

苯并吡啶半菁、二次甲基菁染料的微波合成、光谱性能及其与生物分子的相互作用

康琼^a 范芳丽^a 毕渭滨^b 黄怡^c 付义乐^a 王兰英^{*,a}

(^a 西北大学化学与材料科学学院 合成与天然功能分子化学教育部重点实验室 西安 710069)

(^b 西北大学凝聚态物理与材料研究所 西安 710069)

(^c 咸阳师范学院化学系 咸阳 712000)

摘要 采用微波技术, 分别以 *N*-烷基-2,3,3-三甲基-4,5-苯并吡啶六氟合磷酸盐与二甲氨基苯甲醛或 3-吡啶甲醛为原料, 在哌啶的催化下快速合成了 4 种苯并吡啶半菁染料 **H1**~**H4** 和 4 种苯并吡啶二次甲基菁染料 **F1**~**F4**, 并采用 UV-Vis, ¹H NMR, IR, 元素分析确证了产物的结构. 研究了染料在不同溶剂中的吸收光谱性质, 结果显示: 两类染料在质子性溶剂中随着溶剂极性的增加最大吸收波长出现蓝移; 而在非质子性溶剂中随着溶剂极性的减小最大吸收波长发生红移. 同时, 研究了染料 **H3** 和 **F2** 在生理条件下与鲑鱼精 DNA、牛血清白蛋白、溶菌酶、淀粉酶和糜蛋白酶的相互作用, 发现染料 **H3** 的荧光强度随着 DNA 浓度的增加而增强.

关键词 苯并吡啶菁染料; 微波合成; 光谱性质; DNA; 蛋白质

Microwave-Assisted Synthesis and Spectral Properties of Some Benzoindohemicyanine and Benzoindodimethine Cyanine Dyes as well as the Interaction with Biomolecules

Kang, Qiong^a Fan, Fangli^a Bi, Weibin^b Huang, Yi^c Fu, Yile^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 Institute of Condensed Matter Physics & Materials, Northwest University, Xi'an 710069)

(^c Department of Chemistry, Xianyang Normal University, Xianyang 712000)

Abstract Two series of benzoindocyanine dyes **H1**~**H4** and **F1**~**F4** were synthesized with the assistance of microwave irradiation under solvent-free condition using *N*-alkyl-2,3,3-trimethyl-4,5-benzoindole phosphate hexafluoropropylene and dimethylaminobenzaldehyde or indole-3-aldehyde as materials and piperidine as catalyst. All of the compounds were characterized by UV-Vis, ¹H NMR, IR techniques and elemental analysis. Their absorption spectral properties in different solvents were also investigated. The results showed that the $\lambda_{\max}$ of the dyes showed hypochromatic shifts with the increase of polarity in protic solvents, and bathochromic shifts with the decrease of polarity in aprotic solvents. The interactions of prepared dyes **H3** and **F2** with salmon sperm DNA, bovine serum albumin, muramidase, amylase and chymotrypsin were investigated, respectively. The results showed that the fluorescence intensity of **H3** increased with the increase of DNA concentration.

Keywords benzoindocyanine dye; microwave synthesis; spectral property; DNA; protein

菁染料广泛应用于太阳能电池^[1,2]、光动力学疗法 (PDT)^[3,4]、DNA 测序^[5~7]、pH 探针^[8,9]等领域. 苯并吡啶半菁及二次甲基菁染料作为功能菁染料的一类, 由于其

稳定性高、吸收波长可调谐范围大、摩尔消光系数大等优点, 在合成、性质研究及应用方面得到人们的广泛关注.

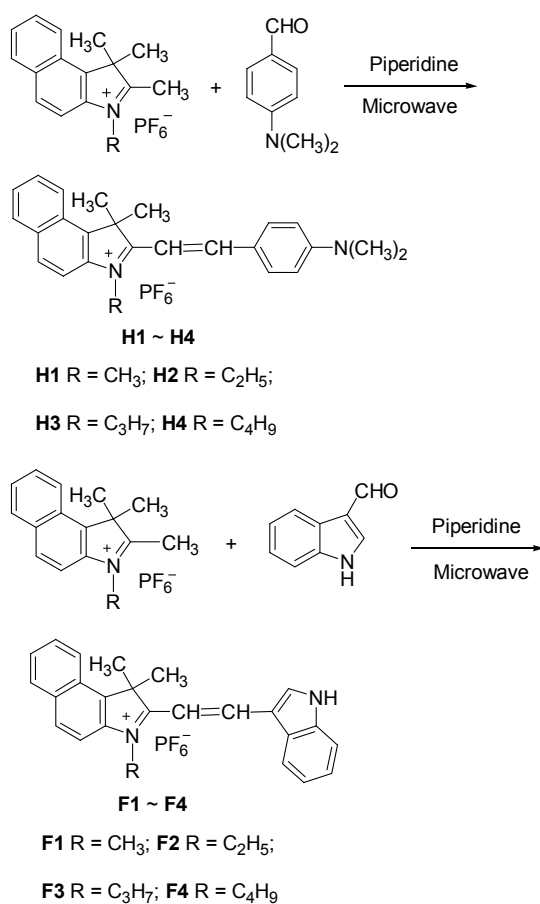
* E-mail: wanglany@nwnu.edu.cn

Received July 29, 2011; revised October 14, 2011; accepted November 17, 2011.

Project supported by the Natural Science Foundation of Shaanxi Province (No. SJ08B04), the Special Science Research Foundation of Shaanxi Education Committee (No. 11JK0558) and the Graduate Cross-discipline Funds of Northwest University (No. 09YJC20).

陕西省自然科学基金(No. SJ08B04)、陕西省教育厅科学研究基金(No. 11JK0558)及西北大学研究生创新基金交叉学科(No. 09YJC20)资助项目.

苯并吡啶半菁及二次甲基菁染料通常是在碱催化下, 将具有活性甲基的苯并吡啶季铵盐与芳香醛或芳杂醛在有机溶剂中回流来制备^[10-12], 这种方法反应时间较长, 尤其需要大量的有机溶剂, 易造成环境污染. 本工作采用操作方便、选择性高、时间短、产物易纯化、环境友好的微波合成法, 在无溶剂条件下实现苯并吡啶半菁及二次甲基菁染料的合成(Scheme 1), 并对合成的染料用 UV-Vis, ¹H NMR, IR 及元素分析技术进行了结构确证, 探讨了染料的紫外-可见光谱及荧光光谱性能. 研究了 **H3** 和 **F2** 在生理条件下与鲑鱼精 DNA、牛血清白蛋白、溶菌酶、淀粉酶和糜蛋白酶的相互作用. 这一研究对苯并吡啶半菁及二次甲基菁染料的绿色合成及在生物医学领域中的应用提供实验基础数据.



Scheme 1

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

XT-4 型数字显示微熔点仪, 温度计未经校正(北京光学仪器厂生产); Vario EL-III CHN 元素分析仪(德国); General TU-1201 紫外-可见分光光度计(北京通用仪器设备公司); UV-1700 紫外-可见分光光度计(SHIMADZU CORPORATION, assembled in China);

F-4500 型荧光分光光度计(日本日立公司); Bruker-55 红外分光光度计(KBr 压片)(德国); Varian INOVA-400 核磁共振仪(美国); WD700S-1 格兰仕微波炉.

哌啶(CP, 北京化工厂); 对二甲氨基苯甲醛(AR, 西安化学试剂厂); 2,3,3-三甲基-4,5-苯并吡啶(工业级); 无水乙醇(AR, 西安化学试剂厂); 丙酮(AR, 天津市瑞金特化学品有限公司); 3-吡啶甲醛(工业级); 甲醇(AR, 西安化学试剂厂); 鲑鱼精 DNA、牛血清白蛋白、糜蛋白酶、淀粉酶和溶菌酶(99%, 西安博精生物有限公司).

1.2 苯并吡啶半菁染料的无溶剂微波合成

以染料 **H1** 的合成为例, 将 1,2,3,3-四甲基-4,5-苯并吡啶六氟合磷酸盐(0.54 mmol)、对二甲氨基苯甲醛(0.54 mmol)和少量哌啶在烧杯中混合均匀, 然后选用适当的功率, 微波辐射几分钟后, 冷却到室温, 加入少量乙醇, 搅拌后静置, 抽滤得粗品. 用 *V*(乙醇): *V*(丙酮)=1:1 重结晶得深紫色固体 **H1**, 产率 83.8%. m.p. 234~235 °C; UV-vis (MeOH) $\lambda_{\max}$: 551 nm; ¹H NMR (CH₃COCH₃-*d*₆, 400 MHz) δ : 2.13 [s, 6H, C(CH₃)₂], 3.25 [s, 6H, N(CH₃)₂], 4.27 (s, 3H, ⁺NCH₃), 6.95 (d, *J*=8.8 Hz, 2H, ArH), 7.47 (d, *J*=15.6 Hz, 1H, CH=CH), 7.68 (t, *J*=6.8 Hz, 1H, ArH), 7.78 (t, *J*=7.8 Hz, 1H, ArH), 7.98 (d, *J*=9.6 Hz, 1H, ArH), 8.07 (d, *J*=8.8 Hz, 2H, ArH), 8.18 (d, *J*=7.6 Hz, 1H, ArH), 8.25 (d, *J*=8.8 Hz, 1H, ArH), 8.42 (d, *J*=8.8 Hz, 1H, ArH), 8.58 (d, *J*=15.6 Hz, 1H, CH=CH); IR (KBr) ν : 3045, 3020 (w, ν_{CH}), 2990, 2922 (m, ν_{CH}), 1569, 1517, 1437 (s, $\nu_{\text{C=C}}$, $\nu_{\text{C=N}}$), 1354, 1288, 1160, 1120 (m, $\nu_{\text{C-N}}$, δ_{CH}), 968 (s, δ_{CH}), 938 (m, δ_{CH}), 837 (s, δ_{CH}). Anal. calcd for C₂₅H₂₇N₂PF₆: C 60.09, H 5.55, N 5.03; found C 60.00, H 5.60, N 5.40.

其它染料 **H2**~**H4** 的合成方法相似, 实验数据如下:

染料 **H2**: 深紫色晶体, 产率 84.5%. m.p. 238~239 °C; UV-vis (MeOH) $\lambda_{\max}$: 561 nm; ¹H NMR (CH₃COCH₃-*d*₆, 400 MHz) δ : 1.64 (t, *J*=7.0 Hz, 3H, CH₃), 2.16 [s, 6H, C(CH₃)₂], 3.25 [s, 6H, N(CH₃)₂], 4.81 (q, *J*=7.0 Hz, 2H, ⁺NCH₂), 6.95 (d, *J*=9.2 Hz, 2H, ArH), 7.48 (d, *J*=15.8 Hz, 1H, CH=CH), 7.68 (t, *J*=7.6 Hz, 1H, ArH), 7.78 (t, *J*=7.2 Hz, 1H, ArH), 7.99 (d, *J*=9.2 Hz, 1H, ArH), 8.09 (d, *J*=9.2 Hz, 2H, ArH), 8.19 (d, *J*=8.0 Hz, 1H, ArH), 8.26 (d, *J*=9.2 Hz, 1H, ArH), 8.42 (d, *J*=8.4 Hz, 1H, ArH), 8.61 (d, *J*=15.8 Hz, 1H, CH=CH); IR (KBr) ν : 3060 (w, ν_{CH}), 2996, 2916 (m, ν_{CH}), 1621, 1569, 1533, 1507, 1454 (s, $\nu_{\text{C=C}}$, $\nu_{\text{C=N}}$), 1355, 1324, 1285, 1167, 1123, 1094 (m, $\nu_{\text{C-N}}$, δ_{CH}), 970 (s, δ_{CH}), 940 (m, δ_{CH}), 839 (s, δ_{CH}). Anal. calcd for C₂₆H₂₉N₂PF₆: C 60.70, H 5.67, N

5.45; found C 60.44, H 5.67, N 5.28.

染料 **H3**: 深绿色晶体, 产率 89.4%. m.p. 225~227 °C; UV-vis (MeOH) $\lambda_{\max}$: 561 nm; ^1H NMR (CH_3COCH_3 - d_6 , 400 MHz) δ : 1.15 (t, $J=7.4$ Hz, 3H, CH_3), 2.0~2.13 (m, 2H, CH_2), 2.16 [s, 6H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$], 3.25 [s, 6H, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$], 4.75 (t, $J=7.4$ Hz, 2H, $^+\text{NCH}_2$), 6.95 (d, $J=8.8$ Hz, 2H, ArH), 7.48 (d, $J=16.4$ Hz, 1H, $\text{CH}=\text{CH}$), 7.68 (t, $J=7.2$ Hz, 1H, ArH), 7.78 (t, $J=6.8$ Hz, 1H, ArH), 8.01 (d, $J=8.8$ Hz, 1H, ArH), 8.08 (d, $J=10.0$ Hz, 2H, ArH), 8.18 (d, $J=7.6$ Hz, 1H, ArH), 8.24 (d, $J=8.8$ Hz, 1H, ArH), 8.43 (d, $J=8.8$ Hz, 1H, ArH), 8.61 (d, $J=15.6$ Hz, 1H, $\text{CH}=\text{CH}$); IR (KBr) ν : 3055 (w, ν_{CH}), 2992, 2917 (m, ν_{CH}), 1573, 1531, 1503, 1451 (s, $\nu_{\text{C}=\text{C}}$, $\nu_{\text{C}=\text{N}}$), 1278, 1168, 1124 (m, $\nu_{\text{C}-\text{N}}$, δ_{CH}), 979 (s, δ_{CH}), 943 (m, δ_{CH}), 838 (s, δ_{CH}). Anal. calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{31}\text{N}_2\text{PF}_6$: C 61.36, H 5.87, N 5.30; found C 61.19, H 5.76, N 5.24.

染料 **H4**: 深绿色晶体, 产率 85.8%. m.p. 240~241 °C; UV-vis (MeOH) $\lambda_{\max}$: 563 nm; ^1H NMR (CH_3COCH_3 - d_6 , 400 MHz) δ : 1.02 (t, $J=7.2$ Hz, 3H, CH_3), 1.60~1.62 (m, 2H, CH_2), 2.06~2.08 (m, 2H, CH_2), 2.16 [s, 6H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$], 3.25 [s, 6H, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$], 4.78 (t, $J=7.4$ Hz, 2H, $^+\text{NCH}_2$), 6.96 (d, $J=8.8$ Hz, 2H, ArH), 7.46 (d, $J=15.6$ Hz, 1H, $\text{CH}=\text{CH}$), 7.68 (t, $J=7.2$ Hz, 1H, ArH), 7.78 (t, $J=7.2$ Hz, 1H, ArH), 7.99 (d, $J=9.6$ Hz, 1H, ArH), 8.06 (d, $J=8.8$ Hz, 2H, ArH), 8.18 (d, $J=7.6$ Hz, 1H, ArH), 8.25 (d, $J=8.8$ Hz, 1H, ArH), 8.42 (d, $J=8.0$ Hz, 1H, ArH), 8.61 (d, 1H, $J=15.6$ Hz, $\text{CH}=\text{CH}$); IR (KBr) ν : 3030 (w, ν_{CH}), 2923 (m, ν_{CH}), 1622, 1571, 1530, 1503, 1455, (s, $\nu_{\text{C}=\text{C}}$, $\nu_{\text{C}=\text{N}}$), 1292, 1166 (s, $\nu_{\text{C}-\text{N}}$, δ_{CH}), 978 (s, δ_{CH}), 938 (s, δ_{CH}), 838 (s, δ_{CH}). Anal. calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{33}\text{N}_2\text{PF}_6$: C 61.09, H 6.09, N 5.17; found C 61.92, H 5.95, N 5.10.

1.3 苯并咪唑二次甲基菁染料的无溶剂微波合成

以染料 **F1** 合成为例, 将 1,2,3,3-四甲基-4,5-苯并咪唑六氟合磷酸盐(0.51 mmol), 3-咪唑甲醛(0.51 mmol)和少量吡啶在烧杯中混合均匀, 然后选用适当的功率, 微波辐射几分钟后, 冷却到室温, 加入少量乙醇, 搅拌后静置, 抽滤得到粗品. 用 $V(\text{乙醇}):V(\text{丙酮})=1:2$ 重结晶得红色固体 **F1**, 产率 87.6%. m.p. 253~254 °C; UV-vis (MeOH) $\lambda_{\max}$: 484 nm; ^1H NMR (CH_3COCH_3 - d_6 , 400 MHz) δ : 2.19 [s, 6H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$], 4.33 (s, 3H, $^+\text{NCH}_3$), 7.43~7.45 (m, 2H, ArH), 7.50 (d, $J=15.6$ Hz, 1H, $\text{CH}=\text{CH}$), 7.67~7.72 (m, 2H, ArH), 7.79 (t, $J=7.8$ Hz, 1H, ArH), 8.03 (d, $J=8.8$ Hz, 1H, ArH), 8.19 (d, $J=7.6$ Hz, 1H, ArH), 8.26~8.31 (m, 2H, ArH), 8.45 (d, $J=8.8$ Hz,

1H, ArH), 8.63 (s, 1H, pyrrole-H), 9.00 (d, $J=15.6$ Hz, 1H, $\text{CH}=\text{CH}$); IR (KBr) ν : 3397 (m, ν_{NH}), 3087, 3030 (w, ν_{CH}), 2995, 2913 (m, ν_{CH}), 1593, 1573, 1487, 1433, 1404 (s, $\nu_{\text{C}=\text{C}}$, $\nu_{\text{C}=\text{N}}$, δ_{NH}), 1302, 1235, 1115 (s, $\nu_{\text{C}-\text{N}}$, δ_{CH}), 968 (s, ω_{CH}), 943 (m, δ_{CH}), 833 (s, δ_{CH}). Anal. calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{PF}_6$: C 60.48, H 4.64, N 5.65; found C 60.31, H 4.39, N 5.63.

其它染料 **F2**~**F4** 的合成方法相似, 实验数据如下:

染料 **F2**: 红色固体, 产率 85.5%. m.p. 235~236 °C; UV-vis (MeOH) $\lambda_{\max}$: 485 nm; ^1H NMR (CH_3COCH_3 - d_6 , 400 MHz) δ : 1.71 (t, $J=7.2$ Hz, 3H, CH_3), 2.20 [s, 6H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$], 4.85 (q, $J=7.2$ Hz, 2H, $^+\text{NCH}_2$), 7.42~7.46 (m, 2H, ArH), 7.50 (d, $J=15.6$ Hz, 1H, $\text{CH}=\text{CH}$), 7.67~7.73 (m, 2H, ArH), 7.80 (t, $J=7.4$ Hz, 1H, ArH), 8.04 (d, $J=8.8$ Hz, 1H, ArH), 8.19 (d, $J=8.0$ Hz, 1H, ArH), 8.26~8.29 (m, 2H, ArH), 8.45 (d, $J=8.8$ Hz, 1H, ArH), 8.66 (s, 1H, pyrrole-H), 9.03 (d, $J=15.6$ Hz, 1H, $\text{CH}=\text{CH}$); IR (KBr) ν : 3384 (m, ν_{NH}), 3127, 3031 (w, ν_{CH}), 2986 (m, ν_{CH}), 1594, 1570, 1487, 1470, 1424 (s, $\nu_{\text{C}=\text{C}}$, $\nu_{\text{C}=\text{N}}$, δ_{NH}), 1303, 1233, 1204, 1121 (s, $\nu_{\text{C}-\text{N}}$, δ_{CH}), 965 (s, δ_{CH}), 935 (m, δ_{CH}), 838 (s, δ_{CH}). Anal. calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{PF}_6$: C 61.18, H 4.90, N 5.49; found C 61.25, H 4.60, N 5.40.

染料 **F3**: 红棕色固体, 产率 90.7%. m.p. 226~227 °C; UV-vis (MeOH) $\lambda_{\max}$: 487 nm; ^1H NMR (CH_3COCH_3 - d_6 , 400 MHz) δ : 1.21 (t, $J=7.2$ Hz, 3H, CH_3), 2.18~2.21 (m, 2H, CH_2), 2.22 [s, 6H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$], 4.81 (b, 2H, $^+\text{NCH}_2$), 7.45 (q, $J=6.4$ Hz, 2H, ArH), 7.52 (d, $J=16.0$ Hz, 1H, $\text{CH}=\text{CH}$), 7.69 (q, $J=7.8$ Hz, 2H, ArH), 7.80 (t, $J=7.8$ Hz, 1H, ArH), 8.05 (d, $J=8.8$ Hz, 1H, ArH), 8.19 (d, $J=8.8$ Hz, 1H, ArH), 8.26 (d, $J=6.8$ Hz, 2H, ArH), 8.45 (d, $J=8.0$ Hz, 1H, ArH), 8.66 (s, 1H, pyrrole-H), 9.04 (d, $J=16.0$ Hz, 1H, $\text{CH}=\text{CH}$); IR (KBr) ν : 3390 (m, ν_{NH}), 3030 (w, ν_{CH}), 2967 (m, ν_{CH}), 1594, 1569, 1485, 1424 (s, $\nu_{\text{C}=\text{C}}$, $\nu_{\text{C}=\text{N}}$, δ_{NH}), 1346, 1304, 1233, 1201, 1122 (s, $\nu_{\text{C}-\text{N}}$, δ_{CH}), 971 (s, δ_{CH}), 944 (m, δ_{CH}), 838 (s, δ_{CH}). Anal. calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{PF}_6$: C 61.83, H 5.15, N 5.34; found C 61.60, H 4.95, N 5.26.

染料 **F4**: 红棕色固体, 产率 84.9%. m.p. 218~219 °C; UV-vis (MeOH) $\lambda_{\max}$: 487 nm; ^1H NMR (CH_3COCH_3 - d_6 , 400 MHz) δ : 1.06 (t, $J=8.2$ Hz, 3H, CH_3), 1.65~1.71 (m, 2H, CH_2), 2.11~2.15 (m, 2H, CH_2), 2.21 [s, 6H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$], 4.84 (t, $J=7.4$ Hz, 2H, $^+\text{NCH}_2$), 7.45 (q, $J=7.2$ Hz, 2H, ArH), 7.51 (d, $J=16.0$ Hz, 1H, $\text{CH}=\text{CH}$), 7.71 (q, $J=8.4$ Hz, 2H, ArH), 7.80 (t, $J=7.8$ Hz, 1H, ArH),

8.04 (d, $J=8.8$ Hz, 1H, ArH), 8.20 (d, $J=7.6$ Hz, 1H, ArH), 8.27 (d, $J=8.8$ Hz, 2H, ArH), 8.45 (d, $J=8.0$ Hz, 1H, ArH), 8.66 (s, 1H, pyrrole-H), 9.04 (d, $J=16.0$ Hz, 1H, CH=CH); IR (KBr) ν : 3408 (m, ν_{NH}), 3045 (w, ν_{CH}), 2932 (m, ν_{CH}), 1594, 1571, 1483, 1425 (s, $\nu_{\text{C}=\text{C}}$, $\nu_{\text{C}=\text{N}}$, δ_{NH}), 1302, 1235, 1198, 1122 (s, $\nu_{\text{C}-\text{N}}$, δ_{CH}), 961 (s, δ_{CH}), 936 (m, δ_{CH}), 837 (s, δ_{CH}). Anal. calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{PF}_6$: C 62.45, H 5.39, N 5.20; found C 62.67, H 5.19, N 5.14.

1.4 H3 和 F3 的常规合成

染料 **H3** 的合成: 在圆底烧瓶中加入 0.40 g (0.0010 mol) 2,3,3-三甲基-1-丙基-4,5-苯并吡啶六氟合磷酸盐、0.16 g (0.0011 mol) 对二甲氨基苯甲醛和 8 mL 无水乙醇, 回流溶解, 然后加入少量哌啶回流 2 h, 冷却至室温, 抽滤, 乙醚洗涤, 得到粗产物, 用 $V(\text{乙醇}):V(\text{丙酮})=1:1$ 重结晶得到 0.40 g 深绿色固体 **H3**, 产率为 75.1%.

染料 **F3** 的合成: 在圆底烧瓶中加入 0.60 g (0.0015 mol) 2,3,3-三甲基-1-丙基-4,5-苯并吡啶六氟合磷酸盐、0.23 g (0.0016 mol) 3-吡啶甲醛和 8 mL 无水乙醇, 回流溶解, 然后加入少量哌啶回流 2 h, 冷却至室温, 抽滤, 乙醚洗涤, 得到粗产物, 用 $V(\text{乙醇}):V(\text{丙酮})=1:2$ 重结晶得到 0.60 g 红棕色固体 **F3**, 产率为 75.7%.

1.5 光谱性质测定

1.5.1 两类菁染料在不同溶剂中的紫外-可见吸收光谱、荧光光谱的测定

配制苯并吡啶半菁染料 **H1~H4** 和苯并吡啶二次甲基菁染料 **F1~F4** 浓度为 1×10^{-2} mol/L 的二甲亚砷储备液, 然后依次用水、二甲亚砷、甲醇、乙醇、氯仿稀释成 10^{-5} mol/L 的工作液, 测定紫外-可见吸收和荧光光谱, 选择染料最大吸收波长作为激发波长测定其荧光光谱, 测试条件为室温, 样品池为 $1 \text{ cm} \times 1 \text{ cm} \times 4 \text{ cm}$ 石英比色皿, 最大激发和最大发射光谱狭缝宽均为 5.0 nm.

1.5.2 两类菁染料与生物分子作用的紫外-可见吸收光谱和荧光光谱测定

(1) TE 缓冲溶液的配制

首先配制 0.25 mol/L 的 Tris(三羟甲基氨基甲烷)储备液, 并用 HCl 溶液将 pH 值调至 7~8 左右; 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 左右; 然后将一定量的 Tris 和 EDTA-2Na 储备液混合, 调 pH 值至 7.0~7.5 左右, 最终稀释定容, 使 Tris-HCl 和 EDTA 的终浓度分别为 10 和 1 mmol/L.

(2) 染料-生物分子溶液的配制

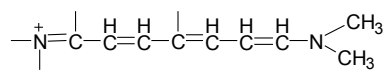
配制苯并吡啶半菁染料 **H3** 和苯并吡啶二次甲基菁染料 **F2** 浓度为 1×10^{-2} mol/L 的 DMSO 储备溶液; 糜蛋白酶、淀粉酶、牛血清白蛋白、鲑鱼精 DNA 和溶菌酶

的储备液均用 TE 缓冲溶液配制, 浓度均为 80 $\mu\text{g/mL}$. 分别吸取一定量的染料和生物分子溶液相混合, 再用 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依次为 2×10^{-5} mol/L 和 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 $\mu\text{g/mL}$.

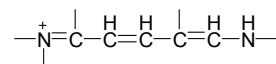
2 结果与讨论

2.1 染料的合成

染料 **H1~H4** 及 **F1~F4** 的合成条件列在表 1 中, 从表中可以看出, 采用不同的醛和 *N*-烷基-2,3,3-三甲基-4,5-苯并吡啶六氟合磷酸盐进行反应时, 所需要的微波辐射功率和时间不同. 对二甲氨基苯甲醛和 *N*-烷基-2,3,3-三甲基-4,5-苯并吡啶六氟合磷酸盐缩合生成染料 **H1~H4**, 所需功率小, 时间也短. 这是由于染料 **H1~H4** 的 D- π -A 共轭骨架结构为



而 **F1~F4** 的 D- π -A 共轭骨架结构为:



共轭程度越大, 电子的离域性就越大, 分子就越稳定, 分子的能量就越低, 即反应的过渡态能量就越低(因为反应过渡态的结构不能用实验观测, 通常认为过渡态的结构类似于中间体或产物的结构, 中间体或产物的能量低, 过渡态能量就低)^[13], 而合成染料 **H1~H4** 及 **F1~F4** 的反应类型均是亲核加成-消除反应, 反应原料结构也基本相似, 因此过渡态能量低的, 反应的活化能小, 反应速率高, 即反应容易进行. 由上述 D- π -A 共轭骨架结构可以看出: 染料 **H1~H4** 的共轭程度大于染料 **F1~F4**, 因此形成 H 类染料反应容易进行, 反应所需的功率小, 时间也短.

表 1 染料 **H1~H4** 及 **F1~F4** 的合成条件

Table 1 The synthesis condition of dyes **H1~H4** and **F1~F4**

Dye	R	Time/min	Power/W	Yield/%
H1	CH ₃	5	406	83.8
H2	C ₂ H ₅	5	406	84.5
H3	C ₃ H ₇	5	406	89.4
H4	C ₄ H ₉	5	406	85.8
F1	CH ₃	8	567	87.6
F2	C ₂ H ₅	10	567	85.5
F3	C ₃ H ₇	10	567	90.7
F4	C ₄ H ₉	12	567	84.9

本文也利用常规方法合成了其中的两个染料, 结果如表 2 所示. 显然, 从反应时间、产率考虑, 采用微波辐射技术明显优于常规方法. 微波合成避免或减少了传统

合成所需的有机溶剂和副产物的产生, 所得产品易于纯化, 且对环境污染小.

表 2 部分染料微波辐射法与常规加热法合成比较

Table 2 The comparison of synthesis conditions (part dyes)

Dye	Common method		Microwave irradiation	
	Time/h	Yield/%	Time/min	Yield/%
H3	2	75.1	5	89.4
F3	2	75.7	10	90.7

2.2 染料的结构确证

通过 ^1H NMR, IR, UV-Vis 及元素分析技术很好地解释了染料 H1~H4 与 F1~F4 的结构. 在紫外-可见光谱中均出现了共轭链的吸收($\pi-\pi^*$), 染料 H1~H4 及 F1~F4 在甲醇中的最大吸收波长分别在 551~563 和 484~487 nm 之间.

在红外光谱中出现了芳环的特征吸收(ν_{CH} , 3020~3087 cm^{-1} , $\nu_{\text{C}=\text{C}}$, 1400~1622 cm^{-1} ; δ_{CH} , 833~979 cm^{-1})和生色团的共轭不饱和伸缩振动吸收峰($\nu_{\text{C}=\text{C}}$, $\nu_{\text{C}=\text{N}}$, 1404~1622 cm^{-1}), 在染料 F1~F4 的红外吸收中, 均出现了在 3384~3408 cm^{-1} , 范围内的 ν_{NH} 的特征吸收峰.

从 ^1H NMR 谱的数据中可以看出, 染料 H1~H4 与 F1~F4 烯碳上的氢的邻位偶合常数($^3J_{\text{HH}}$)都在 15~16 Hz, 说明染料 H1~H4 与 F1~F4 的结构均为反式构型. 从红外数据也可看出, 所有染料在 960~980 cm^{-1} 之间各有一中等强度的吸收峰, 这是反式 $\text{RCH}=\text{CHR}$ 烯碳上氢的面外摇摆振动引起的, 表明所合成的染料均为稳定的反式构型.

2.3 染料在不同溶剂中的光谱性质

表 3 列出了染料 H1~H4 与 F1~F4 在不同溶剂中的吸收光谱和荧光光谱性质. 从表中可以看出, 半菁染料 H1~H4 及二次甲基菁染料 F1~F4 在 H_2O , DMSO, MeOH, EtOH, CHCl_3 中的最大吸收波长分别在 541~578 和 477~512 nm 之间. 苯并吡啶半菁染料的最大吸收波长大于苯并吡啶二次甲基菁染料(如图 1). 这是由于苯并吡啶半菁染料 H1~H4 的“D- π -A”共轭体系大于相应的苯并吡啶二次甲基菁染料 F1~F4, “D- π -A”共轭体系越大, 最大吸收波长越长. 还可看出, 8 种染料分别在三种不同极性的质子性溶剂乙醇、甲醇、水(它们的介电常数依次为: 24.6, 32.6, 78.4)中的最大吸收波长的顺序为: $\lambda_{\text{max}}(\text{EtOH}) > \lambda_{\text{max}}(\text{MeOH}) > \lambda_{\text{max}}(\text{H}_2\text{O})$, 即随着溶剂极性的增加最大吸收波长发生蓝移, 表现为负溶剂化效应. 这是由于随着溶剂极性的增大, 染料分子与溶剂分子之间的相互作用增大, 从而降低了基态能级, 增大了吸收过程基态和激发态之间的能量差^[14,15]. 其中, 在水溶液中的各种染料相对于在其它溶剂均表现

出较大的蓝移, 这归因于水分子与染料分子中给体氮原子上的孤对电子有较强的氢键作用, 降低了共轭体系中电子的离域^[16].

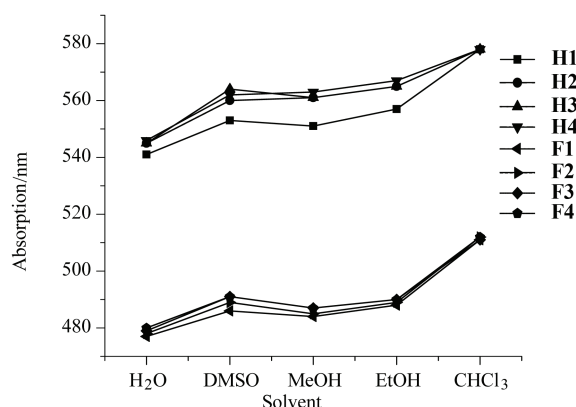


图 1 染料 H1~H4 与 F1~F4 在不同溶剂中的最大吸收波长的变化

Figure 1 The maximum absorption wavelength of dyes H1~H4 and F1~F4 in different solvents

在两种非质子性溶剂 DMSO 和 CHCl_3 (介电常数分别为 47.2, 4.7)中的最大吸收波长顺序为: $\lambda_{\text{max}}(\text{CHCl}_3) > \lambda_{\text{max}}(\text{DMSO})$, 这是因为氯仿的极性较小, 又由于三个氯原子立体效应, 使得氯仿分子与染料分子中给体氮原子上的孤对电子的相互作用与 DMSO 相比较弱^[17].

从荧光量子产率数据可以看出, 8 种染料在 5 种溶剂中均具有荧光, 且染料在非质子极性溶剂中的荧光量子产率均较质子性溶剂的值要大, 这可能是染料与质子性溶剂分子相互作用相对较强导致了非辐射衰减过程的增加所致^[18]. Stokes 位移(Stokes Shifts)是由化合物的激发光谱与发射光谱的分离度表示, 其大小反映了分子在激发与发射过程中发生振动弛豫散失部分能量或者空间几何构型等的变化. 从表 3 中可看出, 合成的 8 种染料的 Stokes 位移为 33~76 nm, 在相同溶剂中苯并吡啶二次甲基菁染料的 Stokes 位移明显的比半菁染料的大, 这说明苯并吡啶二次甲基菁染料在激发与发射过程中, 空间几何构型或电子分布的变化较大, 而苯并吡啶半菁染料的变化较小.

2.4 不同生物分子存在下染料的荧光光谱性质

选择两类染料中有较大 Stokes 位移和较大荧光量子产率的 H3 和 F2 进行了与鲑鱼精 DNA 相互作用的实验, 结果发现在生理 pH 条件下, 随着鲑鱼精 DNA 浓度的增加, 染料 H3 的荧光强度出现了规律性的增加(图 2), 说明 DNA 和半菁染料 H3 发生了相互作用. 这可能是由于该阳离子型染料通过本身的正电性和 DNA 双螺旋结构中的磷酸骨架产生了静电作用^[19,20], 光激发时, 这种作用使核间桥旋转的自由度降低, 甲川链异构化不

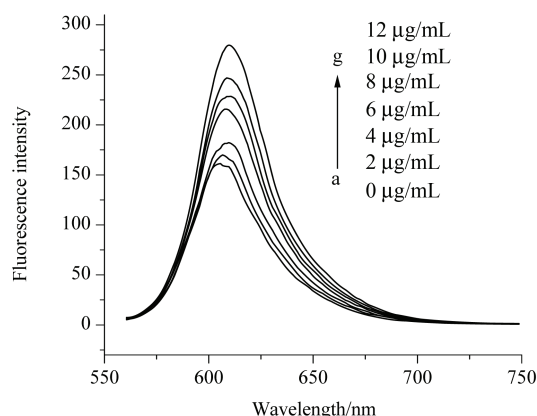


图2 染料 **H3** (2×10^{-5} mol/L) 与不同浓度的DNA相互作用的荧光光谱

Figure 2 Fluorescence spectra of the dye **H3** (2×10^{-5} mol/L) with different concentration of DNA

可能发生, 导致染料的荧光强度逐渐增强^[21].

此外, 我们还研究了染料 **H3** 和 **F2** 与 BSA、溶菌酶、淀粉酶和糜蛋白酶的相互作用, 实验所用染料和 4 种蛋白质的浓度与 DNA 相互作用所用浓度一致, 实验数据如表 4 所示, 从表中可以看出 4 种蛋白质的加入与没有加入生物分子之前相比, 两种染料的荧光量子产率并没有出现规律性变化。

3 结论

利用绿色微波合成技术合成了 4 种苯并吡啶半菁染料和 4 种苯并吡啶二次甲基菁染料. 8 种染料在 5 种溶剂中的紫外-可见吸收光谱和荧光光谱研究显示, 在质子性溶剂和非质子性溶剂中两类染料的最大吸收波长都随着溶剂极性的增加出现蓝移. 染料 **H3** 和 **F2** 与 5 种生物大分子的相互作用结果显示, **H3** 的荧光强度随着

表3 染料 **H1**~**H4** 与 **F1**~**F4** 在不同溶剂中的吸收光谱和荧光光谱性质

Table 3 The absorption and fluorescence spectral characteristics of dyes **H1**~**H4** and **F1**~**F4** in different solvents

Solvent	Dye	$\lambda_{\max}/\text{nm}$	$\lambda_{\text{ex}}/\text{nm}$	$\lambda_{\text{em}}/\text{nm}$	Stokes shift/nm	$\varepsilon \times 10^{-4}/(\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1})$	Φ_{free}
H ₂ O	H1	541	541	601	60	3.36	0.0016
	H2	545	545	603	58	3.70	0.0017
	H3	545	545	605	60	5.22	0.0023
	H4	546	546	603	57	4.55	0.0021
	F1	477	477	553	76	3.43	0.0019
	F2	478	478	552	74	4.10	0.0022
	F3	479	479	553	74	3.77	0.0020
	F4	480	480	551	71	2.74	0.0014
DMSO	H1	553	553	616	63	4.93	0.0112
	H2	560	560	616	56	5.09	0.0109
	H3	564	564	618	55	5.62	0.0116
	H4	562	562	619	57	5.79	0.0123
	F1	486	486	554	68	3.90	0.0100
	F2	489	489	561	72	4.14	0.0105
	F3	491	491	558	67	4.36	0.0106
	F4	491	491	558	67	3.38	0.0083
MeOH	H1	551	551	606	55	5.45	0.0039
	H2	561	561	607	46	4.97	0.0033
	H3	561	561	609	48	6.24	0.0041
	H4	563	563	610	47	6.49	0.0043
	F1	484	484	558	74	4.30	0.0035
	F2	485	485	558	73	4.59	0.0037
	F3	487	487	559	72	4.59	0.0035
	F4	487	487	557	70	3.73	0.0029
EtOH	H1	557	557	608	51	5.03	0.0063
	H2	565	565	607	42	5.11	0.0060
	H3	565	565	611	46	6.53	0.0075
	H4	567	567	611	44	6.49	0.0076
	F1	488	488	560	72	4.55	0.0065
	F2	489	489	559	70	4.62	0.0065
	F3	490	490	560	70	4.79	0.0065
	F4	490	490	554	64	3.95	0.0054

续表

Solvent	Dye	$\lambda_{\max}/\text{nm}$	$\lambda_{\text{ex}}/\text{nm}$	$\lambda_{\text{em}}/\text{nm}$	Stockes shift/nm	$\varepsilon \times 10^{-4}/(\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1})$	Φ_{free}
CHCl_3	H1	578	578	613	35	6.72	0.0133
	H2	578	578	611	33	6.82	0.0129
	H3	578	578	613	35	7.46	0.0137
	H4	578	578	614	36	7.30	0.0138
	F1	511	511	568	57	4.44	0.0098
	F2	512	512	567	55	4.62	0.0101
	F3	511	511	565	54	4.02	0.0086
	F4	512	512	564	52	3.24	0.0070

表4 H3和F2与不同生物分子作用的荧光量子产率

Table 4 The fluorescence quantum yield of dyes H3 and F2 with different biomolecules

Dye	$c(\text{Biomolecule})/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	$\Phi_{\text{DNA}}/\Phi_{\text{free}}$	$\Phi_{\text{BSA}}/\Phi_{\text{free}}$	$\Phi_{\text{Muramidase}}/\Phi_{\text{free}}$	$\Phi_{\text{Amylase}}/\Phi_{\text{free}}$	$\Phi_{\text{Chymotrypsin}}/\Phi_{\text{free}}$
H3	0	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
	2	1.0741	1.1993	1.0884	1.0810	1.0497
	4	1.1045	0.4844	0.9842	1.1083	1.0018
	6	1.2027	0.9494	0.8140	1.0913	1.0470
	8	1.3114	0.9275	0.9786	0.9452	1.0089
	10	1.3873	0.9235	0.9251	1.0799	1.0741
	12	1.4989	0.8523	0.9212	1.0104	1.0246
	0	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
F2	2	1.1462	0.8680	0.9607	0.9616	0.9310
	4	1.1152	0.8347	0.7272	0.9051	0.9553
	6	1.0242	0.8483	0.8532	0.9115	0.9453
	8	1.2909	0.8633	0.7974	0.9027	0.9854
	10	1.0883	0.8148	0.8173	0.8893	0.8674
	12	0.9604	0.7936	0.7765	0.9312	0.9041

DNA 浓度的增加而增强, 而 BSA、溶菌酶、淀粉酶和糜蛋白酶的加入对染料 **H3** 和 **F2** 的荧光强度影响不大。

References

- [1] Wang, Z.-S.; Li, F.-Y.; Huang, C.-H. *Chem. Commun.* **2000**, 2063.
- [2] Yao, Q.-H.; Meng, F.-S.; Li, F.-Y.; Tian, H.; Huang, C.-H. *J. Mater. Chem.* **2003**, *13*, 1048.
- [3] Kanofsky, J. R.; Sima, P. D. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **2000**, *54*, 136.
- [4] 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.
- [5] Fechter, E. J.; Olenyuk, B.; Dervan, P. B. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 16685.
- [6] Duthie, R. S.; Kalve, I. M.; Samols, S. B.; Hamilton, S.; Livshin, I.; Khot, M.; Nampalli, S.; Kumar, S.; Fuller, C. W. *Bioconjugate Chem.* **2002**, *13*, 699.
- [7] Thompson, M. *Bioconjugate Chem.* **2006**, *17*, 507.
- [8] Mazières, M. R.; Duprat, C.; Wolf, J. G.; Roshal, A. D. *Dyes Pigm.* **2009**, *80*, 355.
- [9] Xu, Y.; Liu, Y.; Qian, X. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **2007**, *190*, 1.
- [10] Wang, J.; Cao, W.-F.; Su, J.-H.; Tian, H.; Huang, Y.-H.; Sun, Z.-R. *Dyes Pigm.* **2003**, *57*, 171.
- [11] Zhan, W.-H.; Barnhill, N.; Sivakumar, K.; Tian, H.; Wang, Q. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 1691.
- [12] Wang, Q.-C.; Qu, D.-H.; Ren, J.; Xu, L.-H.; Liu, M.-Y.; Tian, H. *Dyes Pigm.* **2003**, *59*, 163.
- [13] Michael, B. S.; March, J. *March's Advanced Organic Chemistry—Reactions, Mechanisms, and Structure*, 5th ed., Translated by Li, Y. M., Chemical Industry Press, Beijing **2009**, p. 135 (in Chinese). (Michael, B. S.; March, J. 高等有机化学——反应、机理与结构 (第五版), 李艳梅译, 化学工业出版社, 北京, **2009**, p. 135.)
- [14] Zhang, W.; Cui, Y.-Z.; Wang, S.-J. *Acta Chim. Sinica* **2009**, *67*, 1880 (in Chinese). (张雯, 崔月芝, 王世杰, 化学学报, **2009**, *67*, 1880.)
- [15] El-Shishtawy, R. M.; Asiri, A. M.; Basaif, S. A.; Sobahi, T. R. *Spectrochim. Acta, Part A* **2010**, *75*, 1605.
- [16] Shindy, H. A.; El-Maghraby, M. A.; Eissa, F. M. *Coloration Technol.* **2009**, *125*, 104.
- [17] Shindy, H. A. *Coloration Technol.* **2007**, *123*, 298.
- [18] Song, B.; Zhang, Q.; Peng, X.-J.; Ma, W.-H.; Wang, B.-S.; Fu, X.-M. *Chem. J. Chin. Univ.* **2008**, *29*, 932 (in Chinese). (宋波, 张茜, 彭孝军, 马文辉, 王炳帅, 付新梅, 高等学校化学学报, **2008**, *29*, 932.)
- [19] Medhi, C.; Mitchell, J. B.; Price, S. L. *Biopolymers* **1999**, *52*, 84.
- [20] Neto, B. A. D.; Alexandre, L.; Lapis, A. M. *Molecules* **2009**, *14*, 1725.
- [21] Su, Z.; Qin, C.; Xie, M.-X.; Li, J.-D.; Wang, Y.-D. *Acta Chim. Sinica* **2007**, *65*, 329 (in Chinese). (苏忠, 秦川, 谢孟峡, 李建东, 王英典, 化学学报, **2007**, *65*, 329.)

(Zhao, C.; Lu, Z.)