或恢复荧光分子的荧光。在配合物 **22** 中，三价镍离子通过激发态丹磺酰胺荧光团向金属离子的电子转移将荧光淬灭；还原 Ni^{3+} 后，相应的二价配合物 **23** 则不与荧光团间发生电子转移，荧光处于“开”的状态。铜等金属离子也广泛存在这种现象^[54]。



式 1-10 基于过渡金属氧化-还原的荧光分子开关

Scheme 1-10 A transition metal fluorescent switch based on redox mechanism

金属离子特别是过渡金属离子荧光探针的设计原理纷繁复杂，在这里并

没有一一列举。还有许多基于其它设计原理的探针也具有良好的识别效果，如光致异构荧光识别、分子自组装界面膜及两亲分子溶液中自聚集荧光识别等^[5,10,55,56]。近年来对于锌离子识别的还有其特有的一些作用原理，将在下文中作以详细介绍。

1.3 Zn^{2+} 在生物体的重要作用及配位结构

1.3.1 Zn^{2+} 在生物体中的重要作用

锌离子是生物体中的一种二价金属，也是生物体中继铁之后第二富集的过渡金属。例如，成年人体中共含有 2-3g 锌，而铜仅有 250mg^[57]。更有趣的是，大量的锌(II)都集中在神经组织中，如在脑组织中的浓度是 0.1-0.5mM^[58]。尽管生物体中大部分的锌离子都与蛋白质紧密结合^[59]，但在某些细胞中仍然存在着“游离锌池”。游离锌的浓度在各种哺乳细胞内低至纳摩尔级，在海马（海马是大脑中负责情节记忆的脑神经结构）古老的神经末梢中高达 300 μM ^[60]。迄今为止，人们已经认识到锌在生命过程中起着许多不同的作用（图 1-3）^[61]。其中最重要也是最广为人知的作用就是在金属蛋白中作为一种构造因子。在最初发现的转录因子 III A(TFIII A)中， Cys_2His_2 和锌离子作用成为一种核酸键联域，也称“锌指膜”^[62]。同时， Zn^{2+} 通过金属调整蛋白直接参与调整基因表达^[63]。因为水合锌或氢氧化锌都是很好的亲核试剂，许多水解酶在其活性位点上都含有锌离子。例如，人体中碳酸酐酶 II (CA II) 的催化中心就是锌离子和三个组氨酸残基及一个水分子配位^[64]。事实上，生物体内外的大量证据都说明锌在细胞凋亡中是一种重要的调整元素^[65]。另外，锌离子存在于大部分的 DNA 和 RNA 聚合酶中^[66]。 Zn^{2+} 能够从突触囊中释放出来并通过电位调控型 Ca^{2+} 信道进入细胞，这表明游离锌离子还具有神经调节功能^[67]。



图 1-3 锌离子在生物体中的主要作用

Figure 1-3 main roles of Zn^{2+} in biological processes

以蛋白质结合形式存在的 Zn^{2+} 在生物体中的作用已广为报道, 但“游离锌”(未配位结合或弱键结合锌)的作用还有待解释^[68]。所以, 需要发展一种敏感并且非扩散性技术来完成这种实时局部成像。有别于其它过渡金属(如 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Cu^{2+}), 由于最外层电子分布是 $3d^{10}4s^0$, Zn^{2+} 不能表现出任何波谱或磁信号。普通的分析方法, 如紫外-可见光谱、核磁共振光谱和电子顺磁共振光谱等都不能用于这种生物体系中特殊金属离子的检测。因此, 应用荧光探针体系在一个比较宽的浓度范围内定量检测和反映 Zn^{2+} 的流量和水平对进一步了解 Zn^{2+} 在生物体系内的作用具有重要意义^[69]。荧光探针分子的设计涉及各个学科的知识, 如配位化学、光物理学、有机合成、分析技术、细胞生物学、组织学、神经生物学和临床成像等^[70]。

1.3.2 Zn^{2+} 的配位结构

Zn^{2+} 是一个非常重要的络合物中心离子。金属蛋白中许多氨基酸残基上的电子供体原子都是潜在的能与锌键合的基团。但在含锌酶中, 通常与锌键合的是组氨酸(His)、谷氨酸(Glu)和半胱氨酸。在简单化合物中, 含硫的配体对 Zn^{2+} 表现出特别高的亲和性。生物体中, 组氨酸在含锌酶中的键合能力是很突出的。这一方面是由于组氨酸残基上的咪唑环与金属离子配位有极大的空间柔曲性, 同时能通过氮原子的孤对电子生成 σ 键。另一方面, 由于咪

唑环上氮原子的 $pK_a \approx 6.5$ ，因此在生理条件下，它是比巯基以及胺基强得多的配位基团^[71]。Zn²⁺的空间立体化学结构也是一个重要因素。锌在生成简单络合物时，它的配位数可以是 2、4、5、6。但是，除了少数几个络合物外，通常它的配位数为 4，具有四面体的空间结构^[72]。事实上，几乎所有酶的锌活性部位上，锌都是取四面体结构^[73]。

1.4 Zn²⁺荧光分子探针的发展

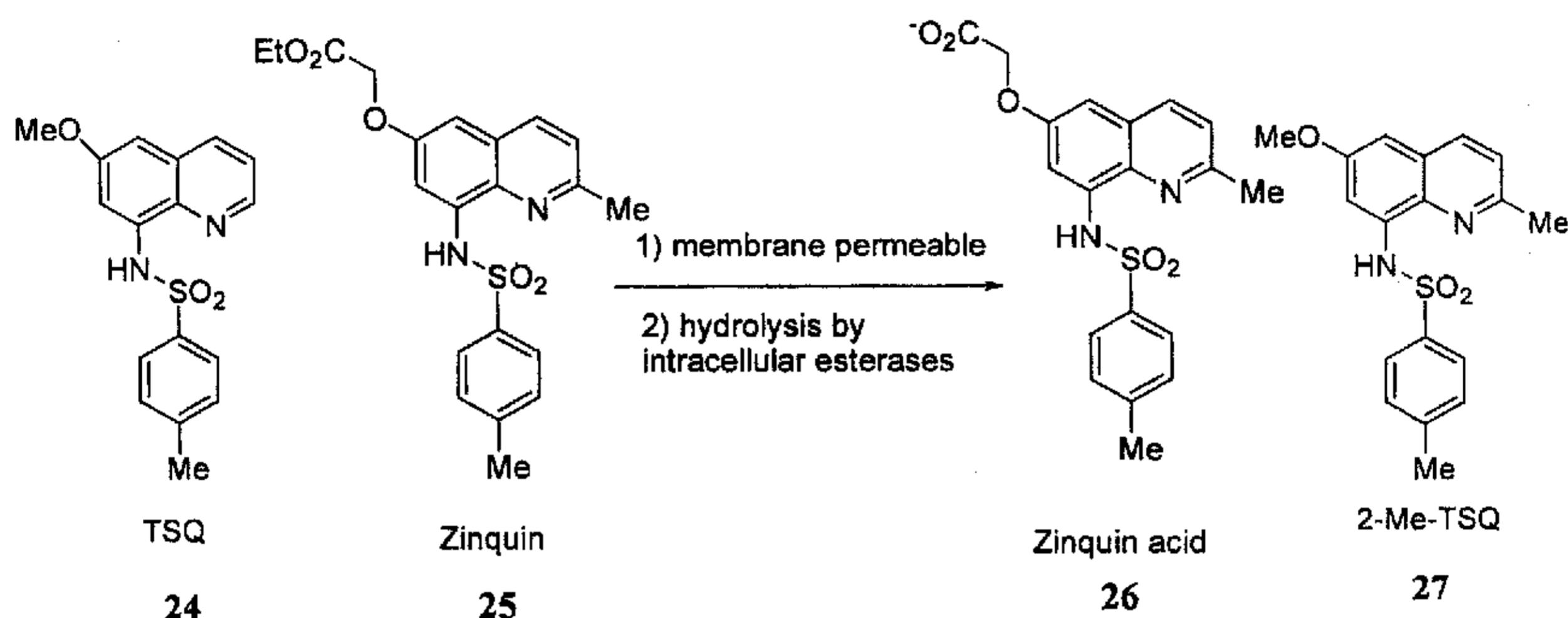
可靠的 Zn²⁺荧光分子探针应具有以下性质：化学-光稳定性、对 Zn²⁺荧光选择性和敏感性、快速响应、信号快速传递、水溶性以及可操作性。为了在生命体系中检测 Zn²⁺，还必须考虑其它方面的因素。例如，激发波长在可见光区 ($\geq 400\text{nm}$)，以避免紫外光对生命有机体的伤害。在生物体外和生物体内有溶解性和细胞穿透性。另外，pH 不敏感性也是需要考虑的一个重要因素^[6,7]。

Zn²⁺荧光分子探针的设计原理一般是基于光诱导电子转移 (PET) 或分子内电荷转移 (ICT)。另外，能量共振转移 (FRET) 以及激发态分子内质子转移等也在近年来有所发展。本论文将按荧光团和配体分类，介绍基于不同设计原理的 Zn²⁺荧光分子探针。

1.4.1 经典的 Zn²⁺荧光分子探针

6-甲氧基-8-对甲苯磺酰胺喹啉 (TSQ, 24)^[74]是第一例用于大脑、心脏及其它组织切片中 Zn²⁺浓度检测的荧光分子探针。TSQ 虽然可用于在生理条件下较高浓度的 Ca²⁺和 Mg²⁺存在时 Zn²⁺的检测，但 TSQ-Zn²⁺络合物的结构和稳定常数尚不清楚，TSQ/Zn²⁺可能以 1:1 或 2:1 的形式络合，并且荧光强度在不同的介质中变化较大，所以用 TSQ 进行定量分析 Zn²⁺还有待于进一步研究。Zalewski 小组在 TSQ 的 6 位上引入酯基后生成 Zinquin 酯 (25)^[75]。当 25 渗入到细胞膜内后，在酶的作用下水解成羧酸根阴离子 26，就可以长时间停留在细胞内，从而考察 Zn²⁺在细胞生长规律中的作用。2 μM Zinquin 自身的荧光非常弱，当游离 Zn²⁺的浓度达到纳摩尔级后，荧光强度大大增强，当 Zn²⁺达到饱和浓度 (1 μM) 时，荧光强度增大 20 倍，并且生物体中其它的重要金属离子 (如

Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Mn^{2+} 、 Co^{2+} 等) 都不会影响 **26**- Zn^{2+} 络合物的荧光强度。**26** 能检测的 Zn^{2+} 浓度范围在 100 pM-10 nM 之间。但通过荧光计滴定分析, **26** 与 Zn^{2+} 形成 1:1 或 2:1 的混合络合物, 在 pH 7.4 时, 键合常数分别是 $7.0 \times 10^6 M^{-1}$ 和 $11.7 \times 10^6 M^{-1}$ 。



式 1-11 早期的 Zn^{2+} 荧光探针

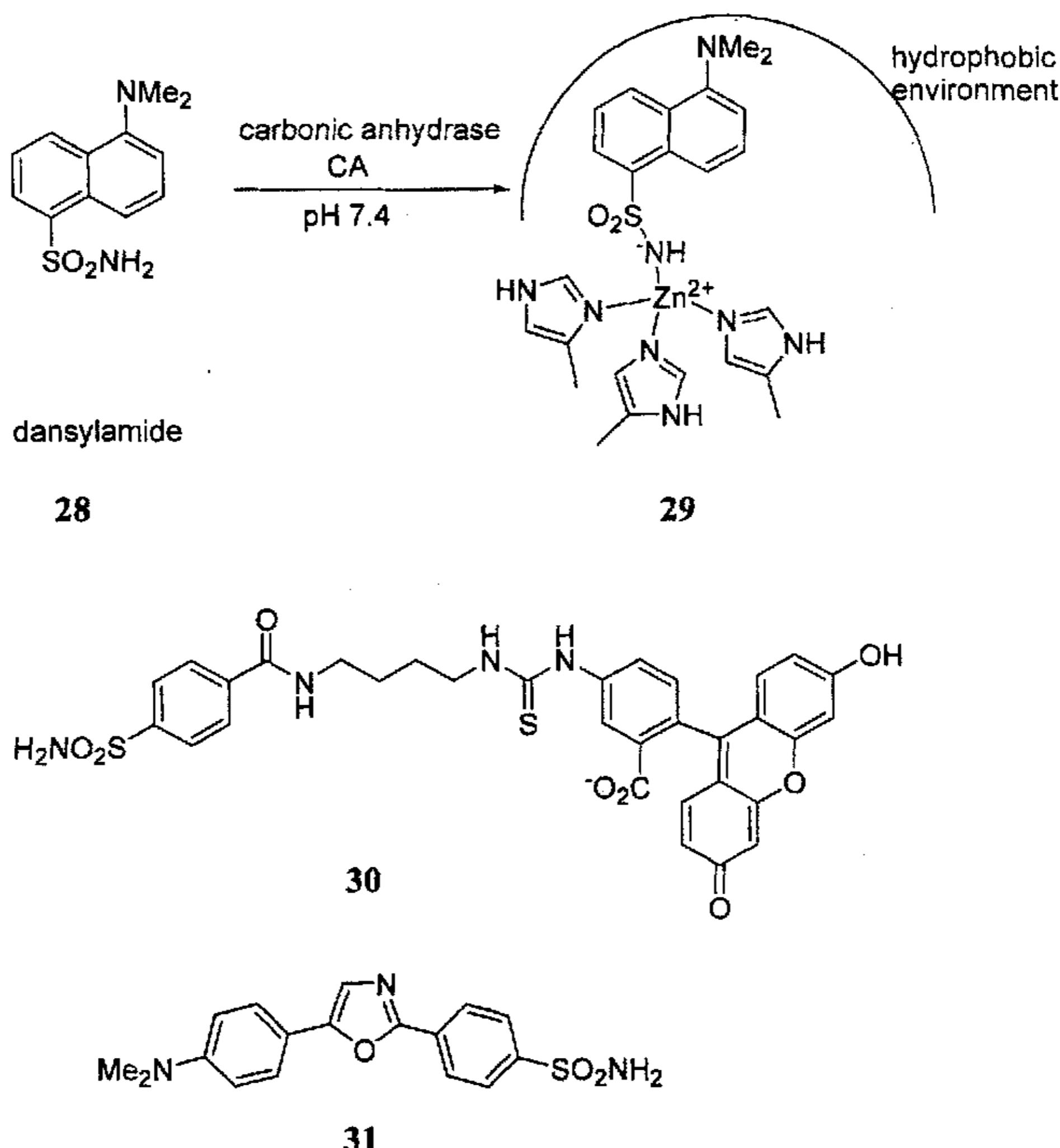
Scheme 1-11 Early Zn^{2+} fluorescent probes

为了进一步了解 TSQ 类荧光探针的化学结构, O'Halloran 小组研究了 2-甲基-TSQ (**27**)^[76], 结果表明, 在中性 DMSO-水 (1:1) 的混合溶液中, **27**- Zn^{2+} 的 2:1 四面体络合物是主要存在形式。X-衍射晶体分析进一步确定了络合物的结构, 即脱质子的酰亚胺 N^+ 及喹啉环上的 N 原子与 Zn^{2+} 配位。

1.4.2 由碳酸酐酶发展的 Zn^{2+} 荧光探针

1940 年, Mann 和 Keilin 报道了磺酰胺能够抑制含有锌的碳酸酐酶 (CA) 的活性^[77]。1967 年, Chen 和 Kernohan 提出牛血红细胞 CA 和等摩尔的丹磺酰胺 **28** 能形成 1:1 的络合物, 发出强烈的荧光^[78]。在水中, **28** 的发射波长为 580 nm, 荧光量子产率仅为 0.055, 但结合了 CA 后, **29** 的发射波长蓝移到 468 nm, 而量子产率增大到 0.84。荧光光谱的大幅度蓝移是由于丹磺酰胺的结合位点屏蔽性好, 疏水性强, 并且磺酰胺在结合 CA 时失去一个质子 (成为 SO_2NH^+)。所以丹磺酰胺被认为是一种很好的碳酸酐酶荧光探针或者 CA 调亡后游离 Zn^{2+} 荧光

探针。碘酰胺-荧光素结合物³⁰^[79]和dapoxy1碘酰胺³¹^[80]是这一类型荧光探针的进一步发展。³⁰和含有Zn²⁺的CA络合（解离常数K_d = 2.3nM），荧光各相异性和络合的Zn²⁺浓度在10-100nM范围内成比例。³¹络合CA后荧光强度增大90倍，光谱从605nm蓝移到530nm(K_d = 0.3μM)。这样就可以通过计算化合物³¹在535nm和685nm处的荧光强度实现对Zn²⁺的定量检测。



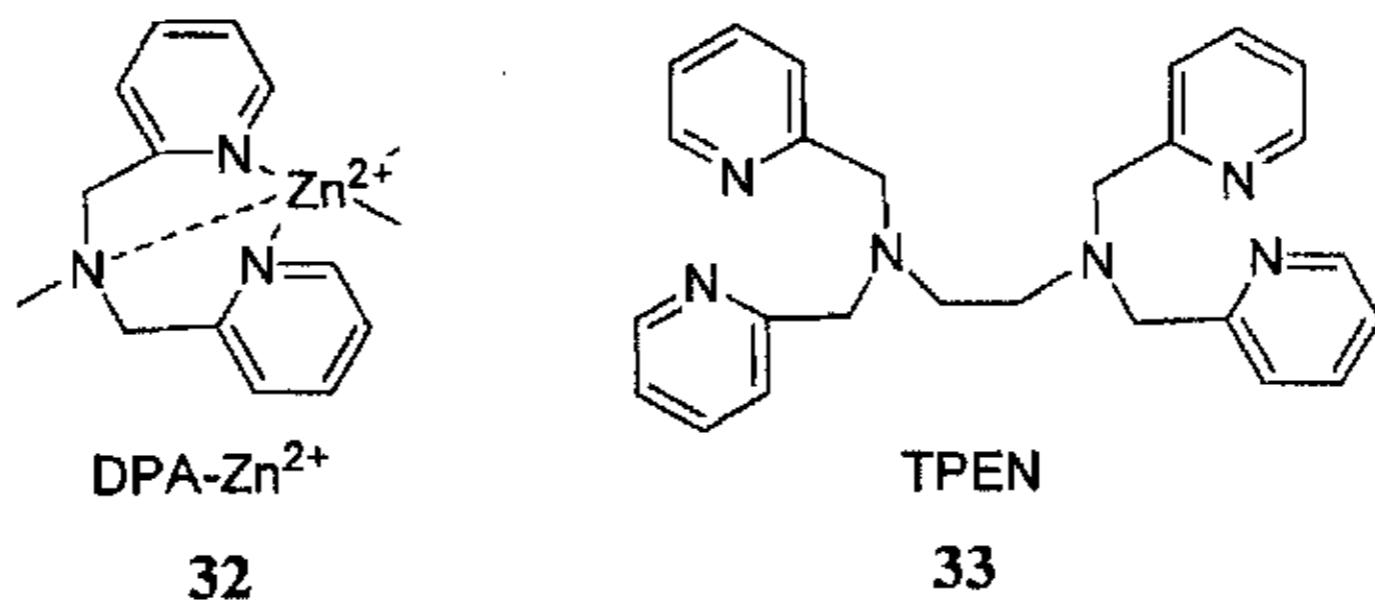
式1-12 三个碳酸酐酶荧光探针

Scheme 1-12 Three carbonic anhydrase fluorescent probes

1.4.3 吡啶衍生物为识别基团的Zn²⁺荧光探针

近年来，吡啶衍生物作为荧光分子探针的识别基团得到了广泛应用，特别是双(2-吡啶甲基)氨(DPA)³²被经常用于Zn²⁺的荧光分子探针中，提供三

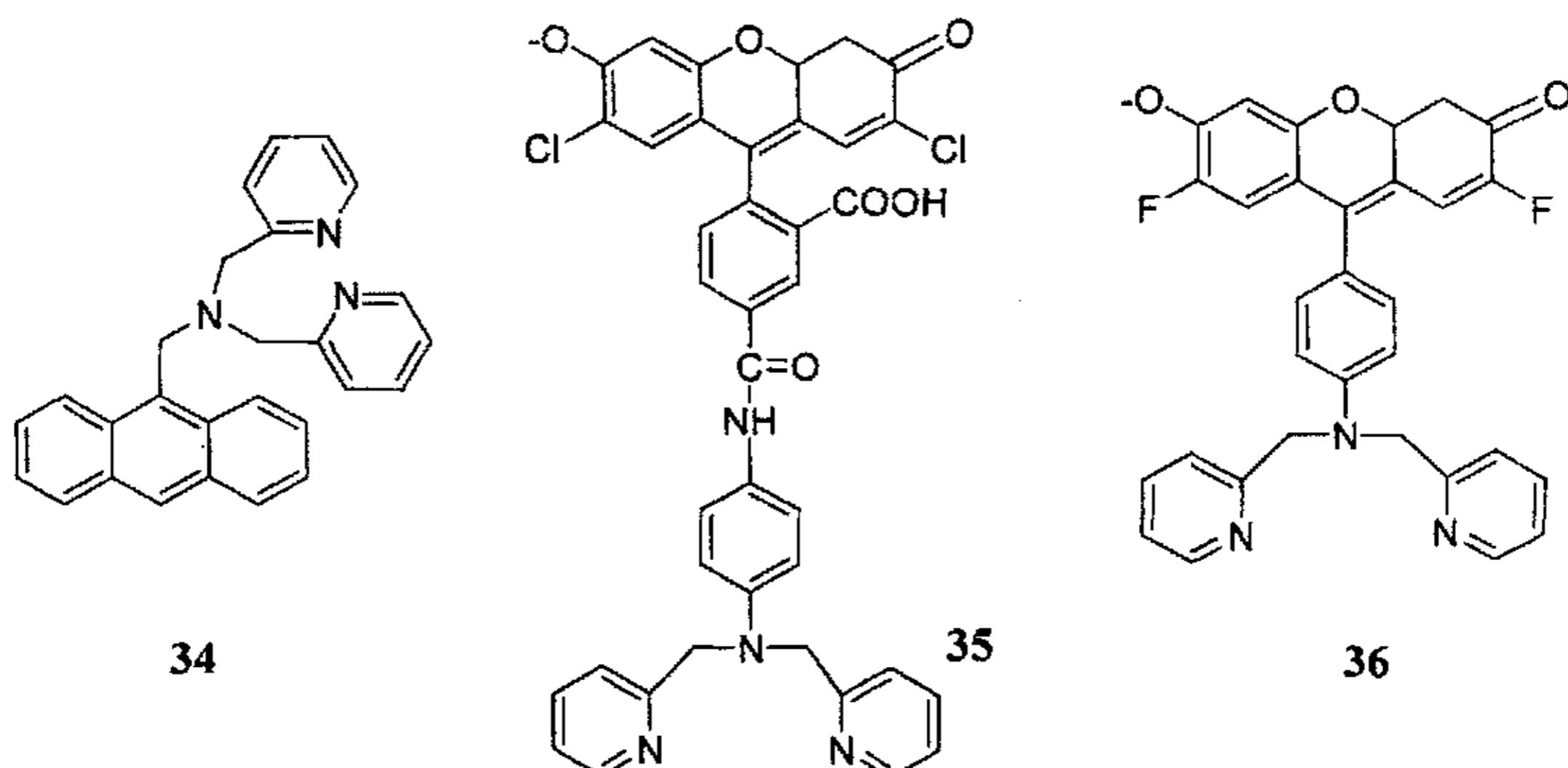
个氮原子，是明确的中性 Zn^{2+} 配体。众所周知，*N,N,N',N'*-四(2-吡啶甲基)乙二胺(TPEN) 33是一种中性螯合剂，和 Zn^{2+} 有很好的亲和性 ($K_d = 2.6 \times 10^{-16} M$)，但和 Ca^{2+} 的亲和性较弱 ($K_d = 4.0 \times 10^{-5} M$)^[81,82]。所以类似TPEN的荧光分子探针相对 Ca^{2+} 而言，对 Zn^{2+} 有很好的选择性，DPA氨基上的氮原子在PET和ICT探针中都是电子给体。



式 1-13 DPA 和 TPEN 示意图

Scheme 1-13 Schematic drawing of DPA and TPEN groups

化合物 34^[83] 是早期的选择 DPA 为 Zn^{2+} 识别基团的 PET 型质子和 Zn^{2+} 荧光分子开关。在乙腈溶液中，加入 Zn^{2+} 后，荧光量子产率增大 77 倍。但它对 Zn^{2+} 的亲和力一般，并且没有对其它金属离子的选择性实验。由分子探针公司发展的化合物 35^[84,85] (Newport Green) 是第一个实用的以 DPA 为识别基团的 Zn^{2+} 荧光分子探针。在中性条件下，结合 Zn^{2+} 后，35 的荧光强度增大 3.3 倍，并且对 Ca^{2+} 不敏感。此探针已经以醋酸盐的形式商品化，广泛用于探测通过电位或谷氨酸门控进入神经元的锌。但 35 对 Zn^{2+} 较弱的亲和性阻碍了对 Zn^{2+} 的研究^[69]。后来的化合物 36^[84,86] 虽然比 35 对 Zn^{2+} 的荧光增强倍数大，但对 Zn^{2+} 的亲和性比 35 更差。通过以上讨论，化合物 34-36 由于只有三个可以和 Zn^{2+} 络合的氮原子，导致对 Zn^{2+} 不敏感，只能和 Zn^{2+} 有微摩尔级的亲和性。所以，在配体分子中额外引入能和 Zn^{2+} 配位的给体，应该会加强对 Zn^{2+} 的亲和性。

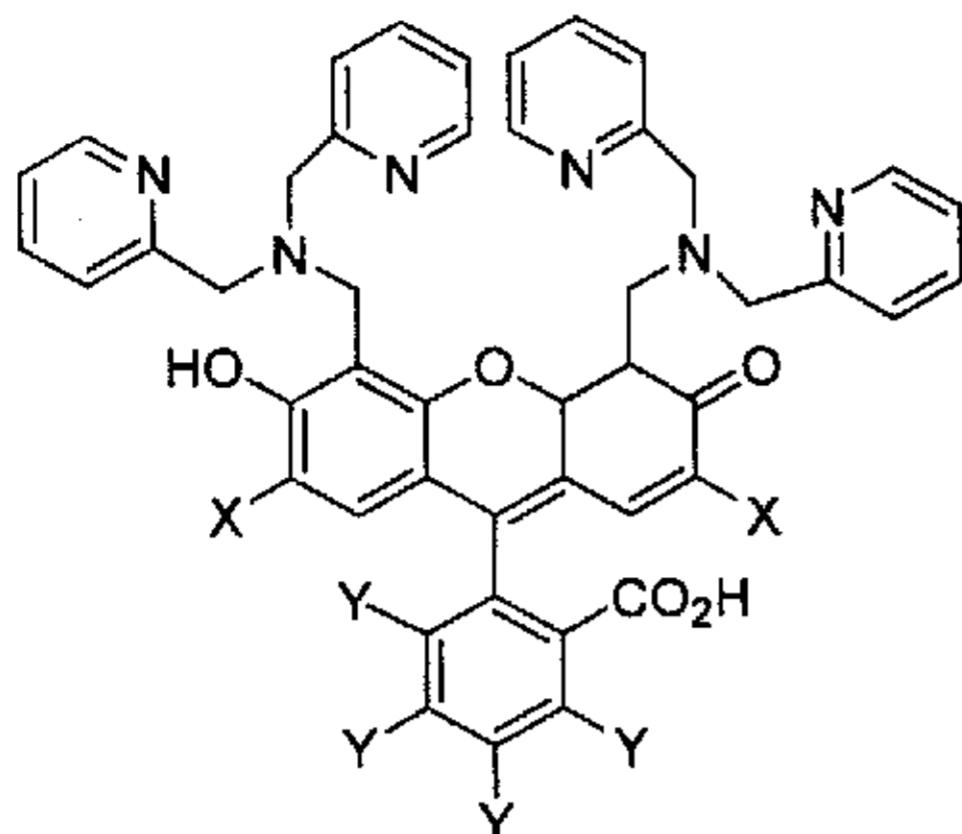


式 1-14 三个 DPA 识别基 Zn^{2+} 荧光分子探针

Scheme 1-14 Three Zn^{2+} fluorescent probes based on DPA

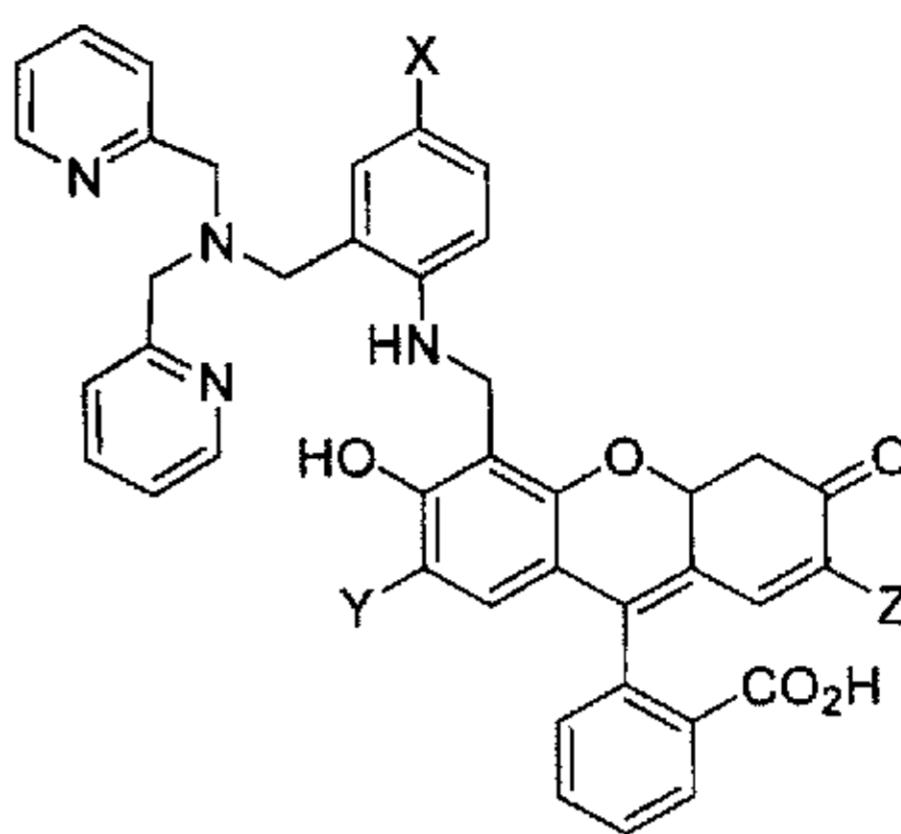
Lippard小组选择荧光素作为荧光团，DPA作为Zn²⁺的识别基团研究Zn²⁺荧光探针并做了大量工作。从ZP1到ZPF3，都是在荧光素上连有两个DPA（和以前一种在碱性环境中使用的Ca²⁺荧光探针相似，但现已不常用），并且在荧光素上引入吸电子基团以减小pH对探针分子荧光强度的影响^[87-92]。ZP1和Zn²⁺络合物的晶体数据表明，Zn²⁺和四个氮原子以及咕吨上的氧原子形成五配位结构迫使DPA向荧光团靠近。这种结果导致ZP1与Zn²⁺有很好的亲和性。但由于一个荧光团上存在两个识别基团，可能会存在探针与Zn²⁺1:1或1:2配位，故而不能实现对Zn²⁺的定量检测。为了避免上述情况以及荧光探针本身的荧光干扰，从ZP4到ZP8，是在分子中引入了[2-双（2-吡啶甲基）-胺甲基-N-甲基苯胺]-苯酚（BPAMP），这样Zn²⁺与配体中的三个氮原子、酚羟基上的氧原子以及一个水分子形成五配位络合物。新引入的苯胺上氮原子和DPA上的叔氮原子共同担当PET过程中的电子给体，从而提高了PET效率，降低了荧光探针的背景荧光，络合Zn²⁺后提高了荧光增强倍数。总的说来，在分子设计过程中，Lippard实验室试图采取两种方式减小氢质子对荧光强度的影响：1，在荧光素上引入吸电子基团增加荧光团的缺电子性；2，用芳香环氮原子取代脂肪族氮原子作为PET过程的开关，提高其效率。由于荧光素本身的荧光以及动力学复

杂性，这类探针对pH的敏感性仍然是需要解决的问题。



ZP1: X = Cl, Y = H
 ZP2: X = H, Y = H
 ZP3: X = F, Y = F
 ZPF1: X = Cl, Y = F
 ZPCI1: X = Cl, Y = Cl
 ZPBr1: X = Cl, Y = Br
 ZPF3: X = F, Y = F

34



ZP4: X = H, Y = H, Z = Cl
 ZP5: X = F, Y = H, Z = Cl
 ZP6: X = Cl, Y = H, Z = Cl
 ZP7: X = OMe, Y = H, Z = Cl
 ZP8: X = H, Y = F, Z = F

35

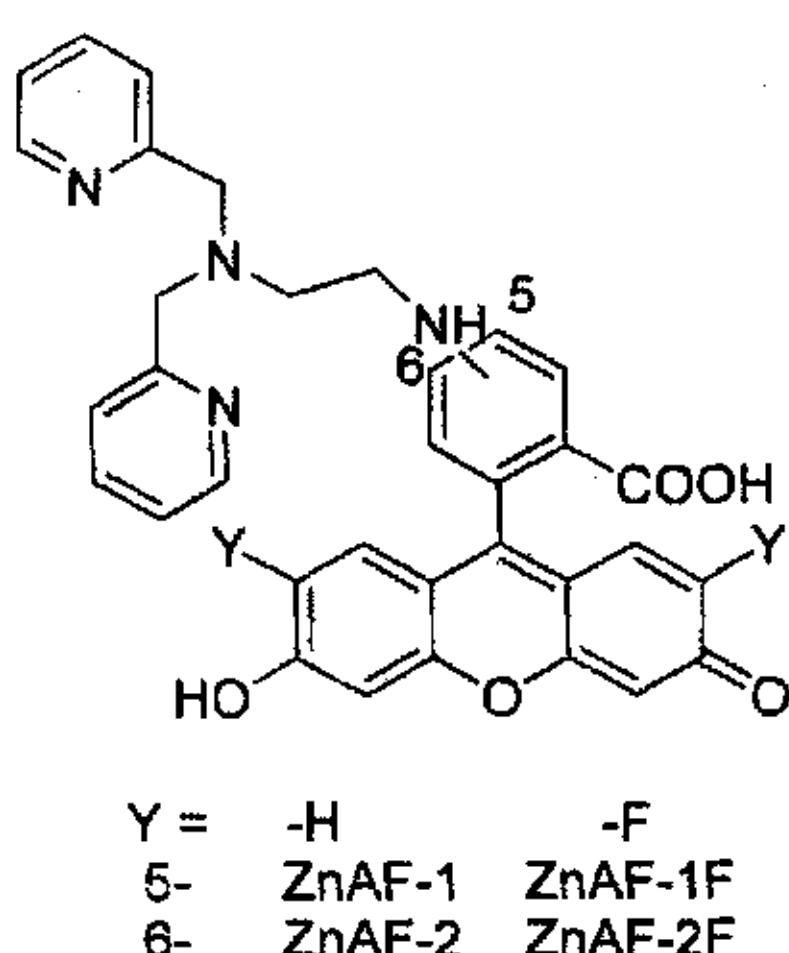
式1-15 两类荧光素PET Zn^{2+} 荧光探针

Scheme 1-15 Two kinds of fluorescent PET Zn^{2+} probes based on fluorescein

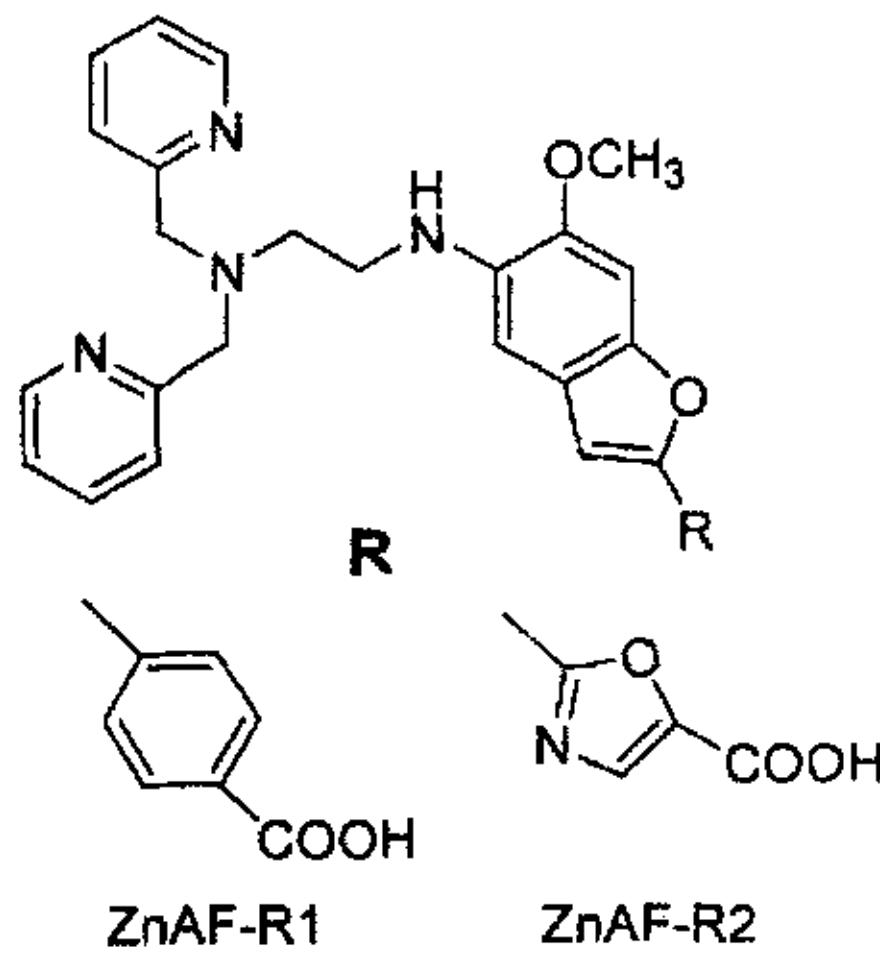
与Lippard小组相似，Nagano小组也用5-或6-氨基荧光素作为荧光母体，结合DPA合成另一系列 Zn^{2+} 荧光探针36^[93,94]。在36中有四个氮原子可以和 Zn^{2+} 配位。仲胺上氮原子也是电子转移的给体，在结合 Zn^{2+} 后，ZnAF-1的荧光增强10倍，ZnAF-2荧光增强15倍。但由于羧基的存在，金属离子半径的大小决定了这两个化合物对 Cd^{2+} 的选择性更好。另外，尽管ZnAF-1和ZnAF-2荧光在中性条件下相对稳定，但酸性环境对探针荧光强度的影响较大。在分子中引入F原子，可以降低共轭体系的电子云密度，从而降低探针分子的pKa，导致ZnAF-1F和ZnAF-2F本身以及 Zn^{2+} 络合物的荧光量子产率都有所降低。总之，ZnAF-1F和ZnAF-2F在中性以及弱酸性条件下对 Zn^{2+} 的荧光性质都有所改善。

化合物37^[95]的荧光团是苯并呋喃，这种荧光团常常用在 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 荧光分子探针中，配体仍然是DPA。37是基于ICT原理设计的，分子体系中的推拉电子作用在配体结合了 Zn^{2+} 之后减小，使分子探针的吸收光谱和激发光谱蓝移

($\lambda_{ex} = 365$ nm, $\lambda'_{ex} = 335$ nm)。ZnAF-1R和ZnAF-2R相比较而言, ZnAF-R2的水溶性及荧光性质好一些, 更适合生物体系中Zn²⁺的检测, 但关于pH对这两个分子的影响却没有报道。和PET类荧光分子探针不同的是, ICT类荧光分子探针在结合Zn²⁺前后, 荧光强度及量子产率变化不大, 但吸收光谱和激发光谱有较大的移动。



36

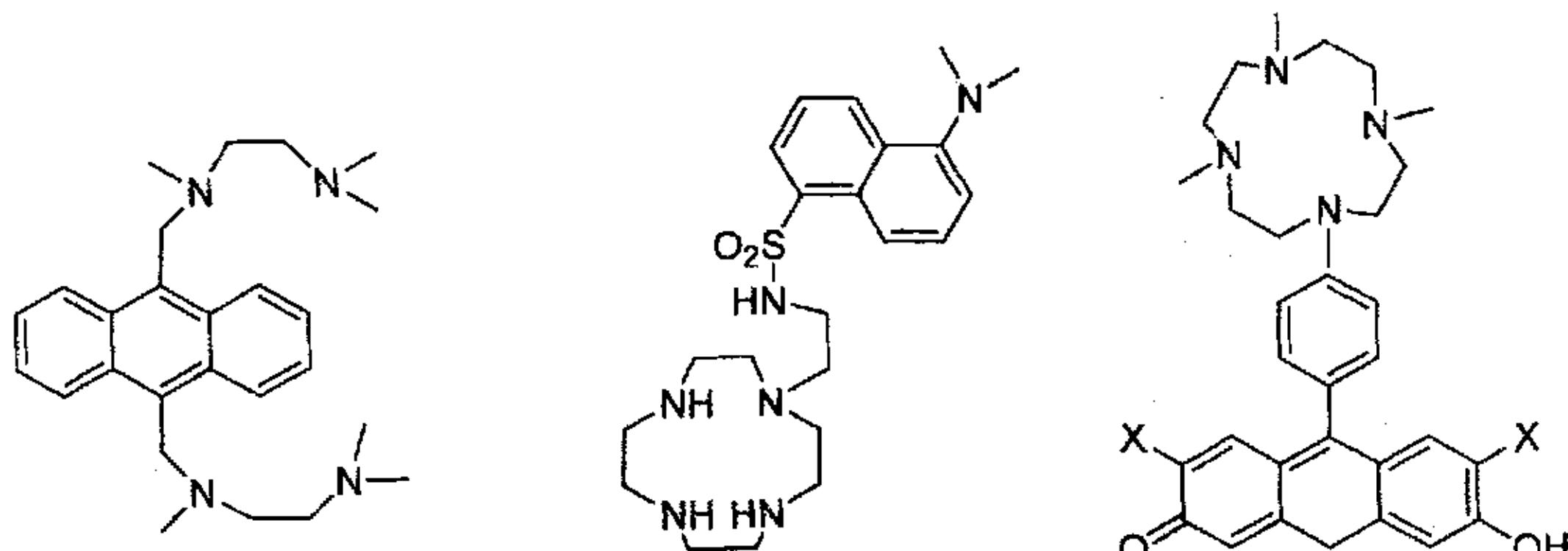


37

式1-16 Nagano研究组发展的以DPA为络合配体的Zn²⁺荧光分子探针

Scheme 1-16 Two kinds of Zn²⁺fluorescent probes based on DPA developed by Naganos' group.

1.4.4 脂肪族胺或环状多胺为识别基团的Zn²⁺荧光分子探针



38

39

40

式1-17 三个以多胺为络合配体的Zn²⁺荧光分子探针

Scheme 1-17 Three Zn²⁺ fluorescent probes based on polyamine

因为多胺上的氮原子不仅与 Zn^{2+} 表现出很好的亲和性，而且是很好的电子给体，被广泛用于 Zn^{2+} 识别配体。关于多胺应用于 Zn^{2+} 荧光分子探针的研究开始于上世纪80年代。

Czarnik研究小组首次将两个烷基二胺连接在蒽荧光团上，在乙腈中识别 Zn^{2+} 。研究结果表明，由于烷基胺与 Zn^{2+} 的亲和性较低，化合物38^[96]不适合生物体系中反映 Zn^{2+} 。但这个PET类型荧光分子探针初步试验说明对某些金属离子有特性的含氮配体可以用来通过简单的柔性链连接到荧光团上构成荧光分子探针。化合物39^[97]是由丹磺酰基团和氨基环烯连接而成。X-衍射晶体分析表明 Zn^{2+} 和39配位后形成扭曲的四面锥体。在水溶液中其荧光强度对pH不敏感。络合常数pH 7时为0.14nM，pH 7.8时低于皮摩尔级。为了引入可见光激发的荧光团，化合物40^[98]选用6-羟基-9-苯基荧光酮为荧光团，四取代环烯为识别基团。作为典型的PET类型荧光探针，结合 Zn^{2+} 后，荧光分别增大14倍（ZnACF-1）和26倍（ZnACF-2）。但由于空间障碍，这两个探针与金属离子结合的速度很慢，使他们不适合在生物体系中实时监测。

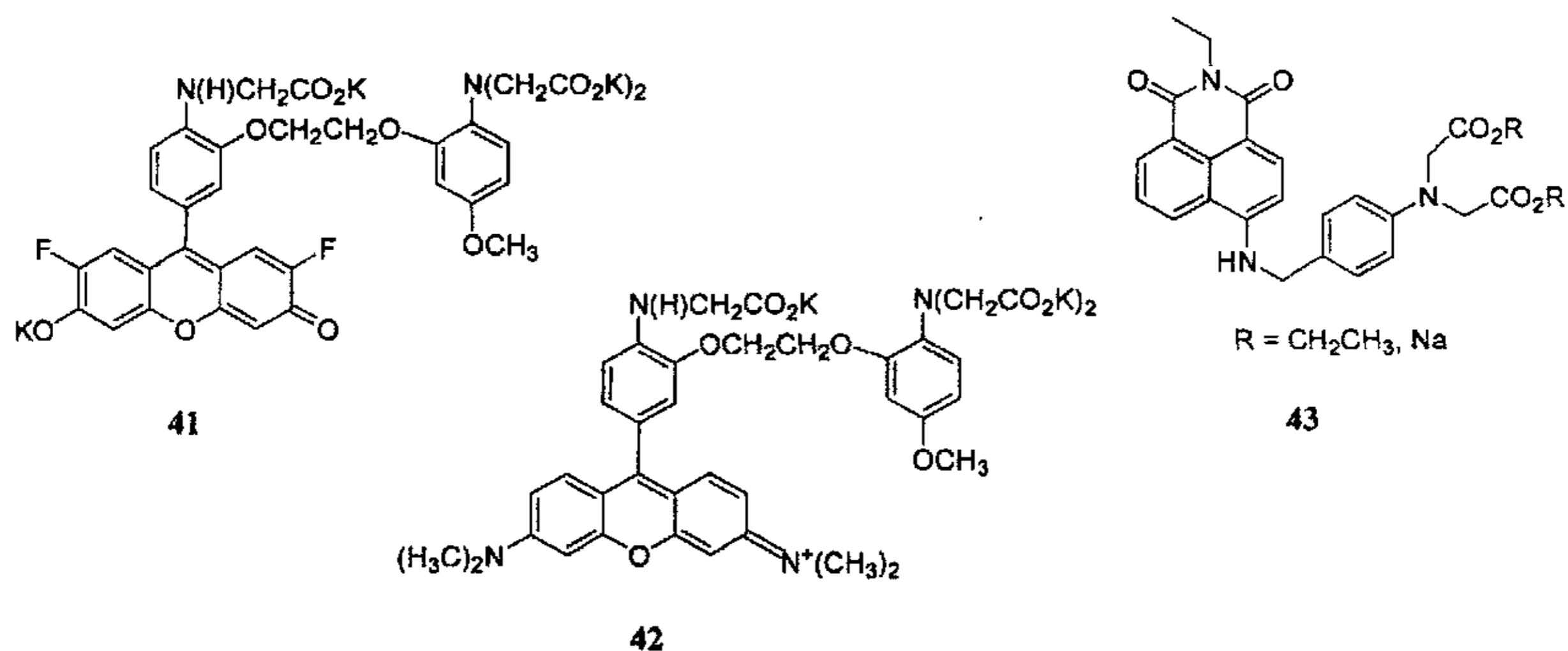
近年来，一些传统的荧光团，如2-溴-3-（1氢-吲哚-3-顺丁烯二酰亚胺）^[99]2,4-二氧四氢蝶啶和二甲(基)异咯嗪^[100]等也被用来和 Zn^{2+} -环烯作用形成叔环烯- Zn^{2+} 络合物，从而引起荧光增强，并且对 Zn^{2+} 的选择性好于其它金属离子。但由于氮环烯多胺对 Zn^{2+} 的亲和性相对较弱，并且含有多个活性氢原子，会导致复杂的氢质子解离平衡，化合物的荧光就会对pH敏感。所以，这类化合物很少用于生物体系的研究。

1.4.5 经典的 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 荧光分子探针用于 Zn^{2+} 的识别

Zn^{2+} 和 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 的离子半径和配位数都有相似之处，所以对 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 有识别能力的基团通常对 Zn^{2+} 也有一定的亲和性。事实上，像TPEN这样的螯合剂对 Zn^{2+} 表现出更好的亲和性。所以TPEN一般被用来屏蔽 Zn^{2+} ，从而避免 Zn^{2+} 所引起的荧光干扰^[82]。

Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 作为硬酸对含氧原子的基团有很好的亲和性，例如羧基。乙烯

基乙二醇-二(2-氨基乙基醚)-*N,N,N',N'*-四乙酸(EGTA)以及它的衍生物二(邻氨基苯氧基)乙烷-*N,N,N',N'*-四乙酸(BAPTA)广泛用于检测 Ca^{2+} ^[101]。



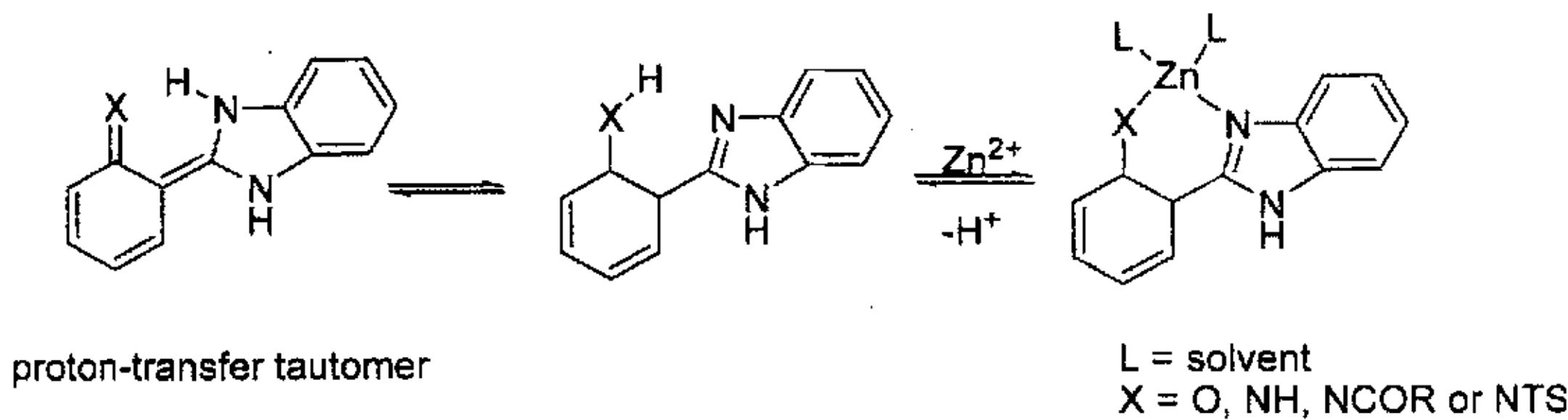
式1-18 三个以多羧酸络合配体的 Zn^{2+} 荧光分子探针

Scheme 1-18 Three Zn^{2+} fluorescent probes based on carboxyl groups

化合物41^[102]配体部分选用的离子载体类似BAPTA但去掉了其中一个*N*-乙酸，荧光素上连接了吸电子基团F。这样，41对 Zn^{2+} 表现出较好的亲和性，解离常数(K_d)为15nM，在生理条件下对pH不敏感。同样，化合物42^[103]也是用这种离子载体，而荧光团是罗丹明，对 Zn^{2+} 的 K_d 为65nM。化合物43^[104]是一种典型的PET类型的荧光分子探针。 Zn^{2+} 的加入使其荧光量子产率增大53倍，而对 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 及其它许多金属离子不响应，但 K_d 仅为80nM。由此看来，羧酸类离子载体只能检测高浓度的游离锌，适合于大脑神经系统和胰腺。

1.4.6 其它的 Zn^{2+} 荧光分子探针

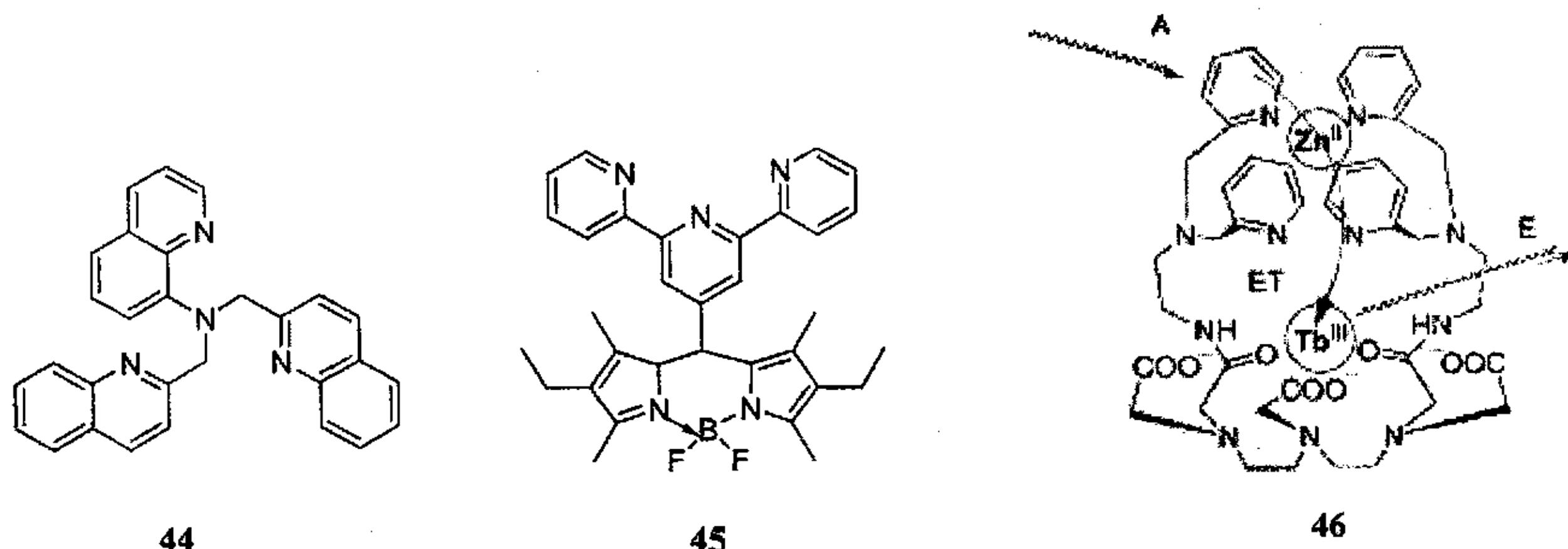
另外一类有代表性的 Zn^{2+} 荧光分子探针是基于激发态分子内质子转移(Excited-state Intramolecular Proton Transfer, ESIPT)^[105]，示意图如式1-19所示。这类探针由于在结合金属离子后发射波长蓝移，因而可以做到定量检测金属离子。最近报道的一系列分子^[106]可以在比较大的浓度范围内检测游离痕量锌。但它们的缺点也很突出：对溶剂敏感，pH对其荧光强度的影响较大，并且激发和发射波长都较短等。



式 1-19 金属离子诱导的激发态质子转移互变异构体的抑制

Scheme 1-19 Metal-cation-induced inhibition of excited-state intramolecular proton transfer

化合物 44^[107] 中，三个喹啶作为离子载体与叔胺一起提供四个氮原子和 Zn^{2+} 配位，表现出很高的亲和性。化合物 45^[108] 属于 ICT 类型分子探针，它以三联吡啶作为识别配体，对 Zn^{2+} 的选择性较好，遇 Zn^{2+} 荧光红移。另外，镧系络合物作为发色体连接离子载体也用来识别 Zn^{2+} 。化合物 46^[109] 是两个 DPA 基团连接到核磁共振成像造影剂 $\text{Ln}(\text{III})\text{-DTPA}$ 上，对 Zn^{2+} 有很好的选择性，但仍需要非常短的激发波长 ($\lambda_{\text{ex}} = 260\text{nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 545\text{nm}$)。

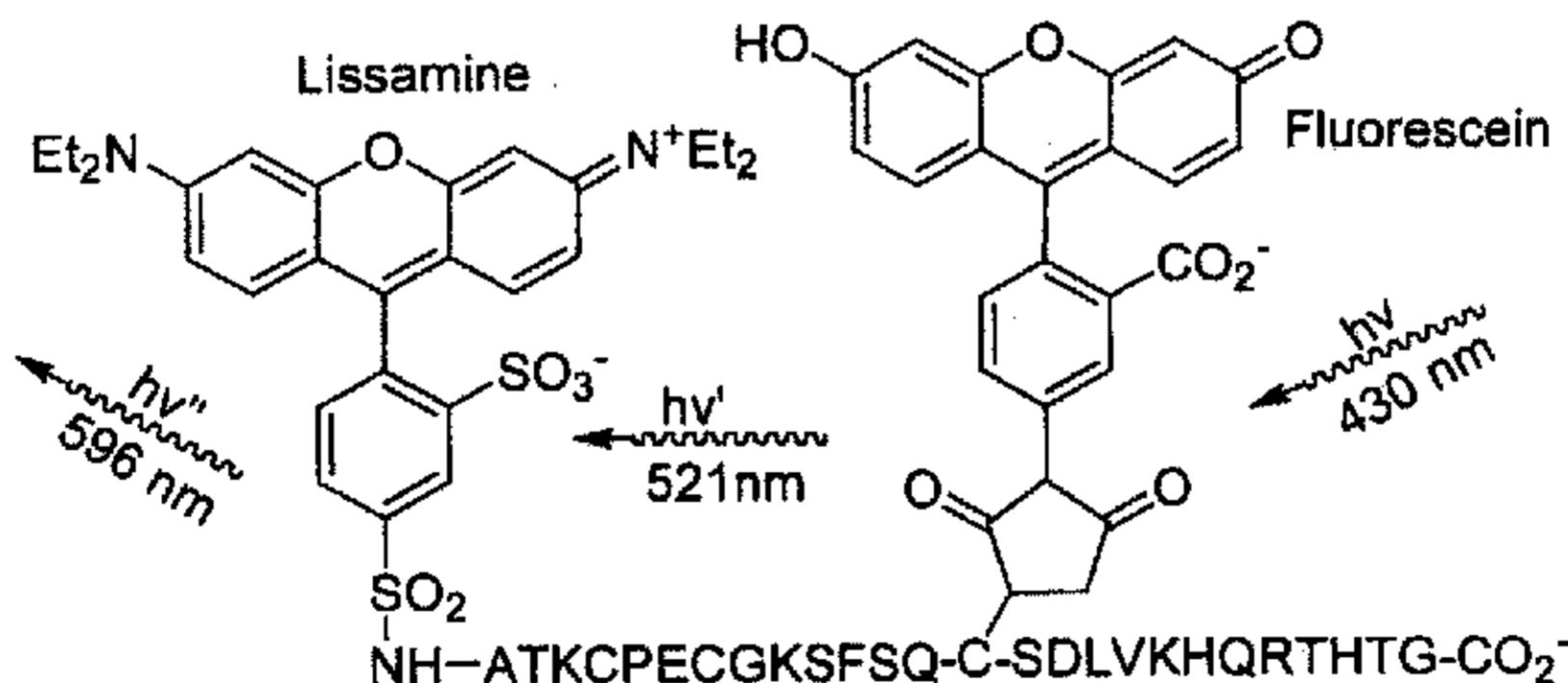
式 1-20 其它配体的 Zn^{2+} 荧光分子探针Scheme 1-20 Zn^{2+} fluorescent probes based on other ligands

如果我们把上面所介绍的分子探针称为化学传感器，那么还有一类分子可以被划分为生物传感器。这是因为它们利用了生物体中的蛋白质^[78-80]、缩胺酸^[110,111]、核酸^[112-114]等作为离子载体或连接基团。化合物 47^[110] 中， Cys_2His_2 序列连接两个荧光团荧光素和丽丝胶。光谱研究表明，可见光激发分别在

521nm和596nm处有两个发射峰。加入Zn²⁺后，596nm处发射峰基本不变，而521nm处发射峰大大加强。作者把这种现象解释为FRET机理，其中荧光素是能量给体，丽丝胶是能量受体。和化学传感器相比较而言，这类Zn²⁺荧光分子探针对Zn²⁺表现出更好的选择性以及亲和性(达到皮摩尔级)，但它们对氧特别敏感，只能在氮气-氢气环境下操作。

综上所述，作为超分子化学的重要组成部分，荧光分子探针受到广大科研工作者的广泛关注。从上世纪80年代末，人们对Zn²⁺荧光分子探针的设计及合成投入了大量的心血，也取得了很多进展，许多探针分子可以在某一浓度范围内表现出对Zn²⁺很好的选择性和敏感性。

到目前为止，TSQ、Zinquin和Newport Green探针分子已经成功地应用于解释生物体特别是中性体系里Zn²⁺的作用。一般说来，小的化学传感器分子对Zn²⁺的专一性和敏感性适中，而大分子的生物传感器经常表现出更好的选择性。这些荧光分子探针的研究涉及到有机合成、配位化学、分析化学、光物理和光化学等等多学科理论和知识的交叉学科，尽管关于探针设计有一些原则性的理论指导^[1,5,11,115,116]，但细微分子差异对探针性能的影响是难以预测的，要靠实验来验证。



47

式1-21 一种缩氨酸Zn²⁺荧光探针Scheme 1-21 A kind of Zn²⁺ fluorescent probes based on peptide

1.5 本研究工作的指导思想和主要内容

通过以上讨论可以看出, 近年来发展了很多以不同设计机理设计的不同荧光团和识别基团的 Zn^{2+} 荧光分子探针, 其中有少数在生物体系中得到了应用。但这些 Zn^{2+} 荧光分子探针都存在这样或那样的缺点, 因此设计更多性能良好的探针分子是很必要也很迫切的。

很多以DPA为识别基团的 Zn^{2+} 荧光分子探针对 Zn^{2+} 表现出更好的亲和性和选择性, 但由于氮原子的质子化过程, 探针分子本身对pH有一定的敏感性。另一方面, 荧光分子探针对客体的识别能力不仅依赖于识别基团, 并且与荧光团自身的光物理性质和电化学性质有着非常重要的关系。目前大部分这类 Zn^{2+} 荧光分子探针都选择荧光素作为荧光母体。而这类荧光团Stocks 位移小, 对环境因素, 如pH、温度等很敏感, 特别是pH, 不适合在中性和酸性条件下使用。而且当它们与生物大分子结合后, 荧光淬灭非常严重, 达60-90%。

本论文的研究工作是根据荧光分子探针的基本作用原理, 结合前人的工作, 主要进行水溶液中 Zn^{2+} 荧光分子探针的设计、合成及识别性能研究, 为进一步了解并解释 Zn^{2+} 在生物体中的重要作用提供更广泛的技术手段。分别选取丹磺酰胺、1, 8-萘酰亚胺、BODIPY染料、2-苯基咪唑蒽醌为荧光基团, 主要以DPA为 Zn^{2+} 识别基团, 设计合成了几个系列荧光分子探针, 并试图通过改变荧光团与识别基团的结合方式, 调节识别基团的配位原子、配位原子间的距离等手段改善识别性能, 同时通过量子化学计算等辅助手段进一步解释实验得到的结果。

参考文献

- [1] de Silva, A. P.; Gunaratne H. Q. N.; Gunnlaugsson, T.; Huxley, A. J. M.; McCoy C. P.; Radmancher J. T.; Rice T. E. Signaling Recognition Event with Fluorescent Sensors and Switches. *Chem. Rev.*, 1997, 97, 1515~1566.
- [2] Jean-Marie Lehn著, 沈兴海 等译, 超分子化学-概念和展望, 北京: 北京大学出版社, 2002, 1-33.
- [3] 刘育, 尤长城, 张衡益 编著, 超分子化学-合成受体的分子识别与组装, 天津: 南开大学出版社, 2001, 1-5.
- [4] Valeur, B. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*, Wiley-VCH Verlag GmbH: 2001, 273.
- [5] Rurack, K. Flipping the light switch ‘ON’ ----the design of sensor molecules that show cation-induced fluorescence enhancement with heavy and transition metal ions, *Spectrochimica Acta Part A*, 2001, 57, 2160-2195.
- [6] Kimura, E.; Koike, T. Recent development of zinc-fluorophores, *Chem. Soc. Rev.*, 1998, 27, 179-184.
- [7] Kimura, E.; Aoki, S. Chemistry of zinc (II) fluorophore sensors, *Biometals*, 2001, 14, 191-204.
- [8] Klein, G.; Kaufmann, D.; Schürch, S.; Reymond, J.-L. A fluorescent metal sensor based on macrocyclic chelation, *Chem. Commun.*, 2001, 561-562.
- [9] 郭祥峰, 亲水性藜酰亚胺阳离子荧光分子探针的设计、合成及性能, 大连理工大学博士论文, 2004年3月.
- [10] 樊美公等, 光化学基本原理与光子学材料科学, 北京: 科学出版社, 2001, 326-331.
- [11] Valeur, B.; Leray, I. Design principles of fluorescent molecular sensors for cation recognition, *Coor. Chem. Rev.*, 2000, 205, 3-40.
- [12] Czarnik, A. W. Chemical Communication in Water Using Fluorescent Chemosensors, *Acc. Chem. Res.* 1994, 27, 302-308.
- [13] Czarnik, A. W. Fluorescent Chemosensors of Ion and Molecule Recognition, *ACS Symp. Ser*, American Chemical Society: Washington DC, 1993, p538.
- [14] Fabbrizzi, L.; Poggi, A. Sensors and switches from supramolecular chemistry, *Chem. Soc. Rev.*, 1995, 24, 197-202.
- [15] de Santis, G.; di Casa, M.; Fabbrizzi, L.; Licchelli, M.; Mangano, C.; Pallavicini, P.; Perotti, A.; Poggi, A.; Sacchi, D.; Taglietti, A. In Transition Metals in Supramolecular Chemistry. Fabbrizzi, L.; Poggi, A.; Eds.; Kluwer: Dordrecht, 1994.
- [16] Fabbrizzi, L.; Licchelli, M.; Pallavicini, P.; Sacchi, D.; Taglietti, A. Sensing of

- transition metals through fluorescence quenching or enhancement. A review, *Analyst*, 1996, 121, 1763-1768.
- [17] Tsien, R. Y. Intracellular signal transduction in four dimensions: from molecular design to physiology, *Am. J. Physiol:Cell physiology*, 1992, 263, 723-728.
- [18] Tsien, R. Y. In ref 14, p130.
- [19] Kuhn, M. A. In ref 14, p147.
- [20] Desvergne, J. P.; Fages, F.; Bouas-Laurent, H.; Marsau, P. Tunable photoresponsive supramolecular systems. *Pure Appl. Chem.*, 1992, 64, 1231-1238.
- [21] Bouas-Laurent, H.; Desvergne, J. P.; Fages, F.; Marsau, P. In ref 14, p59.
- [22] James, T. D.; Linnane, P.; Shinkai, S. Fluorescent saccharide receptors: a sweet solution to the design, assembly and evaluation of boronic acid derived PET sensors, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1996, 281-288.
- [23] James, T. D.; Sandanayake, K. R. A. S.; Shinkai, S. Saccharide Sensing with Molecular Receptors Based on Boronic Acid, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 1996, 35, 1910-1922.
- [24] de Silva, A. P.; Gunaratne, H. Q. N.; Habib-Jiwan, J.-L.; McCoy, C. P.; Rice, T. E.; Soumillion, J.-P. New Fluorescent Model Compounds for the Study of Photoinduced Electron Transfer: The Influence of a Molecular Electric Field in the Excited State, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 1995, 34, 1728-1731.
- [25] de Silva, A. P.; Rice, T. E. A small supramolecular system which emulates the unidirectional, path-selective photoinduced electron transfer (PET) of the bacterial photosynthetic reaction centre (PRC), *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1999, 163-164.
- [26] de Silva, A. P.; Fox, D. B.; Moody, T. S.; Weir, S. M. The development of molecular fluorescent switches, *TRENDS in Biotechnology*, 2001, 19, 29-34.
- [27] de Silva, A. P. Fluorescent signaling crown ethers: 'switching on' of fluorescence by alkali metal ion recognition and binding in situ, *J. Chem. Soc. Chem. Comm.*, 1986, 1709-1710.
- [28] Fabbrizzi, L.; Lichelli, M.; Pallavicini, P.; Perotti, A.; Sacchi, D. An Anthracene-Based Fluorescent Sensor for Transition Metal Ions, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1994, 33, 1975-1977.
- [29] de Silva, A. P.; Gunaratne, H. Q. N.; Maguire, G. E. M.; Luminescence and charge transfer. Part 3. The use of chromophores with ICT (internal charge transfer) excited states in the construction of fluorescent PET (photoinduced electron transfer) pH sensors and related absorption pH sensors with aminoalkyl side chains, *J. Chem. Soc. Chem. Comm.*, 1994, 1213-1214.

- [30] De Santis, G.; Fabbrizzi, L.; Lichelli, M.; Mangano, C.; Sacchi, D.; Sardone, N. A fluorescent chemosensor for the copper (II) ion, *Inor. Chem. Acta.*, 1997, 257, 69-76.
- [31] Gabe, Yu.; Urano, Y.; Kikuchi, K.; Kojima, H.; Nagano, T. Highly Sensitive Fluorescence Probes for Nitric Oxide Based on Boron Dipyrromethene Chromophore-Rational Design of Potentially Useful Bioimaging Fluorescence Probe, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, 126, 3357-3367.
- [32] Cosnard, F.; Wintgens, V.; A new fluoroionophore derived from 4-amino-N-methyl-1,8-naphthalimide, *Tetrahedron Letter*, 1998, 39: 2751-2754.
- [33] Delmond, S.; Létard, J. F.; Lapouyade, R.; Mathevret, R.; Jonusauskas, G.; Rullière, C. Cation-triggering intramolecular charge transfer and fluorescence red-shift in intrinsic fluorescence probes, *New. J. Chem.*, 1996, 20, 861-869.
- [34] Kolimannsberger, M.; Rurack, K.; Resch-Genger, U.; Daub, J. Ultrafast charge transfer in amino-substituted boron dipyrromethene dyes and its inhibition by cation complexation: a new design concept for highly sensitive fluorescent probes. *J. Phys. Chem. A.*, 1998, 102, 10211-10220.
- [35] Grabowski, Z. R.; Dobkowski, J. Twisted intramolecular charge transfer (TICT) excited states: energy and molecular structure. *Pure. Appl. Chem.*, 1983, 55 (2): 245-252.
- [36] Rettig, W. Charge separation in excited states of decoupled system- TICT compounds and implications regarding the development of new laser dyes and the primary processes of vision and photosynthesis, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1986, 25, 971-988.
- [37] Zachariasse, K. A.; Druzhinin, S. I.; Bosch, W.; Machinek, R. Intramolecular Charge Transfer with the Planarized 4-Aminobenzonitrile 1-tert-Butyl-6-cyano-1,2,3,4-tetrahydroquinoline (NTC6), *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, 126, 1705-1715.
- [38] Rappoport, D.; Furche, F. Photoinduced Intramolecular Charge Transfer in 4-(Dimethyl)aminobenzonitrile – A Theoretical Perspective, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, 126, 1277-1284.
- [39] Létard, J. F.; Lapouyade, S. P.; Rettig, W. Synthesis and Photophysical Study of 4-(N-monoaza-15-crown-5) Stilbenes Forming TICT States and Their Complexation with Cations. *Pure. Appl. Chem.*, 1993, 65, 1705-1709.
- [40] Létard, J. F.; Delmond, S.; Lapouyade, S. P.; Braun, D.; Rettig, W.; Kreissler, M. New Intrinsic Fluoroionophores with Dual Fluorescence: DMABN-Crown-4 and DMABN-Crown-5, *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas.*, 1995, 114, 517-521.

- [41] Collins, G. E.; Choi, L.-S.; Callahan, J. H. Effect of Solvent Polarity, Ph, and Metal Complexation on the Triple Fluorescence of 4-(N-1,4,8,11-tetraazacyclotetradecyl)-benzonitrile, *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, 120, 1474-1475.
- [42] Trautwein, A. X. *Bioionorganic Chemistry*, Wiley-VCH, Weinheim, 1997.
- [43] Kubo, K.; Kato, N.; Sakurai, T. Synthesis and Complexation Behavior of Diaza-18-crown-6 Carrying Two Pyrenylmethyl Groups, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1997, 70, 3041-3046.
- [44] Park, D.; Williams, J. A. G. Luminescence behaviour of cadmium, lead, zinc, copper, nickel and lanthanide complexes of octadentate macrocyclic ligands bearing naphthyl chromophores, *J. Chem. Soc. Perkin. Trans.*, 1995, 1305-1314.
- [45] Fages, F.; Desvergne, J.-P.; Bouas-Laurent, H. Lehn, J.-M.; Konopelski, J.P.; Marsau, P.; Barrans, Y. Synthesis and fluorescence emission properties of a bis-anthracenyl macrotricyclic ditopic receptor. Crystal structure of its dinuclear rubidium cryptate, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1990, 655-657.
- [46] Fages, F.; Desvergne, J.-P.; Kampke, K.; Bouas-Laurent, H. Lehn, J.M. Meyer, M. Albrecht-Gary, A.M. Linear molecular recognition: spectroscopic, photophysical, and complexation studies on .alpha.,.omega.-alkanediyl diammonium ions binding to a bisanthracenyl macrotricyclic receptor, *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, 115, 3658-3664.
- [47] Speiser, S. Photophysics and mechanisms of intramolecular electron energy transfer in bichromophoric molecular systems: solution and supersonic jet studies, *Chem. Rev.*, 1996, 96, 1953-1976.
- [48] 魏亦男, 李元宗, 常文宝, 慈云祥. 荧光共振能量转移技术在生物分析中的应用, *分析化学*, 1996, 26, 477-484.
- [49] Valeur, B.; Pouget, J.; Bourson, J.; Kaschke, M.; Ernsting, N. P. Tuning of photoinduced energy transfer in bichromophoric coumarin supermolecule by cation binding, *J. Phys. Chem.*, 1992, 96, 6545-6549.
- [50] de Silva, A. P.; Gunaratne, H. Q. N.; Gunnlaugsson, T.; Lynch, L. M. Molecular photoionic switches with an internal reference channel for fluorescent pH sensing applications, *New. J. Chem.*, 1996, 20, 871-880.
- [51] Johnson, D.A.; Leathers, V.L.; Martinez, A.-M.; Walsh, D.A.; Fletcher, W.H. Fluorescence resonance energy transfer within a heterochromatic cAMP-dependent protein kinase holoenzyme under equilibrium conditions: new insight into the conformational changes that result in cAMP activation, *Biochem.*, 1993, 93, 587-614
- [52] Hennrich, G.; Walther, W.; Resch-Genger, U.; Sonnernschein, H. Cu²⁺ and Hg²⁺

- Induced Modulation of the Fluorescence Behavior of a Redox-Active Sensor Molecule, *Inorg. Chem.*, 2001, 40, 641-644.
- [53] Chen, C.-T.; Huang, W.-P.; A Highly Selective Fluorescent Chemosensor for Lead Ions, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, 124, 6246-6247.
- [54] Amendrola, V.; Fabbrizzi, L.; Licchelli, M.; Mangano, C.; Pallavicini, P.; Parodi, L.; Poggi, A. Molecular events switched by transition metals, *Coord. Chem. Rev.*, 1999, 190-192, 649-669.
- [55] Sasaki, D. Y.; Padila, B.E. Dithioamide metal ion receptors on fluorescent lipid bilayers for the selective optical detection of mercuric ion, *Chem. Commun.*, 1998, 1581-1582.
- [56] Grandini, P.; Mancin, F.; Tecilla, P.; Scrimin, P.; Tonellato, U. Exploiting the Self-Assembly Strategy for the Design of Selective Cu^{2+} Ion Chemosensors, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 1999, 38, 3061-3064.
- [57] Cotton, F. A.; Wilkinson, G. Advanced Inorganic Chemistry, fifth ed., Wiley, 1988.
- [58] Bush, A. I. Metals and neuroscience, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2000, 4, 184-191.
- [59] Outten, C.E.; O'Halloran, T.V. Femtomolar Sensitivity of Metalloregulatory Proteins Controlling Zinc Homeostasis, *Science*, 2001, 292, 2488-2491.
- [60] Lopez-Garcia, C.; Varea, E.; Palop, J. J.; Nacher, J.; Ramirez, C.; Ponsoda, X.; Molowny, A. Cytochemical techniques for zinc and heavy metals localization in nerve cells, *Microsc. Res. Tech.*, 2002, 56, 318-331.
- [61] Berg, J. M.; Shi, Y. The galvanization of biology: A growing appreciation for the roles of zinc, *Science*, 1996, 271, 1081-1085.
- [62] Clarke, N. D.; Berg, J. M. Zinc fingers in *Caenorhabditis elegans*: Finding families and probing pathways, *Science*, 1998, 282, 2018-2022.
- [63] Andrews, G. K. Cellular zinc sensors: MTF-1 regulation of gene expression, *Biometals*, 2001, 14, 223-237.
- [64] Coleman, J. E. Zinc enzymes, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 1998, 2, 222-234.
- [65] Truong-Tran, A. Q.; Carter, J.; Ruffin, R. E.; Zalewski, P. D. The role of zinc in caspase activation and apoptotic cell death, *Biometals*, 2001, 14, 315-330.
- [66] Lippard, S. J.; Berg, J. M. Principles of Bioinorganic Chemistry, *University Science Books*, Mill Valley, 1994.
- [67] Burdette, S. C.; Lippard, S. J. ICCC34 — golden edition of coordination chemistry reviews. Coordination chemistry for the neurosciences, *Coord. Chem. Rev.*, 2001, 216-217, 333-361.
- [68] Huang, E. P. Metal ions and synaptic transmission: Think zinc, *Proc. Natl. Acad. Sci.*

- U.S.A. 1997, 94, 13386-13387.
- [69] Thompson R. B.; Peterson, D.; Mahoney, W.; Cramer, M.; Maliwal, B. P.; Suh, S. W.; Frederickson, C.; Fierke, C.; Herman, P. Fluorescent zinc indicators for neurobiology. *J. Neurosci. Methods*, 2002, 118, 63-75.
- [70] Jiang, P. J.; Guo, Z. J. Fluorescent detection of zinc in biological system: recent development on the design of chemosensors and biosensors, *Coord. Chem. Rev.*, 2004, 248, 205-229.
- [71] 王夔, 徐碧辉, 唐任寰, 罗贤懋 编著, 生命科学中的微量元素, 下卷, 北京: 中国计量出版社, 1992.
- [72] Bailar, J. C. *Comprehensive Inorganic Chemistry*, Pergamon, Oxford, 1973, 188.
- [73] Fiabane, A. M.; Williams, D. R. *The principle of Bioinorganic Chemistry*, The chemical Society, London, 1977, 21.
- [74] Frederickson, C. J.; Kasarskis, E. J.; Ringo, D.; Frederickson, R. E. A quinoline fluorescence method for visualizing and assaying histochemically reactive zinc (bouton zinc) in the brain, *J. Neurosci. Methods*, 1987, 20, 91-103.
- [75] Zalewski P. D.; Forbes, I. J.; Betts, W. H.; Correlation of apoptosis with change in intracellular labile Zn (II) using Zinquin [(2-methyl-8-p-toluenesulphonamide-6-quinolyloxy)acetic acid], a new specific fluorescent probe for Zn(II). *Biochem.J.*, 1993, 296, 403-408.
- [76] Fahrni, C. J.; O'Halloran, T. V.; Aqueous coordination chemistry of quinoline-based fluorescence probes for the biological chemistry of zinc, *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, 121, 11448-11458.
- [77] Mann, T.; Keilin, D. Sulphanilamide as a specific inhibitor of carbonic anhydrase, *Nature*, 1940, 146, 164-165.
- [78] Chen R. F.; Kernohan, J. C. Combination of bovine carbonic anhydrase with a fluorescent sulfonamide, *J. Biol. Chem.*, 1967, 242, 5813-5823.
- [79] Elbaum, D.; Nair, S. K.; Patchan, M. W.; Thompson R. B. Christianson, D. W. Structure-based design of a sulfonamide probe for fluorescence anisotropy detection of zinc with a carbonic anhydrase-based biosensors. *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, 118, 8381-8387.
- [80] Thompson, R. B.; Maliwal, B.P.; Zeng, H-H. Improved fluorophores for zinc biosensing using carbonic anhydrase, *Proc. SPIE-Int. Soc. Opt. Engin.*, 1999, 3603, 14-22.
- [81] Anderegg, G.; Hubmann, E.; Podder, N. G. Wenk, F. Pyridinderivate als Komplexbildner. XI. Die Thermodynamik der Metallkomplexbildung mit Bis-, Tris-

- und Tetrakis[(2-pyridyl)methyl]-aminen, *Helv. Chin. Acta.*, 1977, 60, 123-140.
- [82] Arsan, P.; Di Virgillio, F.; Beltrame, M.; Tsien, R. Y.; Pozzan, T. Cytosolic Ca^{2+} homeostasis in Ehrlich and Yoshida carcinomas. A new, membrane-permeant chelator of heavy metals reveals that these ascites tumor cell lines have normal cytosolic free Ca^{2+} , *J. Biol. Chem.*, 1985, 260, 2719-2727.
- [83] Bhattacharya, S.; Mandal, S. S. 3,4-Bis(trimethylsilyl)-1*H*-pyrrole: a versatile building block for unsymmetrically 3,4-disubstituted pyrroles, *Chem. Commun.*, 1996, 1515-1517.
- [84] Haugland, R. P. Handbook of Fluorescent Probes and Research Products, 9th ed., Molecular Probes Inc, 2002.
- [85] Canzoniero, L. M. T.; Sensi, S.L.; Choi, D. W. Measurement of Intracellular Free Zinc in Living Neurons, *Neurobiol. Dis.*, 1997, 4, 275-279.
- [86] Gee, K. R.; Zhou, Z.-L.; Ton-That, D.; Sensi, S.L. Weiss, J. H. Measuring zinc in living cells.: A new generation of sensitive and selective fluorescent probes, *Cell. Calcium*, 2002, 31, 245-251.
- [87] Walkup, G. K.; Burdette, S. C.; Lippard, S. J.; Tsien, R. Y. A New Cell-Permeable Fluorescent Probe for Zn^{2+} , *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, 122, 5644-5645.
- [88] Burdette, S. C.; Walkup, G. K.; Spingler, B.; Tsien, R. Y.; Lippard, S. J. Fluorescent Sensors for Zn^{2+} Based on a Fluorescein Platform: Synthesis, Properties and Intracellular Distribution, *J. Am. Chem. Soc.* 2001, 123, 7831-7841.
- [89] Burdette, S. C.; Frederickson, C. J.; Bu, W.; Lippard, S. J. ZP4, an Improved Neuronal Zn^{2+} Sensor of the Zinpyr Family, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, 125, 1778-1787.
- [90] Chang, C. J.; Nolan, E. M.; Jaworski, J.; Burdette, S. C.; Sheng, M.; Lippard, S. J. Bright Fluorescent Chemosensor Platforms for Imaging Endogenous Pools of Neuronal Zinc, *Chem. Biol.*, 2004, 11, 203-210.
- [91] Nolan, E. M.; Burdette, S. C.; Harvey, J. H.; Hilderbrand, S. A.; Lippard, S. J. Synthesis and Characterization of Zinc Sensors Based on a Monosubstituted Fluorescein Platform, *Inorg. Chem.*, 2004, 43, 2624-2635.
- [92] Chang, C. J.; Nolan, E. M.; Jaworski, J.; Okamoto, K.-I.; Hayashi, Y.; Sheng, M.; Lippard, S. J. ZP8, a Neuronal Zinc Sensor with Improved Dynamic Range; Imaging Zinc in Hippocampal Slices with Two-Photon Microscopy, *Inorg. Chem.*, 2004, 43, 6774-6779.
- [93] Hirano, T.; Kikuchi, K.; Urano, Y.; Higuchi, T.; Nagano, T. Highly Zinc-Selective Fluorescent Sensor Molecules Suitable for Biological Applications, *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, 122, 12399-12400.

- [94] Hirano, T.; Kikuchi, K.; Urano, Y.; Higuchi, T.; Nagano, T. Improvement and Biological Applications of Fluorescent Probes for Zinc, ZnAFs, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124, 6555-6562.
- [95] Maruyama, S.; Kikuchi, K.; Hirano, T.; Urano, Y.; Nagano, T. A Novel, Cell-Permeable, Fluorescent Probe for Ratiometric Imaging of Zinc Ion, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124, 10650-10651.
- [96] Huston, M. E.; Haider, K. W.; Czarnik, A. W. Chelation enhanced fluorescence in 9,10-bis{[(2-(dimethylamino)ethyl)methylamino]methyl}anthracene, *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, 120, 4460-4462.
- [97] Koike, T.; Watanabe, T.; Aoki, S.; Kimura, E.; Shiro, M. A Novel Biomimetic Zinc(II)-Fluorophore, Dansylamidoethyl-Pendant Macroyclic Tetraamine 1,4,7,10-Tetraazacyclododecane (Cyclen), *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, 118, 12696-12703.
- [98] Hirano, T.; Kikuchi, K.; Urano, Y.; Higuchi, T. Nagano, T. Novel Zinc Fluorescent Probes Excitable with Visible Light for Biological Applications, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2000**, 39, 1052-1054.
- [99] Kaletas, B. K.; Williams, R. M.; König, B.; De Cola, L. Strong fluorescence enhancement of 2-bromo-3-(1*H*-indol-3-yl)maleimide upon coordination to a Lewis-acidic metal complex, *Chem. Commun.*, **2002**, 776-777.
- [100] Han, M. S.; Kim, D. H. Readily Available Fluorescence Probes for Zinc Ion in Aqueous Solution of Neutral pH, *Supramol. Chem.*, **2003**, 15, 59-64.
- [101] Tsein, R. Y. New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: design, synthesis, and properties of prototype structures, *Biochemistry*, **1980**, 19, 2396-2404.
- [102] Gee, K. R.; Zhou, Z.-L.; Qian, W. J.; Kennedy, R. Detection and Imaging of Zinc Secretion from Pancreatic β -Cells Using a New Fluorescent Zinc Indicator, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124, 776-778.
- [103] Sensi, S. L.; Ton-That, D.; Weiss, J. H.; Rothe, A.; Gee, K. R. A new mitochondrial fluorescent zinc sensor, *Cell Calcium*, **2003**, 34, 281-284.
- [104] Gunnlaugsson, T.; Lee, T. C.; Parkesh, R. A highly selective and sensitive fluorescent PET (photoinduced electron transfer) chemosensor for $Zn(II)$. *Org. Biomol. Chem.*, **2003**, 1, 3265-3267.
- [105] Henary, M. M.; Fahrni, C. Excited state intramolecular proton transfer and metal ion complexation of 2-(2'-hydroxyphenyl)benzazoles in aqueous solution. *J. Phys. Chem. A*, **2002**, 106, 5210-5220.
- [106] Henary, M. M.; Wu, Y.-G.; Fahrni, C. Zinc(II)-Selective Ratiometric Fluorescent

- Sensors Based on Inhibition of Excited-States Intramolecular Proton Transfer, *Chem. Eur. J.*, 2004, 20, 3015-3025.
- [107] Castagnetto, J. M.; Canary, J. W. A chiroptically enhanced fluorescent chemosensor, *Chem. Commn.*, 1998, 203-204.
- [108] Goze, C.; Ulrich, G.; Charbonnière, L.; Cesario, M.; Prangé, T.; Ziessel, R. Cation Sensors Based on Terpyridine-Functionalized Boradiazaindacene, *Chem. Eur. J.*, 2003, 9, 3748-3755.
- [109] Hanaoka, K.; Kikuchi, K.; Kojima, H.; Urano, Y.; Nagano, T. Selective Detection of Zinc Ions with Novel Luminescent Lanthanide Probes, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2003, 42, 2996-2999.
- [110] Walkup, G. K.; Imperiali, B. Design and Evaluation of a Peptidyl Fluorescent Chemosensor for Divalent Zinc, *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, 118, 3053-3054.
- [111] Godwin, H. A.; Berg, J. M. A Fluorescent Zinc Probe Based on Metal-Induced Peptide Folding, *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, 118, 6514-6515.
- [112] Lu, Y. New Transition-Metal-Dependent DNAzymes as Efficient Endonucleases and as Selective Metal Biosensors, *Chem. Eur. J.*, 2002, 8, 4588-4596.
- [113] Lu, Y.; Liu, J.; Li, J.; Brueschoff, P.J.; Pavot, C. M. B.; Brown, A. K. New highly sensitive and selective catalytic DNA biosensors for metal ions, *Biosensors. Bioelectron.*, 2003, 18, 529-540.
- [114] Kawakami, J.; Imanaka, H.; Yokota, Y.; Sugimoto, N. In vitro selection of aptamers that act with Zn^{2+} , *J. Inorg. Biochem.*, 2000, 82, 197-206.
- [115] 吴世康, 荧光化学传感器研究中的光化学与光物理, 化学进展, 2004, 16, 174-183.
- [116] Grabowski, Z. R.; Rotkiewicz, K. Structure changes accompanying intramolecular electron transfer: focus on twisted intramolecular charge-transfer states and structures, *Chem. Rev.*, 2003, 103, 3899-4031.

第二章 丹磺酰胺类荧光分子探针

2.1 分子设计思想

1940年, Mann 和 Keilin 报道了磺酰胺能够抑制含有锌的碳酸酐酶(CA)的活性^[1], 如式 2-1 所示。1967 年, Chen 和 Kernohan 提出牛血红细胞 CA 和等摩尔的丹磺酰胺能形成 1:1 的络合物, 发出强烈的荧光^[2], 解离常数 $K_d = 0.25\mu M$ 。荧光光谱在结合 Zn^{2+} 后的大幅度蓝移是由于丹磺酰胺的结合位点屏蔽性好, 疏水性强, 并且磺酰胺在结合 CA 时失去一个质子(成为 SO_2NH^-)。所以丹磺酰胺被认为是一种很好的碳酸酐酶荧光探针或者 CA 凋亡后游离 Zn^{2+} 荧光探针。

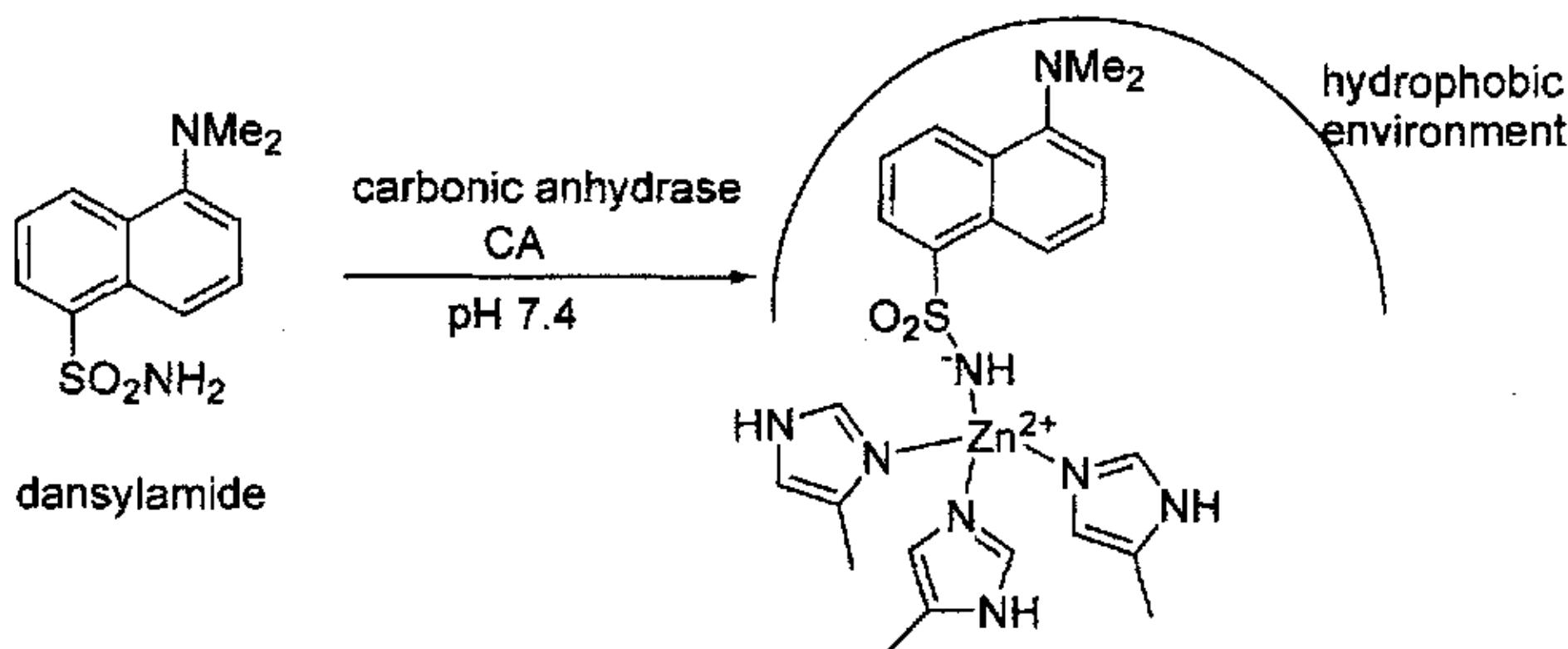


图 2-1 丹磺酰胺和碳酸酐酶的结合

Figure 2-1 The combination of dansylamide with carbonic anhydrase

Koike 研究小组对丹磺酰胺乙基外挂大环四胺 1,4,7,10-四环烯研究表明, 该分子和 Zn^{2+} 络合后形成扭曲的四面锥体, 表现出一定的荧光增强^[3]。但由于环状配位结构决定了探针分子与金属离子结合的速度很慢, 使这种探针分子不适合在生物体系中实时监测。此类探针分子对 Zn^{2+} 的作用原理一般解释为金属络合诱导荧光增强。

近年来, 吡啶类衍生物作为荧光分子探针的识别基团得到了广泛应用, 特别是二(2-吡啶甲基)胺(DPA)被经常用于 Zn^{2+} 的荧光分子探针中, 提供三个氮原子, 是明确的中性 Zn^{2+} 配体。众所周知, N,N,N',N' -四(2-吡啶甲基)

乙二胺(TPEN)是一种中性螯合剂, 和 Zn^{2+} 有很好的亲和性($K_d = 2.6 \times 10^{-16} M$), 但和 Ca^{2+} 的亲和性较弱 ($K_d = 4.0 \times 10^{-5} M$)^[4,5]。所以类似 TPEN 的荧光分子探针相对 Ca^{2+} 而言, 对 Zn^{2+} 有很好的选择性, DPA 氨基上的氮原子在 PET 和 ICT 探针中都是电子给体。另外, DPA 的这种链状敞开式结构使它能够快速与金属离子络合, 保证检测的实时性。所以, 本文在分子设计上, 选择丹磺酰胺作为荧光母体, 根据光诱导电子转移, 通过乙撑基连接 DPA 作为识别基团, 进一步提高分子探针对 Zn^{2+} 的选择性及灵敏性。主要分子结构如下:

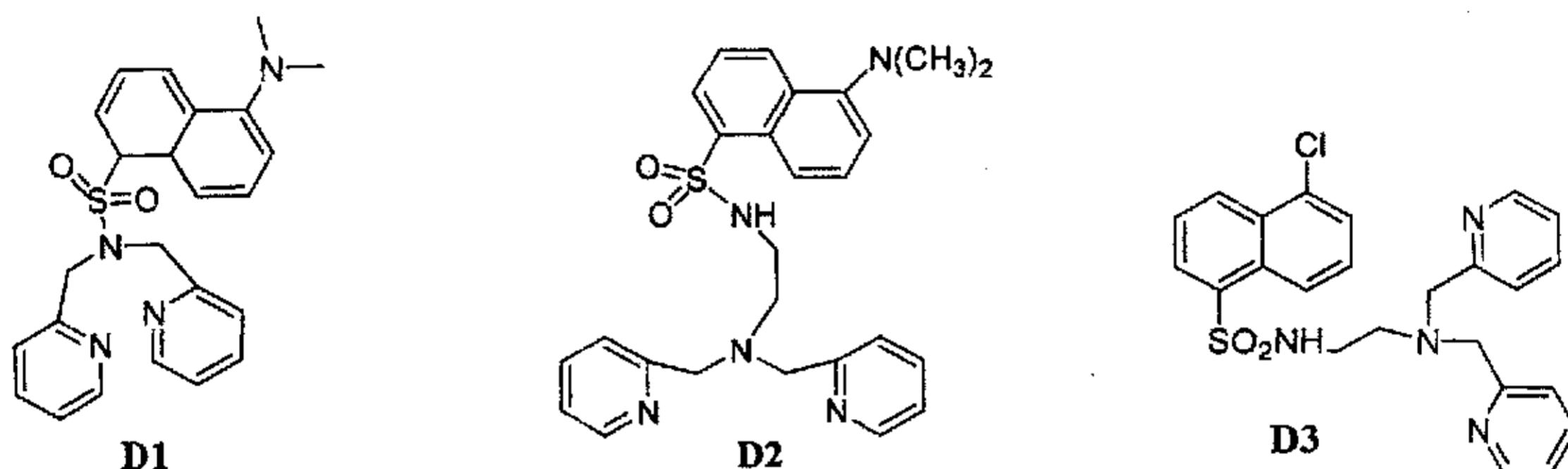


图 2-2 荧光分子探针的结构

Figure 2-2 The structures of fluorescent probes

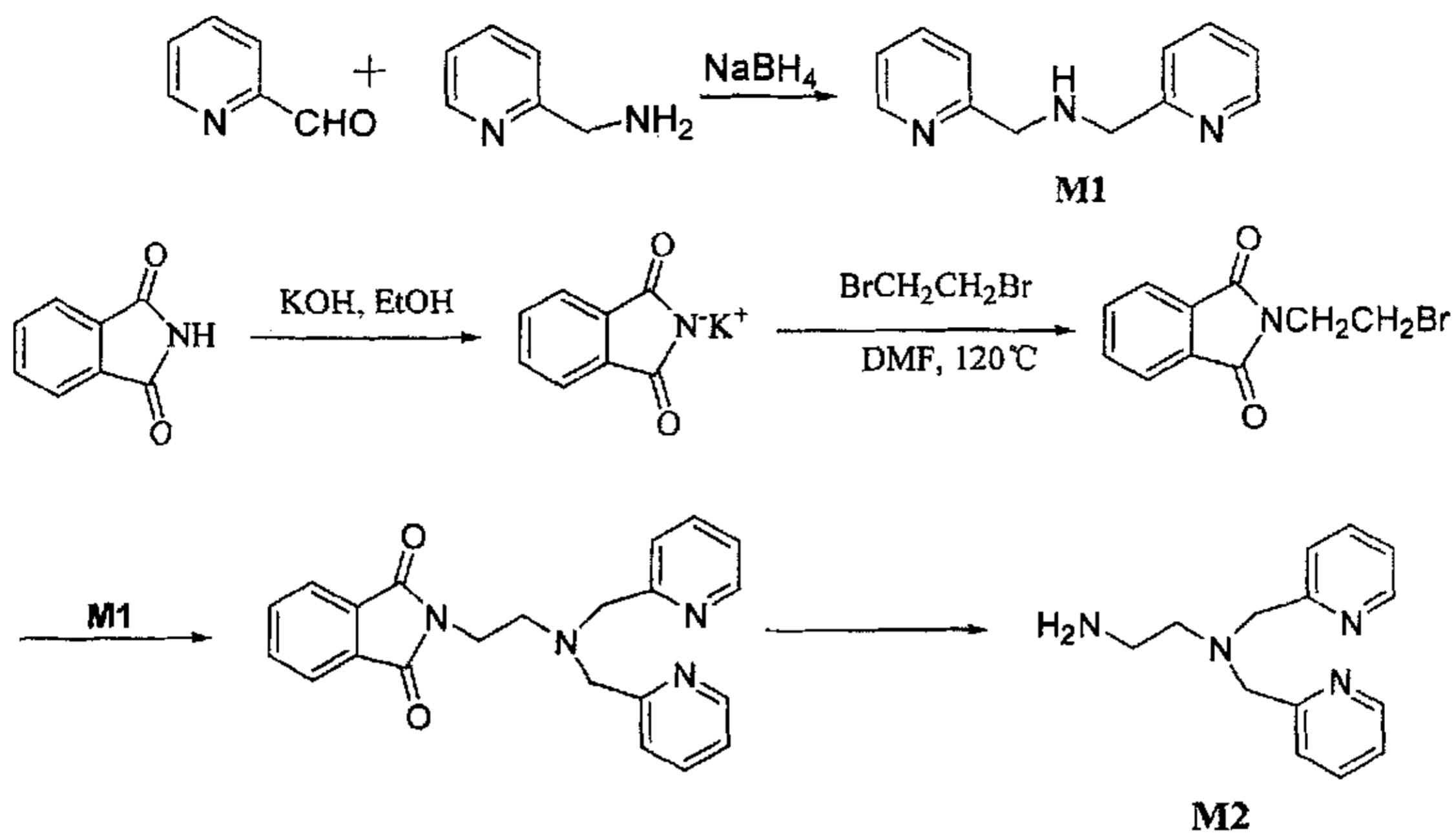
2.2 合成路线

2.2.1 中间体合成路线

如式 2-1 所示, 以吡啶-2-甲醛和 2-氨基吡啶为原料在室温下反应生成西佛碱, 硼氢化钠还原得到中间体二(2-吡啶甲基)胺 M1(DPA)^[6]; 以邻苯二甲酰亚胺为起始原料经溴乙烷化生成 β -溴乙基邻苯二甲酰亚胺, 和中间体 M1 反应, 水合肼脱去保护基, 继而生成中间体 N,N -二(2-吡啶甲基)乙二胺 M2^[7]。

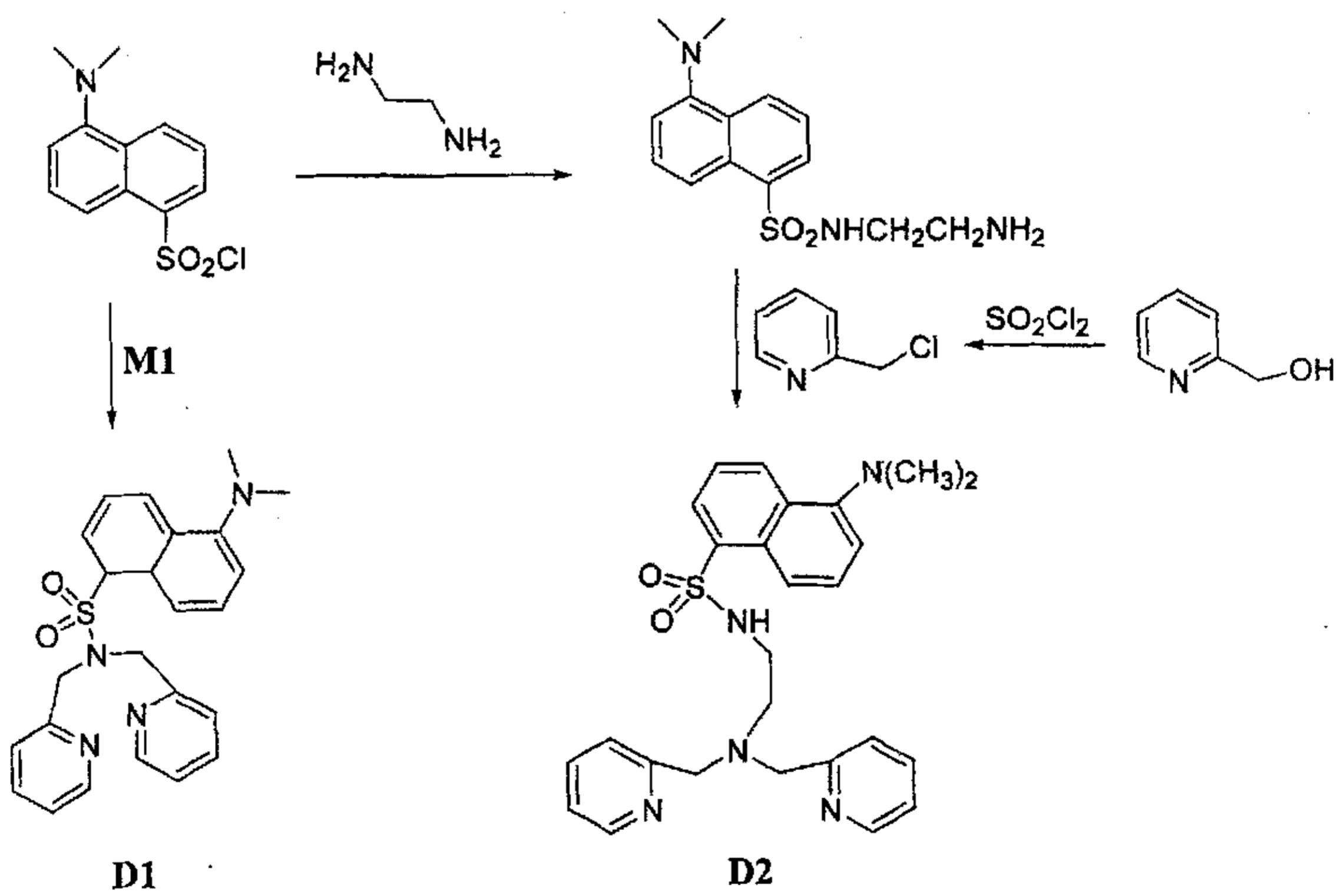
2.2.2 化合物 D1 和 D2 的合成路线

以丹磺酰氯为原料与中间体 M1 反应生成目标化合物 D1；与乙二胺发生取代反应生成 5-二甲胺基-1-萘磺酰乙二胺，最后和 2-氯甲基吡啶反应生成目标化合物 D2。



式 2-1 识别中间体的合成

Scheme 2-1 Synthesis of the recognition intermediates

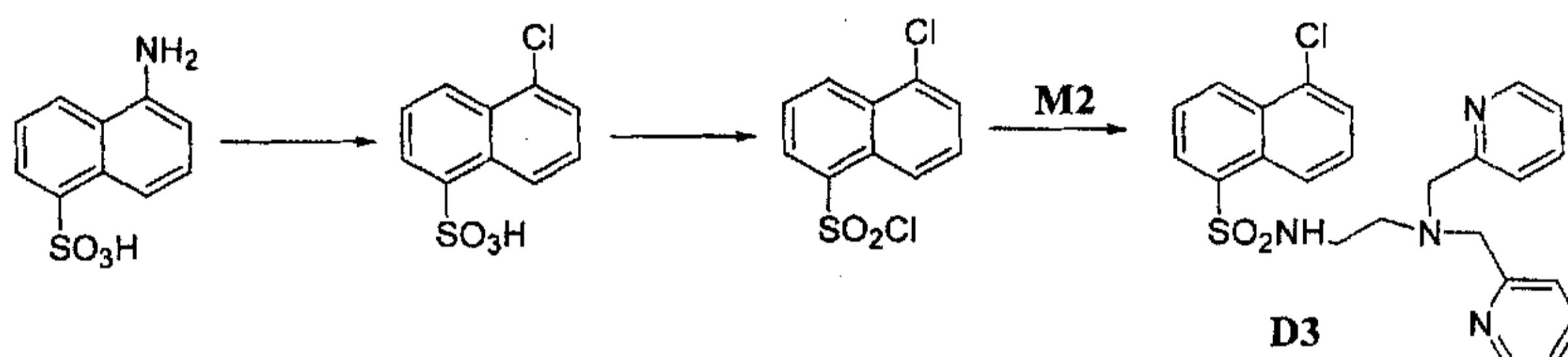


式 2-2 荧光分子探针 D1 和 D2 的合成

Scheme 2-2 Synthesis of fluorescent probes D1 and D2

2.2.3 化合物 D3 的合成

5-氨基-1-萘磺酸经重氮化反应后，与五氯化磷反应得到 5-氯萘磺酰氯^[8]，与中间体 M2 反应得到目标化合物 D3。



式 2-3 荧光分子探针 D3 的合成

Scheme 2-3 Synthesis of fluorescent probes D3

2.3 实验部分

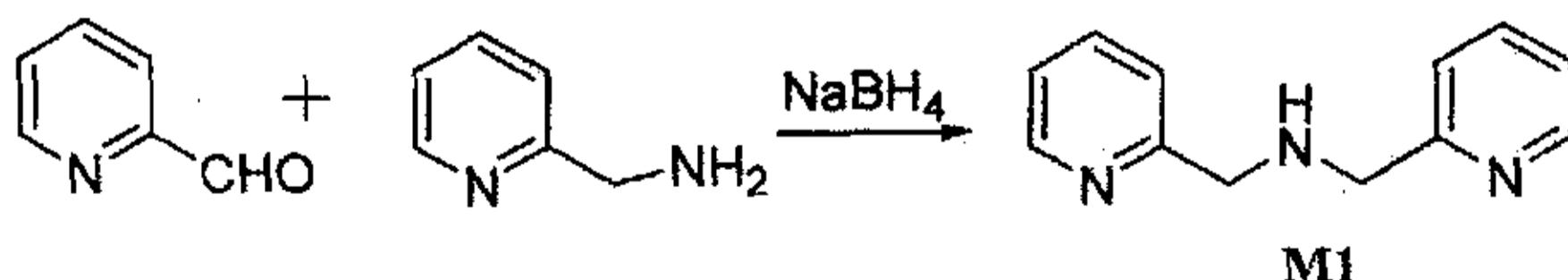
2.3.1 原料与仪器

丹磺酰氯，2-氨基甲基吡啶、吡啶-2-甲醛购自 Aldrich 公司。其它合成原料及溶剂均为市售化学品。柱色谱硅胶为青岛海洋化工厂产品 (200-300 mesh)。

HP1100 HPLC/MS 质谱仪 (美国 HP 公司), Varian INOVA 400 (400MHz) 核磁共振仪 (美国 Varian 公司, TMS 为内标), elementar vario EL III 元素分析仪, X-6 显微熔点测定仪 (北京泰克仪器有限公司), HP-8453 紫外-可见分光光度计, PTI00 荧光分光光度计, BS-210S 万分之一电子天平 (德国 Satorius 公司), PB-20 标准型 pH 计 (德国 Sartorius 公司), 荧光量子产率的计算以硫酸喹啶 (0.55) 在 0.05 N 硫酸中为标准。

2.3.2 中间体的合成及结构表征

2.3.2.1 M1 的合成及结构表征



2.16g(0.02mol)的2-氨基甲基吡啶边搅拌边滴加到溶解在 50ml, 99% 乙醇中的

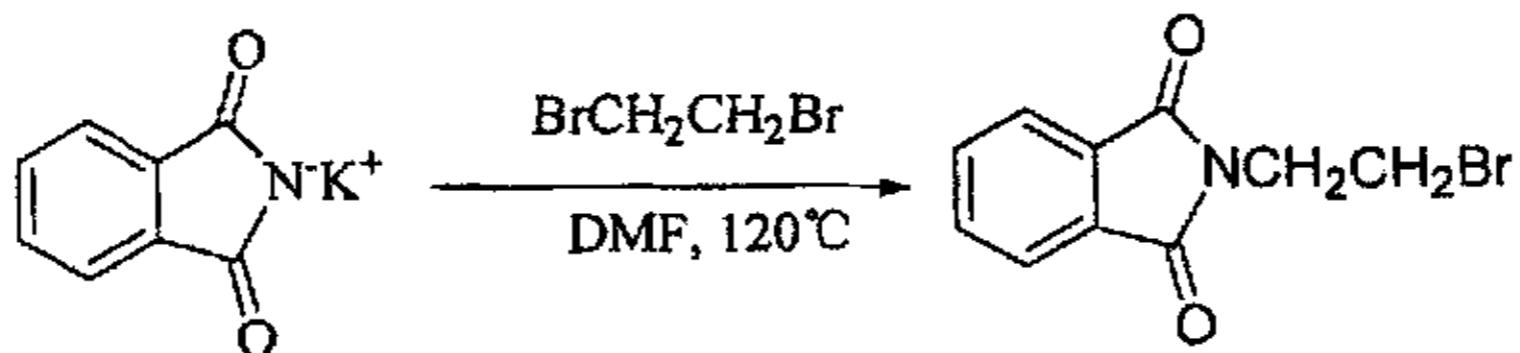
吡啶-2-甲醛2.14g(0.02mol)的溶液中，随后分次加入1.5g(0.04mol)硼氢化钠，室温下继续搅拌2.5h，过滤，冰冷却滤液。12mol/l盐酸酸化溶液到pH 4，加入60ml, 99%乙醇和100ml乙醚，静置，固体析出后用乙醇洗，得到M1的盐酸盐。少量水溶解后，加入氢氧化钠调节pH 7，二氯甲烷萃取后，真空旋转蒸干溶剂，得到黄色油状物M1，收率：40% (1.6g)。

1H -NMR($CDCl_3$) δ 8.46(d, J = 7.5 Hz, 2H), 7.07(m, 4H), 6.62(m, 2H), 3.90(s, 4H), 2.52(s, 1H). API-ES MS m/z (+): 200([M+H] $^+$).

2.3.2.2 M2的合成及结构表征



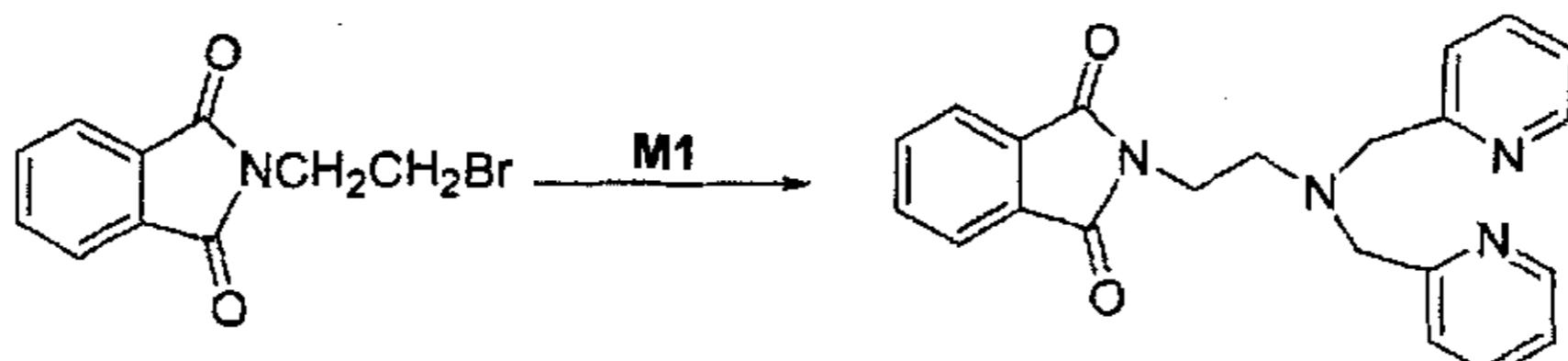
邻苯二甲酰亚胺钾盐的合成：在装有直形冷凝管的500ml单口圆底烧瓶中，加入160ml无水乙醇，搅拌，分次加入邻苯二甲酰亚胺20g(0.136mol)加热回流直至全溶。继续搅拌1h，加入8%氢氧化钾(7.616g, 0.136mol)的甲醇溶液120ml后，立刻有乳白色絮状沉淀。继续搅拌3h。冷却后过滤，固体用乙醇洗，干燥，得到白色片状晶体，产率：92% (23.409g)。



β -溴乙基邻苯二甲酰亚胺的合成：9.25g(0.05mol)的邻苯二甲酰亚胺钾盐和17.3ml(0.2mol)的1,2-二溴乙烷混合，加入邻苯二甲酰亚胺质量的3%的聚乙二醇为相转移催化剂，丙酮为溶剂，加热回流3h。冷却后过滤，蒸出溶剂后减压蒸馏出过量的1,2-二溴乙烷及聚乙二醇。剩余物加少量水，二氯甲烷萃取。合并有机相，蒸掉 CH_2Cl_2 ，无水乙醇重结晶(活性炭脱色)。得到白色溴乙基邻苯二甲酰亚胺。收率：63.1%(7.98g)。

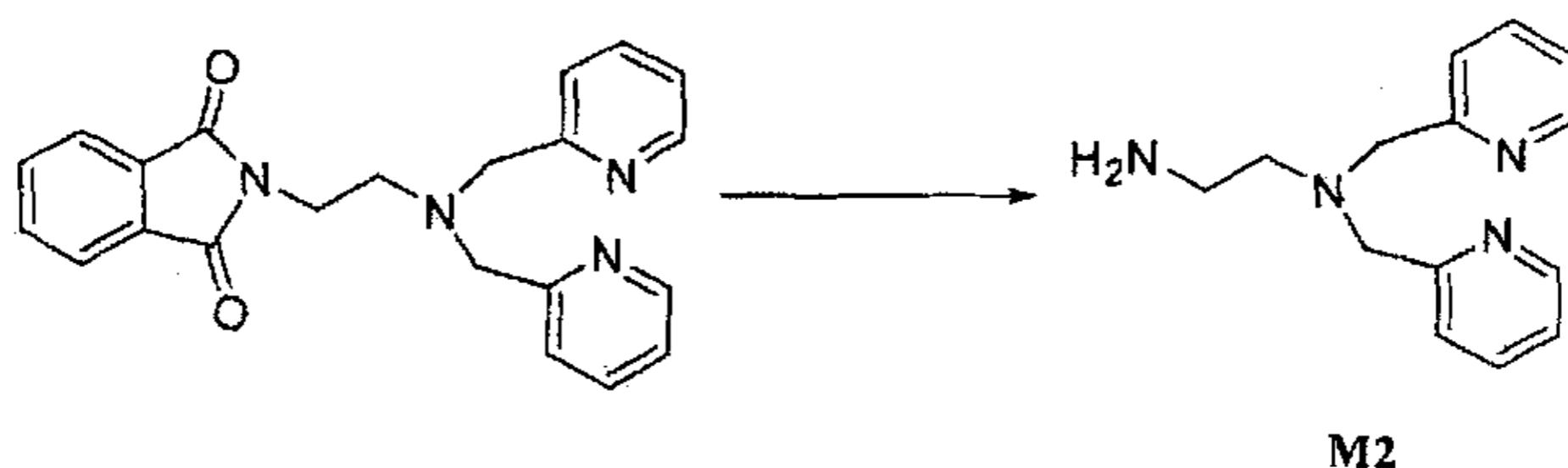
原文献中采用 N,N -二甲基甲酰胺为溶剂，反应温度为120°C，反应9h。

这样，不仅反应温度高，溶剂后处理也麻烦，最重要的是产率不高。本文对文献方法进行了改进，采用聚乙二醇为相转移催化剂，丙酮作溶剂，降低了反应温度，大大提高了产品收率。



2-[2-(吡啶-2-黄甲基胺)乙基]邻苯二甲酰亚胺的合成：4.2g(30.4mmol)无水碳酸钾和0.15g(0.01mmol)碘化钾溶解在精制的75ml乙腈中。中间体M1 2g(10.1mmol)加入到上述溶液中，随后加入2.56g(10.1mmol)的 β -溴乙基邻苯二甲酰亚胺，混合物加热回流24h，过滤，浓缩，得到红色油状物。将此红色油状物溶解在20ml CH_2Cl_2 中，溶液用每次20ml的饱和NaOH溶液洗三次，20ml的水洗两次，蒸出溶剂，得到黑红色油状物。加入2mol/l的盐酸溶液14ml，溶液用每次10ml的 CH_2Cl_2 洗五次，再用无水碳酸钠仔细碱化至pH 8-9。棕灰色固体沉淀下来，用每次15ml的二氯甲烷萃取4次，减压浓缩得到黑棕色固体，用硅胶柱分离(展开剂： $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH} = 20:1$)，得到棕褐色固体。收率：74% (2.77g)。

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3): δ 8.45 (d, 2H, $J = 4.8$), 7.84 (dd, 2H, $J_1 = 3.2$, $J_2 = 2.8$), 7.75 (dd, 2H, $J_1 = 3.2$, $J_2 = 2.8$), 7.44 (td, 2H, $J_1 = 2.0$, $J_2 = 1.6$), 7.36 (d, 2H, $J = 7.6$), 7.08 (t, 2H, $J = 6.0$), 3.86 (m, 6H), 2.87 (t, 2H, $J = 6.0$). $^{13}\text{C-NMR}$ (100MHz, CDCl_3): δ 168.28, 159.42, 149.03, 136.39, 133.96, 132.38, 123.27, 123.15, 122.1, 60.4, 51.8, 36.2. API-ES MS m/z (+): 373([M+H] $^+$), 395([M+Na] $^+$)

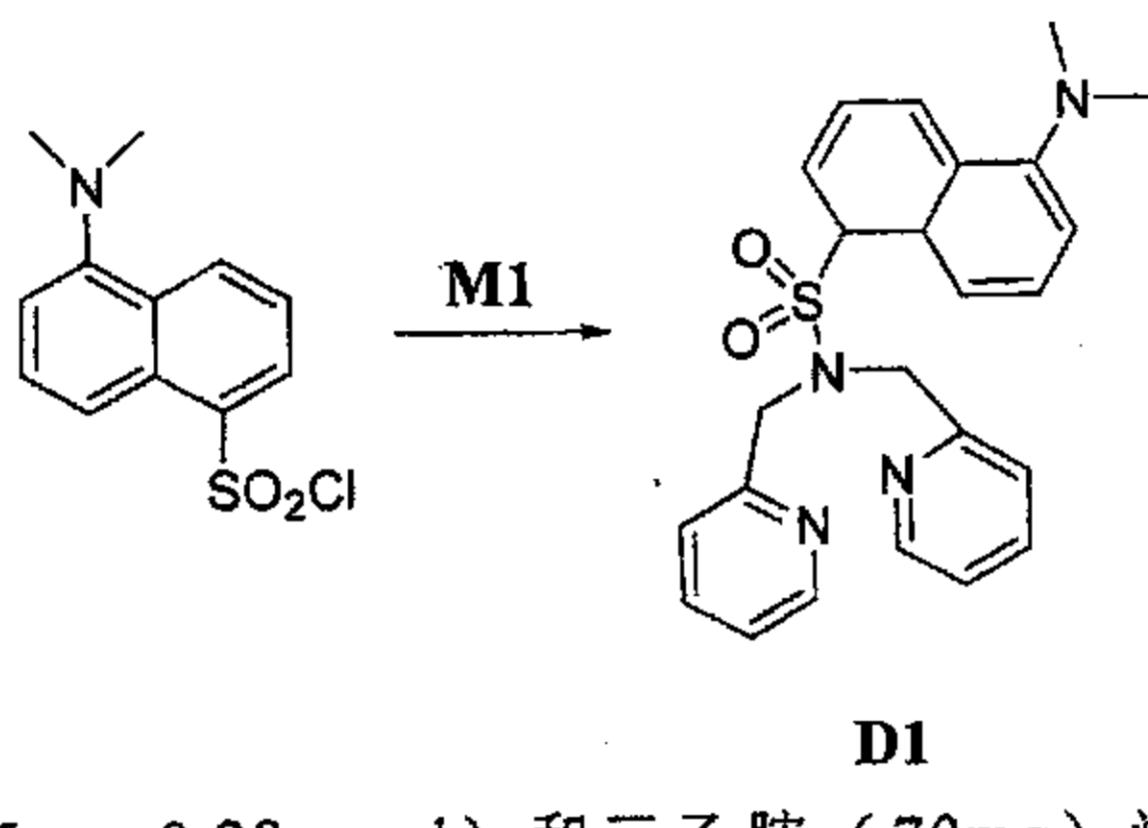


N,N-2-甲基吡啶-乙二胺(中间体M2)的合成：水合肼1.1mol(65mg)溶解在精制乙醇中，加入到2-[2-(吡啶-2-黄甲基胺)乙基]邻苯二甲酰亚胺

(0.2g)的乙醇溶液中，再加 6ml 乙醇稀释，加热回流 3 小时（1 小时后产生白色沉淀）。蒸干溶剂后，加入 2mol/l 的盐酸溶液 20ml，再加入 12mol/l 盐酸 1ml。将悬浮液在 50℃下搅拌 2 小时，再在室温下搅拌 24 小时，过滤，浓缩。将浓缩物溶解在 5ml 水中。加入 15% 的氢氧化钠溶液直到溶液变成红色，得到红色油状物，用每次 10ml 的二氯甲烷萃取 3 次。合并有机相，蒸干溶剂得橙色油状物。收率：75.4% (1.136g)。

¹H-NMR (400MHz, CDCl₃): δ 8.54 (d, 2H, *J* = 5.2), 7.67(t, 2H, *J* = 8.0), 7.48 (d, 2H, *J* = 8.0), 7.17 (t, 2H, *J* = 6.0), 3.85 (s, 4H), 2.84 (t, 2H, *J* = 5.6), 2.71 (t, 2H, *J* = 5.6). ¹³C-NMR (100MHz, CDCl₃): δ 160.55, 149.36, 135.78, 122.89, 121.71, 60.37, 51.79, 36.22. API-ES MS m/z(+): 243([M+H]⁺), 265([M+Na]⁺).

2.3.3 D1 的合成及结构表征

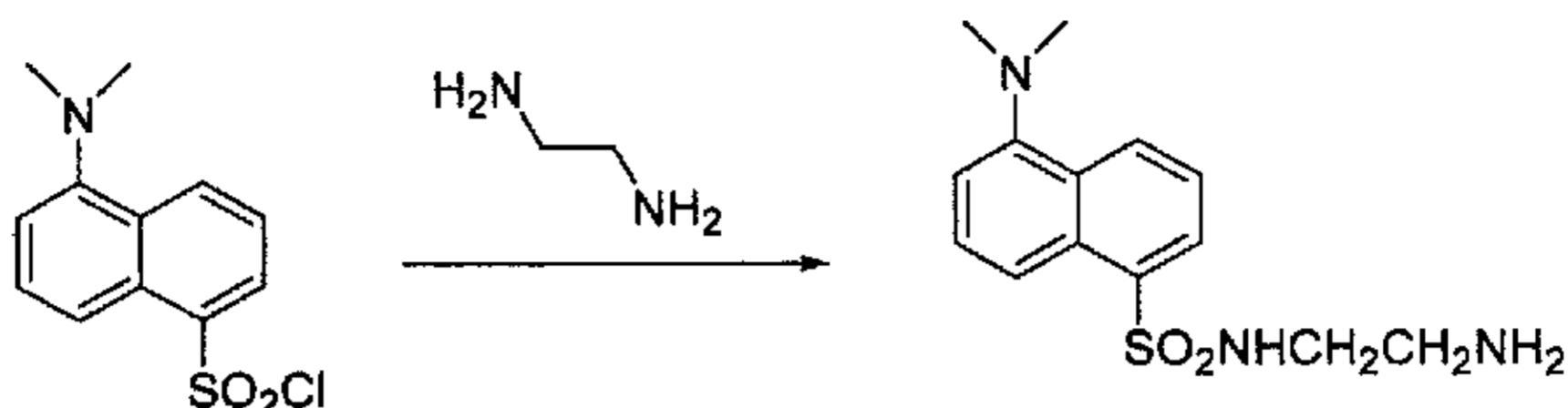


丹磺酰氯 (75mg, 0.28mmol) 和三乙胺 (70mg) 溶解在 CH_2Cl_2 (5ml) 中，缓慢滴加到中间体 **M1**(140mg, 0.7mmol) 的 CH_2Cl_2 (6ml) 溶液中，室温下搅拌反应 10h。蒸干溶剂后，硅胶柱分离（展开剂： $\text{CH}_2\text{Cl}_2 / \text{MeOH} = 50:1$ ）得到淡黄色固体 **D1**。收率：60% (72.5mg)，熔点：89-90°C。

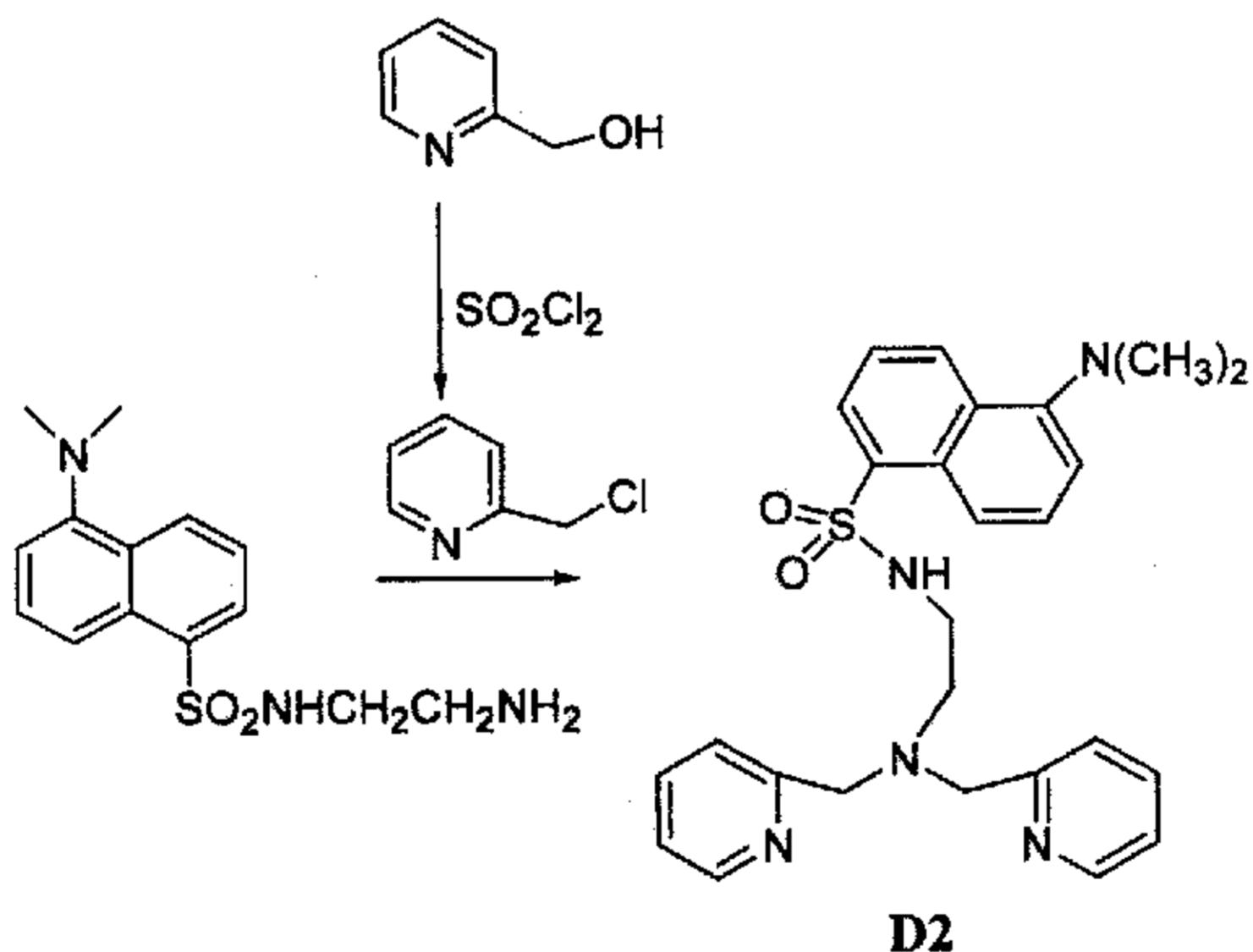
¹H-NMR(400Hz, CDCl₃): δ 8.50 (d, 1H, *J* = 8.4Hz), 8.40 (2d, 3H, *J₁* = 8.8Hz, *J₂* = 4.4Hz), 8.23 (d, 1H, *J* = 7.6Hz), 7.54 (t, 1H, *J* = 8.0Hz), 7.40-7.46 (m, 3H), 7.17 (m, 3H), 7.04 (m, 2H), 4.74 (s, 4H), 2.87 (s, 6H). ¹³C-NMR(100Hz, CDCl₃): δ 156.3, 151.7, 149.0, 136.5, 135.3, 130.1, 129.8, 128.2, 123.2, 122.5, 122.3, 119.6, 115.3, 53.4, 45.6. API-ES MS m/z(+): 433([M+H]⁺). Anal. Calcd for C₂₄H₂₄N₄O₂S: C, 66.48; H, 5.54; N, 12.93; S, 7.39. Found: 66.28; H, 5.52; N,

12.89; S, 7.36.

2.3.4 D2 的合成及结构表征



5-*N,N*-二甲基-胺乙基萘磺酰胺的合成：三口圆底烧瓶中，氮气保护，快速搅拌下，将丹磺酰氯（2g, 7.4mmol）溶解在 5ml CH₂Cl₂ 中，然后转移到恒压滴液漏斗中，在 15min 内滴加到溶解有乙二胺（33ml, 494mmol）的 50ml CH₂Cl₂ 溶液中。反应液在室温下搅拌 4h 后，转移到分液漏斗中，水洗 3 次。其中第二次洗涤时，用饱和食盐水除去已经形成的乳状液。CH₂Cl₂ 相用无水 MgSO₄ 干燥，蒸掉溶剂，真空干燥后得到黄绿色晶体 5-二甲胺基-1-萘磺酰乙二胺，收率：87% (2.06g)，熔点：149-150℃。



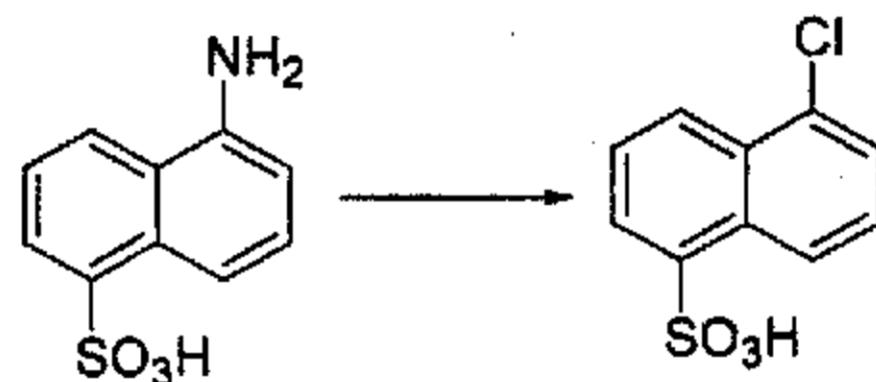
2-氯甲基吡啶盐酸盐的合成：冰浴下，将 2-羟甲基吡啶非常缓慢地滴加到五倍过量（摩尔比）的二氯亚砜中。滴加完毕后，加热回流 3 小时，冷却。搅拌下，加入乙醚使产品析出，过滤，静置干燥，得到淡黄色固体，产率 95%。

0.1g (0.34mmol) 5-二甲胺基-1-萘磺酰乙二胺溶解在 5ml 乙醇中，0.167g(1.02mmol) 2-氯甲基吡啶盐酸盐溶解在 0.2ml 水中。把两种溶液混合在

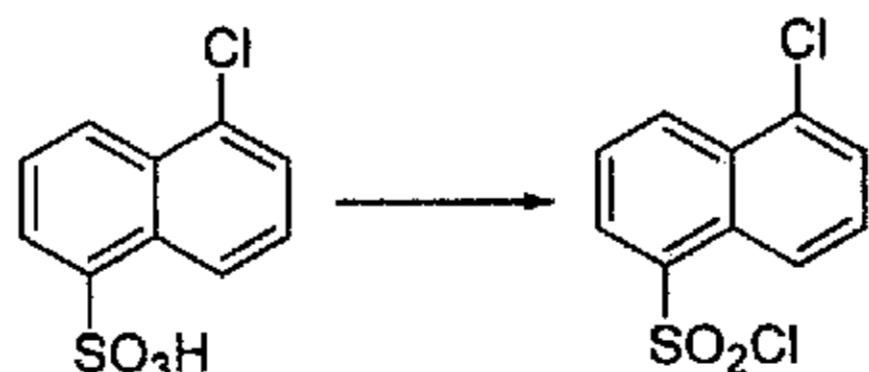
一起。搅拌 10 分钟后，缓慢滴加 0.13ml(10M) 氢氧化钠。混合物加热回流 3 小时，蒸发掉溶剂。剩余物溶解于少量水中，20ml 乙醚萃取 3 次。合并有机相，无水 Na_2SO_4 干燥后蒸发掉溶剂。硅胶柱提纯（展开剂： $CH_2Cl_2/MeOH = 100/1-50/1$, 1% 三乙胺）后得到浅绿色晶体 **D2**，产率：40%(0.064g)。熔点：129-130°C

1H -NMR (400MHz, $CDCl_3$): δ 8.59 (d, 2H, $J = 4.4$ Hz), 8.51 (m, 2H), 8.25 (d, 1H, $J = 7.2$ Hz), 8.14 (s, 1H), 7.39-7.52 (m, 4H), 7.09-7.15 (m, 5H), 3.71 (s, 4H), 3.02 (s, 2H), 2.85 (s, 6H), 2.77 (t, 2H, $J = 5.6$ Hz); ^{13}C -NMR (100MHz, $CDCl_3$): δ 158.9, 151.9, 149.1, 136.8, 135.6, 130.1, 129.4, 127.9, 123.4, 123.1, 122.3, 119.7, 115.1, 59.7, 53.3, 45.6, 41.6. API-ES MS, m/z (+): 476[$M+H]^+$. Anal. Calcd for $C_{26}H_{29}N_5O_2S$: C, 65.66; H, 6.15; N, 14.73; S, 6.74. Found: C, 65.53; H, 6.14; N, 14.70; S, 6.73.

2.3.5 **D3** 的合成及结构表征

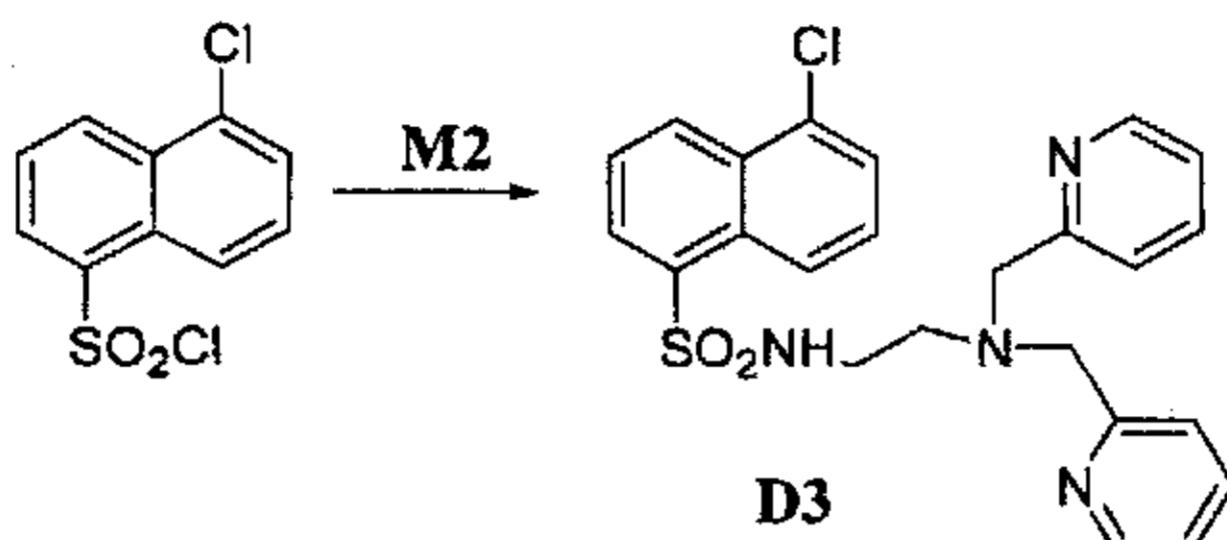


把 5-氨基-萘磺酸(7.37g, 33mmol)溶解在浓盐酸中成悬浮液，置于冰浴中，搅拌下滴加 10% 亚硝酸钠(22.9ml)溶液直至与 KI-淀粉试纸不再变蓝为止。反应 6h，反应温度控制在 0-5°C，将反应液与氯化亚铜 (25ml, 2mol/l) 的浓盐酸溶液混合，有大量气泡产生。室温下放置过夜，绿色固体悬浮析出，过滤后取滤饼。晾干水后，110°C 真空干燥得到浅绿色固体 5-氯-萘磺酸，收率：67.3%(5.379g)。



5-氯-萘磺酸加 5-6 倍质量的五氯化磷混合，搅匀（最好用烧杯反应）。逐渐升温到 80~90°C，固体变得潮湿、冒泡，呈稀糊状并有大量雾状气体逸出，

搅动至呈粘稠状为止。降温至 30℃左右，维持反应，放置过夜。粗品涂在滤纸上，室温下干燥。将滤纸与粗品放入索氏提取器，用 200 ml 30~60℃石油醚提取至无色（约 8h）。浓缩，静置后得到黄色结晶。再用二氯甲烷重结晶。可以得到淡黄色结晶 5-氯-萘磺酰氯，收率：67.6%，熔点：91-92℃



取 242mg 胺乙基 DPA，置于 10ml 圆底烧瓶，用 5ml 精制甲醇溶解，加入 260mg 5-氯-1-萘磺酰氯、少量无水硫酸钠，氩气保护，加热回流 3 小时。过滤，滤去硫酸钠，滤液蒸干。得黄色油状物，用少量二氯甲烷溶解，避光用硅胶柱分离（展开剂：CH₂Cl₂/MeOH = 50:1），得淡黄色油状物，真空干燥，得到黄色固体粉末 D3。收率：38%，熔点：129-130℃。

¹H-NMR(400 MHz, CDCl₃): δ 8.84 (d, 1H, *J* = 8.8Hz), 8.59 (d, 3H, *J* = 4.0), 8.52 (d, 1H, *J* = 8.8Hz), 8.34 (d, 1H, *J* = 4.0Hz), 7.65 (m, 2H), 7.51 (m, 2H), 7.41 (t, 1H, *J* = 8.0Hz), 7.16 (m, 2H), 7.05 (d, 2H, *J* = 7.6Hz). ¹³C-NMR (100MHz, CDCl₃): δ 136.74, 136.33, 132.90, 131.83, 130.10, 130.02, 129.96, 127.59, 127.27, 125.52, 124.61, 123.00, 122.39, 59.67, 53.28, 41.82. API-ES MS⁺ m/z(+)：467([M+H]⁺), 489.2([M+Na]⁺). Anal. Calcd. for C₂₄H₂₃ClN₄O₂S: C, 61.73; H, 4.96; Cl, 7.59; N, 12.00; S, 6.87. Found: 61.91; H, 4.97; Cl, 7.61; N, 12.39.

2.3.6 紫外及荧光光谱的测定

2.3.6.1 不同溶剂中的光谱研究

准确称取待测化合物，将其移入 5ml 容量瓶中，用二氯甲烷定容，配制成浓度 1.0×10^{-4} mol/l 的溶液。分别移取 0.5ml 溶液于 5ml 容量瓶中，用氮气吹干二氯甲烷，再分别用环己烷、甲苯、1,4-二氧六烷、四氢呋喃、乙酸乙酯、丙酮、乙腈和乙醇定容，待样品完全溶解后配制成浓度 1.0×10^{-6} mol/l 的溶液，

测定其紫外光谱。将利用不同溶剂中紫外光谱的最大吸收波长作为荧光光谱的激发波长，测定荧光光谱。

2.3.6.2 荧光量子产率的测定

样品荧光量子产率的测定以硫酸奎宁为基准，在 1N H_2SO_4 中 $\Phi_f = 0.55$ 。在未加入金属离子时，于荧光探针分子溶液中加入过量的 EDTA 以屏蔽样品溶液中金属离子对探针分子荧光强度的影响。通过改变浓度把基准物的吸光度调整到和待测物激发波长处的吸光度相同 ($A < 0.1$)。结果取三次测量的平均值，计算公式如下^[9]：

$$\Phi_{\text{sample}} = \Phi_{\text{standard}} \times \frac{\int_{\text{emission}}_{\text{sample}}}{\int_{\text{emission}}_{\text{standard}}}$$

式中： Φ_{sample} 和 Φ_{standard} 分别表示被测样品和标准化合物的荧光量子产率； \int_{emission} 和 \int_{standard} 分别表示在待测样品荧光强度积分范围内，待测样品和标准化合物的荧光积分强度。

2.3.6.3 不同 pH 的荧光光谱测定

1.0×10^{-5} mol/l 待测样品的水溶液，分别用不同浓度的盐酸或氢氧化钠调节酸碱性（加入量小于待测液体积的 1%），测其不同 pH 时的荧光光谱。

2.3.6.4 对金属离子的识别测定

在 pH 值荧光强度关系测定的基础上，选取荧光强度稳定的 pH 值进行金属离子识别实验。在 HEPES (N-2-羟乙基哌嗪-N'-2-乙磺酸) 缓冲溶液中，探针的浓度为 1.0×10^{-5} mol/l，分别加入 5.0×10^{-5} mol/l 的 $NaCl$ 、 KCl 、 $MgCl_2$ 、 $CaCl_2$ 、 $CoCl_2$ 、 $NiCl_2$ 、 $CdCl_2$ 、 $CuCl_2$ 、 $MnCl_2$ 、 $FeCl_2$ 、 $CrCl_3$ 和 $ZnSO_4$ 测定荧光光谱的变化。

2.3.6.5 Zn^{2+} 浓度对荧光强度的测定

准确称取待测化合物，将其分别移入 10ml 容量瓶中，用 DMSO 定容，配置成浓度为 1.0×10^{-4} mol/l 的溶液。分别移取 0.1ml 溶液于 10ml 容量瓶中，用缓冲溶液定容后，配制成 1.0×10^{-5} mol/l 的溶液。分别向待测化合物中不断加入 1M ZnSO₄ 水溶液，测定不同浓度时探针分子的荧光强度。

2.3.6.6 表观解离常数 K_d 的测定

准备 100mM(HEPES)缓冲溶液 (pH 7.4, I = 0.1 (NaCl))，其中包括 10mM NTA (氨三乙酸)。Zn²⁺-NTA 的络合稳定常数^[10]为 (20 °C, 0.1M KNO₃): pKa₁ = 9.73, pKa₂ = 2.49, pKa₃ = 1.89, logK(ZnL) = 10.66。游离 Zn²⁺ 的浓度计算如下^[11]:

$$[\text{Zn}^{2+}]_f = \frac{[\text{Zn}^{2+}]_{\text{total}}}{\beta' \alpha_M [\text{L}]_{\text{free}}} \quad \beta' = \frac{K_{(\text{ZnL})}}{\alpha_M \alpha_L}$$

$$[\text{L}]_{\text{free}} \approx [\text{L}]_{\text{total}} - [\text{Zn}^{2+}]_{\text{total}}$$

$$\alpha_L = 1 + 10^{(pK_{a1}-pH)} + 10^{(pK_{a2}+pK_{a1}-2pH)} + 10^{(pK_{a3}+pK_{a2}+pK_{a1}-3pH)}$$

其中 $[\text{Zn}^{2+}]_f$ 是游离 Zn²⁺ 浓度， $[\text{Zn}^{2+}]_{\text{total}}$ 是 Zn²⁺ 总浓度， α_M 是配位效应系数， α_L 是酸效应系数， $[\text{L}]_{\text{free}}$ 是游离氨三乙酸浓度， $[\text{L}]_{\text{total}}$ 氨三乙酸总浓度。这里， $[\text{L}]_{\text{total}}$ 设为 10 mM， $[\text{Zn}^{2+}]_{\text{total}}$ 为 0-9 mM。

将待测物溶解在上述缓冲溶液中配制成 1×10^{-6} mol/l 的溶液 10ml，每次加入 5μl Zn²⁺ 水溶液，按上述公式计算得游离 Zn²⁺ 的浓度分别为：0, 0.25, 0.52, 0.826, 1.17, 1.56, 2.00, 2.52, 3.12, 3.83, 4.68, 5.72, 7.02, 10.92, 18.72 nM，最后使 Zn²⁺ 浓度大大过量。溶液总体积增大不超过 2%。所测得的数据经 sigmoidal 拟合得到表观解离常数 K_d 。

2.4 结果与讨论

2.4.1 中间体及目标化合物的合成和结构表征

中间体 M1 和 M2 是参考文献改进后合成得到。在合成 M1 时，本文实验是将 2-吡啶甲醛慢速滴加到 2-胺甲基吡啶中，与文献的滴加顺序相反，但保

证了产物收率与文献相符。

在合成 β -溴乙基邻苯二甲酰亚胺时, 对文献报道的实验方法进行了较大改进。合成中加入聚乙二醇作为相转移催化剂, 丙酮作溶剂, 大大降低了反应温度, 不仅减少了反应时间, 而且产率得到提高。

在进行目标化合物的合成时, 利用的是芳碘酰基卤素的胺取代反应, 反应机理明确、简单易行, 收率较高。分离提纯时, 由于化合物本身带有一定的碱性, 容易在硅胶柱上吸附, 故而在展开剂中加入少量的三乙胺中和硅胶的酸性, 使产物更容易洗脱。这样操作, 使正相柱变成实际意义上的反相柱, 即极性大的产物先从硅胶柱上洗脱下来。

另外, 由于荧光团和识别基团都具有较好的亲水性, 有利于荧光探针分子在水溶液中的应用。

本章合成的目标化合物经核磁氢谱、核磁碳谱、质谱及熔点表征, 结构正确。典型化合物 D2 的 1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 谱图如下:

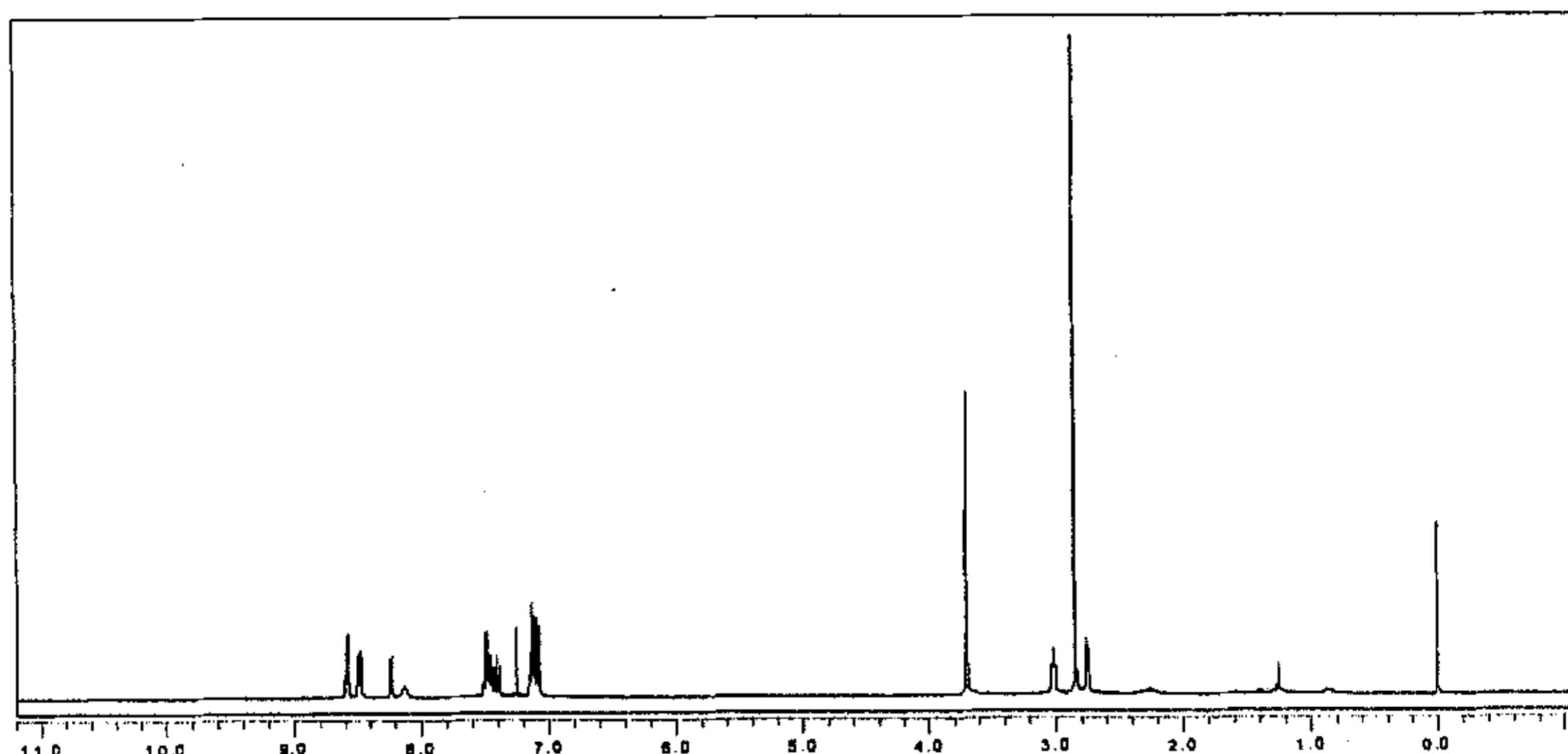


图 2-3 化合物 D2 的 1H -NMR 谱
Figure 2-3 The 1H -NMR spectrum of compound D2

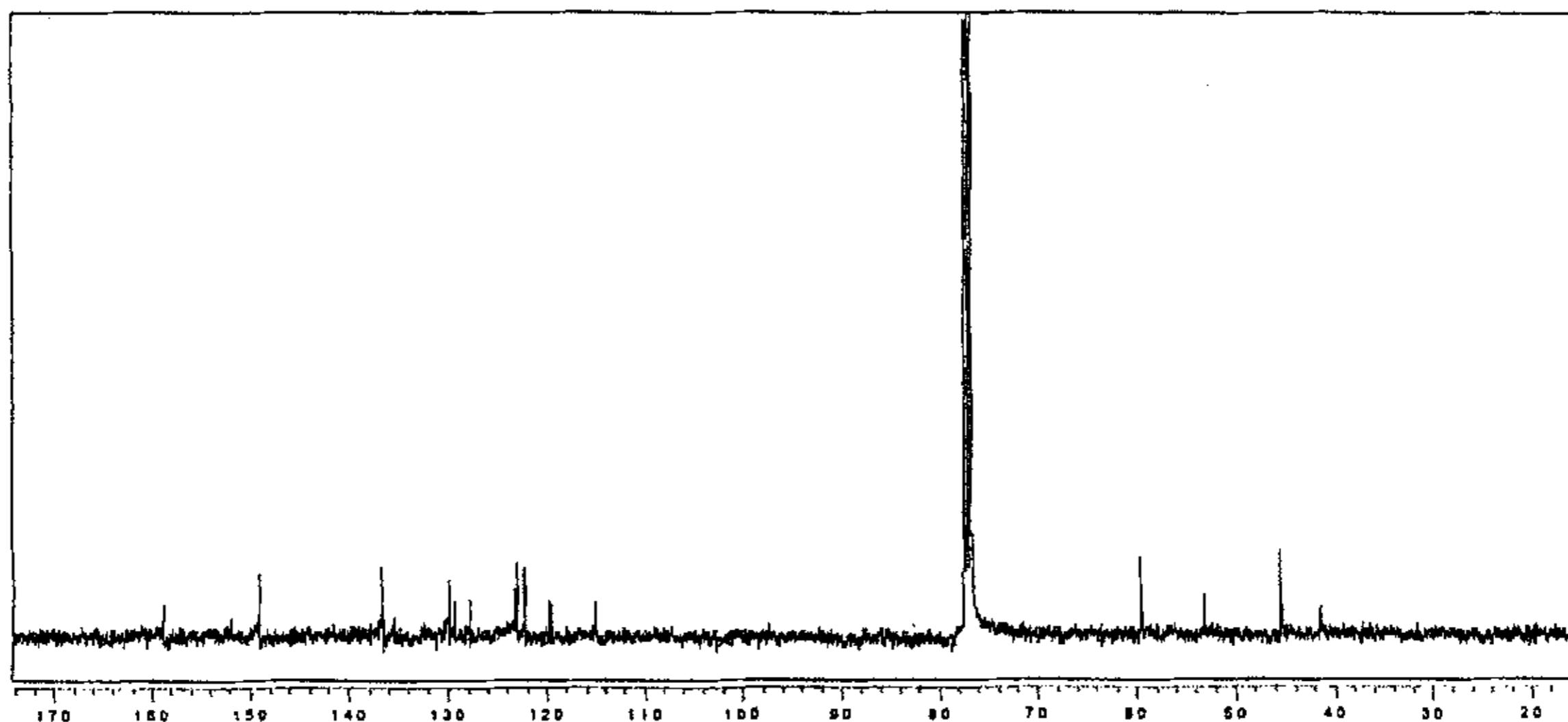


图 2-4 化合物 D2 的 ^{13}C -NMR 谱
Figure 2-4 The ^{13}C -NMR spectrum of compound D2

2.4.2 D1 和 D2 的吸收及荧光光谱

表 2-1 D1 和 D2(1×10^{-6} mol/l)在不同溶剂中的光谱数据
Table 2-1 Spectra data of compound D1 and D2(4×10^{-6} mol/l) in different solvents

		甲苯	四氢呋喃	乙酸乙酯	乙腈	乙醇	二甲基亚砜
D1	λ_{max}	337	338	338	340	340	340
	λ_{em}	486	505	531	529	529	538
	Φ_f	0.19	0.08	0.07	0.07	0.09	0.07
D2	λ_{max}	343	343	345	345	344	344
	λ_{em}	474	486	500	514	512	540
	Φ_f	0.27	0.17	0.19	0.14	0.13	0.12

表 2-1 为 D1 和 D2 在不同溶剂中的最大吸收波长、最大发射波长和量子产率。随着溶剂极性的增加, D1 和 D2 的吸收光谱基本不变, 而发射光谱有较大的红移, 这表明激发态分子有较大的偶极距, 说明分子处于激发态时有显著的分子内电荷转移。由于光诱导下存在从二甲氨基氮原子端经萘环到 DPA 端的分子内电荷转移, D1 和 D2 分子激发态的偶极矩大于基态时的偶极矩。

2.4.3 缓冲溶液中 **D1**、**D2** 和 **D3** 对金属离子的识别

为了避免加入各种金属盐引起溶液 pH 的变化而导致探针的荧光强度发生改变, 识别实验在缓冲溶液中进行。在 100mM 的 HEPES 缓冲溶液中 (pH = 7.4, DMSO:H₂O/1:9), 1×10^{-5} M 的底物中, 分别加入过量的常见金属离子(如: Zn^{2+} 、 K^+ 、 Na^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Cu^{2+} 和 Co^{2+} 。其中, 化合物 **D1** 和 **D3** 对任何金属离子都没有明显的响应, 而化合物 **D2** 对 Zn^{2+} 表现出特殊的选择性识别。所以, 这里以 **D2** 为例在表 2-2 中, 列举了各种金属离子对 **D2** 的荧光强度的影响。

表 2-2 不同金属离子(5×10^{-5} M) 存在下 **D2** (1×10^{-5} M) 的相对荧光强度。^a

Table 2-2 Relative fluorescent intensities of the compound of **D2** (1×10^{-5} M) with various biologically important metal cations.

Entry	Metal cation	Relative intensity
1	none	1.0
2	$10 \mu M Zn^{2+}$	3.6
3	$10 mM Na^+$	1
4	$10 mM K^+$	1
5	$10 mM Ca^{2+}$	1
6	$10 mM Mg^{2+}$	1
7	$50 \mu M Fe^{3+}$	1
8	$50 \mu M Cu^{2+}$	0.1
9	$50 \mu M Ni^{2+}$	1.1
10	$50 \mu M Co^{2+}$	0.2
11	$50 \mu M Mn^{2+}$	1

a: 光谱数据在 100mM HEPES 缓冲溶液中测得 (pH 7.4, I = 0.1 (NaCl))。

从表 2-2 中可以看出, 生命细胞中存在的其它的金属离子, 如: Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Na^+ 和 K^+ 等在很高的浓度下都不会影响 **D2** 的荧光强度, 荧光光谱也没有任何移动。造成这种结果的原因可能是碱土金属或碱金属与 **D2** 的亲和性相对较弱, 所以它们的存在不会影响 Zn^{2+} 的荧光增强作用。过渡金属离子, 如 Fe^{2+} 、 Co^{2+} 、 Ni^{2+} 和 Mn^{2+} 都对 **D2** 的荧光强度没有明显的增强作用。 Cu^{2+} 和 Co^{2+} 的加入使 **D2** 的荧光淬灭。原因可能是, **D2** 能和这些过渡金属离子形成稳定的络合物, 在金属离子和荧光团之间的电子或无辐射能量转移削弱了荧光强度。

度使荧光猝灭。

设计化合物 **D1** 的初衷是在分子中建立推拉电子体系，从而产生分子内的电荷转移。但化合物 **D1**，DPA 直接连接在磺酰基上。由于磺酰基是一种强的吸电子基团，DPA 上的叔氮原子的孤对电子可能被牢牢固定在磺酰基上。所以，分子中的推拉电子体系并不强烈。在接受外来物种时，与它们之间的作用力也不强。化合物 **D3** 的两端都是吸电子基团，分子内的推拉电子作用以及由此产生的电荷转移都非常弱。所以，**D1** 和 **D3** 对任何金属离子都没有明显的响应。

2.4.4 pH 对 **D2** 荧光强度的影响

在生物体系或其它微环境中，都会有一个相对稳定的 pH，但当这个环境受到外因干扰时，pH 可能会有不同程度的变化。所以，探针分子在某一 pH 范围内荧光强度不受或少受其他因素的干扰是研究金属离子荧光分子探针荧光性质的一个重要方面。因此，测定了 **D2-Zn²⁺** 络合物的荧光强度与 pH 之间的关系曲线，归一化后如图 2-5 所示。

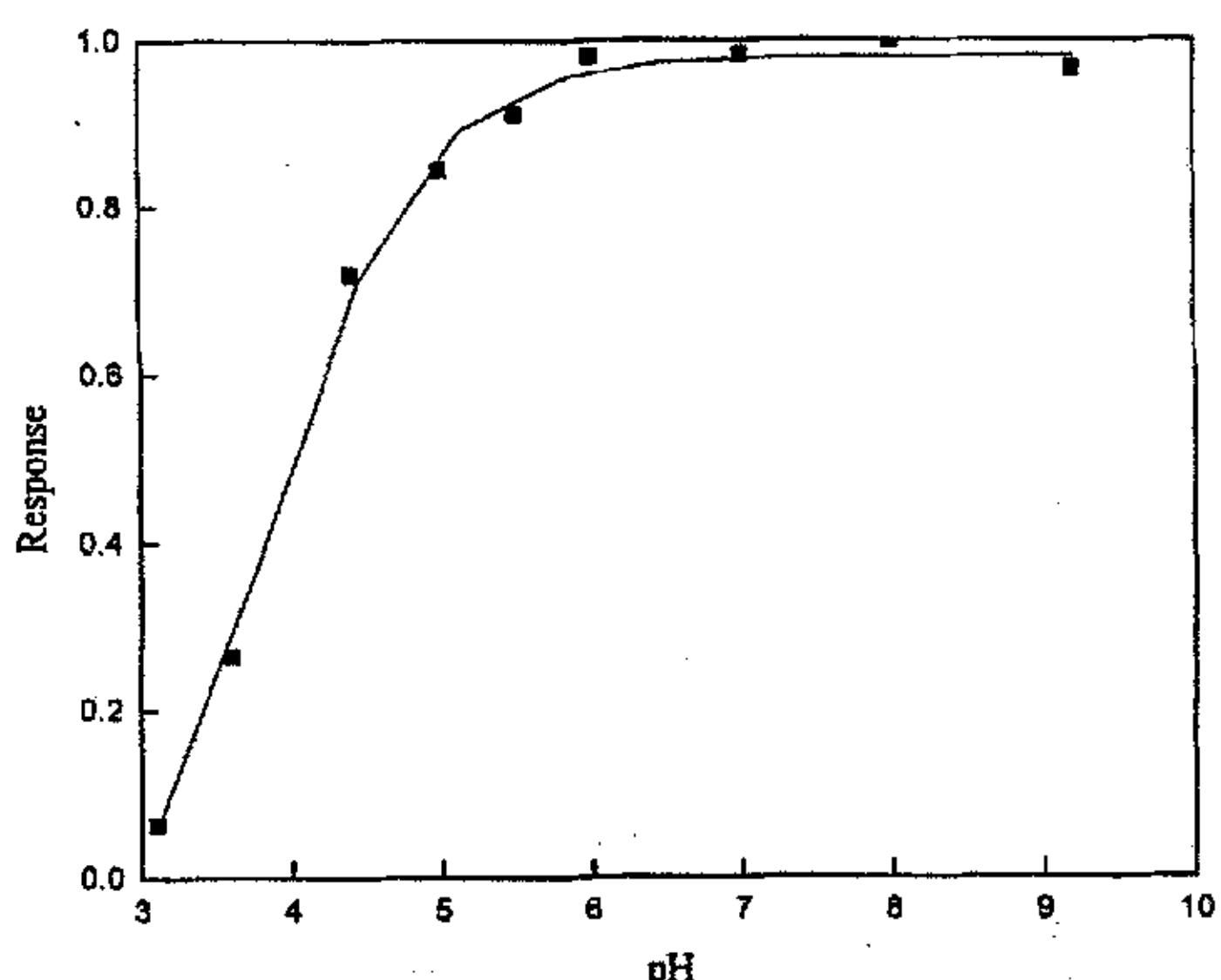


图 2-5 **D2-Zn²⁺** 络合物的荧光响应和 pH 的关系曲线（在 1:9, v:v 的 DMSO/H₂O 混合溶液中）。

Figure 2-5 Fluorescence response of **D2-Zn²⁺** complex as a function of pH in a mixed solution of DMSO and water (1:9, v:v).

如图 2-5 所示, 在饱和 Zn^{2+} ($1 \times 10^{-5} M$) 存在下, **D2** 在 pH 6—9 之间发出稳定的荧光。络合物的荧光在 pH 低于 6 时, 荧光强度降低, pH 小于 3 时基本没有荧光。这说明, Zn^{2+} -**D2** 络合物的荧光强度在近中性或微酸性条件下不受 pH 的影响。这种对 pH 的不敏感性能够适应生命体中某种生理刺激所引起的 pH 的变化。

2.4.5 不同浓度的 Zn^{2+} 对 **D2** 荧光光谱的影响

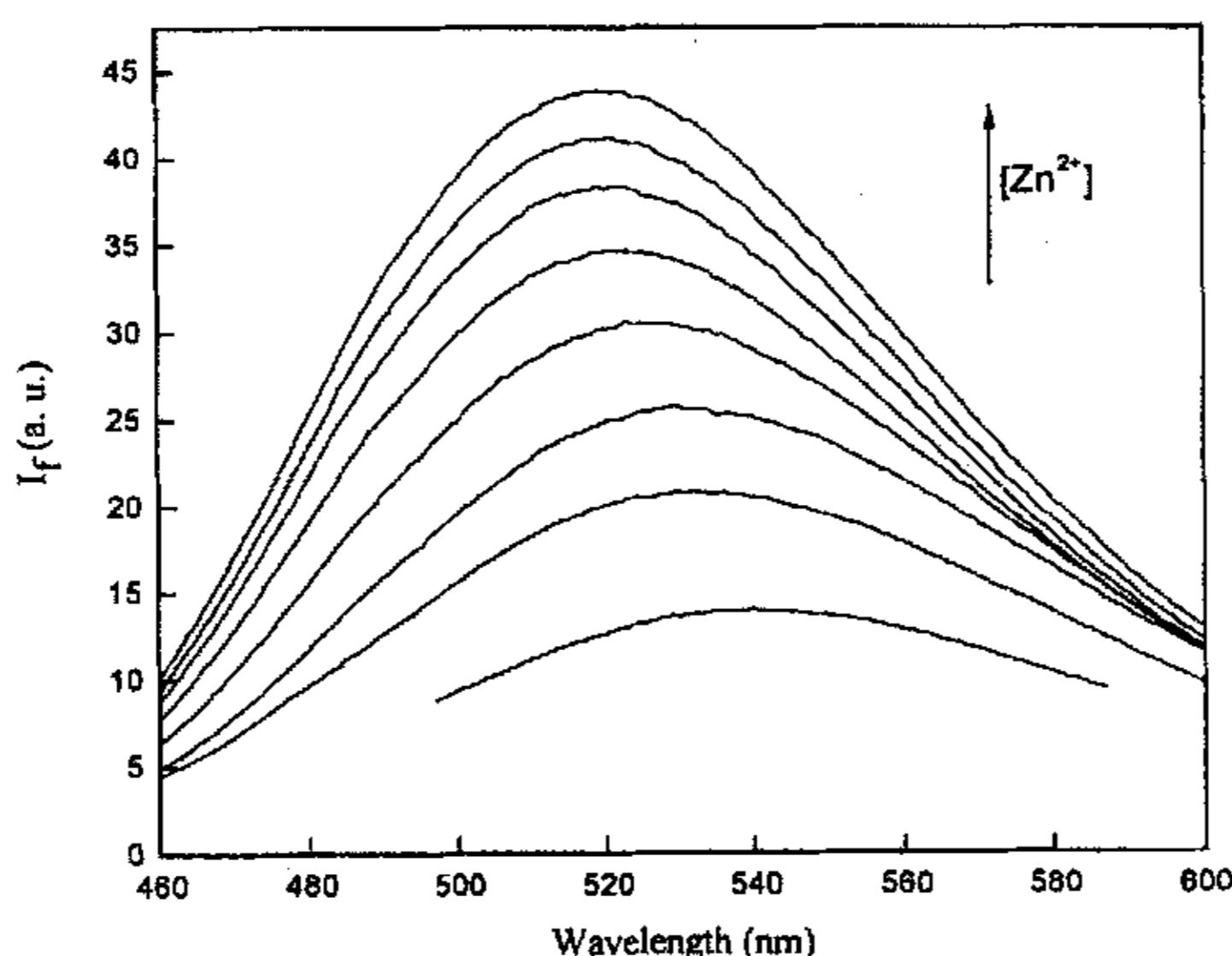


图 2-6 **D2** ($1 \times 10^{-5} M$) 的荧光光谱随 Zn^{2+} 浓度 ($0-5 \times 10^{-5} M$) 的变化。光谱数据在 100 mM HEPES (DMSO:H₂O = 1:9, v/v, pH 7.4, I = 0.1 NaCl) 缓冲溶液中测得。激发波长是 334 nm 。

Figure 2-6 emission spectra of $1 \times 10^{-5} M$ **D2** in the presence of various concentrations of Zn^{2+} ranging from 0 to $1 \times 10^{-5} M$. These spectra were measured at pH 7.4 (100 mM HEPES buffer, I = 0.1 (NaCl)). Excitation wavelength is 334 nm.

在 100 mM 的 HEPES 缓冲溶液中 (pH = 7.4, DMSO/H₂O = 1:9), **D2** 的最大吸收波长 λ_{max} 为 334 nm , 最大发射波长 λ_{em} 为 540 nm , 荧光量子产率是 0.09。加入饱和 Zn^{2+} 后, λ_{max} 只有微小的变化 (蓝移 1-2 nm), λ_{em} 蓝移到 520 nm , 斯托克位移达到 20 nm。荧光强度线性增大将近 4 倍 (图 2-6), 荧光量子产率增大到 0.18。 Zn^{2+} 在 $0-1 \times 10^{-5} M$ 范围内, **D2** 的荧光强度不断增大。当 Zn^{2+} 浓度与 **D2** 的浓度达到 1:1 以后, 进一步增加 Zn^{2+} 浓度, 溶液的荧光强度基本保持不变。丹磺酰胺上仲胺的 $pK_a = 3.2^{[3]}$ 。pH 7.4 时, 萘环上的仲胺脱去一个

质子形成 N^- ，所以推测 **D2** 与 Zn^{2+} 的配位方式是：脱质子后的 N^- 联合 DPA 上的三个氮原子与 Zn^{2+} 配位，形成 Zn^{2+} 的四配位结构。

2.4.6 表观解离常数 K_d

作为 lewis 酸碱加合物的配离子或配合物分子，在水溶液中常常存在着配合物的解离反应和生成反应间的平衡，这种平衡称为配位平衡，配位平衡关系到配合物的稳定性。常用解离常数或稳定常数来判断配合物的稳定性。解离常数越小，配合物越稳定，即两种配离子的亲和性越强。为了测定 **D2** 与 Zn^{2+} 的亲和性，按照实验部分所述方法，对 K_d 值进行了测试，所得数据如图 2-7 所示。

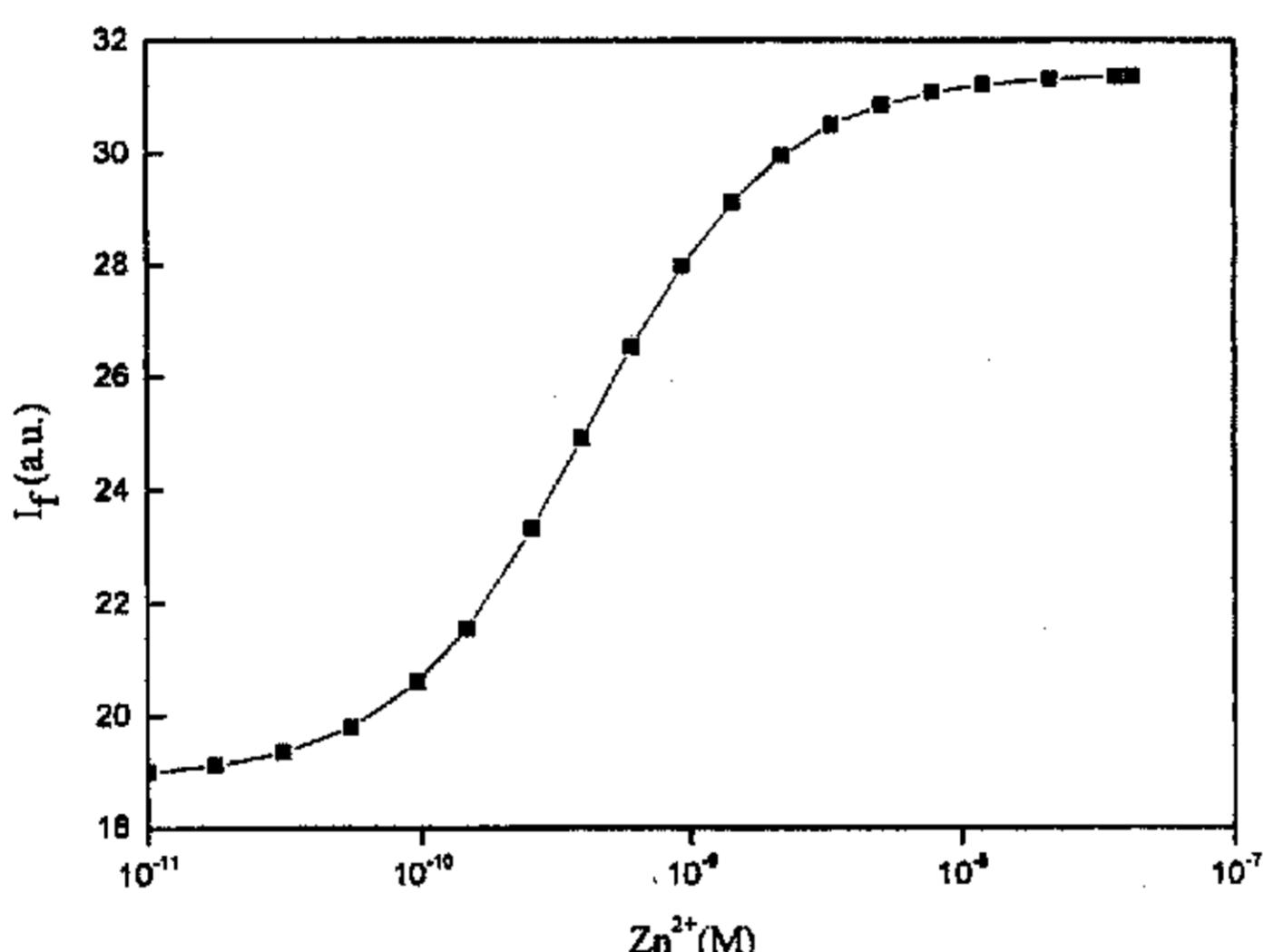


图 2-7 游离 Zn^{2+} 浓度和 $1 \mu\text{M}$ D2 荧光强度的关系曲线。这些数据在 25°C , $\text{pH} 7.4$ 的 100 mM (HEPES) 缓冲溶液中测得，其中含有 100 mM NaCl , 10 mM NTA 和 $0\text{~}10 \text{ mM}$ ZnSO_4 。

Figure 2-7 Fluorescence intensity of $1 \mu\text{M}$ D2 as a function of the concentration of free Zn^{2+} in 100 mM HEPES buffer ($\text{pH} 7.4, I = 0.1$ (NaCl)) with 10 mM NTA and $0\text{~}9 \text{ mM}$ Zn^{2+} at 25°C .

根据图 2-7 所得数据，经 sigmoidal 曲线拟合后，得到 $K_d = 0.8 \text{ nM}$ 。这表明 **D2** 能够定量检测低于纳摩尔浓度范围的游离 Zn^{2+} 。其检测灵敏度要高于其它以丹磺酰胺为荧光团的 Zn^{2+} 荧光分子探针。

2.5 本章小节

1. 基于碳酸酐酶(CA)-芳香磺酰胺抑制剂相互作用的原理,本章设计合成了丹磺酰胺为荧光母体的化合物D1、D2和D3。
2. D2在生理条件下(pH 7.4), $\lambda_{ex} = 334\text{nm}$, $\lambda_{em} = 540\text{nm}$ 。加入 Zn^{2+} 后, λ_{ex} 基本不变, λ_{em} 蓝移到520nm, 荧光强度增大将近4倍。多种生物体中重要的金属离子对 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 等D2的荧光没有影响,。 Zn^{2+} -D2络合物的荧光强度受pH变化的影响不大,特别是在pH 6-9之间影响很小。
3. 表观解离常数 $K_d = 0.8\text{nM}$,其检测灵敏度要高于其它以丹磺酰胺为荧光团的 Zn^{2+} 荧光分子探针。D2的光物理性质表明它是一种对 Zn^{2+} 有特殊选择性并有效的荧光分子探针。

参考文献

- [1] Mann, T.; Keilin, D. Sulphanilamide as a specific inhibitor of carbonic anhydrase, *Nature*, 1940, 146, 164-165.
- [2] Chen R. F.; Kernohan, J. C. Combination of bovine carbonic anhydrase with a fluorescent sulfonamide, *J. Biol. Chem.*, 1967, 242, 5813-5823.
- [3] Koike, T.; Watanabe, T.; Aoki, S.; Kimura, E.; Shiro, M. A novel biomimetic zinc(II)-fluorophore, dansylamidoethyl-pendant macrocyclic tetraamine 1,4,7,10-tetraazacyclododecane (cyclen). *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, 118, 12696-12703.
- [4] Anderegg, G.; Hubmann, E.; Podder, N. G. Wenk, F. Pyridinderivate als Komplexbildner. XI. Die Thermodynamik der Metallkomplexbildung mit Bis-, Tris- und Tetrakis[(2-pyridyl)methyl]-aminen, *Helv. Chin. Acta.*, 1977, 60, 123-140.
- [5] Arsan, P.; Di Virgilio, F.; Beltrame, M.; Tsien, R. Y.; Pozzan, T. Cytosolic Ca^{2+} homeostasis in Ehrlich and Yoshida carcinomas. A new, membrane-permeant chelator of heavy metals reveals that these ascites tumor cell lines have normal cytosolic free Ca^{2+} , *J. Biol. Chem.*, 1985, 260, 2719-2727.
- [6] *Acta Chemica Scandinavica A*, 1986, 40, 63-67.
- [7] Incarvito, C.; Lam, M.; Rhatigan, B.; Rheingold, A. L.; Qin, C. J.; Gavrilova, A. L.; Bosnich, B. Bimetallic reactivity, preparations, properties and structures of complexes formed by unsymmetrical binucleating ligands bearing 4- and 6-coordinates sites supported by alkoxide bridges. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 2001, 3478-3488.
- [8] 赵京浦, 汤建明, 任雷. 氯萘碘酰胺类化合物的合成与蛋白激酶 C 免疫调节作用, *中国药物化学杂志*, 1995, 5, 113-117.
- [9] Gruenwedel, D. W. Multidentate coordination compounds. Chelating properties of aliphatic amines containing alpha.-pyridyl residues and other aromatic ring systems as donor groups, *Inorg. Chem.*, 1968, 7, 495-501.
- [10] Martell, A. E.; Smith, R. M. NIST Critical Stability Constants of Metal Complexes, NIST Standard Reference Database 46, Version 5.0, 1998.
- [11] Perrin, D. D.; Dempsey, B. Buffers for pH and Metal Ion Control, New York, London: John Wiley&Sons, Chapman and Hall, 1974.

第三章 4-(1,8-萘酰亚胺)胺类荧光分子探针

3.1 分子设计思想

以光诱导电子转移(PET)为设计原理的荧光分子探针在各种阳离子荧光分子探针中是人们最为广泛研究的^[1-3]。典型的 PET 体系由包含电子给体的受体部分 Receptor, 通过间隔基 Spacer(如-CH₂-CH₂-)和荧光团 Fluorophore 相连而构成。其中荧光团部分是光能吸收和荧光发射的场所, 受体部分则结合客体, 这两部分被间隔基隔开, 又靠间隔基相连而成一个分子, 构成了一个在选择性识别客体的同时又给出光信号变化的超分子体系。PET 荧光分子探针中, 荧光团与受体单元之间存在着光诱导电子转移, 对荧光有非常强的淬灭作用。因此在未结合客体之前, 探针分子不发射荧光或荧光很弱。一旦受体与客体相结合, 光诱导电子转移作用受到抑制, 甚至被完全阻断, 荧光团就会发射荧光。由于与客体结合前后荧光强度差别很大, 呈明显的“关”, “开”状态, 这类探针又被称作荧光分子开关。

通常在利用 PET 原理设计荧光分子探针时, 主要考虑荧光团的性质、识别基的结合性能以及荧光团与识别基团之间的连接基对识别事件的传导敏感性等三方面因素。4-氨基-1,8-萘酰亚胺衍生物在染料、光电材料等领域得到了广泛应用。作为荧光化合物, 它光稳定性和化学稳定性好, 荧光发射波长在可见光区, 荧光量子产率高并有大的斯托克位移。这些良好的性质使 4-氨基-1,8-萘酰亚胺荧光团经常被用于各种荧光分子探针中。在多年的探针分子研究中, 发现连接基团是亚甲基、乙撑基或丙撑基时对识别事件的传导敏感性较好。因此本文中选择乙基为连接基, 根据光诱导电子转移机理设计了单荧光团和双荧光团荧光母体的荧光分子探针。双荧光团的设计使探针分子有一个离子被结合时两个荧光团能同时发出信号, 有利于提高荧光分子探针的识别敏感性。主要分子的结构如下:

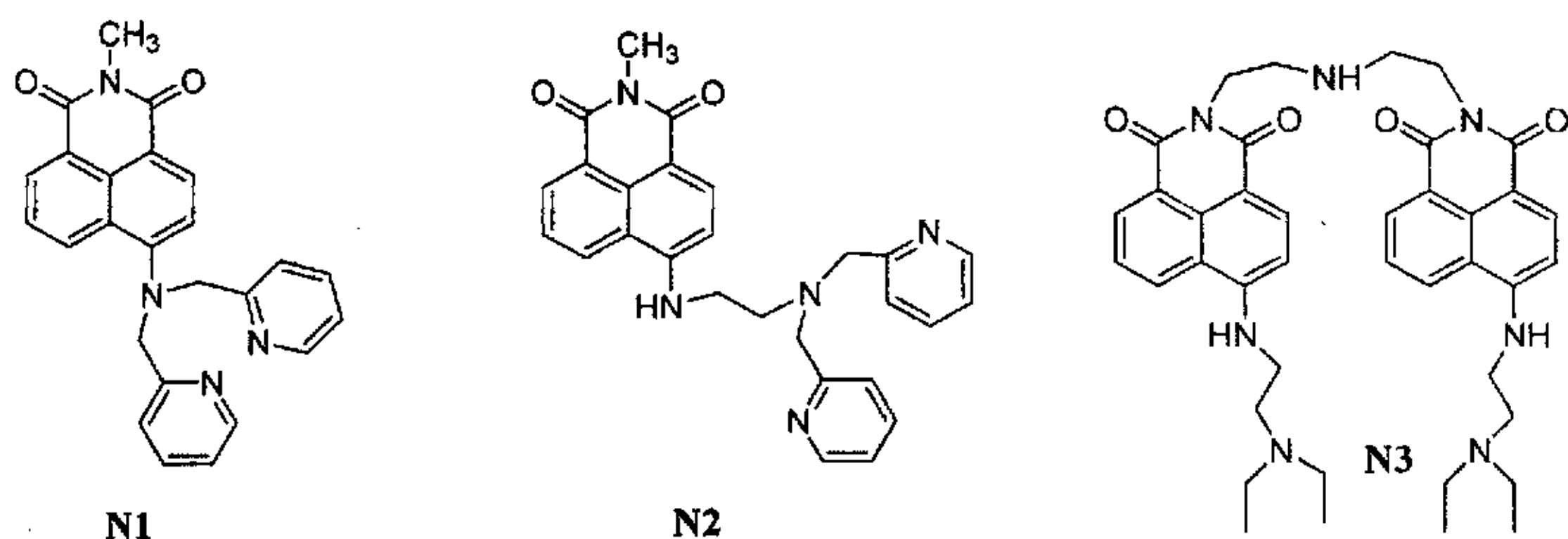
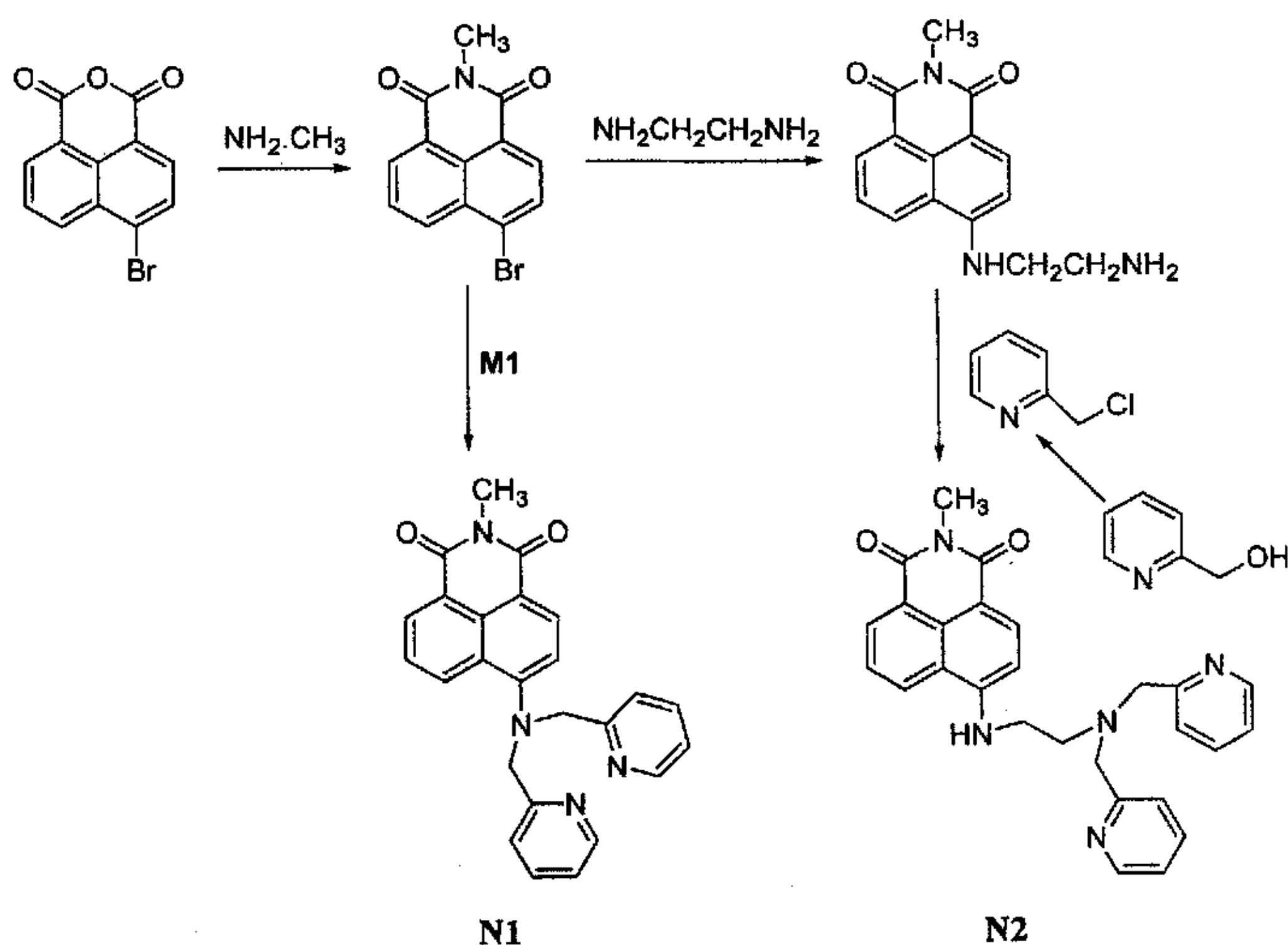


图 3-1 荧光分子探针的结构

Figure 3-1 The structures of fluorescent probes

3.2 合成路线

3.2.1 化合物 N1 和 N2 的合成



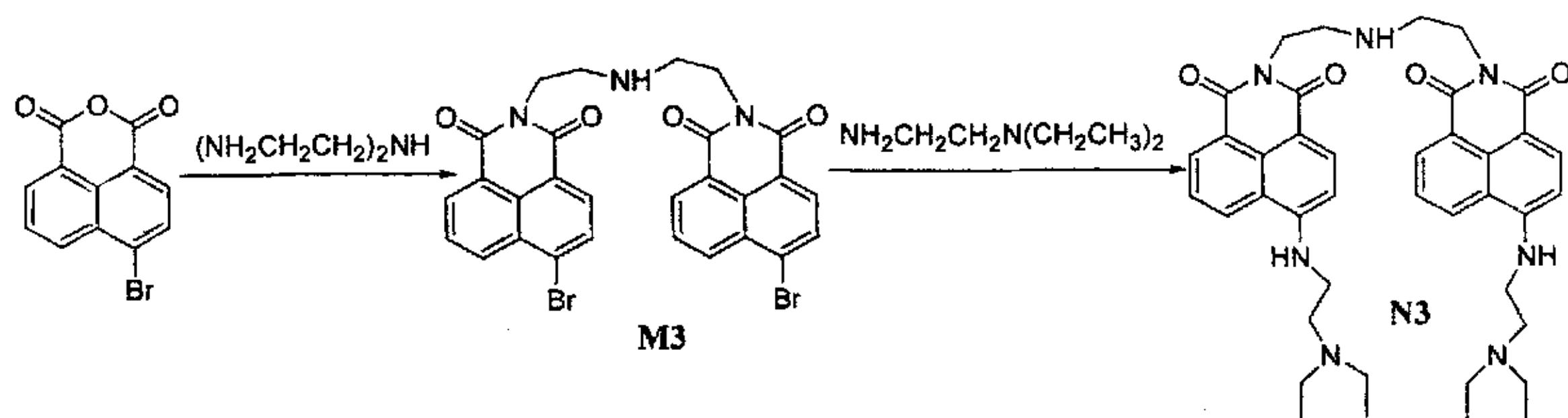
式 3-1 N1 和 N2 的合成

Scheme 3-1 Synthesis of N1 and N2

以 4-溴-1,8-萘酐为原料先与伯胺反应生成 4-溴-1,8-萘酰亚胺衍生物^[4],

与中间体 **M1** 反应生成目标化合物 **N1**；或与乙二胺反应取代 4-位溴原子，生成 4-氨基-N-甲基-1,8-萘酰亚胺^[5]，最后和 2-氯甲基吡啶反应生成目标化合物 **N2**。

3.2.2 化合物 **N3** 的合成



式 3-2 双荧光团荧光探针分子 **N3** 的合成

Scheme 3-2 Synthesis of the two arm fluorescent probe **N3**

4-溴-1,8-萘酰为起始原料和 0.5 倍量的二乙烯三胺反应得到双荧光团中间体 **M3**^[6]，接着以大大过量的 *N,N*-二乙基乙二胺取代 4 位溴原子得到最终产品 **N3**。

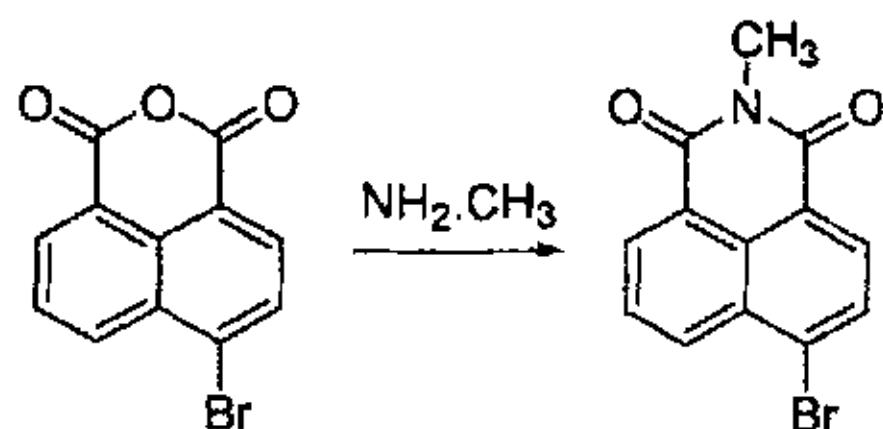
3.3 实验部分

3.3.1 原料与仪器

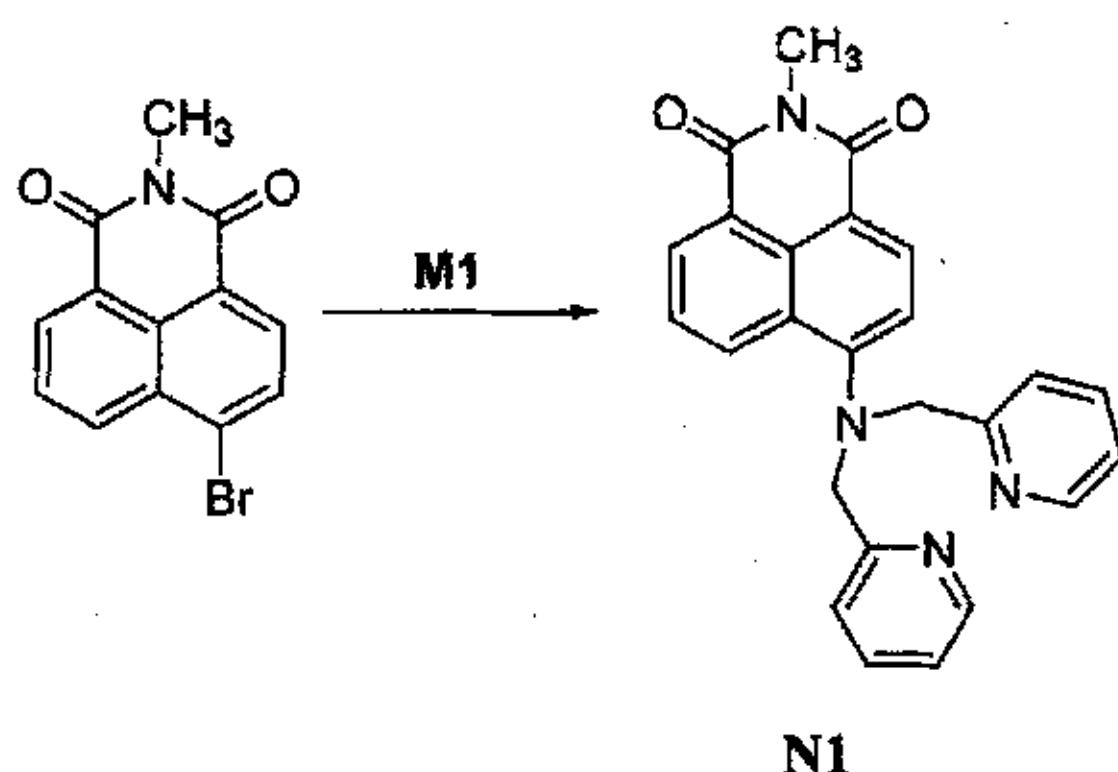
4-溴-1,8-萘酰和 1,8-萘酰购自鞍山化工股份有限公司。其它合成原料及溶剂均为市售化学品。柱色谱硅胶为青岛海洋化工厂产品 (200-300 mesh)。

HP1100 HPLC/MS质谱仪 (美国HP公司), Varian INOVA 400 (400MHz)核磁共振仪 (美国Varian公司, TMS为内标), elementar vario EL III型元素分析仪 (德国), X-6显微熔点测定仪 (北京泰克仪器有限公司), HP-8453 紫外-可见分光光度计, PTI00 荧光分光光度计, BS-210S万分之一电子天平 (德国Satorius公司), PB-20标准型pH计 (德国Sartorius公司), Nikon TE 2000 荧光显微镜, 荧光量子产率的计算以荧光素 (0.85) 在0.1 N氢氧化钠溶液中为标准。

3.3.2 化合物 N1 和 N2 的合成与结构表征



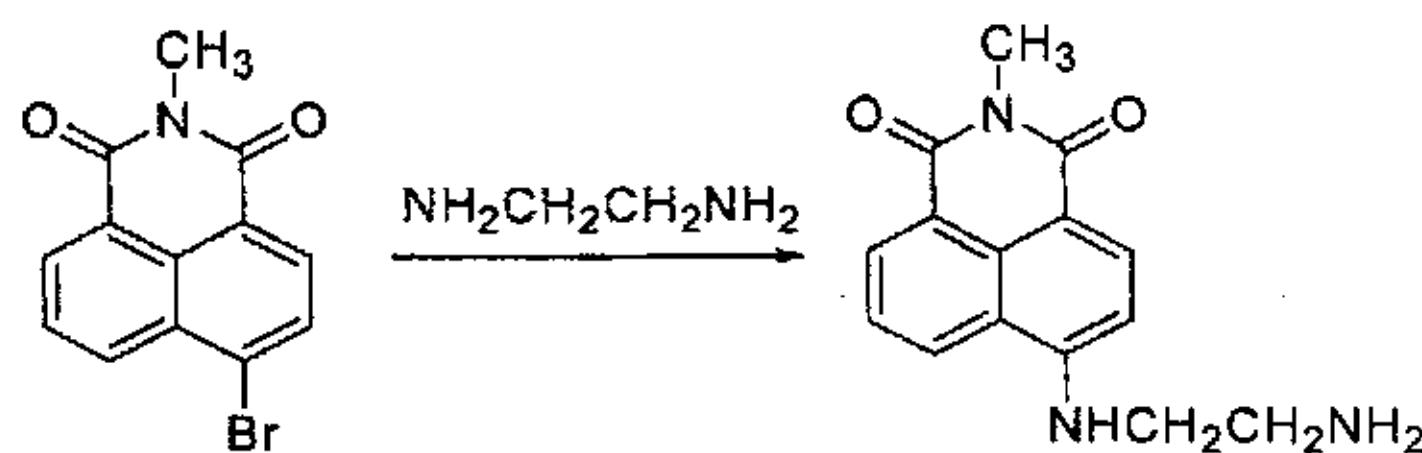
在 250ml 圆底烧瓶中，加入 5g (18mmol) 4-溴-1,8-萘酐和 54ml (浓度为 10%) 的甲胺水溶液，以摩尔比 1:10 在室温下反应 2.5h。过滤，滤饼用氯苯重结晶后得到 4-溴-N-甲基-1,8-萘酰亚胺。收率：95% (5g)。熔点：185-186 °C。



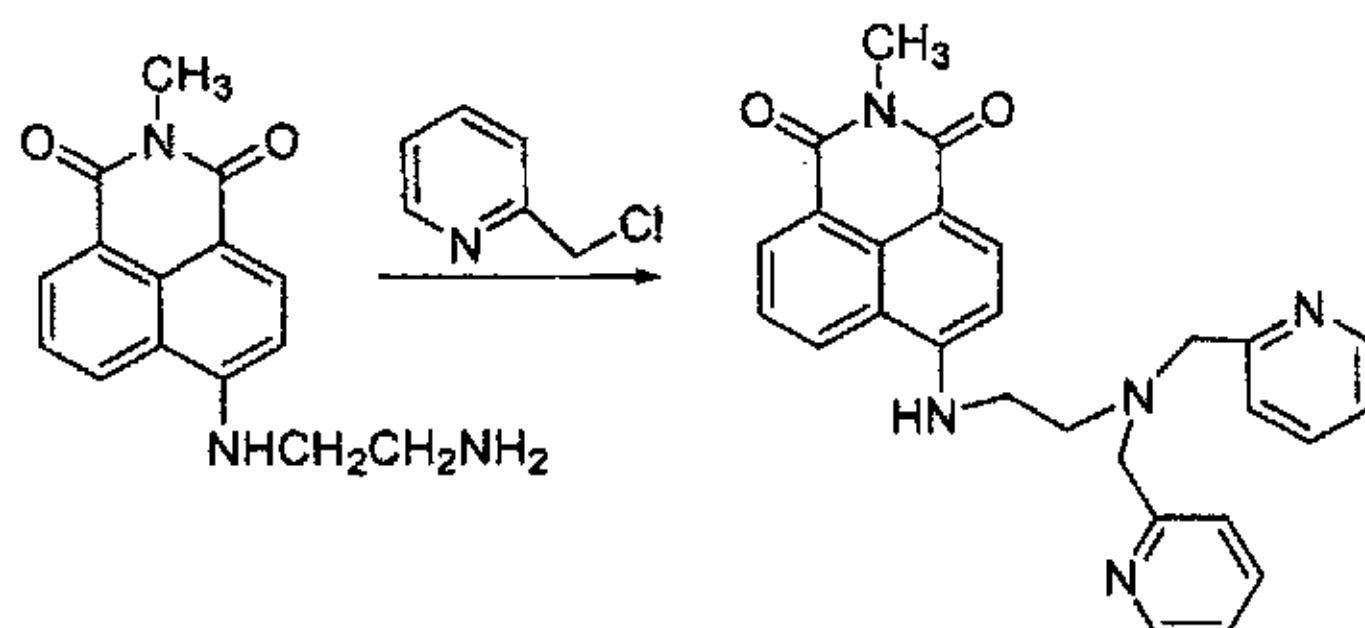
N1

110mg(0.399mmol) 4-溴-N-甲基-1,8-萘酰亚胺和 83mg(0.417mmol) 中间体 M1 混合溶解在 20ml 除水吡啶中，加热回流 24h，减压蒸出溶剂，柱分离得到淡黄色固体 N1。展开剂：CH₂Cl₂/MeOH = 100:1~50:1。收率：40% (65mg)。熔点：123-123 °C。

¹H-NMR(400MHz, CDCl₃): δ 8.91(d, 1H, *J* = 8.0Hz), 8.62(2d, 3H, *J₁* = 6.0Hz, *J₂* = 4.4Hz), 8.39(d, 1H, *J* = 8.4Hz), 7.74(t, 1H, *J* = 7.2Hz), 7.62(t, 2H, *J* = 7.6Hz), 7.36(d, 2H, *J* = 8.0Hz), 7.22(m, 3H), 4.75(s, 4H), 3.52(s, 3H).
¹³C-NMR(100MHz, CDCl₃): δ 166.2, 157.3, 149.6, 136.9, 132.1, 131.3, 130.5, 130.1, 126.0, 123.3, 122.6, 122.5, 117.7, 60.0, 27.1. API-ES MS m/z(+): 409([M+H]⁺). Anal. Calcd. for C₂₅H₂₀N₄O₂: C, 73.51; H, 4.94; N, 13.72. Found: C, 73.29; H, 4.93; N, 13.68.



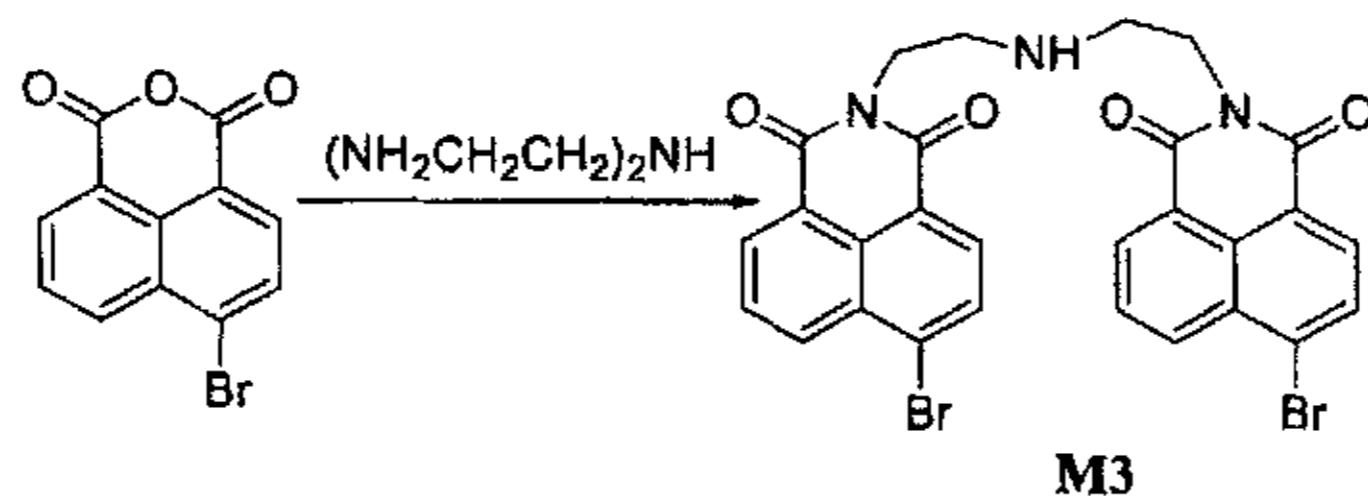
4-溴-N-甲基-1,8-萘酰亚胺 1g(4mmol)、乙二胺(2.4ml)和 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (0.25g)混合在2-甲氧基乙醇中, 加热回流1h, 趁热倒入水中, 得到黄色固体4-氨基-N-甲基萘酰亚胺。氯苯重结晶得到黄色针状晶体。收率: 753mg(70%), 熔点: 125-126°C。



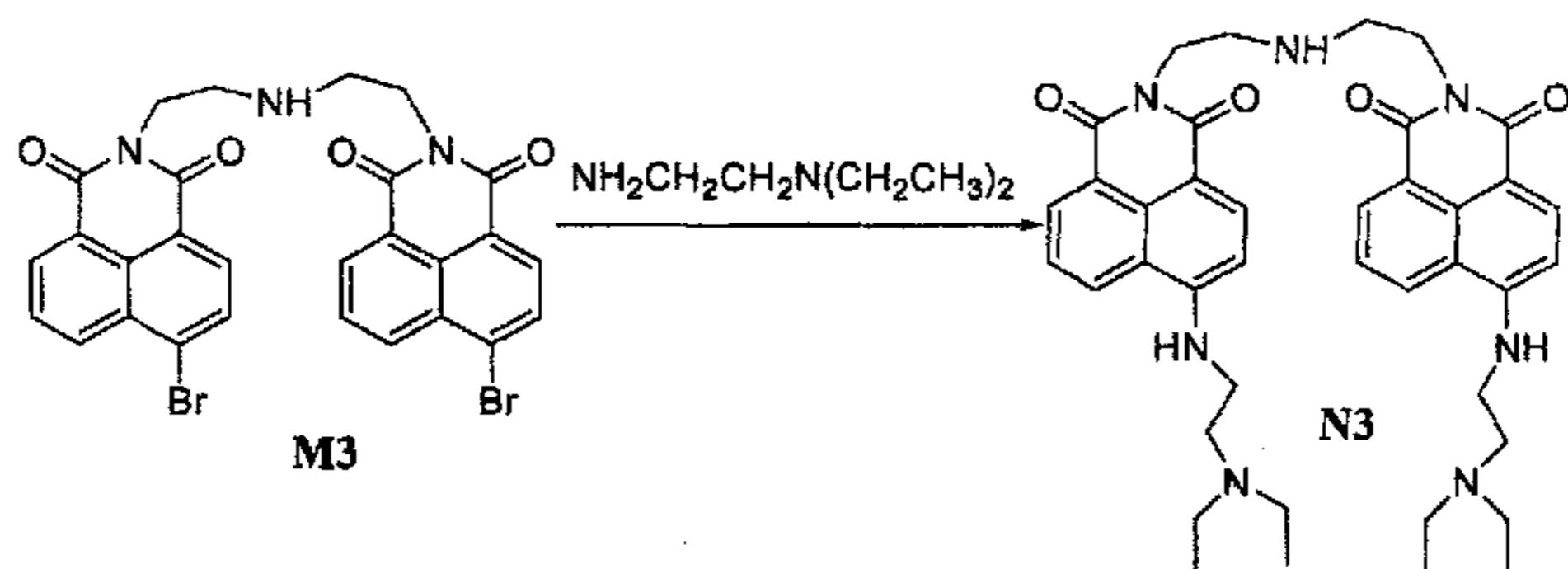
4-氨基-N-甲基萘酰亚胺 100mg(0.37mmol)、2-氯甲基吡啶 152mg(0.12mmol)和无水碳酸钾(153mg)混合溶解在10ml无水乙醇中, 在氮气保护下加热回流16h, 减压蒸去滤液中的溶剂, 剩余物用氧化铝柱分离, 得到黄色固体N2。展开剂: $CH_2Cl_2/MeOH = 100:1$ 。收率: 84.3mg(50%)。熔点: 163-164°C。

1H -NMR(400MHz, $CDCl_3$): δ 8.82(d, 1H, $J = 8.4Hz$), 8.64(d, 1H, $J = 7.2Hz$), 8.57(d, 2H, $J = 4.8Hz$), 8.43(d, 1H, $J = 8.4Hz$), 7.82(s, 1H), 7.72(t, 1H, $J = 8.0Hz$), 7.58(t, 2H, $J = 8.0Hz$), 7.41(d, 2H, $J = 7.6Hz$), 7.16(t, 2H, $J = 5.6Hz$), 6.54(d, 1H, $J = 8.4Hz$), 4.03(s, 4H), 3.54(s, 3H), 3.42(s, 2H), 3.09(s, 2H).
 ^{13}C -NMR(100MHz, $CDCl_3$): δ 165.2, 164.6, 156.7, 148.8, 137.4, 134.7, 131.2, 130.9, 129.6, 128.9, 128.1, 124.6, 124.3, 123.0, 122.7, 120.9, 112.0, 59.5, 51.2, 40.7, 27.1. API-ES MS m/z (+): 451($[M+H]^+$). Anal. Calcd. for $C_{27}H_{25}N_5O_2$: C, 71.82; H, 5.58; N, 15.51. Found: C, 71.53; H, 5.56; N, 15.45.

3.3.3 N3的合成与结构表征



0.135ml (2.5mmol) 二乙烯三胺加入到0.69g(0.02mol)4-氯-1,8-萘酐的50ml无水乙醇溶液中，加热回流30min。冷却到室温后，滤出固体沉淀M3，乙醚洗，干燥后乙醇重结晶。收率：80% (1.24g)。



100mg(0.1mmol) M3和1.46g(12.6mmol) *N,N*-二乙基乙二胺在100ml乙二醇单甲醚中加热回流8h。将反应液倒入水中，与水形成黄色乳浊液。乙酸乙酯萃取后，无水K₂CO₃干燥。硅胶柱分离，展开剂：二氯甲烷/乙酸乙酯(20:1, v:v)，得到黄色固体N3。收率：53% (36.6mg)，熔点：104-105℃。

¹H-NMR(400MHz, CDCl₃): δ 8.43(d, 2H, *J* = 7.2Hz), 8.35 (d, 2H, *J* = 8.4Hz), 8.14 (d, 2H, *J* = 8.0Hz), 7.56 (d, 2H, *J* = 8.0Hz), 6.60 (d, 2H, *J* = 8.4Hz), 6.32 (s, 2H), 4.34 (t, 4H, *J* = 6.4Hz), 3.39(m, 4H), 3.11(t, 4H, *J* = 6.4Hz), 2.47 (s, 3H), 2.35 (s, 12H), 2.18 (s, 8H). ¹³C-NMR(100MHz, CDCl₃): δ 164.2, 163.5, 149.4, 133.9, 130.3, 129.2, 126.6, 123.8, 122.0, 119.8, 103.6, 56.3, 46.9, 44.6, 39.3, 38.9, 30.4. API-ES MS m/z(+): 692 ([M+H]⁺). Anal. Calcd. for C₄₀H₄₉N₇O₄: C, 69.44; H, 7.14; N, 14.17. Found: C, 69.30; H, 7.13; N, 14.13.

3.3.4 紫外及荧光光谱的测定

3.3.4.1 不同溶剂中的光谱研究

实验方法同 2.3.6.1 所述。

3.3.4.2 荧光量子产率的测定

实验方法同 2.3.6.2 所述。

3.3.4.3 不同 pH 的荧光光谱测定

用 1.0×10^{-5} mol/l 的待测样品的水溶液，分别用不同浓度的盐酸或氢氧化钠调节酸碱性（加入量小于待测液体积的 1%）。测其不同 pH 时的荧光光谱，计算荧光强度。根据 I_f -pH 曲线，按下式求出 $pK'a$ 值^[7]。

$$\text{Log}[(I_{F\text{max}} - I_f)/(I_f - I_{F\text{min}})] = \text{pH} - pK'a$$

式中： $I_{F\text{max}}$ 、 $I_{F\text{min}}$ 、 I_f 分别是荧光强度-pH 曲线中的最大值、最小值和选取的 pH 对应的荧光强度值。

3.3.4.4 对金属离子的识别测定

实验方法同 2.3.6.4 所述。

3.3.4.5 Zn^{2+} 浓度对荧光强度的测定

实验方法同 2.3.6.5 所述。

3.3.4.6 表观解离常数 K_d 的测定

准备 10mM 三羟甲基氨基甲烷(tris)-HCl 缓冲溶液 (pH 7.4, I = 0.1(NaCl))，其中包括 10mM NTA (氨三乙酸)。 Zn^{2+} -NTA 的络合稳定常数^[8]为 (20°C, 0.1M KNO_3)： $pK_{a1} = 9.73$, $pK_{a2} = 2.49$, $pK_{a3} = 1.89$, $\log K(ZnL) = 10.66$ 。游离 Zn^{2+} 的浓度计算如下^[9]：

$$[\text{Zn}^{2+}]_f = \frac{[\text{Zn}^{2+}]_{\text{total}}}{\beta' \alpha_M [\text{L}]_{\text{free}}} \quad \beta' = \frac{K_{(ZnL)}}{\alpha_M \alpha_L}$$

$$[L]_{\text{free}} \approx [L]_{\text{total}} - [Zn^{2+}]_{\text{total}}$$

$$\alpha_L = 1 + 10^{(pK_{a1}-pH)} + 10^{(pK_{a2}+pK_{a1}-2pH)} + 10^{(pK_{a3}+pK_{a2}+pK_{a1}-3pH)}$$

其中 $[Zn^{2+}]_f$ 是游离 Zn^{2+} 浓度, $[Zn^{2+}]_{\text{total}}$ 是 Zn^{2+} 总浓度, α_M 是配位效应系数, α_L 是酸效应系数, $[L]_{\text{free}}$ 是游离氨三乙酸浓度, $[L]_{\text{total}}$ 氨三乙酸总浓度。这里, $[L]_{\text{total}}$ 设为 10mM, $[Zn^{2+}]_{\text{total}}$ 为 0-9mM。

将待测物溶解在上述缓冲溶液中配制成 1×10^{-6} mol/l 的溶液 10ml, 每次加入 5 μ l Zn^{2+} 水溶液, 按上述公式计算得游离 Zn^{2+} 的浓度分别为: 0、0.246、0.52、0.826、1.17、1.56、2.00、2.52、3.12、3.83、4.68、5.72、7.02、10.92、18.72nM, 最后使 Zn^{2+} 浓度大大过量。溶液总体积增大不超过 2%。所测得的数据经 sigmoidal 拟合得到表观解离常数 K_d 。

3.3.5 N2在活细胞中的荧光影像

在 DEME 中培养 PC12 细胞, 10% FCS 作为补充液。成像前一天, 细胞于 24 孔板继续培养 24 小时。以 10 μ M N2 对培养的 PC12 细胞在 37°C 下染色 1 小时, DEME 淋洗后, 加入含 10 μ M $ZnSO_4$ 的培养基, 在激光共聚焦电子扫描显微镜下扫描成像。激发波长范围是 450-480nm, 放大倍数 1000 倍。

3.4 结果与讨论

3.4.1 目标化合物的合成及核磁谱图

萘酰亚胺上有多个反应位点, 其中在萘酰亚胺的氮原子上和 4-氨基-1, 8-萘酰亚胺荧光团氨基上的取代反应都可以合成多种衍生物。N1、N2 和 N3 的合成是利用不同位点的取代反应所得。本章合成的主要产物经核磁氢谱、核磁碳谱和质谱鉴定, 结构正确。代表产物 N2 核磁谱图如下:

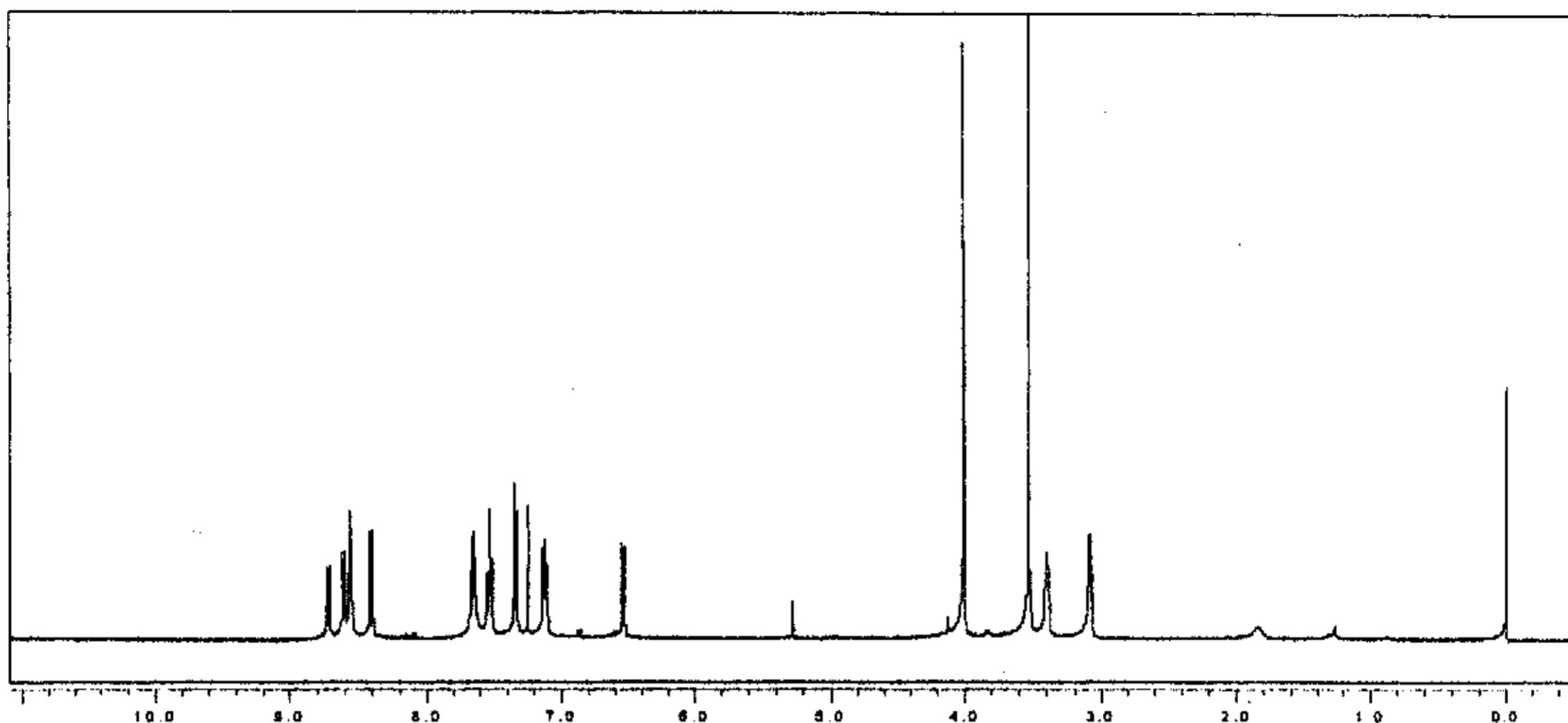


图 3-4 化合物 N2 的 ¹H NMR 谱
Figure 3-4 The ¹H-NMR spectrum of compound N2

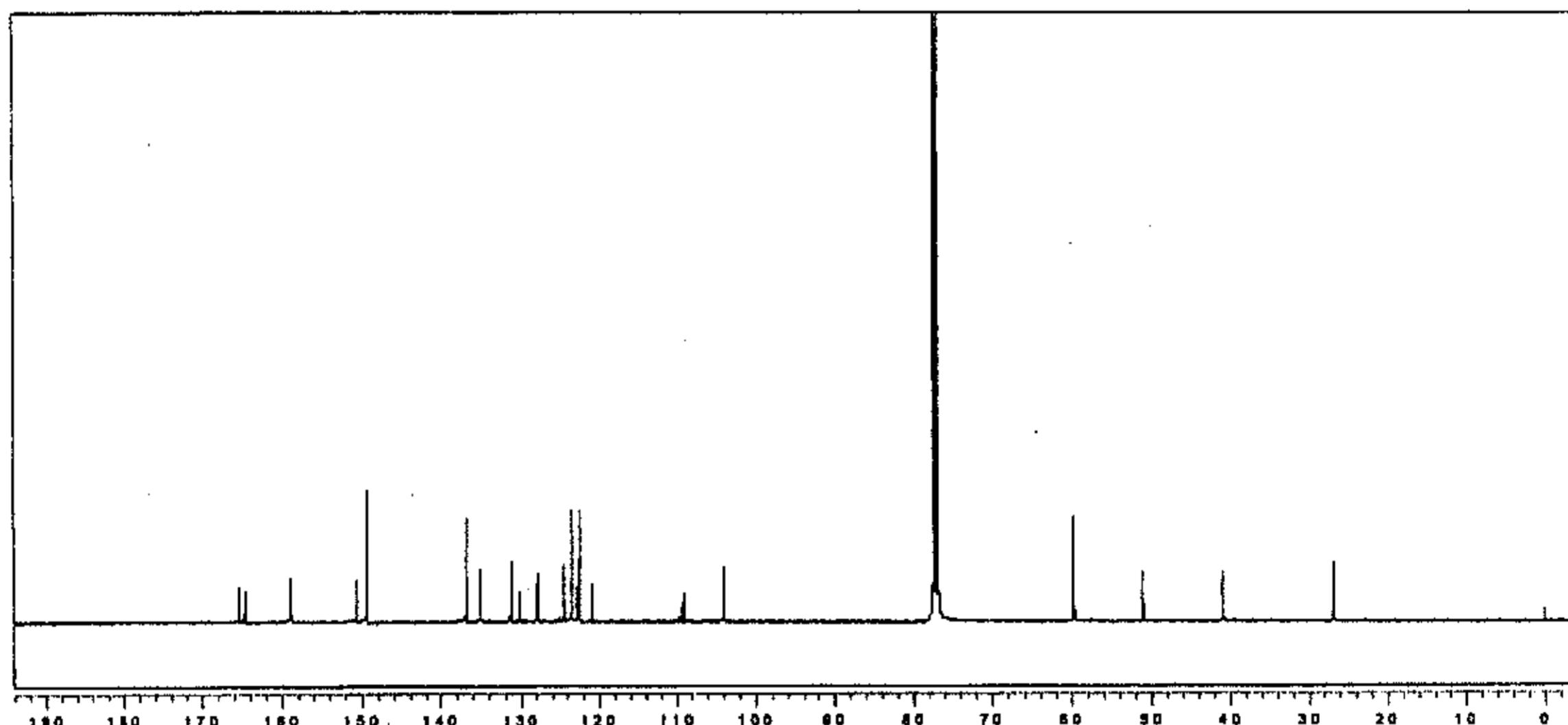


图 3-5 化合物 N2 的 ¹³C NMR 谱
Figure 3-5 The ¹³C-NMR spectrum of compound N2

3.4.2 N2 的吸收和荧光光谱

测试中发现, 本章合成的目的产物在不同的溶剂中它们的吸收和发射光谱变化情况非常相似。以 N2 为例, 在常用溶剂中的吸收和发射光谱如表 3-1 所示。总的的趋势是随着溶剂极性的增加, N2 的吸收和发射波长不断红移。这是在分子内存在推拉电子的发光分子中的常见现象。

表 3-1 N2 (1×10^{-5} mol/l) 在不同溶剂中的光谱数据Table 3-1 Spectra data of compound N2 (1×10^{-5} mol/l) in different solvents

溶剂	甲苯	四氢呋喃	乙酸乙酯	丙酮	乙腈	乙醇	二甲亚砜
λ_{max}	430	427	435	435	435	445	444
λ_{em}	494	494	503	518	523	531	531

3.4.3 tri-HCl 缓冲溶液中 N2 对金属离子的识别

为了避免加入各种金属盐引起溶液 pH 变化而导致探针的荧光强度发生变化，识别实验在缓冲溶液中进行。本文对 N1、N2 和 N3 都进行了金属离子的识别实验，但发现只有 N2 对 Zn^{2+} 有选择性识别，而 N1 和 N3 对任何金属离子都无识别。以 N2 为例，在 10mM 的三羟甲基甲烷(tris)-HCl 中 (pH = 7.4, DMSO/CH₃OH = 1:9) 对常见金属离子 (如： Zn^{2+} 、 K^+ 、 Na^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Cr^{3+} 、 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Cu^{2+} 和 Co^{2+}) 的识别如图 3-8 所示。

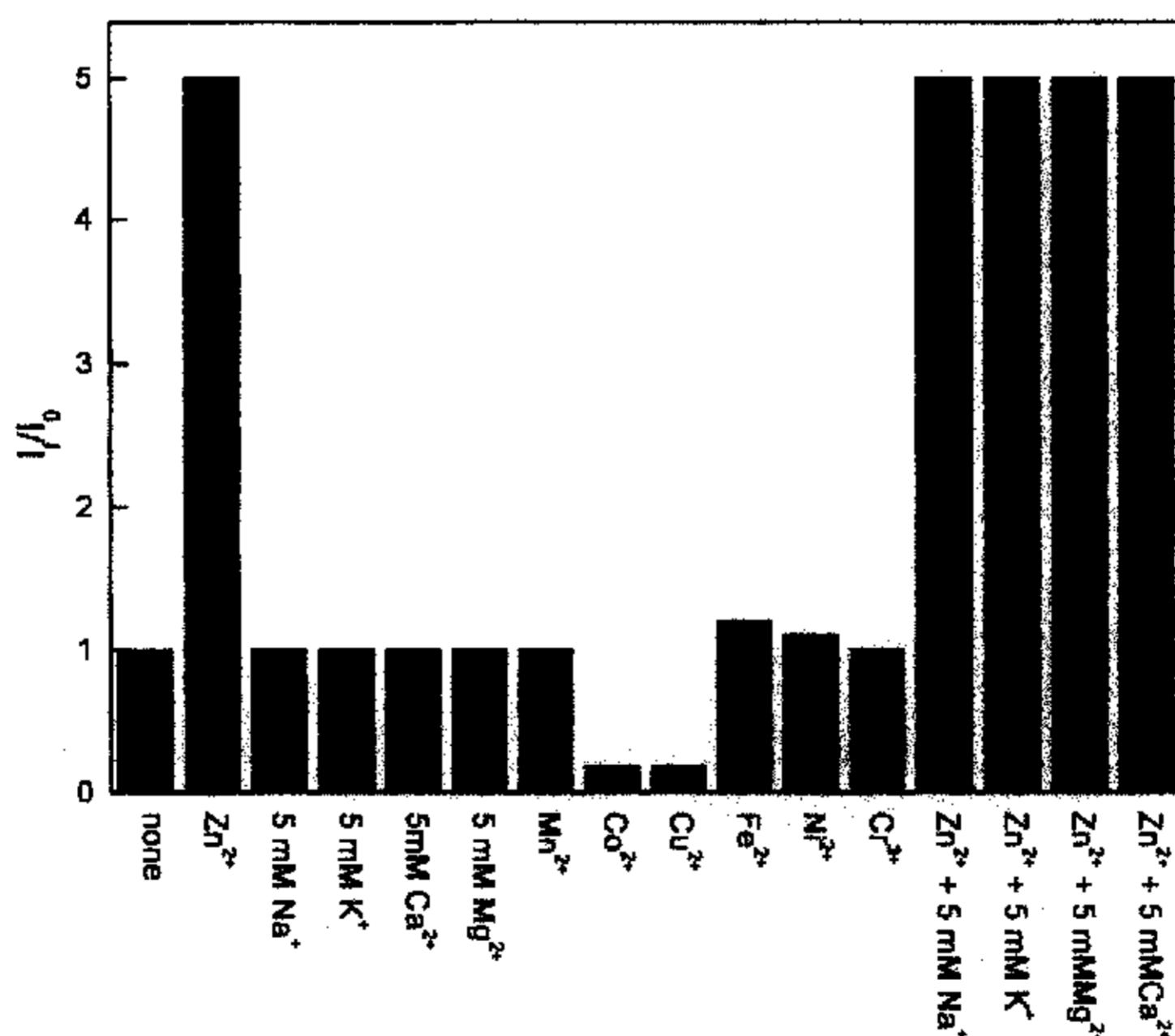


图 3-8 N2 (1×10^{-5} M) 的荧光强度对不同金属离子 (5×10^{-5} M) 的响应。数据在 10 mM tris-HCl buffer (pH 7.4, I = 0.1 (NaCl)) 中测得。

Figure 3-8 The relative fluorescence intensity of N2 (1×10^{-5} M) in the presence of various metal cations (5×10^{-5} M). These data were measured in 10 mM tris-HCl buffer (pH 7.4, I = 0.1 (NaCl)).

Zn^{2+} 的加入使化合物 **N2** 的荧光强度增大 5 倍。而 Cu^{2+} 和 Co^{2+} 使 **N2** 的荧光淬灭，原因可能是金属离子和荧光团之间存在电子或能量转移引起的。生物体系中重要的碱金属离子 (K^+ 、 Na^+) 和碱土金属离子 (Mg^{2+} 、 Ca^{2+}) 即使在很高的浓度 (5mM) 下，对 **N2** (1×10^{-6} M) 的荧光强度没有任何影响，其他一些过渡金属离子 (Cr^{3+} 、 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ni^{2+}) 均有相似的结果。

3.4.4 不同浓度的 Zn^{2+} 对 **N2** 荧光光谱的影响

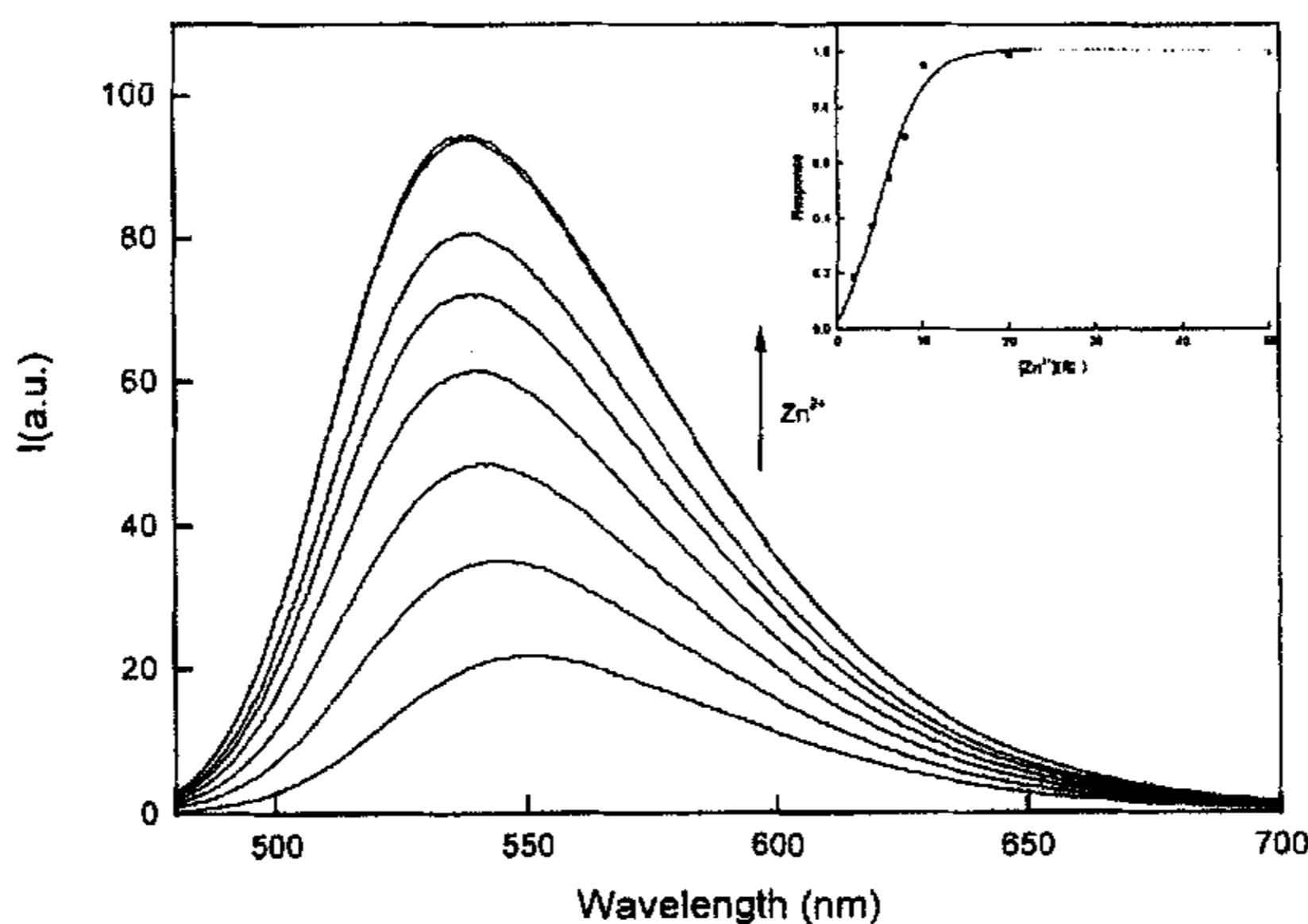


图 3-9 **N2** (1×10^{-5} M) 的发射光谱随 Zn^{2+} 浓度 (0- 5×10^{-5} M) 的变化。实验数据在 pH 7.4 (10 mM tris-HCl buffer, $I = 0.1$ (NaCl)) 中测得。插图是在 480-700 nm 之间不同 Zn^{2+} 浓度下积分发射光谱得到的荧光强度，扣除基线光谱 (无 Zn^{2+}) 后的变化曲线。

Figure 3-9 Emission spectra (excitation at 453 nm) of 1×10^{-5} M **N2** in the presence of various concentrations of Zn^{2+} ranging from 0 to 5×10^{-5} M. These spectra were measured at pH 7.4 (10 mM tris-HCl buffer, $I = 0.1$ (NaCl)). Insert: fluorescence response obtained by integrating the emission spectra between 480 and 700 nm, subtracting the baseline (no Zn^{2+}) spectra and normalizing to the full scale response (5×10^{-5} M).

如图 3-9 所示，在 $0-1 \times 10^{-5}$ M 浓度范围内 **N2** 对 Zn^{2+} 的识别有较好的线性关系。**N2** (1×10^{-5} M) 随着 Zn^{2+} 浓度的增大荧光强度线性增强，在 Zn^{2+} 与 **N2** 等摩尔浓度时，荧光强度增加到最大。继续加入过量的 Zn^{2+} ，**N2** 的荧光强度没有明显的增大。插图表示 **N2** 的发射光谱荧光强度的积分值减去基线光

谱的积分值归一化后与 Zn^{2+} 的浓度关系，也说明 **N2** 与 Zn^{2+} 呈 1:1 络合关系。在未加入 Zn^{2+} 之前，**N2** 的最大吸收波长 λ_{max} 是 453nm，最大发射波长 λ_{em} 是 549nm，荧光量子产率 Φ_0 为 0.04。而加入饱和 Zn^{2+} 后， λ_{max} 蓝移到 443nm， λ_{em} 蓝移到 539nm， Φ_{N2} 增大到 0.17。由 4-氨基-1,8-萘酰亚胺这样分子内具有推拉电子效应的荧光母体而构造的荧光分子探针，在与正离子结合时出现吸收或荧光光谱的蓝移现象是比较常见的^[10]。当缺电子的 Zn^{2+} 与识别基团结合时，减弱了分子内推拉电子效应，会导致光谱蓝移。

3.4.5 pH 对 **N2** 和 **N3** 的荧光强度的影响。

荧光分子探针 **N2** 和 **N3** 的识别基团中都含有多个氮原子，它们能与氢质子结合使荧光强度发生变化。因此，测定了 **N2** 和 **N3** 的荧光强度与 pH 之间的关系曲线，如图 3-10 和图 3-11 所示。

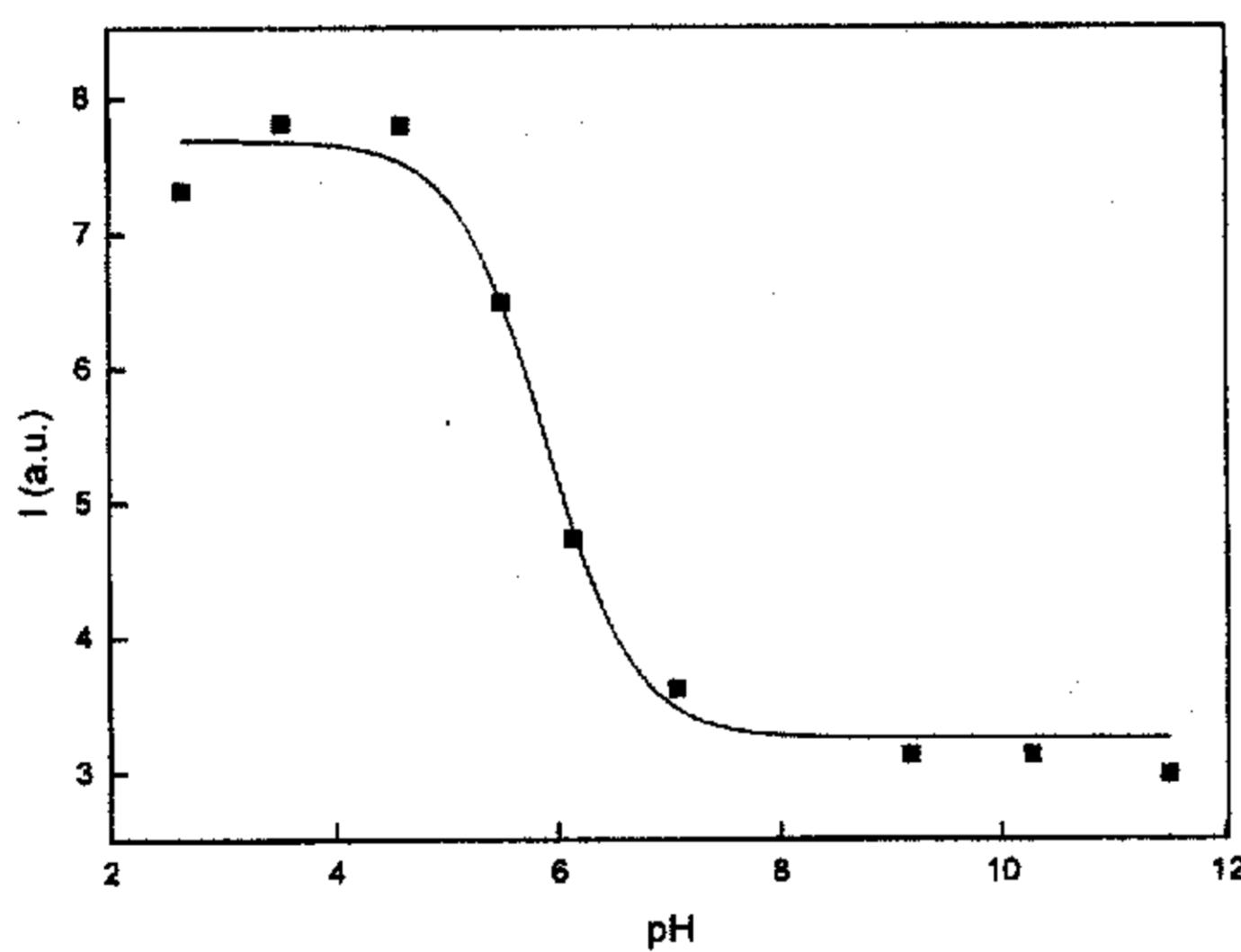


Figure 3-10 **N2** 荧光强度与 pH 值之间的关系曲线（在 1:9, v:v 的 DMSO/H₂O 的混合溶液中）。

Figure 3-10 Effect of pH on fluorescence intensity of **N2** in a mixed solution of DMSO and water (1:9, v:v).

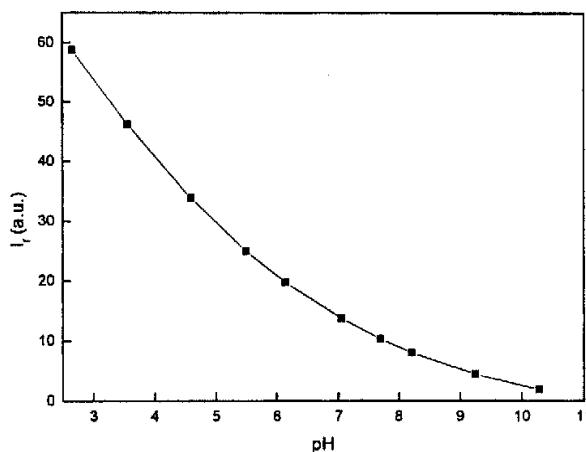


Figure 3-11 N3 荧光强度与 pH 值之间的关系曲线 (在 1:9, v:v 的 DMSO/H₂O 的混合溶液中)。

Figure 3-11 Effect of pH on fluorescence intensity of N3 in a mixed solution of DMSO and water (1:9, v:v).

N2 的荧光强度与 pH 之间的关系曲线如图 3-10 所示, 按照文献计算方法, 可以计算出 N2 的 $pK_a = 6.4$ 。当溶液的 pH 大于 7 后, 溶液的荧光强度达到最小值并保持稳定 (7-10)。这个荧光稳定的 pH 区间是大多数生物样品的 pH 范围, 这使 N2 有广泛应用的可能性。

N3 的荧光强度与 pH 之间的关系曲线如图 3-11 所示。可以看出, 在 pH 2-11 之间, 荧光强度不断减弱。在酸性条件下的荧光强度是碱性条件下的 27 倍, 说明 N3 是一个较好的大 pH 范围的氢质子荧光分子开关。

3.4.6 表观解离常数 K_d

为了测定 N2 与 Zn^{2+} 的亲和性, 根据图 3-12 游离 Zn^{2+} 浓度和 $1 \times 10^{-6} M$ N2 荧光强度的关系曲线数据, 经 sigmoidal 曲线拟合后, 得到 $K_{dN2} = 0.83 nM$ 。这表明 N2 能够定量检测低于纳摩尔浓度范围的游离 Zn^{2+} 。

3.4.7 N2 在活细胞中对 Zn^{2+} 的荧光显微成像

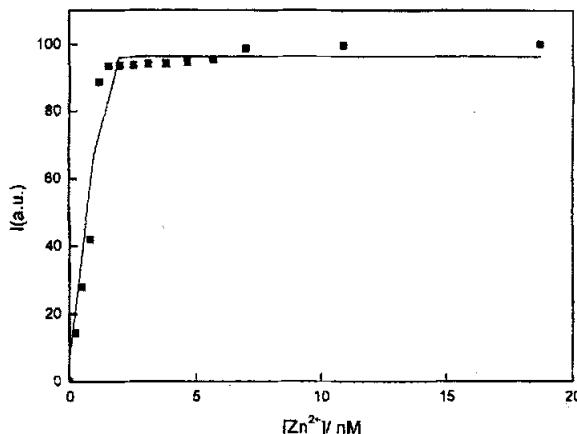


图 3-12 游离 Zn^{2+} 浓度和 $1 \times 10^{-6} M$ N2 荧光强度的关系曲线。这些数据在 $25^{\circ}C$, pH 7.4 的 10 mM (tris-HCl) 缓冲溶液中测得, 其中含有 100 mM NaCl, 10 mM NTA, and $0\text{--}10 \text{ mM}$ $ZnSO_4$ 。

Figure 3-12 Fluorescence intensity of $1 \times 10^{-6} M$ N2 as a function of the concentration of free Zn^{2+} in 10 mM tris-HCl buffer (pH 7.4, $I = 0.1$ (NaCl)) with 10 mM NTA and $0\text{--}9 \text{ mM}$ Zn^{2+} at $25^{\circ}C$.

N2 是结合促进荧光增强的荧光分子探针, 具有良好的水溶性、对 Zn^{2+} 有很好的选择性和高敏感性, 所有这些性质都显示它可能适合于 Zn^{2+} 的荧光细

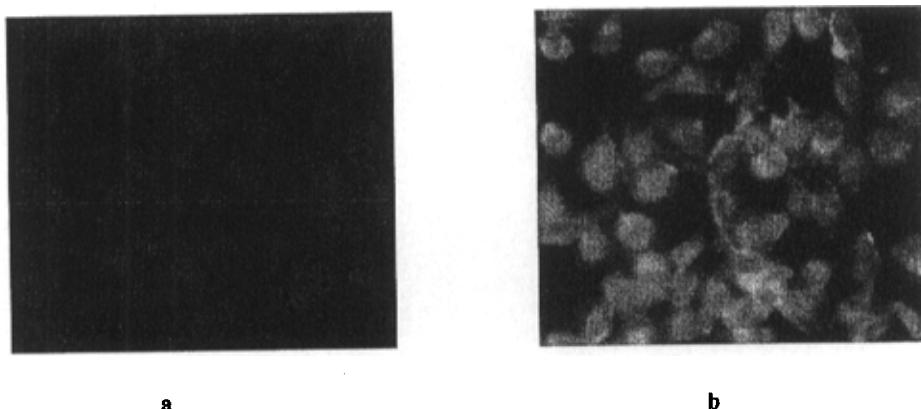


图 3-13 活 PC12 细胞摄取 $ZnSO_4$ 前后的荧光显微照片。PC12 细胞在 $10 \mu M$ 的 N2 培养液中培养 1 小时后, 加入 $10 \mu M$ 的 $ZnSO_4$ 拍照。激发波长是 WB 450-480 nm。 (a) 加入 $ZnSO_4$ 前; (b) 加入 $ZnSO_4$ 后。

Figure 3-13 Fluorescence microphotographs of $ZnSO_4$ uptake by the living PC12 cells. The cells were incubated in $10 \mu M$ N2 cultured solution. (a) Fluorescence images of PC12 cells untreated with Zn^{2+} ; (b) Fluorescence images of the PC12 cells loaded with $10 \mu M$ Zn^{2+} . The excited light is WB 450-480 nm.

胞成像检测。**N2** 标记的 PC12 细胞在其细胞质中（细胞核未标记）发出微弱的荧光（如图 3-13a 所示）；加入 Zn^{2+} 后，细胞质和细胞核中都发出强烈的荧光（如图 3-13b 所示）。在活细胞中的显微成像表明，**N2** 能够很好地进入细胞中并在活细胞中对 Zn^{2+} 表现出荧光增强。所以，**N2** 在活细胞中能够用于检测细胞内 Zn^{2+} 浓度的变化，为进一步阐明 Zn^{2+} 在生命过程中的作用。

3.5 本章小节

1. 设计合成了以 4-氨基-1, 8-萘酰亚胺为荧光团的荧光分子探针 **N1**、**N2** 和 **N3**，三个化合物均未见文献报道。
2. 以 DPA 为识别基团，氨基乙基为连接基的荧光分子探针 **N2** 在 tris-HCl 的中性缓冲溶液中能够高灵敏度、高选择性地络合促进荧光增强识别 Zn^{2+} 。络合 Zn^{2+} 后，**N2** 的荧光强度增大 5 倍，吸收光谱和荧光光谱都分别蓝移 10 nm。 $K_d = 0.83 \text{ nM}$ ，表明 **N2** 能够定量检测低于纳摩尔浓度范围的游离 Zn^{2+} 。在此基础上，实现了该探针对活细胞中 Zn^{2+} 的荧光成像检测。
3. **N3** 在酸性条件下的荧光强度是碱性条件下的 27 倍，说明 **N3** 是一个潜在的大范围的氢质子荧光分子开关。

参考文献

- [1] de Silva, A. P.; Gunaratne H. Q. N.; Gunnlaugsson, T.; Huxley, A. J. M.; McCoy C. P.; Radmancher J. T.; Rice T. E. Signaling Recognition Event with Fluorescent Sensors and Switches. *Chem. Rev.*, 1997, 97, 1515~1566.
- [2] 樊美公等, 光化学基本原理与光子学材料科学, 北京: 科学出版社, 2001, 326-331.
- [3] Valeur, B.; Leray, I. Design principles of fluorescent molecular sensors for cation recognition, *Coord. Chem. Rev.*, 2000, 205, 3-40.
- [4] 甘家安, 陈孔常, 田禾. 新型1, 8-萘酰亚胺衍生物的合成及分子内光致电子转移. *华东理工大学学报*, 2001, 27, 217-220.
- [5] Xuhong Qian, Zhenghua Zhu, Kongchang Chen. The Synthesis, Application and Prediction of Stokes Shift in Fluorescent Dyes Derived from 1,8-Naphthalic Anhydride. *Dyes and Pigments*, 1989, 11, 13-20.
- [6] Grabchev, I.; Petkov, C.; Bojinov, V. Synthesis and absorption properties of some new bis-1,8-Naphthalimide. *Dyes and Pigments*, 2001, 48, 239-244.
- [7] de Silva, A. P.; Rice, T. E. A Small Supramolecular System Which Emulates the Unidirectional, Path-selective Photoinduced Electron Transfer (PET) of the Bacterial Photosynthetic Reaction Centre (PRC). *Chem. Commun.*, 1999, 163-164.
- [8] Martell, A. E.; Smith, R. M. NIST Critical Stability Constants of Metal Complexes, NIST Standard Reference Database 46, Version 5.0, 1998.
- [9] Perrin, D. D.; Dempsey, B. Buffers for pH and Metal Ion Control, New York, London: John Wiley&Sons, Chapman and Hall, 1974.
- [10] Sahs, S.; Samanta, A. Transition Metal Ion Induced Fluorescence Enhancement of 4-(*N,N*-Dimethylethylenediamino)-7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazole, *J. Phys. Chem. A.* 2002, 106, 4763-4771.

第四章 1,8-萘酰亚胺类荧光分子探针

4.1 分子设计思想

1,8-萘酰亚胺由于具有光稳定性好、化学稳定性好、量子产率高并有大的斯托克斯位移等优点，经常被用于各种荧光分子探针中。该荧光团在合成过程中有两个不同性质的反应位点，为连接识别基提供了方便。一般来说，几乎所有的荧光化合物都可以用作荧光分子探针的信号基团，但实际上不同荧光化合物之间的性质差别巨大，以一类荧光化合物为荧光团设计的有效识别结构用于另一类荧光团未必有效。即使相同的识别基团和连接基团连接在4-氨基-1,8-萘酰亚胺不同的位置上，其识别效果也可能截然不同，而且这种现象并非偶然。

de Silva^[1,2]和 Samanta 研究小组^[3-5]在1,8-萘酰亚胺的酰胺位置上，设计了结构简单的“氨基-烷基-荧光团”光诱导电子转移(PET)类型荧光分子探针。经研究表明，强缺电子的4-氯-1,8-萘酰亚胺衍生物在有机溶剂中，多种过渡金属离子对其有荧光增强作用。在四氢呋喃中，分别加入水合高氯酸锌、 Ni^{2+} 和 Cu^{2+} ，荧光增强329倍、227倍和283倍；另外，它还是很好的pH探针，在甲醇/水溶液中，pH 8.06-10.65之间，荧光增大56倍。

但是，上述探针对金属离子没有特殊选择性，并且有文章认为，在有机溶剂中，结构简单的荧光团-连接基-受体类型的荧光分子探针对过渡金属离子的开关作用，可能不是过渡金属离子和荧光分子探针直接作用的结果，而是由于有机溶剂中存在微量水，或过渡金属为水合盐，微量水的存在导致过渡金属离子的水解，水解产生的质子与荧光分子探针之间的作用阻止了PET过程，而导致荧光增强^[6]。

为了使这类荧光分子探针有选择性地稳定结合金属离子，并且利用萘酰亚胺处的羰基氧可能与其他原子之间形成氢键，抑制pH对探针分子荧光强度的影响，在分子设计上，选择4位不同取代基-1,8-萘酰亚胺作为荧光分子探针的荧光信号发射基团，根据光诱导电子转移机理在酰胺键上通过乙基连接

DPA 作为识别基团。主要分子的结构如下：

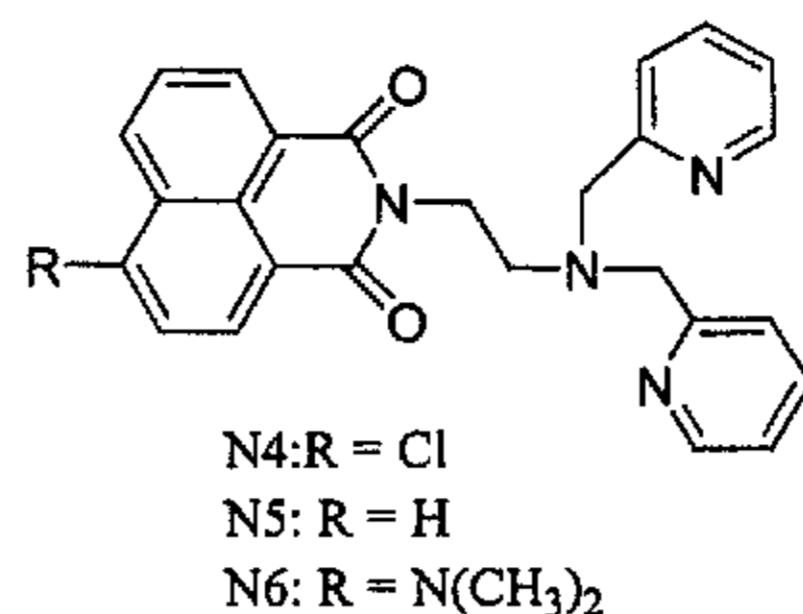
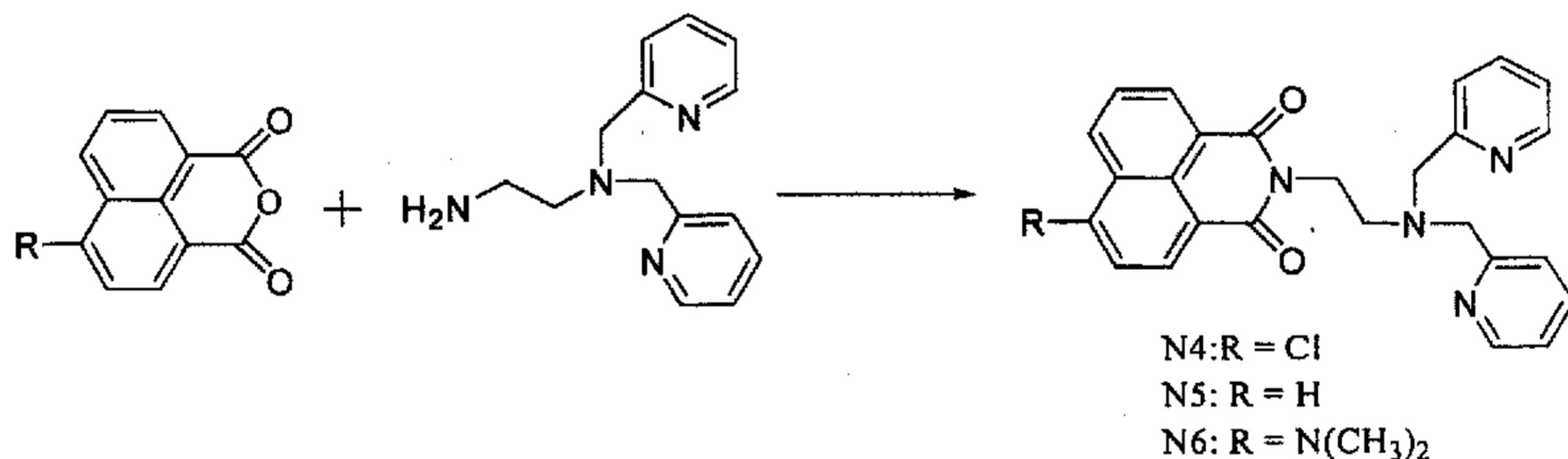


图 4-1 荧光分子探针的结构

Figure 4-1 The structures of fluorescent probes

4.2 荧光分子探针的合成路线

以 4-取代-1,8-萘酐为原料和中间体 **M2** 反应，生成目标化合物 **N4**、**N5** 和 **N6**。



式 4-1 荧光分子探针的合成
Scheme 4-1 Synthesis of the fluorescent probes

4.3 实验部分

4.3.1 原料与仪器

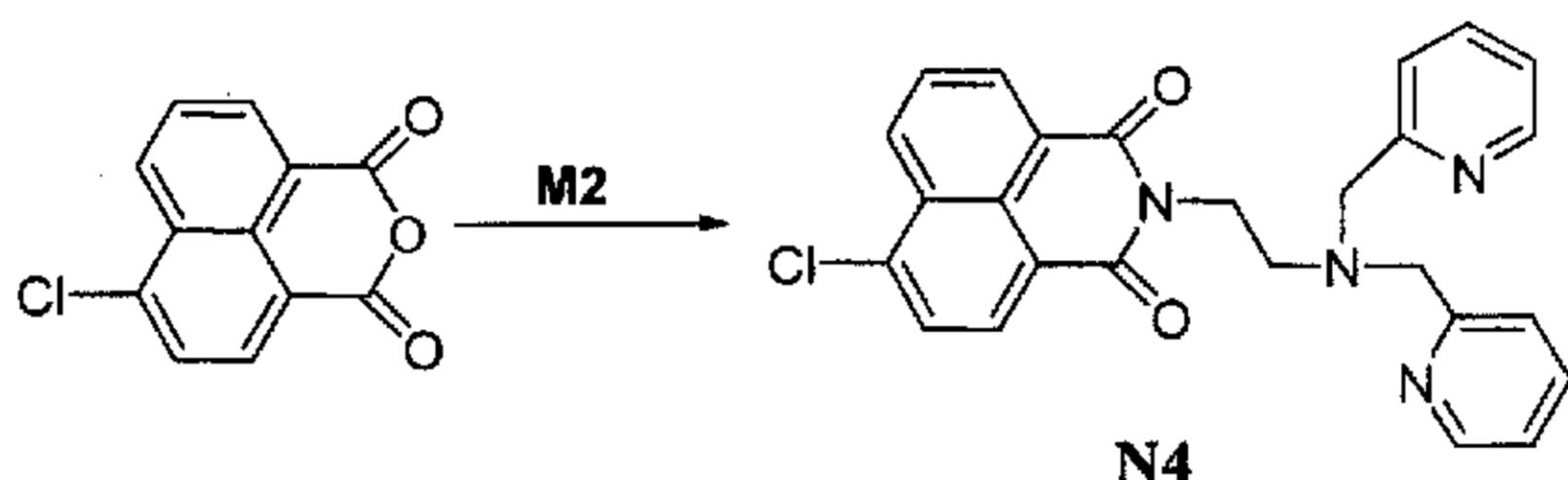
4-氯-1,8-萘酐和 1,8-萘酐购自鞍山化工股份有限公司，2-氨基甲基吡啶、吡啶-2-甲醛购自 Aldrich 公司，其它合成原料及溶剂均为市售化学品。柱色谱硅胶为青岛海洋化工厂产品 (200-300 mesh)。

HP1100 HPLC/MS 质谱仪 (美国 HP 公司)，Varian INOVA 400 (400MHz) 核磁共振仪 (美国 Varian 公司，TMS 为内标)，X-6 显微熔点测定仪 (北京泰克仪

器有限公司), elementar vario EL III型元素分析仪(德国), HP-8453 紫外-可见分光光度计, PTI00 荧光分光光度计, BS-210S 万分之一电子天平(德国 Satorius 公司), PB-20 标准型 pH 计(德国 Sartorius 公司), 荧光量子产率的计算以硫酸奎宁(0.55)在 0.05 N 硫酸中为标准。

4.3.2 荧光分子探针的合成及结构表征

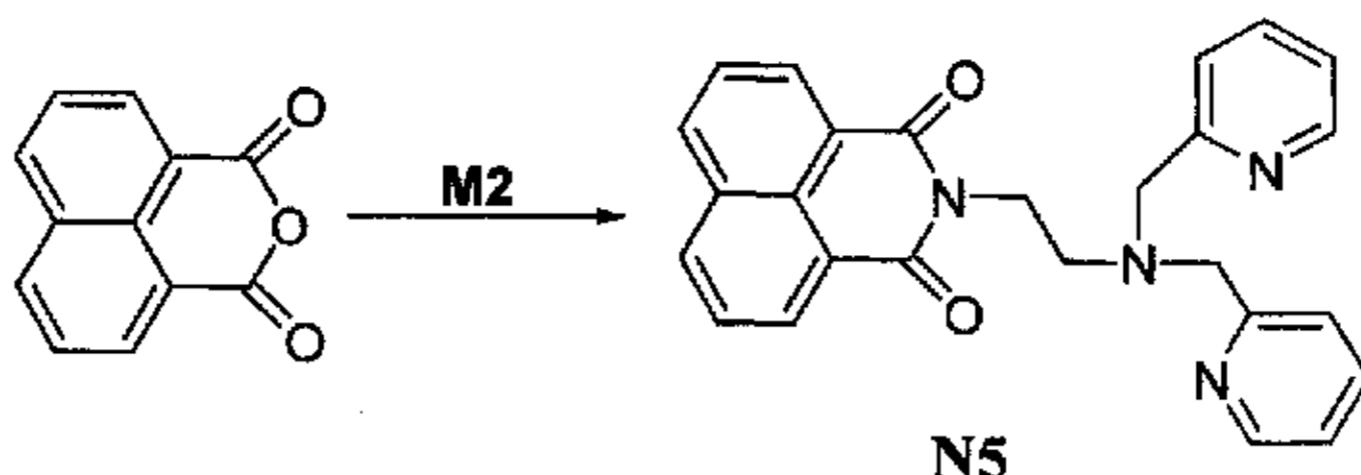
4.3.2.1 化合物 N4 的合成及结构表征



取 125mg(0.52mmol)中间体 M2, 置于 10ml 圆底烧瓶中, 用 5ml 精制乙醇溶解, 加入 100mg (0.43mmol)4-氯-1,8-萘酐, 氩气保护, 无水硫酸钠作为除水剂。加热回流反应 24 小时。反应完毕后过滤, 滤液蒸干, 得黄色油状物残留。残留物用少量二氯甲烷溶解, 避光用硅胶柱分离。展开剂: $CH_2Cl_2/MeOH = 25:1$ (v:v)。蒸干溶剂, 得到暗黄色油状物, 真空干燥, 得到淡黄色固体粉末 N4。收率: 35%(68.6mg), 熔点: 116-117°C。

1H -NMR (400MHz, $CDCl_3$): δ 8.63 (dd, 2H, $J_1 = 8.4$ Hz, $J_2 = 7.2$ Hz), 8.44 (dd, 3H, $J_1 = 8.0$ Hz, $J_2 = 4.8$ Hz), 7.89 (dd, 2H, $J_1 = 8.0$ Hz, $J_2 = 7.6$ Hz), 7.34 (m, 4H), 7.00 (t, 2H), 4.41 (t, 2H, $J = 6.4$ Hz), 3.91 (s, 4H), 2.96 (t, 2H, $J = 6.0$ Hz)。
 ^{13}C -NMR (100MHz, $CDCl_3$): δ 163.64, 163.40, 159.76, 149.00, 139.09, 136.21, 132.08, 132.19, 130.70, 129.46, 129.24, 128.02, 127.54, 122.95, 121.91, 60.51, 51.76, 38.29. API-ES MS m/z (+): 457, 459 ($[M+H]^+$); 479, 481 ($[M+Na]^+$). Anal. Calcd. for $C_{26}H_{21}ClN_4O_2$: C, 68.34; H, 4.63; Cl, 7.76; N, 12.26. Found: C, 68.48; H, 4.64; Cl, 7.78; N, 12.28.

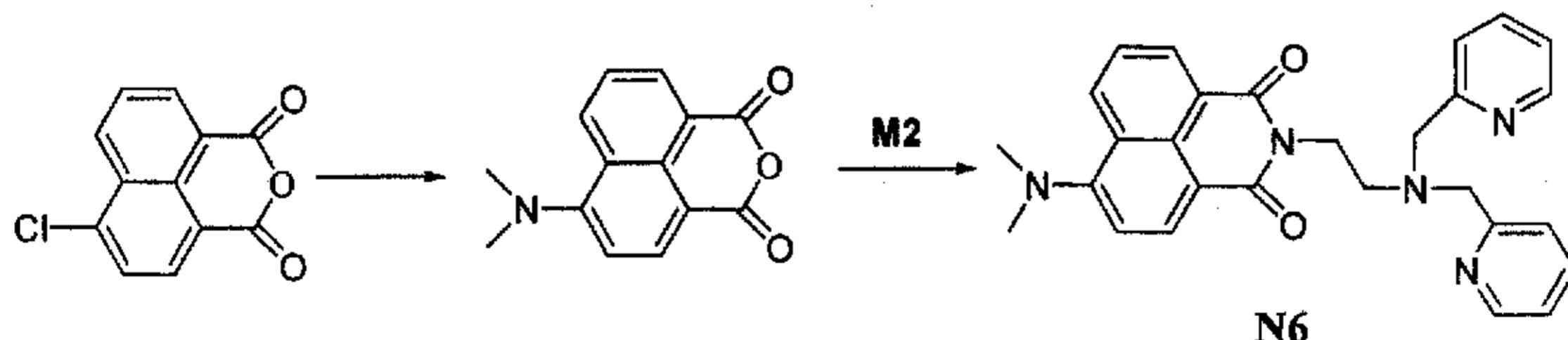
4.3.2.2 化合物 N5 的合成及结构表征



取 145mg(0.6mmol)中间体 **M2**，置于 10ml 圆底烧瓶中，用 5ml 精制乙醇溶解，加入 100mg (0.51mmol) 1,8-萘酇，加入少量无水硫酸钠，氩气保护。加热回流 21 小时。过滤，滤去硫酸钠，滤液蒸干，得黄色油状物残留。残留物用少量二氯甲烷溶解，避光用硅胶柱分离，展开剂： $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH} = 20:1$ (v:v)。蒸干溶剂，得到淡黄色油状物，真空干燥，得到黄色固体粉末 **N5**。收率：32% (68.9mg)，熔点：122-123°C。

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3): 8.56 (d, 2H, $J = 7.6\text{Hz}$), 8.40 (d, 2H, $J = 4.4\text{Hz}$), 8.26 (d, 2H, $J = 8.0\text{Hz}$), 7.80 (t, 2H, $J = 7.2\text{Hz}$), 7.36 (d, 2H, $J = 7.6\text{Hz}$), 7.27 (t, 2H, $J = 4.1\text{Hz}$), 7.00 (t, 2H, $J = 5.6\text{Hz}$), 4.44 (t, 2H, $J = 6.0\text{Hz}$), 3.92 (s, 4H), 2.96 (t, 2H, $J = 6.4\text{Hz}$). $^{13}\text{C-NMR}$ (100MHz, CDCl_3): δ 164.15, 159.80, 148.96, 136.27, 134.01, 131.74, 131.32, 127.13, 122.95, 121.92, 60.52, 51.91, 38.15. API-ES MS $m/z(+)$: 423 ($[\text{M}+\text{H}]^+$), 445 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$). Anal. Calcd. for $\text{C}_{26}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_2$: C, 73.92; H, 5.25; N, 13.26. Found: C, 74.14; H, 5.27; N, 13.30.

4.3.2.3 化合物 **N6** 的合成及结构表征



4-*N,N*-二甲基-1,8-萘酇的合成：向 25ml 圆底烧瓶中加入 0.506g 4-溴-1,8-萘酇，再加入约 15ml *N,N*-二甲基甲酰胺 (DMF)，其中 DMF 既作为反应原料，又作为溶剂。加热回流 4 小时。反应完毕冷却至室温，将反应液倒入冰水中，析出大量黄色固体，过滤，取滤饼，真空干燥。将干燥的固体溶于少量二氯甲烷，用硅胶柱分离，展开剂： $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH} = 50:1$ (v:v)。

105mg (0.43mmol) 中间体 **M2**, 置于 10ml 圆底烧瓶, 用 5ml 精制乙醇溶解, 加入 100mg (0.41mmol) 4-(N,N-二甲基) 胺基-1,8-萘酐, 加入少量无水硫酸钠, 氩气保护。加热回流 6 小时。过滤, 滤液蒸干, 得黄色油状物。用少量二氯甲烷溶解, 硅胶柱分离, 展开剂: $CH_2Cl_2/MeOH = 50:1 \sim 30:1 (v:v)$ 。将产物层的溶剂蒸干, 得黄色油状物, 真空干燥, 得黄色固体粉末 **N6**。收率: 40% (76mg)。熔点: 106.0-106.2°C

1H -NMR (400MHz, $CDCl_3$): δ 8.51 (m, 5H), 7.67 (m, 1H), 7.40 (d, 2H, $J = 7.6$ Hz), 7.32 (t, 2H, $J = 7.6$ Hz), 7.15 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz), 7.02 (t, 2H, $J = 5.6$ Hz), 4.24 (t, 2H, $J = 6.0$ Hz), 3.93 (s, 4H), 3.13 (s, 6H), 2.95 (t, 2H, $J = 6.4$ Hz).
 ^{13}C -NMR (100MHz, $CDCl_3$): δ 164.56, 164.05, 159.86, 157.06, 148.91, 136.32, 132.73, 131.25, 131.12, 130.42, 125.49, 125.08, 122.99, 121.89, 115.33, 113.52, 60.50, 53.59, 44.98, 37.97. API-ES MS m/z (+): 466 ($[M+H]^+$), 488 ($[M+Na]^+$).
Anal. Calcd. for $C_{28}H_{27}N_5O_2$: C, 72.24; H, 5.85; N, 15.04. Found: C, 72.10; H, 5.84; N, 15.01.

4.3.3 紫外及荧光光谱的测定

实验方法同第二章所述。

4.3.4 量子化学计算方法

化合物的几何构型进行优化, 用极小能量法寻找过渡态, 并用同样的方法对其进行构型优化。为了能更准确地估计反应的能量, 在 B3LYP/6-311+G(2d,p)^[7] 水平上对所有优化的几何构型实行了单点能计算。全部计算工作使用 Gaussian 98^[8] 程序中的 B3LYP 方法, 在 K7-600 计算机上完成。

4.4 结果与讨论

4.4.1 荧光分子探针的合成及核磁谱图

N4、N5 和 N6 的合成反应是用 4 位取代的 1,8-萘酐和伯胺反应，其过程只涉及到氮酰化反应，反应时有水生成。所以应该加入无水硫酸钠吸水，使反应向正向进行。氩气保护有利于保证反应物在反应过程中自身没有变质。

本章合成的主要产物经核磁氢谱、碳谱、质谱表征，结构正确。典型产物化合物 **N4** 的核磁谱图如下：

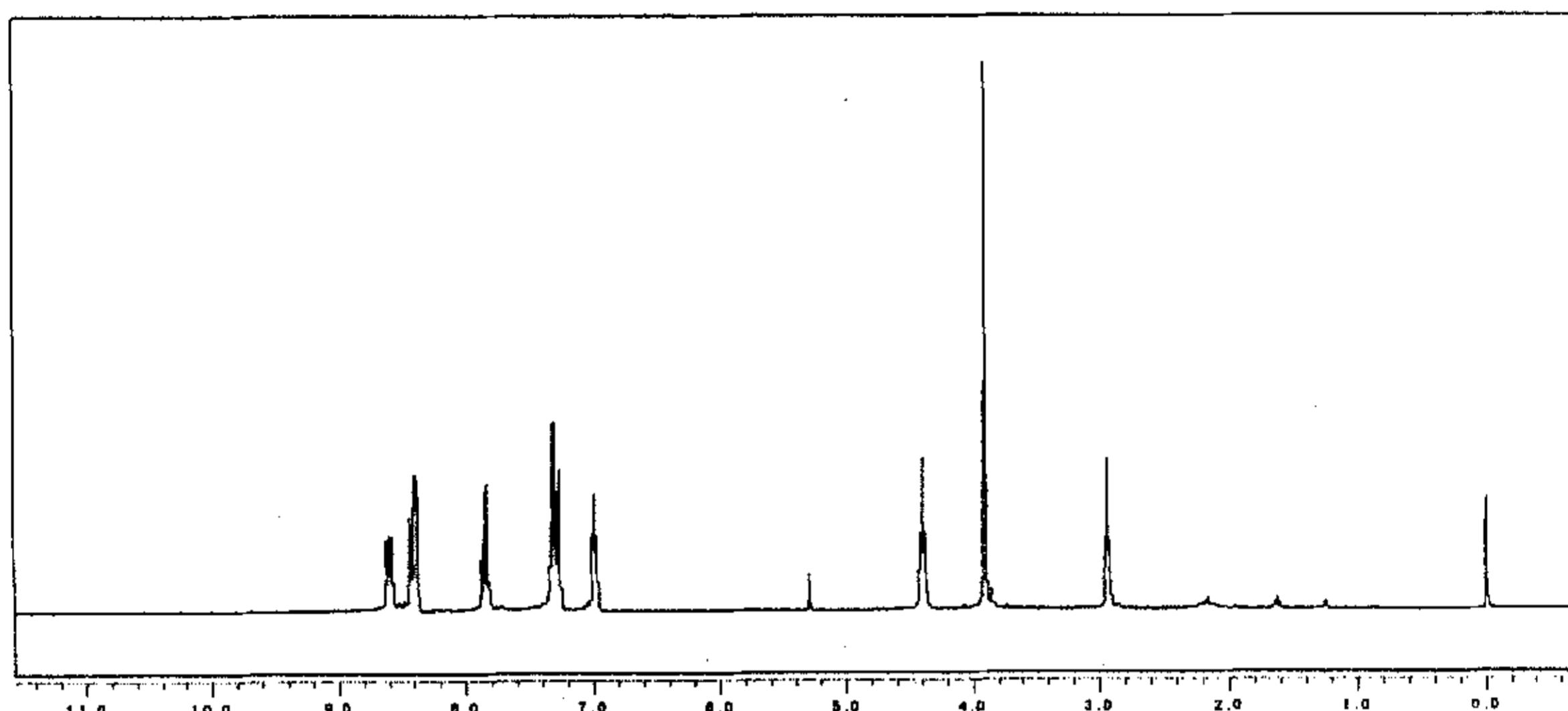


图 4-2 化合物 N4 的 ^1H NMR 谱
Figure 4-2 The ^1H NMR spectrum of compound N4

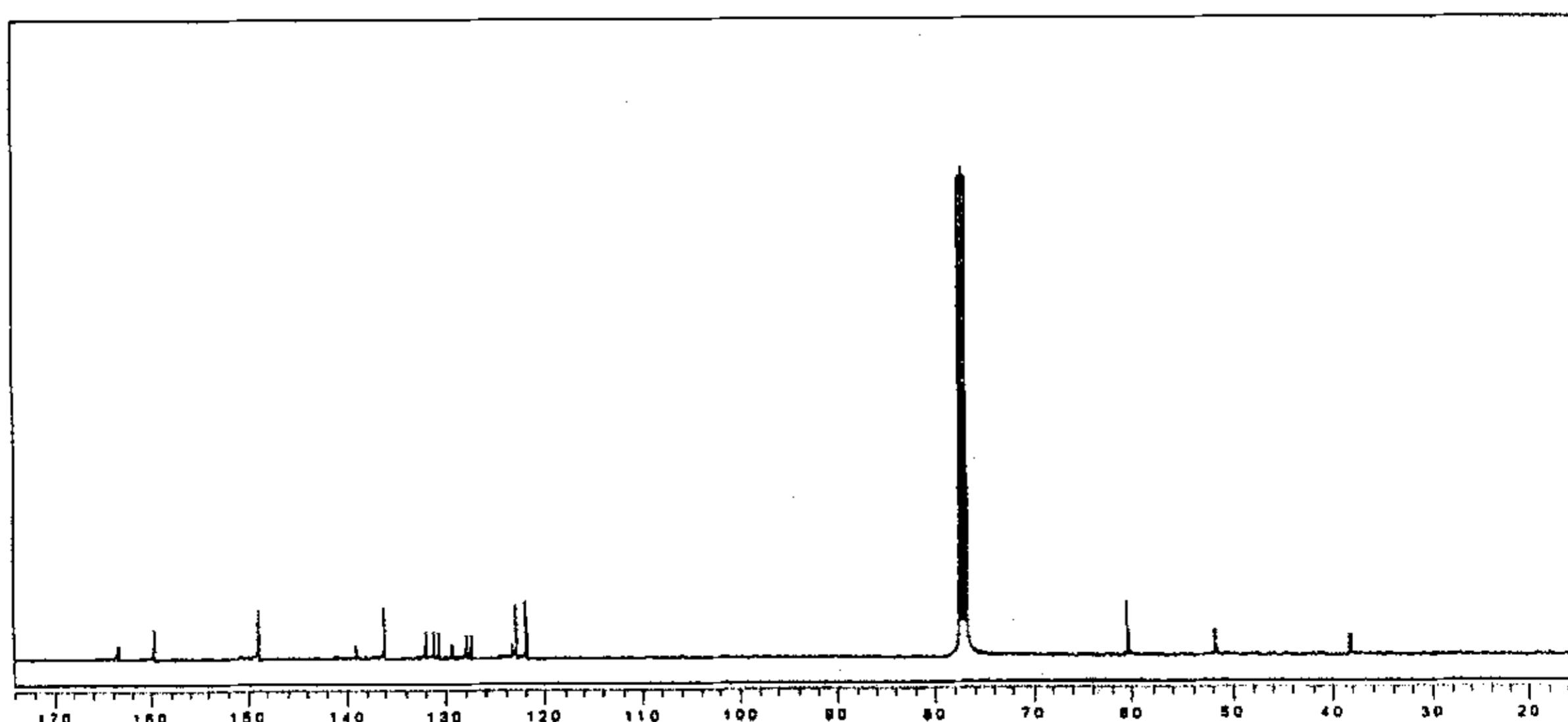


图 4-3 化合物 N4 的 ^{13}C -NMR 谱
Figure 4-3 The ^{13}C -NMR spectrum of compound N4

4.4.2 溶剂对 N4、N5 和 N6 光谱的影响

表 4-1 为 N4、N5 和 N6 在不同溶剂中的最大吸收波长、最大发射波长和相对荧光强度($1 \times 10^{-5} M$)。

表 4-1 N4、N5 和 N6($1 \times 10^{-5} mol/l$)在不同溶剂中的光谱数据
Table 4-1 Spectra data of compound N4, N5 and N6($1 \times 10^{-5} mol/l$) in different solvents

		环己烷	甲苯	四氢呋喃	乙酸乙酯	丙酮	乙腈	乙醇
N4	λ_{max}	361	363	364	368	366	360	380
	λ_{em}	404	407	427	435	431	421	429
	Abs	0.037	0.07	0.049	0.022	0.028	0.106	0.106
N5	λ_{max}	291	294	297	341	329	342	341
	λ_{em}	355	345	331	378	395	387	379
	Abs	0.0427	0.0427	0.0319	0.0118	0.0945	0.0962	0.1055
N6	λ_{max}	395	406	411	419	420	420	420
	λ_{em}	460	491	511	521	519	530	527
	Abs	0.1579	0.1118	0.0862	0.1201	0.1235	0.0946	0.1129

从表 4-1 中可以看出，随着溶剂极性的增加，化合物 N4、N5 和 N6 的最大吸收波长都发生了红移，分别移动了 20nm、50nm 和 25nm；发射波长也分别红移 25nm、24nm 和 67nm。吸光度总的呈增加趋势，荧光强度随着溶剂极性的增加而降低。以上研究表明，N4、N5 和 N6 对溶剂极性有一定的敏感性，其荧光的最大发射波长随溶剂极性变化均有较灵敏的响应。

4.4.3 tri-HCl 缓冲溶液中 N4、N5 和 N6 对金属离子的识别

为了避免加入各种金属盐引入溶液的 pH 的变化而导致探针的荧光强度发生改变，识别实验在缓冲溶液中进行。化合物 N4 和 N5 在 10mM 的三羟甲基甲烷(tris)-HCl 中(pH = 7.4, DMSO 和水 1:9)对常见金属离子(如： Zn^{2+} 、 Cd^{2+} 、 K^+ 、 Na^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Cr^{3+} 、 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Cu^{2+} 和 Co^{2+})的识别如图 4-4 和 4-5 所示。其中，化合物 N4 和 N5 都对 Zn^{2+} 表现出很好的选择性识别；另外，它们对 Cd^{2+} 也表现出一定的荧光增强，只是一般生命体中这种金属离子的含量很低，不会对 Zn^{2+} 的检测产生影响。而化合物 N6 对任何金属离子都无

明显的识别作用，荧光强度没有明显的变化。

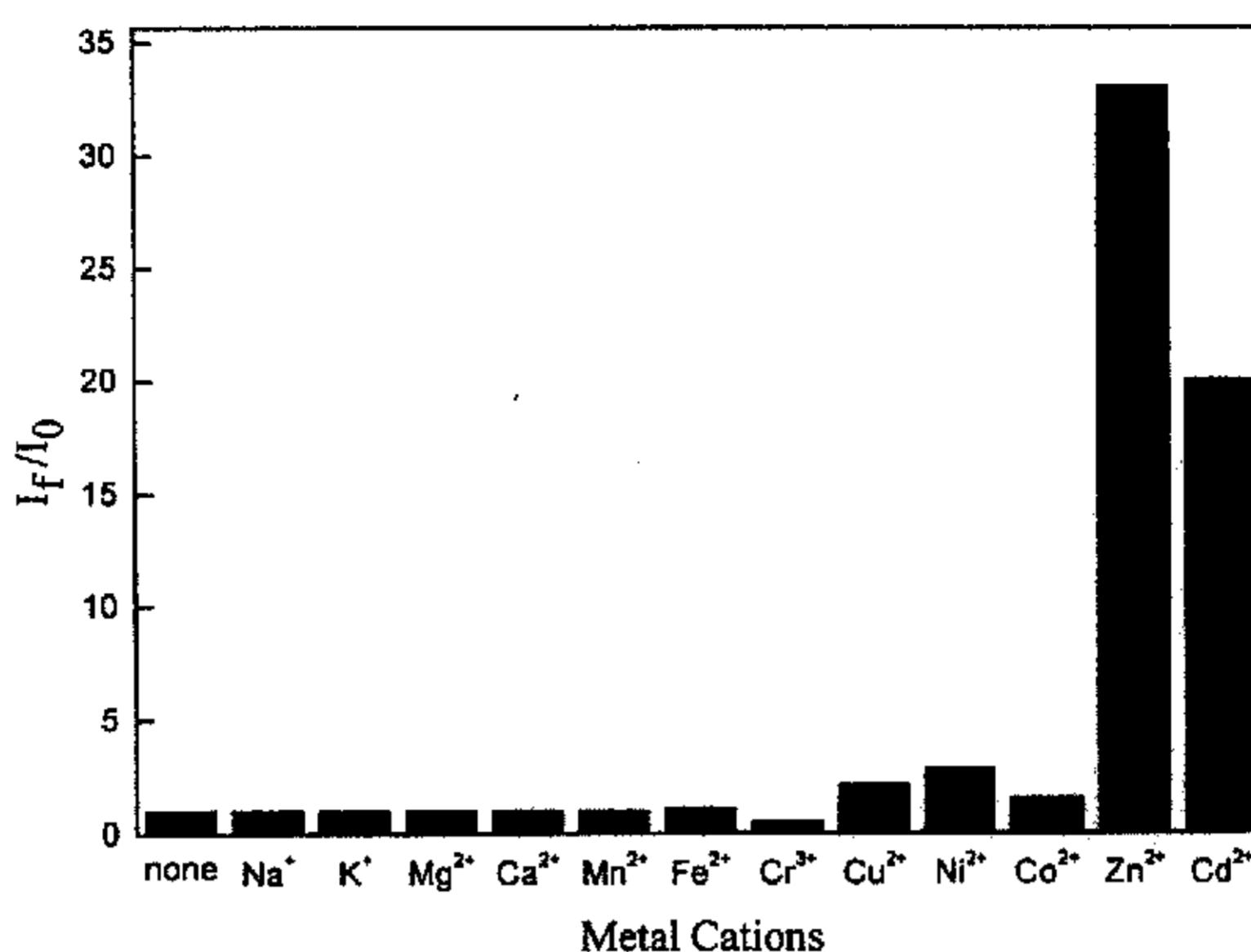


图 4-4 不同金属离子(5×10^{-6} M) 存在下 N4 (1×10^{-6} M) 荧光强度的变化。光谱数据在 10mM tris-HCl 缓冲溶液中测得(pH 7.4, I = 0.1 (NaCl))。

Figure 4-4 The relative fluorescence intensity of 1×10^{-6} M N4 in the presence of various metal cations (5×10^{-6} M). These data were measured in 10 mM tris-HCl buffer (pH 7.4, I = 0.1 (NaCl)).

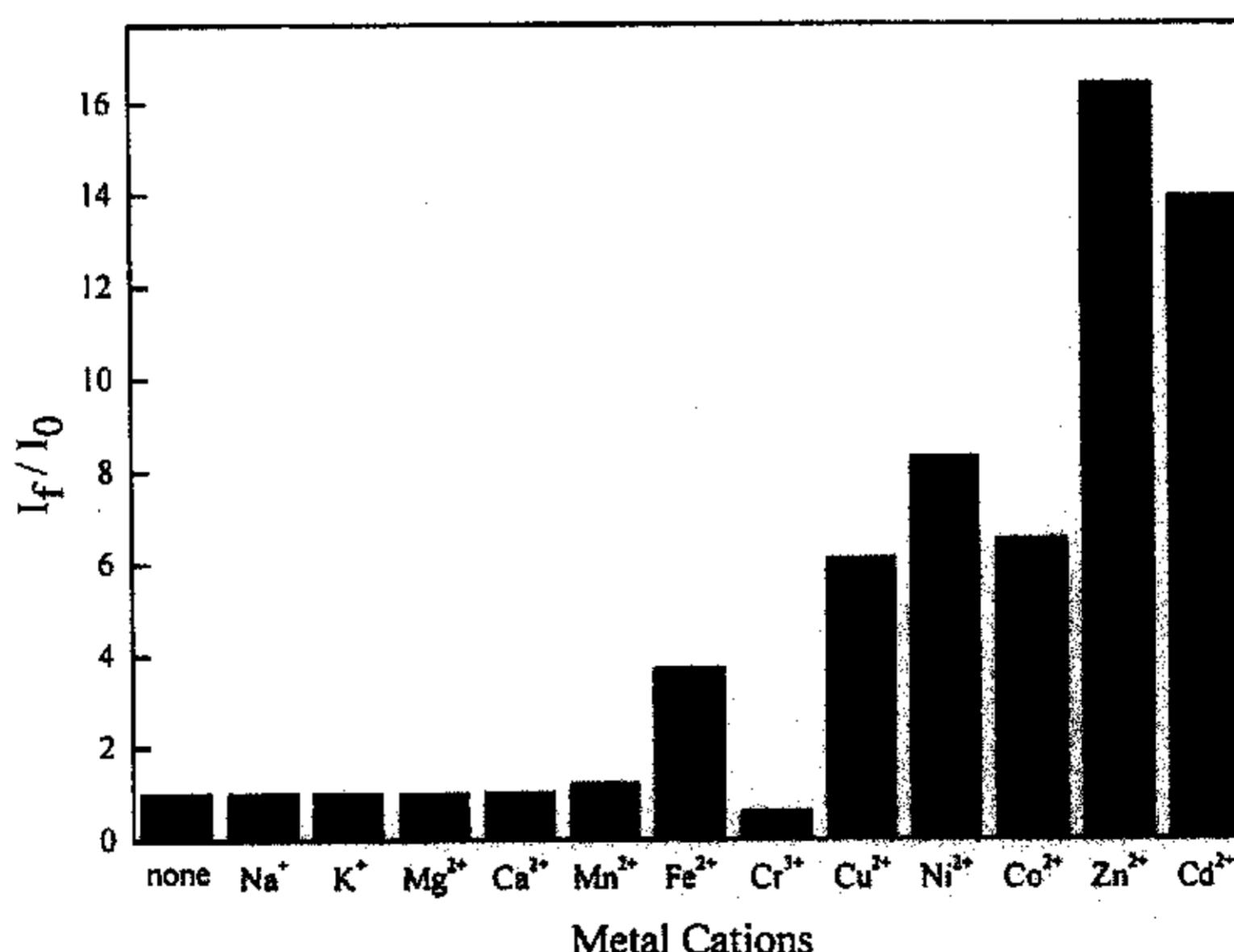


图 4-5 不同金属离子(5×10^{-6} M) 存在下 N5 (1×10^{-6} M) 荧光强度的变化。光谱数据在 10mM tris-HCl 缓冲溶液中测得(pH 7.4, I = 0.1 (NaCl))。

Figure 4-5 The relative fluorescence intensity of 1×10^{-6} M N5 in the presence of various metal cations (5×10^{-6} M). These data were measured in 10 mM tris-HCl buffer (pH 7.4, I = 0.1 (NaCl)).

识别金属离子的作用原理之一光诱导电子转移(PET)原理已经在第一章作过陈述。识别配体和荧光团之间的最高占有轨道(HOMO)的能量差为正值,是光诱导电子转移能够发生的重要因素。因此,我们可以从PET机制的前线轨道理论对上述实验结果作辅助解释。

化合物N4和N5的HOMO能级经量子化学计算后,根据PET原理作图4-6。从图中可以看出,DPA的最高占有轨道(HOMO)的能级(-5.01eV)明显高于化合物N4(-6.59eV)和N5(-6.48eV)。因此,在热力学上化合物N4和N5是可能发生光诱导电子转移过程(PET)的;而结合了 Zn^{2+} 后,DPA的HOMO能级降低到-14.45eV,远远小于荧光团的HOMO能级,PET过程被抑制住,荧光团的荧光恢复。所以,N4和N5是典型的PET类型 Zn^{2+} 荧光分子探针。

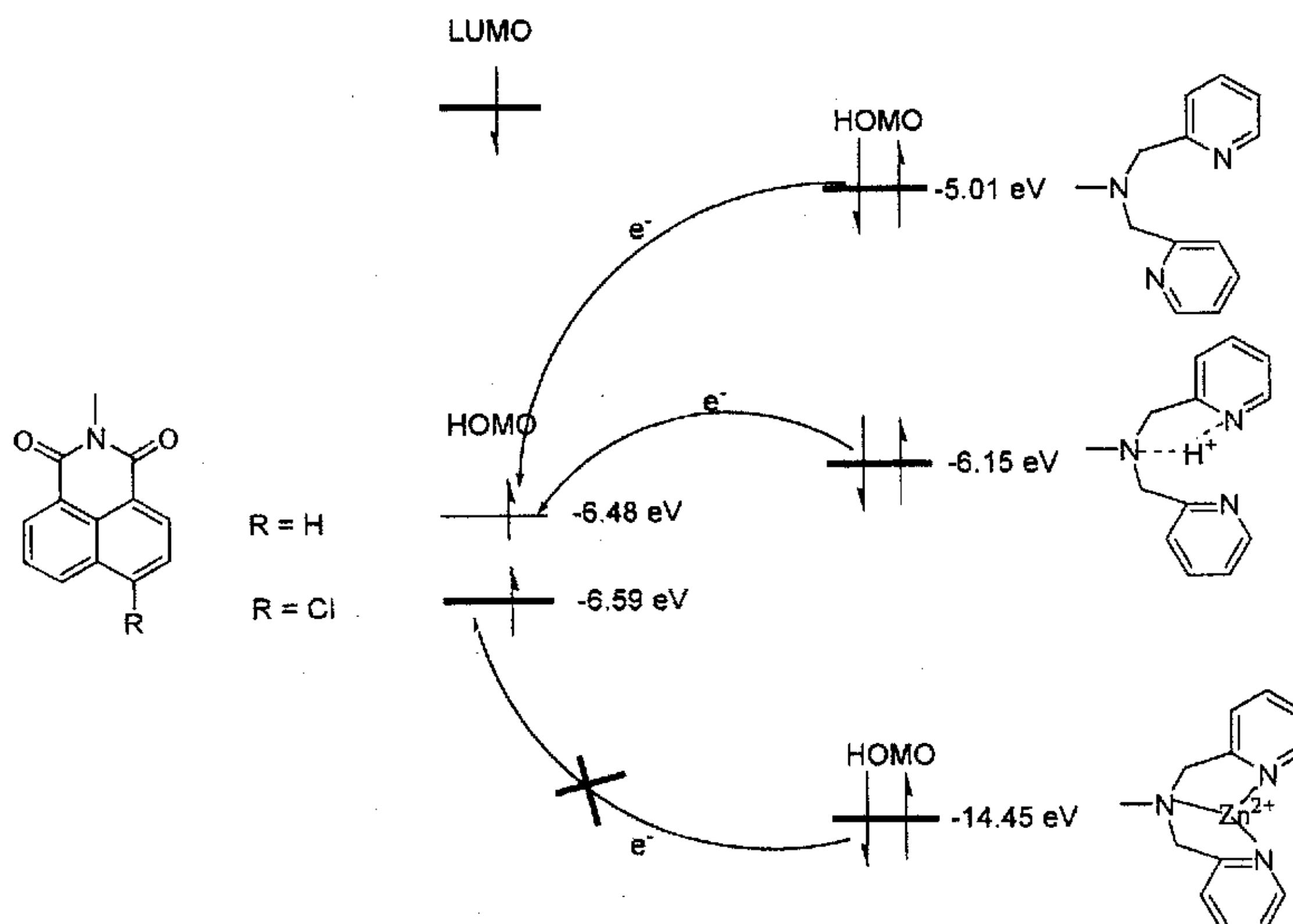


图4-6 化合物N4和N5的HOMO能级和PET过程。能量值用B3LYP/6-31 G*计算。
Figure 4-6 HOMO energy level and PET process of N4 and N5. These values were obtained from B3LYP/6-31 G* calculation.

如图 4-7 所示, 对于化合物 N6, 4-N,N-二甲基萘酰亚胺是推拉 π 电子体系, 其中 N,N-二甲基作为电子给体, 萘酰亚胺是电子受体。这导致了强烈的最低激发单线态分子内电荷转移和相当大的偶极性质(正极是 N,N-二甲基上)。激

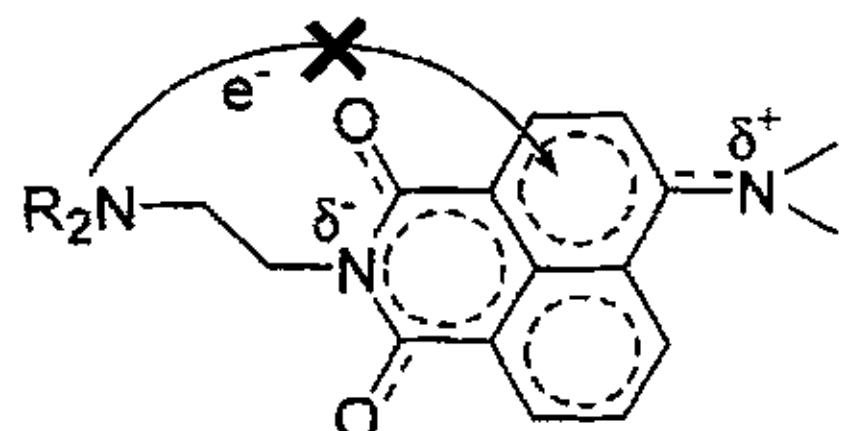


图 4-7 荧光团和外部电子给体(也是质子接受体)之间的 ICT 激发态电子转移示意图

Figure 4-7 Schematic representation of electron transfer to an ICT excited state of a fluorophore from an intramolecular but “external” electron donor (which is also a proton receptor).

发态大的偶极距引起了强烈的光衍生电子云密度。这种电子云密度分布抑制了 N6 内部的电子跃迁。所以, 虽然化合物 N6 的 PET 过程在热力学上是可行的, 但是电子需要穿过相互排斥的酰胺键才能进入荧光团, 使 PET 过程最终

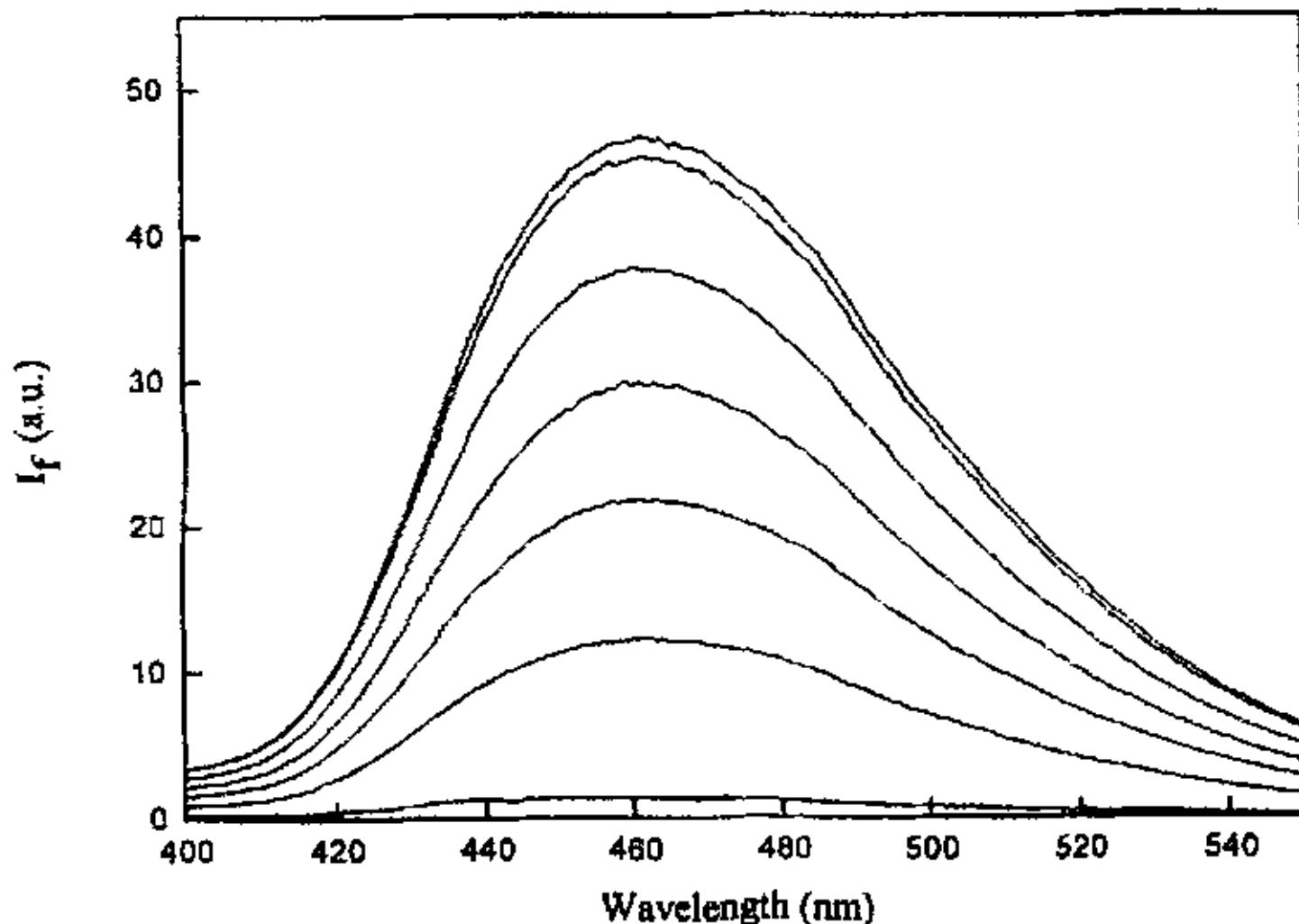


图 4-8 N4(1×10^{-5} M)的荧光光谱随 Zn^{2+} 浓度($0-5 \times 10^{-5}$ M)的变化。光谱数据在 0.01 M tris-HCl(DMSO:H₂O = 1:9, v/v, pH 7.4, I = 0.1 NaCl)缓冲溶液中测得。激发波长是 380 nm。

Figure 4-8 Emission spectra of N4 (1×10^{-5} M) in the presence of various concentrations of Zn^{2+} ranging from 0 to 1×10^{-5} M. These spectra were measured at pH 7.4 (10 mM tris-HCl buffer, I = 0.1 (NaCl)). Excitation wavelength is 380 nm.

不能够发生, 相应地, 化合物 **N6** 在络合金属离子前后荧光强度没有明显变化 [9]。

4.4.4 不同浓度的 Zn^{2+} 对 **N4** 和 **N5** 荧光光谱的影响

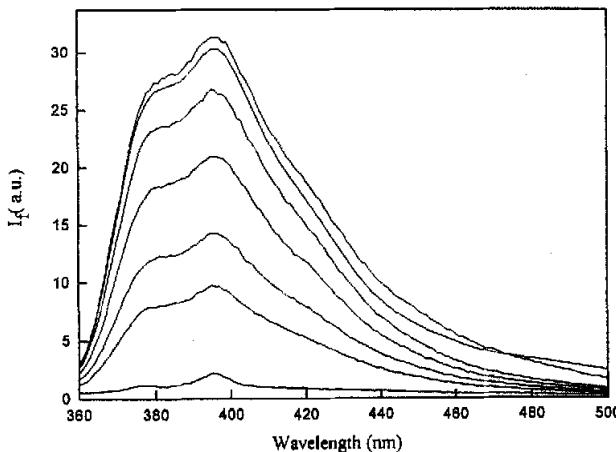


图 4-9 $N5(1 \times 10^{-5} M)$ 的荧光光谱随 Zn^{2+} 浓度($0-5 \times 10^{-5} M$)的变化。光谱数据在 $0.01 M$ tris-HCl($DMSO:H_2O = 1:9, v/v, pH 7.4, I = 0.1 NaCl$)缓冲溶液中测得。激发波长是 $348 nm$ 。

Figure 4-9 Emission spectra of $1 \times 10^{-5} M$ $N5$ in the presence of various concentrations of Zn^{2+} ranging from 0 to $1 \times 10^{-5} M$. These spectra were measured at pH 7.4 (10 mM tris-HCl buffer, $I = 0.1$ (NaCl)). Excitation wavelengths are $348 nm$.

由图 4-8 和图 4-9 可见, 在化合物 **N4** 或 **N5** 中加入 Zn^{2+} 后, 荧光大幅度增强, 发射光谱没有移动。在 $0-1 \times 10^{-5} M$ 范围内, 随着 Zn^{2+} 浓度的增加, **N4** 和 **N5** 的荧光强度不断增大, 并具有较好的线性关系。当 Zn^{2+} 浓度与 **N4** 或 **N5** 的浓度达到 $1:1$ 以后, 进一步增加 Zn^{2+} 浓度, 溶液的荧光强度基本保持不变。

4.4.5 pH 对 **N4** 和 **N5** 荧光光谱的影响

DPA 基团上有可质子化的位点, 因此 pH 的变化会对荧光分子探针的荧光强度产生影响。因此, 测定了 **N4** 和 **N5** 的荧光强度与 pH 之间的关系曲线, 如图 4-10 所示。

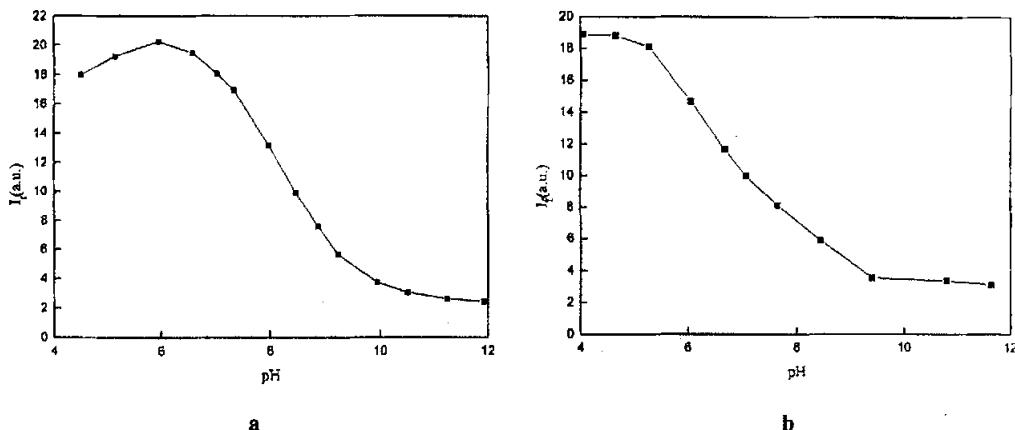


图 4-10 N4(a)和N5(b)的荧光强度与 pH 值之间的关系曲线 (在 1:9, v:v 的 DMSO/H₂O 的混合溶液中)。

Figure 4-10 Effect of pH on fluorescence intensity of N4 (a) and N5 (b) in a mixed solution of DMSO and water(1:9, v:v).

一般来说, PET 类型的金属离子荧光探针在水溶液中对 H⁺和金属离子所表现出来的荧光增强性质是相似的, 也就是说探针分子对二者没有很好的选择性。而从图 4-10 中可以看出, pH 6-12 之间, 化合物 N4 的荧光强度随 pH 的减小而增大 6 倍, 远远小于 N4 结合 Zn²⁺后荧光增强的倍数 (33 倍)。原因可能是, 由于 DPA 结构上叔胺氮原子质子化后, 和一个吡啶上的氮原子之间形成了氢键, 连接吡啶上的 C 原子得到了一个五元环结构, 分散了 H⁺的正电荷,

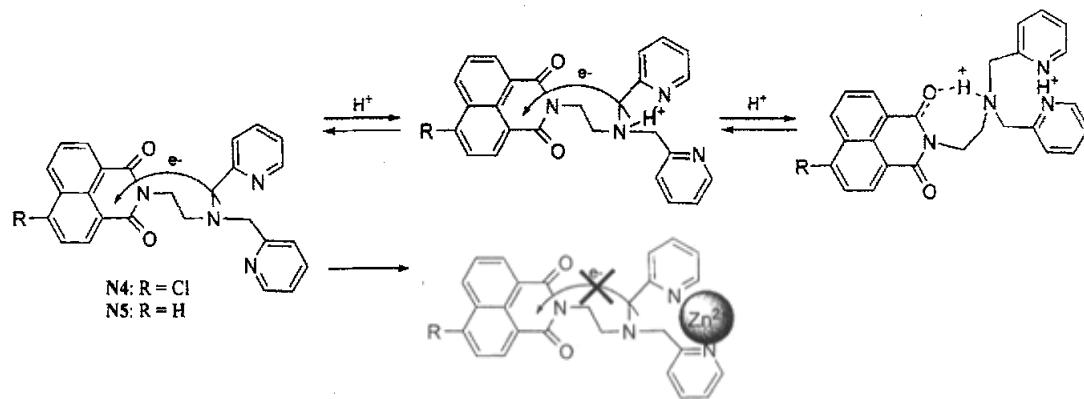


图 4-11 质子化或加入 Zn²⁺后 N4 和 N5 的 PET 过程的抑制

Figure 4-11 PET inhibition of N4 and N5 upon addition protons or Zn²⁺

致使质子化后的 DPA 的 HOMO 能级(-6.15eV)仍然微大于荧光团的 HOMO 能级(-6.48eV 和 -6.59eV)(如图 4-6 所示), 于是 N4 分子内 PET 过程仍然能够缓慢进行。所以, 叔氮的质子化过程所引起的 N4 荧光强度的改变并不大; 在 pH 4-6 之间 N4 出现了荧光淬灭现象, 这是由于 DPA 上的一个吡啶氮原子继续质子化, 破坏了与叔氮之间的氢键, 叔氮转而与酰胺上的氧原子形成氢键, 与其它 C 原子连接得到了一个七元环结构(以上分子模型都经过 Gaussian 结构优化后得到)^[9]。同理, 对于 N5 也得到了相似的结果。根据 N4 和 N5 的荧光强度与 pH 之间的关系曲线, 按照文献方法可以计算出 N4 的 $pK'a = 8.17$, N5 的 $pK'a = 6.93$ 。这些过程的示意图如图 4-11 所示。

将加入 Zn^{2+} 前后, pH 对 N4 和 N5 荧光强度的影响对比作图 4-12。可以看出, 在 pH 4-9 之间, pH 的变化对 Zn^{2+} 的检测影响很小。pH 7.4 时, N4 和 N5 有相同的荧光量子产率 0.004, 加入饱和 Zn^{2+} 后, Φ 分别增大到 0.17($\Phi_{N4}/\Phi_0 = 43$) 和 0.09($\Phi_{N5}/\Phi_0 = 23$)。pH 5 时, 加入 Zn^{2+} 后, $\Phi'_{N4}/\Phi_0 = 30$ 和 $\Phi'_{N5}/\Phi_0 = 10$ 。因此, N4 和 N5 是以 DPA 为识别配体, 在一定 pH 范围内, 对 Zn^{2+} 和 H^+ 选择性荧光识别的 Zn^{2+} 荧光分子探针。

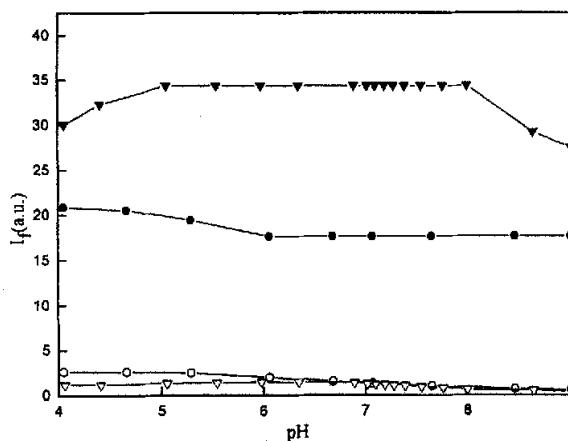


图 4-12 加入 Zn^{2+} 前后, pH 对 N4 和 N5 荧光强度的影响: ∇ , $10\mu M$ N4; \blacktriangledown , $10\mu M$ N4 + $10\mu M$ Zn^{2+} ; \circ , $10\mu M$ N5; \bullet , $10\mu M$ N5 + $10\mu M$ Zn^{2+} 。激发波长分别是 380nm 和 348nm。

Figure 4-12 Effect of pH on the fluorescence intensity of N4 and N5: ∇ , $10\mu M$ N4; \blacktriangledown , $10\mu M$ N4 + $10\mu M$ Zn^{2+} ; \circ , $10\mu M$ N5; \bullet , $10\mu M$ N5 + $10\mu M$ Zn^{2+} . The excitation wavelengths are 380nm for N4 and 348nm N5.

4.4.6 表观解离常数 K_d

为了测定 N4 和 N5 与 Zn^{2+} 的亲和性, 测定了游离 Zn^{2+} 浓度和 $1 \times 10^{-6} M$ N4 或 N5 荧光强度的关系曲线。这些数据在 $25^\circ C$, pH 7.4 的 10mM (tris-HCl) 缓冲溶液中测得, 其中含有 100mM NaCl, 10mM NTA, and 0~10mM $ZnSO_4$ 。根据图 4-13 所得数据, 经 sigmoidal 曲线拟合后, 得到 $K_{dN4} = 0.63 \text{ nM}$, $K_{dN5} = 0.5 \text{ nM}$ 。这表明 N4 和 N5 能够定量检测低于纳摩尔浓度范围的游离 Zn^{2+} 。N4 和 N5 适合于哺乳类细胞内 Zn^{2+} 的检测与研究。

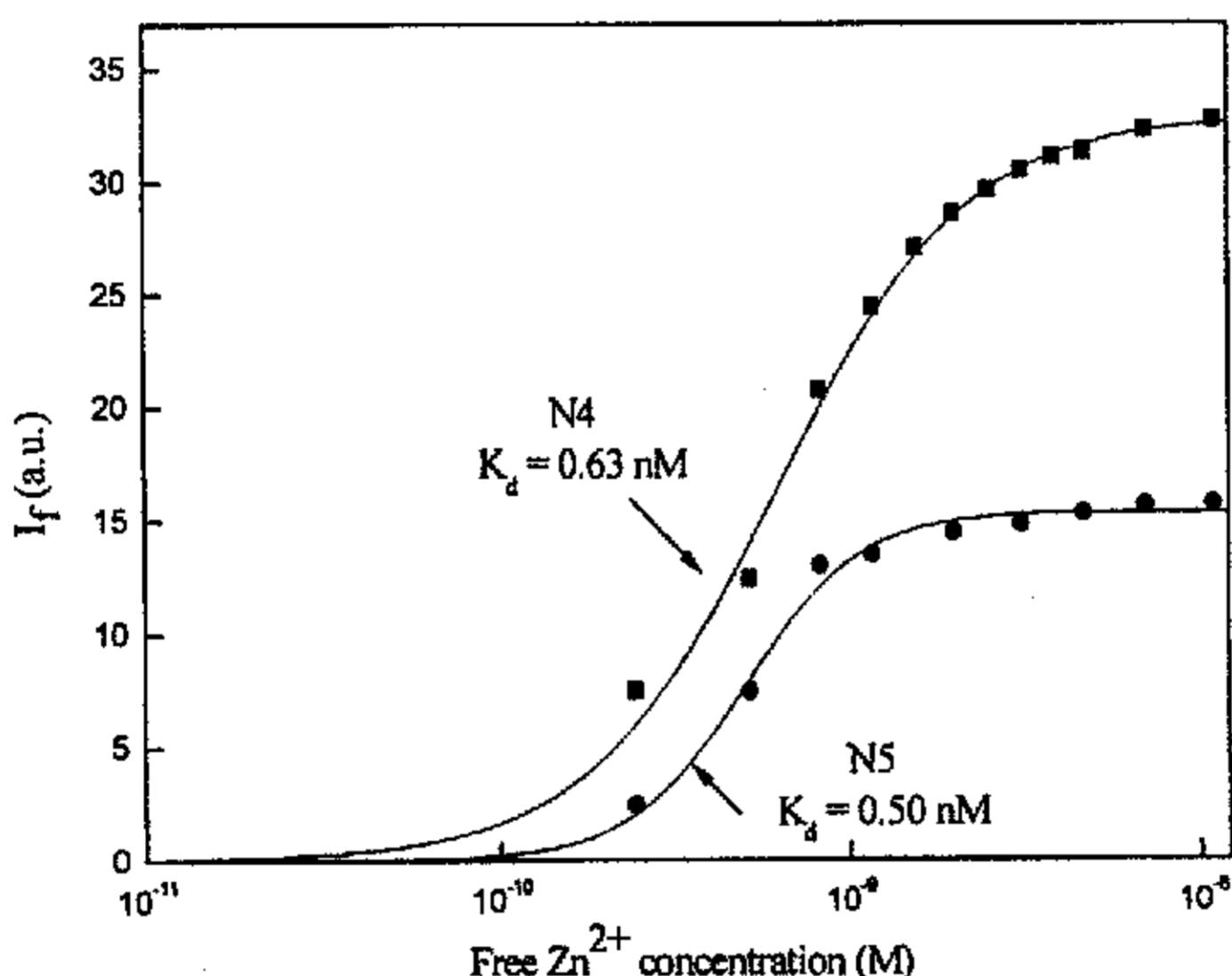


图 4-13 游离 Zn^{2+} 浓度和 $1 \times 10^{-6} M$ N4 或 N5 荧光强度的关系曲线。这些数据在 $25^\circ C$, pH 7.4 的 10mM (tris-HCl) 缓冲溶液中测得, 其中含有 100mM NaCl, 10mM NTA, 和 0~10mM $ZnSO_4$ 。

Figure 4-13 Fluorescence intensity of $1 \times 10^{-6} M$ N4 (square) or N5 (roundness) as a function of the concentration of free Zn^{2+} . These data were measured at $25^\circ C$, pH 7.4 (10mM tris-HCl) in buffered Zn^{2+} solutions containing 100mM NaCl, 10mM NTA, and 0~10mM $ZnSO_4$.

4.5 本章小结

- 设计合成了三个以 4 位含不同取代基的 1, 8-萘酰亚胺为荧光母体, DPA 为识别基团的化合物 N4、N5 和 N6, 均未见文献报道。
- pH 7.4 时, N4 和 N5 有相同的荧光量子产率 0.004, 加入饱和 Zn^{2+} 后, Φ 分别增大到 0.17($\Phi_{N4}/\Phi_0 = 43$)和 0.09($\Phi_{N5}/\Phi_0 = 23$)。pH 5 时, 加入 Zn^{2+} 后,

$\Phi'_{N4}/\Phi_0 = 30$ 和 $\Phi'_{N5}/\Phi_0 = 10$ 。这样, **N4** 和 **N5** 相对 H^+ , 对 Zn^{2+} 表现出良好的选择性荧光增强。理论计算表明, 分子内氢键可抑制 H^+ 对荧光强度的影响, 这为 PET 探针克服 H^+ 的影响提供了一个全新的思路。

3. **N4** 和 **N5** 与 Zn^{2+} 的解离常数分别为 $K_{dN4} = 0.63 \text{ nM}$, $K_{dN5} = 0.5 \text{ nM}$, 表明 **N4** 和 **N5** 能够定量检测低于纳摩尔浓度范围的游离 Zn^{2+} 。因此, 结合对其它金属离子的选择性实验, **N4** 和 **N5** 是高灵敏性和选择性识别 Zn^{2+} 荧光分子探针。

参考文献

- [1] Daffy, L. M.; de Silva, A. P.; Gunaratne, H. Q. N.; Huber, C.; Lynch, P. L. M.; Werner, T.; Wolfbeis, O. S. Arenedicarboximide Building Blocks for Fluorescent Photoinduced Electron Transfer pH Sensors Applicable with Different Media and Communication Wavelengths, *Chem. Eur. J.*, 1998, 4, 1810-1815.
- [2] de Silva, A. P.; Rice, T. E. A Small Supramolecular System Which Emulates the Unidirectional, Path-selective Photoinduced Electron Transfer (PET) of the Bacterial Photosynthetic Reaction Centre (PRC). *Chem. Commun.*, 1999, 163-164.
- [3] Ramachandram, B.; Sankaran, N. B.; Karmakar, R.; Saha, S.; Samanta, A. Fluorescence Signalling of Transition Metal Ions by Multi-Component Systms Comprising 4-Chloro-1,8-naphthalimide as Fluorophore, *Tetrahedron*, 2000, 56, 7041-7044.
- [4] Sankaran, N. B.; Banthia, S.; Samanta, A. Fluorescence Signalling of the Transition Metal Ions: Design Strategy Based on the Choice of the Fluorophore Component, *Proc. Indian. Acad. Sci. (Chem. Sci.)*, 2002, 114, 539-545.
- [5] Ramachandram, B.; Saroja, G.; Sankaran, N. B.; Samanta, A. Unusually High Fluorescence Enhancement of Some 1,8-Naphthalimide Derivatives Induced by Transition Metal Salts, *J. Phys. Chem. B.*, 2000, 104, 11824-11832.
- [6] 贾丽华, 新萘酰亚胺类荧光分子探针的合成及对金属离子的识别, 大连理工大学博士学位论文, 2003, 10, 25-47.
- [7] Frisch, M. J.; Pople, J. A.; Binkley, J. S. Self-Consistent Molecular Orbital Methods 25: Supplementary Functions for Gaussian Basis Sets. *J. Chem. Phys.*, 1984, 80, 3265-3269.
- [8] Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B. Gaussian 98, Revision A. 7, Gaussian, Inc., Pittsburgh PA, 1998.
- [9] De Silva, A. P.; Gunaratne, H. Q. N.; Habib-Jiwan, J.-L.; McCoy, C. P.; Rice, T. E.; Soumillion, J.-P. New Fluorescent Model Compounds for the Study of Photoinduced Electron Transfer: The Influence of a Molecular Electric Field in the Excited State, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1995, 34, 1728-1731.

第五章 二吡咯甲基硼(BODIPY)类荧光分子探针

5.1 分子设计思想

能够在活细胞中检测 Zn^{2+} 的荧光分子探针成为近年来发展的一种趋势^[1-10]，其中非常重要的两类荧光探针分别是喹啉类衍生物和荧光素类衍生物。然而，喹啉类分子探针的激发波长在紫外光区($\sim 350nm$)，可能会对细胞本身有损害；荧光素类分子探针在近中性条件(pH 6-8)下仍然对pH敏感。这种敏感性是由荧光素荧光团本身的激发和发射光谱对pH敏感所引起的：随着pH的变化，荧光素中存在中性分子、单价阴离子、二价阴离子及三者之间的平衡^[11]。所以，生物体受到刺激后所引起的细胞内pH的变化会干扰探针分子对 Zn^{2+} 的检测^[12]。因此，设计新的 Zn^{2+} 荧光分子探针，进一步避免现有探针分子的缺点是非常必要的。

二吡咯甲基硼(简称BODIPY)类荧光团是在二十世纪六十年代末首次合成^[13]，到九十年代中期才由分子探针公司推出的新型荧光染料^[14]。BODIPY类荧光化合物的特点是荧光量子效率高，随取代基变化其荧光可调范围大、不易受环境pH和极性的影响。所以，这一类非常有前途的荧光团，尽管进入实际应用的时间较短，但是其性能已得到普遍公认，在荧光探针领域有很大的影响力。它的不同衍生物可以跨越整个可见区，甚至进入近红外区。

现在，已经发展了一些以BODIPY为荧光母体的荧光分子探针或分子开关^[15-18]，其中也有以分子内氧化型光诱导电子转移荧光淬灭为设计机理的 Zn^{2+} 荧光分子开关^[11,19-21]，只有一例是荧光增强类型的 Zn^{2+} 荧光分子探针^[22]，但是它对pH的敏感性以及生物应用并没有详细报道。本章仍然



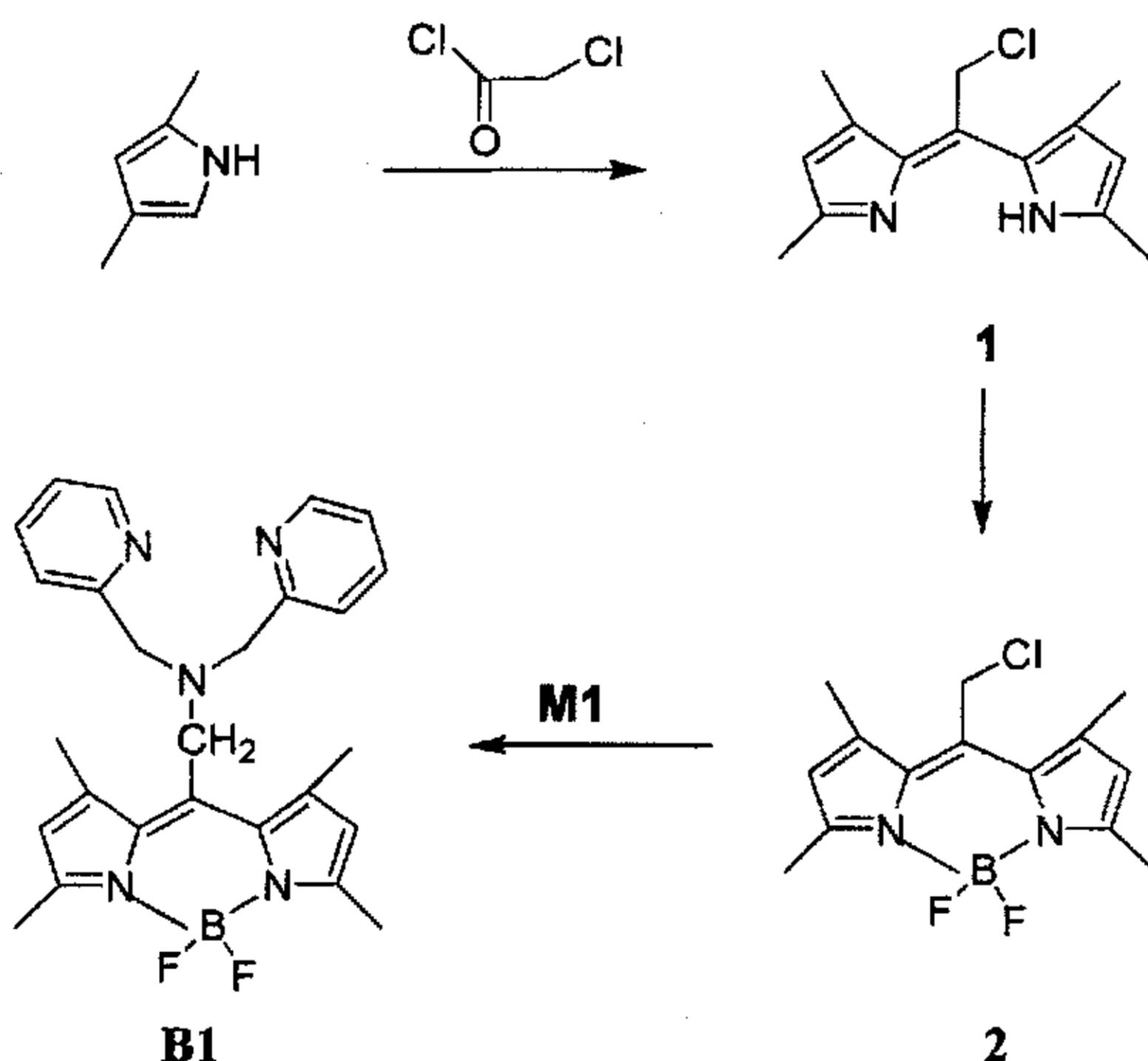
图 5-1 荧光分子探针 B1 的结构

Figure 5-1 the structure of fluorescent probe B1

选择 Zn^{2+} 的有效络合配体 DPA 为识别基团, BODIPY 染料为荧光母体, 通过亚甲基把两部分连接起来, 构成一个典型的 PET 型的荧光分子探针 B1, 分子结构如图 5-1 所示^[23]。

5.2 合成路线

B1 的合成是按照文献合成 BODIPY 衍生物相似的方法^[24], 具体路线如式 5-1 所示。2,4-二甲基吡咯在氩气保护下加入到氯乙酰氯的二氯甲烷溶液中, 室温下搅拌反应 5 小时。然后加入三乙胺和 $BF_3 \cdot OEt_2$, 继续搅拌 4 小时, 柱分离后得到化合物 2。2 和中间体 M2(DPA) 在 THF 中加热回流 8 小时, 柱分离后得到目标化合物 B1。



式 5-1 荧光分子探针 B1 的合成

Scheme 5-1 Synthesis of fluorescent probe B1

5.3 实验部分

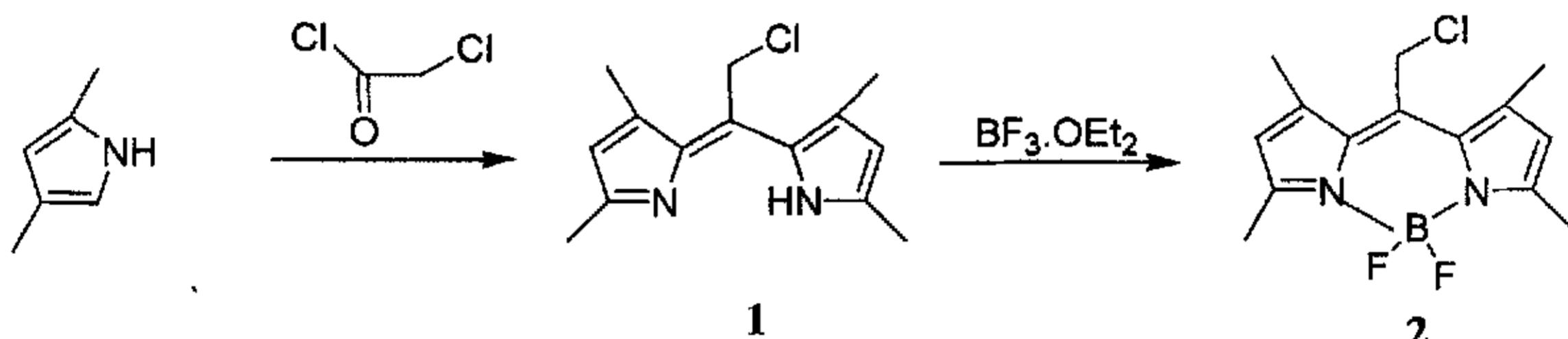
5.3.1 原料与仪器

所有试剂和溶剂都是市售化学纯。所有反应都是在氩气保护下, 新蒸馏过的干燥溶剂中操作。中间体 M1 (DPA) 按第二章所述方法合成。柱色谱硅

胶（200-300mesh）和中性氧化铝（100mesh）为青岛海洋化工厂产品。

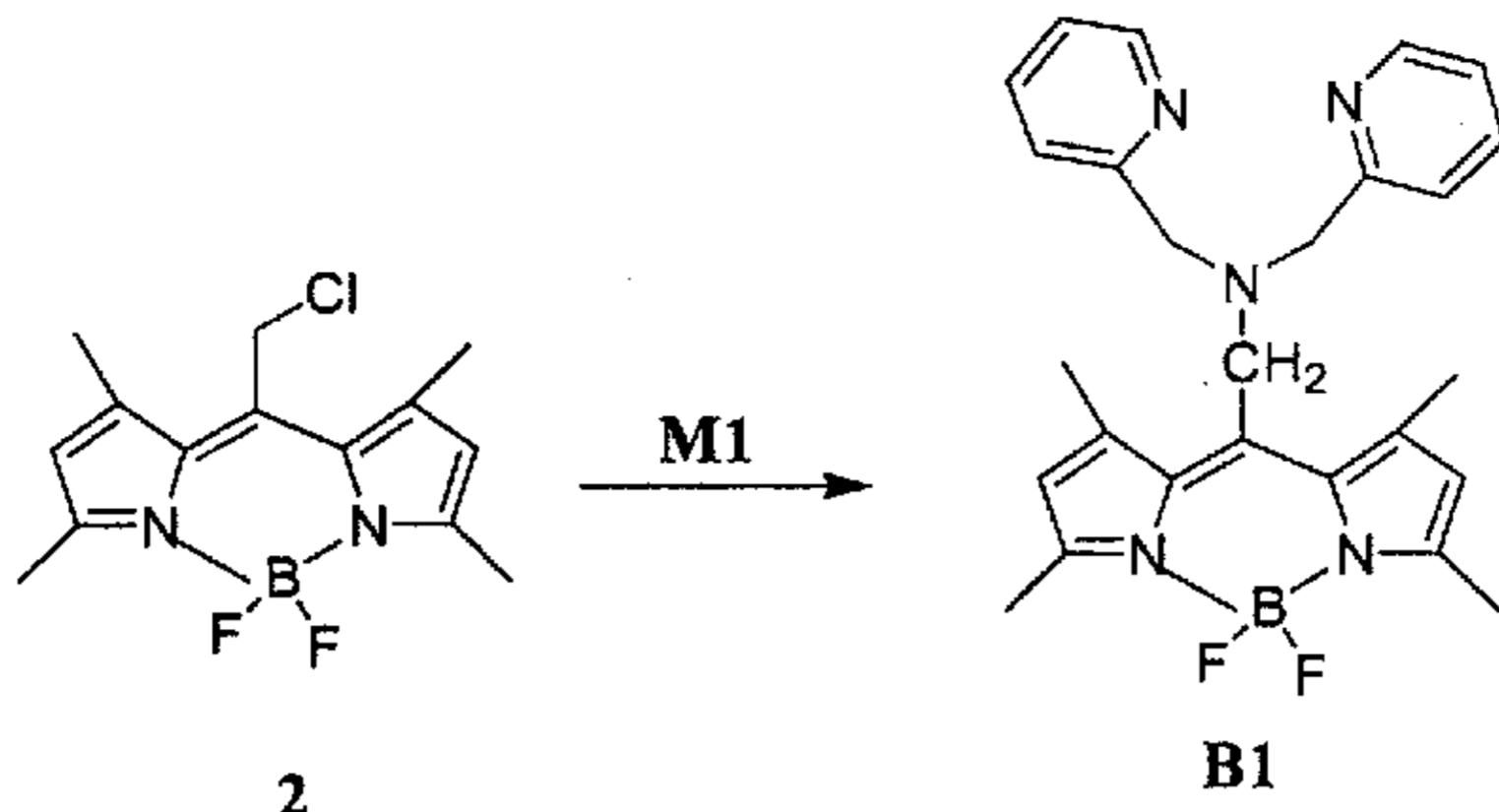
核磁共振仪（美国Varian公司，TMS为内标），elementar vario EL III型元素分析仪（德国），X-6显微熔点测定仪（北京泰克仪器有限公司），HP-8453紫外-可见分光光度计，PTI00 荧光分光光度计，BS-210S万分之一电子天平（德国Satorius公司），PB-20标准型pH计（德国Sartorius公司），Nikon TE 2000荧光显微镜，荧光量子产率的计算以荧光素（0.85）在0.1 N氢氧化钠溶液中为标准。

5.3.2 目标化合物 B1 的合成



氯乙酰氯 (217mg, 1.94mmol) 和 1,4-二甲基吡咯 (370mg, 3.9mmol) 氩气保护下溶解在 150ml CH_2Cl_2 中。混合物在室温下搅拌 5 小时后, 把得到的化合物 1 的黑色溶液浓缩至 50ml, 加入 4ml 三乙胺和 8ml 的 $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ 。混合物在氩气保护下继续搅拌 4 小时。反应物用水洗后, 无水 K_2CO_3 干燥, 过滤, 蒸干溶剂。粗产品用快速硅胶柱分离 (展开剂: 正己烷/乙酸乙酯 = 16:1), 得到红色固体 2。产率: 35% (169mg), 熔点: 176-178°C。

¹H-NMR (400MHz, CDCl₃): δ 6.08 (s, 2H, CH), 4.78 (s, 2H, ClCH₂C), 2.53 (s, 12H, CH₃). ¹³C-NMR (100MHz, CDCl₃): δ 156.83, 141.31, 136.14, 131.57, 122.46, 37.33, 15.69, 14.86. ¹⁹F-NMR (400MHz, CDCl₃, CFCl₃): δ -146.73 (q, J = 36 Hz). Anal. Calcd. for BC₁₄ClF₂H₁₆N₂: C, 56.70; H, 5.44; N, 9.45. Found: C, 56.81; H, 5.51; N, 9.50.



化合物 **2**(100mg, 0.34mmol)、中间体 **M2**(55mg, 0.34mmol)、碘化钾(60mg, 0.36mmol) 和无水碳酸钾(60mg, 0.34mmol) 溶解于 50ml THF 中，氩气保护下回流 8 小时。混合物冷却到室温后，蒸掉溶剂 THF。剩余物用 20ml 的 2N 碳酸钠溶液稀释后， CH_2Cl_2 萃取。有机相用盐水洗，碳酸钾干燥后，过滤，蒸干溶剂。粗产品用快速氧化铝柱分离提纯(展开剂: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH} = 100:1$)，得到黄色固体 **B1**。产率: 45% (62mg)，熔点: 62-63℃。

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3): δ 8.65 (d, 2H, $J = 4.4\text{Hz}$, ArH), 7.74-7.81 (m, 4H, ArH), 7.30 (t, 2H, $J = 6.0\text{Hz}$, ArH), 6.72 (s, 1H, CH), 6.12 (s, 1H, CH), 4.34 (s, 2H, CCH_2N), 4.32 (s, 4H, PhCH_2N), 2.58 (s, 3H, CH_3), 2.51 (s, 3H, CH_3), 2.43 (s, 3H, CH_3), 2.38 (s, 3H, CH_3). $^{13}\text{C-NMR}$ (100MHz, CDCl_3): δ 159.69, 155.24, 154.95, 152.33, 142.01, 140.55, 138.85, 133.32, 132.57, 122.76, 122.09, 119.86, 60.95, 51.98, 30.52, 29.88, 17.74, 17.55, 16.63, 14.67. $^{19}\text{F-NMR}$ (400MHz, CDCl_3 , CFCl_3) δ -144.92 (q, $J = 36\text{ Hz}$). Anal. Calcd. for $\text{BC}_{26}\text{F}_2\text{H}_{28}\text{N}_5$: C, 67.98; H, 6.14; N, 15.25. Found: C, 68.12; H, 6.22; N, 15.34.

5.3.3 紫外和荧光光谱的测定

所有实验方法同 5.3.4 所述。

5.3.4 计算方法

化合物 **B1** 和中间体 **2** 基态的几何构型用 MM2 force field 进行简单优化，然后再运行 MOPAC (Chem3D Ultra 7.0) 中 AM1(the Austin Model 1) 哈密顿函数对基态结构进行进一步优化。

5.3.4 B1 在活细胞中的荧光影像

实验方法同 5.3.5 所述。

5.4 结果与讨论

5.4.1 B1 的 1H -NMR 和分子模型

在对比化合物 B1 和其中间体 2 的 1H -NMR 谱图时发现，在两个分子中硼-二氢吡咯部分的 1H -NMR 有很大的差别，如图 5-2 所示。中间体 2 中的四个甲基在 2.53 ppm 处为单峰，而在 B1 中分裂成 4 个峰；中间体 2 中的亚甲基的化学位移在 4.78 ppm，相应的 B1 中则向高场移动到 4.34 ppm 处，这样就与连接吡啶环的亚甲基产生了交叠；中间体 2 中吡咯环上的 H 在 6.08 ppm 处的单峰，而在 B1 中却分裂成两个峰：6.12 ppm 和 6.27 ppm。以上现象表明 DPA 结构的引入对 B1 中硼-二氢吡咯部分产生了一个巨大的不对称张力，使硼-二氢吡咯不再对称。

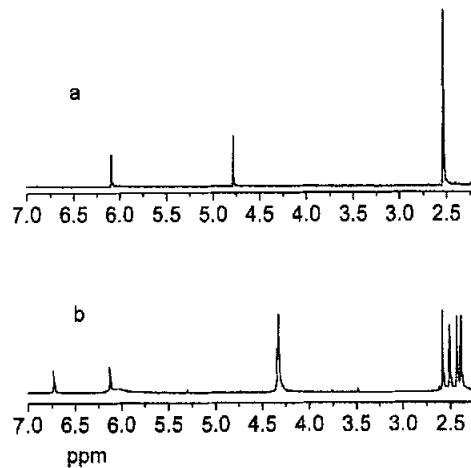


图 5-2 化合物 B1 和中间体 2 的 1H -NMR 对比图 (a) $CDCl_3$ 中中间体 2 的部分 1H -NMR 谱图；(b) $CDCl_3$ 中化合物 B1 的部分 1H -NMR 谱图

Figure 5-2 The parallel 1H -NMR of compound B1 and intermediate 2 (a) the partial 1H NMR spectrum of intermediate 2 in $CDCl_3$; (b) the partial 1H NMR spectrum of BDA in $CDCl_3$

为了验证在核磁波谱中观察到的现象，通过半经验计算分别对化合物 B1 和中间体 2 的构象 进行了研究。图 5-3 表示优化后的几何构型。从中间体 2 的

侧视图可以看出, 硼-二氢吡咯部分是对称的平面构型。化合物 **B1** 中的硼-二氢吡咯部分却是不对称的非平面构型, 这是由于 DPA 结构的加入导致了明显的原子之间的空间排斥, 相关的几何参数列于表 5-1 中。数据表明, **2** 有一个 σ -对称结构, 而对于 **B1**, 末端最接近的甲基键长和二面角都不同。相对于 C19-C6 键, 硼-二氢吡咯上的两个氢质子呈现外向及内向构型, 所以 **B1** 中的硼-二氢吡咯上的质子化学环境就不再相同了, 表现为产生不同的化学位移。

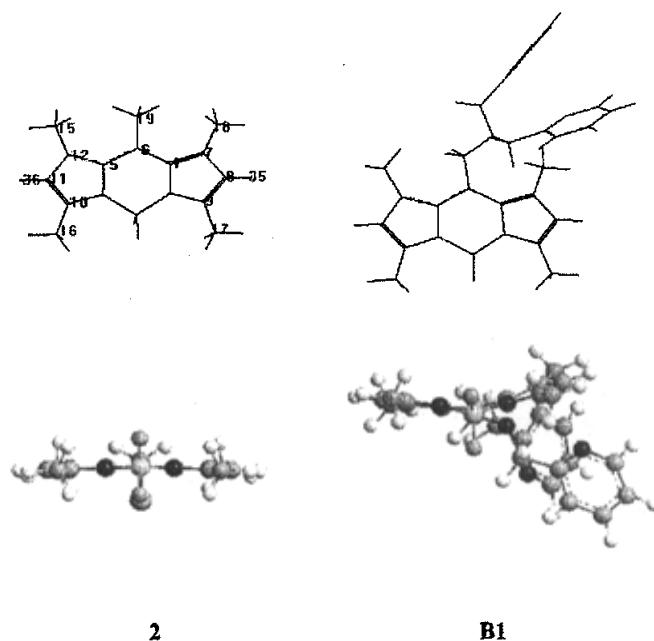


图 5-3 化合物 **2** 和 **B1** 的结构模拟。上图和下图分别是 **2** 和 **B1** 的侧视图和仰视图。侧视图说明 **2** 的平面性和 **B1** 的弯曲性。

Figure 5-3 Simulated structures of **2** and **B1**. The top and bottom are the side-view and bottom-view of the geometries of **2** and **B1**, respectively. Side-view illustrates planeness of **2** and curvature of the **B1**.

表 5-1 2 和 B1 结构中的部分计算数据
Table 5-2 Selected calculated structural data for 2 and B1

参数	2	B1
$r(C_{18}-C_7, \text{nm})$	0.1463	0.1464
$r(C_{17}-C_9, \text{nm})$	0.1463	0.1475
$r(C_{16}-C_{10}, \text{nm})$	0.1475	0.1476
$r(C_{15}-C_{12}, \text{nm})$	0.1475	0.1463
$r(C_{19}-C_6, \text{nm})$	0.1463	0.1487
$r(H-C_8, \text{nm})$	0.1084	0.1084
$r(H-C_{11}, \text{nm})$	0.1084	0.1084
$\phi(H-C_8, H-C_{11})$	0	5.2
$\phi(C_{18}-C_7, C_{15}-C_{12})$	0	15.8
$\phi(C_{17}-C_9, C_{16}-C_{10})$	0	7.9
$\phi(C_{18}-C_7, C_{19}-C_6)$	7.5	-9.1
$\phi(H_{35}-C_8, C_9-C_{16})$	5.1	-17.0
$\phi(H_{36}-C_{11}, C_9-C_{16})$	-5.1	19.6

5.4.2 tris-HCl 缓冲溶液中 B1 的吸收和荧光光谱

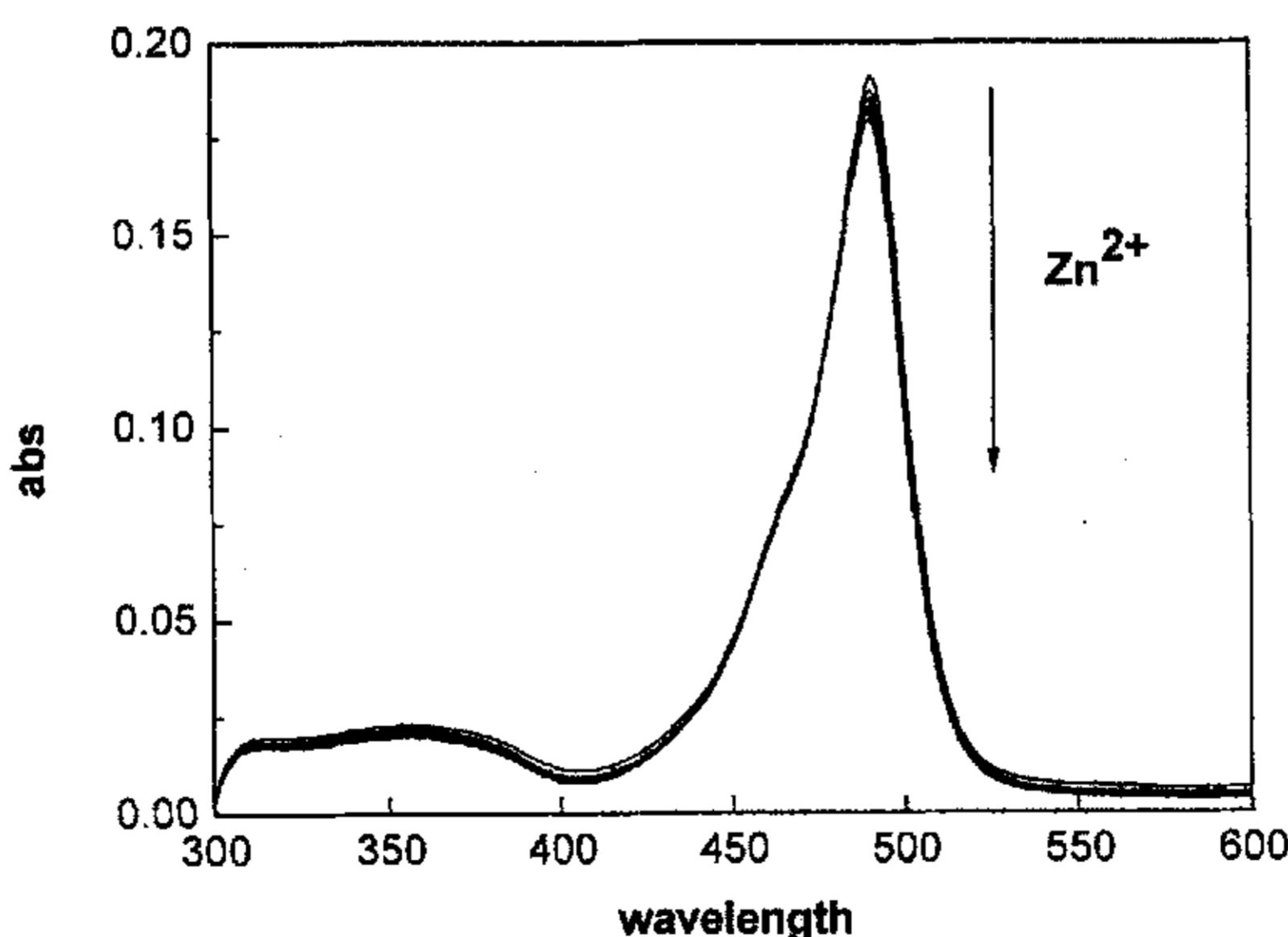


图 5-4 缓冲溶液中不同 Zn^{2+} 浓度下 B1 ($1 \times 10^{-5} \text{M}$) 的紫外-吸收光谱。 Zn^{2+} 的浓度分别是 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 0.6, 0.7, 0.9, 1.1, 2.0, 3.5, 5.0 倍 B1 的浓度。

Figure 5-4 Absorption spectra of B1 in buffered solution by titration with Zn^{2+} . The concentrations of Zn^{2+} are 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 0.6, 0.7, 0.9, 1.1, 2.0, 3.5, 5.0 equiv (1 equiv = $1.0 \times 10^{-5} \text{M}$).

在 tris-HCl 缓冲溶液 (pH 7.4) 中加入 EDTA 以避免其它金属离子的影响, **B1** 的最大吸收波长 $\lambda_{\text{max}} = 491\text{nm}$, 最大发射波长 $\lambda_{\text{em}} = 509\text{nm}$, 荧光量子产率 $\Phi = 0.079$ 。自由探针分子 **B1** 的低荧光量子产率是 DPA 中氮原子的孤对电子向激发态的硼 - 二氢吡咯部分的光诱导电子转移引起的。有别于其它以 BODIPY 为荧光母体的分子内氧化型光诱导电子转移的 Zn^{2+} 荧光分子探针, 这是一种分子内还原型光诱导电子转移过程^[11,20,21]。加入 Zn^{2+} 后, 由于 Zn^{2+} 与 DPA 的配位, 这种光诱导电子转移过程被阻断, 于是 **B1** 发出强烈的绿色荧光。 Zn^{2+} -**B1** 络合物的 λ_{em} 红移到 511nm , 荧光量子产率 Φ 增大到 0.857 (增大将近 11 倍)。

图 5-4 表示中性缓冲溶液中, **B1** ($1.0 \times 10^{-5}\text{M}$) 的紫外 - 吸收光谱随 Zn^{2+} 浓度的变化情况。当 Zn^{2+} 的浓度大于等摩尔量的 **B1** 时, **B1** 的吸光度才有微弱的减小, 但吸收光谱没有任何移动。稳定的最大吸收波长也表明此探针的作用机理是 PET 机理。

5.4.3 tris-HCl 缓冲溶液中金属离子对 Zn^{2+} 选择性检测的干扰

图 5-5 表示不同金属离子对 **B1** 荧光强度的影响以及 **B1** 对 Zn^{2+} 的选择性实验。从图中可以看出, 加入 Zn^{2+} 后 **B1** 荧光光谱的积分值增大 7 倍。生理条件下高浓度存在的金属离子, 如 Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 等, 对 **B1** 的荧光强度并没有影响。过渡金属离子, Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Cr^{3+} 和 Co^{2+} 仅仅对 Zn^{2+} 的荧光增强作用有微小的干扰, 而 Cu^{2+} 和 Ni^{2+} 使 **B1** 的荧光强度降低, 这是一种金属离子和荧光团之间的电子或能量转移引起的荧光淬灭机理^[25]。类似于其它 DPA 类型的 Zn^{2+} 荧光分子探针, Cd^{2+} 也能引起 **B1** 荧光强度的增强, 并且干扰对 Zn^{2+} 的选择性检测。但是, 因为在一般的生命体系中, 这些金属离子的浓度很小^[26], Cd^{2+} 以及其它可能干扰 Zn^{2+} 检测的金属离子在生物体中对 Zn^{2+} 的检测影响可忽略不计。

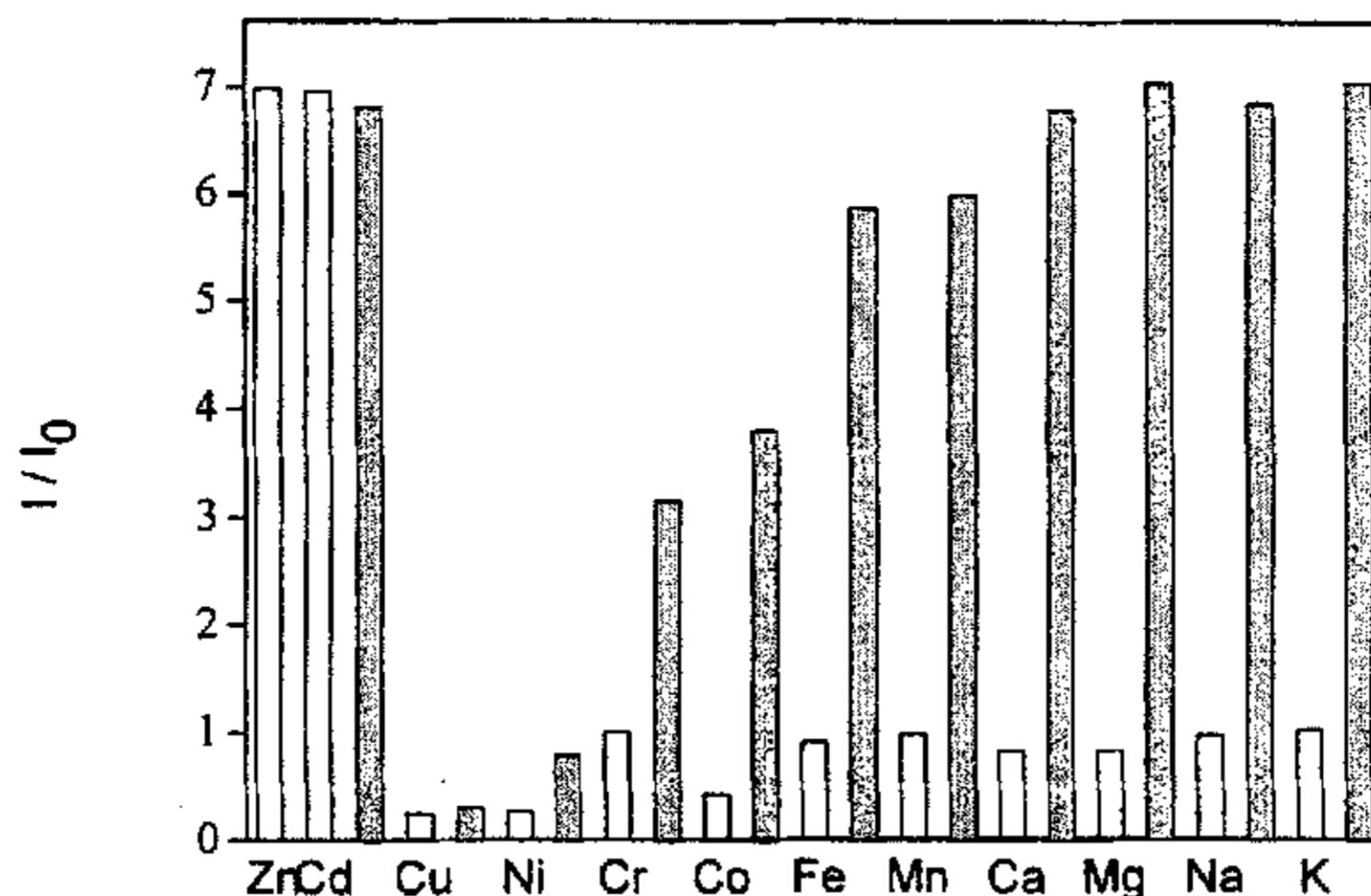


图 5-5 不同金属离子对 B1 荧光强度的影响以及 B1 对 Zn^{2+} 的选择性。无色条代表 B1 在 5 倍等量的金属离子溶液中的荧光积分；黑色条代表在前面溶液中再加入 5 倍等量的 Zn^{2+} 后，B1 荧光光谱的积分。激发波长 491nm，荧光积分范围 497-600nm。

Figure 5-5 The fluorescence response of B1 to various cations and its selectivity for Zn^{2+} . The colourless bars represent the integrated emission of B1 in the presence of 5 equiv of the cations interest; the dark bars represent the changes in integrated emission that occur upon subsequent addition of 5 equiv of Zn^{2+} to solutions containing B1 and the cations of interest. The response was normalized with respect to the integrated emission intensity of free dye (I_0); excitation was provided at 491 nm and emission was integrated from 497 to 600 nm.

5.4.4 pH 对 B1 荧光强度的影响

在第四章中讨论到 PET 类荧光分子探针会受到氢质子的干扰，如 DPA 上叔氮原子的质子化同样会抑制 PET 过程，从而使探针分子的荧光增强。更有一些荧光团本身，如荧光素等，其自身的荧光光谱就表现出 pH 敏感性。本章也对荧光探针分子 B1 在水溶液中的 pH 的敏感性进行了研究 (NaCl 溶液用来保持离子强度)，如图 5-6 所示。在 B1 的酸性溶液中 (pH~1.1) 用稀 NaOH 溶液滴定，荧光强度不断降低，并且这种荧光开关是完全可逆的—这也证明了是一种典型的 PET 荧光开关作用。

图 5-6 所得结果经 sigmoidal 曲线拟合后得到 $pK'_a = 2.1$ 。 pK'_a 大大低于其它以 DPA 为识别配体的荧光分子探针，这可能由于 BODIPY 荧光团的缺电子性减小了 DPA 叔氮原子的碱性所造成的^[27]。另一个原因可能是 5.4.1 中讨论的 B1 的扭曲结构：叔氮原子质子化后，会导致这种结构的扭曲进一步加剧，使叔氮原子与氢质子的亲和性变得更加困难，B1 的 pK'_a 也就小于其它体系。 Zn^{2+} 存在时，BDA- Zn^{2+} 络合物的荧光强度在 pH 3.0-10.0 之间几乎不受氢质子

的影响(图 5-6 中插图)。荧光探针分子 B1 对 pH 的不敏感性, 可避免生物体受到外界刺激后引起的 pH 变化, 非常适合在活细胞中的应用。

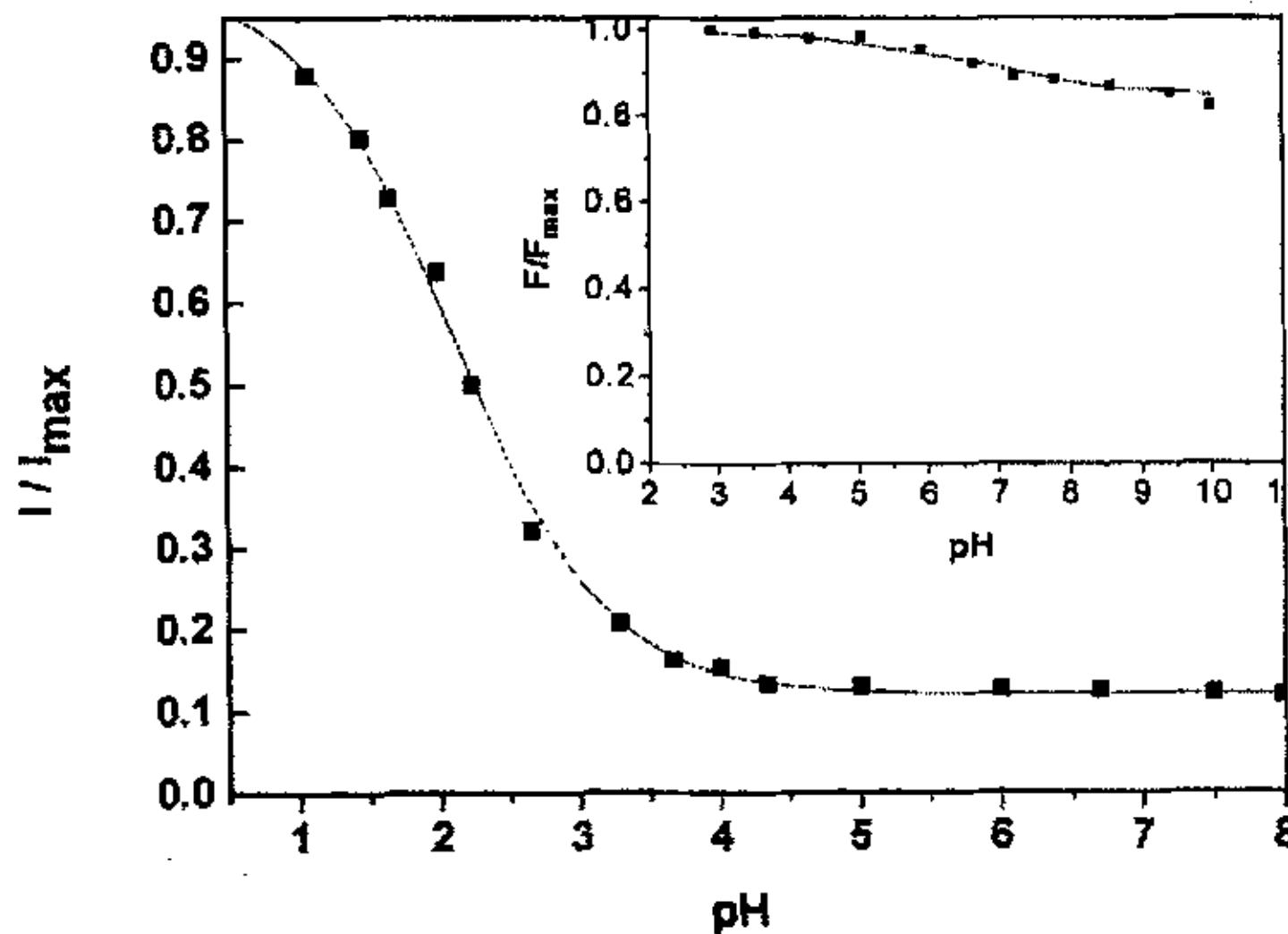


图 5-6 B1 荧光光谱的积分归一化后与 pH 的关系曲线。插图: B1-Zn²⁺络合物荧光光谱的积分归一化后与 pH 的关系曲线。激发波长 491nm。

Figure 5-6 The normalized integrated emission intensity of B1 versus pH. Insert: The normalized integrated emission intensity of B1-Zn²⁺ complex versus pH. Excitation was provided at 491nm.

5.4.5 表观解离常数 K_d

对 B1 的 Zn²⁺滴定荧光光谱如图 5-7a 所示。Zn²⁺与 B1 的配位数通过下式作图得到的 Hill-plot 获得。

$$\log\left(\frac{F - F_{\min}}{F_{\max} - F}\right) = \log K_s + \log[M]$$

其中, F_{\min} , F_{\max} 分别表示 B1 在加入饱和 Zn²⁺前后的荧光强度。 K_s 表示 B1-Zn²⁺络合物的稳定常数。 $[M]$ 表示游离 Zn²⁺的浓度。从图 5-7b 插图中可以看出, 荧光响应符合 Hill 系数为 1, 这说明 B1 与 Zn²⁺形成的是 1:1 的 B1-Zn²⁺络合物。取荧光光谱的积分值与 $[Zn^{2+}]_{free}$ 做图, 经 sigmoidal 曲线拟合后(图 5-7b)得到 K_d 为 1.0nM, 说明 B1 能够定量检测纳摩尔范围的 Zn²⁺

浓度。

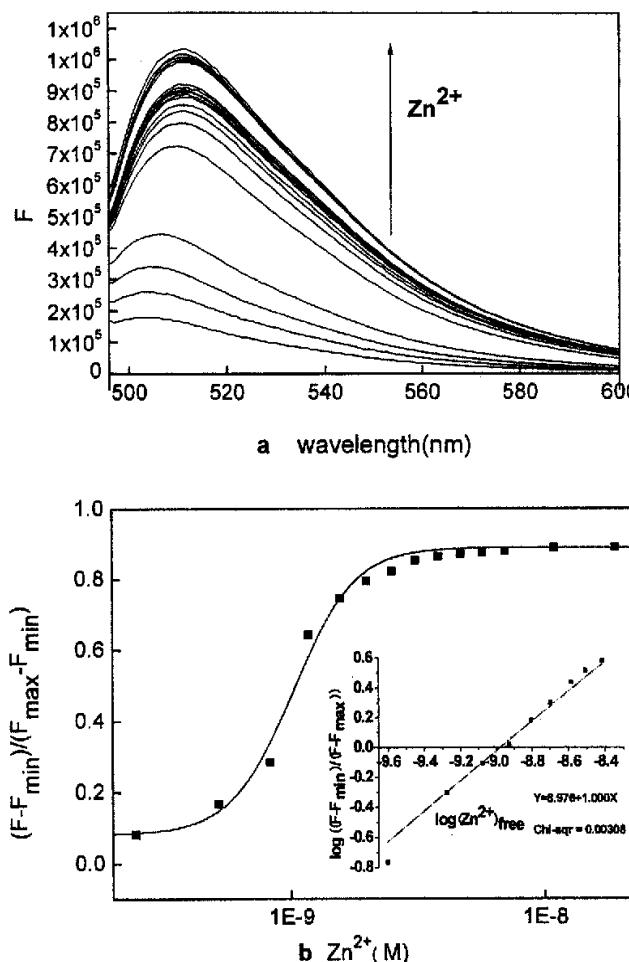


图 5-7 (a) 游离 Zn^{2+} 浓度和 1×10^{-6} M B1 荧光强度的关系曲线。这些数据在 25 °C, pH 7.4 的 10 mM (tris-HCl) 缓冲溶液中测得, 其中含有 100 mM NaCl、10 mM NTA 和 0~10 mM $ZnSO_4$ 。(b) 归一化后 B1 的荧光强度积分值与游离 Zn^{2+} 浓度的关系。插图: B1- Zn^{2+} 络合 Hill-plot 图。

Figure 5-7 (a) Fluorescence emission spectra of B1 in buffered Zn^{2+} solutions with free Zn^{2+} concentration. (b) The normalized integrated emission intensity versus the $p[Zn^{2+}]$ free. Insert: the Hill plot of B1 complexation with Zn^{2+} .

5.4.6 B1 在活细胞中对 Zn^{2+} 的荧光显微成像

荧光探针分子 B1 在水溶液中对 Zn^{2+} 很好的选择性和高敏感性荧光增强, 络合 Zn^{2+} 前后荧光有显著的变化, 并且在较大 pH 范围内对氢质子不敏感, 所有这些性质都显示它非常适合于 Zn^{2+} 的荧光细胞成像检测。本章选择两种细

胞分别成像都得到了良好的效果。

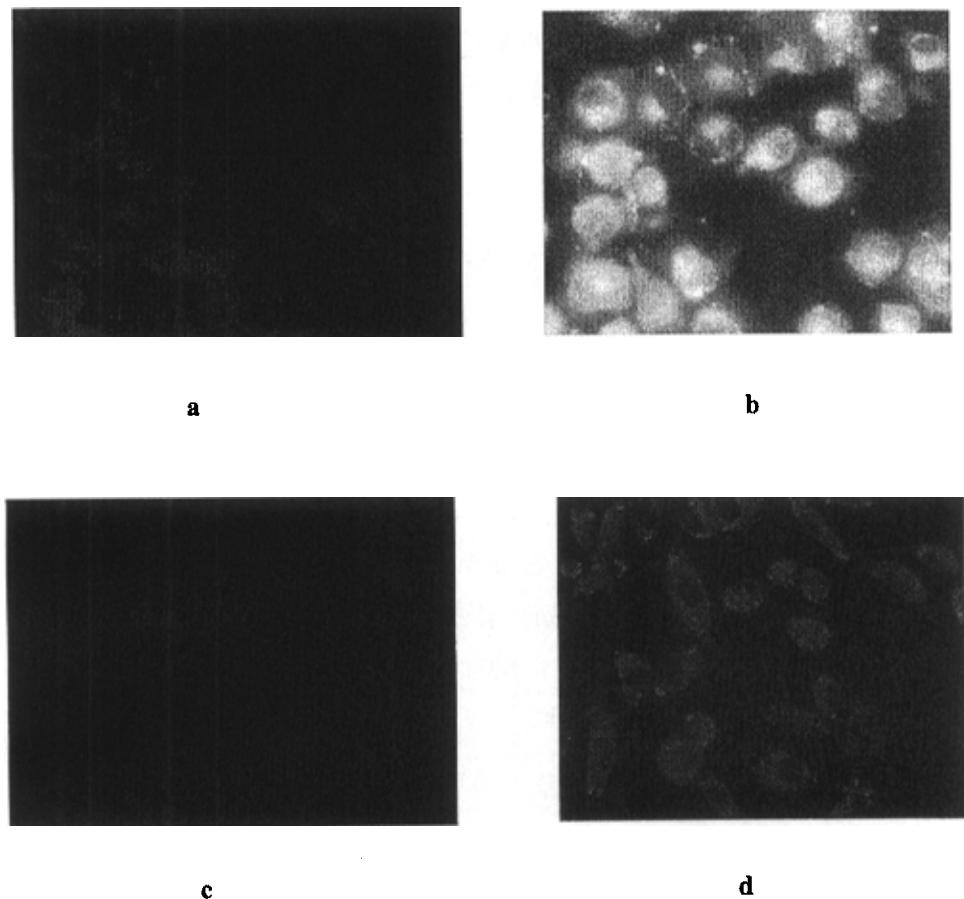


图 5-8 (a) 活 TCA 细胞摄取 $ZnSO_4$ 的荧光显微照片。TCA 细胞在 $10\mu M$ 的 B1 培养液中 $37^\circ C$ 下培养 5 分钟, 用磷酸盐缓冲溶液 (pH 7.4) 淋洗 3 次后拍照; (b) 加入 $50\mu M$ 的 $ZnSO_4$, 半小时后拍照; (c) 不加 Zn^{2+} 的 PC12 细胞; (d) 加入 Zn^{2+} 后的 PC12 细胞。激发波长是 WB 450-480nm。

Figure 5-8 (a) Fluorescence images of TCA cells loaded with B1. The cells were incubated with $10\mu M$ B1 for 5 min, $37^\circ C$, under 5% CO_2 . Then the cells were washed with phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) for 3 times; (b) Fluorescence image of B1 stained cells loaded with $50\mu M$ Zn^{2+} for 30 min; (c) PC12 cells untreated with Zn^{2+} ; (d) the PC12 cells preloaded with Zn^{2+} . The excited light is WB 450-480 nm.

首先, 在培养好的 TCA 细胞中加入 B1 保持 5 分钟, 使 B1 有足够的时间进入细胞。荧光显微成像发现在 TCA 活细胞中 B1 只能发出微弱的荧光 (图 5-8a), 而在上述培养液中加入饱和 Zn^{2+} , 30 分钟后成像, TCA 细胞的荧光迅速显著增强(图 5-8b)。在 PC12 活细胞中做进一步研究。B1 标记的 PC12 细胞在其细胞质中 (细胞核未标记) 发出微弱的荧光 (图 5-8c); 加入 Zn^{2+} 后, 细

胞质和细胞核中都发出强烈的荧光(图 5-8d)。活细胞中的显微成像表明, N2 能够很好地进入细胞中并在活细胞中, 对 Zn^{2+} 表现出荧光增强。所以, N2 在活细胞中能够用于检测细胞内 Zn^{2+} 浓度的变化, 为进一步阐明 Zn^{2+} 在生命过程中的作用提供了一个有效的研究手段。

5.5 本章小结

1. 设计合成了以 BODIPY 为荧光母体, DPA 为识别基团的荧光分子探针 B1, 该分子未见文献报道。
2. 在 tris-HCl 缓冲溶液(pH 7.4)中, B1 的最大吸收波长 $\lambda_{max} = 491\text{nm}$, 最大发射波长 $\lambda_{em} = 509\text{nm}$, 荧光量子产率 $\Phi = 0.079$ 。加入 Zn^{2+} 后, Zn^{2+} -B1 络合物的 λ_{em} 红移到 511nm , 荧光量子产率 Φ 增大到 0.857(增大将近 11 倍)。在 pH 3-10 之间, B1 及 B1- Zn^{2+} 络合物的荧光强度受质子的影响很小, $pK_a' = 2.1$ 。 pK_a' 大大低于其它以 DPA 为识别配体的荧光分子探针, 克服了荧光素类 Zn^{2+} 荧光分子探针的主要缺点。另外, B1 的低毒性和细胞可渗透性使它成为一个新的生物应用 Zn^{2+} 荧光分子探针。

参考文献

- [1] Kimura, E.; Koike, T. Recent development of zinc-fluorophores, *Chem. Soc. Rev.*, 1998, 27, 179-184.
- [2] Jiang, P. J.; Guo, Z. J. Fluorescent detection of zinc in biological system: recent development on the design of chemosensors and biosensors, *Coord. Chem. Rev.*, 2004, 248, 205-229.
- [3] Burdette, S. C.; Walkup, G. K.; Spangler, B.; Tsien, R. Y.; Lippard, S. J. Fluorescent Sensors for Zn^{2+} Based on a Fluorescein Platform: Synthesis, Properties and Intracellular Distribution, *J. Am. Chem. Soc.* 2001, 123, 7831-7841.
- [4] Burdette, S. C.; Frederickson, C. J.; Bu, W.; Lippard, S. J. ZP4, an Improved Neuronal Zn^{2+} Sensor of the Zinpyr Family, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, 125, 1778-1787.
- [5] Hirano, T.; Kikuchi, K.; Urano, Y.; Higuchi, T.; Nagano, T. Highly Zinc-Selective Fluorescent Sensor Molecules Suitable for Biological Applications, *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, 122, 12399-12400.
- [6] Hirano, T.; Kikuchi, K.; Urano, Y.; Higuchi, T.; Nagano, T. Improvement and Biological Applications of Fluorescent Probes for Zinc, ZnAFs, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, 124, 6555-6562.
- [7] Gee, K. R.; Zhou, Z.-L.; Qian, W. J.; Kennedy, R. Detection and Imaging of Zinc Secretion from Pancreatic β -Cells Using a New Fluorescent Zinc Indicator, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, 124, 776-778.
- [8] Taki, M.; Wolford, J. L.; and O'Halloran, T. V. Emission Ratiometric Imaging of Intracellular Zinc: Design of a Benzoxazole Fluorescent Sensor and Its Application in Two-Photon Microscopy. *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, 126, 712 - 713.
- [9] Lim, N. C. and Brückner, C. DPA-substituted coumarins as chemosensors for zinc(II): modulation of the chemosensory characteristics by variation of the position of the chelate on the coumarin. *Chem. Commun.*, 2004, 1094- 1095.
- [10] Henary, M. M.; Wu, Y.-G.; Fahrni, C. Zinc(II)-Selective Ratiometric Fluorescent Sensors Based on Inhibition of Excited-States Intramolecular Proton Transfer, *Chem. Eur. J.*, 2004, 20, 3015-3025.
- [11] Valeur, B. Molecular Fluorescence: Principles and Applications; Wiley-VCH: Weinheim, 2002.
- [12] Li, J. and Eastman, A. Apoptosis in an Interleukin-2-dependent Cytotoxic T Lymphocyte Cell Line Is Associated with Intracellular Acidification. *J. Biol. Chem.*, 1995, 270, 3203 - 3211.
- [13] Treibs, A.; Kreuzer, F.-H. Difluoroboryl-Komplexe von Di- und Tripyrrylmethen. *Liebigs Ann. Chem.*, 1968, 718, 208-223.
- [14] Haugland, R.P. *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*. Sixth edition. Eugene, Oregon, USA: Molecular Probe Inc., 1996, 13-17.
- [15] Rurack, K.; Kollmannsberger, M.; Resch-Genger, U.; Daub, J. A Selective and Sensitive Fluoroionophore for Hg^{II} , Ag^I , and Cu^{II} with Virtually Decoupled Fluorophore and Receptor Units *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, 122, 968 - 969.
- [16] Gee, K.R.; Rukavishnikov, A.; Rothe, A. New Ca^{2+} Fluoroionophores Based on the BODIPY Fluorophore. *Comb. Chem. High. T. Scr.*, 2003, 6, 363-366.

- [17] Cha, N. R.; Moon, S. Y.; Chang, S.-K. New ON-OFF type Ca²⁺-selective fluoroionophore having boron-dipyrromethene fluorophores. *Tetrahedron Letters.*, 2003, 44, 8265-8268.
- [18] Moon, S. Y.; Cha, N. R.; Kim, Y. H.; Chang, S.-K. New Hg²⁺-Selective Chromo- and Fluoroionophore Based upon 8-Hydroxyquinoline. *J. Org. Chem.*, 2004, 69, 181-183.
- [19] Gabe, Y.; Urano, Y.; Kikuchi, K.; Kojima, H.; Nagano, T. Highly Sensitive Fluorescence Probes for Nitric Oxide Based on Boron Dipyrromethene Chromophore-Rational Design of Potentially Useful Bioimaging Fluorescence Probe. *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, 126, 3357-3367.
- [20] Turfan, B.; Akkaya, E. U. Modulation of Boradiazaindacene Emission by Cation-Mediated Oxidative PET. *Org. Lett.*, 2002, 4, 2857-2859.
- [21] Goze, C.; Ulrich, G. Charbonnière, L.; Cesario, M.; Prangé, T.; Ziessel, R. Cation Sensors Based on Terpyridine-Functionalized Boradiazaindacene. *Chem. Eur. J.*, 2003, 9, 3748-3755.
- [22] Koutaka, H.; Kosuge, J.; Fukasaku, N.; Hirano, T. Kikuchi, K. Urano, Y.; Kojima, H.; Nagano, T. A Novel Fluorescent Probe for Zinc Ion Based on BODIPY Chromophore. *Chem. Pharm. Bull.*, 2004, 52, 700-703.
- [23] Wu, Y.-K.; Peng, X.-J.; Guo, B.-C.; Fan, J.-I.; Zhang, Z.-C.; Wang, J.-Y.; Cui, A.-J.; Gao, Y.-L. Boron Dipyrromethene Fluorophore Based Fluorescence sensor Suitable for the Selective Imaging of Zn(II) in Living Cells. *Org. Bio. Chem.*, accepted.
- [24] Chen, J.; Burghart, A.; Derecskei-Kovacs, A.; Burgess, K. 4,4-Difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene (BODIPY) Dyes Modified for Extended Conjugation and Restricted Bond Rotations. *J. Org. Chem.*, 2000, 65, 2900-2906.
- [25] L. Fabbrizzi, M. Licchelli, P. Pallavicini, D. Sacchi and A. Taglietti, *Analyst.*, 1996, 121, 1763-1768.
- [26] Rae, T. D.; Schmidt, P. J.; Pufahl, R. A.; Culotta, V. C.; O'Halloran, T. V. Undetectable Intracellular Free Copper: The Requirement of a Copper Chaperone for Superoxide Dismutase. *Science.*, 1999, 284, 805-808.
- [27] Kollmannsberger, M.; Gareis, T.; Heinl, S.; Breu, J.; Daub, J. Electrogenerated Chemiluminescence and Proton-Dependent Switching of Fluorescence: Functionalized Difluoroboradiaz-a-s-indacenes. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 1997, 36, 1333-1335.

第六章 2-苯基咪唑葱醌类荧光分子探针

6.1 分子设计思想

应用光诱导电子转移原理(PET)设计的荧光分子探针称之为 PET 荧光分子探针。很多种荧光团, 如: 葱、茈及其衍生物等都可以通过荧光团-连接基团-接受体构造 PET 类型的荧光分子探针; 香豆素、荧光素和 4-氨基-1,8-萘酰亚胺等的紫外吸收光谱和荧光发射光谱都在可见光区, 为生物应用提供了有价值的选择。而这些分子探针对客体的识别能力不仅依赖于识别基团, 并且与荧光团自身的光物理性质和电化学性质有着非常重要的关系。所以, 新荧光团的研究对进一步发展 PET 类型荧光分子探针是非常必要的。

在前面几章中我们尝试了用常见的荧光团来设计 PET 类型荧光分子探针, 不同荧光团连接同样的识别基团所构成的荧光分子探针表现出的性质却大相径庭。2-苯基咪唑蒽醌(PIAQ)在可见光区 ($\lambda_{em} = 515\text{nm}$) 发出强烈的荧光^[1]。作为发色团, PI AQ 是有效的电子受体, 因此可望 PI AQ 用来构造新的 PET 荧光分子探针。所以, 本章合成并研究了以 PI AQ 为荧光母体, DPA 为识别基团, 亚甲基或氨基乙基作为连接基团所构成的荧光分子探针 A1 和 A2 的荧光性能。主要分子结构如下:

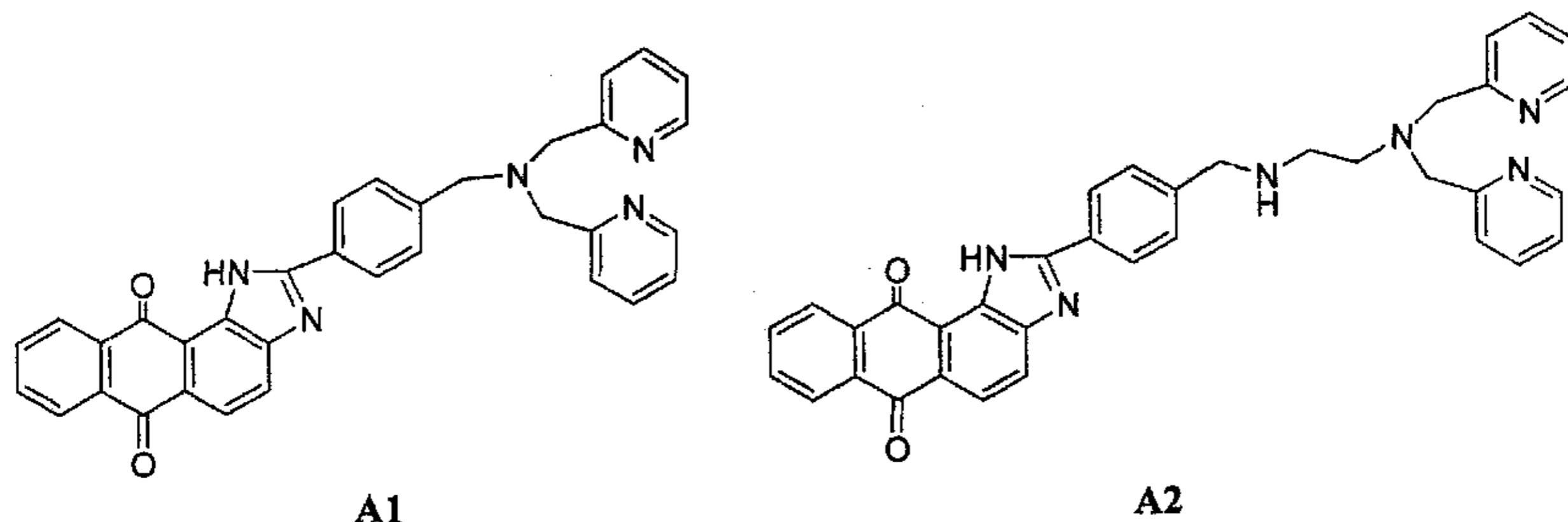


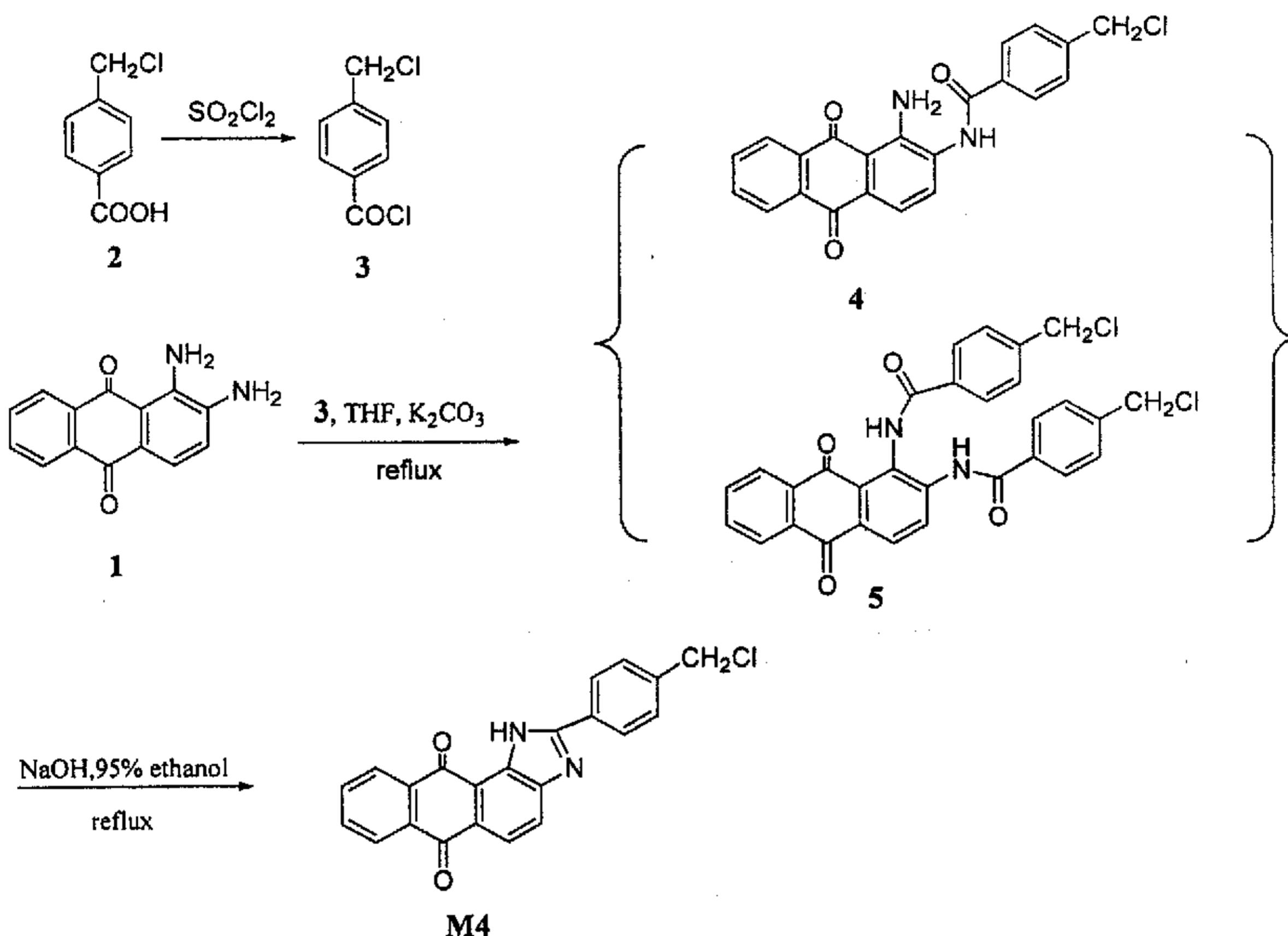
图 6-1 荧光分子探针的结构

Figure 6-1 The structures of fluorescent probes

6.2 合成路线

6.2.1 中间体 M4 的合成

1,2-二氨基蒽醌和 p-氯甲基苯甲酸反应^[1]分别生成 β -位和 α -, β -双酰胺化产物 4 和 5。这两个取代产物都可以在碱的作用下发生加成反应，脱去一分子水生成中间体 M4，合成路线如式 6-1 所示。



式 6-1 中间体 M4 的合成路线

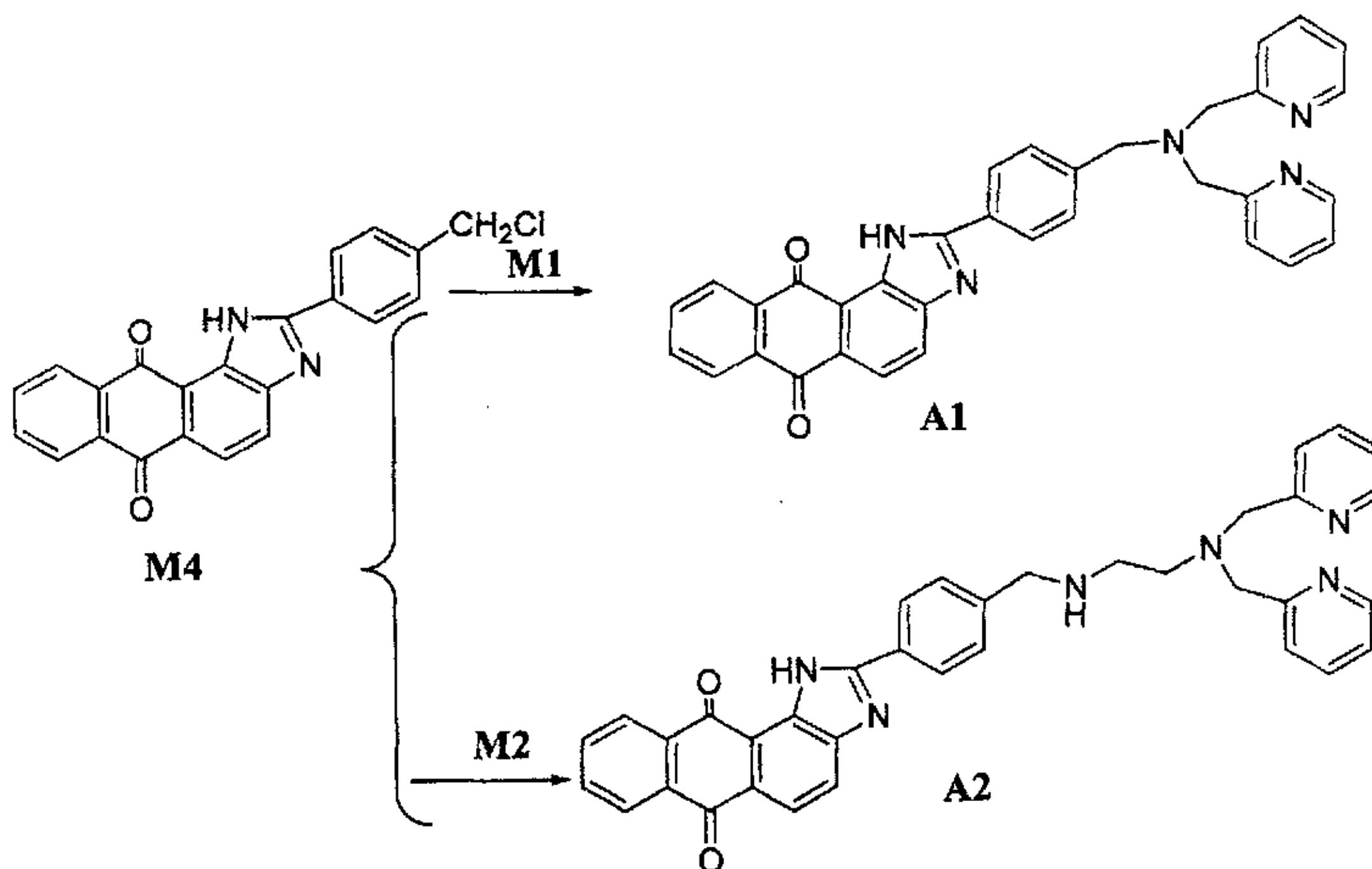
Scheme 6-1 The synthesis route of immediate M4

6.2.2 目标化合物 A1 和 A2 的合成

第二章中合成的中间体 M1 和 M2，与含有氯化物反应活性的中间体 M4 通过氨基氮原子的烷基化反应得到化合物 A1 和 A2。反应中以碳酸盐等无机碱为缚酸剂，以四氢呋喃为溶剂。

6.3 实验部分

6.3.1 原料和仪器



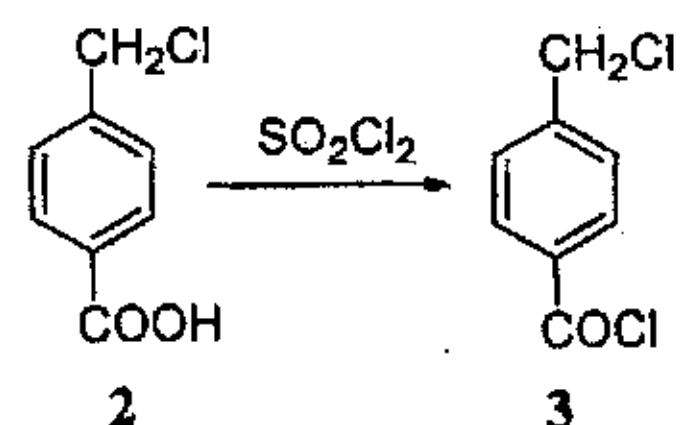
式 6-2 荧光分子探针 A1 和 A2 的合成

Scheme 6-2 The synthesis routes of fluorescent probes A1 and A2.

中间体 M1 和 M2 按第二章中方法合成。1,2-二氨基蒽醌购自 Aldrich, 其它原料均为市售化学品。柱色谱硅胶为青岛海洋化工厂产品 (200-300 mesh)。

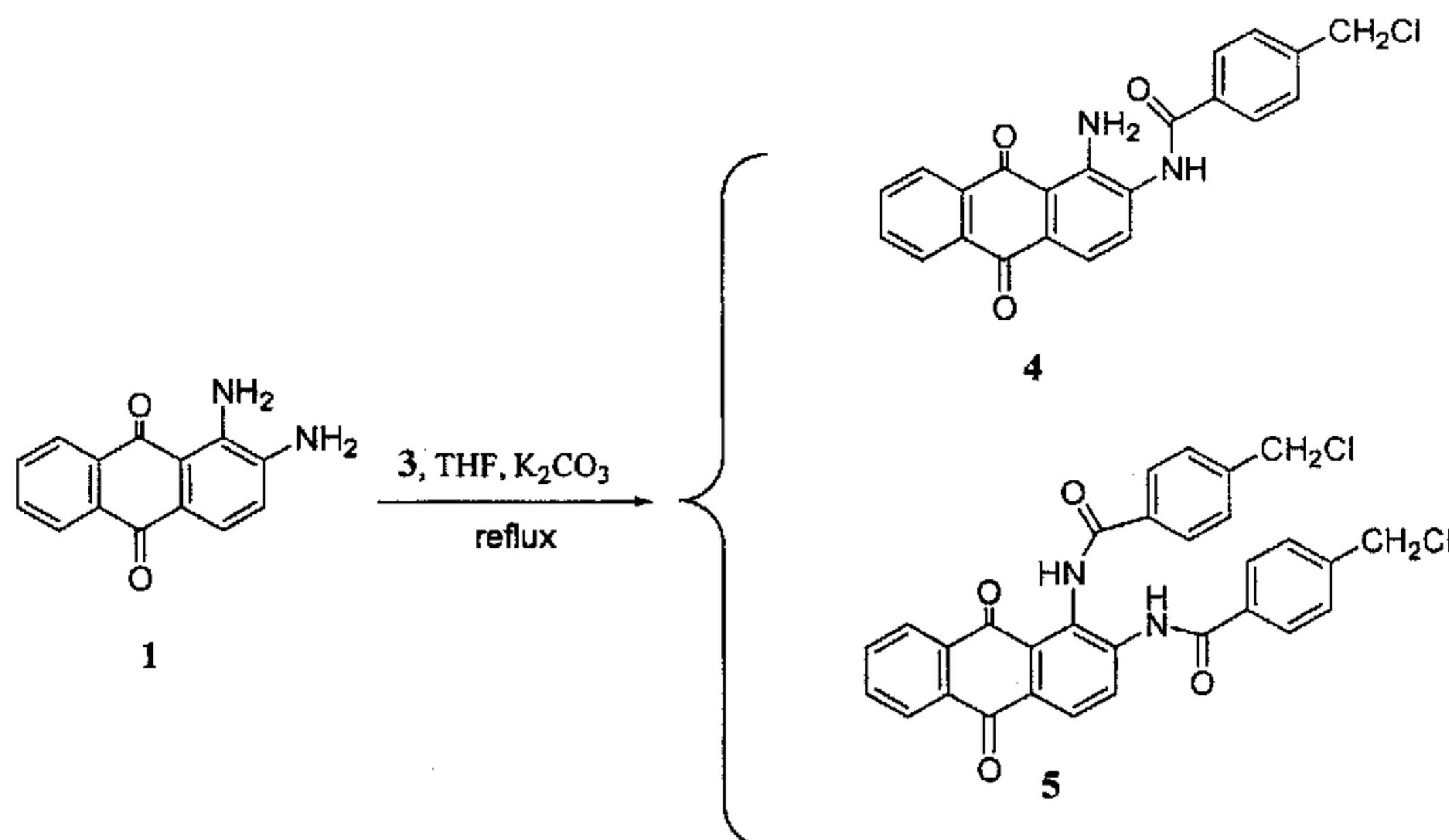
HP1100 HPLC/MS 质谱仪 (美国 HP 公司), Varian INOVA 400 (400MHz) 核磁共振仪 (美国 Varian 公司, TMS 为内标), elementar vario EL III型元素分析仪 (德国), X-6 显微熔点测定仪 (北京泰克仪器有限公司), HP-8453 紫外-可见分光光度计, PTI00 荧光分光光度计, BS-210S 万分之一电子天平 (德国 Satorius 公司), PB-20 标准型 pH 计 (德国 Sartorius 公司)。

6.3.2 中间体 M4 的合成及结构表征



在 50ml 的圆底烧瓶中加入对氯甲基苯甲酸 2(2g), 再加入二氯亚砜(6.98g, 4.2ml), 放置 5-6h。装上回流冷凝管, 水吸收装置, 加热回流 6h。蒸出过量

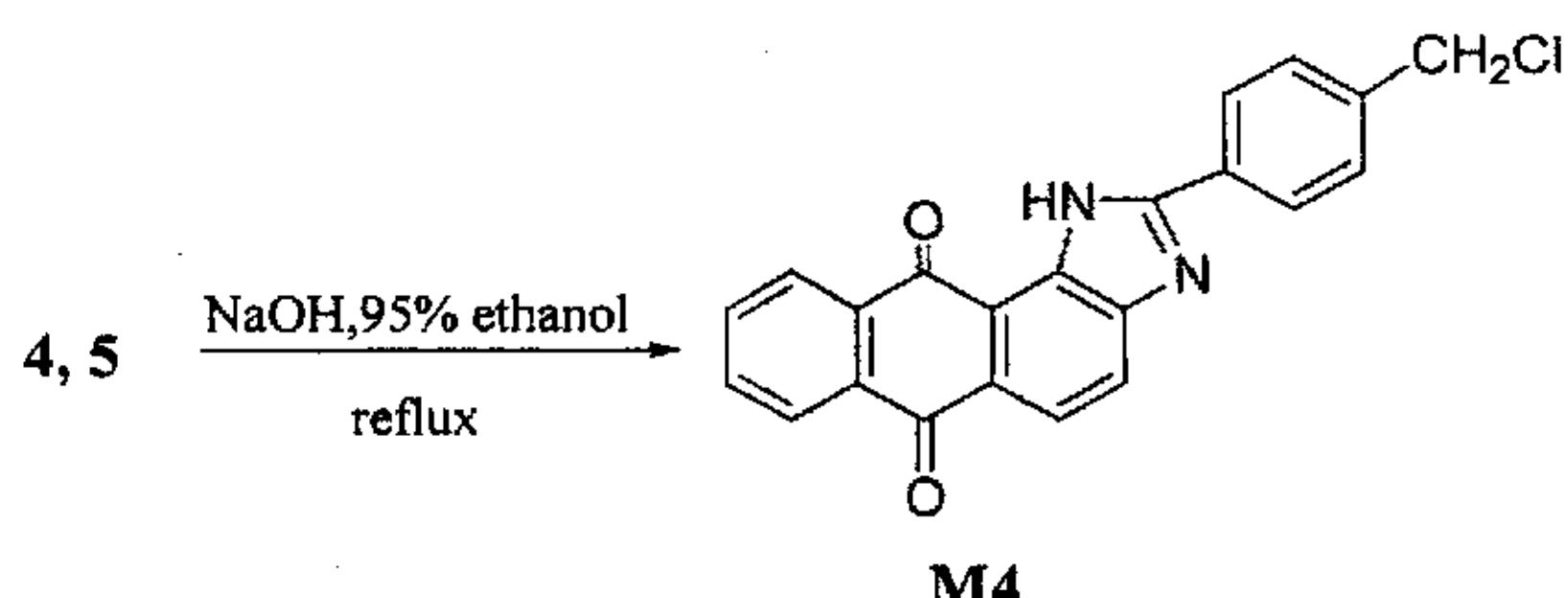
的二氯亚砜。冷却后得到无色针状晶体对氯甲基苯甲酰氯 3。收率：92.7% (2.05g)。



将 3 (0.79g, 4.2mmol) 溶解在 30ml 的 THF 中，缓慢滴加到 1,2-二氨基蒽醌 1 (1g, 4.2mmol)、三乙胺 (0.43g, 4.2mmol) 的 THF(180ml)混合溶液中。加热回流过夜，蒸出溶剂。干燥后，硅胶柱分离 (展开剂：二氯甲烷/乙酸乙酯 = 3:1)，分别得到暗红色固体 4 和黄色固体 5。收率分别是：4, 20% (25.2 mg)，熔点：256-257°C；5, 40% (0.91 g)，熔点：232-233°C。

4: 1H -NMR (DMSO, 400MHz): δ 12.18 (s, 1H), 8.28-8.34 (m, 4H), 8.21 (d, 1H, J = 8.4Hz), 8.11 (d, 1H, J = 8.4Hz), 7.84 (t, 2H, J = 4.0Hz), 7.61 (d, 2H, J = 8.4Hz), 7.46 (s, 2H), 4.69 (s, 2H). API-ES MS m/z (+): 391 [M+H] $^+$.

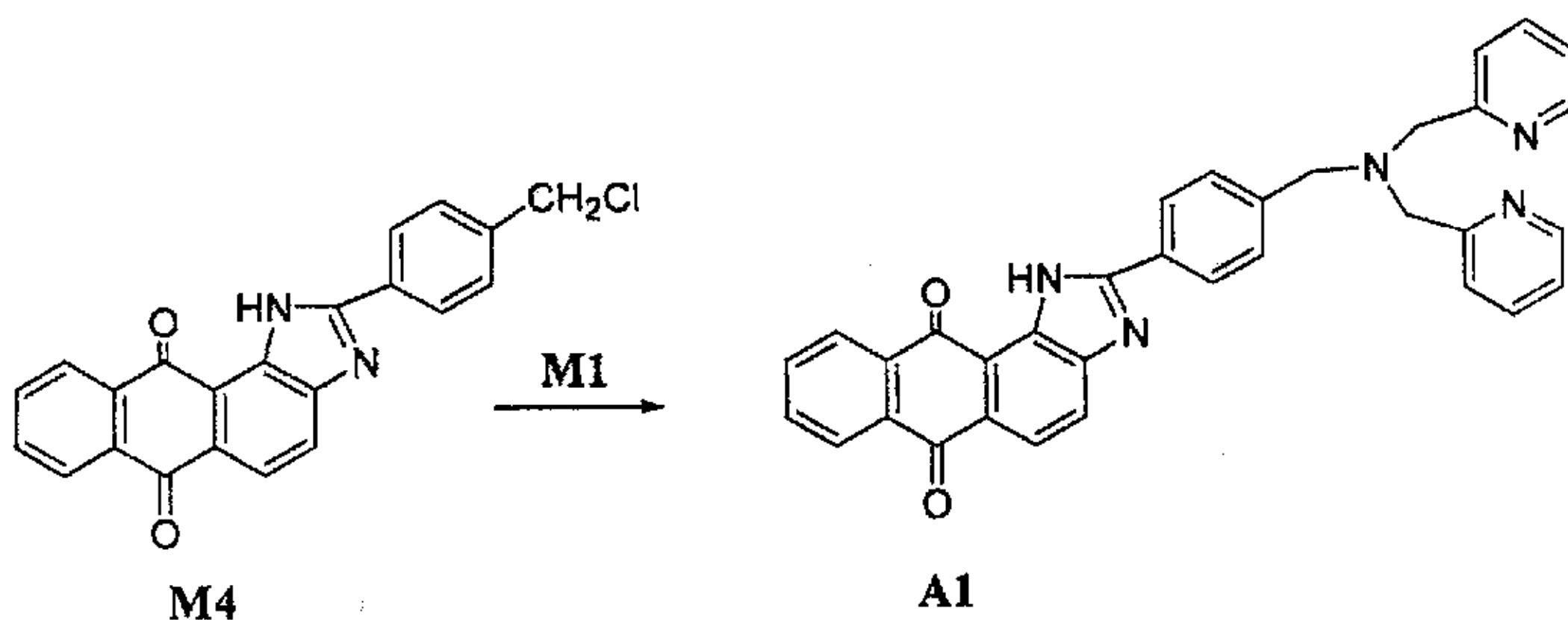
5: 1H -NMR (DMSO, 400MHz): δ 10.81 (s, 1H), 10.18 (s, 1H), 7.57-8.46 (m, 14H), 4.88 (s, 2H), 4.82 (s, 2H). ^{13}C -NMR (DMSO, 100MHz): δ 171.4, 162.9, 154.2, 143.0, 141.5, 137.1, 134.5, 133.6, 133.0, 132.1, 131.6, 129.8, 128.9, 127.9, 126.9, 56.1. API-ES MS(+) m/z : 543 [M+H] $^+$.



化合物 4 或 5 和等摩尔量的氢氧化钠溶解在 95% 的乙醇中，加热回流 1.5h，冷却到室温后，用盐酸溶液中和到 pH 7。蒸干溶剂，剩余物用水洗，干燥。硅胶柱分离（二氯甲烷/乙酸乙酯 = 5:1），得到黄色固体 M4。总收率：49.3%，熔点：151-152°C。

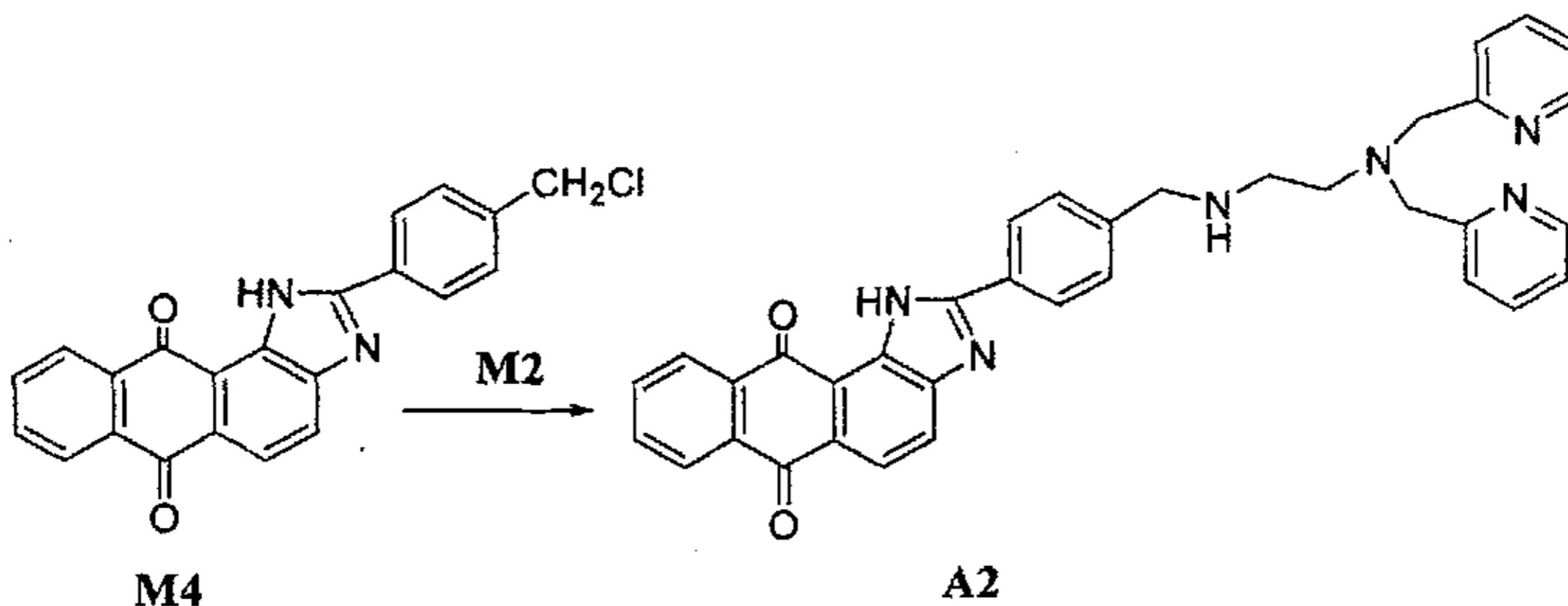
¹H-NMR(CDCl₃, 400MHz): δ 11.32 (s, 1H), 8.37 (d, 1H, *J* = 6.4Hz), 8.31(dd, 2H, *J* = 7.2Hz, *J* = 8.4Hz), 8.19 (m, 3H), 7.84 (t, 2H, *J* = 3.2Hz), 7.63 (d, 2H, *J* = 8.0Hz), 4.69 (s, 2H). ¹³C-NMR(CDCl₃, 100MHz): δ 156.0, 149.5, 140.9, 134.6, 133.9, 133.4, 129.6, 128.9, 127.8, 127.6, 126.6, 125.9, 122.2, 118.3, 53.6. APCI-MS m/z(+): 373 ([M+H]⁺).

6.3.3 目标化和物 A1 和 A2 的合成及结构表征



中间体 M1(100mg, 0.5mmol)、M4(186mg, 0.5mmol)，三乙胺数滴混合溶解在精制的 100ml THF 中，加热回流反应 24h。蒸干溶剂后，用水溶解，二氯甲烷萃取。合并有机相后，无水硫酸镁干燥。硅胶柱分离，展开剂：二氯甲烷/乙酸乙酯 = 20:1，得到黄色固体 A1。收率：50% (133.8mg)，熔点：232-233°C。

1H -NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ 11.31 (s, 1H), 8.57 (d, 2H, $J = 4.0$ Hz), 8.36 (t, 1H, $J = 6.0$ Hz), 8.30 (t, 1H, $J = 6.0$ Hz), 8.26 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz), 8.14 (d, 3H, $J = 8.0$ Hz), 7.83 (t, 2H, $J = 4.0$ Hz), 7.73 (t, 2H, $J = 7.6$ Hz), 7.66 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz), 7.60 (d, 2H, $J = 7.6$ Hz), 7.20 (t, 2H, $J = 6.0$ Hz), 3.91 (s, 4H), 3.85 (s, 2H). ^{13}C -NMR(100MHz, $CDCl_3$): δ 187.0, 158.6, 149.4, 141.5, 141.3, 139.4, 139.2, 136.3, 135.9, 135.0, 133.8, 131.9, 129.8, 129.5, 126.7, 126.3, 124.2, 123.0, 120.6, 118.8, 58.9. API-ES MS m/z (+): 536 $[M+H]^+$. Anal. Calcd. for $C_{34}H_{25}N_5O_2$: C, 76.24; H, 4.70; N, 13.08. Found: C, 79.53; H, 4.68; N, 13.03.



中间体 **M2**(242mg, 0.5mmol), **M4**(186mg, 0.5mmol), 三乙胺数滴混合溶解在精制的 100ml THF 中, 加热回流反应 24h。蒸干溶剂后, 用水溶解, 二氯甲烷萃取。合并有机相后, 无水硫酸镁干燥。硅胶柱分离。展开剂: 二氯甲烷/乙酸乙酯 = 20:1。得到暗红色固体 **A2**。收率: 30%(87mg), 熔点: 193-194 $^{\circ}C$ 。

1H -NMR(400MHz, $CDCl_3$): δ 8.53 (d, 2H, $J = 3.6$ Hz), 8.34 (d, 1H, $J = 5.6$ Hz), 8.26 (m, 2H), 8.11 (t, 2H, $J = 6.4$ Hz), 7.80 (s, 2H), 7.66 (t, 2H, $J = 7.6$ Hz), 7.51 (m, 4H), 7.34 (d, 1H, $J = 7.6$ Hz), 7.18 (t, 3H, $J = 6.0$ Hz), 3.86 (s, 4H), 3.77 (s, 2H), 2.83(s, 4H), 1.25 (s, 1H). ^{13}C -NMR(100MHz, $CDCl_3$): 182.7, 159.5, 156.7, 149.5, 149.1, 136.5, 134.5, 134.0, 133.8, 133.3, 129.8, 128.0, 128.6, 127.6, 127.1, 126.5, 125.6, 123.1, 122.0, 118.0, 60.7, 53.9, 53.2, 46.7. API-ES MS m/z (+): 579 $[M+H]^+$, 601 $[M+Na]^+$. Anal. Calcd. for $C_{36}H_{30}N_6O_2$: C, 74.72; H,

5.23; N, 14.52. Found: C, 74.42; H, 5.21; N, 14.46.

6.3.4 紫外及荧光光谱的测定

6.3.4.1 不同溶剂中的光谱研究

准确称取待测化合物，将其移入 5ml 容量瓶中，用二氯甲烷定容，配制成浓度 1.0×10^{-4} mol/l 的溶液。分别移取 0.5ml 溶液于 5ml 容量瓶中。用氮气吹干溶剂二氯甲烷，用甲苯、乙醚、四氢呋喃、乙酸乙酯、丙酮、乙腈、乙醇、二甲基亚砜等定容，待样品完全溶解后配制成浓度 1.0×10^{-5} mol/l 的溶液，测定其紫外—可见吸收光谱。利用不同溶剂中紫外—可见光谱的最大吸收波长，作为荧光光谱的激发波长，测定荧光光谱。

6.3.4.2 不同 pH 的荧光光谱测定

1.0×10^{-5} mol/l 待测样品的水溶液，分别用不同浓度的盐酸或氢氧化钠调节酸碱性（加入量小于待测液体积的 1%）。测其不同 pH 时的荧光光谱。

6.3.4.3 荧光量子产率的测定

实验方法同第三章所述。

6.3.4.4 对金属离子的识别测定

6.3.4.4.1 甲醇溶液中 A1 和 A2 对金属离子的识别

选取 AgNO_3 、 CoCl_2 、 NiCl_2 、 CdCl_2 、 CuCl_2 、 MnCl_2 、 FeCl_3 、 CrCl_3 和 ZnSO_4 ，在甲醇-四甲基氢氧化铵(10% a.q.)(98:1, v:v)混合溶液中测定 A1 和 A2 的紫外和荧光光谱。金属离子浓度为 5×10^{-5} mol/l，探针分子的浓度是 1×10^{-5} mol/l。

通过以上测试，筛选出被识别的金属离子 Ag^+ ，进行浓度梯度实验。准确称取待测化合物 A1，将其移入 10ml 容量瓶中，用 DMSO 定容，配置成浓度为浓度 1.0×10^{-4} mol/l 的溶液。移取 0.1ml 上述溶液于 10ml 容量瓶中，甲醇-四甲基氢氧化铵(10% a.q.)(98:1, v:v)混合溶液定容后配制成 1.0×10^{-5} mol/l 的

溶液。向此溶液中不断加入 1M $AgNO_3$ 水溶液, 测定不同 Ag^+ 浓度时探针分子 **A1** 的荧光强度。

6.3.4.4.2 缓冲溶液中 **A1** 和 **A2** 对金属离子的识别

在 pH-荧光强度关系测定的基础上, 选取荧光强度稳定的 pH 值进行金属离子识别实验。在缓冲溶液中, 探针的浓度为 $1.0 \times 10^{-5} mol/l$, 分别加入 $5.0 \times 10^{-5} mol/l$ 的 $NaCl$ 、 KCl 、 $MgCl_2$ 、 $CaCl_2$ 、 $AgNO_3$ 、 $CoCl_2$ 、 $NiCl_2$ 、 $CdCl_2$ 、 $CuCl_2$ 、 $MnCl_2$ 、 $FeCl_3$ 、 $CrCl_3$ 和 $ZnSO_4$ 测定荧光光谱的变化。

通过以上测试, 筛选出被识别的金属离子 Zn^{2+} , 进行浓度梯度试验。准确称取化合物 **A1**, 将其移入 10ml 容量瓶中, 用 DMSO 定容, 配置成浓度为浓度 $1.0 \times 10^{-4} mol/l$ 的溶液。移取 0.1ml 溶液于 10ml 容量瓶中, 缓冲溶液定容后配制成 $1.0 \times 10^{-5} mol/l$ 的溶液。向此溶液中不断加入 1M $ZnSO_4$ 水溶液, 测定不同 Zn^{2+} 浓度时探针分子 **A1** 的荧光强度。

6.3.4.5 量子化学计算方法

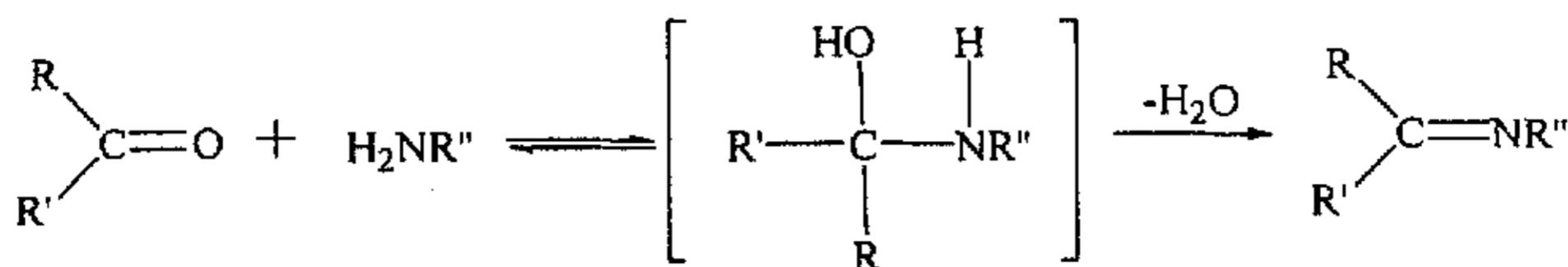
本章采用 Gaussian 98 中 RHF 方法在 STO-3G 水平上计算分子稳态存在的最低能量以及分子内各原子的电荷分布。

6.4 结果与讨论

6.4.1 中间体 **M4** 的合成

胺类化合物的酰化是发生在氨基氮原子上的亲电取代反应。N-酰化反应的难易与胺类氮原子的电子云密度和酰化剂的反应活性, 以及空间效应都有密切关系。氨基上的电子云密度越大, 空间阻碍越小, 则反应活性越强。1, 2-二氨基蒽醌的酰胺化反应, 其主要产物应该是在 β -上的单酰胺化。而在实验中却发现 α -、 β -双酰胺化产物 **5** 较 β -上的单酰胺化产物 **4** 更多。原因可能是 β -上的单酰胺化后, α -位上氨基的电子云密度相对增大, 从而增大了 α -位氨基的反应活性。

M4 的合成是酰胺上的羰基与伯胺加成后再脱去一分子水所生成的缩合物。反应机理如下^[2]:



式 6-3 中间体 **M4** 的合成反应机理

Scheme 6-3 The synthesis mechanism of intermediate **M4**

因此,由化合物 4 在氢氧化钠溶液的作用下自身的酰胺与邻位伯胺加成后脱水生成的是中间体 **M4** 就容易解释。而用化合物 5 进行的成咪唑环反应中,也只得到了一种产物 **M4**,却没有得到它的同分异构体 **M5**,其结构式如图 6-2 所示。原因可能是化合物 5 在碱性溶液中先水解掉 α -位的酰胺化产物,继而再发生以上反应得到中间体 **M4**。另外,不考虑分子内氢键的存在,根据 Gaussian 98 中 RHF 方法在 STO-3G 水平上计算所得, **M5** 能够稳定存在的最低能量要比 **M4** 高出 17.34 kJ/mol, 所以,在热力学上能够稳定存在的产物也应该是中间体 **M4**。实验所得到的化合物构型能够用理论计算加以解释。

中间体 **M4** 的 $^1\text{H-NMR}$ 谱图如图 6-3 所示。从图中可以看出, -NH 峰在低场 δ 11.324 处出现,这是因为-NH 出现在与羰基氧位置较近的地方,与氧原子之间形成的分子内氢键所致,这一点还可以从化合物 **A1** 的核磁谱图中看到,如图 6-4 所示。

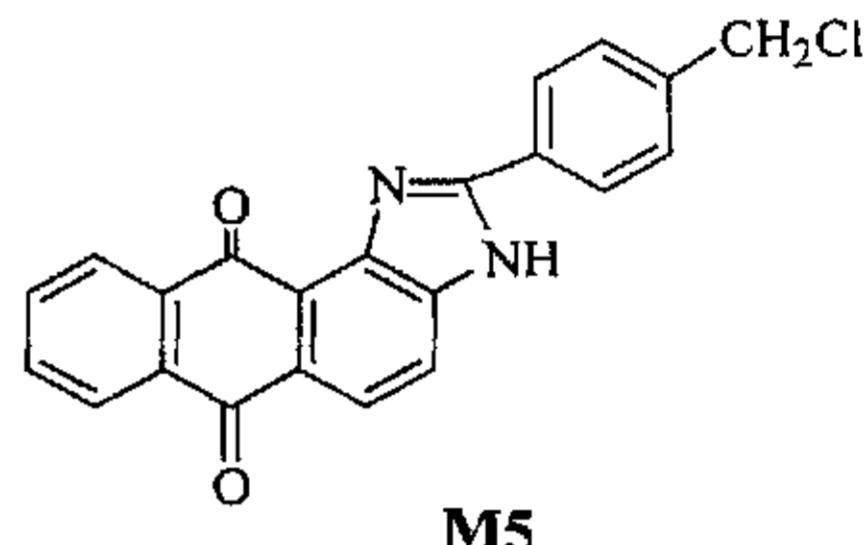


图 6-2 化合物 **M5** 的结构式

Figure 6-2 The structure of compound **M5**

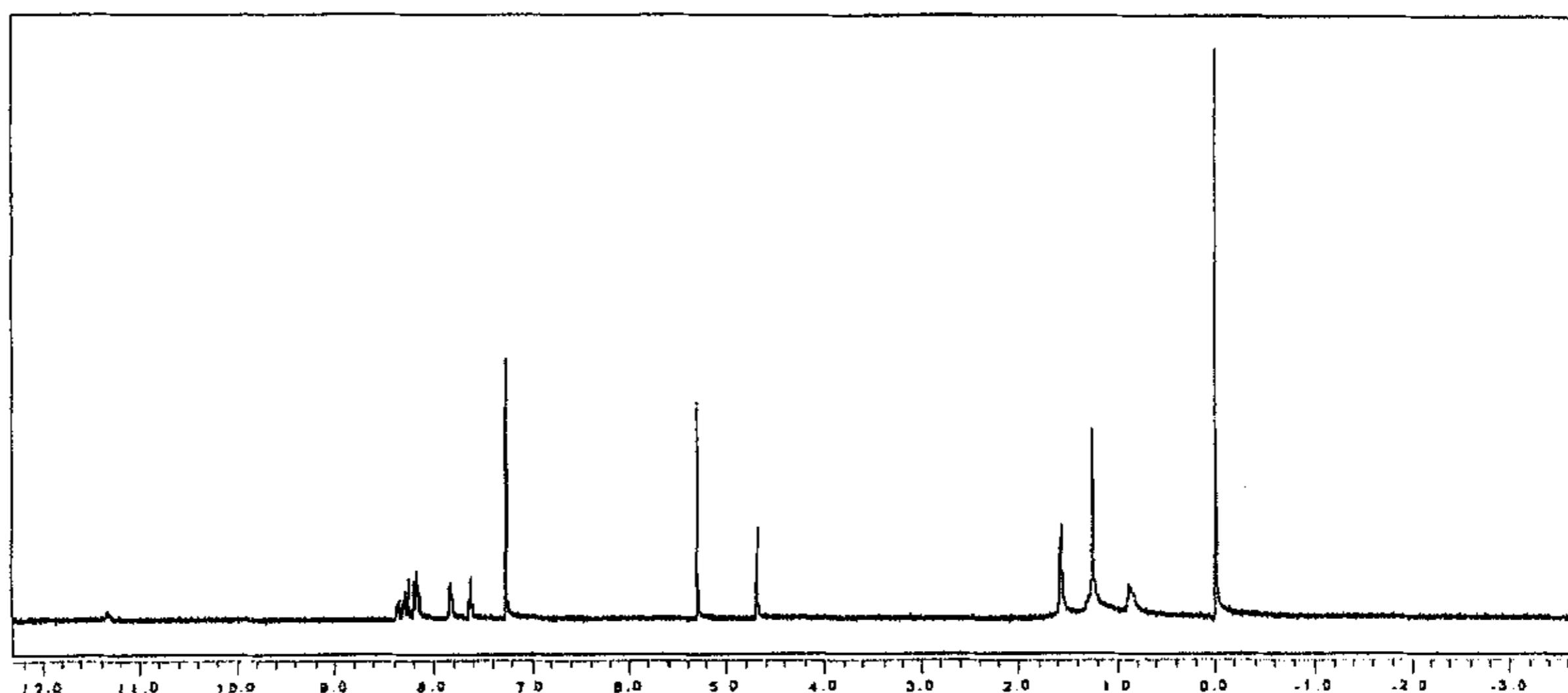


图 6-3 中间体 M4 的 1H NMR 谱图

Figure 6-3 The 1H NMR spectrum of immediate M4

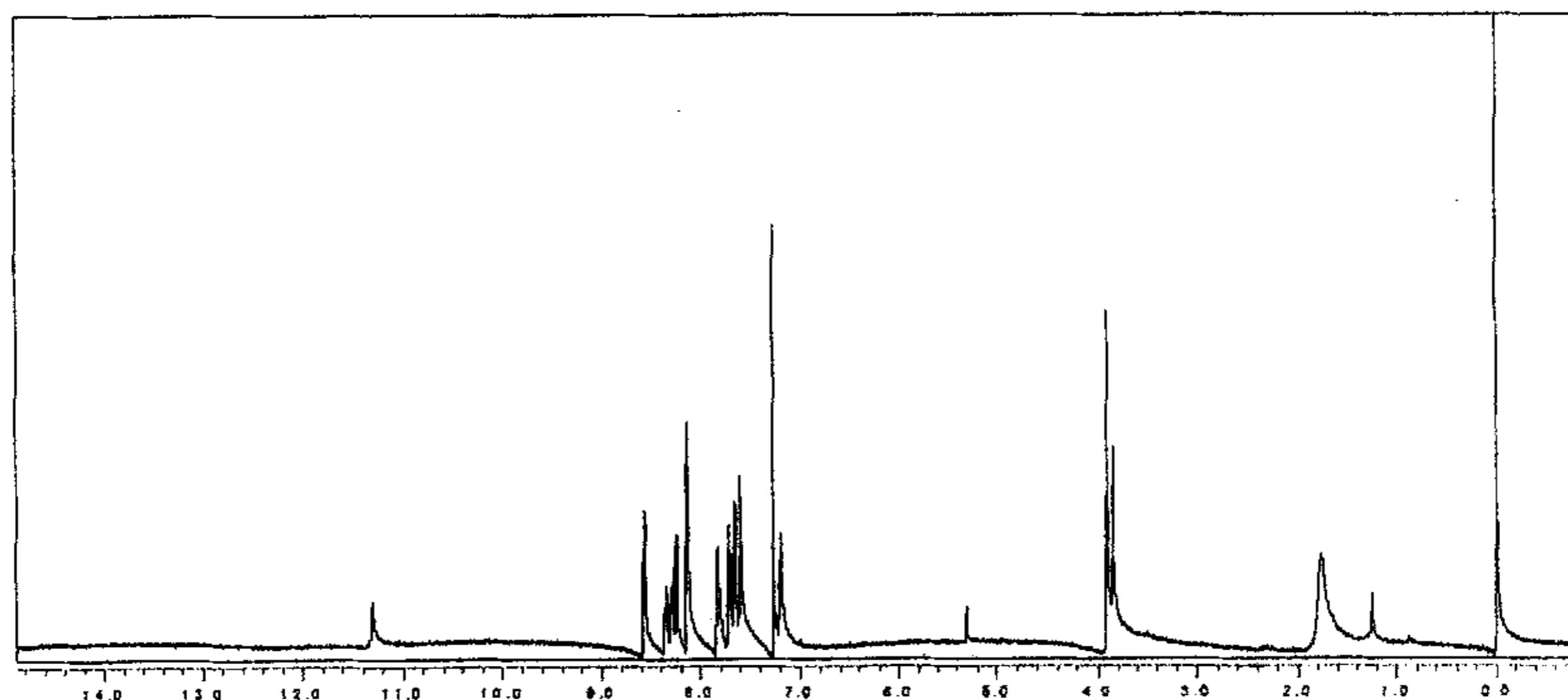


图 6-4 化合物 A1 的 1H -NMR 谱图

Figure 6-4 The 1H -NMR spectrum of compound A1

6.4.2 溶剂对 A1 和 A2 光谱的影响

在测试中发现，本章合成的目标化合物 A1 和 A2 在不同的溶剂中它们的吸收和发射光谱变化情况非常相似。以 A1 为例，在常用溶剂中的吸收和发射光谱如表 6-1 所示。

表 6-1 A1(1×10^{-5} mol/l)在不同溶剂中的光谱数据Table 6-1 Spectra data of compound A1(1×10^{-5} mol/l) in different solvents

solvent	λ_{max}	Abs	λ_{em}
toluene	416	0.114	488
diethyl ether	409	0.074	481
THF	409	0.131	510
ethyl acetate	400	0.126	519
acetone	404	0.135	524
ethanol	401	0.118	537
DMSO	402	0.138	530

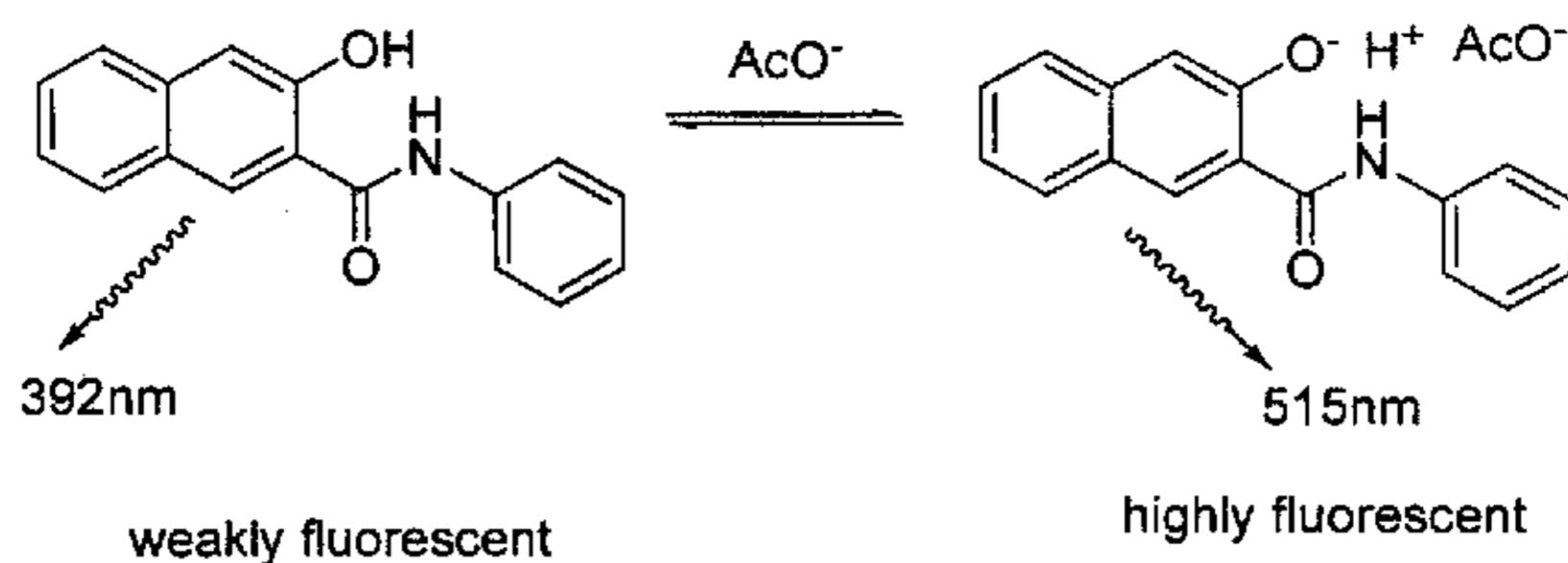
和前面几章中所述的荧光分子探针不同的是，随着溶剂极性的增大，A1的吸收光谱不断蓝移，荧光光谱不断红移。一般说来，对于吸收光谱是由 $\pi-\pi^*$ 跃迁和 $n-\pi^*$ 跃迁产生的化合物，溶剂极性对这两类跃迁产生的影响是不同的。当溶剂的极性增加时，使 $\pi-\pi^*$ 跃迁产生的谱带移向长波方向；与此相反，使用溶剂的极性越强，则由 $n-\pi^*$ 跃迁产生的谱带越向短波方向移动，即发生蓝移^[3]。

6.4.3 pH 对 A1 和 A2 荧光强度的影响

化合物 A1 的荧光强度与 pH 在 2-9 之间的关系曲线如图 6-5 所示。最大激发波长 λ_{ex} 是 400nm，最大发射波长 λ_{em} 是 560nm。从该图可以看出，随着 pH 的增大，A1 的荧光强度不断降低，在 pH 6-8 之间有一稳定值。而后 A1 的荧光强度继续下降， λ_{ex} 从 400nm 红移到 424nm， λ_{em} 从 560nm 蓝移到 525nm。在 pH 达到 11 以后，出现了新的激发光谱和荧光光谱。以 pH12 为例，如图 6-6 所示。以 $\lambda_{\text{ex}} = 424\text{nm}$ 激发可以看到在分别在 $\lambda_{\text{em}} = 525\text{nm}$ 和 617nm 处的荧光峰。而用 $\lambda_{\text{ex}} = 466\text{nm}$ 激发时，主要表现出 $\lambda_{\text{em}} = 617\text{nm}$ 处的荧光光谱和微弱的 525nm 荧光峰。

近年来，在阴离子分子探针的设计中，经常用到分子间激发态质子转移的作用原理^[4,5]，举例说明如式 6-4 所示。在非质子型溶剂乙腈中，3-羟基-2-萘甲酰苯胺在 329nm 处发出微弱的荧光，当溶液中加入呈碱性的醋酸根负离子时，羟基脱掉的质子转而与 AcO^- 结合，即发生了分子间的质子转移。此化

合物在 515nm 处出现了新的发射峰，并表现出强荧光。



式 6-4 分子间激发态质子转移作用原理举例

Scheme 6-4 Example of Intermolecular excited proton transfer

也正是因为碱性条件下，A1 和溶液中 OH^- 之间发生了激发态的分子间质子转移，咪唑环脱掉 H^+ ，从而形成 N^+ 。这样， $\lambda_{em} = 617nm$ 处荧光光谱的形成有两种渠道：脱质子（分子间质子转移）后的基态激发 ($\lambda_{ex} = 466nm$) 和未脱质子的基态 ($\lambda_{ex} = 424nm$) 伴随脱质子的激发态。

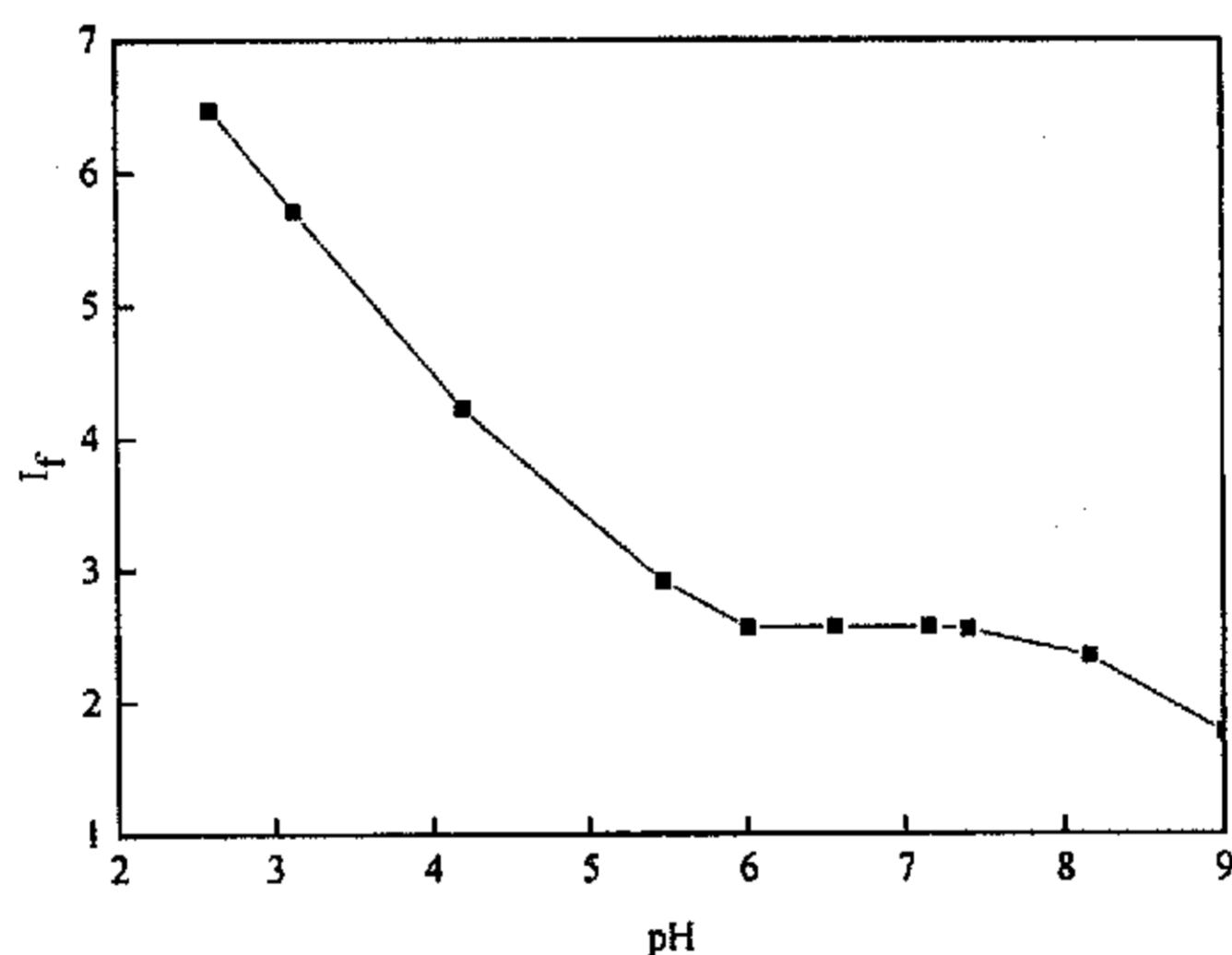


Figure 6-5 A1 荧光强度与 pH 值之间的关系曲线（在 1:9, v:v 的 DMSO/H₂O 的混合溶液中）。

Figure 6-5 Effect of pH on fluorescence intensity of A1 in a mixed solution of DMSO and water (1:9, v:v).

化合物 A2 的荧光光谱随 pH 的变化曲线与化合物 A1 有着相类似的性质，这里就不再详述。

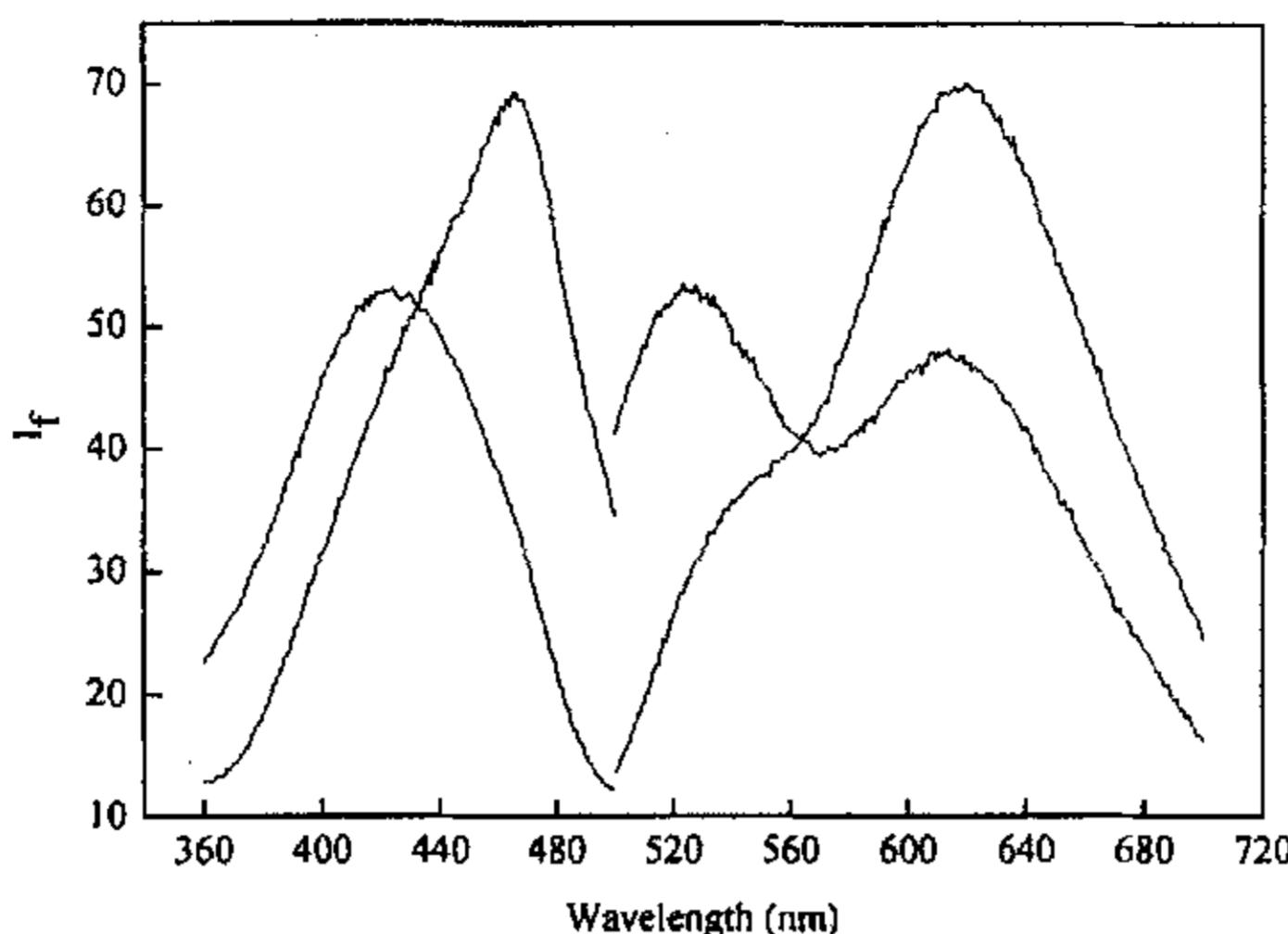


图 6-6 pH 12 时 A1(1×10^{-5} mol/l)的荧光光谱

Figure 6-6 The fluorescence spectrum of A1(1×10^{-5} mol/l) at pH 12

6.4.4 甲醇-碱体系中 A1 对不同金属离子的识别研究

为了避免过渡金属离子水解产生的质子对 PET 原理的荧光探针识别的影响，此类探针一般在缓冲溶液中^[6,7]或者在有机溶剂中加入四甲基氢氧化铵水溶液^[8,9]进行，以消除质子的影响。

6.4.4.1 对不同金属离子的识别研究

既然在碱性条件下，可以得到长波长的荧光光谱以及发射光谱和激发光谱之间大的 Stokes 位移。那么我们可以避免 H^+ 对 A1 本身性质的影响，在甲醇-四甲基氢氧化铵体系中观察 A1 对金属离子的识别。

表 6-2 为 A1 在甲醇-四甲基氢氧化铵(10% a.q.) (98:1) 溶液中加入金属离子后的紫外吸收和荧光光谱的变化情况。

表 6-2 甲醇-四甲基氢氧化铵(10% a.q.) (98:1) 溶液中金属离子对 A1 (1×10^{-5} mol/l) 吸收光谱和荧光光谱的影响

Table 6-2 Absorption and fluorescence spectrum data of compound A1(1×10^{-5} mol/l) with different metal ions

	空白	Zn^{2+}	Cu^{2+}	Cd^{2+}	Co^{2+}	Cr^{3+}	Fe^{3+}	Ag^+	Ni^{2+}
λ_{max}	462	464	460	460	460	460	462	438	460
Abs	0.1007	0.1149	0.1357	0.1054	0.1517	0.1018	0.1235	0.1572	0.1018
λ_{em}	616	616	611	611	615	616	616	608	616
I_f/I_0	1.0	0.96	0.75	0.96	0.87	0.96	0.85	0.21	0.94

由表 6-2 中数据可以看出, Zn^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Cr^{3+} 、 Ni^{2+} 、 Co^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Cu^{2+} 和 Ag^+ 依次对 **A1** 的荧光淬灭作用增强。但这些离子与空白实验相比, 对荧光的影响都较小。只有 Ag^+ 与上述离子形成了鲜明对比: 加入 Ag^+ 后, **A1** 的吸光度增大, 最大吸收光谱蓝移 24nm, ; 荧光淬灭 80%, 荧光光谱蓝移 8nm, 而且溶液颜色由深黄色变成浅绿色。

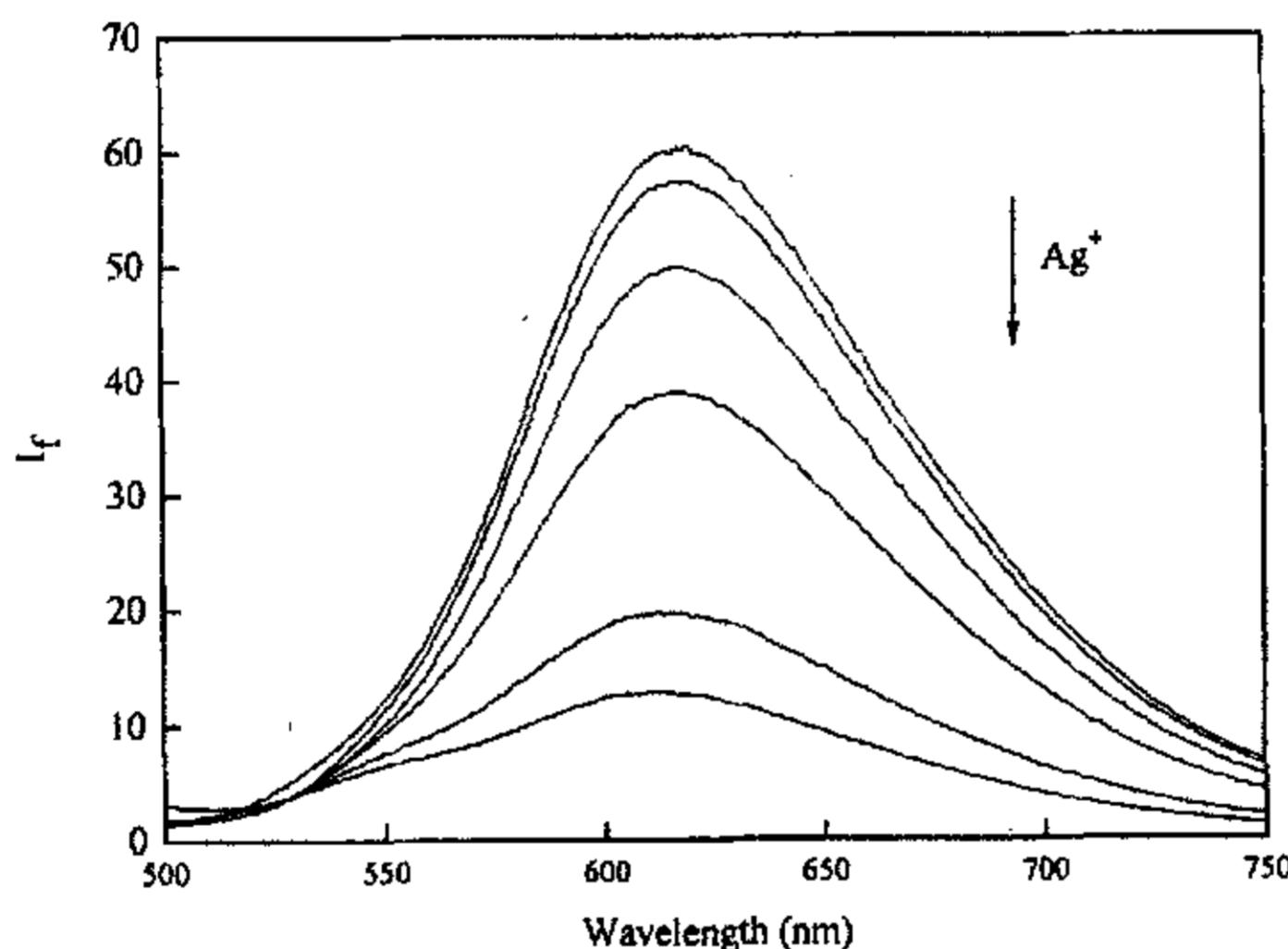


图 6-7 甲醇-四甲基氢氧化铵溶液中 Ag^+ 浓度对 **A1** (1×10^{-5} mol/L) 荧光光谱的影响

Figure 6-7 Fluorescent spectra of compound **A1** (1×10^{-5} mol/L) with the different concentration of Ag^+ (from top to bottom C_{Ag^+} : 1×10^{-5} mol/L- 4×10^{-5} mol/L)

6.4.4.2 Ag^+ 浓度对 **A1** 荧光强度的影响

在筛选试验的基础上, 进一步研究了 Ag^+ 浓度对 **A1** 荧光光谱的影响。在甲醇-四甲基氢氧化铵体系中, 加入不同浓度的 Ag^+ 水溶液, 测定荧光光谱。

由图 6-7 可以看出，随着 Ag^+ 浓度增加，荧光光谱不断蓝移，荧光淬灭。在实验中，当加入的 Ag^+ 的浓度超过探针 4 倍时，荧光光谱才不再变化。可能在强碱性条件，能与探针结合的自由 Ag^+ 浓度较低，当 Ag^+ 表观浓度过量很多时，才能和探针完全结合。我们推测 Ag^+ 是和脱质子后的 N^- 离子配位，具体配位方式和配位数有待培养单晶做进一步解释。

6.4.5 tri-HCl 缓冲溶液中 A1 和 A2 对金属离子的识别

6.4.5.1 A1 和 A2 对不同金属离子的识别

在甲醇的碱性溶液中，A1 表现出对 Ag^+ 的特殊选择性，为了验证在中性条件下， Ag^+ 是否还对 A1 有荧光淬灭作用及推测其配位位点，本节在 tri-HCl 缓冲溶液中对 A1 和 A2 做了对金属离子的识别实验，如图 5-8 和 5-9 所示。

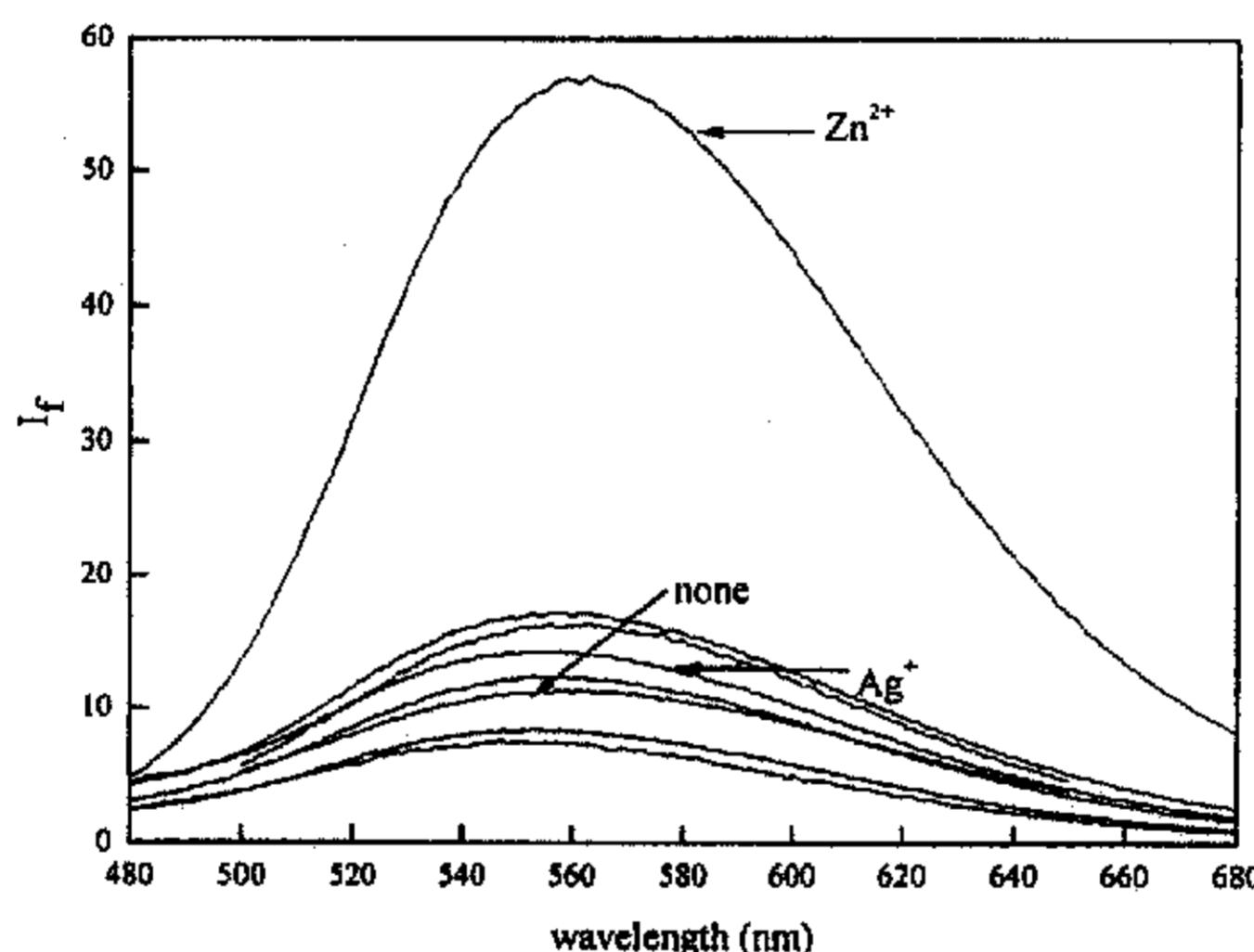


图 6-8 不同金属离子($5 \times 10^{-5} \text{ M}$) 存在 A1 ($1 \times 10^{-5} \text{ M}$) 的荧光强度的变化。光谱数据在 10 mM tri-HCl 缓冲溶液中测得($\text{pH } 7.4, I = 0.1 \text{ (NaCl)}$)。金属离子有： NaCl 、 KCl 、 MgCl_2 、 CaCl_2 、 AgNO_3 、 CoCl_2 、 NiCl_2 、 CdCl_2 、 CuCl_2 、 MnCl_2 、 FeCl_3 、 CrCl_3 和 ZnSO_4
Figure 6-8 The relative fluorescence intensity of $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ A1 in the presence of various metal cations ($5 \times 10^{-5} \text{ M}$). These data were measured in 10 mM tri-HCl buffer ($\text{pH } 7.4, I = 0.1 \text{ (NaCl)}$). The metal cations: NaCl , KCl , MgCl_2 , CaCl_2 , AgNO_3 , CoCl_2 , NiCl_2 , CdCl_2 , CuCl_2 , MnCl_2 , FeCl_3 , CrCl_3 and ZnSO_4 .

从图 6-8 可以看出，A1 对 Zn^{2+} 表现出很好的选择性荧光增强识别，加入过量的 Zn^{2+} 使 A1 的荧光强度增大 5 倍，而对 Ag^+ 看不出明显的荧光增强或淬灭作用。虽然 Cd^{2+} 在很多微环境中的含量很少甚至是 0，但 Cd^{2+} 是经常能够

干扰 Zn^{2+} 检测的过渡金属离子。令人兴奋的是, Cd^{2+} 对 **A1** 无明显的荧光增强作用。其它金属离子如碱金属和碱土金属离子 Na^+ 、 K^+ 、 Mg^{2+} 和 Ca^{2+} 等无任何识别, 对 Cd^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 和 Cr^{3+} 也有类似的结果, 只是 Ni^{2+} 和 Co^{2+} 对其荧光有微弱的淬灭作用。所以, **A1** 是在中性介质中对 Zn^{2+} 有着特殊选择性识别的荧光分子探针。

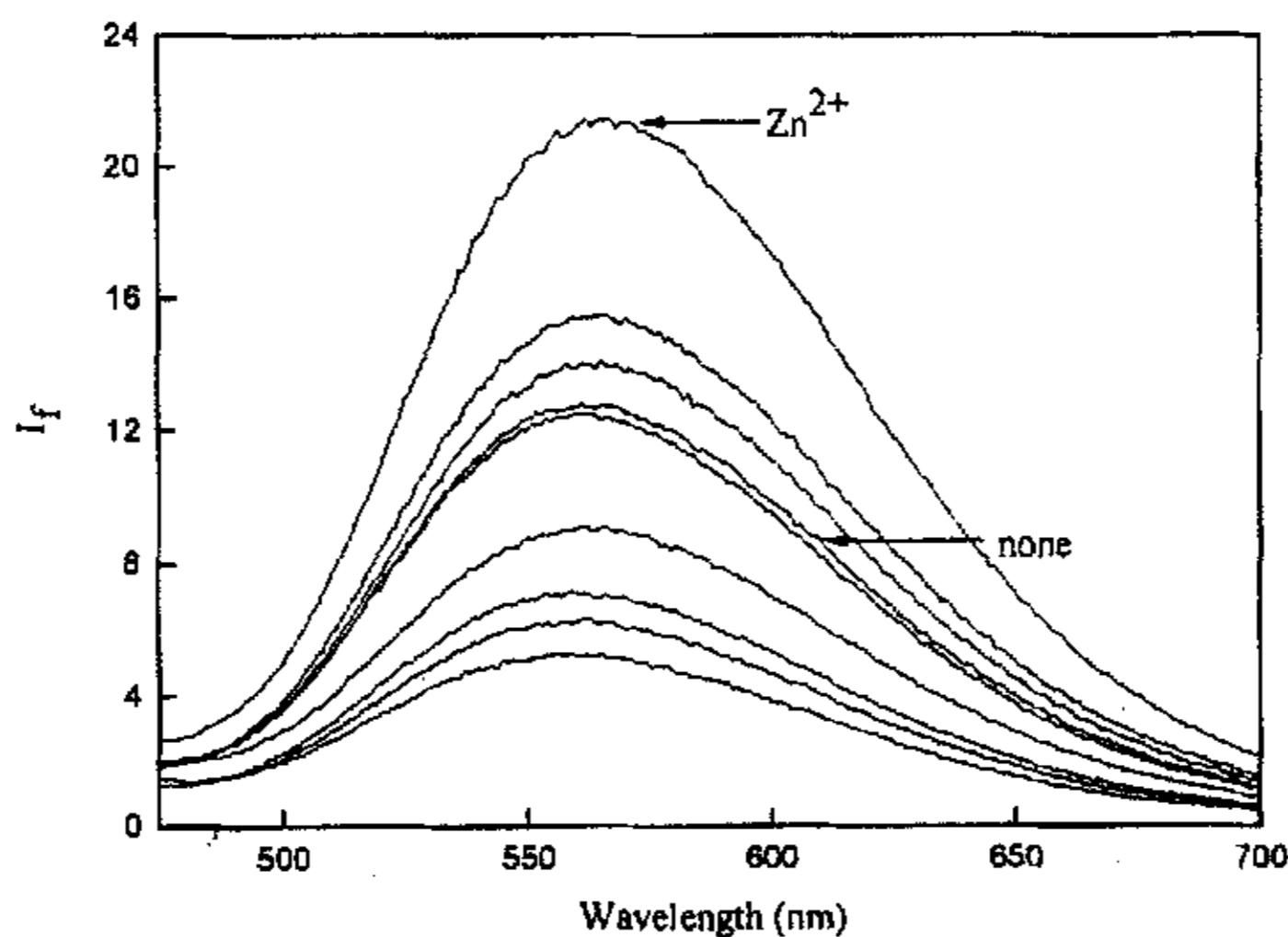


图 6-9 不同金属离子($5 \times 10^{-5} M$) 存在 **A2** ($1 \times 10^{-5} M$) 的荧光强度的变化。光谱数据在 10 mM tris-HCl 缓冲溶液中测得(pH 7.4, I = 0.1 (NaCl))。金属离子有: $NaCl$ 、 KCl 、 $MgCl_2$ 、 $CaCl_2$ 、 $AgNO_3$ 、 $CoCl_2$ 、 $NiCl_2$ 、 $CdCl_2$ 、 $CuCl_2$ 、 $MnCl_2$ 、 $FeCl_3$ 、 $CrCl_3$ 和 $ZnSO_4$

Figure 6-9 The relative fluorescence intensity of $1 \times 10^{-5} M$ **A2** in the presence of various metal cations ($5 \times 10^{-5} M$). These data were measured in 10 mM tris-HCl buffer (pH 7.4, I = 0.1 (NaCl)). The metal cations: $NaCl$, KCl , $MgCl_2$, $CaCl_2$, $AgNO_3$, $CoCl_2$, $NiCl_2$, $CdCl_2$, $CuCl_2$, $MnCl_2$, $FeCl_3$, $CrCl_3$ and $ZnSO_4$

另外, **A1** 对 Ag^+ 没有识别作用, 正可以说明推测的正确性。酸性至中性介质中, 在咪唑环上的氮原子没有脱掉 H^+ 之前, Ag^+ 和 **A1** 之间并没有任何作用。光激发荧光团发生的是分子内的光诱导电子转移过程, 所以加入 Zn^{2+} 后所表现出来的荧光变化是抑制了这种光诱导电子转移过程得到的结果; 而在强碱性介质中, 咪唑环上的-NH 与溶液中的 OH^- 发生分子间质子转移, 脱掉 H^+ 之后, 整个分子的负电荷集中在 N^- 上, 从而与 Ag^+ 进行配位络合, 导致荧光淬灭。

图 6-9 是化合物 A2 在不同金属离子中的荧光变化情况。从图 6-9 中看出, Zn^{2+} 对化合物 A2 的荧光增强作用与其它金属离子无明显区别。究其原因, 可能是 DPA 通过氨基连接苯亚甲基这样一个很长的连接基团, 使 PET 过程不能够顺利地发生。那么, 我们所观察到的络合促进的荧光增强作用也就不明显了。

6.4.5.2 不同浓度的 Zn^{2+} 对 A1 荧光光谱的影响

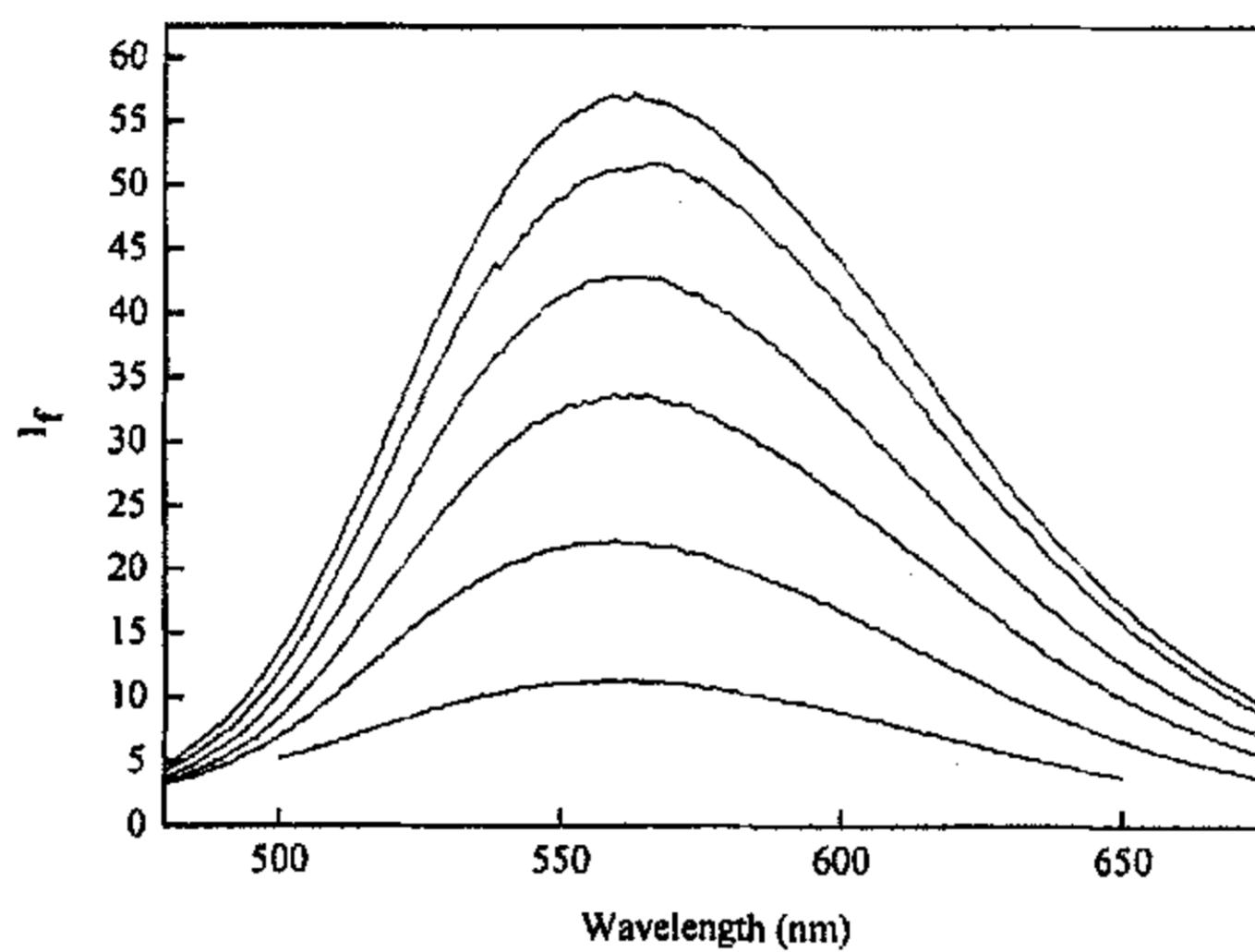


图 6-10 A1 (1×10^{-5} M) 的荧光光谱 (400nm 处激发) 随 Zn^{2+} 浓度 ($0-1 \times 10^{-5}$ M) 的变化。实验数据在 pH 7.4 (10 mM tris-HCl buffer, I = 0.1 (NaCl)) 中测得。

Figure 6-10 Fluorescence spectra (excitation at 400 nm) of $10 \mu\text{M}$ A1 in the presence of various concentrations of Zn^{2+} ranging from 0 to 1×10^{-5} M. These spectra were measured at pH 7.4 (10 mM tris-HCl buffer, I = 0.1 (NaCl)).

由图 6-10 所示, 在 $0-1 \times 10^{-5}$ M 浓度范围内, A1 对 Zn^{2+} 的识别有较好的线性关系。A1(1×10^{-5} M) 随着 Zn^{2+} 浓度的增大荧光强度线性增强, 在 Zn^{2+} 浓度达到 1×10^{-5} M 时, 荧光强度增加到最大。继续加入过量的 Zn^{2+} , A1 的荧光强度没有明显的增大, 说明 A1 与 Zn^{2+} 呈 1:1 络合关系。最大吸收波长 $\lambda_{\text{max}} = 400\text{nm}$ 和最大发射波长 $\lambda_{\text{em}} = 560\text{nm}$ 在加入 Zn^{2+} 前后都没有明显的移动, 荧光量子产率从 0.007 增大到 0.028。

6.5 本章小节

1. 设计合成了 2-苯基咪唑蒽醌为荧光母体的化合物 **A1** 和 **A2**，均未见文献报道。对中间体 **M4** 的合成过程进行了实验和理论讨论，解释了由化合物 **4**、**5** 和伯胺加成反应后脱去一分子水都会生成中间体 **M4**，而不会生成它的同分异构体 **M5**。

2. 化合物 **A1** 在甲醇—四甲基氢氧化铵溶液和 tri-HCl 中性缓冲溶液中分别对 Ag^+ 和 Zn^{2+} 有很好的选择性识别。在甲醇溶液中，加入 Ag^+ 使 **A1** 的荧光淬灭 80%，最大吸收光谱蓝移 8nm，并且溶液颜色由深黄色变成淡绿色；在 tri-HCl 缓冲溶液 (pH 7.4) 中加入 Zn^{2+} 后，荧光强度增大 5 倍，而对 Ag^+ 没有识别作用。在 pH 6-8 之间，**A1** 的荧光强度受 pH 的影响不大。

参考文献

- [1] Yoshida, K.; Mori, K.; Watanabe, S.; Kawai, H.; Nagamura, T. Synthesis and metal ion-sensing properties of fluorescent PET chemosensors based on the 2-phenylicidazo[5,4- α]anthraquinone chromophore. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1999, 393-397.
- [2] 袁履冰主编, 有机化学, 北京: 高等教育出版社, 1999.
- [3] 高崑玉主编, 精细化学品分析, 北京: 化学工业出版社, 2002.
- [4] Choi, K.; Hamilton, A. D. A Dual Channel Fluorescence Chemosensor for Anions Involving Intermolecular Excited State Proton Transfer. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2001, 40, 3912-3915.
- [5] Zhang, X.; Guo, L.; Wu, F.-Y.; Jiang, Y.-B. Development of Fluorescent Sensing of Anions under Excited-State Intermolecular Proton Transfer Signaling Mechanism. *Org. Lett.*, 2003, 5, 2667-2670.
- [6] Beltramello, M.; Gatos, M.; Mancin, F.; Tecilla, P.; Tonellato, U. A new selective fluorescence chemosensor for Cu(II) in water. *Tetrahedron Lett.*, 2001, 42, 9143-9146.
- [7] Hirano, T.; Kikuchi, K.; Urano, Y.; Higuchi, T. Highly zinc-selective fluorescent sensor molecules suitable for biological applications. *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, 122, 12399-12400.
- [8] De Silva, A. P.; Gunaratne H. Q. N.; McCoy, C. P. Molecular photoionic AND logic gates with bright fluorescence and “off-on” digital action. *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, 119, 7891-7892.
- [9] De Silva, A. P.; de Silva, S. A. Fluorescent signaling crown ethers: switching on of fluorescence by alkali metal ion recognition and binding in situ. *J. Chem. Soc. Chem. Comm.*, 1998, 1709-1717.

第七章 结 论

1. 基于碳酐酶 (CA) - 芳香磺酰胺抑制剂相互作用的原理, 设计合成了丹磺酰胺荧光分子探针 **D1**、**D2** 和 **D3**。其中, 化合物 **D2** 在生理条件下 (pH 7.4), $\lambda_{ex} = 334\text{nm}$, $\lambda_{em} = 540\text{nm}$ 。加入 Zn^{2+} 后, λ_{ex} 基本不变, λ_{em} 蓝移到 520nm, 荧光强度增大近 4 倍。表观解离常数 (K_d) 在纳摩尔范围内, 在生物体系应用中具有足够的敏感性。另外, 多种生物体中重要的金属离子对 **D2** 的荧光没有影响, 如 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 等。 Zn^{2+} -**D2** 络合物的荧光强度受 pH 变化的影响不大, 特别是在 pH 6-9 之间影响很小。**D2** 的光物理性质表明它是一种对 Zn^{2+} 有特殊选择性的荧光探针。
2. 设计合成了三个以 4-氨基-1,8-萘酰亚胺为荧光团的化合物 **N1**、**N2** 和 **N3**。以 DPA 为识别基团, 氨乙基为连接基的荧光分子探针 **N2** 在 tris-HCl 的中性缓冲溶液中能够高灵敏度性和高选择性地络合促进荧光增强识别 Zn^{2+} 。在此基础上, 实现了该探针对活细胞中 Zn^{2+} 的荧光成像检测。探针分子 **N3** 在酸性条件下的荧光强度是碱性条件下的 27 倍, 说明 **N3** 是一个潜在的大范围的氢质子荧光分子开关。
3. 设计合成了三个 4 位不同取代基 1, 8-萘酰亚胺为荧光母体, DPA 为识别基团的化合物 **N4**、**N5** 和 **N6**。其中 **N4** 和 **N5** 是高灵敏性和高选择性识别 Zn^{2+} 荧光分子探针, 并利用分子内氢键进一步解决了光诱导电子转移类 Zn^{2+} 荧光分子探针对 pH 敏感的问题。通过量子化学计算提出, 由于 DPA 上 N 原子的质子化和吡啶环上的 N 原子形成氢键后连接其它邻近 C 原子所构成的五元环结构分散了 H^+ 的正电荷, 使识别基团与荧光团之间的 PET 过程在 $pH < pK_a$ 时仍然能够缓慢发生, 从而使荧光团荧光恢复的程度大大减小。DPA 上的吡啶氮原子继续质子化, 破坏了与叔氮之间的氢键, 叔氮转而与酰胺上的氧原子形成氢键, 与其它 C 原子连接得到了一个七元环结构, 由于 ICT, 使荧光团出现了淬灭现象。水溶液中, **N4** 和 **N5** 相对 H^+ , 对 Zn^{2+} 表现出良好的选择性荧光增强, 此类 PET 荧光分子探针尚未见文献报道。理论计算表明, 分子内氢键可抑制 H^+ 对荧光强度的影响, 这为 PET 探针克服 H^+ 的影响提供了一个全新的思路。

4. 设计合成了以 BODIPY 为荧光母体, DPA 为识别基团的荧光分子探针 **B1**。**B1** 能够在水溶液中对 Zn^{2+} 表现出特殊选择性和纳摩尔级敏感性。 $pK'a$ 低至 2.1, 是目前所发现 $pK'a$ 最低的 Zn^{2+} 荧光探针, **B1**- Zn^{2+} 络合物的荧光强度在 pH 宽达 3-10 范围内不受 H^+ 的影响。活细胞内荧光显微成像表明该探针能够穿透细胞并反映细胞内 Zn^{2+} 的分布状况。
5. 设计合成了 2-苯基咪唑蒽醌为荧光母体的化合物 **A1** 和 **A2**。化合物 **A1** 在甲醇—四甲基氢氧化铵溶液和 tri-HCl 缓冲溶液中分别对 Ag^+ 和 Zn^{2+} 有很好的选择性识别。在甲醇—四甲基氢氧化铵溶液中, 加入 Ag^+ 使 **A1** 的荧光淬灭 80%, 最大吸收光谱蓝移 8nm, 并且溶液颜色由深黄色变成淡绿色; 在 tri-HCl 缓冲溶液 (pH 7.4) 中加入 Zn^{2+} 后, 荧光强度增大 5 倍, 而对 Ag^+ 没有识别作用。在 pH 6-8 之间, **A1** 的荧光强度受 pH 的影响不大。

创新点摘要

1. 设计合成了不同荧光母体、二(2-吡啶甲基)胺(DPA)为主要识别基团的化合物 **D1-D3**、**N1-N6**、**A1**、**A2** 和 **B1**，均未见文献报道。其中，**N2** 和 **B1** 是在 tris-HCl 的中性缓冲溶液中能够高灵敏度地、选择性络合促进荧光增强识别 Zn^{2+} 的荧光分子探针。在此基础上，实现了这两个探针对活细胞中 Zn^{2+} 的荧光成像。 pK_a 低至 2.1，是目前所发现 pK_a 最低的 Zn^{2+} 荧光探针。
2. 水溶液中，**N4** 和 **N5** 相对 H^+ ，对 Zn^{2+} 表现出良好的选择性荧光增强，此类 PET 荧光分子探针尚未见文献报道。理论计算表明，分子内氢键可抑制 H^+ 对荧光强度的影响，这为 PET 探针克服 H^+ 的影响提供了一个全新的思路。

附录 攻读博士期间论文发表情况

1. Jiangli Fan, Yunkou Wu, and Xiaojun Peng. A Naphthalimide Fluorescent Sensor for Zn^{2+} Based on Photo-induced Electron Transfer. *Chemistry Letters*, 2004, 33, 1392-1393.
2. Jiangli Fan, Xiaojun Peng, Yunkou Wu, Erhu Lu, Jun Hou, Hongbing Zhang, Rong Zhang, and Xinmei Fu. A New PET Fluorescent Sensor for Zn^{2+} , *Journal of Luminescence*. (in press, LUMIN 8139)
3. Jiangli Fan, Xiaojun Peng, Yunkou Wu, Jun Hou. Fluorescent Zn^{2+} Sensors based on PET with Intramolecular Hydrogen Bonding and Charge Delocalisation. *229th ACS National Meeting*, San Diego, CA, March 13-17, 2005.
4. Yunkou Wu, Xiaojun Peng, Binchen Guo, Jiangli Fan, Zhichao Zhang, Jingyun Wang, Aijun Cui and Yunling Gao. Boron Dipyrromethene Fluorophore Based Fluorescence sensor Suitable for the Selective Imaging of $Zn(II)$ in Living Cells. *Organic & Biomolecular Chemistry*, accepted.
5. Erhu Lu, Xiaojun Peng, Fengling Song, Jiangli Fan. A novel fluorescent sensor for triplex DNA, *Bioorganic&Medical Chemistry Letters*, 2005, 15, 255-257.
6. Xiaojun Peng, Fengling Song, Erhu Lu, Yanan Wang, Wei Zhou, Jiangli Fan and Yunling Gao. Heptamethine Cyanine Dyes with Large Stokes Shift and Strong Fluorescence: A Paradigm for Exited-State Intramolecular Charge Transfer, *Journal of American Chemical Society*, accepted.
7. Feng Shi, Hong Yang Li, Xiao Jun Peng*, Rong Zhang, Xiao Qiang Chen, Jiang Li Fan, Jing Nan Cui, Li Cheng Sun, Synthesis and Characterization of Two Novel High Valent Dinuclear Complexes with a Triphenolate Ligand Bearing Functional Groups, *Chinese Chemical Letters*, 2005, 16, 89-92.
8. Feng Shi, Hong Yang Li, Xiao Jun Peng*, Rong Zhang, Xiao Qiang Chen, Jiang Li Fan, Li Cheng Sun, Synthesis and Photochemical Properties of a New Substituted Phenol Covalently Linked to Ruthenium (II) Tris-bipyridine Containing Four Ester Groups as Sensitizer, *Chinese Chemical Letters*, 2004, 15, 1407-1410.
9. Zhiping Jin, Jiangli Fan, Xiaojun Peng, Licheng Sun. Femtosecond optical molecular switches, *The proceeding of the 2nd International Conference on Functional Molecules. (KFM 2003)* Dalian University of Technology press. p21-23.
10. 施峰, 李宏洋, 彭孝军, 陈小强, 张蓉, 王东平, 樊江莉, 孙立成. 一种 PS II 给体模型化合物的合成和性能, *高等学校化学学报*, 2004, 25, 1666-1672.
11. 樊江莉, 彭孝军, 吴云扣, 卢二虎, 施峰. 丹磺酰胺为染料母体的 Zn^{2+} 荧光探针合成及光谱性能, *染料与染色会议论文暨信息发布会论文集*, 2004, p53-55.
12. 樊江莉, 彭孝军, 吴云扣, 高尚. 生物应用 Zn^{2+} 荧光探针研究进展, *化学研究与应用*, 已接收.
13. 樊江莉, 彭孝军. 手性树枝状分子催化剂, *化学通报*, 2003, 66, W093.

致 谢

感谢国家科学基金(20128005, 20376010)和教育部基金(2472012)。

在历时三年半的博士研究生学习即将结束之际,我想感谢我身边所有帮助过我的人们。

首先感谢我的导师彭孝军教授,将我带入荧光分子探针这样一个崭新的领域。彭老师丰富扎实的理论知识、严谨求实的科学态度、永不言败的精神面貌、谦和朴实的处世原则和舍己奉公的崇高思想都是我今后学习工作中的榜样。彭老师对整个论文工作投入了大量心血,在此,向彭老师表示衷心的感谢和崇高的敬意!

感谢张蓉老师、张红兵老师、傅新梅老师和靳昆老师在测试当中给予的帮助!

感谢大连化学物理研究所韩克利教授和王洪明同学在计算化学方面给予的帮助。同样感谢高岩同学在理论计算工作中参与了讨论。

感谢张志超老师和王静云老师在生物测试工作中的帮助。

感谢吴云扣师弟参加了部分实验工作,并在论文写作期间的大力支持。感谢李宏洋、施峰、卢二虎、宋峰玲、陈秀英、高尚、王欣和张丽珠以及其他同组的师弟师妹们在论文期间对我工作的支持。

特别感谢我的父母和我的亲人们!

感谢每一位关心和支持我的人们!

樊江莉

2005.3

大连理工大学学位论文版权使用授权书

本学位论文作者及指导教师完全了解“大连理工大学硕士、博士学位论文版权使用规定”，同意大连理工大学保留并向国家有关部门或机构送交学位论文的复印件和电子版，允许论文被查阅和借阅。本人授权大连理工大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，也可采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编学位论文。

作者签名: 樊江菲

导师签名: 彭彦军

2005 年 4 月 20 日