水溶性吲哚菁染料的合成、光谱性质及其与 DNA 和 BSA 的作用

张秀富^a 付义乐^b 左治钧^a 侯媛^a 李玥萱^a
刘艳霞^a 王兰英^{*,a}

(^a 西北大学合成与天然功能分子化学教育部重点实验室 西安 710069)

(^b 西安建筑科技大学 西安 710055)

摘要 以 1,2,3-三甲基-3-(4-磺酸丁基)-3*H*-吲哚啉-5-磺酸盐和各种芳杂醛为原料,在哌啶催化下合成了 6 种新型水溶性吲哚菁染料,采用 ¹H NMR, HRMS, IR 和 UV-Vis 对染料进行了结构表征. 研究了 6 种染料在不同溶剂中的光谱性质,结果表明:染料在不同溶剂中的最大吸收波长处在 426.0~562.5 nm 之间,发射波长处在 508.2~596.0 nm 之间,摩尔消光系数在 $0.6 \times 10^4 \sim 6.7 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 范围内. 同时,研究了染料与鲑鱼精 DNA 和牛血清白蛋白(BSA)的相互作用,结果发现:5 种水溶性染料与 DNA 或 BSA 相互作用较弱.

关键词 水溶性吲哚菁染料; 光谱性质; DNA; BSA

Synthesis and Spectral Properties of Water-Soluble Indocyanine Dyes as Well as the Interaction with DNA and BSA

Zhang, Xiufu^a Fu, Yile^b Zuo, Zhijun^a Hou, Yuan^a Li, Yuxuan^a
Liu, Yanxia^a Wang, Lanying^{*,a}

(^a Key Laboratory of Synthetic and Natural Functional Molecule Chemistry (Ministry of Education),
College of Chemistry and Materials Science, Northwest University, Xi'an 710069)

(^b School of Science, Xi'an University of Architecture and Technology, Xi'an 710055)

Abstract Six novel water-soluble indocyanine dyes were synthesized using 1,2,3-trimethyl-3-(4-sulphobutyl)-3*H*-indolium-5-sulphonate salt and corresponding aromatic aldehyde as materials and piperidine as catalyst. All of the compounds were characterized by ¹H NMR, HRMS, IR and UV-vis techniques. Their spectral properties in different solvents were also investigated. The results showed that the maximum absorption wavelength of the dyes was in the region of 426.0~562.5 nm, the emission wavelength was located in 508.2~596.0 nm and the molar extinction coefficients was in the region of $0.6 \times 10^4 \sim 6.7 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ in different solvents. The interactions of prepared dyes with salmon sperm DNA and bovine serum albumin (BSA) were also investigated. The results showed that the interaction of five water-soluble dyes with DNA or BSA was weak.

Keywords water-soluble indocyanine dye; spectral properties; DNA; BSA

吲哚菁染料具有稳定性高、摩尔消光系数大、吸收波长可调节范围大以及结构可修饰性强等特点,已被应用于光盘存储介质^[1,2]、非线性光学材料^[3~5]和太阳能电池^[6]等领域,特别是在生物大分子标记^[7~9]、光动力学疗法(PDT)^[10]、DNA 测序^[11]、pH 探针^[12]等生物医学领域的应用尤为广泛. 由于 DNA 等生物大分子大都是水溶

性的,所以吲哚菁染料在生物医学领域的应用不仅需要具有良好的光谱性能,更需要具有良好的水溶性. 但是大多数吲哚菁染料的水溶性较差,因而限制了其在生物医学方面的应用. 为了改善这一缺点,可以在菁染料的分子中引入亲水性基团,如羧基、羟基、磺酸基等,以增强其水溶性. 本文通过向吲哚环中引入两个磺酸基,

* E-mail: wanglany@nwnu.edu.cn

Received December 24, 2012; revised March 25, 2013; published online April 24, 2013.

Project supported by the Special Science Research Foundation of Shaanxi Education Committee (No. 11JK0558), the Scientific and Technological Research and Development Projects in Shaanxi Province (No. 2012K07-06) and the Graduate Cross-discipline Funds of Northwest University (No. 09YJC20).

陕西省教育厅科学研究基金(No. 11JK0558)、陕西省科学技术研究发展计划(No. 2012K07-06)及西北大学研究生创新基金交叉学科(No. 09YJC20)资助项目.

合成 6 种新型水溶性吡啶菁染料(Scheme 1), 并采用光谱法研究了此类水溶性吡啶菁染料的光谱性质以及在生理条件下与鲑鱼精 DNA 和牛血清白蛋白(BSA)的相互作用.

1 结果与讨论

1.1 染料的合成

以 1,2,3-三甲基-3-(4-磺酸丁基)-3*H*-吡啶-5-磺酸盐和各种芳杂醛为原料, 在哌啶催化下合成了 6 种新型水溶性吡啶菁染料. 采用 ^1H NMR, HRMS, IR 和 UV-Vis 对染料进行了结构表征. 由于染料分子中引入了多个磺酸基, 使染料的极性较大, 增加了合成及分离纯化的难度, 因此六种染料的合成均在干燥的情况下进行, 且采用硅胶柱色谱分离的方法纯化. 通过不同溶剂的选择, 最终以 $V(\text{甲醇}):V(\text{乙醇}):V(\text{正丁醇}):V(\text{水})=4:2:4:1$ 的洗脱剂可以较好的分离出 **2a**, **2b**, **2c**, 以 $V(\text{正丁醇}):V(\text{冰醋酸}):V(\text{水})=5:2:1$, $V(\text{甲醇}):V(\text{正己烷})=5:3$ 的洗脱剂可以较好的分离出 **2d**, 以 $V(\text{甲醇}):V(\text{乙醇}):V(\text{正丁醇}):V(\text{水})=8:2:8:1$, $V(\text{甲醇}):V(\text{正己烷})=2:1$, $V(\text{甲醇}):V(\text{正己烷}):V(\text{乙酸乙酯})=4:1:2$ 的洗脱剂可以较好的分离出 **2e**, 以 $V(\text{异丙醇}):V(\text{甲醇}):V(\text{水})=6:2:1$, $V(\text{甲醇}):V(\text{正己烷})=2:1$, $V(\text{甲醇}):V(\text{乙酸乙酯})=3:2$ 的洗脱剂可以较好的分离出 **2f**.

1.2 染料在不同溶剂中的光谱性质

染料在甲醇、乙醇、水、丙酮、二甲亚砆和 N,N -

二甲基甲酰胺中的紫外-可见吸收和荧光光谱数据列于表 1. 从表 1 中可以看出, 染料在不同溶剂中的最大吸收波长(λ_{max})处在 426.0~562.5 nm 之间, 其摩尔消光系数(ϵ)在 $0.6\times 10^4\sim 6.7\times 10^4\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ 范围内. 以最大吸收波长作为染料的激发波长, 其发射波长(λ_{em})处在 508.2~596.0 nm 之间, 与最大吸收波长相比, 发生了 19.1~92.4 nm 不等的红移(即斯托克斯位移值 Stokes shifts), 且同一种染料在非质子性溶剂中的 Stokes shifts 大于质子性溶剂中的.

1.3 染料与 DNA, BSA 作用的光谱性质

6 种染料在缓冲溶液中及其与 DNA 相互作用的光谱数据如表 2、表 3 所示. 在缓冲溶液中其摩尔消光系数为 $0.1\times 10^4\sim 6.2\times 10^4\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, 最大吸收波长为 423.0~563.0 nm. 染料 **2b**, **2c** 与 DNA 作用后的摩尔消光系数分别为 1.5×10^4 , $1.2\times 10^4\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, 相对于缓冲溶液中的纯染料摩尔消光系数有一定程度的增加. 染料-DNA 的荧光最大发射波长位于 514.8~555.6 nm 之间, 斯托克位移位于 17.6~87.3 nm 之间. 染料 **2e** 在缓冲溶液中以及在加入 DNA 后不发射荧光, 其余染料在缓冲溶液中的荧光量子产率为 0.0011~0.0047. 当加入 DNA 后, 染料 **2a**, **2c** 和 **2d** 的荧光量子产率分别增加了 1.18, 1.10 和 1.15 倍. 由于加入 DNA 后, 染料 **2a**~**2d**, **2f** 的荧光量子产率增加的倍数很小, 因此, 可以认为它们与 DNA 相互作用较弱.

染料与 BSA 作用的光谱数据如表 4 所示. 染料和 BSA 作用后的摩尔消光系数位于 $2.2\times 10^4\sim 7.0\times 10^4$

Scheme 1

表 1 染料在不同溶剂中的吸收光谱和荧光光谱性质

Table 1 The absorption and fluorescence spectral characteristics of dyes in different solvents

Solvent	Dye	$\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$	$\lambda_{\text{em}}/\text{nm}$	Stokes shift/nm	$\varepsilon \times 10^{-4}/(\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1})$
MeOH	2a	559.0	588.4	29.4	1.5
	2b	434.5	510.8	76.3	3.6
	2c	548.5	567.6	19.1	4.4
	2d	491.0	543.0	52.0	5.3
	2e	495.0	567.0	72.0	4.3
	2f	487.0	536.0	49.0	4.6
EtOH	2a	559.5	588.4	28.9	1.6
	2b	432.5	510.8	78.3	3.4
	2c	550.5	569.6	19.1	6.2
	2d	493.0	545.0	52.0	5.5
	2e	497.0	559.0	62.0	4.5
	2f	489.0	539.0	50.0	4.5
H ₂ O	2a	562.5	592.6	30.1	1.5
	2b	426.0	508.2	82.2	3.1
	2c	540.0	559.8	19.8	5.8
	2d	487.0	540.0	53.0	5.3
	2e	489.0	—	—	4.4
	2f	485.0	534.0	49.0	4.6
CH ₃ COCH ₃	2a	554.5	587.0	32.5	0.6
	2b	430.0	513.4	83.4	4.3
	2c	559.0	—	—	4.1
	2d	479.0	570.0	91.0	1.8
	2e	493.0	577.0	84.0	2.5
	2f	485.0	562.0	77.0	2.3
DMF	2a	552.0	594.8	42.8	1.1
	2b	430.5	517.2	86.7	3.5
	2c	547.0	572.2	25.2	3.8
	2d	492.0	551.0	59.0	6.7
	2e	493.0	563.0	70.0	3.8
	2f	488.0	547.0	59.0	3.8
DMSO	2a	557.0	596.0	39.0	1.4
	2b	430.0	522.4	92.4	4.7
	2c	552.5	575.8	23.3	2.5
	2d	490.0	550.0	60.0	4.4
	2e	497.0	563.0	66.0	3.9
	2f	489.0	548.0	59.0	4.4

^a “—” 代表 “无荧光发射”。

表 2 染料在缓冲溶液中的光谱特征

Table 2 Spectral characteristics of dyes in buffer

Dye	$\lambda_{\text{abs}}/\text{nm}$	$\varepsilon/(\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1})$	$\lambda_{\text{ex}}/\text{nm}$	$\lambda_{\text{em}}/\text{nm}$	Φ_{F}
2a	563.0	6.2×10^4	563.0	591.6	0.0011
2b	423.0	0.1×10^4	423.0	509.6	0.0016
2c	538.0	0.7×10^4	538.0	555.0	0.0021
2d	488.0	5.6×10^4	488.0	518.2	0.0047
2e	488.0	3.6×10^4	488.0	—	—
2f	484.0	4.4×10^4	484.0	526.2	0.0024

表3 染料-DNA 在缓冲溶液中的光谱特征
Table 3 Spectral characteristics of dyes-DNA in buffer

Dye	$\lambda_{\text{abs}}/\text{nm}$	$\epsilon^{\text{DNA}}/(\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1})$	$\lambda_{\text{ex}}/\text{nm}$	$\lambda_{\text{em}}/\text{nm}$	$\Phi_{\text{F}}^{\text{DNA}}$	$\Phi_{\text{F}}^{\text{DNA}} / \Phi_{\text{F}}^{\text{free}}$
2a	510.0	6.0×10^4	510.0	548.8	0.0013	1.18
2b	427.5	1.5×10^4	431.5	514.8	0.0015	0.94
2c	538.0	1.2×10^4	538.5	555.6	0.0023	1.10
2d	489.0	5.0×10^4	489.0	518.4	0.0054	1.15
2e	486.0	3.7×10^4	488.0	—	—	—
2f	485.0	4.9×10^4	485.0	528.8	0.0022	0.92

表4 染料-BSA 在缓冲溶液中的光谱特征
Table 4 Spectral characteristics of dyes-BSA in buffer

Dye	$\lambda_{\text{abs}}/\text{nm}$	$\epsilon^{\text{DNA}}/(\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1})$	$\lambda_{\text{ex}}/\text{nm}$	$\lambda_{\text{em}}/\text{nm}$	$\Phi_{\text{F}}^{\text{DNA}}$	$\Phi_{\text{F}}^{\text{DNA}} / \Phi_{\text{F}}^{\text{free}}$
2a	509.5	6.8×10^4	509.5	548.8	0.0016	1.45
2b	430.0	2.5×10^4	432.5	517.0	0.0013	0.81
2c	539.0	2.2×10^4	538.5	554.0	0.0020	0.95
2d	488.0	6.9×10^4	488.0	519.4	0.0048	1.02
2e	488.0	5.7×10^4	488.0	—	—	—
2f	484.0	7.0×10^4	484.0	529.4	0.0015	0.63

$\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ 之间, 相对于缓冲溶液中的纯染料摩尔消光系数有一定程度的增加. 染料-BSA 的荧光最大发射波长位于 517.0~554.0 nm 之间, 斯托克位移位于 15.0~87.0 nm 之间. 染料 2e 在缓冲溶液中以及在加入 BSA 后不发射荧光. 对于染料 2a 和 2d, 当加入 BSA 后, 其荧光量子产率分别增加了 1.45 和 1.02 倍. 由于加入 BSA 后荧光量子产率增加的倍数很小, 因此, 可以认为水溶性染料 2a~2d, 2f 与 BSA 相互作用较弱.

2 结论

合成了 6 种新型水溶性吡啶菁染料, 采用 ^1H NMR, HRMS, IR 和 UV-Vis 对染料进行了结构表征. 6 种染料在不同溶剂中的最大吸收波长处在 426.0~562.5 nm 之间, 发射波长处在 508.2~596.0 nm 之间, 摩尔消光系数在 $0.6 \times 10^4 \sim 6.7 \times 10^4 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ 范围内. 5 种染料与 DNA 或 BSA 相互作用较弱.

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

XT-4 型显微熔点仪(北京泰克仪器有限公司, 温度计未经校正); General TU-1900 双光束紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司); F-4500 荧光分光光度计(日本 HITACHI); TENSOR 27 红外分光光度计(德国 BRUKER 公司, KBr 压片); Varian INOVA-400 MHz 核磁共振仪(美国 Varian 公司); micrOTOF-QII 电喷雾四级杆飞行时间质谱仪(德国 BRUKER 公司); GCMS-QP2010 型质谱仪(日本).

对甲氧基苯甲醛(CP, 上海化学试剂厂); 对二甲胺

基苯甲醛(CP, 西安化学试剂厂); *N*-甲基-2-吡咯甲醛(CP, 荆州腾飞化工有限公司); 3-吡啶甲醛(工业品, 上海诺泰化工有限公司); 5-甲氧基-3-吡啶甲醛(工业品, 上海诺泰化工有限公司); 对羟基苯甲醛(CP, 天津化学试剂一厂); 鲑鱼精 DNA (99%, 西安博精生物有限公司); 牛血清白蛋白(99%, 西安博精生物有限公司). 使用的所有溶剂均为分析纯.

3.2 水溶性吡啶菁染料的合成

参考文献[13, 14]合成 1,2,3-三甲基-3-(4-磺酸丁基)-3*H*-吡啶啉-5-磺酸盐.

3.2.1 染料 1,3-二甲基-3-(4-磺酸丁基)-2-[2-(4-*N,N*-二甲基氨基)苯基-*E*-乙烯基]-5-磺酸-3*H*-吡啶啉内盐 (2a)的合成

在圆底烧瓶中依次加入 1,2,3-三甲基-3-(4-磺酸丁基)-3*H*-吡啶啉-5-磺酸盐 0.75 g (2.0 mmol)、对二甲胺基苯甲醛 0.36 g (2.4 mmol)和适量甲醇, 加热溶解, 滴入数滴吡啶, 回流 2 h, 减压移除溶剂, 将剩余固体用乙醚洗涤数次. 用体积比为 $V(\text{甲醇}):V(\text{乙醇}):V(\text{正丁醇}):V(\text{水})=4:2:4:1$ 的四元溶剂作为洗脱剂, 进行柱色谱分离, 得到带有金属光泽的紫黑色固体 0.2 g, 产率为 19.5%. m.p. > 295 °C; UV-Vis (MeOH) λ_{max} : 558.5 nm; ^1H NMR (D_2O , 400 MHz) δ : 8.19 (d, $J=15.2$ Hz, 1H, CH=CH), 7.91 (s, 1H, ArH), 7.88 (s, 1H, ArH), 7.75 (d, $J=8.4$ Hz, 2H, PhH), 7.43 (d, $J=8.4$ Hz, 1H, ArH), 6.92 (d, $J=15.2$ Hz, 1H, CH=CH), 6.69 (d, $J=7.2$ Hz, 2H, PhH), 3.69 (s, 3H, N^+-CH_3), 3.07 [s, 6H, $\text{N}-2(\text{CH}_3)$], 2.60 (t, $J=7.2$ Hz, 2H, $\delta\text{-CH}_2$), 2.31 (b, 2H, $\gamma\text{-CH}_2$), 1.78 (s, 3H, CH_3), 1.53~1.47 (m, 2H, $\beta\text{-CH}_2$), 1.18 (t, $J=7.2$ Hz, 2H,

α -CH₂); IR (KBr) ν : 3416 (s, $\nu_{\text{O-H}}$), 2927, 2848 (w, $\nu_{\text{C-H}}$), 1618, 1571, 1532 (s, $\nu_{\text{C=C}}$, $\nu_{\text{C=N}}$), 1173, 1090, 1032 (s, $\nu_{\text{C-N}}$, δ_{CH} , $\nu_{\text{S=O}}$), 822 (s, $\delta_{\text{=CH}}$) cm^{-1} ; HRMS calcd for C₂₄H₂₉N₂Na₂O₆S₂: 551.1257, found 551.1253.

3.2.2 染料 1,3-二甲基-3-(4-磺酸丁基)-2-[2-(4-甲氧基)苯基-*E*-乙烯基]-5-磺酸-3*H*-吡啶内盐(2b)的合成

在圆底烧瓶中依次加入 1,2,3-三甲基-3-(4-磺酸丁基)-3*H*-吡啶内盐-5-磺酸盐 0.75 g (2 mmol)、对甲氧基苯甲醛 0.32 g (2.6 mmol)和适量甲醇, 加热溶解, 滴入数滴哌啶, 回流 2.5 h, 减压移除溶剂, 将剩余固体用乙醚洗涤数次. 依次用体积比为 $V(\text{甲醇}):V(\text{乙醇}):V(\text{正丁醇}):V(\text{水})=4:2:4:1$ 的四元溶剂、 $V(\text{甲醇}):V(\text{乙醇}):V(\text{正己烷}):V(\text{乙酸乙酯})=2:3:1:1$ 的四元溶剂为洗脱剂进行柱色谱分离, 得到带有金属光泽的深红色固体 0.17 g, 产率为 17.2%. m.p. > 295 °C; UV-Vis (MeOH) λ_{max} : 421.5 nm; ¹H NMR (D₂O, 400 MHz) δ : 8.42 (d, $J=12.0$ Hz, 1H, CH=CH), 8.08 (s, 1H, ArH), 8.04 (d, $J=8.0$ Hz, 1H, ArH), 7.99 (d, $J=8.0$ Hz, 2H, PhH), 7.80 (d, $J=8.0$ Hz, 1H, ArH), 7.44 (d, $J=12.0$ Hz, 1H, CH=CH), 7.16 (d, $J=12.0$ Hz, 2H, PhH), 4.09 (s, 3H, N⁺-CH₃), 3.95 (s, 3H, OCH₃), 2.65 (t, $J=8.0$ Hz, 2H, δ -CH₂), 2.56~2.50 (m, 2H, γ -CH₂), 1.82 (s, 3H, CH₃), 1.55~1.52 (m, 2H, β -CH₂), 0.92~0.86 (m, 2H, α -CH₂); IR (KBr) ν : 3420 (s, $\nu_{\text{O-H}}$), 2932, 2867 (w, $\nu_{\text{C-H}}$), 1586, 1529 (s, $\nu_{\text{C=C}}$, $\nu_{\text{C=N}}$), 1264 (m, $\nu_{\text{C-O-C}}$), 1174, 1101, 1034 (s, $\nu_{\text{C-N}}$, $\delta_{\text{C-H}}$, $\nu_{\text{S=O}}$), 832 (s, $\delta_{\text{=CH}}$) cm^{-1} ; HRMS calcd for C₂₃H₂₆NNa₂O₇S₂: 538.0941, found 538.0947.

3.2.3 染料 1,3-二甲基-3-(4-磺酸丁基)-2-[2-(4-羟基)苯基-*E*-乙烯基]-5-磺酸-3*H*-吡啶内盐(2c)的合成

在圆底烧瓶中依次加入 1,2,3-三甲基-3-(4-磺酸丁基)-3*H*-吡啶内盐-5-磺酸盐 0.75 g (2 mmol)、对羟基苯甲醛 0.36 g (3 mmol)和适量甲醇, 加热溶解, 滴入数滴哌啶, 回流 3 h, 减压移除溶剂, 将剩余固体用乙醚洗涤数次. 依次用体积比为 $V(\text{甲醇}):V(\text{乙醇}):V(\text{正丁醇}):V(\text{水})=4:2:4:1$ 的四元溶剂、 $V(\text{甲醇}):V(\text{乙酸乙酯})=5:2$ 的混合溶剂为洗脱剂进行柱色谱分离, 得到带有金属光泽的红色固体 0.14 g, 产率为 14.8%. m.p. > 295 °C; UV-Vis (MeOH) λ_{max} : 547.0 nm; ¹H NMR (D₂O, 400 MHz) δ : 8.44 (s, 1H, OH), 8.39 (d, $J=16$ Hz, 1H, CH=CH), 8.06 (s, 1H, ArH), 8.02 (d, $J=8.4$ Hz, 1H, ArH), 7.93 (d, $J=8.4$ Hz, 2H, PhH), 7.76 (d, $J=8.4$ Hz, 1H, ArH), 7.38 (d, $J=16$ Hz, 1H, CH=CH), 7.02 (d, $J=8.8$ Hz, 2H, PhH), 4.06 (s, 3H, N⁺-CH₃), 2.65 (t, $J=8.0$ Hz, 2H, δ -CH₂), 2.56~2.45 (m, 2H, γ -CH₂), 1.82 (s, 3H, CH₃), 1.60~1.50 (m, 2H, β -CH₂), 0.95~0.88 (m, 2H,

α -CH₂); IR (KBr) ν : 3420 (s, $\nu_{\text{O-H}}$), 2928, 2850 (w, $\nu_{\text{C-H}}$), 1582, 1571 (s, $\nu_{\text{C=C}}$, $\nu_{\text{C=N}}$), 1366 (s, $\delta_{\text{O-H}}$), 1283 (s, $\nu_{\text{C-O}}$), 1169, 1097, 1036 (s, $\nu_{\text{C-N}}$, $\delta_{\text{C-H}}$, $\nu_{\text{S=O}}$), 834 (s, $\delta_{\text{=CH}}$) cm^{-1} ; HRMS calcd for C₂₂H₂₄NNa₂O₇S₂: 524.0784, found 524.0786.

3.2.4 染料 1,3-二甲基-3-(4-磺酸丁基)-2-[2-(3-吡啶)-*E*-乙烯基]-5-磺酸-3*H*-吡啶内盐(2d)的合成

在圆底烧瓶中依次加入 1,2,3-三甲基-3-(4-磺酸丁基)-3*H*-吡啶内盐-5-磺酸盐 0.40 g (0.7 mmol)、3-吡啶甲醛 0.15 (1.0 mmol)和适量甲醇, 加热溶解, 滴入数滴哌啶, 在回流条件下反应 3 h, 减压移除溶剂, 将剩余固体用乙醚洗涤数次. 依次用体积比为 $V(\text{正丁醇}):V(\text{冰醋酸}):V(\text{水})=5:2:1$ 、 $V(\text{甲醇}):V(\text{正己烷})=5:3$ 的洗脱剂进行柱色谱分离, 得到深红色粉末状固体 0.12 g, 产率为 13.4%. m.p. > 295 °C; UV-Vis (MeOH) λ_{max} : 491.0 nm; ¹H NMR (D₂O, 400 MHz) δ : 8.37 (d, $J=15.2$ Hz, 1H, CH=CH), 8.08 (s, 1H, ArH), 7.91 (s, 1H, ArH), 7.88 (d, $J=9.2$ Hz, 2H, ArH), 7.87 (s, 1H, ArH), 7.41~7.25 (m, 3H, ArH), 6.77 (d, $J=15.2$ Hz, 1H, CH=CH), 3.66 (s, 3H, N⁺-CH₃), 2.60 (t, $J=8.6$ Hz, 2H, δ -CH₂), 2.24~2.20 (m, 2H, γ -CH₂), 1.60 (s, 3H, CH₃), 1.54~1.45 (m, 2H, β -CH₂), 1.19 (t, $J=8.6$ Hz, 2H, α -CH₂); IR (KBr) ν : 3420 (s, $\nu_{\text{O-H}}$, $\nu_{\text{N-H}}$), 3087 (m, ν_{CH}), 2926 (w, ν_{CH}), 1633, 1571, 1467 (s, $\nu_{\text{C=C}}$, $\nu_{\text{C=N}}$), 1327 (s, $\nu_{\text{C-N}}$), 1205, 1091, 1029 (s, $\nu_{\text{C-N}}$, δ_{CH} , $\nu_{\text{S=O}}$), 827 (s, $\delta_{\text{=CH}}$) cm^{-1} ; HRMS calcd for C₂₄H₂₅N₂Na₂O₆S₂: 547.0944, found 547.0960.

3.2.5 染料 1,3-二甲基-3-(4-磺酸丁基)-2-[2-(5-甲氧基-3-吡啶)-*E*-乙烯基]-5-磺酸-3*H*-吡啶内盐(2e)的合成

在圆底烧瓶中依次加入 1,2,3-三甲基-3-(4-磺酸丁基)-3*H*-吡啶内盐-5-磺酸盐 0.50 g (0.9 mmol)、5-甲氧基-3-吡啶甲醛 0.25 g (1.4 mmol)和适量甲醇, 加热溶解, 滴入数滴哌啶, 在回流条件下反应 3 h, 减压移除溶剂, 将剩余固体用乙醚洗涤数次. 依次用体积比为 $V(\text{甲醇}):V(\text{乙醇}):V(\text{正丁醇}):V(\text{水})=8:2:8:1$ 、 $V(\text{甲醇}):V(\text{正己烷})=2:1$ 、 $V(\text{甲醇}):V(\text{正己烷}):V(\text{乙酸乙酯})=4:1:2$ 的洗脱剂进行柱色谱分离, 得到深红色粉末状固体 0.11 g, 产率为 12.6%. m.p. > 295 °C; UV-Vis (MeOH) λ_{max} : 494.0 nm; ¹H NMR (D₂O, 400 MHz) δ : 8.44 (d, $J=15.2$ Hz, 1H, CH=CH), 8.14 (s, 1H, ArH), 7.93 (s, 1H, ArH), 7.91 (s, 1H, ArH), 7.45 (d, $J=9.2$ Hz, 2H, ArH), 7.38~7.36 (m, 3H, ArH), 6.78 (d, $J=15.2$ Hz, 1H, CH=CH), 3.82 (s, 3H, OCH₃), 3.68 (s, 3H, N⁺-CH₃), 2.6 (t, $J=8.0$ Hz, 2H, δ -CH₂), 2.34~2.32 (m, 2H, γ -CH₂), 1.55 (s, 3H, CH₃), 1.53~1.49 (m, 2H, β -CH₂), 1.19 (b,

α -CH₂); IR (KBr) ν : 3445 (s, $\nu_{\text{O-H}}$, $\nu_{\text{N-H}}$), 3062 (m, ν_{CH}), 2925 (w, $\nu_{\text{C-H}}$), 1622, 1565, 1462 (s, $\nu_{\text{C=C}}$, $\nu_{\text{C=N}}$), 1386 (s, $\delta_{\text{C-H}}$), 1316 (s, $\nu_{\text{C-N}}$), 1284, 1034 (s, $\nu_{\text{C-N}}$, $\delta_{\text{C-H}}$, $\nu_{\text{S=O}}$), 783 (s, δ_{CH}) cm^{-1} ; HRMS calcd for C₂₅H₂₇N₂Na₂O₇S₂: 577.1050, found 577.1036.

3.2.6 染料 1,3-二甲基-3-(4-磺酸丁基)-2-[2-(*N*-甲基-2-吡咯)-*E*-乙烯基]-5-磺酸-3*H*-吡啶内盐(2f)的合成

在圆底烧瓶中依次加入 1,2,3-三甲基-3-(4-磺酸丁基)-3*H*-吡啶内盐-5-磺酸盐 0.70 g (1.3 mmol)、*N*-甲基-2-吡咯甲醛 0.40 g (3.7 mmol)和适量甲醇, 加热溶解, 滴入数滴哌啶, 在回流条件下反应 3 h, 减压移除溶剂, 将剩余固体用乙醚洗涤数次. 依次用体积比为 $V(\text{异丙醇}):V(\text{甲醇}):V(\text{水})=6:2:1$ 、 $V(\text{甲醇}):V(\text{正己烷})=2:1$ 、 $V(\text{甲醇}):V(\text{乙酸乙酯})=3:2$ 的洗脱剂进行柱色谱分离, 得到深红色粉末状固体 0.15 g, 产率为 14.7%. m.p. > 295 °C; UV-Vis (MeOH) λ_{max} : 488.0 nm. ¹H NMR (D₂O, 400 MHz) δ : 8.15 (d, $J=15.2$ Hz, 1H, CH=CH), 7.99~7.95 (m, 3H, pyrrole-H), 7.63 (d, $J=8.8$ Hz, 2H, ArH), 7.44 (s, 1H, ArH), 6.52 (d, $J=15.2$ Hz, 1H, CH=CH), 3.91 (s, 3H, N⁺-CH₃), 3.90 (s, 3H, Pyrrole-N-CH₃), 2.67 (t, $J=15.2$ Hz, 2H 7.6 Hz, δ -CH₂), 2.64~2.40 (m, 2H, γ -CH₂), 1.80 (s, 3H, CH₃), 1.94~1.88 (m, 2H, β -CH₂), 1.55 (t, 2H, $J=7.6$ Hz, α -CH₂); IR (KBr) ν : 3446 (s, $\nu_{\text{O-H}}$, $\nu_{\text{N-H}}$), 3069 (m, ν_{CH}), 2932 (w, $\nu_{\text{C-H}}$), 1586, 1553, 1466 (s, $\nu_{\text{C=C}}$, $\nu_{\text{C=N}}$), 1394 (s, $\delta_{\text{C-H}}$), 1333 (s, $\nu_{\text{C-N}}$), 1197, 1093, 1029 (s, $\nu_{\text{C-N}}$, $\delta_{\text{C-H}}$, $\nu_{\text{S=O}}$), 826 (s, δ_{CH}) cm^{-1} ; HRMS calcd for C₂₁H₂₅N₂Na₂O₆S₂: 511.0944, found 511.0968.

3.3 光谱性质测定

3.3.1 水溶性吡啶菁染料在不同溶剂中的光谱测定

配制水溶性吡啶菁染料 2a~2f 浓度为 2×10^{-3} mol/L 的二甲亚砷储备溶液, 然后分别用甲醇、乙醇、水、丙酮、*N,N*-二甲基甲酰胺、二甲亚砷稀释成浓度为 2×10^{-5} mol/L 的工作溶液(当 DMSO 浓度小于 2.0% 时所引起的光谱位移小于 0.5 nm, 可忽略不计^[15]), 测定紫外-可见吸收和荧光光谱; 选择最大吸收波长作为激发波长测定工作溶液的荧光光谱, 测试条件为室温, 样品池为 1 cm×1 cm×4 cm 石英比色皿, 最大激发和最大发射光谱狭缝宽度为 5.0 nm.

3.3.2 水溶性吡啶菁染料与 DNA, BSA 作用的紫外-可见光谱和荧光光谱测定

TE 缓冲溶液配制: 配制 0.25 mol/L 的 Tris(三羟甲基氨基甲烷)储备液, 用 HCl 溶液将 pH 调至 7~8; 同时

配制 0.05 mol/L EDTA-2Na 的储备液, 并用 NaOH 溶液将 pH 值调至 7~8, 然后将一定量的 Tris 和 EDTA-2Na 储备液混合, 调 pH 值至 7.0~7.5, 最终稀释定容, 使 Tris-HCl 和 EDTA 的终浓度分别为 10 和 1 mmol/L.

染料-DNA、BSA 溶液的配制: 配制水溶性吡啶菁染料 2a~2f 浓度为 2.5×10^{-2} mol/L 的二甲亚砷储备溶液; BSA 和 DNA 的储备液均用 TE 缓冲溶液配制, 浓度均为 250 $\mu\text{g/mL}$. 分别吸取一定量的染料和生物分子溶液相混合, 用 TE 缓冲溶液稀释成染料-生物分子的工作溶液, 其中染料和生物分子的浓度分别为 1×10^{-5} mol/L 和 8 $\mu\text{g/mL}$.

荧光量子产率的测定: 染料的相对荧光量子产率 Φ 以罗丹宁 B 在乙醇中的荧光量子产率($\Phi=0.56$)为参比, 根据下式^[16]计算:

$$\Phi_x = \Phi_s(F_x/F_s)(A_x/A_s)(\lambda_{\text{exs}}/\lambda_{\text{exx}})(n_x/n_s)^2$$

式中, F 为发射光谱曲线积分值, A 为激发波长处的吸收值, λ_{ex} 为激发波长, n 为所用溶剂的折射系数, s 和 x 分别代表相应的标准染料(罗丹宁 B)和被测染料.

References

- [1] Liao, W.-Y.; Hu, A.-T.; Huang, C.-L.; Yang, H.-W.; Chen, Y.-C.; Yen, W.-H.; Jeng, T.-R.; Huang, D.-R.; Hu, D.-Y.; Lee, M.-C. *US 20020037474*, **2002** [*Chem. Abstr.* **2002**, 136, 286663].
- [2] Ata, A.; Matsuzawa, N. *JP 03272890*, **1991** [*Chem. Abstr.* **1991**, 116, 162619].
- [3] Webster, S.; Fu, J.; Padilha, L. A.; Przhonska, O. V.; Hagan, D. J.; Van Stryland, E. W.; Bondar, M. V.; Slominsky, Y. L.; Kachkovski, A. D. *Chem. Phys.* **2008**, 348, 143.
- [4] Wang, Y. *Chem. Phys. Lett.* **1986**, 126, 209.
- [5] Spano, F. C.; Mukamel, S. *Phys. Rev.* **1989**, 40, 5783.
- [6] Yao, Q.-H.; Meng, F.-S.; Li, F.-Y.; Tian, H.; Huang, C.-H. *J. Mater. Chem.* **2003**, 13, 1048.
- [7] Metelev, V.; Zhang, S. R.; Tabatadze, D.; Bogdanov Jr, A. *Bioconjugate Chem.* **2011**, 22, 759.
- [8] Romieu, A.; Brossard, D.; Hamon, M.; Outaabout, H.; Portal, C.; Renard, P. Y. *Bioconjugate Chem.* **2008**, 19, 279.
- [9] Bouteiller, C.; Clavé, G.; Bernardin, A.; Chipon, B.; Massonneau, M.; Renard, P. Y.; Romieu, A. *Bioconjugate Chem.* **2007**, 18, 1303.
- [10] Chen, Y.-H.; Gryshuk, A.; Achilefu, S.; Ohulchansky, T.; Potter, W.; Zhong, T.-X.; Morgan, J.; Chance, B.; Prasad, P. N.; Henderson, B. W.; Oseroff, A.; Pandey, R. K. *Bioconjugate Chem.* **2005**, 16, 1264.
- [11] Thompson, M. *Bioconjugate Chem.* **2006**, 17, 507.
- [12] Mazières, M. R.; Duprat, C.; Wolf, J. G.; Roshal, A. D. *Dyes Pigm.* **2009**, 80, 355.
- [13] West, R. M.; Bosworth, N.; Mujumdar, R. B. *WO 2005044923*, **2005** [*Chem. Abstr.* **2005**, 142, 465089].
- [14] Fu, Y.-L.; Wang, L.-Y.; Zhang, X.-H.; Lu, T.-Q.; Xie, Q.-J.; Shi, Z. *Chin. J. Chem.* **2011**, 29, 493.
- [15] West, W.; Geddes, A. L. *J. Phys. Chem.* **1964**, 68, 837.
- [16] Karstens, T.; Kobs, K. *J. Phys. Chem.* **1980**, 84, 1871.

(Li, L.; Fan, Y.)