

文章编号 1006-8147(2019)05-0531-05

论 著

基于茚母核的新型水溶性弱酸性荧光 pH 指示剂

李华锟, 廖永芳, 刘阳平

(天津医科大学药学院药物化学教研室, 天津市临床药物关键技术重点实验室, 天津 300070)

摘要 目的:设计并合成可以检测弱酸性环境的 pH 荧光探针,为检测溶酶体 (pH=4~5)和内涵体 (pH=5~6)中的酸性环境提供科学的方法依据。**方法**:以 2,7-二溴茚为荧光母核,分别与电子给体二乙胺基和电子受体苯并噻唑相连,构建供体- π -受体体系,并在茚的亚甲基上引入能够改善水溶性的二乙二醇甲醚乙基得到目标化合物 5,并对其进行核磁表征确定结构,采用紫外分光光度计法和荧光光谱法研究目标化合物 5 对 pH 值的响应性,计算 pKa。**结果**:核磁数据与化合物结构相吻合,化合物 5 紫外吸光度与荧光强度变化具有 pH 依赖性,通过非线性回归显示 pKa 为 5.88。**结论**:基于茚母核结构设计并合成了探针化合物 5,紫外和荧光结果表明是一个弱酸性 pH 荧光指示剂,在弱酸性环境的检测方面应该具有很好的应用前景。

关键词 弱酸性;荧光;pH;指示剂;茚

中图分类号 R914

文献标志码 A

A water soluble fluorene core pH indicator in weak acidic environments

LI Hua-kun, LIAO Yong-fang, LIU Yang-ping

(Department of Pharmacochimistry, School of Pharmacy, Tianjin Medical University, Tianjin Key Laboratory on Technologies Enabling Development of Clinical Therapeutics and Diagnostics, Tianjin 300070, China)

Abstract Objective: To design and synthesize the pH-sensitive fluorescent probes that could detect weak acidic conditions, which would provide a scientific basis for detecting the acidic environments of lysosomes (pH=4~5) and endosomes (pH=5~6). **Methods:** Based on a fluorescent core 2,7-dibromofluorene, a donor- π -acceptor system was developed via conjugation with the electron donor diethylamine and the electron acceptor benzothiazole. The diethylene glycol methyl ether ethyl group was introduced to the methylene position of fluorene to improve the solubility and finally compound 5 was obtained. The compound 5 was characterized by NMR. UV-Vis and fluorescence spectroscopies were used to study its pH-responsive properties and the pKa was calculated. **Results:** The NMR spectral data were well agreement with the compound 5 as well as the intermediates. The changes of UV-vis absorbance and fluorescence intensity of compound 5 were pH-dependent. The pKa was calculated to be 5.88 by nonlinear regression analysis. **Conclusion:** The compound 5 can be designed and synthesized based on the fluorene core. The results from UV-Vis and fluorescence experiments indicate that it may be a weak acidic fluorescent pH indicator, showing a great promise in the detection of weak acidic environment.

Key words weak acid; fluorescence; pH; indicator; fluorene

细胞内 pH 的动态变化被认为是理解细胞中许多生理功能调节机制的关键^[1]。pH 值的有效控制对维持细胞正常的生理活动十分重要。目前细胞内 pH 值测定方法主要有光化学法、弱酸弱碱分布法、微电极法、核磁共振法等几种。其中光学方法有响应时间快,高信噪比,无创性和良好的 pH 敏感性等几个优点。自从首次捕获到细胞内的 pH 探测器 6-羧基荧光素后,Thomas 等^[2-3]已经描述了很多 pH 指示性质^[1,4-11]。

为了定量的测量 pH 值,需要指示剂的 pKa 与实验系统的 pH 值相匹配。溶酶体与内涵体是存在于细胞结构中的亚细胞结构,在细胞的活动扮演着重要的作用,所以对于这些细胞器的定位与追

踪,具有重要的意义。由于溶酶体和内涵体的 pH 值分别在 4~5 和 5~6 之间,因此开发高效的弱酸性 pH 荧光指示剂是非常有意义的。在此,笔者报告一种基于新型茚母核的敏感的弱酸性荧光 pH 指示剂。

茚衍生物以其高荧光量子产率和优异的光稳定性著称^[12-13]。最近茚基共轭化合物因为其中具有高双光子吸收(2PA)横截面,也被报道为优异的双光子荧光(2PF)材料^[14-18]。因此本文基于茚母核进行衍生化以期得到可以指示弱酸性 pH 的荧光探针。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器 二乙二醇-2-溴乙基甲醚、2,7-二溴茚、正丁基锂(n-BuLi)、碘化钾(KI)、二乙胺和 2-氨基苯硫酚等试剂购买于阿拉丁试剂公司。干燥的 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)和二甲基亚砜(DMSO)购买于 Sigma 试剂公司。干燥的 THF 经过金属钠干

作者简介 李华锟(1985-),男,硕士在读,研究方向:药物化学;通信作者:刘阳平,E-mail:liuyangping@tmu.edu.cn。

干燥处理制备。核磁数据采集于 Bruker 400M 核磁共振波谱仪上。

1.2 目标化合物的合成路线及合成步骤 见图 1。

1.2.1 化合物 9,9-二乙二醇甲醚乙基-2,7-二溴芴

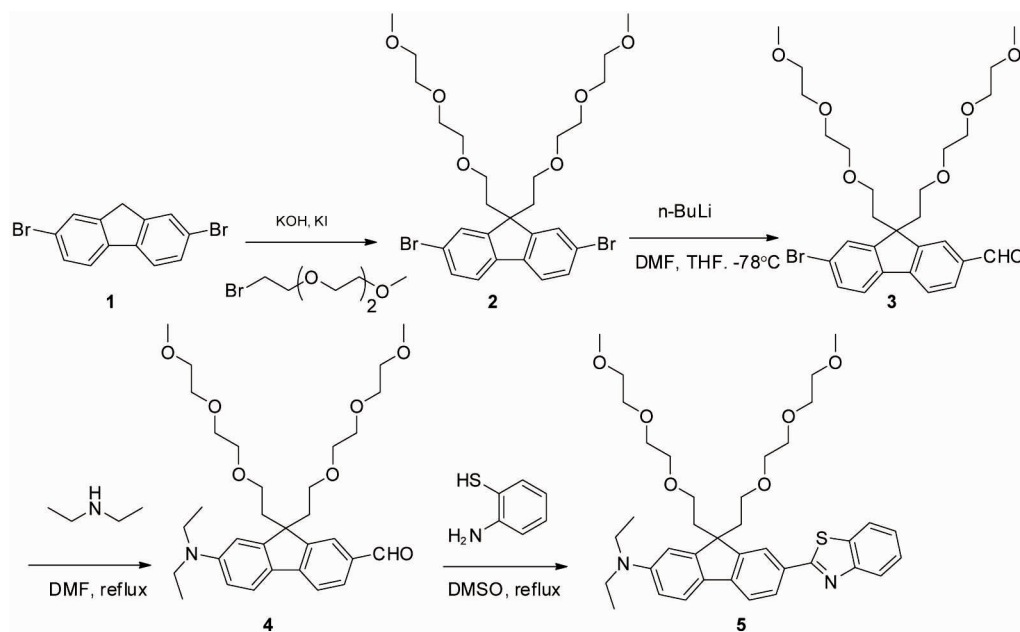


图 1 目标化合物 5 的合成路线

Fig 1 The synthetic route of target compound 5

2 的合成 将 2,7-二溴芴 (0.907 g, 2.8 mmol)、二乙二醇-2-溴乙基甲醚 (1.294 g, 5.7 mmol) 溶于 DMSO (7 mL) 中, 当然后加入 KI (0.049 g, 0.3 mmol) 和 KOH (0.665 g, 11.9 mmol), 在氩气保护下室温搅拌 1 h。将反应液倒入水中 (50 mL), 乙酸乙酯萃取 3 次 (20 mL×3), 有机相水洗, 无水 Na_2SO_4 干燥, 减压浓缩。浓缩液经硅胶柱层析纯化 (PE:EA=10:1) 得黄色化合物 2 (1.328 g), 产率 77%。

1.2.2 化合物 9,9-二乙二醇甲醚乙基-7-溴芴-2-甲醛 3 的合成 将原料 2,7-二溴芴 (1.18 g, 1.914 mmol) 溶于干燥的 THF (7 mL) 中, 冷却至 -78°C , 然后缓慢滴加 n-BuLi (1.6 mol/L 正己烷溶液, 1.28 mL)。滴加完毕后 20 min, 加入 DMF (0.21 mL, 2.693 mmol) 与 THF (0.37 mL) 的混合溶液, 反应液在此温度下反应 1.5 h, 然后缓慢升至室温反应 1 h。反应液冷却至 5°C , 加入盐酸水溶液 (2 mol/L, 1.5 mL) 淬灭反应。反应液用乙酸乙酯萃取 3 次 (40 mL×3), 合并有机相并用饱和 NaHCO_3 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 旋蒸浓缩得粗产品, 经硅胶柱层析纯化 (PE:EA=8:1) 得白色目标化合物 (0.806 g), 产率 78.4%。

1.2.3 化合物 9,9-二乙二醇甲醚乙基-7-二乙胺基芴-2-甲醛 4 的合成 将化合物 3 (0.679 g, 1.2 mmol) 溶于干燥的 DMF (4 mL), 然后加入二乙胺 (0.877 g,

12 mmol), 氩气保护油浴加热回流反应 12 h。反应结束, 将反应液倒入水中 (50 mL), 乙酸乙酯萃取 3 次 (20 mL×3), 1N 盐酸水溶液洗涤 (20 mL), 水洗 (20 mL), 无水 Na_2SO_4 干燥, 减压浓缩。浓缩液经硅胶柱层析纯化得化合物 4 (0.468 g), 产率 70%。

1.2.4 化合物 9,9-二乙二醇甲醚乙基-7-二乙胺基-2-(2-苯并噻唑)芴的合成 将化合物 4 (0.329 g, 0.59 mmol) 和 2-氨基苯硫酚 (0.18 g, 1.48 mmol) 溶于 DMSO (3 mL), 油浴加热 195°C 反应 2.5 h。反应结束将反应液倒入水 (30 mL) 中, 乙酸乙酯萃取 3 次 (20 mL×3), 饱和 NaHCO_3 洗涤, 水洗, 无水 Na_2SO_4 干燥, 减压浓缩。浓缩液经硅胶柱层析纯化 (PE:EA=5:1) 的黄色目标化合物 (0.265 g), 产率 68%。

2 结果

2.1 目标化合物和中间体核磁数据的表征 在碱性条件下对 2,7-二溴芴的 9 位进行双烷基取代得到化合物 2, 然后 n-BuLi 拔溴与 DMF 反应得到化合物 3, 随后再与二乙胺发生亲核取代反应得到化合物 4, 化合物 4 与 2-氨基苯硫酚缩合得到目标化合物 5。并对各中间体和目标化合物进行核磁表征, 数据如下:

化合物 2: ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.53–7.45 (m, 6H), 3.54–3.52 (m, 4H), 3.50–3.47 (m, 4H),

3.40–3.38 (m,4H), 3.34 (s,6H), 3.22–3.19 (m,4H),
2.77 (t, $J=7.6$ Hz, 4H), 2.33 (m, 7.6 Hz, 4H) (图 2)。

化合物 3: ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 10.05
(s, 1 H), 7.92 (s, 1H), 7.88 (dd, $J=7.6, 1.2$ Hz, 1H),

7.79 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.62 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 7.63
(d, $J=2.4$ Hz, 1H), 7.51 (dd, $J=8.0, 1.6$ Hz, 1H), 3.51–
3.44 (m, 8H), 3.36–3.33 (m, 10H), 3.18–3.16 (m, 4H),
2.79–2.75 (m, 4H), 2.47–2.34 (m, 4H) (图 3)。

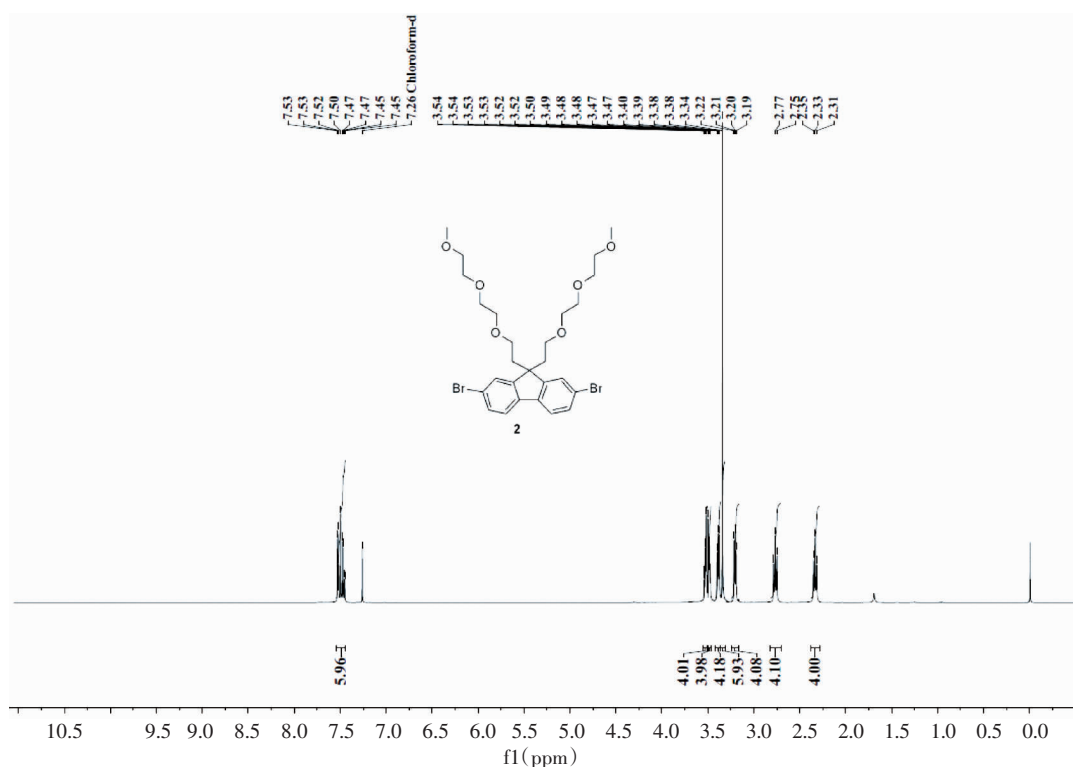


图 2 化合物 2 核磁表征

Fig 2 MNR Characterization of Compound 2

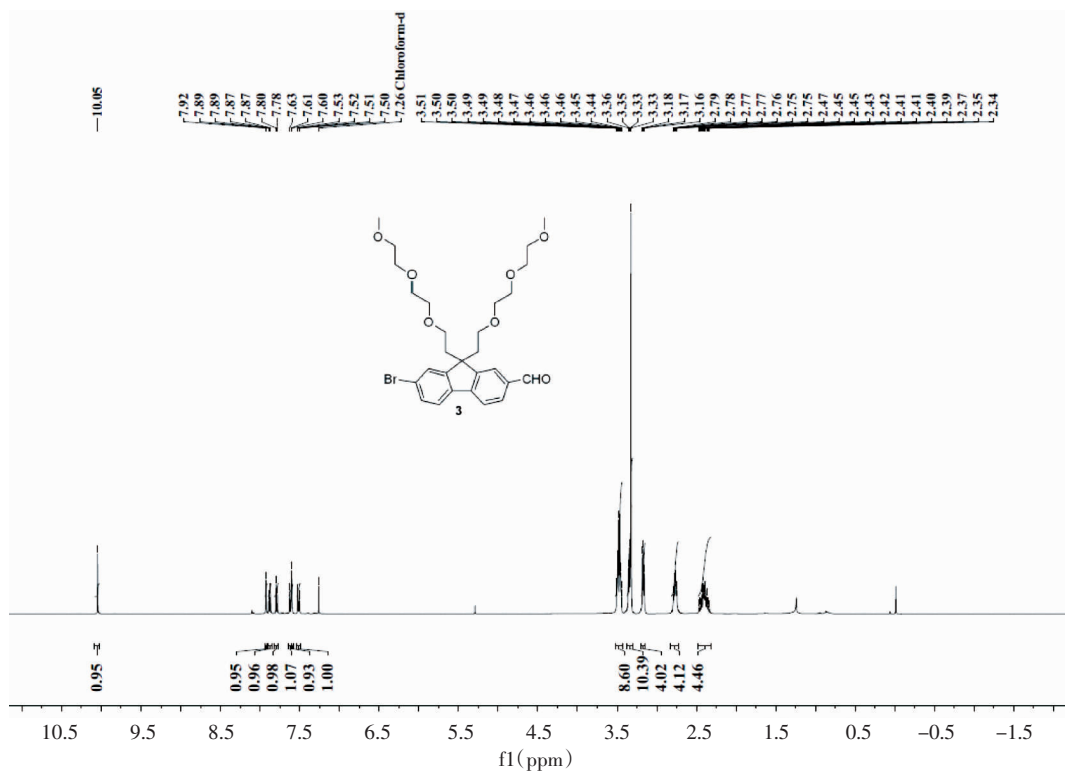


图 3 化合物 3 核磁表征

Fig 3 MNR Characterization of Compound 3

化合物 4: ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 9.96 (s, 1H), 7.83 (s, 1H), 7.78 (d, $J=7.2$ Hz, 1H), 7.60–7.51 (m, 2H), 7.68–6.57 (m, 2H), 3.51–3.18 (m, 26H), 2.84–2.72 (m, 4H), 2.45–2.26 (m, 4H), 1.21 (t, $J=7.2$ Hz, 6H) (图 4)。

化合物 5: ^1H NMR (400 MHz, MeOD) δ 8.15 (s, 1H), 8.01–7.98 (m, 3H), 7.65–7.39 (m, 4H), 6.80 (s, 1H), 6.75 (d, $J=6.4$ Hz, 1H), 3.49–3.18 (m, 26H), 2.93–2.80 (m, 4H), 2.51–2.34 (m, 4H), 1.28–1.21 (m, 6H) (图 5)。

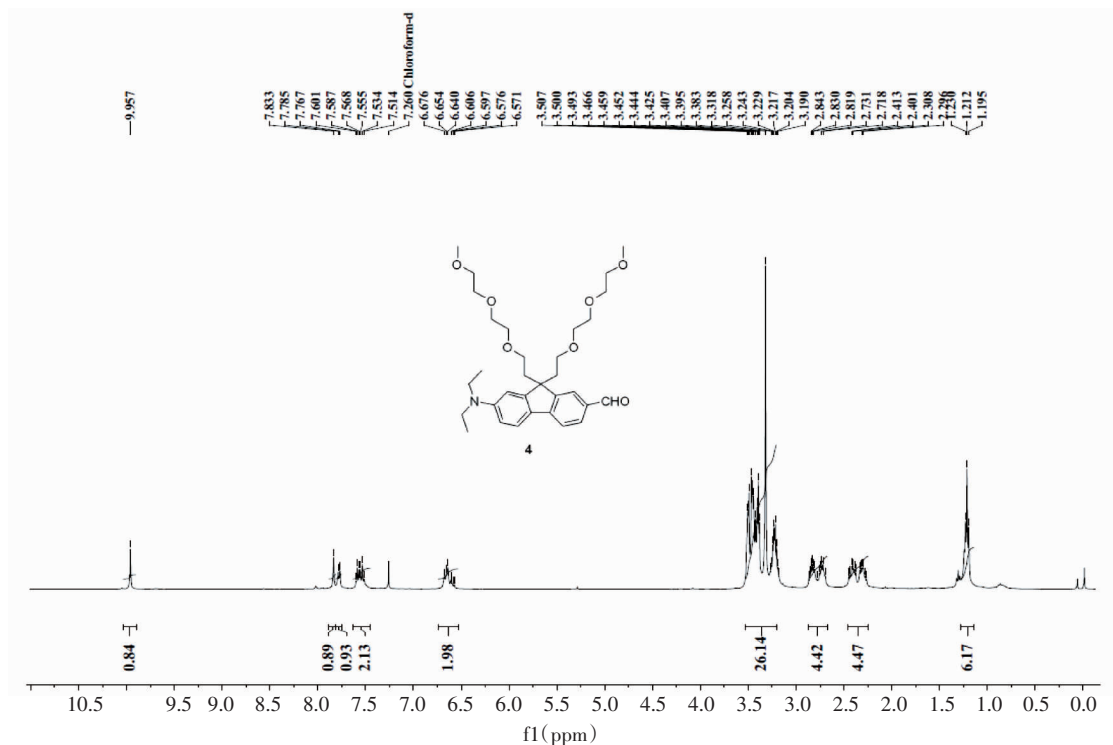


图 4 化合物 4 核磁表征

Fig 4 MNR Characterization of Compound 4

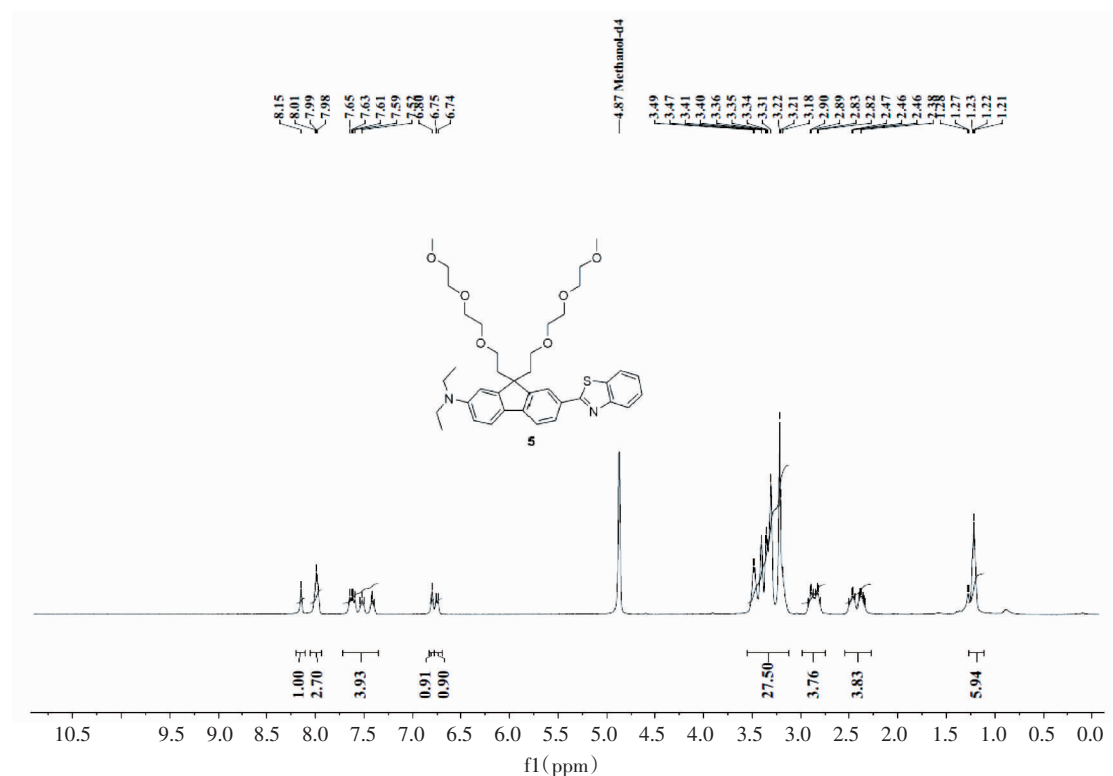


图 5 化合物 5 核磁表征

Fig 5 MNR Characterization of Compound 5

2.2 化合物5紫外吸收变化与pH值的关系 质子化的化合物5的最大吸收峰在341 nm,中性态化合物5的最大吸收峰在409 nm。紫外吸收光谱随pH值的变化如图6所示,随着pH值的增加,化合物在341 nm的吸收强度逐渐降低,而409 nm的吸收强度逐渐升高,并在355 nm处形成一个等当点。由于与苕相连的二乙胺基氮的碱性明显高于苯并噻唑氮的碱性,因此质子化优先发生在二乙胺基氮的位置。根据文献报道的方法,对341 nm处的紫外吸光度进行非线性回归,结果显示化合物5的pKa为 5.75 ± 0.12 。

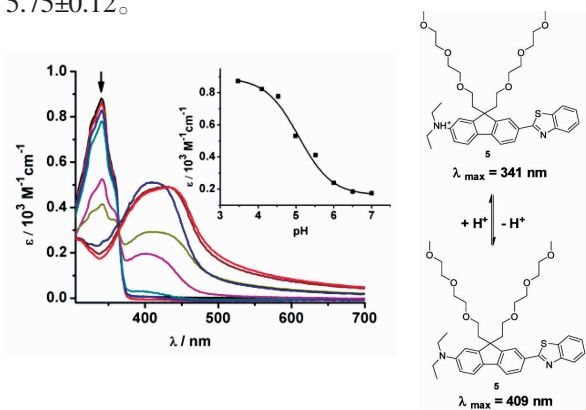


图6 在磷酸缓冲液中(50 mmol/L),化合物5(25 $\mu\text{mol/L}$)的吸收光谱显示为pH依赖性,箭头显示吸收强度随pH增加而变化。(箭头)341 nm处吸光系数与pH值非线性拟合

Fig 6 pH dependence of the absorption spectra of compound 5 (25 $\mu\text{mol/L}$) in PB buffer (50 mmol/L) with arrow indicating the change of the absorption intensities with pH increase. (Arrow) Nonlinear fitting of the pH-dependent extinction coefficients at 341 nm

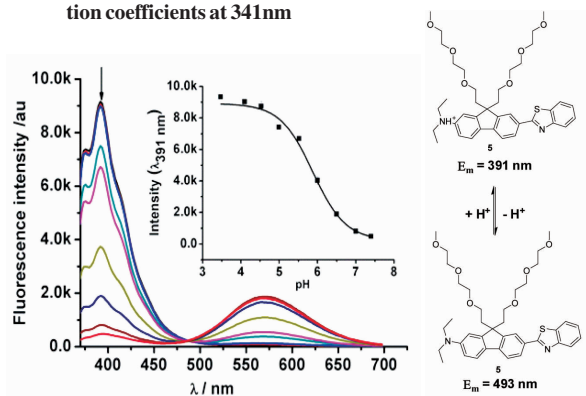


图7 在355 nm(吸收等当点波长)处激发,化合物5(10 $\mu\text{mol/L}$)在磷酸缓冲液(50 mmol/L)中荧光强度显示pH依赖性,箭头显示荧光强度随pH增加而变化。(箭头)391 nm处荧光强度与pH值的非线性拟合

Fig 7 pH-dependence of the fluorescence intensity of compound 5 (10 $\mu\text{mol/L}$) in PB buffer (50 mmol/L) excited at 355 nm (absorption isobestic point wavelength in Fig 1) with arrow indicating the change of the fluorescent intensities with pH increase. (Arrow) Nonlinear fitting of the pH-dependent fluorescent intensity at 391 nm

2.3 目标化合物荧光强度变化与pH值的关系 由图7所示,当化合物5在等当点(355 nm)波长处被激发时,可以观察到质子态和中性态的荧光发射,分别在392 nm和571 nm。随着pH值的增加,392 nm处的荧光强度逐渐降低,571 nm处的荧光强度逐渐增加。根据文献报道的方法,对392 nm处的荧光强度进行非线性回归,结果显示化合物5的pKa为 5.88 ± 0.06 。这一结果与利用341 nm处的紫外吸光度进行非线性回归所得pKa相吻合。

3 讨论

综上所述,笔者通过4步反应合成了目标化合物5,并对其结构进行了核磁表征。紫外吸光度法和荧光光谱法显示,化合物紫外吸光系数与荧光强度随着pH的变化而变化,通过非线性拟合显示化合物的pKa为5.88,是一个弱酸性的pH荧光指示剂,笔者下一步的工作将要探索其在弱酸性环境的溶酶体和内涵体方面的应用前景。

参考文献:

- [1] Haugland R P, Spence M T Z, Johnson I, et al. The Molecular Probes™ Handbook: A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies. 10th ed[M]. Carlsbad: Molecular Probes, Invitrogen Detection Technologies, 2011: 1276
- [2] Thomas J A, Buchsbaum R N, Zimniak, et al. Intracellular pH measurements in Ehrlich ascites tumor cells utilizing spectroscopic probes generated in situ[J]. Biochem, 1979, 18(11): 2210
- [3] Belt J A, Thomas J A, Buchsbaum R N, et al. Inhibition of lactate transport and glycolysis in Ehrlich ascites tumor cells by bioflavonoids[J]. Biochem, 1979, 18(16): 3506
- [4] El-Shishtawy R M, Almeida P. A new Vilsmeier-type reaction for one-pot synthesis of pH sensitive fluorescent cyanine dyes[J]. Tetrahedron, 2006, 62(33): 7793
- [5] Bizzarri R, Arcangeli C, Arosio D, et al. Development of a novel GFP-based ratiometric excitation and emission pH indicator for intracellular studies[J]. Biophys J, 2006, 90(9): 3300
- [6] Zhang Z, Achilefu S. Design, synthesis and evaluation of near-infrared fluorescent pH indicators in a physiologically relevant range[J]. Chem Commun(Camb), 2005(47): 5887
- [7] Valuk V F, Duportail G, Pivovarenko V G. A wide-range fluorescent pH-indicator based on 3-hydroxyflavone structure[J]. Photochem Photobiol, 2005, 175(2/3): 226
- [8] Baruah M, Qin W, Basaric N D, et al. BODIPY-based hydroxyaryl derivatives as fluorescent pH probes[J]. J Org Chem, 2005, 70(10): 4152
- [9] Ertekin K, Cinar S, Aydemir T, et al. Glucose sensing employing fluorescent pH indicator: 4-[(pN,N-dimethylamino)benzylidene]-2-phenyloxazole-5-one[J]. Dyes Pigments, 2005, 67(2): 133
- [10] Dong S, Ma H, Li X, et al. Synthesis of a New Water-Soluble Polymeric Probe and its Fluorescent Properties for Ratiometric Measurement of Near-Neutral pH[J]. Anal Lett, 2004, 37(14): 2937
- [11] Diwu Z, Chen C S, Zhang C, et al. A novel acidotropic pH indicator and its potential application in labeling acidic organelles of live cells[J]. Chem Biol, 1999, 6(7): 411

(下转第539页)

- mutations in the thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter [J]. *Nat Genet*, 1996,12(1):24
- [8] Kurtz I. Molecular pathogenesis of Bartter's and Gitelman's syndromes[J]. *Kidney Int*, 1998,54(4):1396
- [9] 秦岭. Gitelman 综合征[J]. *肾脏病与透析肾移植杂志*, 2008,17(1):72
- [10] 石然然,李丛丛,方丽,等. Gitelman 综合征的临床及基因诊断[J]. *中华内科杂志*, 2017, 56(2):104
- [11] 邵乐平, 逯静茹, 郎艳华, 等. 中国 Gitelman 综合征患者的基因型、表型分析及随访研究[J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2017,33(1):40
- [12] Ma J, Ren H, Lin L, et al. Genetic features of Chinese patients with gitelman syndrome: sixteen novel SLC12A3 mutations identified in a new cohort[J]. *Am J Nephrol*, 2016,44(2):113
- [13] 秦岭,邵乐平,任红,等. Gitelman 综合征的对表型的影响表型特点及性别因素[J]. *中华肾脏病杂志*, 2009,25(7):532
- [14] Riveira-Munoz E, Chang Q, Godefroid N, et al. Transcriptional and functional analyses of SLC12A3 mutations: new clues for the pathogenesis of Gitelman syndrome[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2007,18(4):1271
- [15] Chen Z F, Vaughn D A, Fanestil D D. Influence of gender on renal thiazide diuretic receptor density and response[J]. *J Am Soc Nephrol*, 1994,5(4):1112
- [16] Verlander J W, Tran T M, Zhang L, et al. Estradiol enhances thiazide-sensitive NaCl cotransporter density in the apical plasma membrane of the distal convoluted tubule in ovariectomized rats[J]. *J Clin Invest*, 1998,101(8):1661
- [17] 徐爱晶,苏玲,李秀珍,等. 儿童 Gitelman 综合征 3 例临床特点及基因分析[J]. *临床儿科杂志*, 2017,35(12):889
- [18] Cruz D N, Shaer A J, Bia M J, et al. Gitelman's syndrome revisited: An evaluation of symptoms and health-related quality of Life[J]. *Kidney Int*, 2001,59(2):710
- [19] Tseng M H, Yang S S, Hsu Y J, et al. Genotype, phenotype, and follow-up in Taiwanese patients with salt-losing tubulopathy associated with SLC12A3 mutation[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2012, 97(8):E1478
- [20] Ren H, Qin L, Wang W, et al. Abnormal glucose metabolism and insulin sensitivity in Chinese patients with gitelman syndrome [J]. *Am J Nephrol*, 2013,37(2):152

(2018-12-20 收稿)

(上接第 535 页)

- [12] Belfield K D, Bondar M V, Przhonska O V, et al. Photostability of a series of two-photon absorbing fluorene derivatives[J]. *J Photochem Photobiol A Chem*, 2004, 162(2/3): 489
- [13] Corredor C C, Belfield K D, Bondar M V, et al. One- and two-photon photochemical stability of linear and branched fluorene derivatives[J]. *J Photochem Photobiol A Chem*, 2006, 184(1/2):105
- [14] Belfield K D, Schafer K J, Mourad W, et al. Synthesis of new two-photon absorbing fluorene derivatives via Cu-mediated Ullmann condensations[J]. *J Org Chem*, 2000, 65(15): 4475
- [15] Belfield K D, Morales A R, Hales J M, et al. Linear and two-photon photophysical properties of a series of symmetrical diphenylaminofluorenes[J]. *Chem Mater*, 2004, 16(11): 2267
- [16] Belfield K D, Morales A R, Kang B S, et al. Synthesis, characterization, and optical properties of new two-photon-absorbing fluorene derivatives[J]. *Chem Mater*, 2004, 16(23): 4634
- [17] Morales A R, Belfield K D, Hales J M, et al. Synthesis of two-photon absorbing unsymmetrical fluorenyl-based chromophores [J]. *Chem Mater*, 2006, 18(20): 4972
- [18] Yao S, Belfield K D. Synthesis of two-photon absorbing unsymmetrical branched chromophores through direct tris (bromomethylation) of fluorine[J]. *J Org Chem*, 2005, 70(13): 5126

(2018-12-06 收稿)