



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104830314 A

(43) 申请公布日 2015. 08. 12

(21) 申请号 201510207599. 0

(22) 申请日 2015. 04. 29

(71) 申请人 西北大学

地址 710069 陕西省西安市太白北路 229 号

(72) 发明人 李剑利 库梦尧 薛智凤 金洗郎
史真

(74) 专利代理机构 西安西达专利代理有限责任
公司 61202

代理人 谢钢

(51) Int. Cl.

C09K 11/06(2006. 01)

C07D 491/052(2006. 01)

G01N 21/64(2006. 01)

A61K 49/00(2006. 01)

权利要求书1页 说明书6页 附图5页

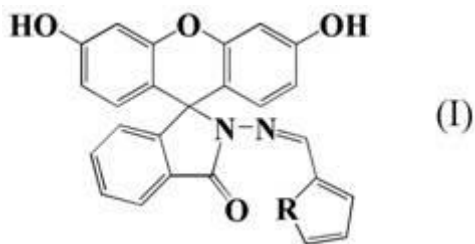
(54) 发明名称

呋喃、噻吩基荧光素型 OCl^- 荧光探针及其制备方法与应用

(57) 摘要

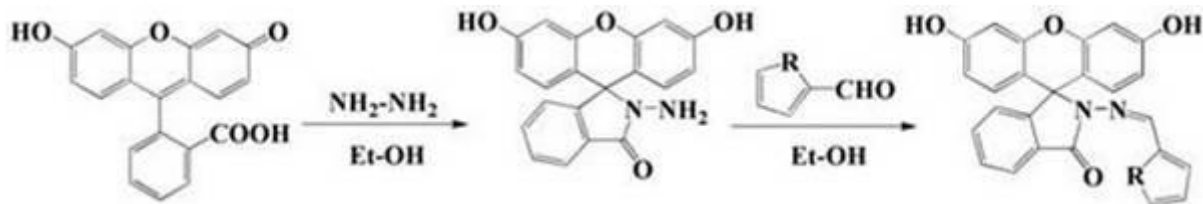
本发明涉及一类经呋喃、噻吩基修饰的能够用于检测 OCl^- 的荧光素型荧光探针, 本发明的荧光素型荧光探针利用不可逆的 OCl^- 的氧化作用来实现荧光由关到开的转变, 具有高选择性和高灵敏性等优点。可应用于自来水中 OCl^- 的检测及荧光共聚焦成像, 可作为一种潜在的能够应用于饮用水中病原体定性分析及 OCl^- 饮用水灭菌的作用机理研究的工具。

1. 结构通式(I)所示的化合物,



其中 R 为 S 或 O。

2. 权利要求 1 所述化合物的制备方法,其特征在于包含如下步骤:



(1) 在乙醇溶剂中,荧光素和水合肼反应得到荧光素酰肼;

(2) 在乙醇溶剂中,将荧光素酰肼和 2-呋喃甲醛或 2-噻吩甲醛反应即可得到目标产物。

3. 权利要求 1 所述化合物在检测 OC1^- 中的应用。

4. 权利要求 1 所述化合物在检测细胞中 OC1^- 的应用。

5. 权利要求 1 所述化合物在检测环境中 OC1^- 的应用。

呋喃、噻吩基荧光素型 OCl^- 荧光探针及其制备方法与应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种呋喃、噻吩基荧光素型 OCl^- 荧光探针及其制备方法与其在水体中 OCl^- 检测方面的应用。

背景技术

[0002] 次氯酸盐作为世界上最早的杀菌剂,1827 年,英国就已经开始使用次氯酸盐对环境进行消毒。含氯杀菌谱广,合成工艺简单,价格低廉、毒性低,在防止感染方面具有重要的作用,因而被广泛应用。含氯消毒剂对结核杆菌和非典型结核分枝杆菌有较强的杀灭作用。研究发现,在通常状况下,使用浓度为 141ppm 该溶液作用 1 分钟,可使金黄色葡萄球菌以 10^{-6} – 10^{-7} 的指数速率递减,还能够在 2.5 min 内使枯草杆菌黑色变种芽孢以 10^{-6} 的指数速率递减。然而,一旦次氯酸的使用浓度超过 10^{-5} – 10^{-2} M 的水平,高浓度的次氯酸盐溶液就会成为一种潜在的污染物,危害植物、动物甚至人类。生物体内源性次氯酸主要是通过单核巨噬细胞与中性粒细胞中的髓过氧化物酶 (myeloperoxidase, MPO) 催化产生。在 MPO 酶的存在下,过氧化氢与氯化铁反应产生次氯酸。HOCl 作为一种中性小分子,具有极强的氧化性,可以自由穿过细胞膜,在机体免疫系统起着重要的作用。HOCl 能够渗入病毒体与细菌体内,与蛋白质、核酸等发生氧化反应进而起到杀死病原微生物的作用。但是,如果出现 MPO 酶催化产生的 HOCl 过量,超过局部抗氧化剂的所需量,将导致氧化过激甚至氧化性细胞损伤。经证实,过量 HOCl 引起的氧化过激会导致白血病、肾炎、肿瘤、动脉粥样硬化等疾病。

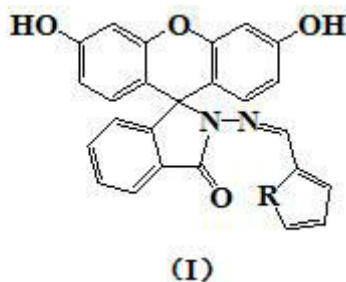
[0003] 基于 HOCl 在病理及生理过程中的重要作用,发展高性能的检测 HOCl 的方法,能够为进一步研究其在生物学过程中的细胞和分子事件提供探测工具,为疾病的发病机制、诊断及干预的研究提供可靠信息,具有重要意义。针对这种情况,大量的检测方法,比如比色法、荧光法、电化学法、色谱法被大量的设计,但是几乎所有的这些方法都还没有被真正用于生物学体系中的次氯酸检测。相反,基于各种成像方法基础上的荧光探针技术由于其具有灵敏、快捷、良好的实时性而备受科研工作者的关注。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种呋喃、噻吩基荧光素型 OCl^- 荧光探针及其制备方法,与其在自来水中 OCl^- 的检测及细胞荧光共聚焦成像中的应用。

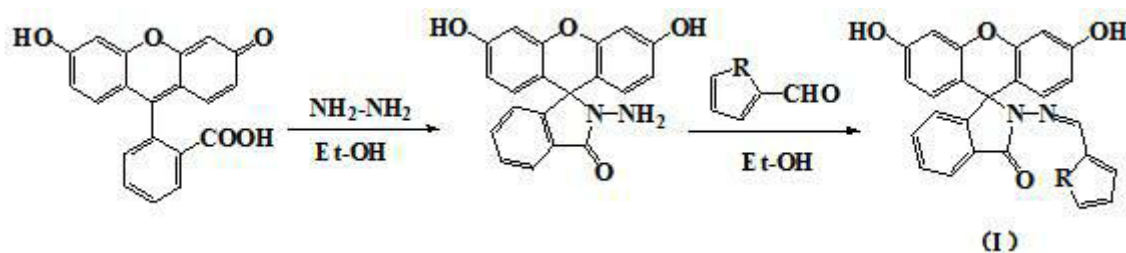
[0005] 本发明的实现过程如下:

一种呋喃、噻吩基荧光素型 OCl^- 荧光探针,其结构通式如(I)所示:



其中 R 为 S 或 O。

[0006] 所述的荧光探针的制备方法,包含如下步骤:



(1) 在乙醇溶剂中,荧光素和水合肼反应得到荧光素酰肼;(2) 在乙醇溶剂中,将步骤(1)所得到的荧光素酰肼和 2-呋喃甲醛或 2-噻吩甲醛反应即可得到目标产物。

[0007] 所述的荧光探针的制备方法,包含如下步骤:

(1) 将 6g 荧光素溶于 60mL 无水乙醇中,加入 8mL 水合肼,加热回流 12 小时,反应液冷却后减压去除溶剂,调节 pH 至 4-5,再用氢氧化钠溶液调节至 pH = 9,抽滤、洗涤、干燥,即得荧光素酰肼;

(2) 在搅拌作用下,将步骤(1)所得荧光素酰肼溶于无水乙醇,及收入溶有 2-呋喃甲醛或 2-噻吩甲醛的乙醇溶液,其中荧光素酰肼和 2-呋喃甲醛(或 2-噻吩甲醛)的摩尔比为 2:3,回流 8 小时,经冷却、抽滤、重结晶后,得到淡黄色固体。

[0008] 所述的荧光探针在自来水中 OCl^- 的检测及细胞荧光共聚焦成像中的应用。

[0009] 本发明的积极效果:

(1) 本发明所涉及的 OCl^- 荧光探针水溶性较好,光学性质测试溶液为乙醇-PBS (5/5, V/V, pH 7.4);

(2) 本发明方法制备的探针对 OCl^- 具有很高的选择性识别能力和抗干扰能力,具有实时检测性、高选择性;

(3) 适用于生理环境条件下 (PH = 6.6-10) OCl^- 的检测,具有良好的生物学应用前景;

(4) 通过对环境中 OCl^- 的测定,说明该类探针能够用于环境中 OCl^- 的定量测定。

附图说明

[0010] 具有良好的生物学应用前景;通过对环境中 OCl^- 的测定,说明该类探针能够用于环境中 OCl^- 的定量测定。

附图说明

[0011] 图 1 是探针 1b 在不同浓度 OCl^- 存在下的荧光发射光谱图。 $\lambda_{\text{ex}} = 510 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 542 \text{ nm}$, 探针浓度 ($10 \mu\text{mol/L}$), 乙醇-PBS (5/5, V/V, pH 7.4);

图 2 是探针 1b 的荧光强度- OCl^- 浓度线性图。 OCl^- 浓度为 0-10 $\mu\text{mol/L}$, $\lambda_{\text{max}} = 542 \text{ nm}$, 乙醇-PBS (5/5, V/V, pH 7.4);

图 3 是 OCl^- 滴定探针 1a 在不同浓度 OCl^- 存在下的荧光发射图。 $\lambda_{\text{ex}} = 510 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 542 \text{ nm}$, 探针浓度 ($10 \mu\text{mol/L}$), 乙醇-PBS (5/5, V/V, pH 7.4);

图 4 是探针 1a 的荧光强度- OCl^- 浓度线性图。 OCl^- 浓度为 0-10 $\mu\text{mol/L}$, $\lambda_{\text{max}} = 542$

nm, 乙醇-PBS (5/5, V/V, pH 7.4) ;

图 5 是探针 1b 在不同时间下的荧光发射图。 $\lambda_{\text{ex}} = 510 \text{ nm}$, 探针浓度 ($10 \mu\text{mol/L}$), OC1^- 浓度 ($30 \mu\text{mol/L}$), 乙醇-PBS (5/5, V/V, pH 7.4) ;

图 6 是探针 1a 在不同时间下的荧光发射图。 $\lambda_{\text{ex}} = 510 \text{ nm}$, 探针浓度 ($10 \mu\text{mol/L}$), OC1^- 浓度 ($30 \mu\text{mol/L}$), 乙醇-PBS (5/5, V/V, pH 7.4) ;

图 7 是探针 1b 在不同 PH 值下的荧光发射图。 $\lambda_{\text{ex}} = 510 \text{ nm}$, 探针浓度 ($10 \mu\text{mol/L}$), OC1^- 浓度 ($50 \mu\text{mol/L}$), 乙醇-PBS (5/5, V/V) ;

图 8 是探针 1a 在不同 PH 值下的荧光发射图。 $\lambda_{\text{ex}} = 510 \text{ nm}$, 探针浓度 ($10 \mu\text{mol/L}$), OC1^- 浓度 ($50 \mu\text{mol/L}$), 乙醇-PBS (5/5, V/V) ;

图 9 是探针 1b 在 OC1^- 及其它离子存在下的荧光发射强度变化图 $\lambda_{\text{ex}} = 510 \text{ nm}$, 探针浓度 ($20 \mu\text{mol/L}$), OC1^- 浓度 ($10 \mu\text{mol/L}$), 其它离子浓度 ($100 \mu\text{mol/L}$), 乙醇-PBS (5/5, V/V, pH 7.4) ;

图 10 是探针 1a 在 OC1^- 及其它离子存在下的荧光发射强度变化图 $\lambda_{\text{ex}} = 510 \text{ nm}$, 探针浓度 ($20 \mu\text{mol/L}$), OC1^- 浓度 ($10 \mu\text{mol/L}$), 其它离子浓度 ($100 \mu\text{mol/L}$), 乙醇-PBS (5/5, V/V, pH 7.4) ;

图 11 是探针 1b 对 OC1^- 的检测机理图 ;

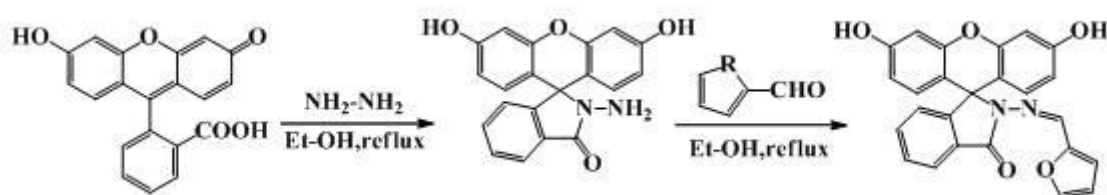
图 12 是探针 1b 在环境中检测 OC1^- 的荧光发射图谱。 $\lambda_{\text{ex}} = 510 \text{ nm}$, 探针浓度 ($10 \mu\text{mol/L}$), OC1^- 浓度 ($30 \mu\text{mol/L}$) ;

图 13 是探针 1a 在环境中检测 OC1^- 的荧光发射图谱。 $\lambda_{\text{ex}} = 510 \text{ nm}$, 探针浓度 ($10 \mu\text{mol/L}$), OC1^- 浓度 ($30 \mu\text{mol/L}$)。

具体实施方式

[0012] 为了更加清楚的理解本发明, 下面通过具体实施例对本发明做进一步的详细描述。

[0013] 实施例 1 : 探针 1a 的合成 :



a、荧光素酰肼的合成 : 在 250 mL 圆底烧瓶中加入 6.00g 荧光素, 60 mL 无水乙醇使其溶解, 缓慢滴加 8.0 mL 水合肼, 约 30 分钟加完。加热至 80°C 回流 12 小时, 反应过程中颜色逐渐变淡, 最终由绿色变为淡绿色直至橘黄色, 反应完毕后, 冷却至室温, 减压去除溶剂。加入 500 mL 水, 调节 pH 至 4-5 左右。再用氢氧化钠溶液调节至 $\text{pH} = 9$, 有大量白色或者淡黄色固体析出。抽滤, 用水洗涤固体数次, 干燥, 得白色固体 5.1 g。产率为 81.2%。熔点 : $262-264^{\circ}\text{C}$ 。

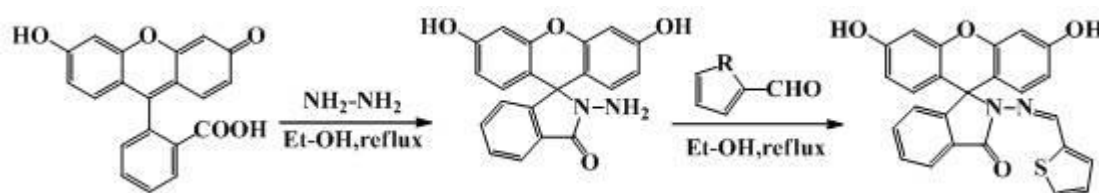
[0014] b、探针 1a 的合成 : 在 100 mL 圆底烧瓶中加入荧光素酰肼 (10 mmol , 3.46g), 50 mL 无水乙醇, 搅拌下, 滴加溶有 2-呋喃甲醛 (15 mmol , 1.44 g) 的乙醇溶液, 约 10 分钟滴加完毕, 加热回流 8 小时。TLC 监测反应完毕, 将反应液冷却至室温, 析出大量固体, 抽滤, 用少量无水乙醇洗涤数次, 取固体, 乙醇重结晶, 即可得到浅黄色固体 3.44 g。产率 : 81.13%。

[0015] ^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.93 (s, 2H), 8.97 (s, 1H), 7.89 (d, $J = 7.1$ Hz, 1H), 7.73 (s, 1H), 7.58 (t, $J = 7.8$ Hz, 2H), 7.06 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 6.83 (d, $J = 3.0$ Hz, 1H), 6.64 (s, 2H), 6.54 (d, $J = 4.5$ Hz, 2H), 6.51 (s, 1H), 6.46 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H).

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO) δ : 169.1, 163.7, 157.1, 156.2, 154.2, 150.7, 144.7, 139.2, 134.2, 133.3, 128.8, 128.3, 120.3, 117.5, 115.1, 107.8, 70.41. IR (cm^{-1}): 3332.4, 1692.2, 1631.8, 1612.8, 1587.9, 1478.8, 1334.7, 1313.7, 1182.9, 935.5, 753.3.

MS (ESI) $m/z = 447.0968$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, calc. for $\text{C}_{25}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_5 = 424.1059$.

实施例 2: 探针 1b 的合成:



a、荧光素酰肼的合成: 荧光素酰肼的合成方法同实施例 1

b、探针 1b 的合成: 在 100 mL 圆底烧瓶中加入荧光素酰肼 (10 mmol, 3.46g), 50 mL 无水乙醇, 搅拌下, 滴加溶有 2-噻吩甲醛 (15 mmol, 1.68 g) 的乙醇溶液, 约 10 分钟滴加完毕, 加热回流 8 小时。TLC 监测反应完毕, 将反应液冷却至室温, 析出大量固体, 抽滤, 用少量无水乙醇洗涤数次, 取固体, 乙醇重结晶, 即可得到浅黄色固体 3.34 g。产率: 75.95%。

[0016] ^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.91 (s, 2H), 9.19 (s, 1H), 7.90 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 7.72 - 7.49 (m, 3H), 7.32 (d, $J = 3.2$ Hz, 1H), 7.13 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 7.07 - 6.96 (m, 1H), 6.65 (d, $J = 1.9$ Hz, 2H), 6.55 - 6.35 (m, 4H).

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO) δ : 164.7, 159.7, 153.5, 151.5, 145.6, 140.9, 135.2, 132.5, 129.1, 125.0, 124.4, 113.5, 111.2, 103.7, 66.6. IR (cm^{-1}): 3418.2, 2923.8, 2852.7, 2360.3, 1683.7, 1631.8, 1611.9, 1504.3, 1446.0, 1343.1, 1179.2, 1109.1, 994.2, 848.3, 712.3.

MS (ESI) $m/z = 463.0722$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, calc. for $\text{C}_{25}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_4\text{S} = 440.0831$.

实施例 3: OC1^- 对探针 1b 的滴定实验

由图 1 可以看出由于内酯式结构的存在, 探针本身没有荧光。当固定探针 1b 的浓度为 $10 \mu\text{mol/L}$ 时, 随着 OC1^- 的加入, 荧光强度逐渐增强。当 OC1^- 浓度在 $20 \mu\text{mol/L} \sim 50 \mu\text{mol/L}$ 时, 探针 1b 的在 542 nm 下的荧光强度增强明显。当 OC1^- 浓度大于 $50 \mu\text{mol/L}$ 时, 荧光强度基本饱和。图 2 可以看出探针 1b 在 OC1^- 浓度为 $0 \sim 10 \mu\text{mol/L}$, 具有很好的线性关系, 可以将其用于定量的测定 OC1^- 浓度。

[0017] 实施例 4: OC1^- 对探针 1b 的响应时间测定

图 5 可以看出, 固定探针浓度为 $10 \mu\text{mol/L}$, OC1^- 的浓度为 $30 \mu\text{mol/L}$, 对其不同时间下的荧光性能进行检测, 荧光强度急剧增大, 在数分钟后, 几乎达到最大值。这, 说明了探针 1b 具有对 OC1^- 实时监测的特点。

[0018] 实施例 5: pH 对探针 1b 识别 OC1^- 的影响

如图 7, 当不添加 OC1^- 时, 探针对 pH 的响应非常弱, 但随着 OC1^- 的加入, 在 $\text{pH} = 6.6 \sim 10.0$

下荧光强度达到最大,且变化较小。因此,该类探针能够应用于 pH=6.6–10.0 的体系中。

[0019] 实施例 6 :OC1⁻对探针 1a 的滴定实验

OC1⁻对探针 1a 的滴定实验研究方法同实施例 3 中,由图 3 可以看出当 OC1⁻浓度在 20 $\mu\text{mol/L}$ ~50 $\mu\text{mol/L}$ 时,探针 1a 的在 542 nm 下的荧光强度增强明显。当 OC1⁻浓度大于 50 $\mu\text{mol/L}$ 时,荧光强度基本饱和。图 4 可以看出探针 1a 在 OC1⁻浓度为 0–10 $\mu\text{mol/L}$,具有很好的线性关系,可以将其用于定量的测定 OC1⁻浓度。

[0020] 实施例 7 :OC1⁻对探针 1a 的响应时间测定

同实施例 4,图 6 可以看出探针 1a 可以达到瞬时响应且迅速饱和,探针 1a 可以对 OC1⁻实时监测。

[0021] 实施例 8 :pH 对探针 1a 识别 OC1⁻的影响

同实施例 5,图 8 表明探针 1a 能够应用于 pH=6.6–10.0 的体系中,推测识别机理如图 11。

[0022] 实施例 9 :探针 1b 对 OC1⁻识别的专一性和抗干扰性研究

本发明中固定探针浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$,加入干扰物质为 1: blank; 2: SO_4^{2-} ; 3: PO_4^{3-} ; 4: CO_3^{2-} ; 5: CH_3COO^- ; 6: SCN^- ; 7: Cl^- ; 8: ClO_3^- ; 9: ClO_4^- ; 10: IO_3^- ; 11: NO_2^- ; 12: NO_3^- ; 13: SO_3^{2-} ; 14: $\cdot\text{OH}$; 15: H_2O_2 ; 16: O_2^- ; 17: tBuOOH ; 18: ONOO^- ; 19: NO 。图 9 可以看出,(黑色条为探针对各种离子的响应情况,红色条为在 OC1⁻存在条件下,探针对各种离子的响应情况。)探针 1b 除了 NO 有轻微的反应外,其他离子的加入均无反应。在其他干扰物质存在的条件下,对探针检测 OC1⁻的数值未产生较大影响。说明该探针对 OC1⁻的检测具有一定的专一性。

[0023] 实施例 10 :探针 1a 对 OC1⁻识别的专一性和抗干扰性研究

探针 1a 对 OC1⁻识别的专一性和抗干扰实验研究方法同实施例 9,如图 10 所示,说明探针 1a 对 OC1⁻的检测具有一定的专一性。

[0024] 实施例 11 :探针对 OC1⁻识别的专一性和抗干扰性研究

为了探索探针对 OC1⁻的检测机理,以 1b 为例,将探针 1b 与 10 倍的 OC1⁻,在 EtOH–H₂O (V/V, 1:1) 的溶液中室温反应 1h,产物使用 ESI–MS 进行表征,发现出现了 506.9985 (m/z) 的峰,这一结果与机理推测图 11 中所示探针由 1b 向 2b [(2b + ClO)⁻ m/z 507.0423] 转变的结果相吻合。

[0025] 探针推测识别机理如图 11 所示。

[0026] 实施例 12 :探针 1b 检测环境中 OC1⁻的应用研究

本发明中取西北大学的喷泉水、地表水、自来水,测试探针 1b 在这些介质中的对 OC1⁻的检测性能。从图 12,可以看出当不加入 OC1⁻时,探针在这三种介质中均没有荧光响应,但加入 30 $\mu\text{mol/L}$ OC1⁻后,荧光强度均有极为明显的增强。这些结果显示探针 1b 可以应用与比实验室环境复杂很多的环境检测。基于前面图 2 所列举的线性关系,采用标准曲线法对自来水中的 OC1⁻的浓度也进行了检测。得出这三组样品中,OC1⁻浓度为 1.16×10^{-5} , 1.89×10^{-5} , 2.89×10^{-5} mol/L,均高于国际标准 (8.4×10^{-6} mol/L)。为了对这个方法进行验证,对三组样品采用碘量法对其中的 OC1⁻浓度进行了测定,得出浓度为 1.18×10^{-5} , 1.85×10^{-5} , 2.88×10^{-5} mol/L,与使用探针所测得的结果相吻合。因此,所有的结果显示,探针 1b 是一种能够用于环境中定量测定的 OC1⁻探针。

[0027] 实施例 13 : 探针 1a 检测环境中 OC1^- 的应用研究

探针 1a 检测环境中 OC1^- 的应用研究方法及其结果同实施例 12, 如图 13, 结果显示, 探针 1a 是一种可能能够用于环境中定量测定的 OC1^- 探针。

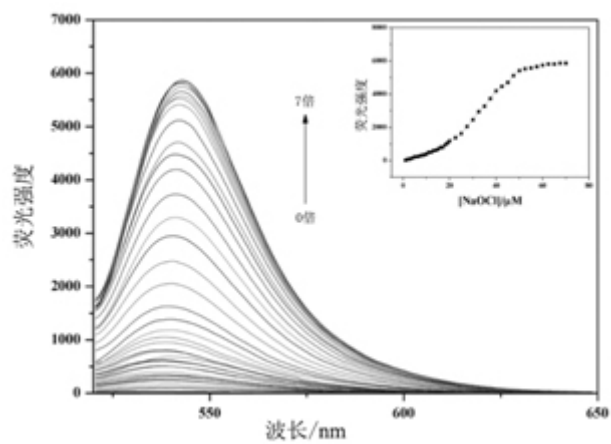


图 1

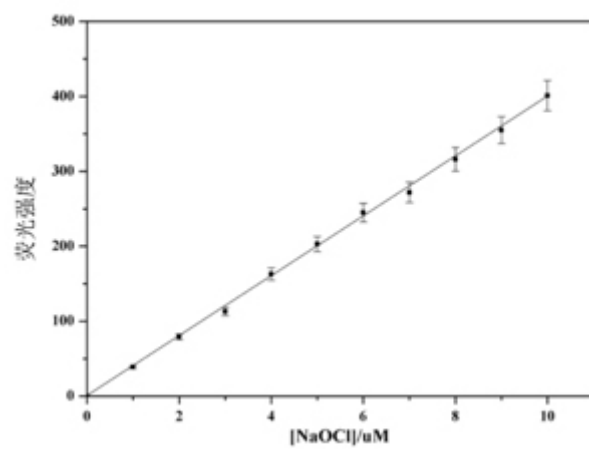


图 2

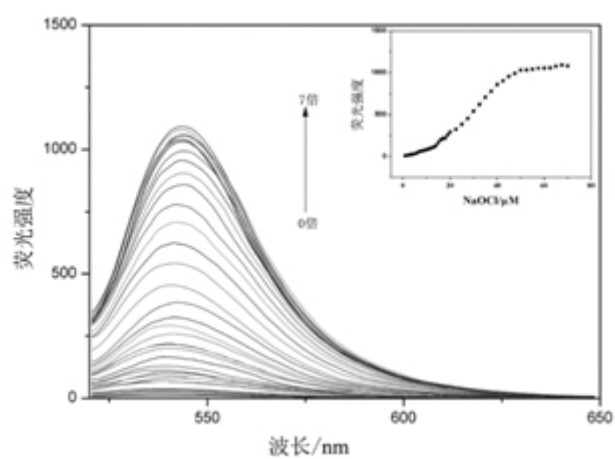


图 3

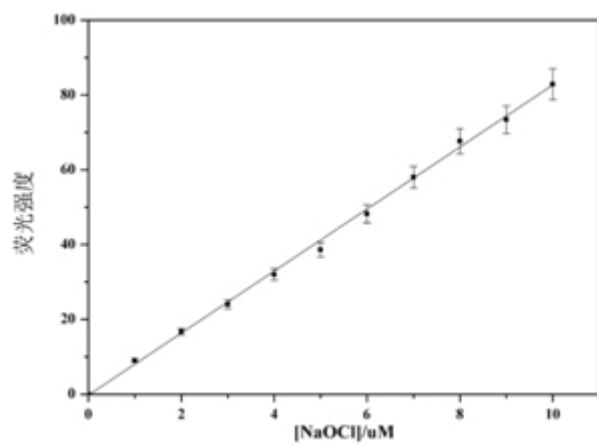


图 4

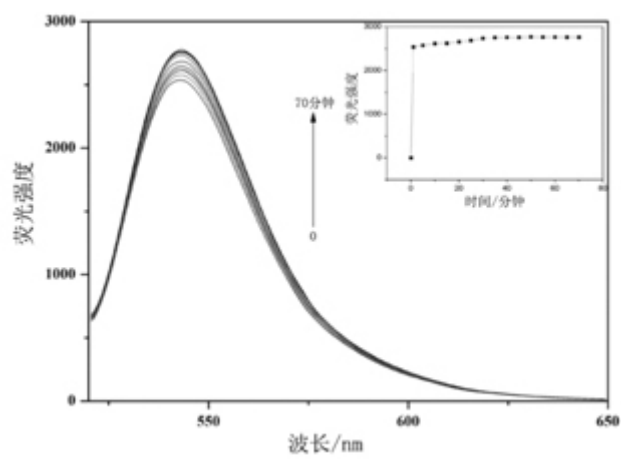


图 5

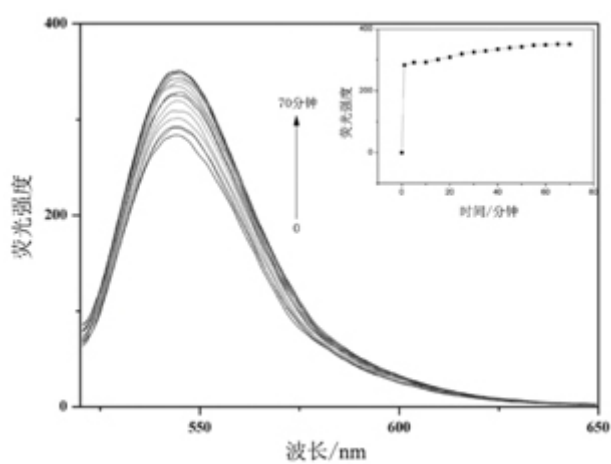


图 6

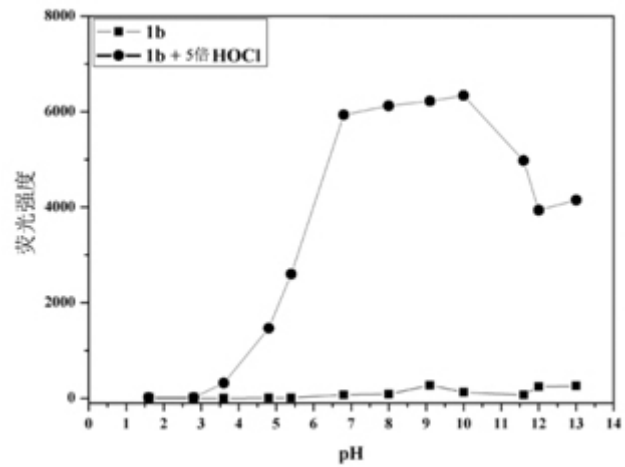


图 7

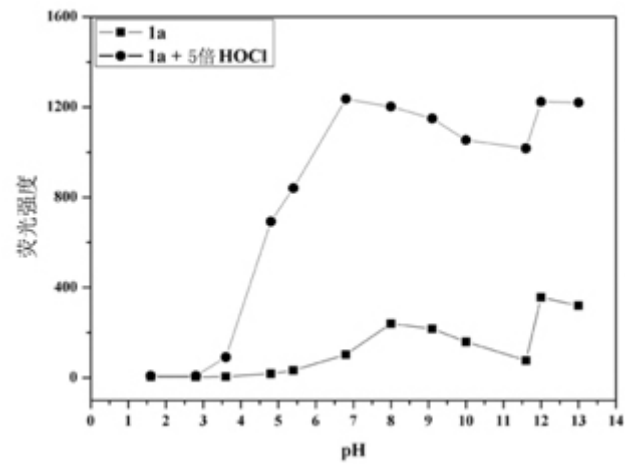


图 8

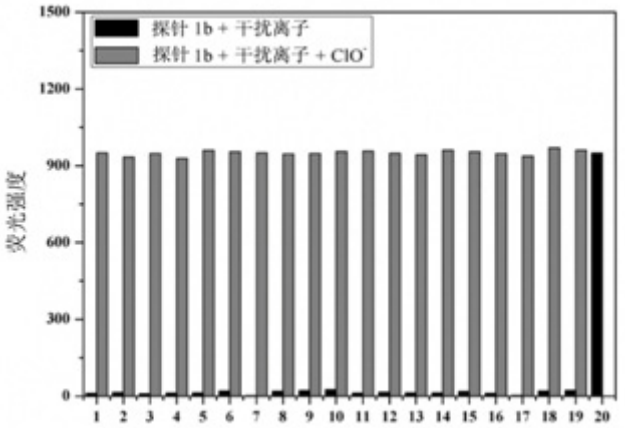


图 9

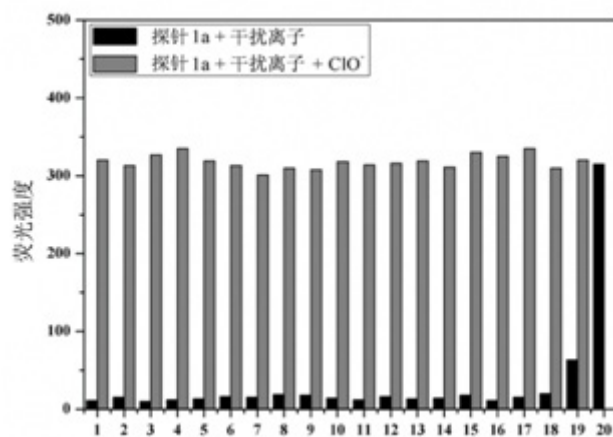


图 10

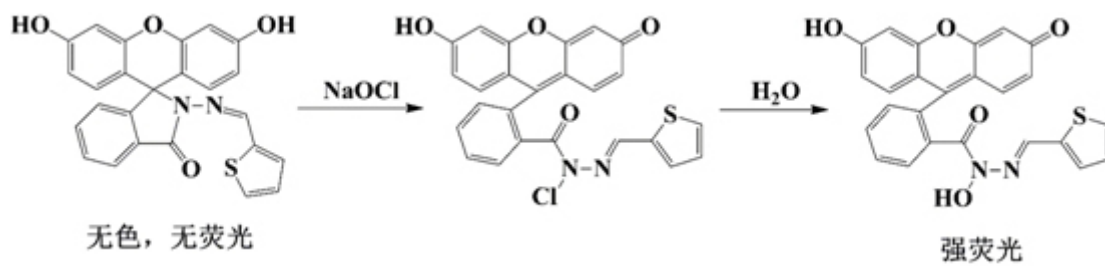


图 11

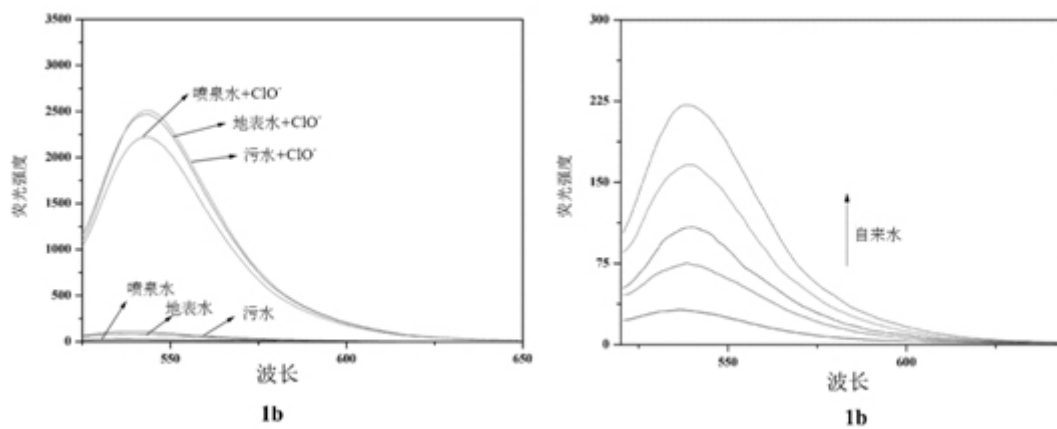


图 12

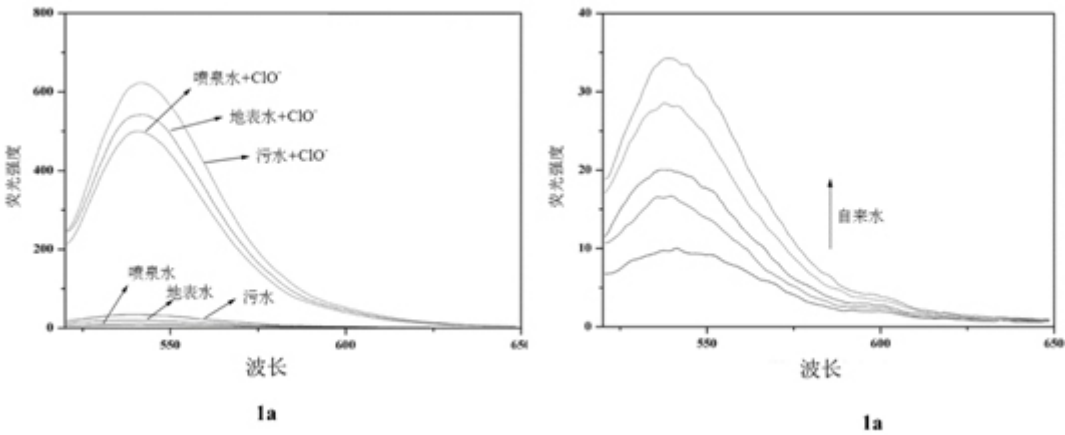


图 13