

Jiang 组^[118]设计了化合物 L(图 3-54),在 L 和锌离子的紫外滴定光谱图上有两个等吸收点 271 nm 和 336 nm,代表相应的配体和锌离子的络合。在 321 nm 处的游离 L 的吸收带位移到 L 和锌离子络合物的 349 nm 处吸收带。产生 28 nm 位移的原因是 L 的氨基喹啉部分上的两个氮原子和锌形成了 5 个螯合环,扩大了共轭环且锌离子和 L 的络合增加了瞬间偶极距,导致在 π 轨道上有更大的电子移动。研究表明络合锌离子荧光增强,而络合其他离子荧光淬灭,配体的最大发射波长在 545 nm 处,锌离子络合物在 469 nm 处,强度大约是配体荧光的 2.4 倍。有文献指出络合过程中同时有 PCT 和 PET 机理存在。

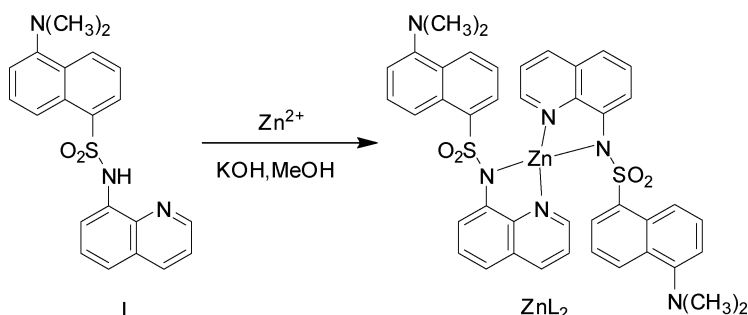


图 3-54 化合物 L 和 Zn^{2+} 配位的反应机理

Tang 组^[119]报道了新的近红外探针 DPA-Cy(图 3-55),DPA-Cy 的吸收峰在 606 nm 处,发射峰在 800 nm 处,有 194 nm 的位移,在乙腈的缓冲溶液中,加入锌离子后立即反应,发射波长蓝移到 780 nm 处,变化不明显,但是荧光量子产率比没有加锌离子时高 20 倍,选择性也非常好。

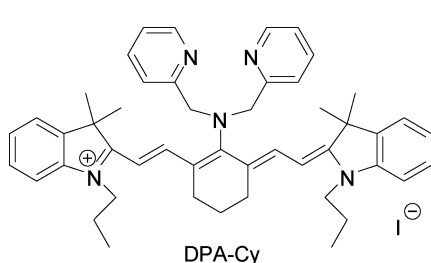


图 3-55 DPA-Cy 的结构式

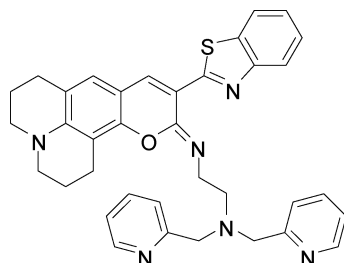


图 3-56 ZnIC 的结构式

Komatsu 组^[120]介绍了用于锌离子比例荧光成像技术的荧光探针 ZnIC(图 3-56),亚氨基香豆素为荧光团,乙胺基-二甲基吡啶胺(DPA)为锌离子

的螯合基,加入锌离子后探针的荧光光谱由 543 nm 处红移到 558 nm 处,被锌离子作用的受体激发态比基态更稳定。F558/F543 由不加锌离子的 0.8 增加到加入锌离子后的 1.9,颜色由绿色变为亮黄色。探针和锌离子的络合过程符合 ICT 机理,含电子供体的荧光团共轭到拉电子基团上,光激发后有从供体到受体的 ICT 过程,大的 Stokes 位移是由瞬间偶极距的变化引起的。

另一个新的近红外荧光材料是东京大学 Nagano 教授课题组设计合成的基于硅基罗丹明的深红到近红外发光荧光探针 7 及其衍生物^[121](图 3-57)。硅基罗丹明相较普通的氧基罗丹明染料具有超过 100 nm 的光谱红移,其吸收与发射峰均位于 650 nm 以上的深红到近红外光区。在该染料基础上设计的开环型探针 7 可以在次氯酸的作用下,生成开环的氧化产物 8,并产生增强型的荧光信号输出。同时,对探针 7 使用荧光显微镜进行了中性粒细胞吞噬异物过程的实时成像监控,证明了这一探针具有良好的生物相容性和快速反应性能。此外,探针 7 具有较好的亲水性,对小鼠腹膜炎模型有良好的成像效果。

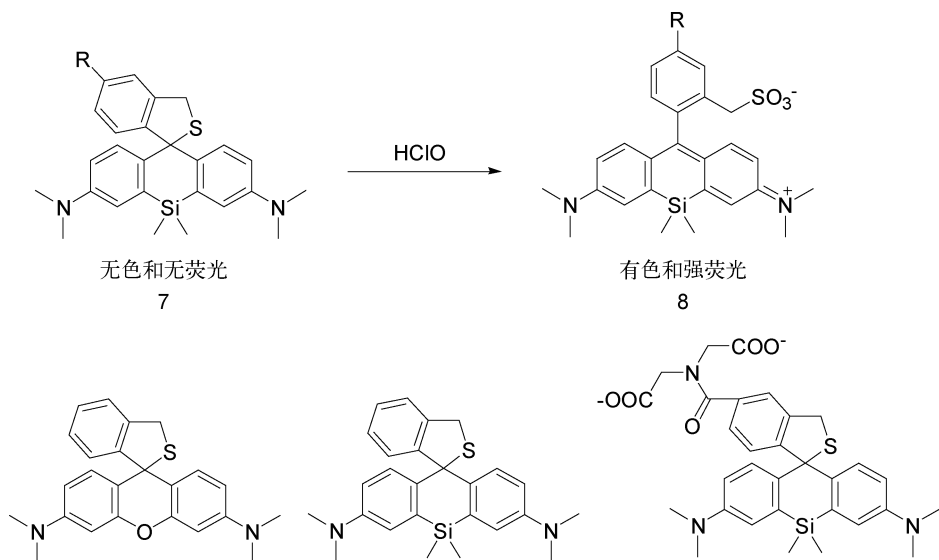


图 3-57 化合物 7 及其衍生物的结构式

Ken-Tsung Wong 等人设计合成了基于螺芴的 PET 探针 9(图 2-16), 探针 9 以螺芴为中心,将电子给体与荧光团组合起来,为 PET 型荧光探针的

结构设计提供了新的策略。

2013年,花建丽教授课题组以具有 AIE 特性的三苯胺-均三嗪化合物为母体,在其基础上进行修饰,连接具有与金属离子结合能力的胸腺嘧啶基团,合成了一个新的红色荧光传感器 24^[122],如图 3-58 所示。经过实验检测,发现化合物 24 对 Hg^{2+} 具有很好的识别作用。在有其他金属离子存在的混合溶液中,该荧光传感器 24 对 Hg^{2+} 仍具有很高的选择性和灵敏度。

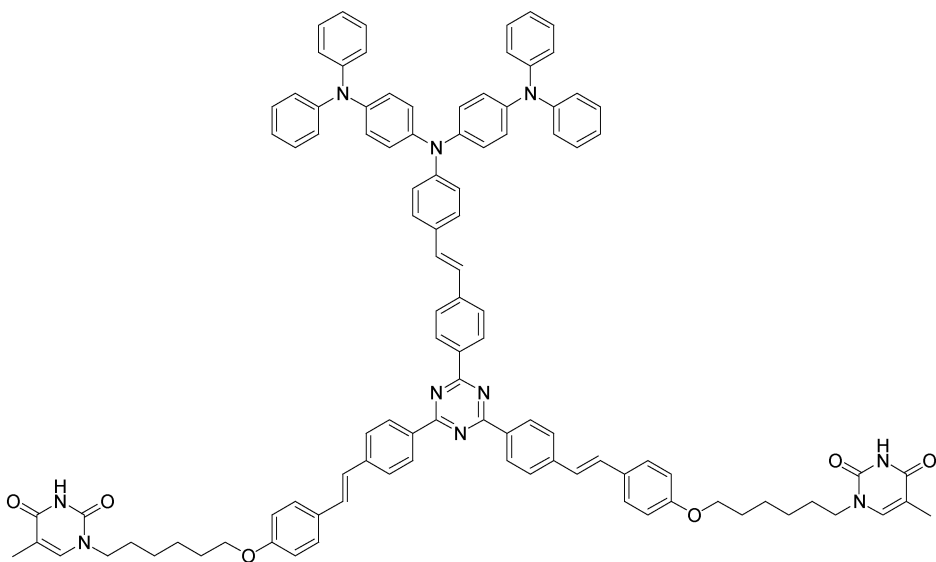


图 3-58 化合物 24 的结构式

唐本忠课题组合成了具有聚集诱导发光特性的化合物 18,该化合物涂在薄层层析硅胶板上,吹干干燥后,在硅胶板上可以看到有荧光。当用氯仿蒸气熏蒸后,硅胶板上的荧光消失,再将溶剂挥发掉之后,发现硅胶板上的荧光重新出现^[123]。该课题组研究的其他 AIE 发光团也可以应用于如二氯甲烷、乙腈、丙酮、四氢呋喃等溶剂中,也可以观察到类似的现象^[124]。

如图 3-59 所示,田禾教授等研究了化合物 25 和 26,它们是具有聚集诱导发光性能的星形三苯胺衍生物,这是首次用新颖的 AIE 活性星形三苯胺化合物组荧光固体薄膜传感器来检测氯气^[125]。该化合物在聚集态时发出很强的荧光,当用氯气熏蒸后,硅胶板上的荧光消失。这种类型的检测为气体荧光化学传感器的分子设计开辟了一条新的道路。

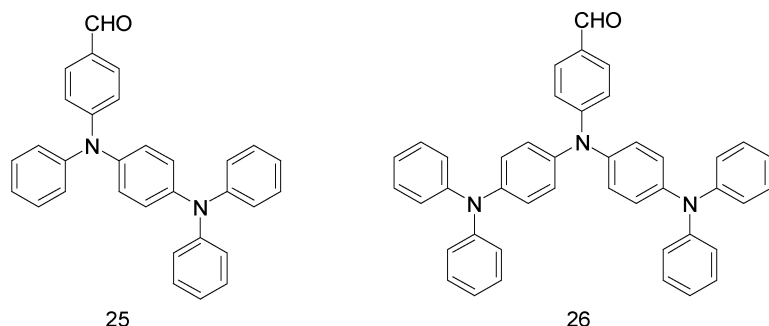


图 3-59 化合物 25 和化合物 26 的结构式

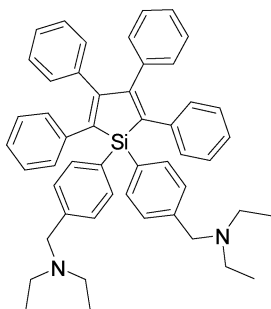


图 3-60 化合物 27 的结构式

聚集诱导发光的聚集物高效荧光发射可以用于探测爆炸物。先通过往四氢呋喃溶液里加纯水制备 HPS 衍生物化合物 27(图 3-60)的纳米聚集态。之后加入苦味酸,发现溶液的荧光慢慢减弱。该化合物 27 能作为一个检测爆炸物的探针^[126]。

2014 年,花建丽教授的课题组在吡咯并吡咯二酮的基础上合成了具有 AIE 特性的化合物 29^[127],如图 3-61 所示。这是一个近红外生物荧光传感器,化合物上连接的季铵盐正电荷可以与带负电荷的牛血清蛋白(BSA)进行静电相互作用,从而实现 BSA 的检测。

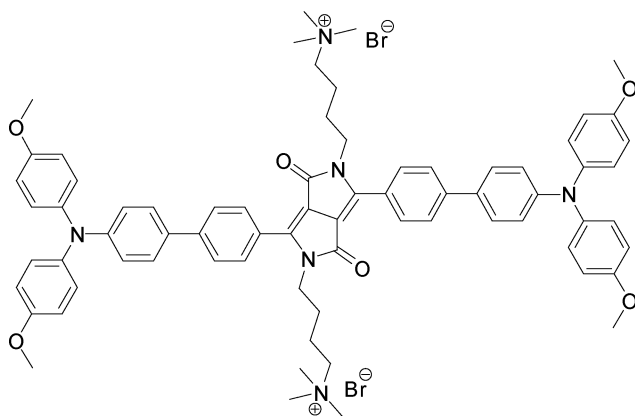


图 3-61 化合物 29 的结构式

2015 年,Gopal Das 等人开发出一个有 AIE 活性的化学传感器 30(图 3-

62), 对焦磷酸阴离子可以进行比色的选择性“接通”和荧光检测^[128]。该化合物对焦磷酸阴离子具有很高的灵敏度和选择性, 并且其选择性不会因为体系中的其他阴离子改变。焦磷酸阴离子诱导可以增强荧光发射, 在 Hela 细胞中可以检测出焦磷酸阴离子。

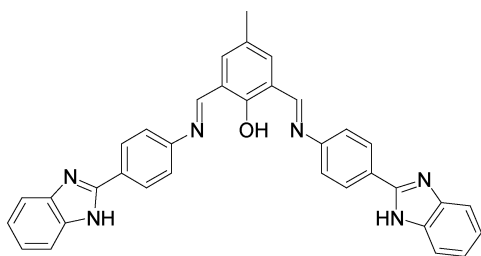


图 3-62 化合物 30 的结构式

Yoon 课题组设计合成了没有荧光的双通道荧光探针化合物 31^[129], 如图 3-63 所示。当它与次氯酸反应后, 生成发出强烈绿色荧光的化合物 32。化合物 31 可应用于中性、酸性及碱性溶液中, 并且在活体动物的黏膜中对次氯酸成功进行了检测。

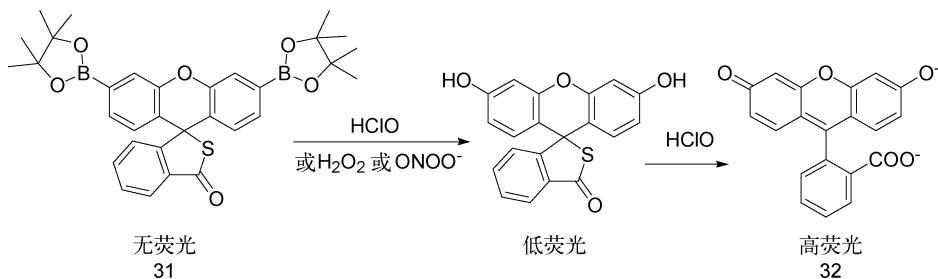


图 3-63 化合物 31 和化合物 32 的结构式

Chang Young-Tae 课题组设计并合成了第一个用于 HClO 检测的双光子荧光探针 33 及其衍生物 34~37^[130], 如图 3-64 所示。这些探针不仅能揭露细胞中次氯酸的分布, 而且在细胞和组织系统中, 能够作为开发次氯酸潜在功能的优秀工具。

通常, 过氧化氢对于细胞来说是有毒的。ROS 在哺乳动物体内的积累会导致氧化应激的条件变宽, 而这会导致细胞衰老和成为疾病的宿主。过氧化氢瞬时产生于多种细胞表面受体的活化, 可以作为在传递信号的信使。因此, 对过氧化氢的定量检测的需求在不断增加。

Chang 的研究小组设计了一系列基于氧杂蒽硼酸酯的化合物, 化合物 39 是其中的一个, 它是一个通过过氧化氢选择性促进脱硼酸盐的过氧化氢化学传感器^[131](图 3-65)。化合物 39 不但能够进行膜渗透, 还可以对活细胞内过

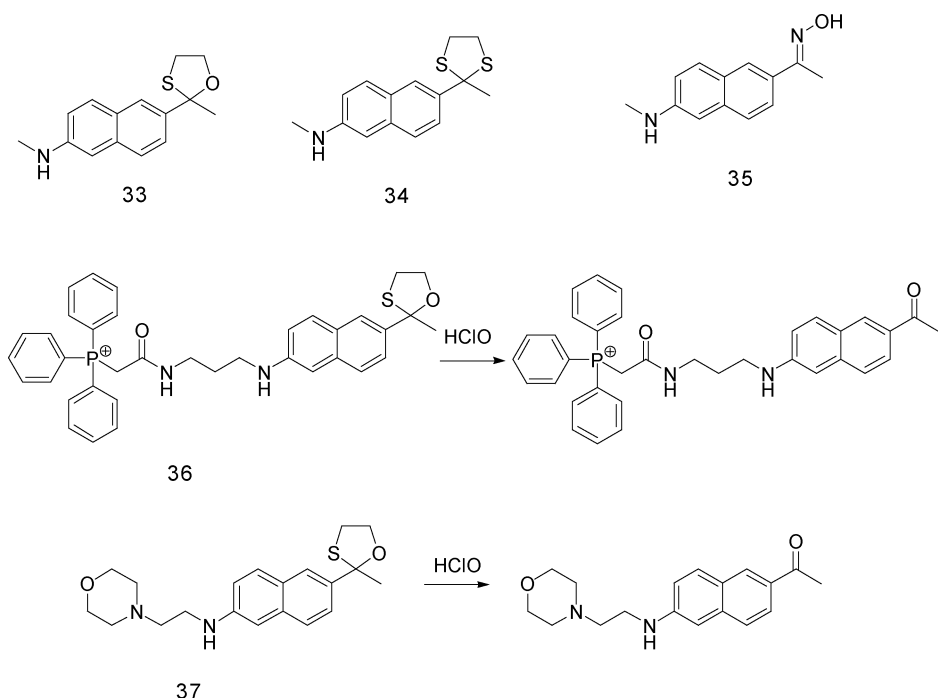


图 3-64 化合物 33 及其衍生物 34~37

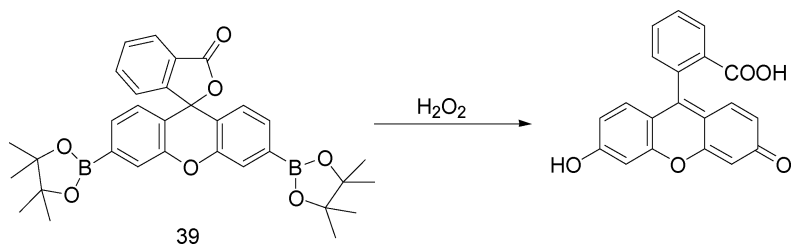


图 3-65 化合物 39 的传感机理

氧化氢浓度的微摩尔变化有响应。化合物 39 还能够在活海马的神经元中检测过氧化物触发的氧化应激反应。

除了上述的双硼酸酯化合物外,还有 13 种基于过氧化氢的单硼酸酯化合物应用于检测过氧化氢,化合物 40(图 3-66)就是其中的一种。化合物 40 是第一个线粒体靶向化学传感器,其在活细胞中可以与线粒体的过氧化氢选择性地结合并成像^[132]。化合物 40 是一个既包含线粒体靶向位点,又能够与过氧化氢反应的双功能染料。

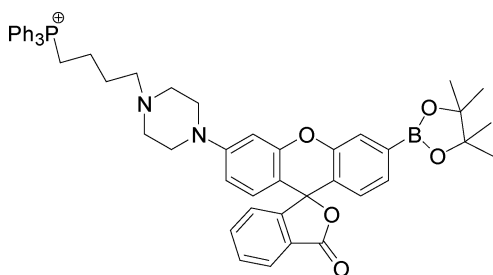


图 3-66 化合物 40 的结构式

2,3-丁二醇酯的对二羟基氧硼苄衍生物的保护基团氨基,可以通过过氧化氢选择性地除去。它与单硼酸酯结合,去保护生成酚和胺,是一种对过氧化氢选择性发光的化学传感器。化合物 41^[133]和化合物 42^[134]都是选择性地检测过氧化氢的传感器(图 3-67),其中化合物 41 的发光体是 1,8-萘二甲酰亚胺。它们都是单硼酸酯比率荧光传感器,可应用于生物系统中的过氧化氢成像检测。

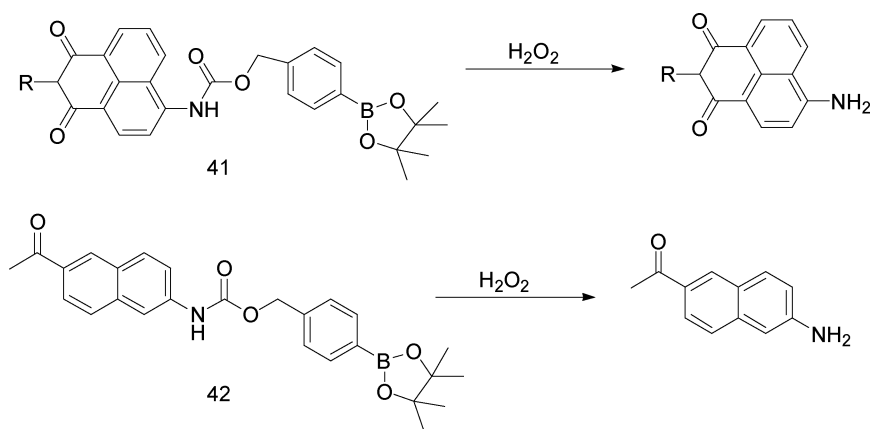


图 3-67 化合物 41 和 42 的传感机理

化合物 41 能够与在活细胞中达到自然免疫反应水平的过氧化氢成像。读数的线性变化可以在吞噬点精确反映过氧化氢的变化,而且这个变化在整个细胞质中可以看到。更重要的是,化合物 42 是一个双光子的活性荧光探针,可以在活组织深层中用于过氧化氢含量变化的双光子比例成像。

化合物 43 是一个纯有机的过氧化氢检测探针,在生理条件下,苯硼酸发生氧化反应,之后发生水解,接着对醌甲基化物发生 1,6-消除反应生成化合

物 44^[135] (图 3-68), 发出荧光。因为在化合物 44 的形成过程中会伴随着 ICT 效应, 故可以观察到荧光增强。化合物 43 已被成功地证明在小鼠的急性炎症模型中能够有效地对过氧化氢成像。

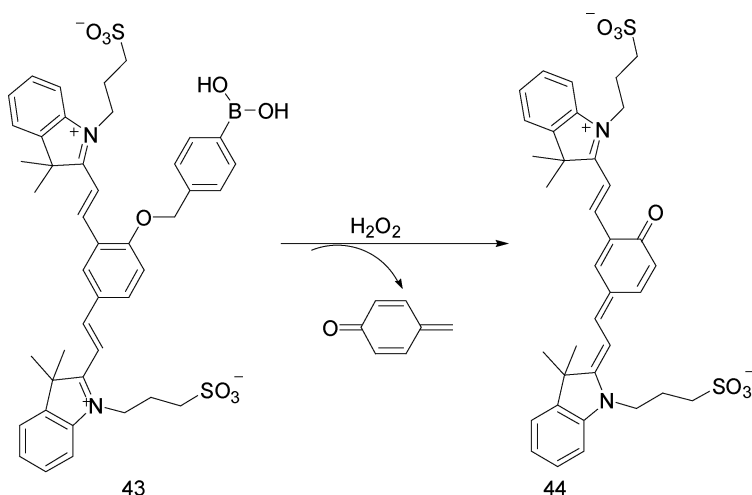


图 3-68 化合物 43 的传感机理

化合物 45 是以过氧化氢为介质水解的磺酸盐化学传感器^[136] (图 3-69)。其对过氧化氢表现出的高选择性高于其他活性氧, 并有荧光增强。经过氧化氢的水解反应, 促进封闭的、无色的、无荧光的内酯环转换成开环的有色荧光产物。化合物 45 可以用于检测活细胞内过氧化氢的变化。

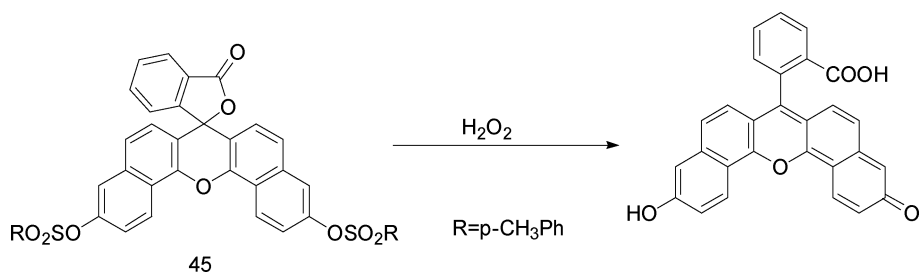


图 3-69 化合物 45 的传感机理

如图 3-70 所示, 唐教授和合作者报道了一个利用¹O₂ 诱导 1,4-环加成反应机理合成的花菁染料 46^[137], 其化合物结构中含有组氨酸结构, 是一个近红外化学荧光传感器。由于组氨酸和激发态的荧光团之间的光诱导电子转移的影响, 染料 46 发出微弱的荧光。当化合物 46 与¹O₂ 反应后, 咪唑基团被氧

化, PET 作用被抑制, 花菁荧光团的荧光恢复, 并且其可应用于检测活细胞中 $^1\text{O}_2$ 浓度的变化。

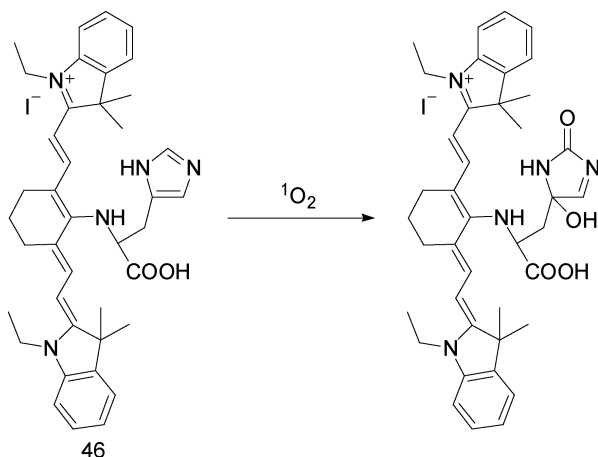


图 3-70 化合物 46 的传感机理

如图 3-71 所示, 化合物 47 在细胞内与 O^{2-} 发生氧化反应生成荧光化合物 48^[138], 且其他活性氧和氮物种不能氧化化合物 47 生成同样的产物。先用不同浓度的甲萘醌细胞内产生的 O^{2-} 对牛的大动脉内皮细胞进行预处理, 之后再用化合物 47 进一步处理, 可以观察到红色的荧光随着剂量的增加而增强。

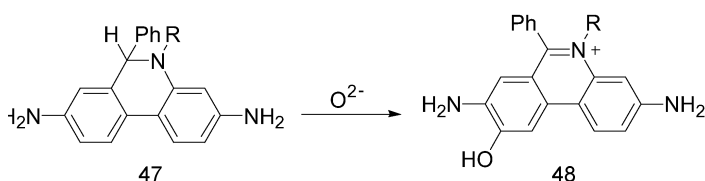


图 3-71 化合物 47 的传感机理

如图 3-72 所示, 化合物 49 是一个 NO 选择性的化学传感器^[139], 当其与 NO 反应, NO 诱导铜离子减少和亚硝基化的过程会导致罗丹明部分的螺环打开, 产生的荧光增强 700 倍。更重要的是, 化合物 49 可应用于用共聚焦荧光显微镜监测细胞内的 NO。

在生物体内, 只要存在一氧化氮和超氧负离子, 就可以形成过氧亚硝酰 (ONOO^-)。如图 3-73 所示, 化合物 50 具有一个通过芳基醚键与二氯荧光

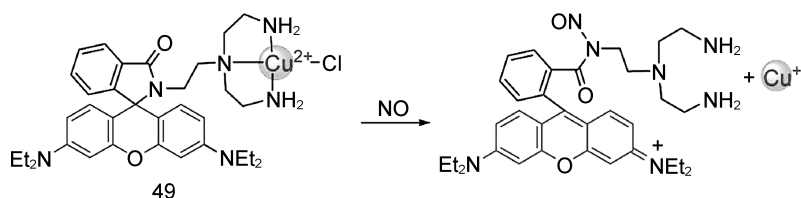


图 3-72 化合物 49 的传感机理

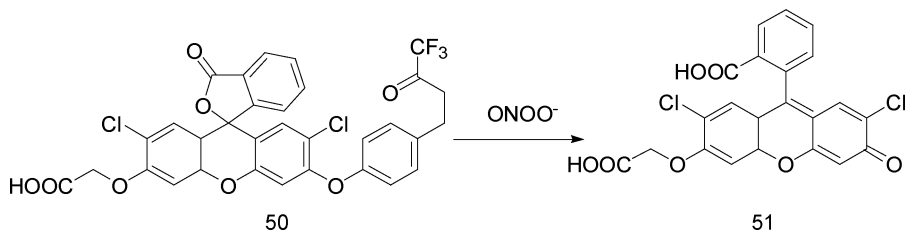


图 3-73 化合物 50 的传感机理

素基连接的酮单元,它可以与 ONOO^- 反应得到强荧光产物 51^[140]。化合物 50 已成功应用于活细胞内 ONOO^- 的高选择性检测。

Chang 等报道了一个在溶液中的亚硫酸根选择性的化学传感器 56^[141],乙酰丙酸异吩噻唑酮在 SO_3^{2-} 的诱导下选择性脱去乙酰丙酸基团,如图 3-74 所示。化合物 56 在 584 nm 处的荧光发射很微弱,在用 100 当量的 SO_3^{2-} 进行处理之后,酯基断开生成异吩噻唑酮阴离子,在 588 nm 处出现强烈的荧光。化合物 56 对 SO_3^{2-} 的选择性较高,且不受其他阴离子的干扰。

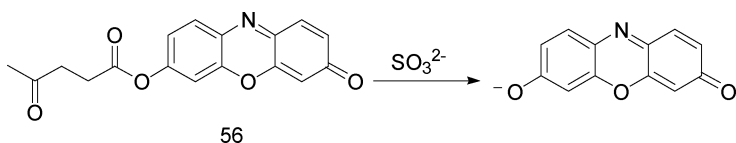


图 3-74 化合物 56 的传感机理

细胞内硫醇在生理过程中扮演着许多重要的作用。例如细胞内最丰富的非蛋白原硫醇: 谷胱甘肽(GSH),在维持细胞还原环境和氧化还原调节方面起着关键的作用。半胱氨酸是一种天然产生的氨基酸,是生物体中非常重要的三种生物巯基小分子中的一种,结构式如图 3-75 所示。生物样品中含巯基的分子的选择性检测和监测极为重要。迄今为止,已通过利用各种机制,包括亲核加成和键的裂解过程,获得了多种选择性硫醇荧光化学传感器。

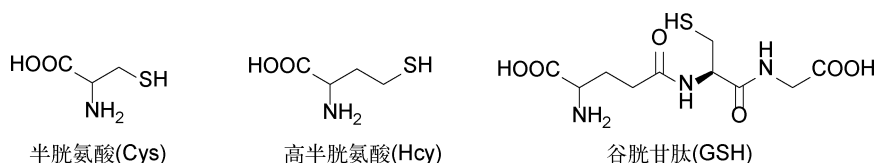


图 3-75 三种巯基氨基酸的结构式

如图 3-76 所示, Yoon 等人报道了基于硫醇的亲核进攻诱导的荧光素螺内酰胺开环的化学传感器 58, 其对生物硫醇具有高选择性和灵敏度^[142]。化合物 58 已被用来检测活小鼠 P19 胚胎肿瘤细胞中的硫醇, 且首次通过荧光成像监测到三日龄斑马鱼的硫醇。

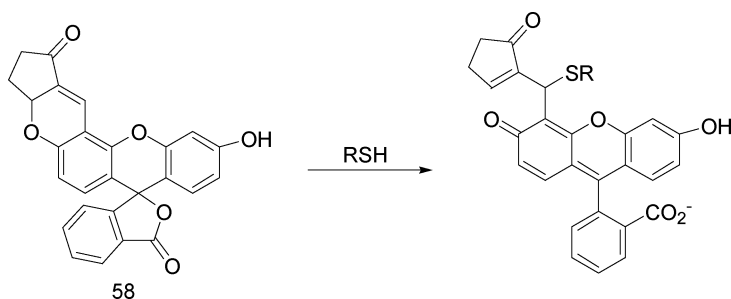


图 3-76 化合物 58 的传感机理

巯基/二硫的交换反应也已被用于检测硫醇, 如半胱氨酸(Cys)。如图 3-77 中化合物 60 的能量给体和受体分别是中-四(4-羧基苯基)卟吩和香豆素的部分结构^[143], 其中能量给体是通过二硫键连接至受体的。从给体到受体有一个 FRET 的过程, 这个过程导致香豆素的部分荧光淬灭。在加入半胱氨酸

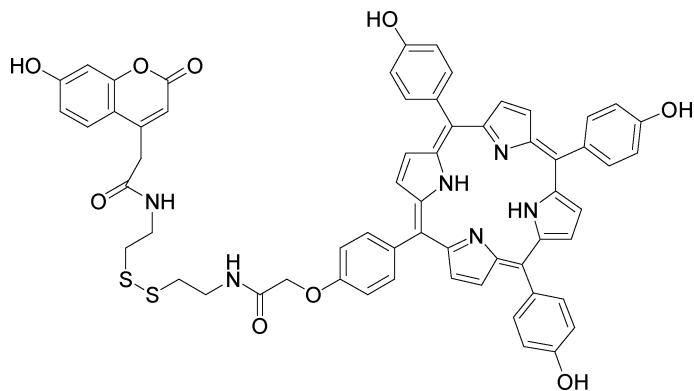


图 3-77 化合物 60 的结构式

后, S—S 键发生断裂, 并且阻止了 FRET 过程。因此, 可以观察到香豆素的荧光发射增强, 吡吩的荧光发射不变, 从而实现了半胱氨酸的比例荧光检测, 并且细胞内硫醇的比率成像已被证明。

图 3-78 中的化合物 61 是一个 Cys/Hcy 化学传感器, 应用于检测活细胞中 Cys/Hcy 分布的荧光成像^[144]。在 pH 值为 7 的甲醇和 HEPES (体积比 7 : 3) 的混合溶液中, 加入 Cys 或 Hcy 后, 其在 588 nm 处的发射峰迅速增强约 75 倍, 这是半胱氨酸或高半胱氨酸的亲核加成过程造成的。竞争实验表明, 化合物 61 对半胱氨酸或高半胱氨酸的选择性比其他各种氨基酸和硫醇生物大分子都要高。可以通过共聚焦荧光显微镜和双光子荧光显微镜证实, 其对生物样品中 Cys 和 Hcy 进行检测。实验表明其可以在可见光区域被用于 Cys/Hcy 的亚细胞分布的生物成像, 且荧光是增强的。

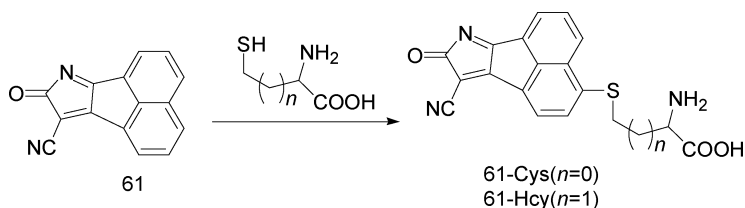


图 3-78 化合物 61 的传感机理

化合物 62 没有荧光, 是由荧光团香豆素和其附近共轭二酯之间的 ICT 作用造成的^[145]。当加入 Cys/Hcy 发生迈克尔加成反应后, 香豆素环系统到 α ,

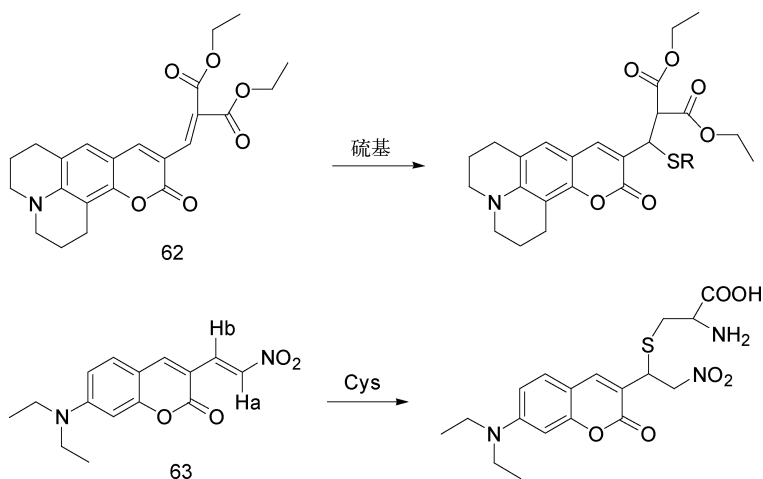


图 3-79 化合物 62 和 63 的传感机理

β -不饱和羰基基团的共轭结构发生了很大的改变,其吸收峰发生了蓝移,荧光增强。如图3-79所示,化合物63也是一个用来检测 Cys/Hcy 的荧光增强型的化学传感器,其电子受体是硝基乙烯部分^[146]。通过共聚焦显微镜可分析二者在细胞内的硫醇成像。但这种基于迈克尔加成反应得到的化学传感器,除了 Cys/Hcy,对其他生物硫醇(如 GSH 等)的选择性都不高(图3-79)。

第 4 章

荧光分子传感器检测基团

4.1 反应型检测基团

荧光分子传感器检测端中的反应型检测基团是非常重要的基本检测基团,目前为止报道的荧光探针分子中很多都属于反应型探针,反应型探针的测试结果通常都有很明显的实验现象,方便于检测识别。

4.1.1 阴离子检测

1. 氰根离子检测

由于 ICT 机理的原因,氰根离子探针在加入 CN^- 后引起双重颜色的出现和荧光的变化(图 3-25)。在 12 种离子中只有 CN^- 有颜色变化,紫外光下从黑蓝色变为黄色,荧光从弱蓝变为强绿,在 490 nm 处的等吸收点说明 CN^- 和化合物 Cou 反应产生了新物种。在 484 nm 处荧光增加,而其他钾盐离子没有这个变化。

Ekmekci 组^[147]研究了 BODIPY 探针加了氰根离子后在 571 nm 的等吸收点的反应,证明在滴定过程中产生了新的物种,加入 TFA,探针失去 CN^- ,荧光恢复。制备了掺杂 BODIPY 探针的聚(甲基丙烯酸甲酯)薄膜,该实验表明在固体状态下和氰基的反应。

由于吡啶基团中带正电荷的氮原子能够对 CN^- 中 sp^2 杂化的亲核性碳原子具有强吸引力,吡啶基团的 $\text{C}=\text{N}$ 可以作为一个氰离子反应位点进行比色识别和荧光比率识别,如第 3 章中图 3-38、图 3-39、图 3-40、图 3-42、图 3-43、图 3-48、图 3-49。

李振教授等人^[33]利用氰化物特殊的亲核性,设计合成得到了比率型荧光

比色探针 11(图 2-21),当加入阴离子 CN^- 后,其荧光光谱和吸收光谱蓝移均达到了 90 nm。

在水杨醛结构中,酚羟基与邻位醛基上的羰基氧形成分子内氢键,引起羰基活化。羰基被活化后能够与氰离子发生亲核加成反应,氰离子攻击醛基上活化了的碳氧双键,导致酚羟基上产生一个烷氧基负离子,产生的烷氧基负离子与酚羟基依靠分子内氢键形式相互结合,进而质子转移后形成氰醇化合物,这一过程可用“激发态质子转移”(ESIPT)机理解释。核磁信号峰精确地阐述了加入氰离子前后水杨醛的醛基质子氢所对应的变化。有大量文献报道过基于这一原理来设计氰离子探针。

Rangsarit Sukato 等人开发了一个氰离子荧光探针 2(图 4-1),该探针加入氰离子后,溶液从橙色变为无色,并且在 504 nm 处表现出强荧光。在生理条件下,向探针体系中加入其他多种阴离子都几乎没有干扰,其检出限为 $0.88 \mu\text{mol/L}$,数据远远低于 WHO 要求的饮用水标准。团队用密度泛函理论(DFT)证明了该探针识别氰离子的主要反应机理是“光诱导电子转移”(PET)抑制机制。细胞成像研究表明,该探针能够在活细胞中实现对氰离子的检测^[148]。

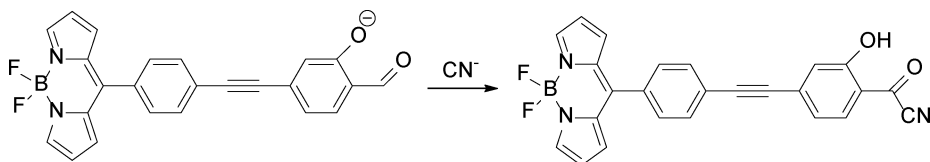


图 4-1 探针 2 识别氰离子的反应机理

Yoon 和 Park 等介绍了一种用醛基荧光素设计的氰离子荧光探针 3,其设计机理也是依靠活化羰基碳加成(图 4-2)^[149]。它们通过微流控技术对氰离子的选择性识别进行测试,并取得了很好的效果。作者将探针溶解到

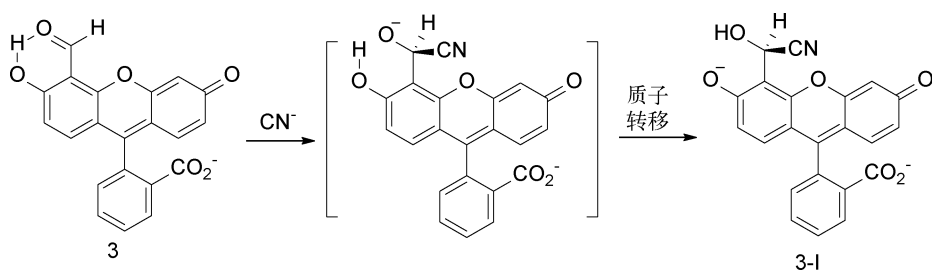


图 4-2 探针 3 加入氰离子后的反应机理

$\text{CH}_3\text{CN}-\text{H}_2\text{O}$ (体积比 9 : 1) 制成溶液, 使用激发波长为 500 nm 的荧光照射, 该氰离子荧光探针能够实现生物体活细胞中氰化物的检测。

由苯胺和水杨醛反应得到的新探针 4 和 5 如图 4-3 所示^[150], 两个探针都能通过颜色改变 (从无色变为淡黄色) 和荧光“开”响应的方式实现对氰离子的识别。理论研究表明, 加入氰离子后溶液颜色变化的原因可能是加入氰离子后的醌由带负电荷状态发生质子转移到三苯基基团。这些探针在加入氰离子后荧光强度能够变为原来的 360 倍。

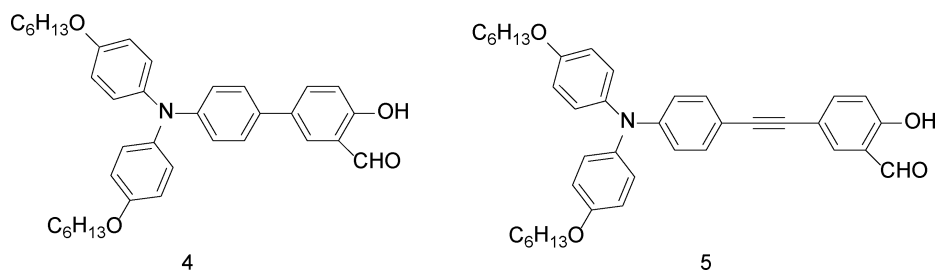


图 4-3 三苯胺与水杨醛反应制得氰离子探针的结构式

2. 氟离子检测

Bozdemir 组^[151]考虑到氟离子传感是建立在醇和酚基础上的脱硅保护基团的方法上的, 设计了化合物 46 和 47 (图 4-4) 作为潜在的氟离子响应分子。

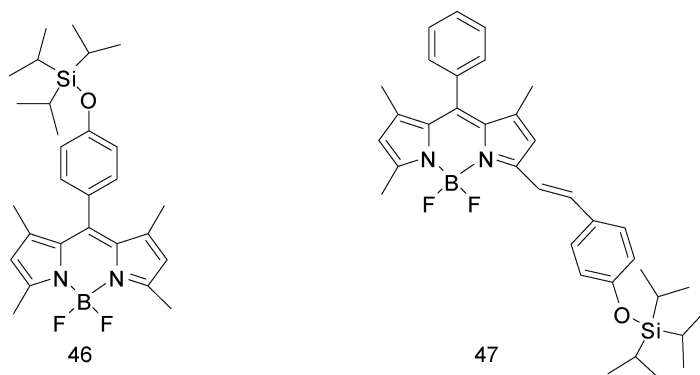


图 4-4 化合物 46 和 47 的结构式

以前的工作证明在 BODIPY 核的 meso 位的苯氧基取代基是非常强的 PET 给体。在非质子溶剂中, 使用探针 46 能识别氟离子, 这是通过在发射强度上的下降作为脱除 TIPS (三异丙硅烷) 保护基团的结果, 脱保护反应过程较

快,产生酚盐阴离子,通过 PET 淬灭发射。探针 47 的设计是希望利用氟离子的脱保护反应产生强烈的 ICT 给体酚盐离子,和 BODIPY 染料完全共轭,这将提高 HOMO 能级,减少 $S_0 - S_1$ 跃迁的能带,导致在吸收的主峰上大的红移。在很多例子中,如此大的红移导致发射强度下降。

化合物 46 的吸收波长在 498 nm,四丁基氟化胺的加入导致吸收波长最小的变化(10 nm 蓝移),最明显的变化是荧光光谱,因为在 506 nm 的荧光被氟离子淬灭,脱保护反应较快。化合物 47 的吸收波长在 560 nm,加入氟离子后红移,560 nm 处峰逐渐下降,出现 680 nm 处新峰,等吸收点在 581 nm 处。在溶液中 120 nm 的红移是非常大的,相应地,颜色从桃红变绿色。另一方面,探针 47 新出现的荧光波长表明了新发射物种的出现,脱保护导致了非发射酚盐的形成,这些反应对氟离子有高的选择性,脱保护反应较慢。探针 46 和 47 经过修饰可用到水溶液中,但要克服水溶液中氢键的影响。

Guoqiang Yan 等人^[152]报道了一种基于化学反应型检测氟离子的荧光探针,如图 4-5 所示,氟离子通过使硅氧键断键,生成供电子的酚羟基,实现发射光谱的红移 142 nm。该荧光探针也是基于 ICT 效应的比率型荧光探针,加入氟离子之后,溶液在紫外灯下由蓝色变为黄色。纯水中的检测极限在 $0.1 \mu\text{mol/L}$ 左右,完全适用于饮用水中氟离子的检测。

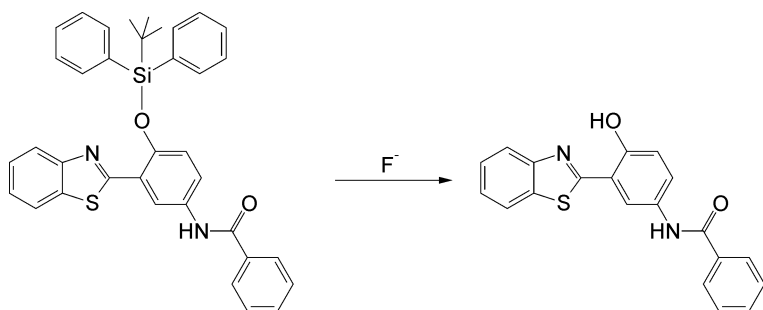


图 4-5 化学反应型荧光探针检测 F^-

Yamaguchi 组^[115]报道了含硼的 π 共轭系统的化合物 48 和 49 作为氟离子化学传感器[图 3-51(b)]。

3. 其他阴离子检测

Xiaofeng Yang 课题组^[153]设计并合成了一种利用 S^{2-} 亲核性进行化学反应的荧光探针。如图 4-6 所示,加入 S^{2-} 之后,探针脱去 2,4-二硝基苯磺酰

基,对于羟基的保护,荧光素的强荧光显现出来。该荧光探针可以成功应用于水体中 S^{2-} 检测,检测极限为 4.3 nm。

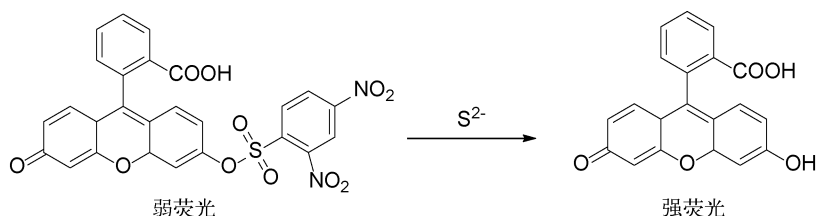


图 4-6 化学反应型荧光探针检测 S^{2-}

2,4-二硝基苯磺酰氯检测基团通常用作苯硫酚荧光探针,赵春常组^[51]以吡啶基 BODIPY 作为荧光团,以强拉电子基二硝基苯磺酰基为识别基团的荧光分子探针,探针加入苯硫酚后荧光增强,有较高的荧光量子产率,可观察到酚/酚盐转换形式的蓝/红颜色转换。

Jiang 等人^[154]在 2007 年报道了一个基于分子内电荷转移机制(ICT)的具有高度选择性和高灵敏度的苯硫酚荧光探针 12(图 4-7)。该探针可以用于区分苯硫酚和脂肪族硫醇。同时,在中性水条件下,加入苯硫酚后溶液的荧光强度有大于 50 倍的荧光增强。

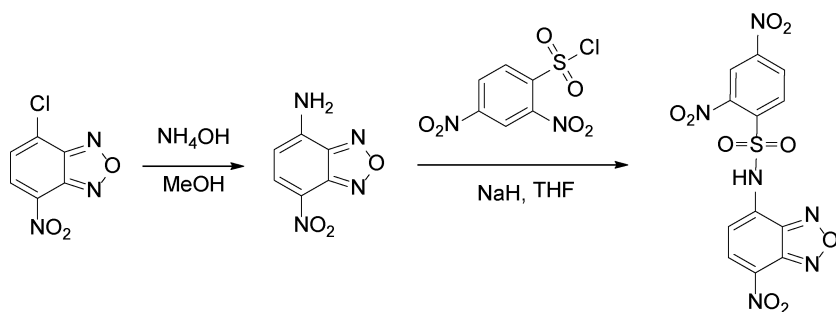


图 4-7 探针 12 的设计合成反应机理

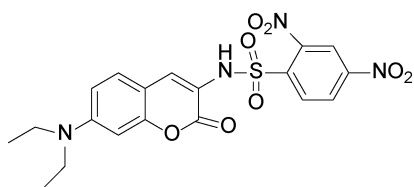


图 4-8 探针 13 的结构式

2014 年, Li 等人^[155]报道了一种基于分子内电荷转移机理(ICT)的新型香豆素类衍生物的荧光探针分子 13(图 4-8)。该探针分子有三大优点:一是具有大的 Stokes 位移(145 nm),二是有高的荧光增强倍数(280 倍),三是这种探针分子在活

细胞和水中都有检测可行性。而且,计算得出荧光探针 13 对苯硫酚的检测下限可以达到 30 nmol/L。此外,探针可在 HEK293 细胞中对苯硫酚进行实时检测,探针的细胞渗透性高、毒性较低、对细胞的损伤较低。在实际水样中对苯硫酚回收率很高,可达到 90% 以上。

然而探针 13 与苯硫酚反应后生成的产物(氨基香豆素)的荧光量子产率不高,只有 0.14,为了对此缺陷进行改善,Sun 等人在 2015 年报道了另外一种经过改进的苯硫酚荧光探针 14(图 4-9),探针用两个环己烷取代的氨基香豆素作为母体在 3 号位进行结构修饰,合成苯硫酚荧光探针 14,这种改进后的荧光探针与苯硫酚结合后所得的产物表现出了更高的荧光强度倍数(700 倍),探针的检测下限更低了(4.5 nmol/L),并且拥有更大的 Stokes 位移(155 nm)。此外,各项数据表明这种探针对于苯硫酚不仅响应速度快、灵敏度高、选择性好,而且探针有着良好的细胞渗透性。实践证明,这种探针在定量检测水样和活细胞中苯硫酚的浓度时,达到了很好的效果。

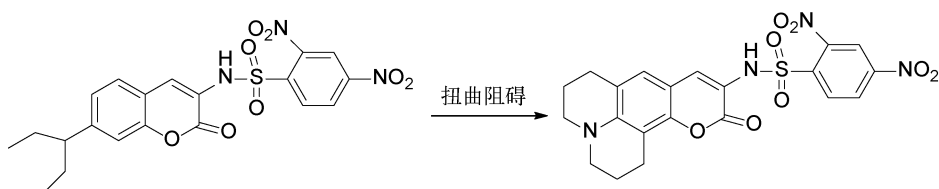


图 4-9 探针 14 的合成机理

2015 年,Liu 等人^[156]报道了一种称为 NpRb1 的双光子苯硫酚荧光探针 15(图 4-10),探针是用 DNBS(二硝基苯磺酸盐)作为识别单元,用萘蒽类物质作为荧光基团,这两个基团有着低的荧光背景值和高的细胞渗透性等优点,再运用了键的能量转移机理(TBET)设计了探针 15。用一个共轭键连接一种双光子 D- π -A 结构的萘衍生物和一个 Bodipy 衍生物,形成 TBET 探针,数据模拟实验显示探针能量转换效率可以达到 93.5%。同时从荧光光谱中发现探针拥有非常大的 Stokes 位移和较长的荧光发射波长($\lambda_{em}=586$ nm)。在检测时探针具有较高的选择性和灵敏度,计算可知探针的检测下限可以达到 4.9 nmol/L,更有意义的是探针 15 可运用到实际的水样和活体细胞中苯硫酚的定位和实时检测。

2010 年,Jiang 等人^[157]报道了一种基于 PET 机理设计开发的“关-开”型苯硫酚荧光探针 16(图 4-11),探针在检测苯硫酚时展现了极高的灵敏度和

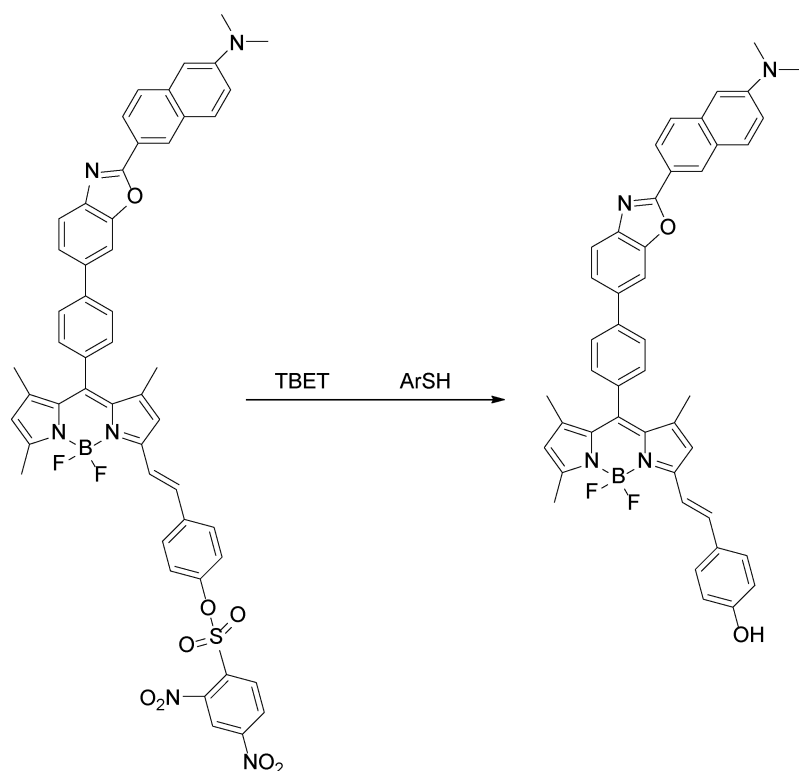


图 4-10 探针 15 的响应机理

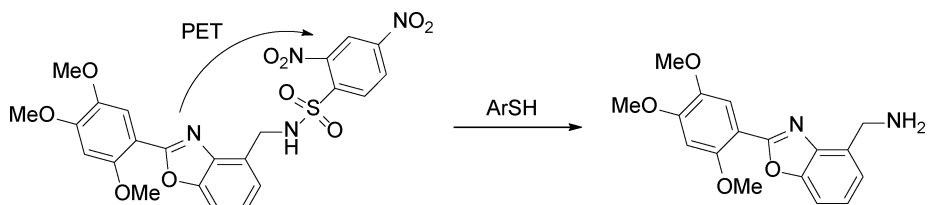


图 4-11 探针 16 的响应机理

优良的选择性,计算得出探针的检测限可达到 $0.2 \mu\text{mol/L}$,在考察 pH 对探针与苯硫酚结合的影响时发现,溶液 pH 从 7 到 9 时,探针溶液的荧光强度基本不发生变化,而加入苯硫酚反应后荧光强度可以迅速增加,当达到稳定时荧光强度比探针溶液本身有 100 倍的增加。这些优异的性能使探针可在生理条件下在细胞中对苯硫酚进行荧光成像实验。

Shao 等人^[158]在 2015 年报道了一种具有高度选择性和敏感度的“关-开”

型荧光探针 17(图 4-12), 探针 17 可高效地区分脂肪族硫醇和苯硫酚, 从荧光光谱中发现当苯硫酚浓度在 $6 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-4}$ mol/L 的范围内时, 溶液的荧光强度与苯硫酚的浓度会有良好的线性相关性, 这就为在溶液中定量检测苯硫酚提供依据。通过计算可知探针 17 在 PBS 缓冲溶液中对苯硫酚的检测下限可达到 4×10^{-6} mol/L。此外, 由于探针的荧光发射在红色波段, 当探针应用在活细胞中定量检测苯硫酚时, 这种红色波段荧光会降低细胞的光损伤, 极大地提高探针在活体细胞中的实用性。

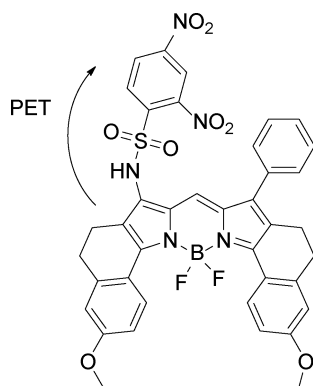


图 4-12 探针 17 的响应机理

Yu 等人^[159]在 2014 年报道一种利用二苯并呋喃合成的用于检测苯硫酚的近红外荧光探针 18(图 4-13)。实验发现探针检测苯硫酚具有快速性、高选择性、高灵敏度等特点。探针以共轭二苯并呋喃分子作为荧光基团, 2,4-二硝基苯-1-磺酰胺作为反应部位。探针检测苯硫酚的优点包括以下几点: 可以快速地检测苯硫酚、在近红外波段进行荧光检测、对苯硫酚具有高选择性和高灵敏性、反应可以在温和的条件下进行、荧光光谱中有一个大的 Stokes 位移。此外, 探针分子还被成功地应用到实际水样和活体细胞中苯硫酚的检测。结果表明, 这项工作提供了一个可在近红外波段对实际水样中和生物细胞中的苯硫酚进行检测的量化机制。

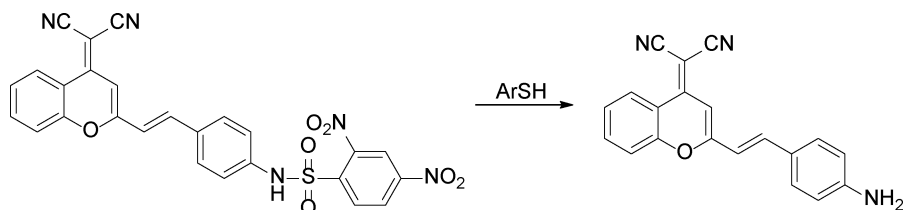


图 4-13 探针 18 的响应机理

Kand 等人^[160]在 2012 年报道了一种基于 BODIPY 结构的比色型氟硼荧光染料的荧光探针 19(图 4-14), 该探针可用于识别苯硫酚并可以定量地检测溶液中的苯硫酚含量。在对苯硫酚检测时溶液颜色由红色变为黄色, 当反应稳定后溶液的荧光强度比探针本身增强 63 倍。在活细胞中可利用探针 19

对苯硫酚进行荧光成像实验。

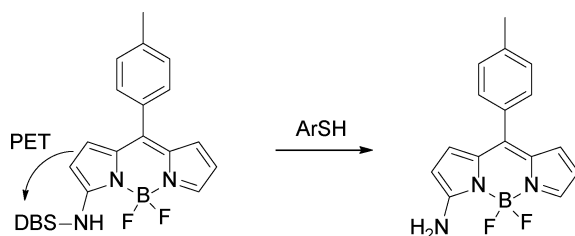


图 4-14 探针 19 的响应机理

在 2012 年的美国分析化学报道中, Wang 等人^[161]研究制备了一种以萘酰亚胺作为荧光基团、以强吸电子基的 2,4-二硝基磺酰胺作为识别单元、以 2,3-二羟基咪唑吡啶作为连接基的苯硫酚荧光探针 20(图 4-15), 探针可在水溶液中对苯硫酚进行专一性识别。所制备的这种荧光探针显示出高的关/开信号比、良好的选择性。探针的检测下限可达到 20 nmol/L。在回收率实验中, 11 个样品浓度为 0.33 mol/L 的苯硫酚检测结果的标准偏差为 1.7%, 表明探针可有效地应用于定量测定水中的苯硫酚(回收率 94%~97%)。这种探针的激发和发射波长分别为 481 nm 和 590 nm, 在实验中带来较小的背景干扰。探针的这些特性保证它在实际应用中能够有令人满意的应用价值。

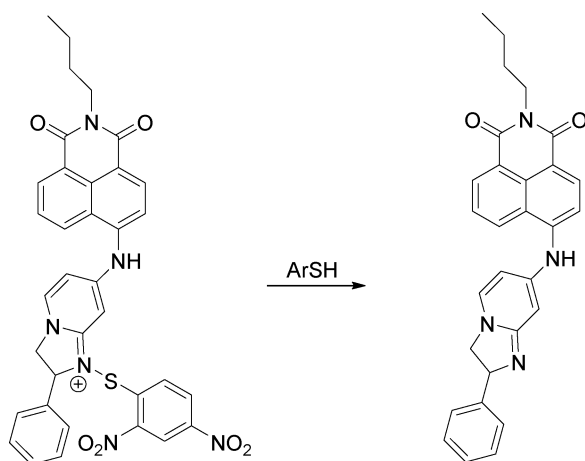


图 4-15 探针 20 的响应机理

Lin 等人^[58]在 2010 年合成了探针 21(图 4-16), 该探针将 2,4-二硝基苯基连接到香豆素衍生物上, 苯硫酚可对探针分子上的磺酰胺键进行切断, 从而

达到检测的效果。实验报道探针可在 $\text{pH}=7.0$ 的 PB 缓冲溶液(45% 的 DMF 作助溶剂)中检测苯硫酚。实验结果表明,探针对苯硫酚的检测的灵敏度较高,同时,反应结束后溶液的荧光量子产率由原先探针的 0.006 增加到了 0.5, 荧光强度有 165 倍的增强,并且当苯硫酚在 $4.0 \times 10^{-9} \sim 3.0 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ 这一浓度段时,溶液的荧光强度和苯硫酚浓度有较好的线性相关性,计算得出探针对苯硫酚的检测下限可达到 $1.8 \times 10^{-9} \text{ mol/L}$,这在检测苯硫酚的探针中是最灵敏的。反应结束后溶液颜色由原来的黑色变为绿色。该实验突破性地将探针与试纸相结合,为探针在实际运用中提供了实际依据。实际水样和生物细胞中的苯硫酚的检测和荧光成像,表明了探针有良好的细胞渗透性和较低的毒性。

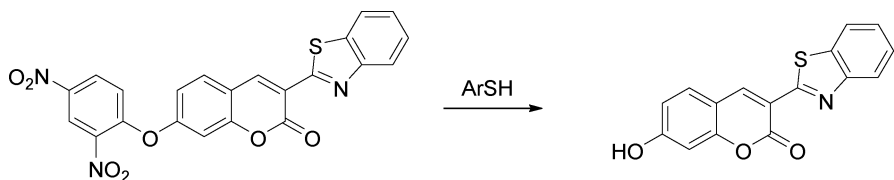


图 4-16 探针 21 的响应机理

Sun 组^[162]设计了基于 PET 机理的 BODIPY 染料探针 HKOCl-1,与次氯酸盐反应之前,对甲氧基苯酚部分的 HOMO 能级(-8.71 eV)比 BODIPY 单元的更高(-9.14 eV),因此, HKOCl-1 的荧光通过 PET 过程淬灭。氧化以后,苯醌部分的 HOMO 能级(-10.9 eV)比 BODIPY 单元的更低,因此, PET 过程被禁阻,产物出现荧光。

基于硅基罗丹明的近红外发光荧光探针 7 及其衍生物是关环型探针^[121],可以在次氯酸的作用下,生成开环的氧化产物 8,并产生增强型的荧光信号输出(图 3-57)。

Kim 等人通过迈克尔亲核加成反应合成得到了荧光探针 12(图 2-22),用于谷胱甘肽的检测。

亚硫酸盐作为防腐剂的有效成分,被广泛应用于饮料和食品中。它具有毒性,并且与过敏反应等有关联。乙酰丙酸异吩噻唑酮在亚硫酸根(SO_3^{2-})的诱导下选择性脱去乙酰丙酸基团的基础上,Chang 等人报道了一个在溶液中的亚硫酸根选择性的化学传感器 56(图 3-74),化合物 56 对 SO_3^{2-} 的选择性较高,且不受其他阴离子的干扰。

与化合物 56 的机理相类似, BODIPY 衍生物 57^[163] 也是用来检测 SO_3^{2-} 的, 且是一个比率型荧光探针, 其传感机理如图 4-17 所示。

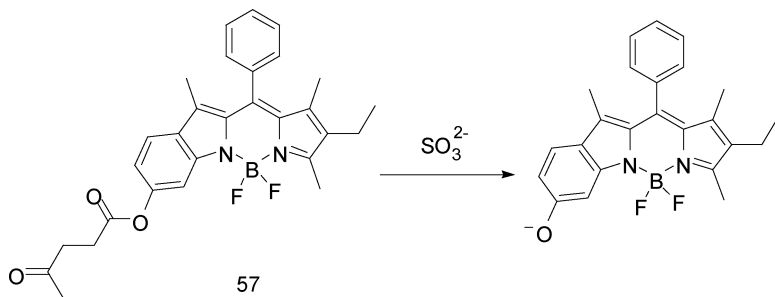


图 4-17 化合物 57 的传感机理

4.1.2 阳离子检测

1. 反应型 Hg^{2+} 化学传感器

Hg^{2+} 是一种嗜硫的重金属离子, 可以与许多含硫化合物发生作用。例如与硫羰基化合物发生脱硫反应生成相应的羰基化合物^[164], 诱导硫脲衍生物脱硫化氢成脒反应^[165], 以及汞促进氨基硫脲转化为 1,3,4-噁二唑的反应^[166], 反应后 Hg^{2+} 一般以硫化汞的形式存在。反应型 Hg^{2+} 化学传感器的设计正是基于这些化学反应, 通过巧妙设计的分子结构, 把反应活性基团与荧光团或发色团结合起来, 利用反应前后化合物光物理性质的不同, 对 Hg^{2+} 进行检测。另外, 水溶液中 Hg^{2+} 可以与炔烃或烯烃发生羟汞化反应^[167], 也可以作为反应型化学传感器分子设计的基础。

Ziessel 组^[168] 的 BODIPY 染料, 在 PBS 溶液中有两个强的 522 nm 和 567 nm 吸收峰, 567 nm 的峰表现出聚集态的特点, 探针带一个酸性官能团, 可以通过酰胺键结构结合生物分子, 适合作为荧光生物标签使用。

由于 Hg^{2+} 有较强的硫亲和力和, 因此与汞引起的脱硫反应(包括水解、环化和消除)而相关的荧光变化已被设计用于 Hg^{2+} 的化学计量器。但是, 这一领域仍然存在若干重大挑战。例如, 为了促使这些脱硫反应完成, 通常需要使用升高的温度或过量的 Hg^{2+} 。尽管 Hg^{2+} 的亲硫性较弱, 但其他金属离子(如 Ag^+ 和 Pb^{2+})也可促进脱硫反应。因此, Hg^{2+} 的最佳比例式化学计量器必须在环境温度下具有快速响应时间, 并且能够选择性地和化学计量地检测

Hg^{2+} 。最后,剂量计应该在含水介质中操作,并且足够敏感,以在十亿分之几的水平上检测 Hg^{2+} 。

目前已经设计了少量的重金属离

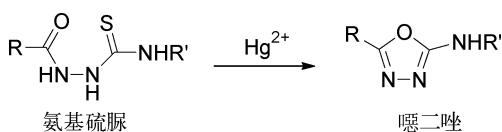


图 4-18 Hg^{2+} 促进氨基硫脲的反应机理

子荧光化学传感器,利用螺内酰胺(非荧光)来打开罗丹明衍生物的酰胺(荧光)平衡开放。图 4-18 为氨基硫脲在 Hg^{2+} 的促进反应下形成 1,3,4-噁二唑,该反应将作为新型的用于 Hg^{2+} 的化学计量器的基础^[10]。

虽然 Hg^{2+} 的一些探针基于多个氮原子与金属离子的配位,但 Hg^{2+} 的大多数探针基于极强的 $\text{Hg}-\text{S}$ 结合。图 4-19 中 Hg^{2+} 促进了荧光掩蔽烷基团裂解,从化合物 2 得到裂解产物 4,这样的系统可以用于 Hg^{2+} 检测。 Hg^{2+} 催化炔烃的水合作用形成相应的酮。酸促进了汞催化水合作的周转频率,但也可能直接通过醚裂解将化合物 2 转化为化合物 4。为了抑制在没有 Hg^{2+} 的情况下酸催化的醚裂解,化合物 2 和 Hg^{2+} (1 当量)在 $\text{pH}=7$ 的缓冲液中在

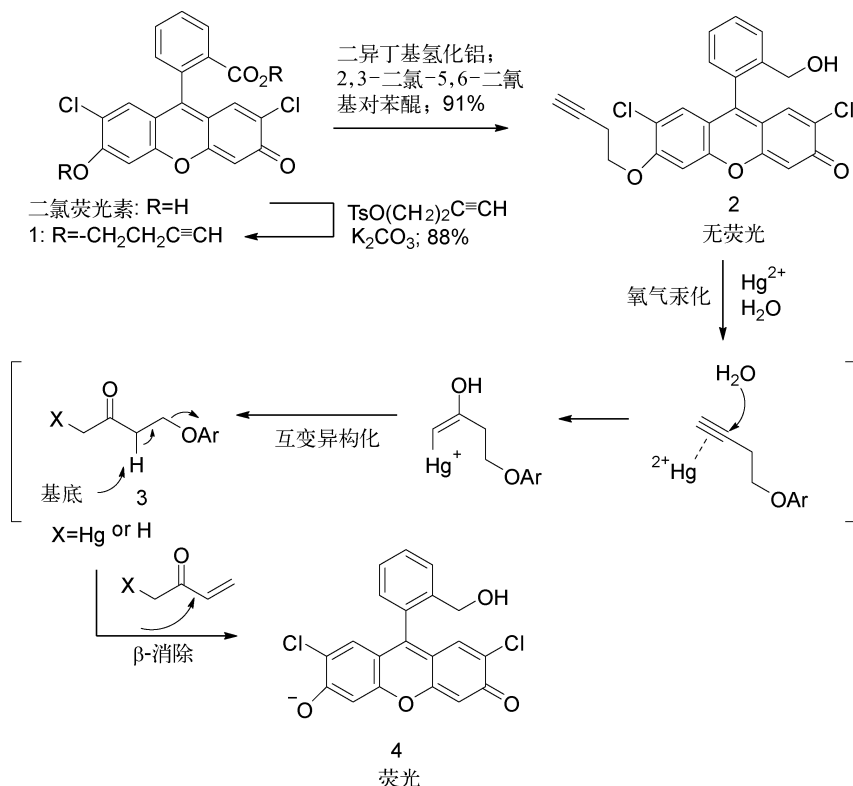


图 4-19 Hg^{2+} 促进烷基团裂解从化合物 2 得到裂解产物 4 的反应机理

90℃下通过加热进行化合物 2 到化合物 4 的转化;可能因为消除步骤比羟汞化更快,所以化合物 3 不能被分离出来。化合物 4 被分离出来,回收率为 61%,通过 HPLC 检测甲基乙烯基酮可作为生成间接的化合物 3 的中间性证据^[11]。

2. 汞促进脱硫和脱硫醇反应

1992 年,Czarnik 等人^[169]报道了第一个用于检测 Hg^{2+} 的反应型传感器 24(图 4-20)。化合物 24 中的硫代酰胺基团是一个有效的分子内荧光淬灭基团,通过光诱导电子转移(PET)过程可以淬灭蒽荧光团的荧光。加入 Hg^{2+} 后,化合物 24 发生脱硫反应,生成羰基产物 25,导致 PET 过程被打断,从而使荧光得以恢复。发生脱硫反应后,体系荧光增强了 56 倍。这一传感器灵敏度高,响应较快(加入 Hg^{2+} 10 分钟后可以达到 87% 的饱和荧光强度),可以在水溶液中检测,并且展示了一种新的基于化学反应体系的荧光信号增强的传感机制。然而,传感器 24 也可以与 Ag^+ 发生反应,并产生较强的荧光增强,这使得它的选择性受到限制。

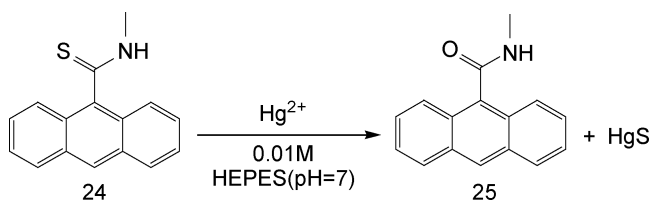
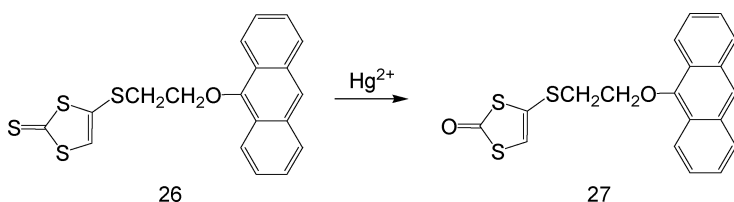
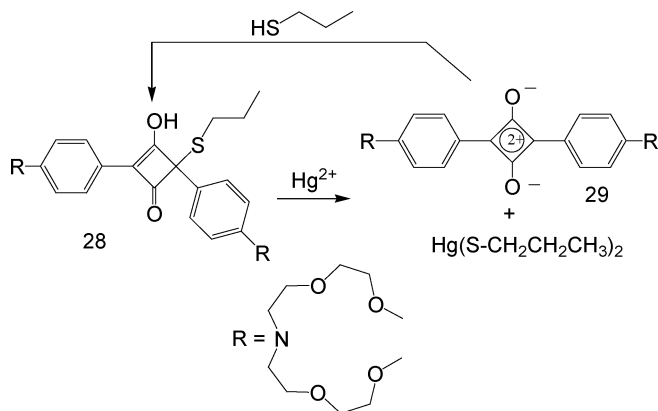


图 4-20 化合物 24 与 Hg^{2+} 的反应机理

张德清等人^[170]报道了含 1,3-二硫酸-2-硫因基团和蒽荧光团的化合物 26(图 4-21)。1,3-二硫酸-2-硫因基团和蒽荧光团之间存在光致电子转移以及能量转移过程,使得化合物 26 在溶液中只有很低的荧光量子产率。在 Hg^{2+} 存在下,化合物 26 发生脱硫反应生成产物 27,新的化合物中能量转移效率降低,同时光致电子转移过程受到抑制,导致荧光增强。在 THF-水(体积比 20:1)溶液中,化合物 26(10 $\mu\text{mol/L}$)与 Hg^{2+} 的作用使 418 nm 处的荧光强度随 Hg^{2+} 浓度增加而线性增强,该变化曲线可以作为实时检测的标准曲线。传感器 26 具有很高的灵敏度和很好的选择性,对 Hg^{2+} 检出下限达到 0.05 $\mu\text{mol/L}$,包括 Ag^+ 在内的其他金属离子对其不构成干扰,提高其水溶性可使其更具实际应用的价值。

图 4-21 化合物 26 对 Hg^{2+} 的传感机理

Martínez-Máñez 等人^[171]合成了一种含方酸菁染料基团的 Hg^{2+} 指示剂 28(图 4-22)。与一般传感体系对已有吸收和荧光性质进行调节的方法不同,作者采用了一种金属离子诱导染料生成(metal-induced dye release)的方法。其中,硫醇作为一种光谱抑制剂(spectroscopic inhibitor),与染料分子 29 发生加成反应,生成无光谱性能的化合物 28,这相当于染料分子的光谱性能被关闭。而加入 Hg^{2+} 后,由于强烈的亲硫特性, Hg^{2+} 可以与传感器 28 发生脱硫醇反应,抑制剂被除去,使得染料分子被释放出来,染料分子的吸收和荧光性能被打开。在水-乙腈(体积比 4 : 1, 0.01 mol/L CHES 缓冲液, $\text{pH}=9.6$)混合溶液中,传感器 28 发生脱硫醇反应后,分别在 642 nm 处和 670 nm 处产生新的吸收峰和荧光信号,传感器 28 对 Hg^{2+} 的检出下限低于 2 ppb。不同于一般的反应型化学传感器,反应过程表明传感器 28 具有可再生性,因此固载化制备的固体传感材料可以对 Hg^{2+} 进行循环检测。

图 4-22 Hg^{2+} 与硫醇控制的化合物 28 和 29 之间的转化机理

8-羟基喹啉对于 Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} 和 Hg^{2+} 来说是很好的配体,可以与这些离子进行有效的络合,已被广泛用于识别金属离子化学传感器的设计合

成^[172](图 4-23)。Chang 等人^[173]将硫代酰胺基团连接到 8-羟基喹啉上,得到弱荧光的化合物 30,在 Hg^{2+} 存在下,化合物 30 发生脱硫反应,生成强荧光产物 31。化合物 30 在 30% 乙腈水溶液中可以选择性地检测 Hg^{2+} ,对 Hg^{2+} 的检测限为 $0.5 \mu\text{mol/L}$ 。

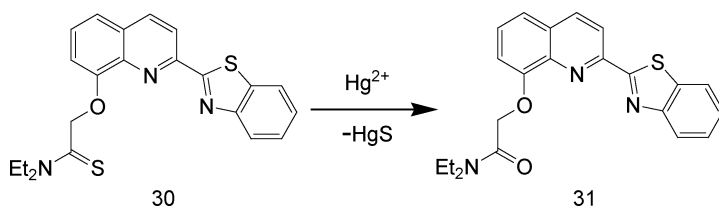


图 4-23 Hg^{2+} 诱导化合物 30 发生脱硫反应的机理

3. Hg^{2+} 促进硫脲衍生物脱硫化氢分子内成环反应

2005 年,刘斌和田禾^[74]设计合成了一个以硫脲为反应识别基团含萘酰亚胺荧光团对 Hg^{2+} 具有选择性的反应型指示剂 10。它对于 Hg^{2+} 的识别基于分子内汞促硫脲成胍(咪唑啉)反应:在乙腈-水溶液中, Hg^{2+} 促进 10 发生脱硫化氢作用(dehydrothiolazition),生成分子内环合的胍类衍生物——含咪唑啉的萘酰亚胺化合物。这种脱硫化氢作用使产物中萘酰亚胺基团 4 位氨基上的推电子能力减弱,从而使吸收光谱和荧光光谱发生蓝移。在乙腈-水(体积比 80:40)混合溶液中,反应前后溶液的最大吸收和发射波长分别从 350 nm 和 475 nm 蓝移到 435 nm 和 530 nm,溶液的黄绿色褪去变为无色,荧光颜色由黄绿色变成蓝色。这一传感体系通过对最大吸收和发射波长位置的调节,实现了比色和荧光比率传感,这是第一个报道的 Hg^{2+} 比色和荧光比率反应型化学传感器(图 3-21)。

对 Hg^{2+} 专一的反应可以与不同的信号基团相结合,通过巧妙的分子结构设计可得到具有比色或者荧光传感性能的传感器。2007 年,Kim 等人同样基于分子内汞促硫脲成胍的反应,设计合成了对 Hg^{2+} 有很好选择性识别的罗丹明化合物 34^[174](图 4-24)及偶氮苯化合物 36^[175](图 4-25)。 $\text{CH}_3\text{OH}-\text{H}_2\text{O}$ (9:1,体积比)溶液中,化合物 34 在 Hg^{2+} 存在下先后经历开环—成环过程,生成化合物 35,反应后溶液由无色、弱荧光变成粉红色、强荧光发射。离子滴定光谱实验表明产生了位于 532 nm 的新吸收峰和 555 nm 处的新发射峰,表现为光信号由关闭到打开的过程。化合物 34 可以在很宽的 pH 值

范围内($\text{pH}=5\sim 10$)对 Hg^{2+} 进行识别,其他金属离子不会对 Hg^{2+} 的识别造成干扰。

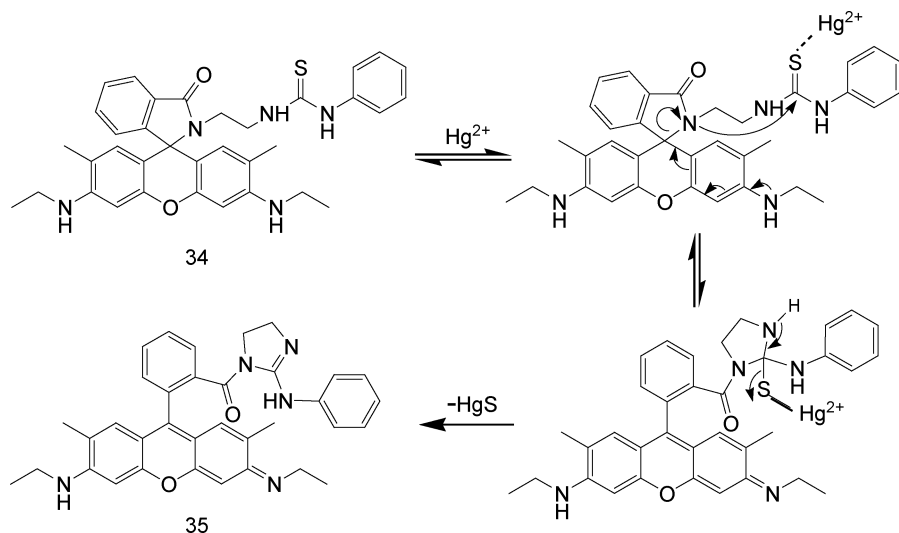


图 4-24 化合物 34 的汞促开环和分子内硫脲成胍反应机理

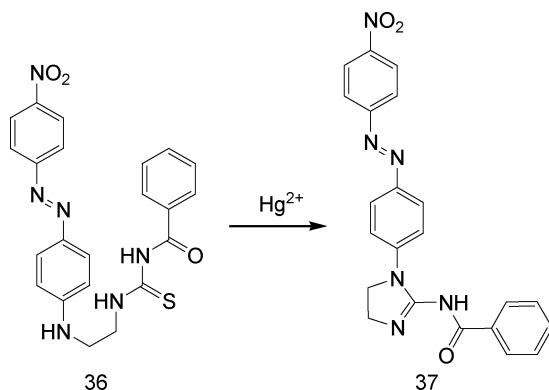


图 4-25 化合物 36 的汞促分子内硫脲成胍反应机理

化合物 36 将识别基团与发色团相连,是一个比色化学传感器。在 $\text{DMSO}-\text{H}_2\text{O}$ (体积比 80 : 20)溶液中与 Hg^{2+} 反应后生成产物 37,发色团给电子端的推电子能力减弱,从而使得吸收峰发生蓝移(从 486 nm 到 406 nm),溶液的深黄色褪去变为无色。通过与 Hg^{2+} 1 : 1 的计量反应,可以在 $\text{pH}=4\sim 9$ 的范围内对 Hg^{2+} 进行识别。

2005 年,Tae 等人利用 Hg^{2+} 促进氨基硫脲转化为噁唑的经典反应,合成

了对 Hg^{2+} 有很好选择性识别的罗丹明化合物(图 3-13 中化合物 1), 通过与 Hg^{2+} 1 : 1 的计量反应, 在水-乙醇(体积比 80 : 20)溶液中荧光信号增强 26 倍, 对 Hg^{2+} 的检出限量为 2 ppb。这一传感器可以在室温下对 Hg^{2+} 的快速响应(<1 min), 对 Hg^{2+} 的专一反应确保了其具有很好的选择性, 包括 Ag^+ 在内的其他金属离子对 Hg^{2+} 的检测不构成干扰。传感器良好的水溶性使其可以用于生物样品的检测, 研究者将其成功地用于活体细胞和动物器官内 Hg^{2+} 的实时检测和荧光成像, 这是第一个利用化学传感器进行 Hg^{2+} 活体检测的报道。

4. 羟汞化反应

Ahn 等人^[176]利用汞促进乙烯基醚水解的反应, 设计合成了一个乙烯基醚荧光素衍生物 42(图 4-26)。化合物 42 在 PBS 缓冲液($\text{pH}=7.4$, 含 5% DMSO)中荧光很弱, 加入 HgCl_2 后, 溶液的荧光大大增强, 显示了“关-开”型的荧光信号响应。对化合物 42 进行离子滴定后产物的分离与表征, 表明化合物 42 与 Hg^{2+} 作用后生成了强荧光化合物 43, 化合物 42 与 Hg^{2+} 2 : 1 的化学计量比使荧光强度达到饱和状态, 反应机理如图 4-26 所示。在甲基汞(CH_3Hg^+)存在下, 化合物 42 同样可以发生水解反应, 生成产物 43。相同条件下化合物 42 对甲基汞的荧光光谱滴定实验显示 1 : 1 的化学计量比。这一研究实现了同时对无机 Hg^{2+} 和有机汞的荧光检测, 这对于对生物体具有更大危害的有机汞化合物的检测具有重要意义。研究者还首次对生物细胞内甲基汞的存在进行了荧光成像。

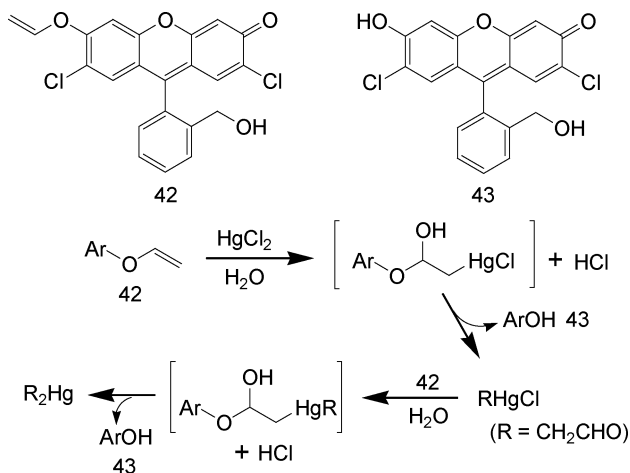


图 4-26 水溶液中化合物 42 在 HgCl_2 和 RHgCl 存在下的水解反应机理

5. 其他类型反应传感

2008年, Torroba等人^[177]报道了第一个对 Hg^{2+} 和 MeHg^+ 能够很好选择性识别的有机钯化合物 44 (图 4-27)。在乙醇-水(体积比 1:1)溶液中, 化合物 44 最大吸收波长为 455 nm, 加入 Hg^{2+} 后, 吸收峰红移到 500 nm, 肉眼可观察到溶液颜色由黄色变为紫色。等摩尔量化合物 44 和 $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$ 的反应生成红色针状晶体, 对晶体的 X 射线衍射分析得到了 $[\text{45}(\text{H}_2\text{O})]\text{ClO}_4$ 的结构, 证明了钯(II)络合物和汞衍生物之间进行甲基转移的反应机理。对比 $[\text{45}(\text{H}_2\text{O})]\text{ClO}_4$ 与等摩尔 44/ Hg^{2+} 在乙醇-水(体积比 1:1)溶液中的吸收光谱, 进一步确认产物 45 的生成导致了吸收光谱的变化。 ^1H 和 ^{31}P NMR 滴定实验也显示了钯络合物中甲基峰的消失, 为甲基转移反应机理提供了佐证。在等物质的量的 44/ Hg^{2+} 混合溶液中, 交替加入二巯基化合物 46 和 Hg^{2+} , 溶液颜色及吸收光谱均显示出可逆变化, 表明化合物 44 是一个可再生的反应型化学传感器, 同时化合物 45 可以作为对 MeHg^+ 选择性识别的比色化学传感器。化合物 44 对 Hg^{2+} 具有很好的选择性和很高的灵敏度, 对 Hg^{2+} 的检出限量为 $0.3 \mu\text{mol/L}$ 。

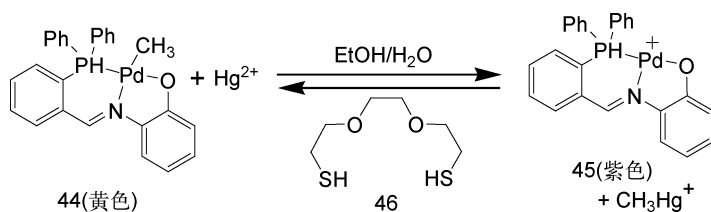


图 4-27 化合物 44 与 Hg^{2+} 之间的甲基转移反应机理

相对于传感器分子与检测对象之间以非共价力络合的超分子体系, 反应型化学传感器由于对检测对象专一的反应, 从而具有很好的选择性, 成为当前传感器发展的方向之一。相对来说, 反应型化学传感器在 CN^- 和 Hg^{2+} 的检测方面已经有了很大发展, 而将其应用于其他离子及有毒中性客体的检测依然是一项具有挑战性的工作。开发新型的具有选择性的反应需要研究者大量艰苦的工作, 基于对一些已有反应的应用和改进, 可设计合成更多反应型指示剂。将对检测对象专一的化学反应与能够对识别事件进行有效的信号传递及表达的基团相结合, 是提高传感器选择性与灵敏度的关键。

6. 分子内环化硫脲衍生物的鸟苷酸化

胍是重要的化合物, 它不但是许多与生物相关的化合物模块, 而且也是有

机合成中重要的碱催化剂。因此胍的合成受到了重视。由此氨的鸟苷酸化的许多方法被研究,包括氨和硫脲衍生物通过运用 Mukaiyama 试剂的反应调节及使用钛催化碳化二亚胺的氢胺化反应,使用钒酰亚胺化合物和二碘化钐作为催化剂^[178]。另外, $\text{Hg}(\text{II})$ 可以有效激发分子内和分子间鸟苷酸化。尽管对 $\text{Hg}(\text{II})$ 催化的硫脲分子间转化为胍的研究已经有一段历史了,但还是很少被注意到这是个潜在的荧光底物反应,因为最多的硫脲衍生物有同样的颜色或荧光,像胍类化合物一样。图 3-21 中的探针是第一个基于 $\text{Hg}(\text{II})$ 激发分子间环化鸟苷酸化的荧光化学比例计。

尽管很多努力去提高 $\text{Hg}(\text{II})$ 化学比例计对金属离子的响应性、扩大激发范围、提高发射波长和量子产率,但它们的生物应用因为水溶性和较差的灵敏性而受到限制。为了解决这个问题, Kim 组合成了 Nile Blue(II) 的新衍生物,研究了在 100% 水溶液中检测 $\text{Hg}(\text{II})$ 的化学比例计性能^[179]。室温下(pH 值在 2~9 范围内)探针 11 对 $\text{Hg}(\text{II})$ 有高效的比色和荧光比率检测效果,而且选择性非常好,特别是容易对硫元素有响应的 $\text{Cu}(\text{II})$ 和 $\text{Ag}(\text{I})$ 的荧光没有变化(图 4-28)。

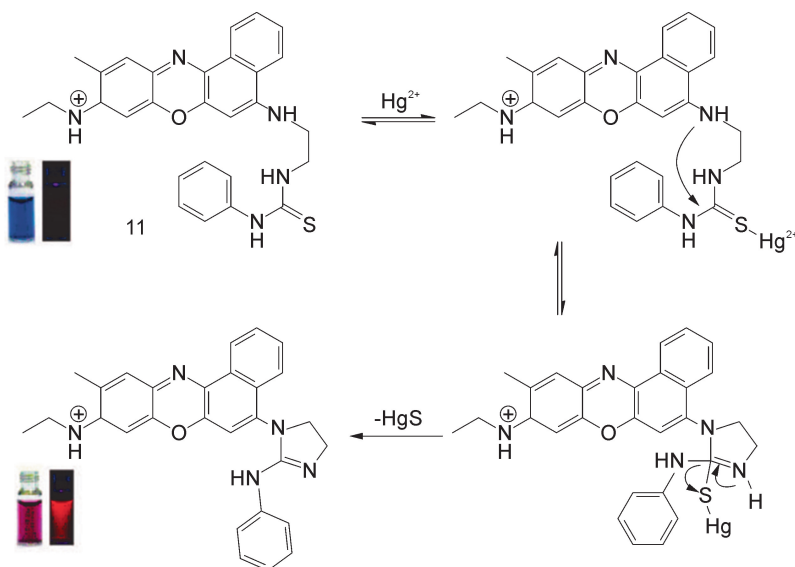


图 4-28 化学反应型荧光探针 11 对于 Hg^{2+} 的检测机理

7. 化学反应型荧光探针对于 Cu^{2+} 的检测

Weiying Lin 等人^[180]发展出了一种以罗丹明为荧光团、基于 FRET 机理

的对于 Cu^{2+} 响应的荧光探针。如图 4-29 所示,铜离子与荧光探针一端的酰胺络合,螺环开环,酰胺分解成了羧酸,FRET 效应由“关”变成了“开”,荧光发射光谱显出比率荧光图像,呈现出了非常大的荧光比率(1 581 nm/1 473 nm)和两个明显的峰形变化。此荧光探针另有一些突出特点,包括高灵敏度、高特异性、低毒性和良好的细胞膜通透性。

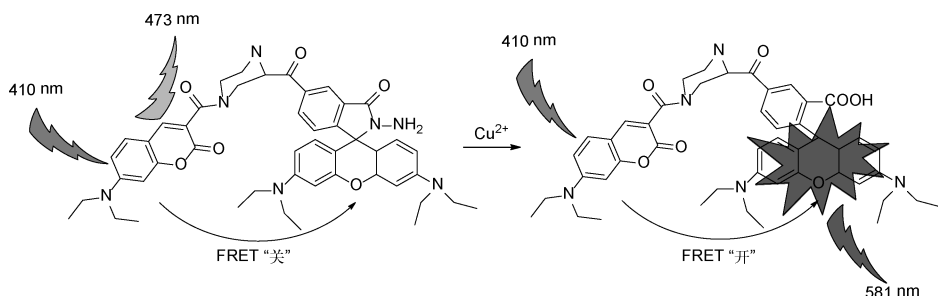


图 4-29 基于 FRET 机理的荧光探针对于 Cu^{2+} 的检测机理

ChingHsuan Tung 等学者^[181]设计制备出了一种苯并唑联炔类荧光探针。铜的催化在有机合成中起着十分重要的作用,因此铜的金属有机性质如图 4-30 所示。在酸根的作用下, Cu^{2+} 转变为 Cu^+ ,进而 Cu^+ 与探针上一端的炔烃反应生成了荧光淬灭的金属有机物。这一反应表明该探针对于 $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^+$ 有比较好的灵敏性与选择性。

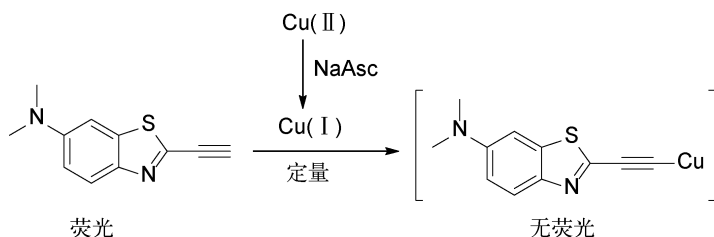
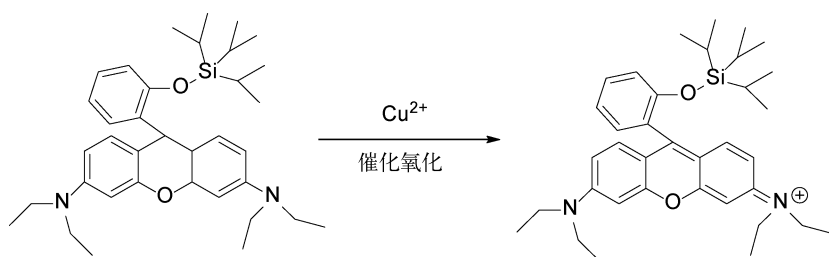


图 4-30 化学反应型荧光探针对于 Cu^{2+} 的检测机理

Weiying Lin 课题组^[182]研制出了利用 Cu^{2+} 催化氧化作用的荧光探针。如图 4-31 所示,在 Cu^{2+} 作用下,荧光淬灭的探针在水溶液中被氧化为有荧光发射的溶液体系。实验表明,在存在其他金属阳离子时,荧光探针不能被氧化,因此荧光强度也就没有发生变化。并且随着 Cu^{2+} 浓度的增加,该荧光探针的荧光强度也随之增加,表现出了高选择性和高灵敏性。

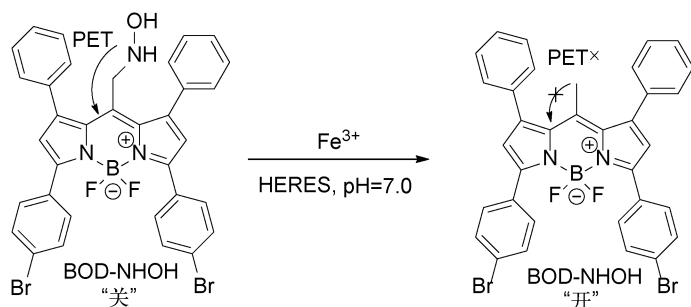
图 4-31 化学反应型荧光探针对于 Cu^{2+} 的检测机理

8. 螺环化合物系统的开环

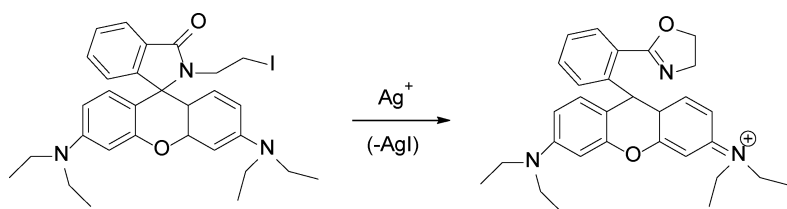
Czarnik 组利用罗丹明 B 衍生物的开环反应设计了检测 $\text{Cu}(\text{II})$ 的化学比例计探针^[56]。

9. 其他金属离子的检测

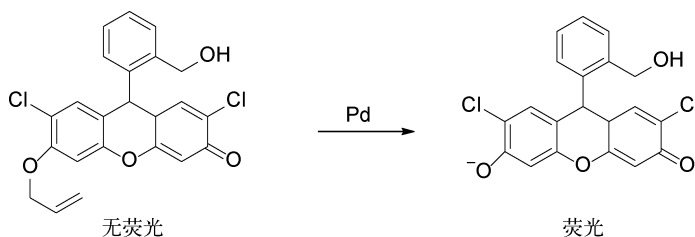
如图 4-32 所示, 荧光探针主要由两部分组成, BODIPY 荧光团和羟胺基团。加入 Fe^{3+} 之前, 由于羟胺基团供电子产生 PET 效应, 导致荧光探针淬灭。加入 Fe^{3+} 之后, 通过 Fe^{3+} 的氧化将羟胺基团变为甲基, 甲基不能供电子, 所以 PET 效应消失, 荧光探针的荧光强度增强^[183]。此荧光探针对于 Fe^{3+} 有很好的选择性, 同时在 $\text{pH}=6\sim 8$ 范围内比较稳定, 适合于生理环境下的细胞显影实验。

图 4-32 化学反应型荧光探针对于 Fe^{3+} 的检测机理

Amrita Chatterjee 等人^[184]发展了一种用于检测 Ag^+ 的化学反应型的荧光探针。研究者以罗丹明为荧光团, 巧妙利用 Ag^+ 与 I^- 反应生成 AgI 沉淀设计出检测 Ag^+ 的荧光探针。如图 4-33 所示, 中间经历的化学过程包括了化学键的断裂与重排, 最终形成了一个五元杂环。前后无论是在可见光下还是在 365 nm 紫外灯下, 颜色都发生了明显的变化。该探针不仅可以用来检测溶液中的 Ag^+ , 而且还可以检测溶液中的纳米银粒子。

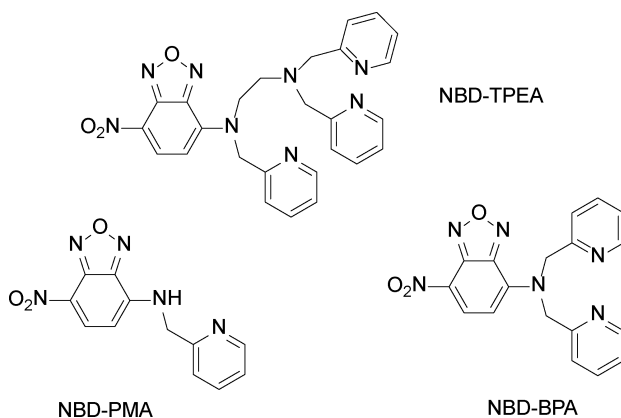
图 4-33 化学反应型荧光探针对于 Ag^+ 的检测机理

Kazunori Koide 等人^[185]研制出了通过化学反应来检测 Pd^0 的荧光探针。如图 4-34 所示,连接在荧光团上的烯丙基与 Pd^0 发生加成反应,在亲核试剂的进攻下,这一部分发生脱落,从而使得荧光探针前后的吸收和荧光发射发生明显变化。

图 4-34 化学反应型荧光探针对于 Pd 的检测机理

4.2 络合型检测基团

DPA 基团用于检测 Zn^{2+} 有很好的选择性^[186](图 4-35)。

图 4-35 用于 Zn^{2+} 检测的络合型荧光探针

铱(Ⅲ)络合物在 CH_3CN 中与锌的络合性质也被研究。发射强度的变化归因于锌离子与 DPA 单元的特异性结合。值得注意的是,加入锌离子后,复合物 1a 和 2a 均显示红移,但对配合物 3a 和 4a 没有观察到类似的反应。由于预期锌离子与 DPA 部分的胺的配位分别导致 MLCT 发射的红移和 NLCT 发射的蓝移,因此复合物 1a 和 2a 的这种红移意味着 NLCT 特征的显著抑制,以及随后在它们的发射状态中的 MLCT 特征的流行。复合物 1a 和 2a 的 MLCT 状态的极性依赖性,复合物 3a 和 4a 的极性不敏感的 IL 特征在络合过程中变得有利^[187](图 4-36)。

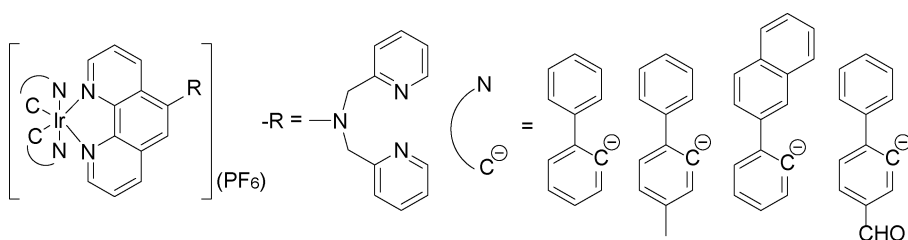


图 4-36 荧光探针对铱(Ⅲ)的络合

关于染料附着的大环 L^2 -溶液和固态研究^[188]也已开展(图 4-37)。现在已经报道了许多基于金属离子诱导的电荷转移现象的发色系统,包括使用大环作为金属结合位点的系统。使用偶氮-大环衍生物 L^2 的这种类型应注意,染料附着系统 L^2 具有与 L^1 中相似的大环金属配位结构域,因此预期这两种配体都具有平行的金属结合行为。硝酸铜(Ⅱ)(6)和高氯酸铜(Ⅱ)(7)络合物的

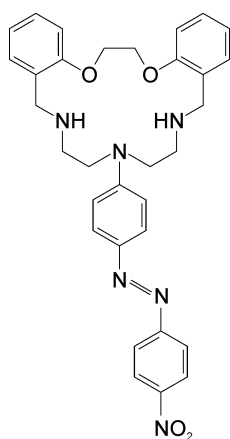


图 4-37 L^2 配体结构式

的 X 射线结构已获得,在复合物 6 的情况下,X 射线分析证实了 1:1 种类型 $[\text{Cu}(\text{L}^2)\text{NO}_3]\text{NO}_3 \cdot \text{CH}_2\text{Cl}_2$ 中 $\text{Cu}(\text{II})$ 离子具有六配位环境,铜与 L^2 的三个氮供体和一个来自受约束的单原子螯合硝酸盐配体的氧结合;来自大环配体的两个醚氧也与铜弱相互作用: $\text{Cu1} - \text{O1} 3.048\text{\AA}$, $\text{Cu1} - \text{O22} 2.912\text{\AA}$ 。第二硝酸根阴离子不配位($\text{Cu1} - \text{O104} 3.333\text{\AA}$,未显示)。涉及具有连接偶氮取代基的叔氮的 $\text{Cu1} - \text{N}_2$ 键 $[2.081(5)\text{\AA}]$ 的存在对于诱导观察到的从游离配体中的红色到本复合物的浅黄色的颜色变化无疑是重要的。在这类发色团中,它是

从供体基团(叔氮)到受体基团(苯并氮杂发色团)的净电子电荷转移,将影响发色团的颜色。 L^2 与 $Cu(II)$ 反应,高氯酸盐产生深色晶体,其X射线分析证实了 $[\{Cu(L^2)\}_2(\mu-OH)_2](ClO_4)_2 \cdot 2CH_2Cl_2 \cdot 2H_2O$ 型的二聚体结构。由于在两个铜原子的中心处存在强制反转,因此不对称单元包含一个 L^2 分子、一个铜原子、一个氢氧根离子和一个高氯酸根离子。该结构包含菱形 $Cu-(OH)_2-Cu$ 核连接两个结合的大环,每个 $Cu(II)$ 是五配位的,与来自一个大环和两个桥连 OH -基团的三个外向取向的仲胺氮结合,两个大环都采用弯曲配置。正如目前类型其他相关的 O_2N_3 -供体大环化合物的 $Cu(II)$ 络合物所发现的一样,二聚体排列中每个大环的大环氧供体不配位。叔(苯胺基)胺 N_2 占据相对于方形平面的轴向位置,产生整体扭曲的正方形锥体配位几何构型。

已知吡咯封端的二乙烯基芳族体系12是用于合成电致变色13和低带隙14聚合物的强荧光结构单元^[189]。由于已知联吡啶部分是过渡金属离子的良好配体,因此使用Wittig-Horner反应设计了一些吡咯封端的5,5'-二乙烯基-2,2'-联吡啶衍生物(图3-50中3a—c)。相应地,吡咯甲醛(1)和2,2'-联吡啶二磷酸盐(2)的产率为25%~40%。

从机械学观点来看,具有柔性配位几何形状的d10电子配置的抗磁性 Zn^{2+} 有利于特异性结合。结合 Zn^{2+} 后,由于两个吡啶基部分之间的扭转角减小,3c的吸收和发射发生红移,导致 $3c-Zn^{2+}$ 络合物的近平面构象,从而改变初始荧光“开”状态A到“开”状态B,顺磁性 Cu^{2+} 的结合使发射猝灭以形成荧光“关”状态。因此,荧光技术成为在与生物样品相容的发射波长下区分 Zn^{2+} 与其他竞争阳离子的有效视觉工具。

口服活性铁螯合剂可用于治疗与地中海贫血和相关疾病相关的铁超负荷。30多年来,药物化学家一直在寻找合适的铁选择性口服活性剂。图4-38为5种铁(III)的配体,双齿配体和三齿配体都被认为是主要的候选物,因为它们具有低分子量和穿透细胞的能力。三齿配体与双齿配体相比被认为是优异的清除剂,因为它们不太可能形成不完全配位的铁(III)的配合物。在 $pH=7.4$ 时,一些三齿配体利用氧和氮原子来配位铁(III)。与“硬”氧原子(具有高电荷密度的氧原子)相比,氮原子结合高自旋铁(III)的能力较低。配体具有明显的结合铁(II)和铁(III)的能力,由于氧化还原循环而具有潜在的毒性,导致产生有毒的羟基自由基。此外,含有氧和氮的配体的铁选择性降低,并且在生理条件下将结合其他金属离子如锌和镍。原则上,使用含有三个“硬”供氧原

子的三齿配体可以实现最佳的铁(Ⅲ)选择性。基于此,研究者尝试设计这种基于 1,2-二甲基-3-羟基吡啶-4-酮 3(去铁酮)和三个潜在螯合氧原子的化合物(化合物 4、化合物 5)。虽然这些螯合剂原则上能够以三齿模式结合铁(Ⅲ),但使用 pH 依赖性紫外分光光度滴定未能提供任何三齿螯合的证据,反而证实了双齿配位。结论是,与第三配体的参与相关的熵损失超过了在三齿模式下配位铁(Ⅲ)所获得的焓。

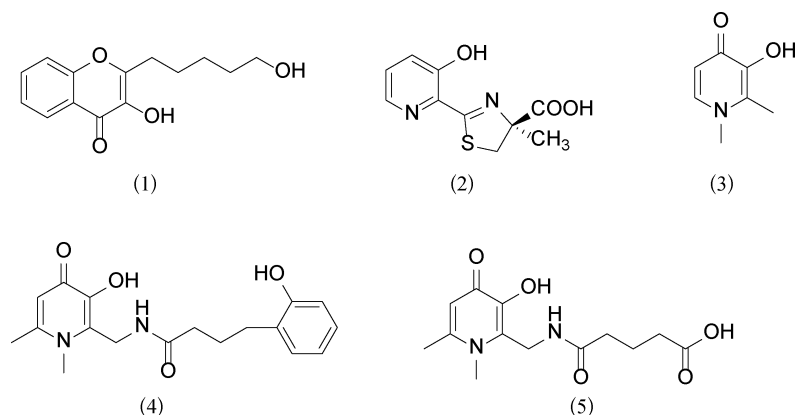


图 4-38 铁(Ⅲ)的配体

大多数重金属离子和过渡金属离子一般与探针/受体分子相互作用引起非特异性荧光淬灭。例如, Hg^{2+} 和顺磁性 Cu^{2+} 金属离子通常会引起荧光淬灭,原因分别是能量或电子转移机制的增强旋轨耦合(图 4-39)。

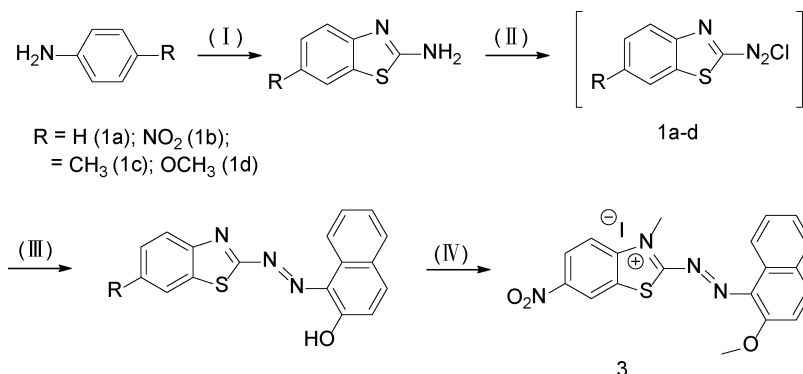


图 4-39 能量或电子转移机制引起荧光淬灭

以 BODIPY 为荧光团,化合物 26^[190] 是一种 PET 型的 Hg^{2+} 荧光传感器。

在甲醇中,化合物 25 与 Hg^{2+} 作用后,在 520 nm 波长处的荧光明显增强,络合比为 1 : 1,同时它能够在 HeLa 细胞中对 Hg^{2+} 成像(图 4-40)。

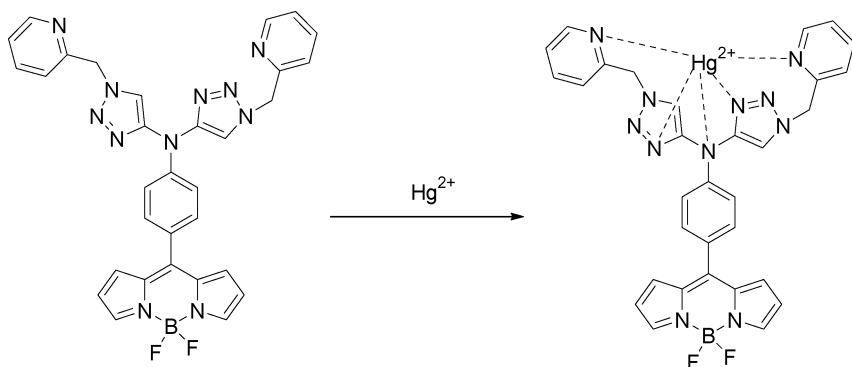


图 4-40 一例基于 PET 机理的 Hg^{2+} 荧光传感器

化合物 27^[191]也是基于 PET 的 Hg^{2+} 荧光传感器。在 $\text{CH}_3\text{CN} : \text{H}_2\text{O}$ 的体积比为 3 : 2 的溶液中, Hg^{2+} 与化合物 27 的哌嗪和三唑中的 N 络合后,降低了荧光团 BODIPY 的电子密度,荧光淬灭,该反应是一个具有氧化特性的 PET 过程(图 4-41)。

很多基于 ICT 机理的荧光传感器是这样设计的:将含 N 的识别基团直接连接到荧光团上,N 对荧光团和金属离子都起到了电子供体的作用。

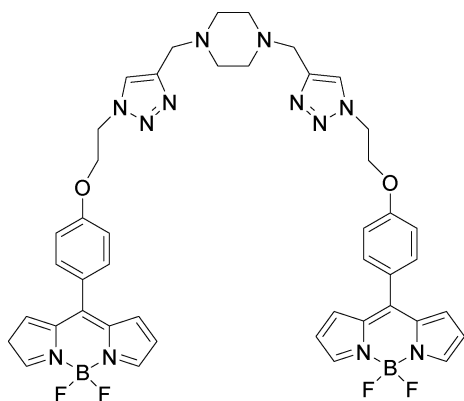
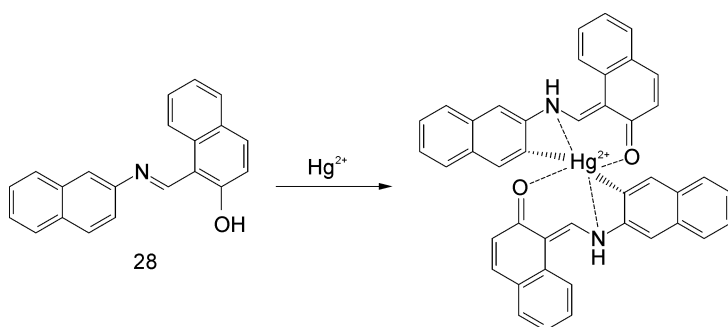
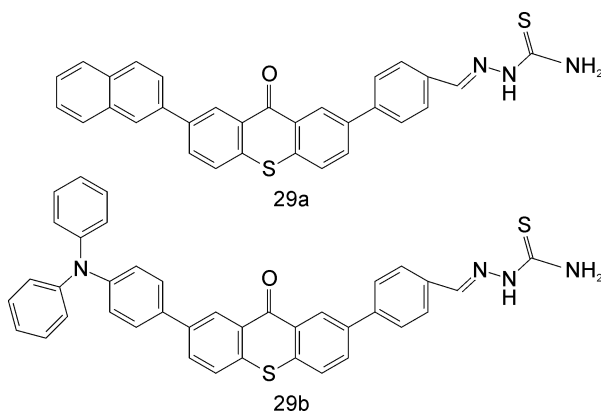
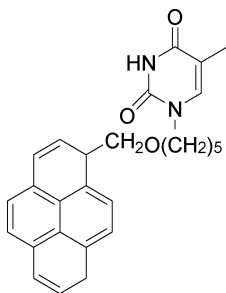


图 4-41 基于 PET 机理的 Hg^{2+} 荧光传感器 27

化合物 28^[192]是一种基于 ICT 机理的 Hg^{2+} 荧光传感器,是由两个蔡基团构成的席夫碱结构。在 DMSO 溶液中,化合物 28 与 Hg^{2+} 的络合比是 2 : 1。未加入 Hg^{2+} 时,化合物 28 因为 ICT 的作用,两个蔡分子不在同一平面上,故而以 356 nm 波长激发,化合物 28 本身没有荧光发射。化合物 28 与 Hg^{2+} 络合后,以 356 nm 波长激发,在 413 nm 波长处发射出蓝色荧光,溶液颜色由黄色褪为无色,实现了裸眼识别。化合物 28 对 Hg^{2+} 的响应时间为 150 min (图 4-42)。

图 4-42 基于 ICT 机理的 Hg^{2+} 荧光传感器 28

化合物 29a 和 29b 也是基于 ICT 机理的荧光传感器^[193], 它们均能识别 Hg^{2+} 和 F^- 。在紫外灯下, 与 Hg^{2+} 作用后, 化合物 29a 由深蓝色变为黑色, 化合物 29b 由黄色变为黑色。在 THF 溶液中, 化合物 29a 和化合物 29b 对的检测限分别是 $3.0 \times 10^{-8} \text{ mol/L}$ 和 $4.9 \times 10^{-8} \text{ mol/L}$ (图 4-43)。

图 4-43 基于 ICT 机理的 Hg^{2+} 荧光传感器 29a 和 29b图 4-44 激基缔合物型 Hg^{2+} 荧光传感器 30

在激基缔合物型 Hg^{2+} 荧光传感器的研究中, 蔡、蒾、苾等荧光团常被用于激基缔合物型荧光传感器的设计合成, 这是因为它们具备较长的激发单线态寿命, 容易形成激基缔合物, 化合物 30^[194] (图 4-44) 是此类型的 Hg^{2+} 荧光传感器。化合物 30 与 Hg^{2+} 能形成“T-Hg-T”键, 同时随着 Hg^{2+} 的不断加入, 激基缔合物的峰逐步增强。

利用配体分子与镉离子的整合, Mahajan 等人^[195]

合成了 N -甲基靛红(N -MI),并将其制备成纳米粒子(N -MINPs),用于 Cd^{2+} 的荧光检测。 N -MI 分子溶解在溶液中时,有强烈的蓝绿色荧光(激发波长 347 nm,发射波长 495 nm);形成纳米粒子后,单体分子之间的 π - π 叠加作用使得溶液呈蓝色荧光(激发波长 298 nm,发射波长 417 nm)。 Cd^{2+} 加入后,由于 N -MI 分子与 Cd^{2+} 的配位作用而形成纳米粒子(N -MINPs)/ Cd^{2+} 复合物,其体系的荧光增强。在水溶液中, N -MI 分子由于疏水性,会逐渐聚集形成纳米粒子。此纳米粒子的分散溶液,在 298 nm 激发光下,可以观测到 417 nm 的荧光。 Cd^{2+} 加入溶液中,与纳米粒子形成复合物,溶液在 417 nm 处的荧光增强。由于其对镉离子的高选择性及 N -MINPs 与 Cd^{2+} 之间高结合常数,使得该探针体系能够实现对痕量 Cd^{2+} 的检测。

Azadbakht 等人^[196]报道了一种基于 ESIPT 机理的 Al^{3+} 荧光探针。向该探针中加入 Al^{3+} 之后会导致其吸收光谱和荧光发射光谱均发生明显变化,因此该探针也可以对 Al^{3+} 进行比色和荧光的同时检测。实验结果表明,加入 Al^{3+} 会使荧光显著增强,这主要是因为探针自身存在着烯醇胺和烯胺酮的互变异构,存在 ESIPT 现象,当该探针与 Al^{3+} 配位之后,这种 ESIPT 现象会得到抑制,从而使荧光发生明显地增强。

Alici 等人^[197]合成出来一个基于氰基联苯结构的配体,作为 Al^{3+} 的荧光探针,并对该探针对 Al^{3+} 的识别机理进行了研究。由于该探针中的席夫碱 N 原子上具有孤对电子,存在着向联苯结构的光诱导电子转移的 PET 现象,因此在乙腈和水的混合溶液中,探针自身几乎不发射出荧光;而当在探针中加入 Al^{3+} 之后,该探针和 Al^{3+} 的配位会抑制 PET 现象,从而导致荧光显著增强。该课题组还测定了该探针对 Al^{3+} 的响应时间,结果表明该探针对 Al^{3+} 的荧光响应非常迅速,大概在 30 s 之内荧光就增强到最高值。该课题组的工作克服了以往大多数 Al^{3+} 荧光探针响应比较慢的缺点,可以对 Al^{3+} 进行实时检测。

4.3 冠醚类检测基团

Coppersensor-1(CS1)是一种新的水溶性、开启式荧光传感器,具有高选择性和对 Cu^{+} 的敏感性^[198],其合成机理如图 4-45。这种基于 BODIPY 的试剂是第一个具有可见激发和发射分布的 Cu^{+} 响应探针,并且为检测该离子提

供了 10 倍的“开”响应。CS1 结合的 BODIPY 荧光报告基具有良好的光学性质和生物相容性,富含硫醚的受体能有选择性且稳定地结合水中的 Cu^+ 。苯基桥联 BODIPY 带硫醚大环化合物用于检测 Cu^{2+} 在乙腈溶液已经被报道。CS1 显示了 apo 形式的弱荧光 ($\Phi = 0.016$) 由于高效的 PET 淬灭通过 azatetrathia 受体。加入 Cu^+ 后,CS1 的荧光强度增加大约增加 10 倍 ($\Phi = 0.13$),略带蓝色发射最大值偏移到 561 nm。

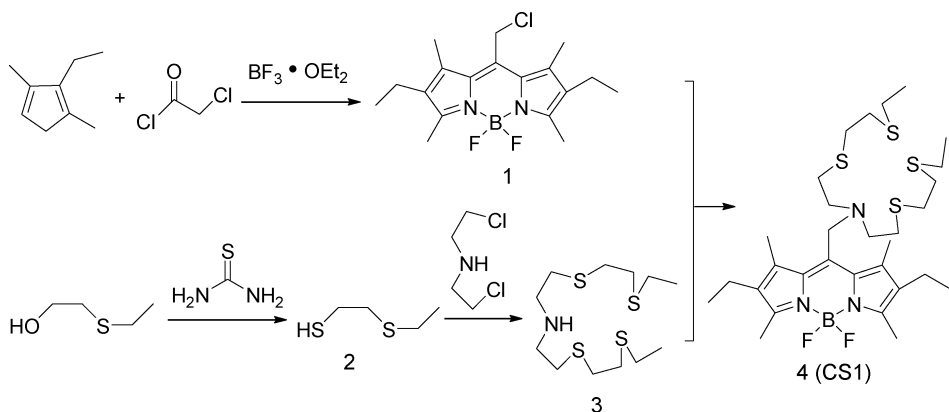


图 4-45 Coppersensor-1 (CS1) 的合成

结合这种几乎解耦的探头设计,允许有效的荧光开关具有选择性地开发了 thia aza 冠受体产生染料 1 (图 4-46),该资料有强烈的荧光增强选择性检测 $\text{Hg}(\text{II})$ 、 $\text{Ag}(\text{I})$ 和 $\text{Cu}(\text{II})$ ^[199],在 1 的 BDP 受体和苯胺供体单元的系统中

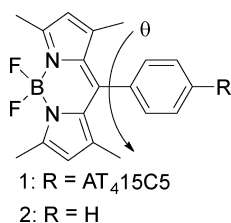


图 4-46 染料 1 的化学结构式

高度扭曲并且很大程度上解耦。吸收在任何极性的溶剂中的光谱在 500 nm 处显示 BDP 发色团的特征,没有观测到明显的电荷转移(CT)带。相反,发射光谱是强溶剂依赖性的。在比烷烃极性更大的溶剂中,荧光强烈淬灭,观察到双重发射。BDP 吸收带的激发导致局部激发(LE)状态,可以经历超快激发态对高极化发射 CT 状态的反应,而 BDP 局部的,窄的 LE 发射带的镜像形状在 510 nm 处对溶剂极性不敏感,随着溶剂极性增加,红移、宽、无结构的 CT 带位移到更低能量。原因是 CT 状态的稳定。时间分辨荧光测量显示两个激发态的前驱-后继平衡。

Baruah 组 ^[200] 合成的荧光探针对于 K^+ 有高度识别性,氮杂-18-冠醚-6 作

为 K^+ 的螯合物通过荧光团 BODIPY 的 3 位的氮原子连接,探针的结构增加了在 BODIPY 的 3 位碳原子和连接氮杂冠醚环的氮原子之间的化学键的扭转角度,将氮原子的孤对电子推离共轭 π 系统,ICT 能有效淬灭荧光。在乙腈溶液中络合 K^+ 后,吸收蓝移 20 nm,在 505 nm 处,发射峰在 525 nm,胺的电子给体性能减小,ICT 过程被部分阻止,荧光强度增加。

Atilgan 组^[201]在 BODIPY 染料探针中引入双倍的苯乙烯基缩合,逐渐滴入 Hg^{2+} 后,690 nm 处吸收峰下降,650 nm 处吸收峰上升,峰强度增加,其他金属离子无效。 Hg^{2+} 紧紧络合在二噻吩氮杂冠配体上后有大的光谱重叠。

有不同接受器的 BODIPY 染料探针由 Bozdemir 组^[202]研究,如图 4-47 所示,二硫氮杂冠配体对 Hg^{2+} 的选择性超过了其他金属离子,二甲基吡啶酰胺配体对 Zn^{2+} 有高识别能力,可以使用不同的金属离子作为输入来设计分子逻辑门。

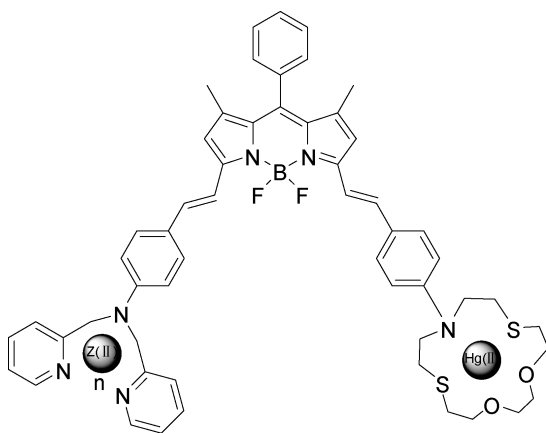
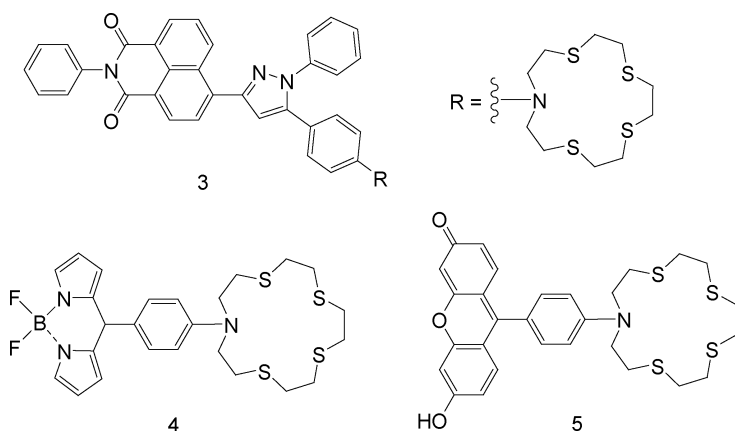


图 4-47 BODIPY 染料探针同时络合 Zn^{2+} 和 Hg^{2+}

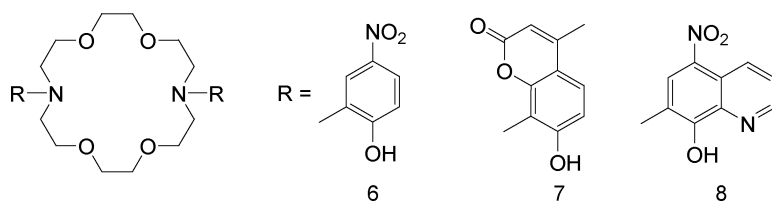
冠醚类化合物常被用来选择性结合各种阳离子,也使得其成为设计 Hg^{2+} 化学传感器的首选。Rurack 等人^[203]以硫原子代替冠醚中氧原子,使得其对 Hg^{2+} 等其亲硫的重金属离子有着较好的选择性。以此为基础,他们设计了一系列 Hg^{2+} 的化学传感器(图 4-48)。

最初的冠醚类 Hg^{2+} 传感器 3 以吡啶作为荧光基团。测试的结果表明,加入 Hg^{2+} 后传感器 3 的荧光光谱位置没有发生改变,但强度有所增加。该传感器有较好的选择性,灵敏度很高,最低检出限为 5×10^{-7} mol/L。后来,Rurack 等人^[199]又将类似的冠醚结构与另一种荧光基团(硼化二吡咯甲基)相连得到化合物 4,作为 Hg^{2+} 的化学传感器。这种硼化二吡咯甲基基团有好的光稳定

图 4-48 Hg^{2+} 化学传感器 3~5 的分子结构式

性、高的荧光量子产率($\Phi > 0.5$)以及能在较长波长下(约 500 nm)激发等优点。最近,Chang 等人^[204]报道了荧光化学传感器 5,因发生 PET 过程,传感器 5 本身无荧光,而 Hg^{2+} 与其结合后荧光增强超过 170 倍($\Phi = 0.16$),研究者用传感器 5 检测鱼中存在的汞,可达到其安全检测限的范围。

除了含 S 的冠醚外,含 N 的冠醚也被用于 Hg^{2+} 化学传感器的设计。早在 1995 年,Porter 等人^[205]设计并合成了化合物 6 和化合物 7 作为 Hg^{2+} 的选择性提取剂,并指出在 Hg^{2+} 配位后,化合物 6 和化合物 7 的吸收光谱有红移。Savage 等人^[206,207]在此基础上,设计了化合物 8 作为 Hg^{2+} 的化学传感器。在甲醇:水(体积比为 70:30)溶液中,化合物 8 只同 Hg^{2+} 、 Cu^{2+} 和 Cd^{2+} 形成配合物,而与其他离子的配合常数很小($\lg K_a < 2.5$)。在同 Hg^{2+} 配合后,传感器 8 的荧光明显增强,检出限为 10^{-8} mol/L。而 Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 的配合物没有荧光。此外, Hg^{2+} 能将 Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 等离子从其配合物中取代出来,形成有荧光的配合物。因此 Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 等离子对 Hg^{2+} 的检测并不产生干扰(图 4-49)。

图 4-49 Hg^{2+} 化学传感器 6~8 的分子结构式

纯冠醚结构对 Hg^{2+} 配合能力差。但 Sancenon 等人^[208]的研究表明,开链

多醚对 Hg^{2+} 的结合较好,并以此为基础设计合成了化合物 9、化合物 10 和化合物 11 以期能找到合适的 Hg^{2+} 化学传感器。这一系列化合物在可见光波段 (460 nm) 有一强吸收峰,其溶液呈橙黄色。在该 3 种化合物溶液中加入 Li^+ 、 Na^+ 、 Ag^+ 、 Hg^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Al^{3+} 等近 20 种离子,只有 Hg^{2+} 使化合物 10 的吸收红移,从而溶液的颜色由橙黄色变为红色。这说明化合物 10 对 Hg^{2+} 有着很好的选择性。此外, Hg^{2+} 对化合物 9 和化合物 11 的影响较小,说明开链醚的链长对 Hg^{2+} 的结合能力有很大影响(图 4-50)。

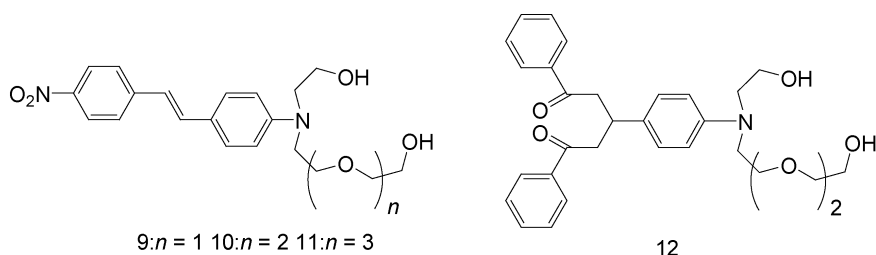


图 4-50 化合物 9~12 的分子结构式

Sancenon 等人^[209]以开链多醚为基础又设计出化合物 12。在二氧六环:水 (体积比为 70:30) 溶液中,加入 Hg^{2+} 使得二酮结构发生关环反应,形成吡喃盐形式,吸收峰从 380 nm 红移到 550 nm。由于采用了与同传感器 10 的相同的识别基团,传感器 12 对 Hg^{2+} 选择性也很高,对 Hg^{2+} 检测限达到了 10^{-9} mol/L。

一种新的高选择性和敏感度、基于 PET 机制、在水溶液中的“关”-“开”荧光 Cd^{2+} 传感器 1^[210] 被报道。为了在水溶液中获得真正高灵敏度和选择性的 Cd^{2+} “关”-“开”传感器,具有潜在的实际应用,选择 BODIPY 作为荧光团,引入吸电子基团的氰基 8b 和类似于冠的水溶性聚酰胺作为受体。当向探针溶液中加入 Cd^{2+} 时,在 562 nm 处出现新的吸收峰,并且在 578 nm 处的吸收峰降低,等吸光点在 566 nm 处。570 nm 处的荧光强度显著增强约 195 倍,并且量子产率增加约 100 倍(高达 0.3),而波长没有变化。传感器 1 可以用于定量检测 Cd^{2+} 浓度(图 4-51)。

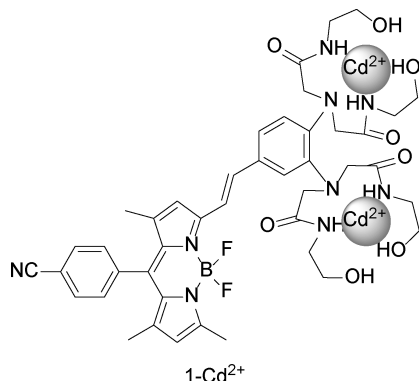


图 4-51 传感器 1 络合机理

Li 等人^[211]设计并合成了一种基于冠醚结构的芳香环化合物,并将其作为 Al^{3+} 的比率型荧光探针进行研究,而且还研究了该探针针对 Al^{3+} 的识别机理。实验结果表明,在该探针中加入 Al^{3+} 之后,会使荧光发射光谱发生明显的红移,而且颜色发生明显的变化。这主要是由于加入 Al^{3+} 之后,形成的配合物的最低未占轨道的能量更低,导致了 ICT 的增强。亮点在于,所合成的这种探针既可以对 Al^{3+} 进行比色检测,又可以作为比率型荧光探针针对 Al^{3+} 进行检测,并且用肉眼就可以分辨出加入 Al^{3+} 前后荧光颜色的变化(图 4-52)。

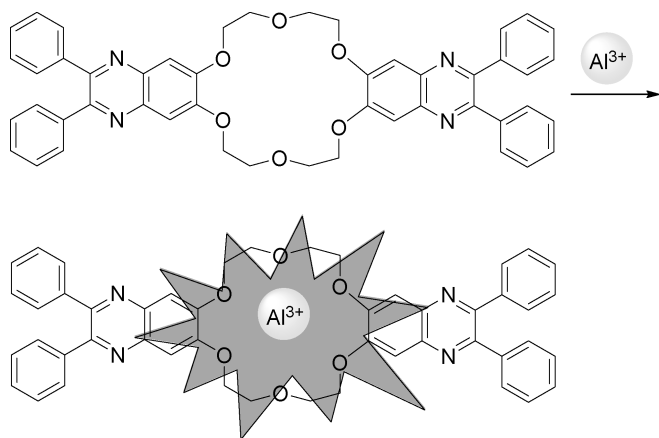


图 4-52 比率型荧光探针识别铝离子原理

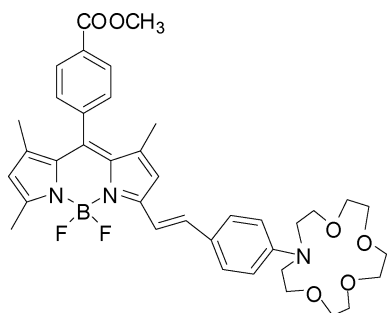


图 4-53 化学传感器 53 的结构式

Qin 组^[212]描述了荧光比率型 BODIPY 连氮杂冠醚化学传感器 53(图 4-53)对 K^+ 有高的选择性,能在可见光波长范围内激发。用 BODIPY 作为荧光团通过酚在 3 位偶联大的四氧杂环。比较氮取代的 BODIPY 染料的吸收和荧光性能,有强烈的溶剂依赖性。

质子化以及含金属离子的络合物的构成阻碍了极性激发态的形成,导致了非极性态的荧光的大幅度增加,新 BODIPY 染料是非常敏感的荧光探针,在分析有用的波长范围内对几种金属离子表现了大的吸收和荧光变化。

如图 2-23 所示,化合物 13 和化合物 14 是通过在其 4 位引入给电子单元而衍生出来的新的氮杂冠醚。该类荧光探针能够高效地选择性识别钙离子络

合阳离子,实验结果显示该化合物与钙离子有很强的亲和力^[35]。

4.4 酰胺类检测基团

基于 BODIPY 荧光团和聚酰胺受体设计并合成了一系列 PET 荧光传感器分子^[213]。研究者对照这些传感器分子的光物理特性,配有二、三、四-酰胺受体,提供了深入了解,展望了聚酰胺- Hg^{2+} 相互作用和不寻常的正配合四酰胺- Hg^{2+} 络合作用。另外,传感器 S3 显示出几种有利的传感特性(图 4-54)。

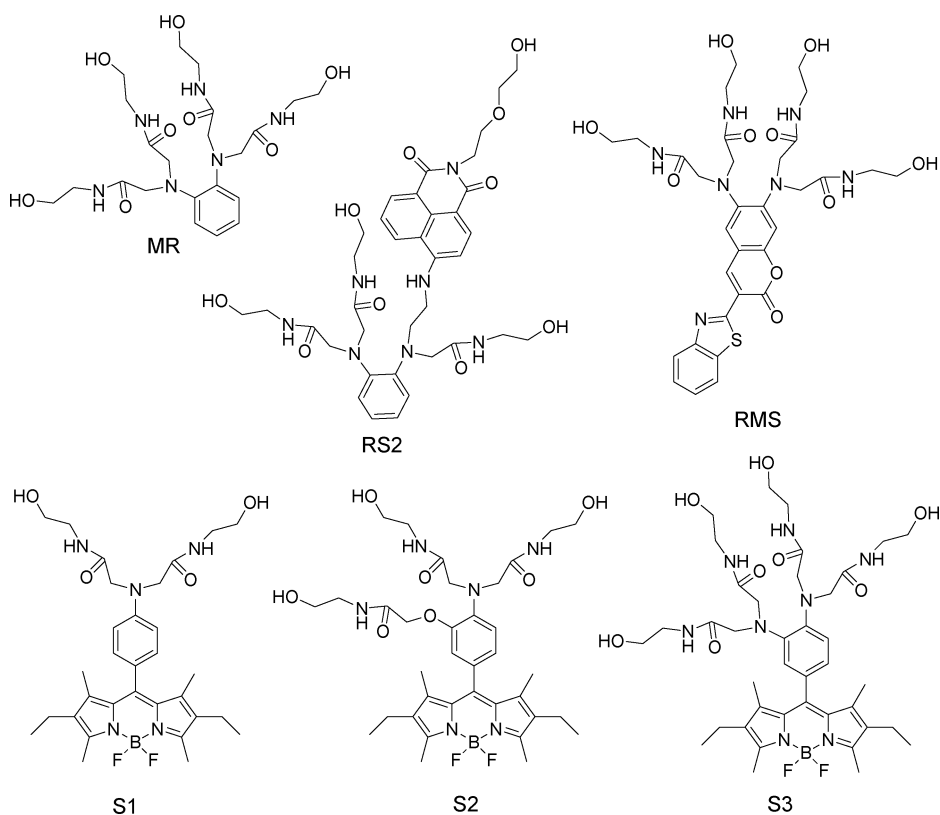


图 4-54 基于 BODIPY 荧光团和聚酰胺受体的一系列传感器分子化学结构式

多胺配体对过渡金属和重金属有着很好的结合性,因而在离子传感器的设计中有着重要价值。然而,由于多胺配体有着较强的结合能力,其选择性往往较低。因此如何提高多胺配体对离子的选择性是化学传感器研究中一个

难点。

Yoon 等人将多胺配体固定在荧光基团上获得一个 Hg^{2+} 化学传感器 13。测试表明,在化合物 13 的溶液中加入 Hg^{2+} 后其荧光强度低了 18 倍。同时,在化合物 13 的溶液中加入 $8\ \mu\text{mol/L}$ 的 Hg^{2+} 以及 $1\ \text{mmol/L}$ 的 Ca^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Cr^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Ni^{2+} 所得到的荧光强度同单独加入 $8\ \mu\text{mol/L}$ 的 Hg^{2+} 所得到荧光强度是一样的。这说明了传感器 13 对 Hg^{2+} 有着很好的选择性(图 4-55)。

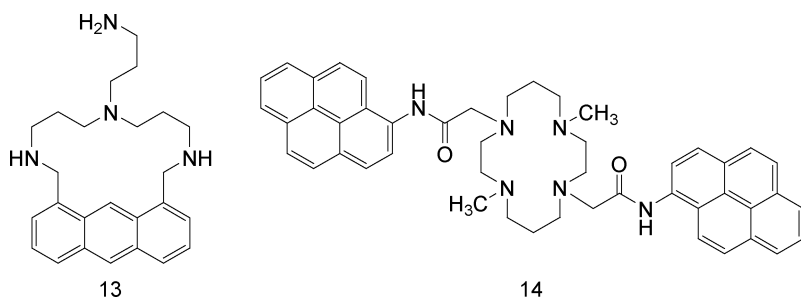


图 4-55 化合物 13、14 的分子结构式

Yoon 等人^[214]还设计合成了以大环多胺为识别基团的荧光化学传感器 14。化合物 14 将两个荧光团对称地接在大环多胺的两侧,并用甲基取代另外两个 N 原子上的氢,以扩大空间位阻,使位于大环多胺两侧的荧光团相互靠近,形成激基缔合物。当大环多胺与 Hg^{2+} 配合后,由于环内张力的增加,激基缔合物的结构被破坏,因此其荧光强度随着 Hg^{2+} 浓度的增加而下降直至完全被淬灭。化合物 14 对 Hg^{2+} 检测限达 $1.3\ \mu\text{mol/L}$ 。这种“开-关”型荧光性质是由 Hg^{2+} 离子诱导发生构象变化所致。

化合物 15 是钱旭红等人^[215]合成的 PET 型传感器。羧基亚胺是化合物 15 的荧光团,2,6-二胺甲基吡啶上的 N 既是荧光团的淬灭剂又是金属离子的结合位点。它的半刚性结构可增强与金属离子结合的选择性。羟基的引入则可增强其水溶性。在 $\text{pH}=6.98$ 的 HCl-Tris 缓冲溶液中,化合物 15 自身的荧光较弱($\Phi=0.007$), Zn^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Ag^{+} 和 Pb^{2+} 均能使其荧光不同程度地增强($\Phi/\Phi_0<3$), Hg^{2+} 可以使其荧光增强 17 倍,且红移了 $8\ \text{nm}$,这是由于化合物 15 配合 Hg^{2+} 后,两个荧光团距离缩短了,形成分子内的激基缔合物(excimer)。而其他金属离子的加入并不影响其荧光行为(图 4-56)。

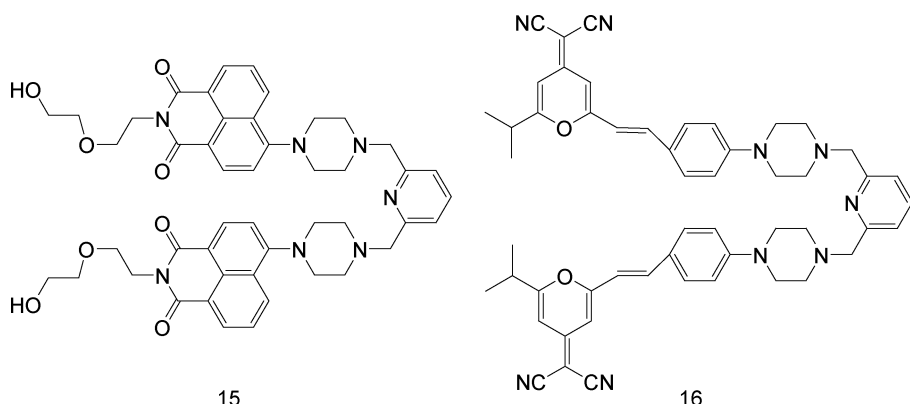


图 4-56 化合物 15、16 的分子结构式

朱为宏等^[216]以 DCM 染料作为荧光团,二胺甲基吡啶作为识别基团,合成了化合物 16。16 是一个对 Hg^{2+} 和 Cu^{2+} 具有选择性的荧光化学传感器,在乙腈-水(体积比为 4 : 1)混合溶剂中, Hg^{2+} 使其荧光增强, Cu^{2+} 使其荧光淬灭。有趣的是,在 Hg^{2+} 和 Cu^{2+} 的当量配比一定时,改变二者加入的次序,能够产生不同的荧光响应,先加 Hg^{2+} ,后加 Cu^{2+} ,体系荧光增强;反之,先加 Hg^{2+} ,后加 Cu^{2+} ,则体系荧光淬灭。这种次序依赖性的荧光响应使得化合物 16 可以作为具有记忆功能的分子逻辑门器件。

4.5 杯芳烃类 Hg^{2+} 检测基团

杯芳烃在化学传感器的设计中有着非常重要的位置。这是因为杯芳烃类化合物在灵敏度、选择性及配位的效率上都有着独特的优点。同时由于杯芳烃的大小、电子给体的类型及取代基的位置对于离子的选择性有很大的影响,因而在设计时有着较大的灵活性。目前,有关杯[4]芳烃用作金属离子选择性载体的研究最详细。

Talanova 等人^[217]报道了第一个基于杯[4]芳烃的 Hg^{2+} 化学传感器。研究者将蔡磺酰胺衍生物修饰在杯[4]芳烃上得到化合物 17。该化合物的氯仿溶液在 520 nm 处有强的荧光。加入 Hg^{2+} 后,其荧光强度大为减小,并随着 Hg^{2+} 浓度的增加呈线性变化,最低检出限为 10^{-3} mol/L。这种荧光强度的变化是由于 Hg^{2+} 的配位诱发了从磺酰胺基团到 Hg^{2+} 之间的电子

转移。

陈绮英等人^[218]研究了由杯芳烃类含氮冠醚类化合物与丹磺酰氯反应制得对 Hg^{2+} 具有荧光选择性的化合物 18。通过 Job' plot 方法测得化合物 18 与 Hg^{2+} 形成 1 : 1 型配合物。在乙腈-水(体积比为 4 : 1)溶剂中,进行荧光滴定实验,当化合物 18 浓度为 $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$, $\lambda_{\text{max}} = 338 \text{ nm}$ 时,在 520 nm 处出现丹磺酰氯基团的典型发射峰。这可能是由激发态的丹磺酰氯将电子转移给 Hg^{2+} 所致(图 4-57)。

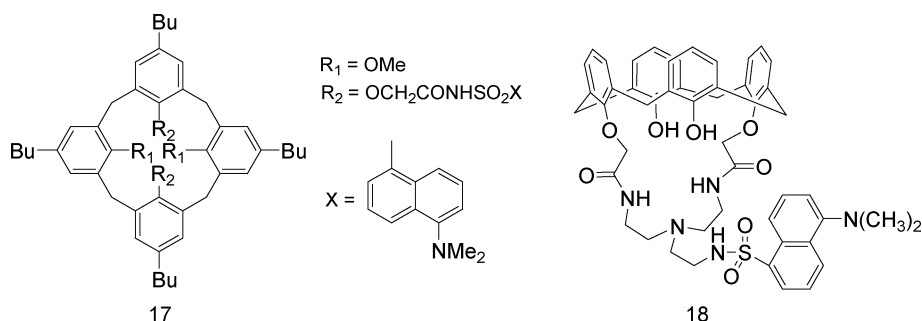


图 4-57 化合物 17、18 的分子结构式

4.6 其他类型 Hg^{2+} 检测基团

卟啉化合物也被用作 Hg^{2+} 的识别基团。Delmarre 等人和 Zhang 等人^[219]报道了这一类型的传感器。Delmarre 等人设计并合成了化合物 20, 在没有 Hg^{2+} 存在时, 化合物 20 在 620~700 nm 处有强的荧光; 加入 Hg^{2+} 后, 荧光的位置没有变化, 但强度随 $M_{[\text{Hg}^{2+}]}$ 的增加而减弱。由于采用的是荧光淬灭机制, 其他重金属离子有一定的干扰, 限制了该传感器的应用。Zhang 等人在此基础上作了改进, 用苯取代化合物 20 中的甲基吡啶, 并将得到的卟啉化合物与光纤设备相连, 得到很好的选择性, 灵敏度也大为提高, 最低检出限为 $5.2 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$ 。

喹啉类衍生物也可作为 Hg^{2+} 的识别基团。Chang 等人^[220]先后设计合成了化合物 21 和化合物 22 作为 Hg^{2+} 的化学传感器。化合物 21 是将 8-羟基喹啉与硼化二吡啶甲基(发光基团)相连; 化合物 22 是将 8-氨基喹啉与苯并

噻唑相连。在二氧六环-水的混合溶剂中,它们均显示了对 Hg^{2+} 的高选择性和高灵敏度。江云宝等人^[221]合成了化合物 23,它能和 Hg^{2+} 形成 1:1 的配合物,同样对 Hg^{2+} 表现出很高的选择性(图 4-58)。

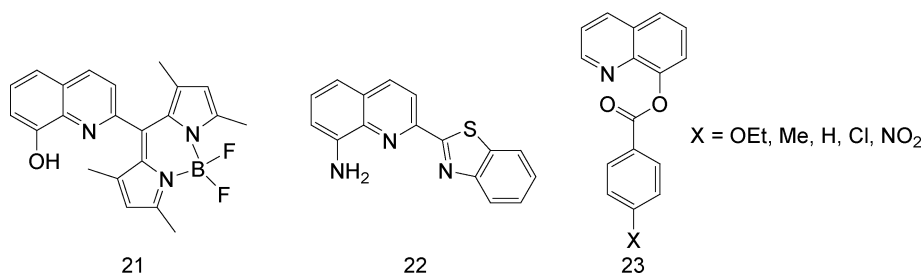


图 4-58 化合物 21~23 的分子结构式

4.7 席夫碱检测基团

席夫碱是具有各种供体原子的配体,其表现出对各种金属的有趣配位模式。

Wang 组^[222]报道了图 4-59 中的化合物 31 的荧光量子产率是 0.002,这是因为电子转移从胺的氮原子到激发态 BODIPY 化合物淬灭发射。在室温下 pH=7 的水溶液中, Cu^{2+} 与化合物 31 的 NO 双齿配体作用激发胺的脱氢反应,使化合物 31 的荧光增强,导致席夫碱- Cu^{2+} 络合物的形成。

Cu^{2+} 加入后,在 596 nm 处荧光增强,量子产率是 0.095,增加 256 倍,其他金属离子没有干扰。反应可以在 pH=5~9 的生理范围内进行,荧光是稳定的,在室温下强度至少可以保持 30 天,加入 EDTA 没有变化,说明化合物 31 和 Cu^{2+} 反应不可逆转。1- Cu^{2+} 配比为 2:1。

Tian 等人^[223]设计并合成了 2-(2-甲酰基喹啉-8-氧基)-N,N-双异丙基乙酰胺(FQDIPA),此分子结构能够与镉离子螯合配位,研究者将其通过席夫碱形式接在硅纳米粒子表面(NC-FQDIPA)。由于硅纳米离子良好的稳定性和生物相容性,改性后的硅纳米离子作为镉离子的载体,并且在酸性条件下席夫碱断裂,FQDIPA 释放出来与镉离子结合。在 pH=3.0 的磷酸缓冲溶液中,NC-FQDIPA 溶液在 502 nm 处出现微弱的荧光发射峰(量子产率为

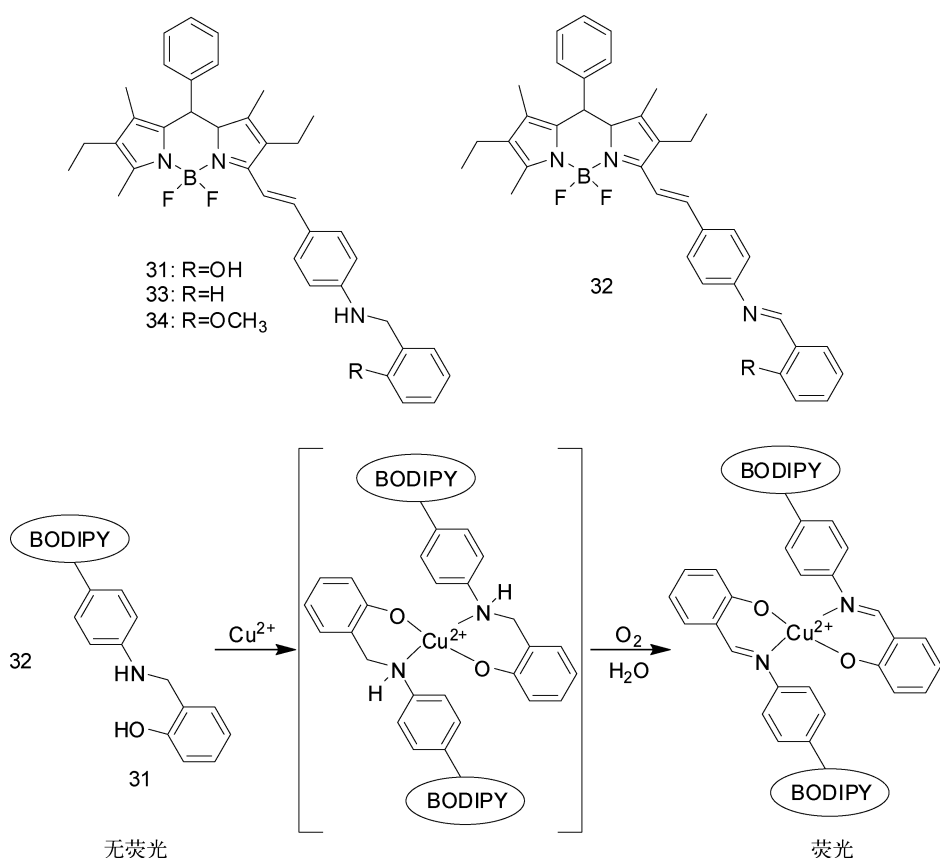


图 4-59 化学比例计 31 和参比化合物 32~34、 Cu^{2+} 诱导化合物 31 的荧光增强机理

0.047 2); 1 当量的镉离子加入后, 在 419 nm 处出现强烈的荧光发射峰(量子产率为 0.490 3); 以此实现了溶液中镉离子浓度的荧光检测。进一步将纳米粒子 NC-FQDIPA 用于生物体系中, 对活细胞内的镉离子的浓度进行成像。将纳米粒子 NC-FQDIPA 加入细胞培养液中, 培养 3 h 后, HeLa 细胞呈现微弱的蓝色荧光; 在加入 NC-FQDIPA 后, 再加入镉离子进行培养, HeLa 细胞呈现较强的蓝色荧光。NC-FQDIPA 探针实现了对活细胞中镉离子的荧光成像。

Zhou 等人^[224]报道了一个基于两个萘环结构的 Al^{3+} 荧光探针, 该探针也是基于 PET 机理。实验结果表明, 由于该探针中的席夫碱氮原子上具有孤对电子, 因此存在着向两个萘环的 PET 现象, 从而使配体自身几乎不发射出荧光; 而当在探针中加入 Al^{3+} 之后, 两个席夫碱氮原子和两个羟基氧原子同时参

与和 Al^{3+} 的配位,从而使 PET 现象得到抑制,因此荧光显著增强。另外,该课题组还计算了该探针与 Al^{3+} 的结合常数和该探针对 Al^{3+} 的检测限,并且通过核磁滴定实验、质谱和 DFT 计算证实该探针与 Al^{3+} 之间是通过 1:1 进行配位的(图 4-60)。

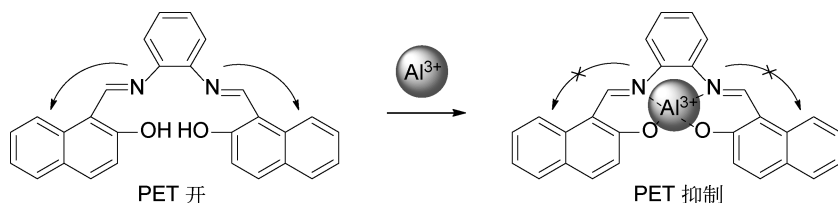


图 4-60 基于 PET 机理的荧光探针识别铝离子的机理

4.8 氧化还原型检测基团

4.8.1 常见次氯酸根荧光探针

图 3-63 中,无荧光的双通道荧光探针化合物 31 与次氯酸反应后,生成化合物 32 发出强烈绿色荧光^[129]。

图 3-64 中是第一个用于 HClO 检测的双光子荧光探针 33 及其衍生物 34~37^[130]。

如图 4-61 所示,杨丹课题组设计并合成了以 BODIPY 为母体,在缓冲液和含酶系统对次氯酸具有高灵敏度和选择性的荧光探针 38^[225]。化合物 38 与次氯酸反应后生成的化合物能发出绿色的荧光,非常适合用来显示巨噬细胞和次氯酸选择性结合的成像。

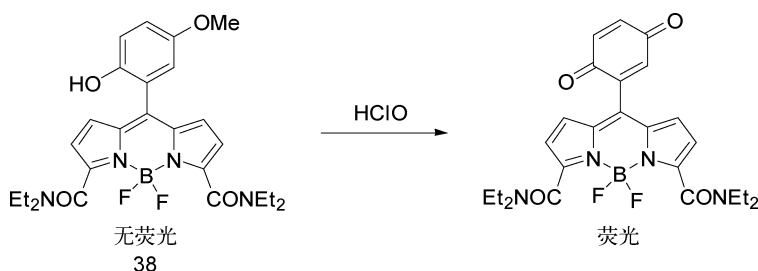


图 4-61 化合物 38 的结构式及反应机理

4.8.2 常见过氧化氢荧光探针

通常,过氧化氢对于细胞来说是有毒的,会导致氧化应激的条件变宽,而这会导致细胞衰老。因此,对过氧化氢的检测和定量的需求在不断增加,过氧化氢瞬时产生于多种细胞表面受体的活化,可以作为传递信号的信使。

Chang 的研究小组设计了一个系列的基于氧杂蒽硼酸酯的化合物 39(图 3-65),能够在活海马神经元中检测过氧化物触发的氧化应激反应。

除了上述的双硼酸酯化合物外,单硼酸酯化合物比率荧光传感器(图 3-66)也可以应用于检测过氧化氢,且可应用于生物系统中的过氧化氢成像检测(图 3-67)。化合物 41 能够与在活细胞中达到自然免疫反应水平的过氧化氢成像,化合物 42 是一个双光子的活性荧光探针,可以在活组织深层中用于过氧化氢含量变化的双光子比例成像。化合物 43 是一个纯有机的检测过氧化氢的探针(图 3-68),它与醌甲基化物发生 1,6-消除反应,生成化合物 44,能够有效地在小鼠的急性炎症模型中对过氧化氢成像。化合物 45 是以过氧化氢作介质水解的磺酸盐化学传感器(图 3-69),可以用于检测活细胞内过氧化氢的变化。

4.8.3 其他常见 ROS/RNS 荧光探针

单线态氧($^1\text{O}_2$)是分子氧的激发态,并且作为高度反应性的分子,它对生物系统存在潜在的破坏性。它可以氧化各种生物分子,如 DNA、蛋白质和脂质。迄今为止,用于检测 $^1\text{O}_2$ 的主要机制是基于内过氧化物的形成和蒽环组成的 $^1\text{O}_2$ 诱导 1,4-环加成反应。唐教授和合作者报道了一个利用 $^1\text{O}_2$ 诱导 1,4-环加成反应机理合成的花菁染料 46,其可应用于检测活细胞中 $^1\text{O}_2$ 浓度的变化(图 3-70)。

超氧阴离子($\text{O}_2^{\cdot-}$)是分子氧的一电子还原产物,半衰期较短,并参与活生物体的各种生理过程,如衰老、肌肉疲劳、贫血和炎症等。因此,在生理条件下对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 实行实时监控变得越来越重要。化合物 47 在细胞内与 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 发生氧化反应生成荧光化合物 48^[138](图 3-71)。

NO 是一个双原子自由基,它作为内皮衍生的松弛因子,能促进血管平滑肌松弛,在循环系统中调节血管扩张,并且使大脑中的长时程增强。但是,微摩尔浓度的 NO 可以触发活性氮物种的形成,导致癌变和神经变性疾病。因

此,开发高选择性和敏感性的化学传感器来实时检测 NO 是非常重要的。

吩噻嗪结构中的硫原子在次氯酸作用下会发生氧化,形成亚砷或砷的结构(图 3-15)。在其他一些报道中,这样的转变同样可以在加热条件的过氧化氢高温环境下实现^[66],说明这一识别机制具有对次氯酸更好的选择性。更有意义的是,吩噻嗪材料氧化前后的分子结构都具有荧光发射,该材料是双通道比率荧光传感器的一个合适的染料母体。随着研究的深入,为了降低吩噻嗪的大 π 结构平面性,从而抑制染料刚性共轭平面的 $\pi-\pi$ 堆叠作用,可在吩噻嗪母体上引入两个位阻型硼酸酯的结构。如果需要增加传感器的空间位阻效应,可在吩噻嗪的 N 原子上引入三苯基季磷盐大位阻单元。

4.9 氢键型检测基团

之前报道的大多数受体通过 H 键诱导的 π 离域或 NH 去质子化起作用,这可能是识别氟化物的唯一机制。硫代碳脒硫脲衍生物具有独特的结构性质和化学性质。研究者设计并合成了两种不同的化学传感器化合物用于氟化物: 1,5-双(2-乙酰基噻吩)硫代碳酰脒(C1)和 1,5-双(2-乙酰基呋喃)硫代碳酰脒(C2)[1,5-bis(2-acetylthiophene) thiocarbonylhydrazide (C1) and 1,5-bis(2-acetylfuran) thiocarbonylhydrazide (C2)](图 4-62),作为双重作用模式传感检测氟化物。

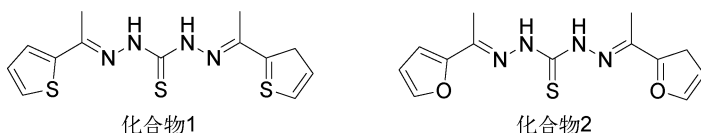


图 4-62 化合物 C1 和 C2 的分子结构式

C1 能更好地识别氟离子,这可能是由于与呋喃环相比,噻吩的芳香性增强。C1 对氟阴离子的敏感性很强,这可能是由于噻吩的存在使其更加芳香,因此具有更好的 π -定位。加入氟化物后发射强度有很大提高^[226]。

Chen 组^[227]报道了如图 4-63 所示的化合物 3a,其吸收峰在 432 nm 和 454 nm 处,发射峰在 478 nm 处,这一现象可

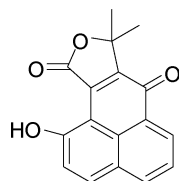


图 4-63

化合物 3a 的结构

能由于 phenalenone 结构的 $\pi-\pi^*$ 跃迁,理论计算支持这个原因,随着氟离子逐渐加入,432 nm 和 454 nm 处下降,502 nm 和 536 nm 处上升,在 468 nm 处有等吸收点,这表明是两种物质之间的转换,荧光在 478 nm 处没有变化,在 550 nm 处有明显的增强,符合 PCT 过程,加入其他阴离子没有变化,所以化合物 3a 可以作为氟离子探针。

氟离子与吡咯基团中的活泼氢形成氢键可用来实现识别氟离子。但是,氢键的强弱及选择性受溶剂极性的影响。Kim 等人^[228]将香豆素类衍生物制成半导体聚合物来检测氟离子。但是聚合物对细胞膜渗透性差,导致在细胞内检测氟离子的难度增加。有关细胞内氟离子检测荧光成像的小分子荧光探针还没有报道。

4.10 金属配位型检测基团

Filatov 组^[229]报道了系列芳香 π -扩展二吡咯分子 BDPs 和 NDPs(图 4-64)。BDPs 的吸收峰在 550~570 nm 处,NDPs 的吸收峰在 660~700 nm 处,作为自由碱基,它们的荧光非常弱,然而加入金属盐后,它们的荧光立刻提高,可通过改变金属配位的方式激活荧光。

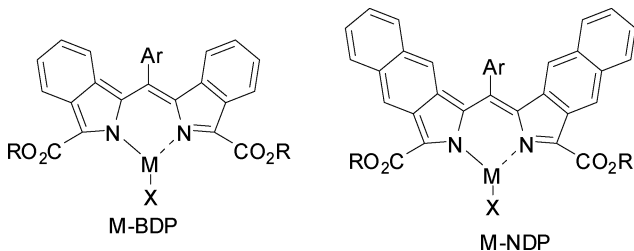


图 4-64 M-BDP 和 M-NDP 的结构

Harriman 组^[230]设计了图 4-65 中的 BODIPY 衍生物,分子中的配位基是三联吡啶(terpy),和 Zn^{2+} 配位时,terpy 的还原电势减少,导致分子内电子转移可能性显著增加。

在乙腈溶液中化合物 1a 的 terpy 的吸收峰在 290 nm 左右。小 Stokes 位移表明在基态和激发态之间,在结构和极性上没有变化。 Zn^{2+} 滴定到化合物

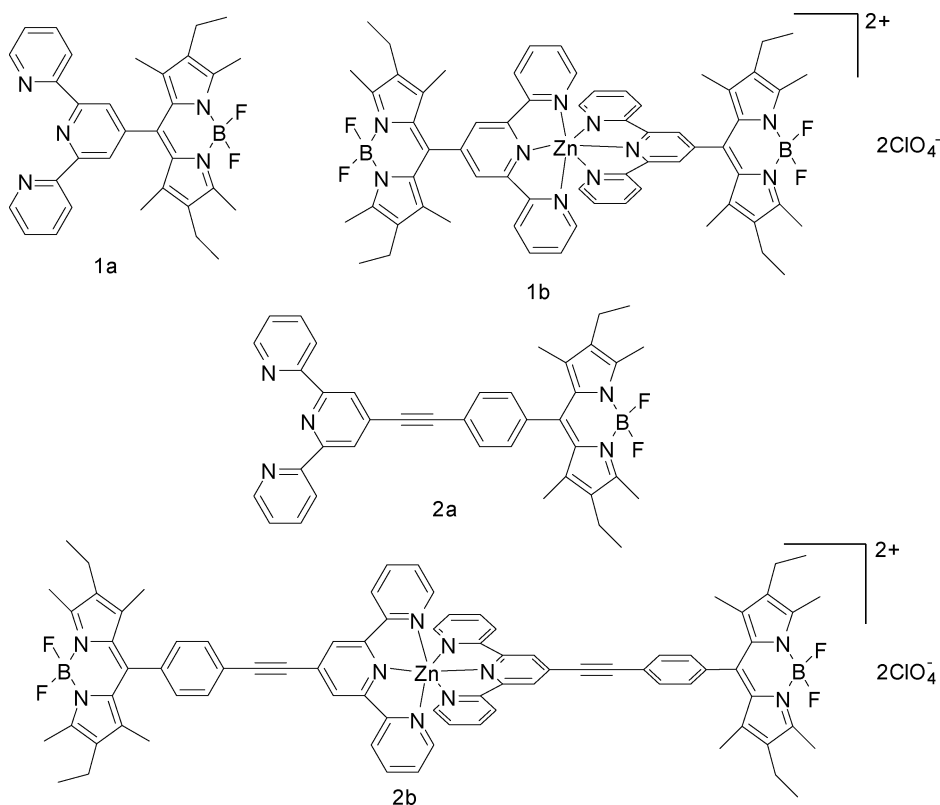
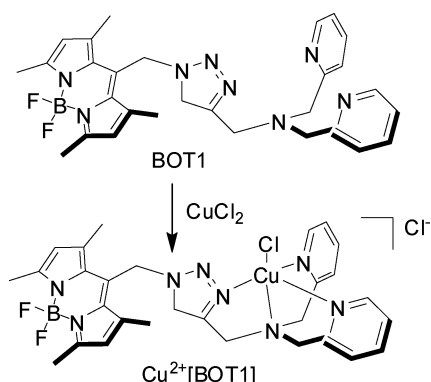


图 4-65 BODIPY 基螯合试剂和 Zn^{2+} 配位比为 2 : 1 的化合物的结构式

1a 的乙腈溶液中,在 330 nm 处有新吸收带,X 射线衍射数据表明新的吸收带归属于 Zn^{2+} -三联吡啶结构。

对于化合物 1a 和化合物 2a,加入 Zn^{2+} ,荧光强度下降,化合物 2a 在 Zn^{2+} 的滴加下荧光不断消失直到一个平台出现,减少了 25 倍。荧光光谱表明, Zn -三联吡啶络合物可以作为光富集器和吸收通道。对于化合物 1b 和化合物 2b,从金属络合物到 BODIPY 染料单线态-单线态能量转移的速率超过 $5 \times 10^{10} \text{ s}^{-1}$,在 Zn -三联吡啶的荧光和 BODIPY 相关跃迁偶极最合理方向的吸收之间有强的光谱重叠,表明存在偶极-偶极的相互作用。

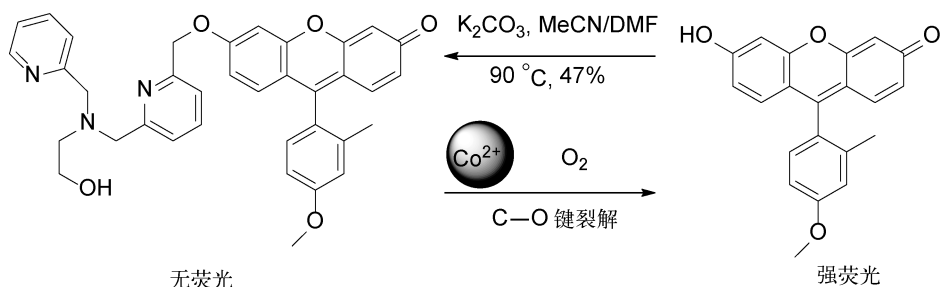
Rosenthal 组^[231]的 BOT1 中并列了一个 BODIPY 报告器,图 4-66 中受体是通过三唑桥连接的三足的二甲基吡啶胺,三唑桥提供了在 BODIPY 报告器和螯合配体之间的刚性空间,减小了荧光团和金属键之间的距离,确保了探针在“关”的状态时强烈地荧光淬灭。

图 4-66 BOT1 和 Cu^{2+} [BOT1] 的结构式

在 BOT1 的溶液中,加入 1 eq 的 CuCl_2 , 荧光强度下降为 1/12, 寿命缩短为 1/30, 这是由于从 BODIPY 单线激发态到束缚了 Cu^{2+} 态的 PET 过程。 Cu^{2+} [BOT1] 在缓冲溶液中用过量的 Angeli 盐(少于 $50 \mu\text{mol/L}$)处理, 在生理条件下产生了等摩尔比率的确硝(HNO)和亚硝酸盐, 观察到发射增加了 4.3 倍, 表明 HNO 能被快速检测。

金属化合物基荧光探针 DCCP- Cu^{2+} 对磷酸盐阴离子(PPi)有较强的荧光增强响应, 在长波长处有较高的量子产率(图 3-10)。

Christopher J. Chang 课题组^[232]设计并合成出了可以识别 Co^{2+} 的化学反应型荧光探针。如图 4-67 所示, 连接基团中的氮氧原子与 Co^{2+} 发生配化, 形成金属配合物, 同时 O_2 参与作用使得 C—O 断裂。因此在 Co^{2+} 和 O_2 的作用下, 连接在荧光团上的二吡啶醇胺基团发生脱落, 生成了具有强烈绿色荧光的荧光染料。同时此荧光探针还可以应用于细胞显影实验, 在生物体中检测 Co^{2+} 。

图 4-67 化学反应型荧光探针对于 Co^{2+} 的检测机理

4.11 聚集传感型检测基团

Zhang 等人^[233]制备 InP 纳米粒子作为荧光探针, 在亲水或疏水环境中对镉离子进行检测。溶液中的 Cd^{2+} 会被 InP 纳米粒子吸附在表面, 形成以

In P/Cd-R 为壳的复杂微多相结,导致纳米粒子发出荧光,实现了对 Cd^{2+} 的荧光检测。

唐本忠课题组将具有聚集诱导发光特性的化合物 18 涂在薄层层析硅胶板上,干燥后可以看到有荧光发射。用氯仿蒸气熏蒸硅胶板,发现荧光消失,再将溶剂挥发掉,发现硅胶板上的荧光发射重新出现。由此可推出,发现其他 AIE 发光团应用于上述实验过程,也可以观察到类似的现象。

田禾教授等人研究了化合物 25 和化合物 26,它们是具有聚集诱导发光性能的星形三苯胺衍生物,这种类型的检测为气体荧光化学传感器的分子设计开辟了一条新的道路(图 3-59)。

HPS 衍生物化合物 27(图 3-60)的纳米聚集态能作为一个检测爆炸物的探针。具有 AIE 效应的化合物在生物探针方面有很好的应用。将羟基、氨基、磺酸基等亲水性功能团,连接到具有聚集诱导发光效应的材料上,能够使化合物的水溶性增强。当化合物溶解在缓冲液中就会产生荧光淬灭现象,但当其与某些特殊的分子结合之后就会重新产生荧光。李振教授等合成并研究了 TPE 的磺酸盐的衍生物 28(图 3-34),它对天然的牛血清蛋白具有高效的识别作用。2014 年文献报道了在吡咯并吡咯二酮的基础上合成了具有 AIE 特性的化合物 29(图 3-61),实现 BSA 的检测。2015 年文献报道了一个 AIE 活性的化学传感器 30(图 3-62),该传感器对焦磷酸阴离子可以进行比色的选择性“接通”和荧光检测。

4.12 利用自身分子结构作为检测基团

4.12.1 黏度探针

Levitt 组^[234]报道了染料能够通过荧光寿命变化检测微黏度,因为荧光寿命与浓度无关,所以可以避免很多问题。文献中提到可以使用荧光寿命图像和两个结构相关分子转子的极化分辨并测量荧光衰退。

图 4-68 为分子转子的结构,长的疏水尾部能容易地渗透进细胞膜, BODIPY 染料的激发和发射波长在可见光范围内,减少了光伤害和光漂白的可能性,该分子转子适合作为生物环境的探针。

化合物 35 作为荧光分子转子,它的荧光寿命和强度对环境黏度是敏感

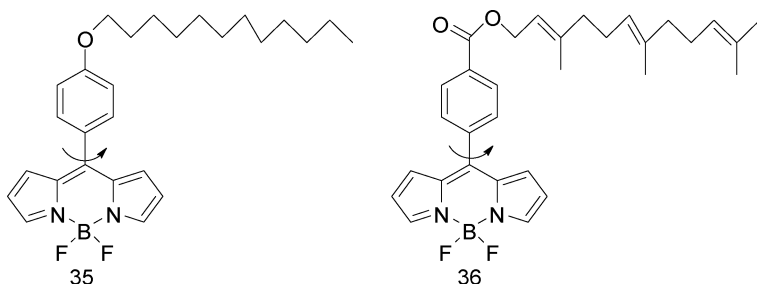


图 4-68 化合物 35、化合物 36 的结构式

的,化合物 36 的荧光光谱形状和 530 nm 处发射波长作为黏度的函数是不变的。实验表明,随着黏度的增加,化合物 35 的荧光寿命和强度也增加,Förster-Hoffmann 方程支持这一点。在非黏性的纯溶剂甲醇中,化合物 35 和化合物 36 的 $\Phi_f = 0.06$,当溶液的黏度增加时,在甲醇和丙三醇混合溶液中, Φ_f 明显增加。 Φ_f 随黏度增加而增加是因为非辐射过程中抑制了分子内旋转。

黏度环境提供了一种方法能够使该状态更低,这是通过折叠结构即芳环旋转进 BODIPY 环平面内来实现的。辐射衰减发生的最稳定的结构是芳环和 BODIPY 平面呈 60° 。在黏度最高的溶剂中(丙三醇:甲醇体积比为 95:5),非辐射过程被完全抑制,化合物 35 和化合物 36 的 Φ_f 均为 1。

Alamiry 组^[235]报道了 BODIPY 结构作为主链的共轭聚合物的合成,在乙醇溶液中,最大发射峰在 514 nm 处,辐射速率常数为 $K_{\text{RAD}} = 1.4 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$,表明这个 BODIPY 染料能作为分子转子,是好的溶液黏度探针,能被用来记录某种流体对压力变化的响应,可以用在生物细胞膜如胶团、囊泡和有机胶体等微观不均匀性介质中。

如图 4-69 所示,彭孝军教授等人报道的化合物 54 为一个基于咪唑的花青衍生物,是一个双光子的比例黏度传感器^[236]。探针分子能够定量地检测溶液黏度,不受环境极性或生物大分子的明显的影响。它也是一个良好的双光子转子传感器,能够对活细胞中的线粒体的黏度,以及 60~130 mm 深度的生物体组织进行比例荧光成像。

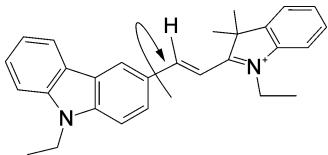


图 4-69 化合物 54 的结构式

通过将咪唑基团直接连接到 BODIPY 转子上形成了化合物 55,它是一个溶酶体黏度荧光探针^[237],如图 4-70 所示。由于其溶酶体活化荧光特性以及

其在激光共聚焦显微镜下的高空间和时间分辨率,它可以作为一个理想的溶酶体示踪剂。

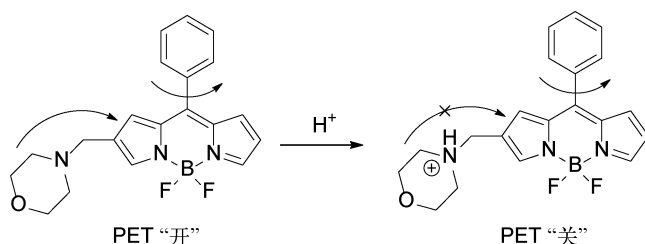


图 4-70 化合物 55 的传感机理

4.12.2 pH 探针

Daub 和 Rurack^[199,238]最先开始研究 BODIPY 衍生物作为 pH 探针的实际应用。

Bura 组^[239]认为图 4-71 的 BODIPY 化合物中的二甲基氨基对质子敏感,酚盐基对碱敏感,分子可用作环境探针和 pH 探针。二甲基氨基被质子进攻后, PET 过程被禁阻,探针荧光团发射荧光。

该探针受溶剂极性影响很大,在不同溶剂中有强发射蓝移,在二氧六环中是 656 nm,在乙醇中是 662 nm;苯酚基在乙醇中去质子化,有强烈的质子转移发生,

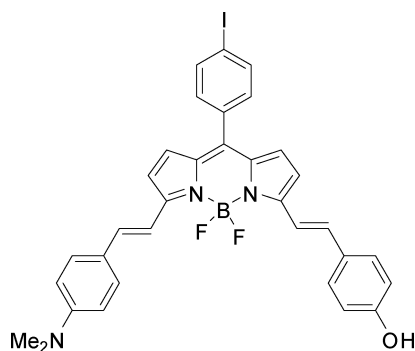


图 4-71 BODIPY 化合物的结构式

在 799 nm 处发射波长有大的红移。在乙醇中用 HCl 滴定实验表明,吸收在 676 nm 低能带处消失,在 637 nm 能带处同时增长,出现了 3 个等吸收点。BODIPY 化合物中加入 NMe_4OH ,诱导 676 nm 能带减弱,721 nm 处新带上升,出现了 4 个等吸收点,可用于 pH 测量的荧光比值法。用同样的方法进行荧光滴定,在相应的等吸收点激发,在质子化过程中,660 nm 处有强烈的发射发生,744 nm 处的发射消耗,碱的加入诱导了 744 nm 处宽峰的减少和 800 nm 处近红外发射的出现。

Baruah 组^[239]的 BODIPY 化合物的荧光在水溶液中随溶液酸性的增加而增加。在可见光范围内, $\text{p}K_{\text{a}}$ 的值在 7.5~9.3,可以在水溶液中用作 pH 荧光

探针。Ozlem 组^[240]发现将小当量的 TFA 加入 BODIPY 化合物的乙腈溶液中,吸收波长从 630 nm 红移到 660 nm,而加入高浓度钠不能引起任何光谱移动。Descalzo 组^[241]报道了高增环菲并-BODIPY 染料,可作为酸范围 pH 指示剂,染料的水溶性不好。

4.12.3 温度探针

Wang 组^[242]介绍了简单的共聚物:聚(NIPAM-co-BODIPY),该共聚物由 *N*-异丙基丙烯胺(NIPAM)和 BODIPY 单元组成,在水中作为荧光热测量计。聚合物在低于 23℃ 时表现出弱荧光,在温度上升到 35℃ 时荧光强度增加,能够灵敏地指示在 23~35℃ 的溶液温度。通过一个聚合物微黏度的增加可以驱动热诱导荧光提高,同时聚合物有从混乱到小球状态的相变化。黏度区域在小球状态聚合物内部形成,阻止了激发态 BODIPY 单元的 meso-吡啶鎓基团的旋转,产生热诱导的荧光增加。在不考虑热、冷过程的情况下,聚合物表明了可逆的荧光增加或淬灭,有重复使用的能力。

合成两组温敏的聚合物 52 和聚合物 53,从图 4-72 可以看出它们的相变温度(最低临界溶液温度)分别是 41℃ 和 44℃^[243]。可以通过温敏聚合物链、易接近的功能和糖部分的选择等外部因素使细菌聚集。聚合物体系和结构的多样性和灵活性,表明聚合物是细菌物质相互作用的非常有效的材料。目前,正在研究发展这些材料作为介质和细胞之间的信号控制器的相关应用。

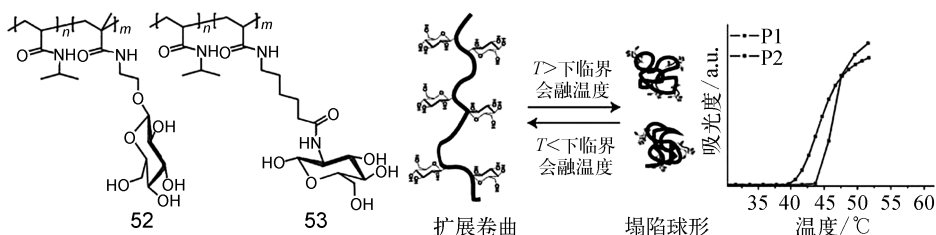


图 4-72 聚合物 52 和聚合物 53 的结构式,在 PBS 缓冲液中的相行为,以及吸光度随温度的变化曲线

如图 4-73 所示,杨国强等人设计合成了一个用来检测细胞内温度的新型纳米温度计 L-DNA^[244],它能够高分辨率地、快速地对温度响应。相对于其他的细胞内荧光温度计,这个纳米温度计具有以下优点:第一,它是核酸组合物,使得它与细胞完全生物相容,这对于长期的温度监测是非常有必要的。

第二,它的信号不会被核酸、蛋白质、核酸酶干扰,能确保温度的准确测量。最后,其物理化学特性如小尺寸(小于10 nm)、优良的反应可逆性、可调的响应范围,使其具有适合在各种情况下应用的潜力。该纳米温度计作为细胞内温度的测量工具,已被成功地用于活细胞中的光热研究。

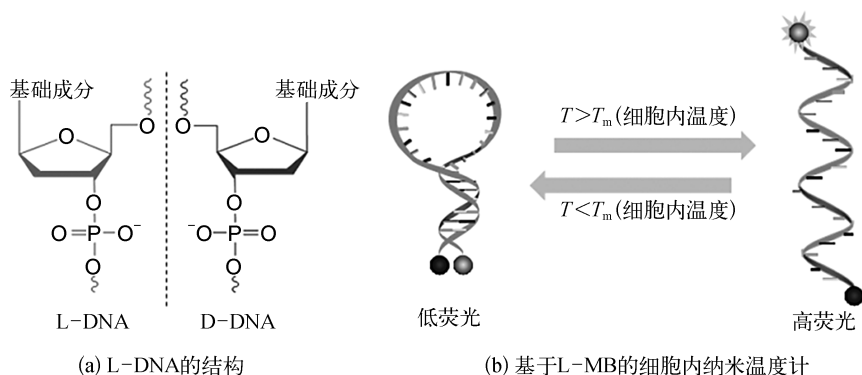


图 4-73

4.13 作为生物硫醇的检测基团

目前已有报道的与硫醇反应的荧光探针有以顺丁烯二酰亚胺部分作为硫醇反应基团,在和硫醇反应以前,它们的激发波长更长,背景荧光更强。Matsumoto 组^[245]报道了硫醇共轭的 BODIPY 荧光探针在和硫醇反应以前几乎没有荧光。邻位取代(*o*-maleimide BODIPY)和硫醇反应后强荧光被恢复。如图 3-76 所示,荧光素螺内酰胺开环的化学传感器 58 对生物硫醇具有高选择性和灵敏度。蔡二甲酰亚胺衍生物 59(图 3-22),是一个在生理过程中检测谷胱甘肽(GSH)的发光化学传感器。

图 3-77 中化合物 60 的能量给体中,四(4-羧基苯基)卟吩通过二硫键连接至能量受体香豆素,利用巯基/二硫的交换反应检测硫醇。Cys/Hcy 化学传感器 61 可应用于检测活细胞中 Cys/Hcy 分布的荧光成像(图 3-78)。图 3-79 中的荧光增强型化学传感器 63 的电子受体是硝基乙烯部分,可以用来检测 Cys/Hcy。

2008 年,林伟英等人^[246]设计合成了一个比率型探针分子 1,来检测 Cys

和 Hcy(图 4-74)。在这个 ICT 体系中,富电子的苯并咪唑作为电子给体的荧光染料,醛基部分作为一个电子受体。在 HEPES 缓冲溶液中加入 Cys 后,荧光出现了蓝移,且蓝移 125 nm。加入硫醇后,由于 ICT 的消失,在 519 nm 处荧光发射强度逐渐降低,394 nm 处有一个新的荧光发射。使用这两处荧光强度的比率对 Cys 的浓度作图,发现呈线性关系。

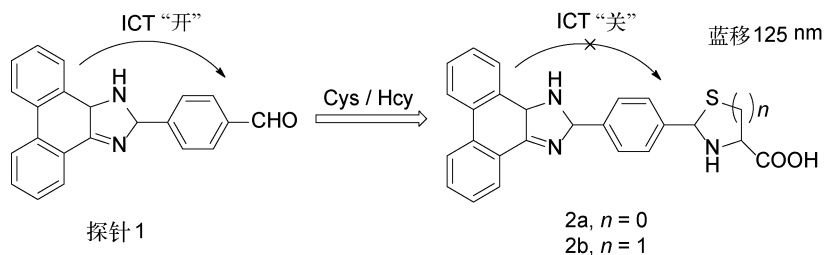


图 4-74 探针 1 的结构式及识别过程

2009 年,阴彩霞等人^[247]报道了一个新的基于苯并吡喃骨架的比色型探针 2(图 4-75)。在 HEPES 缓冲液中检测 Cys、Hcy 和 GSH 时,展现出非常优异的选择性和灵敏度,肉眼可以看见溶液从无色变成黄色。巯基会发生亲核反应,使苯并吡喃的环断开形成 4-硝基苯酚,随着 Cys 浓度的不断上升,传感器分子 2 在 292 nm 的吸收峰逐渐下降,在 405 nm 处出现一个新的吸收峰,且波长红移 113 nm。

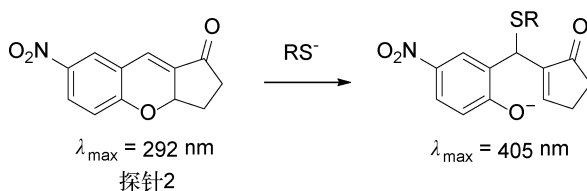


图 4-75 探针 2 的结构式及识别过程

4.14 作为 DNA 的检测基团

Bi 组^[248]报道了 BODIPY 类荧光分子探针在聚合酶扩展反应中能够被很好地合并进 DNA 链,在 SBS 中作为可逆的终止者。Ojida 组^[249]设计了荧光

探针对超磷酸化 tau 蛋白(hyperphosphorylated tau protein)进行有效的荧光检测,BODIPY 部分直接连了两个 Zn^{2+} -DPA 单元,对 NFTs(neurofibrillary tangles,神经元纤维结)的 β -sheet-rich 结构提供更强的相互作用,对 NFTs 有高检测识别性。Lee 组^[250]提出,苯乙烯基衍生 BODIPY 化合物因为扩展的 π -共轭而使荧光发射红移,能用于在细胞中的高血糖素分泌液和相关疾病的生物研究。Nierth 组^[251]研究的探针结构由蒽和被共轭的苯乙炔基桥融合的磺酸化的 BODIPY 荧光团组成,紧连的蒽通过 PET 过程有效淬灭 BODIPY 的荧光。发生 Diels-Alder 反应后,共轭体系被破坏,荧光发射增加了 20 倍,在各种可逆条件下检测 RNA 催化的 Diels-Alder 反应能达到纳米克分子浓度范围。

Lim 组^[252]证实了体外 BODIPY 衍生物(图 4-76)应用于光细胞毒素活性抗白血病和两种类型固体肿瘤的细胞系。研究表明,根据这些衍生物单线态氧的高产生速率,碘原子直接取代 BODIPY 吡咯啉(pyrroline)碳-4 位,比 meso-芳基位重要,在 4-吡咯啉(pyrroline)位取代单 n -丙烯酸丁酯可使最大吸收波长红移。亲水性取代基例如羧酸,磺酸或者磺酸钠通常会减少活性。研究表明,化合物 38 专一定位线粒体,化合物 38 的乳液在体内模型在 CAM 上能够吸留血管网络,可作为 PDT 试剂。

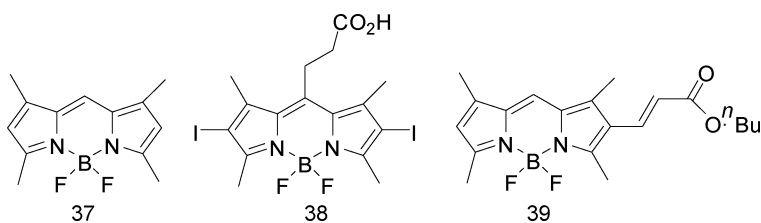


图 4-76 BODIPY 衍生物 37~39 的结构式

化合物 38 可用于处理表面组织,在食管和支气管癌症临床 PDT 中,用 514 nm 激发波长系统处理有和 630 nm 处理相似的消灭肿瘤的效果,化合物 38 在食管上引起打孔的深层组织受伤害程度不大,化合物 38 有潜力被探索成为对癌症的 PDT 临床试剂。

Coban 组^[253]报告了两个 BODIPY 标记的类脂被合并进胶束或类脂泡的聚合物检测,这两个聚合物是平行和共线跃迁偶极距的构型。更高跃迁能量的二聚物是没有荧光的,BODIPY 单体和二聚体发射的比例能用来检测细胞

区间中的相关类脂浓度。

Hapuarachchige 组^[254]报道了 HPY(triazaborolopyridinium), HPY 的细胞渗透性好,共轭杂环骨架上的三个氮原子对水溶性有利。胺取代基的变化可以调节 HPY 染料的吸收和发射性能,受溶剂极性影响很小。杂环基团的尺寸和极性容易改变,交换硼上的氟和醇盐的能力能优化 HPY 染料的结构可作特殊的应用。HPY 的共轭物 40 和共轭物 41(图 4-77)作为在细胞循环研究中的可逆探针可能有更广阔的应用。

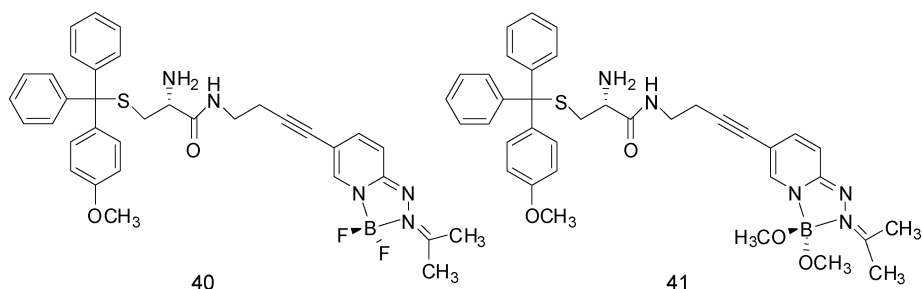


图 4-77 化合物 40 和化合物 41 的结构式

Li 组^[255]报道了系列染料中的一个和两个连接终点叠氮基的类脂物共轭衍生,形成 BODIPY 共轭胆固醇类似物,该文章报道了其作为探针检测胆固醇,在模板组织和细胞中的效果和给体-受体的共振能量转移。它们较好的荧光性能有可能通过荧光显微镜可视化活性细胞中类脂的分配和运输。

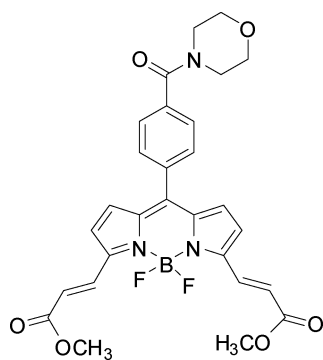


图 4-78 探针 4b 的结构式

Lee 组^[256]合成了 BODIPY 染料 4b(图 4-78),测试了这个染料和组蛋白 H2B 的表现,连接了“RC2·myc”结构到人 H2B 的 N-终点,融合 Cheery 到它的 C-终点,探针 4b 作为一个标记检查表达。探针 4b 成功地标记活细胞中的 H2B,演示了细胞中的核染色。在没有痕迹标记物 Cheery 的 H2B 实验中,探针 4b 和 RC2 标签也识别标记了 H2B,RC2 和它的母体化合物 4b 对当前的蛋白标记方法是有利的,特别是对于活细胞内的特殊目标蛋白光学图像。

Prusty 组^[257]发现从前荧光基上移走重原子形成化学键结构可产生强的荧光,文献中描述了通过钯催化的 Heck 反应,前荧光 BODIPY 基合成和转化

后形成高强度荧光,这个反应可用在超灵敏的 DNA 检测上。

4.15 作为细胞和组织的检测基团

4.15.1 荧光探针在酶检测中的应用

酶是指具有特定生物催化功能的大分子物质,也有人将其称为生物催化剂。大部分酶是蛋白质,也有少数是核酶的 RNA 分子。酶的特殊之处在于具有高度的专一性,每类酶都只催化具有特定结构底物的反应。酶的催化活性容易被干扰,如:抑制剂和激活剂可以使酶活性发生变化,这是部分药物的作用机理;酶的活性也会受到温度、介质环境的 pH 值和电磁波等各种外界条件的影响^[258]。酶的催化反应,就是将特定的底物在酶的作用下生成其他物质。几乎所有的细胞活动进程都需要酶的参与,酶使细胞内复杂的新陈代谢过程能够有条理地进行,细胞才能发挥着正常的功能。如果因基因缺陷或其他原因,造成某种酶的缺乏、活性减弱,往往会导致该与酶相关的生化反应异常,相关物质的生成和代谢受阻,甚至出现生物体病变,如:白化病是因酪氨酸羟化酶缺乏所致。因此,酶与临床医学的关系十分密切。在正常人体内,各组织器官内的各类酶的含量是相对平衡的,当其发生病变时,部分酶则可扩散进入血液循环系统。例如,当肝脏出现损伤时,血清碱性磷酸酶含量会急剧增高。因此,在临床医学上,可通过测定血液中某些酶的含量作为相对应疾病的诊断指标。因此,酶的检测及其生物样品中的应用和实时成像,能为生理反应研究、病理研究和治疗等领域提供依据,具有重大意义。近年来,针对这种酶的荧光检测也取得了一些进展。

4.15.2 荧光探针在组蛋白脱乙酰基酶检测中的应用

组蛋白脱乙酰酶(HDACs)是一种非常重要的水解酶,可脱去细胞内蛋白质内末端 N-乙酰化的赖氨酸残基中的乙酰基。HDACs 在细胞生理过程的调节中有着很重要的作用,如基因表达、信号传导、细胞稳态平衡等;并且与一些疾病有关,如癌症、代谢综合征、神经疾病等^[259]。因此,许多药物开发工作围绕 HDACs 展开,然而对于 HDACs 的检测仍缺少便利的手段。Dhara 等人^[260]利用四苯乙烯(TPE)的 AIE 效应,合成了四苯乙烯衍生物 K(Ac)PS-TPE 作为检测 HDACs 的荧光探针,如图 4-79 所示,K(Ac)PS-TPE 分子是

在 TPE 分子上修饰了一个磺酸根和乙酰基保护的脂肪族伯胺。在 HEPES8.0 缓冲液中,探针 $K(\text{Ac})\text{PS-TPE}$ 分子中的磺酸根带负电荷,使其具有良好的水溶性,几乎没有荧光;加入 HDACs 反应后,分子中伯胺上的乙酰基被脱去,伯胺带正电荷;由于正负电荷的静电吸附作用,反应后的 KPS-TPE 分子聚集起来,因为 TPE 所具有的 AIE 性质而在 456 nm 处发出蓝色荧光。

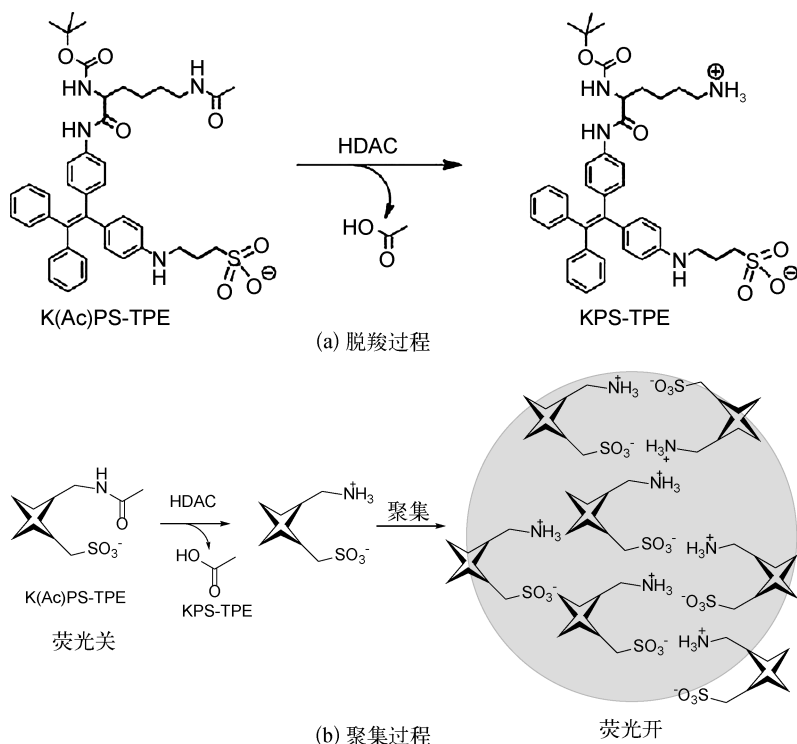


图 4-79 探针分子 $K(\text{Ac})\text{PS-TPE}$ 检测 HDACs 示意图

此外,Baba 等人^[261]设计了一个基于组蛋白 H3 多肽片段的 HDACs 荧光探针 $K4(\text{Ac})\text{-CCB}$,如图 4-80 所示,多肽片段中 4 号为含有乙酰化的赖氨酸 $K4(\text{Ac})$,一端则连接乙酰化的香豆素衍生物;香豆素中的酚羟基酰基化后,抑制其 ICT 效应导致荧光淬灭。在 HEPES8.0 缓冲液中,加入 HDACs 后,探针分子中乙酰化的赖氨酸 $K4(\text{Ac})$ 发生脱乙酰化,生成带伯胺的 DP 分子。DP 分子内的伯胺容易与末端香豆素上的碳酸酯键反应,生成 TP 分子。在 TP 分子中,脱酰化的香豆素的 ICT 效应恢复而发出 466 nm 的蓝色荧光,实现对 HDACs 的“开”响应型检测。

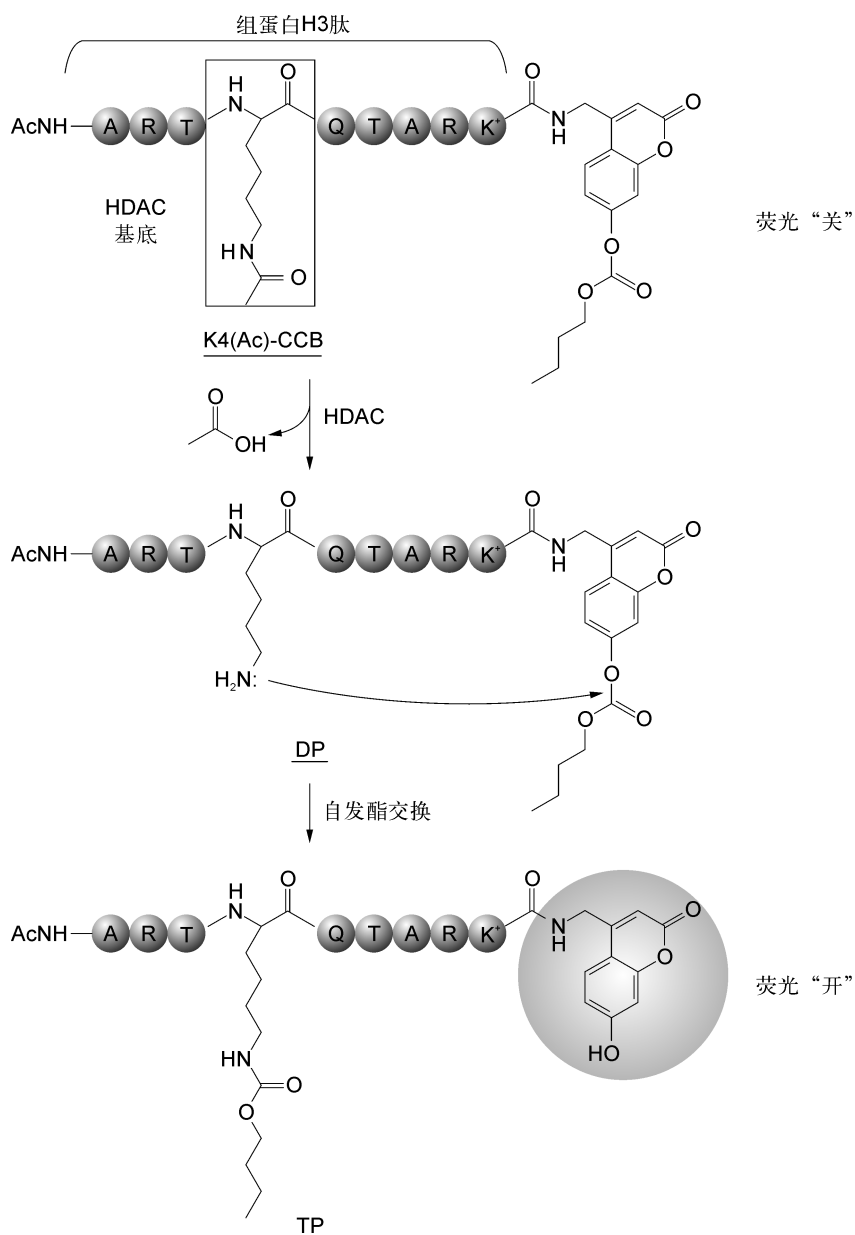


图 4-80 探针分子 K4(Ac)-CCB 检测 HDACs 机理

4.15.3 荧光探针在碱性磷酸酶检测中的应用

碱性磷酸酶(ALP)广泛存在于细胞和组织器官(如肠、肝、肾、骨等)中,在碱性条件下(pH=8~10)催化水解蛋白质、核酸等中的磷酸基团。ALP 的含

量与许多病变过程相关,因此,ALP 常被作为疾病的诊断指标,如骨软化、骨癌、肝炎、肝癌等。所以,开发简单可靠的 ALP 检测手段,在疾病诊断和生物医学研究等领域都有着重要意义。Zheng 等人^[262]制备了基于激发单体——激基缔合物(Monomer-Excimer)机理的 ALP 荧光检测体系,如图 4-81 所示,该探针体系由两部分组成:甜菜碱修饰过的聚乙烯亚胺(Betaine-modified PEI)和磷酸苝(Py-P)。在 Tri8.0 缓冲液中,带正电荷的 Betaine-modified PEI 与带负电荷的 Py-P 通过静电吸引聚集。此时,由于苝具有的激基缔合物效应,发出 488 nm 蓝绿色荧光;当 ALP 加入后,Py-P 分子中的磷酸基团被水解脱去,分散在溶液中,发出在 378 nm 处苝单体的荧光,实现了对 ALP 的荧光比率型检测。

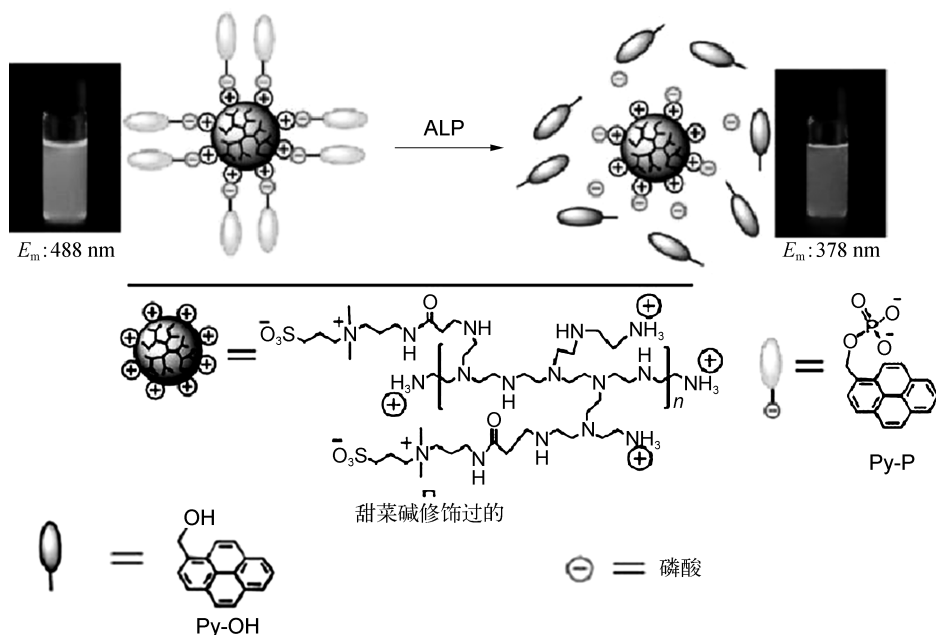


图 4-81 PEI/Py-P 体系检测 ALP 的反应机理

Gu 等人^[263]利用 AIE 效应,合成了基于四苯乙烯衍生物的 ALP 荧光探针。如图 4-82 所示,磷酸基团修饰的 TPE 衍生物具有较好的水溶性,可溶于 Tris7.4 缓冲溶液中,其溶液观测不到荧光;加入 ALP,在 37℃下,探针分子中的磷酸基团水解脱去,水溶性变差而聚集。由于 TPE 的 AIE 效应,其聚集集体发出 480 nm 的蓝绿色荧光。

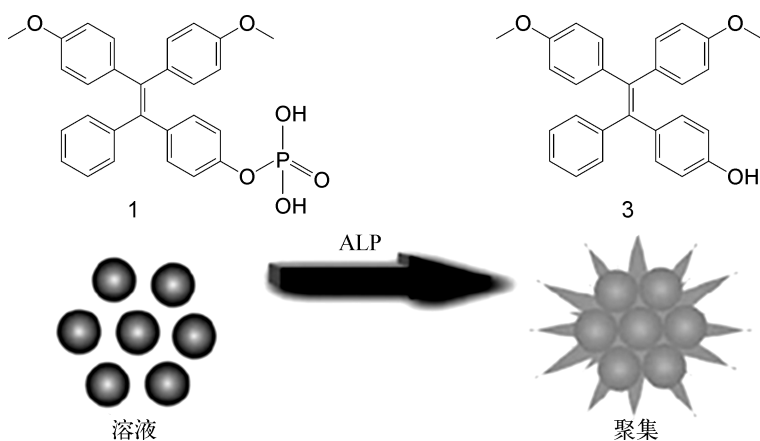


图 4-82 TPE 衍生物检测 ALP 的反应机理

为进一步探究四苯乙烯衍生物探针在生物体系中的应用,研究者将其应用于 Hela 细胞中对 ALP 的成像,加入探针后培养的细胞,呈现明显的蓝绿色荧光;而加入 ALP 抑制剂左旋咪唑培养后再加入探针培养的细胞,观测不到荧光。这说明细胞内的 ALP 诱发了蓝绿色荧光。

4.16 检测气体的荧光团

4.16.1 检测 H_2S 荧光探针的研究进展

硫化氢(H_2S)是一种无色有臭鸡蛋气味的气体,有剧毒,被认为是继 CO 和 NO 之后的第三种气体信号分子。内源性的 H_2S 是以体内含硫的氨基酸,如半胱氨酸、同型半胱氨酸和甲硫氨酸等为底物,在 5'-磷酸吡多醛依赖性酶,包括半胱氨酸转移酶、胱硫醚 β -合成酶、胱硫醚 γ -裂解酶等酶的催化作用下产生的,而且作为终产物的 H_2S 对这些酶具有负反馈调节作用。 H_2S 的另一次要来源是非酶途径,在糖的氧化中由元素硫变为 H_2S ,这一非酶途径的所有基本组成部分都在体内存在,包括还原型硫。研究表明,这种活性物质在生理学中发挥着重要作用,内源性的 H_2S 在大脑中含量高达 $10\sim 600\ \mu\text{mol/L}$,在血液中的含量为 $10\sim 100\ \mu\text{mol/L}$ 。

研究表明,内源性的 H_2S 在一些生理和病理学过程,如抗凋亡、抗感染、抗氧化效果等方面发挥着重要作用;另一方面,超出正常水平的内源性 H_2S 与阿

尔茨海默病、糖尿病、肝硬化等有关。为了更好地了解 H_2S 在复杂的生理系统中发挥的生物学功能,近期的研究主要集中在检测荧光探针的发展上,其反应机理主要有叠氮化物还原成氨基、亲核加成及硫化铜的沉淀。

4.16.2 利用将叠氮化物还原成氨基的机理检测 H_2S

这种方法的优点之一在于能够实现对 H_2S 的选择性检测,并将其与其他硫醇类物质区分开来。利用这一方法,Chang 课题组设计出两种包含叠氮基团的罗丹明荧光探针 1 和探针 3^[264]。这两种探针本身以螺内酯关环形式存在,没有荧光。与 H_2S 反应后,叠氮基被选择性地还原成相应的氨基,螺内酯开环,而且伴随有很强的荧光发射。该荧光探针对 H_2S 有很好的选择性,能够区分 ROS/RNS 等其他硫醇类化合物(图 4-83)。

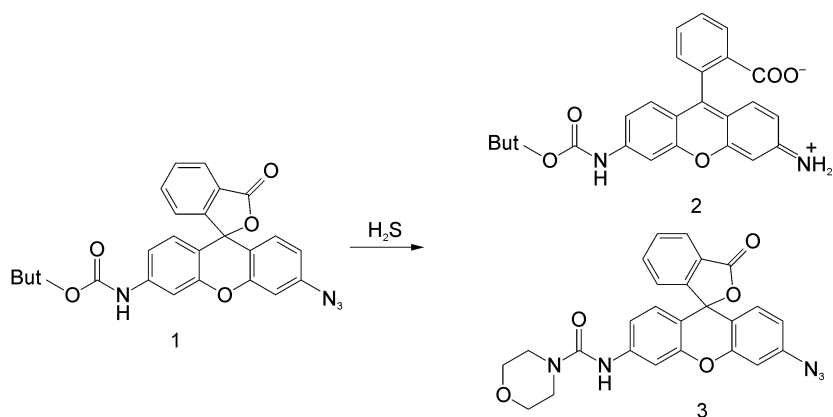


图 4-83 化合物 1~3 的分子结构式

Pluth 等人设计出一种含有叠氮基的萘二甲酰亚胺荧光探针 4,用于从半胱氨酸、谷胱甘肽及其他硫醇类化合物 ROS/RNS 中区分出 H_2S ^[265]。该探针利用 H_2S 对具有荧光淬灭作用的叠氮基或硝基进行还原,生成具有荧光增强作用的氨基来实现对 H_2S 的检测。Han 等人设计出包含叠氮基—花菁基团的荧光探针 5,用于检测细胞内的 H_2S ^[266]。 H_2S 将叠氮基还原成氨基后,反应体系的荧光发生 40 nm 的红移,检出限为 80 nm。

Cho 第一次报道了检测 H_2S 的双光子荧光探针 6,该探针包含改性叠氮基—苯并噻唑苄荧光团,与 H_2S 发生反应后,反应体系的荧光强度增大 21 倍。在后续工作中,Cho 和 Kim 设计合成了线粒体双光子荧光传感器 8 和传感器

9^[267],在与 H_2S 反应后二者的荧光均发生由蓝色到黄色的明显变化。当对两种探针分别进行细胞成像实验时,探针 9 比探针 8 的更亮。Zhang 设计出一种带有萘和叠氮基团、用于检测 H_2S 的双光子荧光探针 7^[268],与 H_2S 发生反应后,探针 7 呈现出单光子和双光子的荧光增强(图 4-84)。

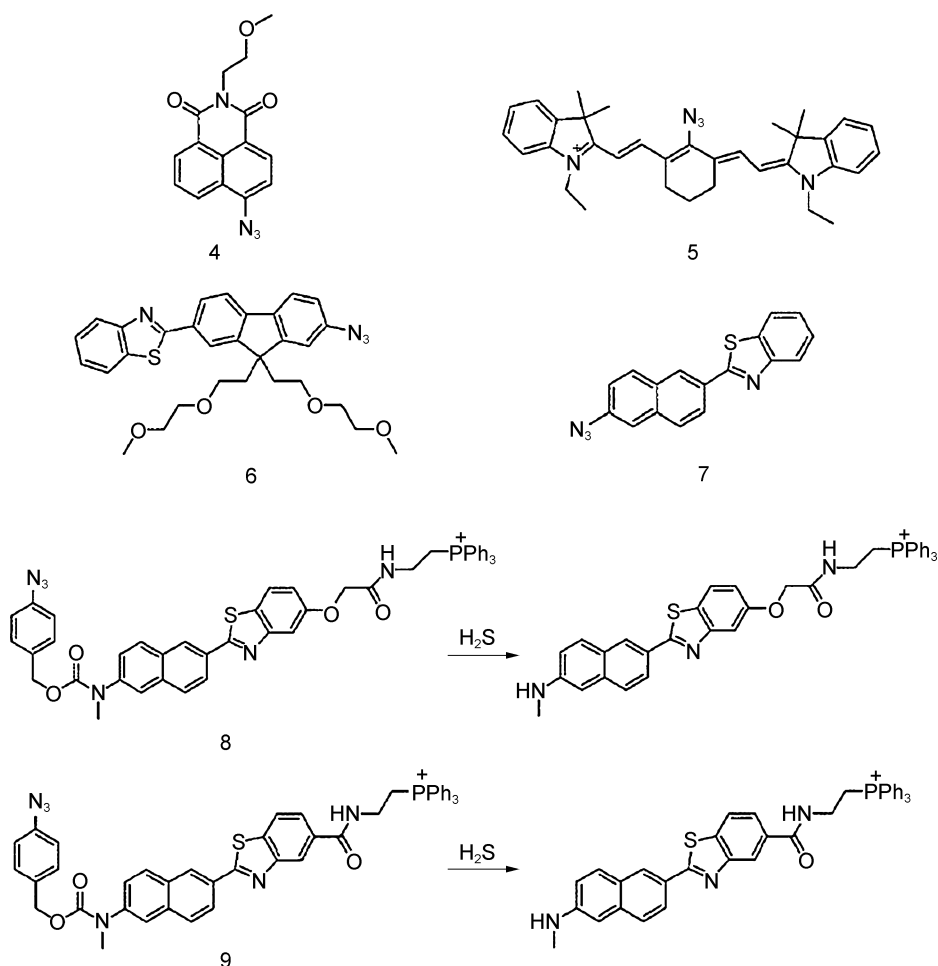


图 4-84 化合物 4~9 的分子结构式

4.16.3 利用亲核加成反应机理检测 H_2S

H_2S 与探针分子还可以通过亲核加成反应,先生成硫醇类物质,然后再经历后续反应实现对 H_2S 的检测,此过程可以生成一个新的荧光物质,也可以通过阻断分子的 PET 过程而恢复物质荧光。然而,常见的硫醇类物质,如半胱

氨酸、高半胱氨酸、谷胱甘肽,由于缺乏双重亲核性而不能发生连续的电环化反应。基于这种方法,He 课题组设计出荧光探针 10 和探针 12,这两个探针分子的醛基的邻位是 α, β -不饱和丙烯酸甲酯^[269]。 H_2S 与醛基发生亲核加成反应形成硫醇类物质,然后与 α, β -不饱和丙烯酸甲酯发生迈克尔加成反应,形成二氢苯并噻吩衍生物。虽然其他硫醇类物质也能与醛基发生可逆反应,但生成的硫缩醛产物却不能进一步发生亲核加成反应,因此这两种探针分子都可以实现对 H_2S 的选择性检测(图 4-85)。

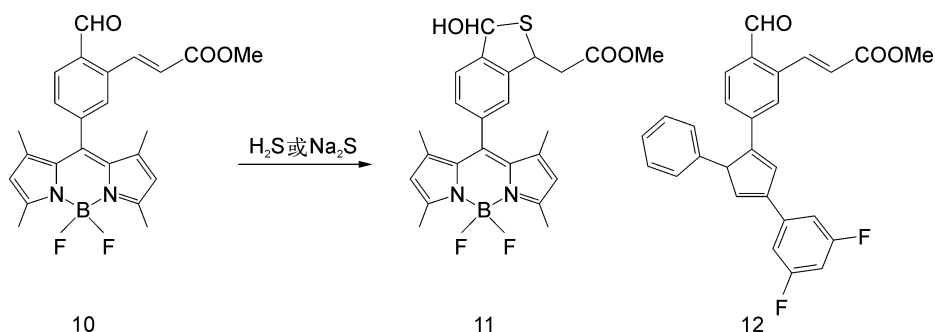


图 4-85 化合物 10~12 的分子结构式

Xian 课题组基于上述原理设计出包含两个亲核位点的荧光探针 13^[270]。反应过程中, H_2S 取代分子中的 2-硫代吡啶,形成过硫化物,然后过硫键的终端硫进攻邻位的酯基,从而发生环化反应生成苯基二硫化物,并释放出甲基荧光素(图 4-86)。

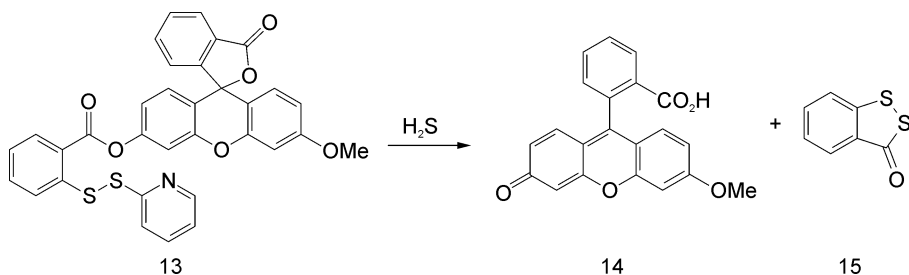


图 4-86 探针 13 的分子结构式及反应机理

Tang 等人基于花菁染料设计出检测 H_2S 的近红外比率型荧光探针 16。 H_2S 对醛基的亲核加成是通过串联亲核加成和环化反应实现的^[271],该过程导致反应体系 780 nm 处的荧光淬灭,而在 625 nm 处出现了一个新的荧光发射

峰,该发射峰对应于花菁酮 17(图 4-87)。

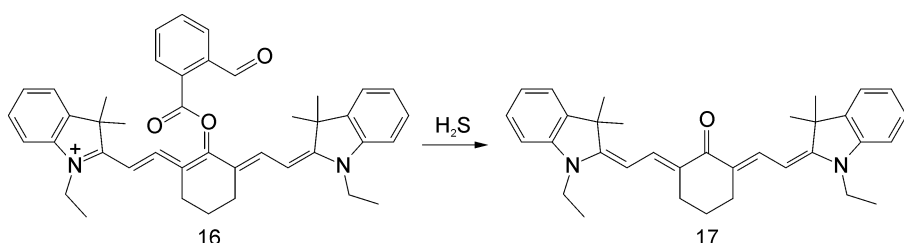


图 4-87 探针 16 的分子结构式及反应机理

Guo 和 He 基于迈克尔加成反应机理设计出香豆素-半花菁比率型荧光探针 18,可用于特异性地检测 H_2S ^[270]。与其他硫醇类物质相比,该探针分子对 H_2S 响应速度快、选择性好,而且能够实时检测细胞内的 H_2S 。

4.16.4 利用生成硫化铜沉淀的反应机理检测 H_2S

Nagano 设计出一种由大环与荧光素基团相连而构成的探针分子 20,用于检测 H_2S ^[272]。探针分子本身没有荧光,在 S^{2-} 供体存在的条件下,生成 CuS 沉淀,并释放出有荧光的化合物 21(图 4-88)。

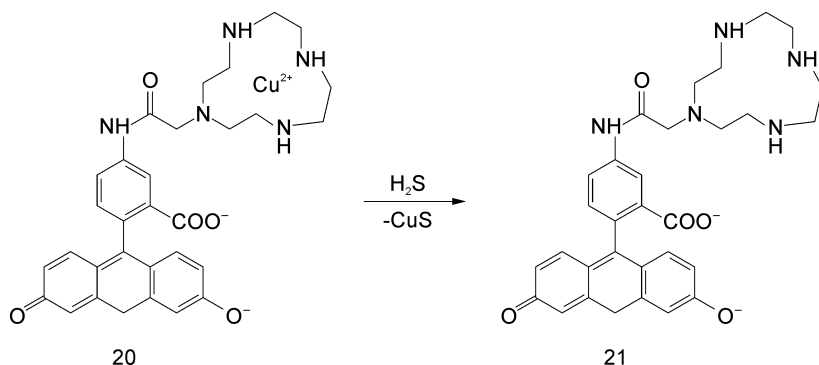


图 4-88 探针 20 的分子结构式及反应机理

Zeng 和 Bai 设计出检测 S^{2-} 的探针分子 22,其结构中 8-羟基喹啉与荧光素相连^[273]。在 S^{2-} 浓度范围为 $10\sim 100\ \mu\text{mol/L}$ 时,反应生成 CuS 沉淀,并且释放出 8-羟基喹啉,导致体系的荧光性质发生改变。另外,Zeng 和 Bai 还设计出探针分子 23,用于检测 H_2S ,在 H_2S 存在的条件下,反应体系的荧光强度增大 30 倍,检出限为 $1.7\ \mu\text{mol/L}$ 。

Chang 等人设计出荧光探针 24 用于检测 H_2S 。探针分子属于 Cu^{2+} 化合物, 包含荧光素基团和吡啶甲基胺基团^[274]。由于 Cu^{2+} 的荧光淬灭作用导致探针分子本身没有荧光, 在 S^{2-} 存在的条件下, Cu^{2+} 与 S^{2-} 络合生成 CuS 沉淀, 因此反应体系的荧光得以恢复(图 4-89)。

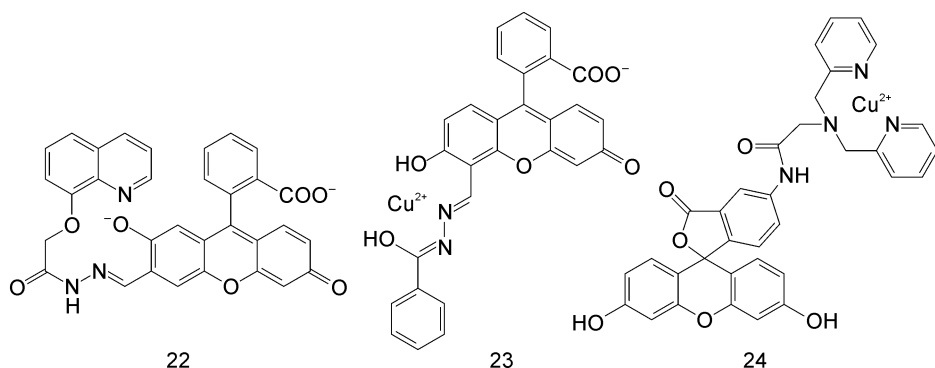


图 4-89 化合物 22~24 的分子结构式

Yu 等人基于 BINOL 配体设计出荧光探针 25, 用于检测 H_2S ^[275], 该探针分子在 Cu^{2+} 与 S^{2-} 存在的条件下能够发生可逆反应。Lin 等人报道了一种用于检测 S^{2-} 的近红外荧光探针 26^[276]。探针分子在水溶液介质中能够与 H_2S 发生反应, 使原本没有荧光的反应体系产生荧光, 而且激发和发射波长均落在近红外区, 并且该反应能够在较宽的 pH 范围内进行(图 4-90)。

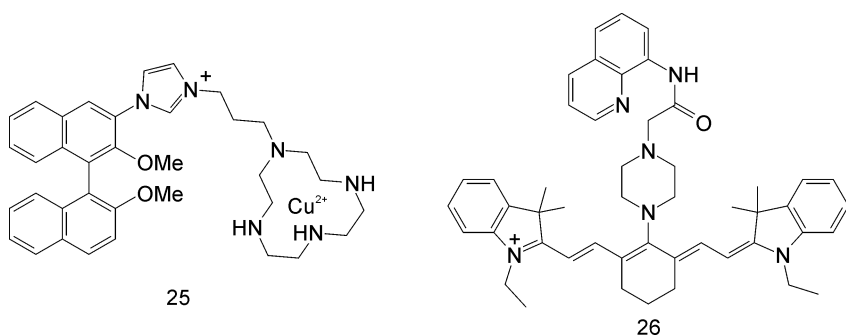


图 4-90 化合物 25、化合物 26 的分子结构式

4.16.5 检测 SO_2 荧光探针的研究进展

荧光分析法检测 SO_2 的反应机理主要是亲核反应, 即 SO_2 及其衍生物通

过迈克尔加成反应选择性地加成到醛基、酮基或者双键上,导致反应体系的共轭 π 键发生变化,从而使体系的荧光性质发生改变。

Chang 等人利用商业化产品试卤灵设计出荧光探针 27,用于检测亚硫酸盐^[141]。在该实验中,亚硫酸盐能够选择性地和乙酰丙酸基反应生成四面体中间体,该中间体能够进一步发生分子内环化过程释放出试卤灵中间体(图 4-91)。

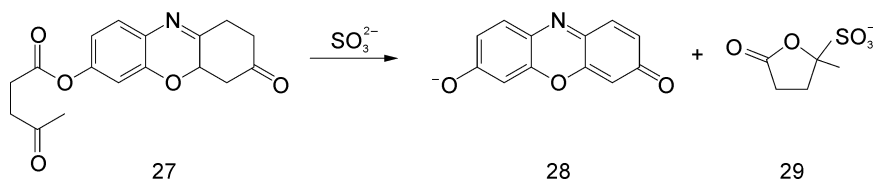


图 4-91 探针 27 的分子结构式及反应机理

Ma 等人^[277]基于荧光素设计出荧光探针 30,用于检测 SO_3^{2-} ,其反应机理为 SO_3^{2-} 分两次进攻乙酰丙酸酯上的羰基碳,然后分子内断键,生成上述小分子 29,最终释放出荧光素(图 4-92)。

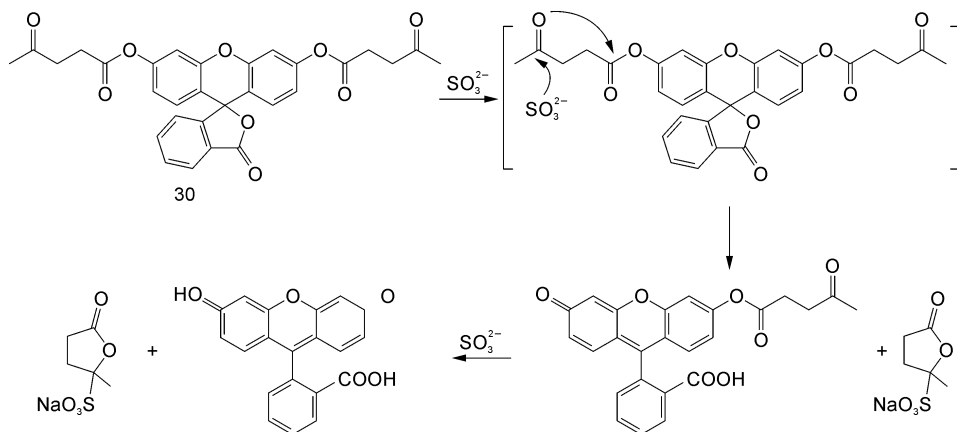


图 4-92 探针 30 的分子结构式及对 SO_3^{2-} 的检测机理

Guo 等人设计出一种香豆素-半花菁染料 31,用于检测 $\text{HSO}_3^-/\text{SO}_3^{2-}$ ^[267]。 $\text{HSO}_3^-/\text{SO}_3^{2-}$ 一对双键的亲核加成是通过一种新的加成——重排机理来打断分子的共轭结构,从而使香豆素-半花菁 633 nm 处的红色荧光蓝移到香豆素的蓝色荧光(图 4-93)。

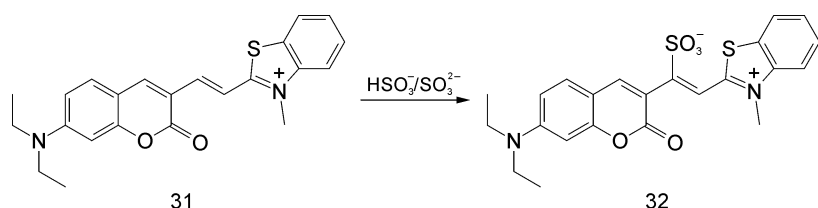


图 4-93 探针 31 的分子结构式及反应机理

Zhou 和 Wu 等人发现亚硫酸盐与 α, β -不饱和酮的迈克尔加成在某些条件下是可逆的^[278], 通过将氰乙酸乙酯基团与不饱和酮相连设计出荧光探针 33, 该探针分子对亚硫酸盐表现出很好的选择性, 检出限为 27 nmol/L。另外, 该反应过程也能够通过氧化还原-串联反应发生可逆(图 4-94)。

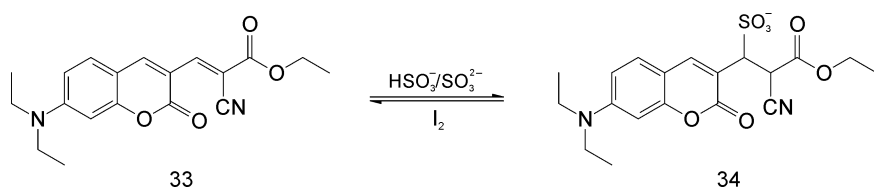


图 4-94 探针 33 的分子结构式及反应机理

Cheng 等人利用醛基与亚硫酸盐的亲核加成反应机理设计出探针分子 35 和探针 36^[279]。探针 35 因分子内存在 ICT 过程, 所以分子本身几乎没有荧光 ($\Phi=0.02$)。与 SO_3^{2-} 反应后, 因分子内 ICT 过程被打断, 使得 484 nm 处荧光增强 ($\Phi=0.43$), 而探针分子 36 本身在 515 nm 处有荧光 ($\Phi=0.40$), 与 SO_3^{2-} 反应后, 荧光发射峰蓝移到 395 nm ($\Phi=0.67$), 如图 4-95 所示。

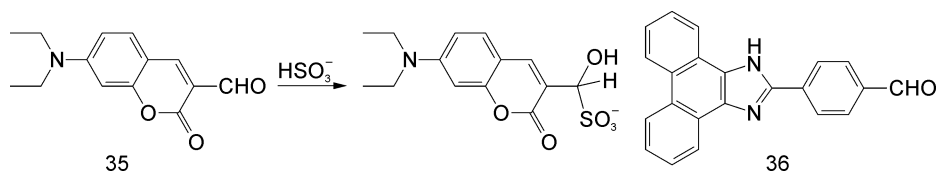


图 4-95 探针 35 的分子结构式及反应机理和探针 36 的分子结构式

基于同样的反应机理, 利用罗丹明荧光团设计出荧光探针 37, 用于测定 HSO_3^- ^[280]。反应前, 探针分子的罗丹明结构处于关环状态, 因此没有荧光, 与 HSO_3^- 反应后, 螺环被打开, 生成化合物 38, 因此反应体系的荧光得以恢复(图 4-96)。

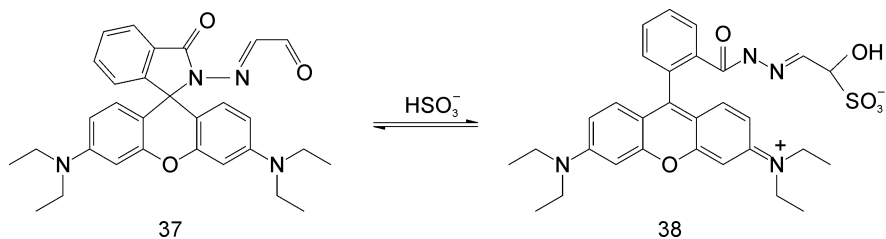


图 4-96 探针 37 的分子结构式及反应机理

Yu 等人利用同样机理,基于 PET 过程设计出荧光探针 39^[281]。由于分子内醛基的拉电子效应导致分子内存在 PET 过程,使得有荧光的蒽发生荧光淬灭。探针 39 本身没有荧光,与 SO_3^{2-} 作用后, SO_3^{2-} 与醛基发生亲核加成反应,破坏了分子内 PET 过程,蒽的荧光得以恢复,从而达到检测亚硫酸盐的目的(图 4-97)。

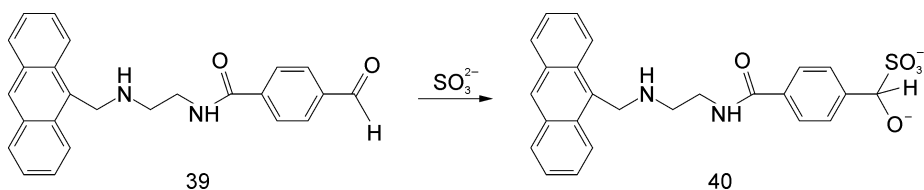


图 4-97 探针 39 的分子结构式及反应机理

除了亲核反应外,还有其他用于检测 SO_2 的反应类型。Wang 等人基于分子内 ICT 过程设计出含有 4-胍基-1,8-萘二甲酰亚胺基团的探针分子 41,用于检测亚硫酸盐^[282]。探针分子本身没有荧光,加入 SO_3^{2-} 后,在 530 nm 出现了荧光发射峰。具体反应机理尚不清楚(图 4-98)。

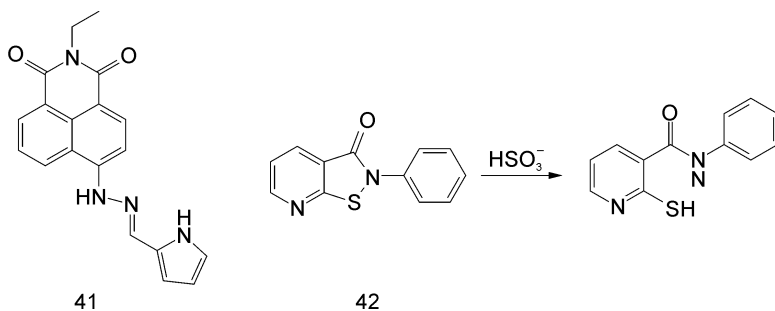


图 4-98 探针 41 和探针 42 的分子结构式及反应机理

Yang 等人设计出探针分子 42, 用于检测 HSO_3^- [283] (图 4-98)。与 HSO_3^- 反应后, 探针分子 42 发生开环反应, 使得反应体系在 450 nm 处出现荧光峰, 检出限为 $0.39 \mu\text{mol/L}$ 。

图 4-99 所示的是具有聚集诱导发光效应的比例型同步荧光探针 DPTPA2, 采用新的检测方法——同步荧光光谱, 对四种不同种类物质进行了选择性研究, 说明了该化合物对亚硫酸盐具有高度的选择性。

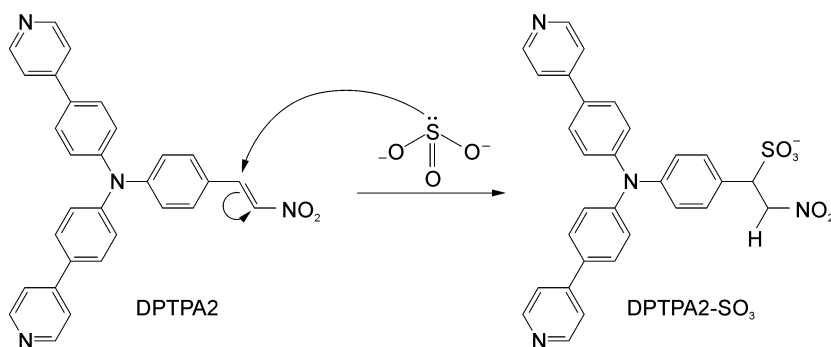


图 4-99 DPTPA2 和其亚硫酸盐的分子结构式及反应机理

4.16.6 检测 NO 荧光探针的研究进展

通常状况下, NO 是一种难溶于水的无色无味气体, 它在生物体内由一氧化氮合酶和内皮细胞分泌, 被称为第一种无处不在的气体信号分子。内源性的 NO 在多种生理和病理过程 (如调节心血管、免疫、中央和周围神经系统等) 中的正常运行等) 中发挥着重要作用, 异常分泌的 NO 还与癌症、炎症、内皮功能障碍, 以及神经变性疾病等很多健康问题有关。

4.16.7 基于邻苯二胺的 NO 荧光传感器

Nagano 课题组基于邻苯二胺 (OPD) 设计出能够在体内外高效检测 NO 的荧光传感器。这些传感器的响应机理是由于探针分子本身的供电子邻二胺中间体的作用, 使得分子内存在 PET 过程, 因而分子没有荧光, 当 OPD 与 NO^+ 或 N_2O_3 发生不可逆反应时, 产生苯并三唑中间体, 能够阻断探针分子的 PET 过程, 从而使反应体系的荧光得以恢复。

Nagano 等人基于二氨基-荧光素设计了一系列荧光传感器, 通过螺内酯

开环实现对 NO 的检测。这种由 NO 引发的化学转变经历了以下过程：在有氧条件下, NO 与芳香族邻二胺发生反应, 经过开环生成苯并三唑中间体, 从而释放出具有强荧光的三环二烯酮。由于传感器分子 43~49 与 NO 反应后转化成具有强荧光的三环形式, 反应体系的荧光量子产率增强了 100 多倍。

然而, 与 NO 反应后生成的三唑质子导致此类反应不适合在中性 pH 范围中进行。为解决这个问题, Nagano 及其课题组向 NO 传感器分子中引入 N-甲氨基基团。以探针 50 和探针 51 为例^[284], 该甲基化传感器因与 NO 反应具有更高的反应速率, 所以对 NO 具有更好的选择性。因此, 这些传感器与荧光显微镜联合使用可以直接用于检测细胞内生产的 NO。实际上, 具有较好膜渗透性的传感器分子 51 可以在细胞内酯酶作用下转化成具有较好水溶性的传感器分子 50, 然后在一氧化氮合酶的作用下与 NO 反应, 形成具有荧光的苯并三唑(图 4-100)。

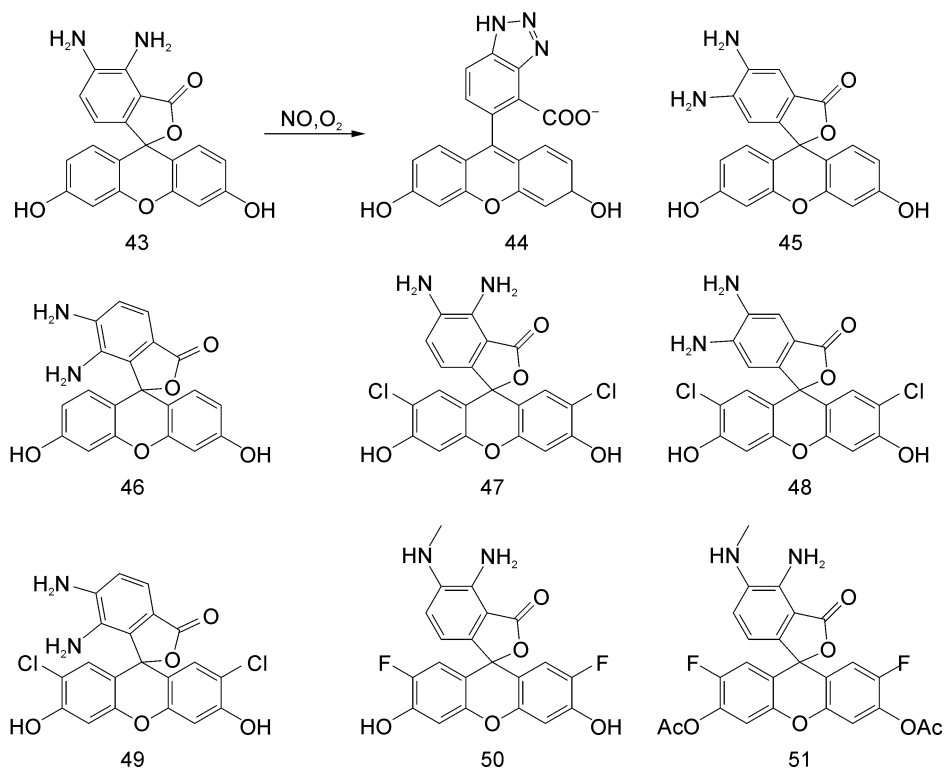


图 4-100 化合物 43~51 的分子结构式

基于相同的邻苯二胺环化机理, Nagano 等人设计出带有不同荧光性质的 NO 传感器 61~66(图 4-101)。

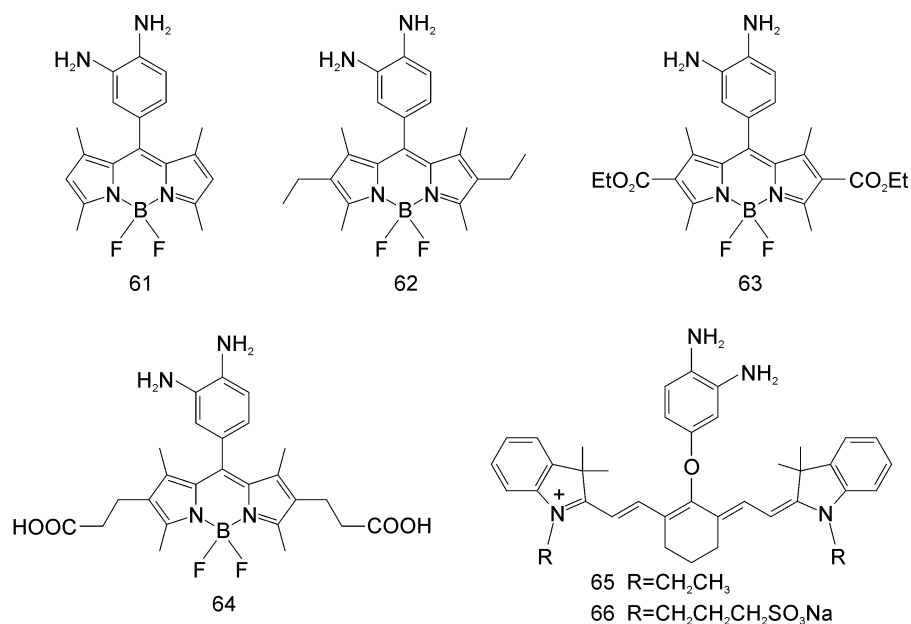


图 4-101 化合物 61~66 的分子结构式

近年来,双光子显微镜(TPM)因其具有更强的组织渗透性在生物成像领域引起很大关注^[285]。Liu 等人设计出双光子荧光探针 67,用于检测 NO^[286],反应后体系的荧光强度增大 12 倍。利用双光子显微镜,探针分子 67 可以检测很长一段时间范围内深度为 90~180 μm 的未经漂白的活组织中的 NO。Kim 和 Cho 报道了双光子荧光探针 68,该探针分子由乙酰苯胺与二胺部分作为反应位点构成^[287],与 NO 反应 5 min 后反应体系荧光强度增大 68 倍,探针 68 可用于监控 100~180 μm 深度的活体组织的细胞和组织成像(图 4-102)。

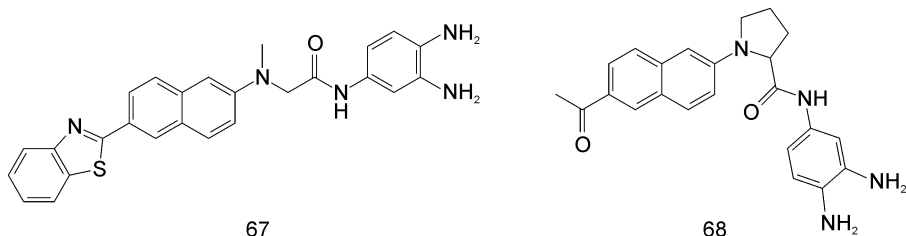


图 4-102 化合物 67、化合物 68 的分子结构式

此外,连接内酰胺的邻苯二胺基团已被发展成为用于构建 NO 荧光传感器的反应位点。基于该方法,Xu 及其工作者设计出荧光探针 69,用于在正常的生理条件下实现对 NO 的高效检测^[288],其反应机理为 NO 促进邻二胺重氮化,伴随螺内酰胺的开环,生成荧光染料 70,然后进一步水解成罗丹明 B 和苯并三唑。探针 70 反应体系荧光强度增大 2 400 倍,检出限为 3 nmol/L(图 4-103)。

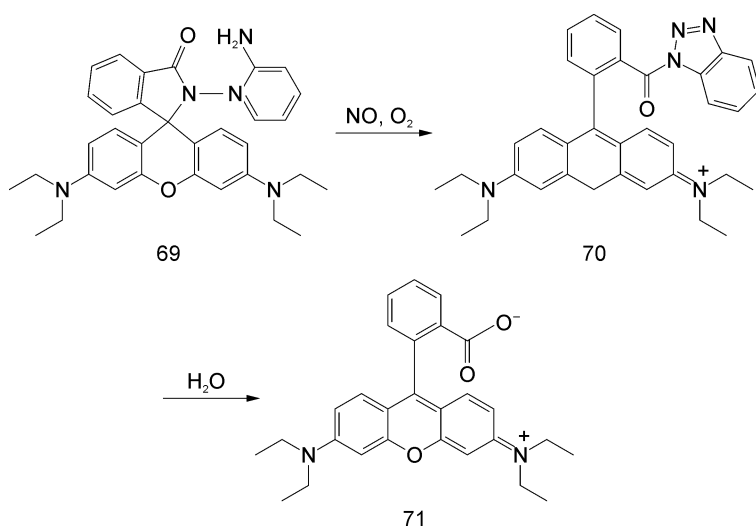


图 4-103 探针 69~71 的分子结构及反应机理

4.16.8 基于 Cu²⁺ 还原的 NO 荧光传感器

科研工作者们利用 NO 把 Cu²⁺ 还原成 Cu⁺ 的方法设计出检测 NO 的荧光传感器。当顺磁性的 Cu²⁺ 与荧光团配位时,可引起荧光团的荧光淬灭。当荧光传感器与 NO 反应时,Cu²⁺ 被还原成 Cu⁺,而 Cu⁺ 不能使荧光淬灭,所以导致反应前后体系的荧光性质发生变化。Ford 等人设计出荧光传感器 72,探针分子 72 本身存在顺磁性的 Cu²⁺,导致分子内荧光淬灭,因而探针分子没有荧光。加入 NO 后,Cu²⁺ 被还原成 Cu⁺,导致在氨基配位点上释放出游离的亚硝基配位体,使得蒽发光体的荧光恢复。

Lippard 等人设计出另外一种通过 NO 还原荧光素-Cu²⁺ 化合物 73 的反应来检测 NO^[289]。该化合物能够特异地、快速地与 NO 反应,即通过亚硝基化反应 NO 诱导 Cu²⁺ 中心的配位体分离,从而使 Cu²⁺ 被还原成 Cu⁺。

Duan 等人基于罗丹明设计出包含 Cu^{2+} 的化合物 74, 来检测 NO, 其反应机理为 NO 结合到平面四边形的 Cu^{2+} 上, 将 Cu^{2+} 还原成 Cu^+ , 然后自发释放出 NO^+ , NO^+ 促进螺内酰胺开环和亚硝基化反应, 反应体系的荧光强度增大 700 倍。该探针分子已被成功用于检测细胞内的 NO(图 4-104)^[139]。

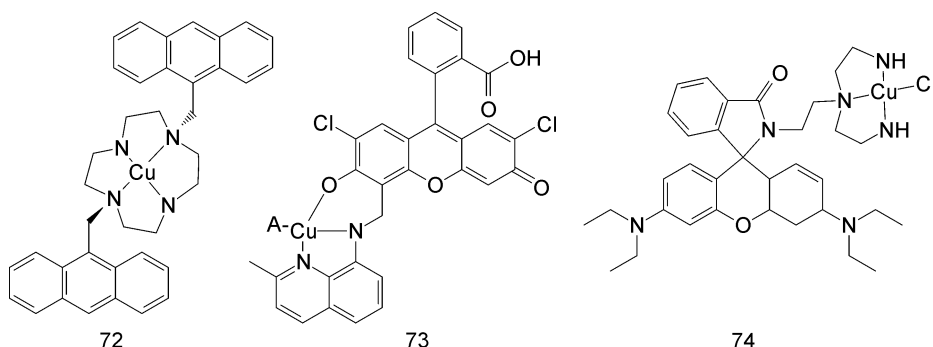


图 4-104 化合物 72~74 的分子结构式

4.16.9 基于其他方法的 NO 荧光传感器

除了上述所介绍的检测 NO 的方法外, 其他方法也被设计出用于 NO 气体的检测。在 2010 年, Anslyn 等人利用一种新的反应机理设计出含有 2-二甲基氨基苯基-5-氰基-1-萘胺荧光团的传感器分子 75。传感器分子本身没有荧光, 与 NO 反应后, 在 550 nm 处荧光强度增大 1 500 倍。重要的是, 该传感器分子对 NO 比其他 ROS/RNS 有更好的选择性。另外, 该传感器分子能够在很宽的 pH 范围内与 NO 反应并且可用于 NO 的生物成像。

为了优化这种方法, Guo 等人设计出改进后的传感器分子 76, 用于对 NO 的检测, 该分子连接 2-氨基-3-邻二甲基氨基联苯(AD)作为 NO 的结合位点, 并且与一个 BODIPY 荧光团相连^[290]。由于分子内 PET 过程荧光很弱, 在 NO 存在下, 探针分子 76 发生上述反应过程而生成重氮产物, 由于生成的产物不存在氨基供电子体, 因此分子内 PET 过程被阻断, 使得反应体系荧光恢复。另外, 该传感器分子对 NO 比其他 ROS/RNS 具有更好的选择性, 检出限为 30 nmol/L。初步细胞实验的结果表明, 该传感器在生物系统中的 NO 生物成像方面具有潜在价值(图 4-105)。

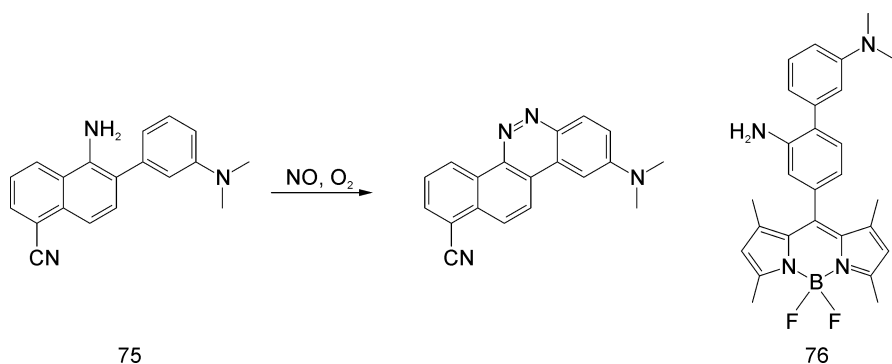


图 4-105 探针 75、探针 76 的分子结构式及反应机理

4.16.10 检测 HNO 荧光探针的研究进展

HNO 是 NO 的一价还原态形式,在生理条件下主要以质子化形式存在,合适条件下可由一氧化氮氧化酶直接生成,并且与 NO 表现出的生理和病理学性质明显不同。研究发现,HNO 在重要生物学功能中的各种生理过程中发挥着重要作用。因此近年来,HNO 在生物体中的作用机制成为生物学家们关注的焦点。例如,HNO 可与酸脱氢酶中的硫醇发生反应,从而抑制酶的活性。HNO 能够通过激活 K^+ 通道的电压来调节血管舒张。此外,HNO 还能够调节心血管功能,并且可以作为治疗心血管疾病如心脏衰竭的有效工具。尽管对于 HNO 的研究已有一些进展,但我们对 HNO 的生物作用仍然知之甚少。因此,寻找更有效、选择性更好的化学手段来检测 HNO 仍然是很有必要的。

4.16.11 利用施陶丁格连接反应检测 HNO

施陶丁格连接(Staudinger-Ligation)反应是检测 HNO 最常见,也是非常有效的反应,它指叠氮化物与磷(三苯基磷)或亚磷酸酯反应得到亚氨基磷烷中间体,然后该中间体进行水解,可以得到相应的胺和氧化磷(三苯基氧磷),它由 Hermann Staudinger 发现并首先报道。其反应机理为:首先磷与叠氮化物的端基氮发生亲核加成反应,然后经过分子内环化生成磷杂三吡丁环中间体,再放出氮气,产生亚胺基磷烷,最后亚胺基磷烷水解为胺和氧化磷。2000 年由 Saxon 和 Bertozzi 对该反应进行了改进与发展。新的施陶丁格连接反应指位于三芳磷上的亲电基团(如甲酯)捕获氮杂叶立德(亚胺基磷烷)中间体,在水的作用下,分子发生重排,生成分子内酰胺基氧化磷(图 4-106)。