

新型水溶性荧光标示剂吡啶方酸菁染料的合成及光谱性能

宋波^{1,2}, 张茜², 彭孝军¹, 马文辉^{1,2}, 王炳帅¹, 付新梅¹

(1. 大连理工大学精细化工国家重点实验室, 大连 116012; 2. 齐齐哈尔大学化学与化学工程学院, 齐齐哈尔 161006)

摘要 用方酸与不同的 N 烷基取代吡啶季铵盐缩合制备了一系列对称的水溶性方酸菁染料. 通过核磁共振氢谱和质谱对合成的染料结构进行了表征, 研究了它们在不同溶剂中的吸收和发射光谱. 结果表明, 随着溶剂极性的增大, 染料的吸收光谱发生蓝移, 表现为负向溶剂化效应, 在极性溶剂中的荧光量子产率比在水中的大. 考察了 N 位取代基对染料水溶液光稳定性的影响, 结果表明在吡啶环 N 原子上引入较大的苯基有助于提高光稳定性, 且随着苯基上取代基吸电子能力的增强, 染料的光稳定性增强.

关键词 方酸; 菁染料; 水溶性; 光稳定性

中图分类号 O626.32*9

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2008)05-0932-04

荧光分析技术是基因测序、基因表达及临床诊断等方面的重要手段^[1~3]. 但荧光染料的水溶性对其在生物领域中的应用非常重要, 这是因为染料的水溶性可以降低染料的聚集程度, 从而影响染料的吸收和发射, 有利于在水相中对生物分子进行标记, 且不使生物分子功能失活^[4,5]. 目前使用较多的染料最大吸收波长和荧光发射波长较短^[6], 荧光检测的灵敏度较低. 多甲川菁染料的吸收和发射光谱区位于 550~1200 nm 处, 在这个光谱区域, 杂质的荧光背景及散射光的干扰都很弱, 信噪比高, 而且它们有很高的摩尔消光系数和良好的荧光特性, 但其光稳定性较差^[7]. 据文献[8]报道, 将荧光染料与纳米技术相结合制备荧光染料纳米颗粒, 可改善其光稳定性及检测灵敏度. 为了提高其光稳定性, 本文在线型甲川链上引入方酸桥环, 在吡啶环两端的氮原子上引入芳环烷基, 在吡啶环上引入磺酸基, 合成了一系列的水溶性方酸吡啶菁染料, 并通过紫外吸收光谱研究了其光稳定性.

1 实验部分

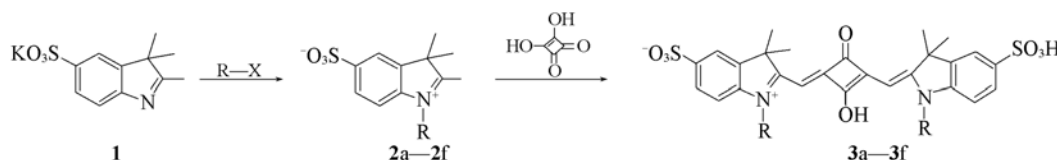
1.1 仪器与试剂

Bruker 公司 AVance-400 超导核磁共振波谱仪, TMS 为内标, DMSO-d₆ 为溶剂; HP 1100 LC-MSD 质谱仪; 美国 PE 公司 Lambda 35 双光束紫外-可见分光光度计; 美国 PE 公司 LS 55 荧光光谱仪.

苯基溴和六溴己酸为 Acros 公司进口, 其它合成用原料为国产工业品经再提纯或国产分析纯试剂.

1.2 合成

合成路线如 Scheme 1 所示. 2,3,3-三甲基-3H-吡啶-5-磺酸钾盐(1)按文献[9]的方法合成.



Scheme 1 Synthetic routes of the squarylium cyanine dyes

a: R = *p*-CH₂C₆H₄COOH; b: R = (CH₂)₅COOH; c: R = C₂H₅; d: R = CH₂C₆H₅; e: R = *p*-CH₂C₆H₄CH₃; f: R = *p*-CH₂C₆H₄F.

1.2.1 N-烷基取代-2,3,3-三甲基-3H-吡啶-5-磺酸的合成

以中间体 2d 为例, 将 2,3,3-三甲基-3H-

收稿日期: 2007-08-26.

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 20376010, 20472012)资助.

联系人简介: 彭孝军, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 从事超分子化学和荧光分子探针的研究. E-mail: pengxj@dlut.edu.cn

吡喹方酸菁染料 5.5 g(0.02 mol)与苄基溴 3.7 g(0.032 mol)溶于 35 mL 甲苯中,在氮气保护下加热回流 5 h,冷却,过滤,真空干燥,直接用于下步反应。

1.2.2 方酸吡喹菁染料的合成 以染料 3d 为例,将 810 mg(1.8 mmol)中间体 2d 溶于 5 mL 吡啶中,然后加入到 114 mg(1 mmol)方酸溶于 10 mL 甲苯-正丁醇(体积比 1:1)的混合溶液中,在氮气保护下将混合液加热回流 6 h,冷却至室温,减压浓缩,加入异丙醇,静置,过滤,得蓝绿色固体,使用反相 C₁₈(Sinocrom 40~75 μm, 10 nm)为填料,甲醇和水为洗脱剂梯度洗脱提纯,得蓝色固体粉末(几种染料均为蓝色固体粉末,熔点均在 300 °C 以上)。

3a: ¹H NMR, δ: 1.70[s, 12H, C(CH₃)₂], 5.46(s, 4H, CH₂), 5.73(s, 2H, CH), 7.22~7.25(d, 2H, J=8.0 Hz, CH), 7.29~7.31(d, 4H, J=8.0 Hz, CH), 7.55~7.57(d, 2H, J=7.5 Hz, CH), 7.72(s, 2H, CH), 7.90~7.93(d, 4H, J=8.1 Hz, CH). ESI-MS, m/z: [M-2H+K]⁻(861.1), [M-H]⁻(823.1), [M-2H]²⁻(411.1)。

3b: ¹H NMR, δ: 1.34~1.41(m, 4H, CH₂), 1.54~1.62(m, 4H, CH₂), 1.68[s, 12H, C(CH₃)₂], 1.70~1.75(m, 4H, CH₂), 2.28~2.31(t, 4H, CH₂), 4.05(m, 4H, CH₂), 5.82(s, 2H, CH), 7.26~7.28(d, 2H, J=8.4 Hz, CH), 7.58~7.60(d, 2H, J=8.8 Hz, CH), 7.65(s, 2H, CH). ESI-MS, m/z: [M-H]⁻(783.2), [M-3H+K]²⁻(410.2), [M-2H]²⁻(391.1)。

3c: ¹H NMR, δ: 1.24~1.26(t, 6H, CH₃), 1.70[s, 2H, C(CH₃)₂], 4.12(m, 4H, CH₂), 5.77(s, 2H, CH), 7.23~7.25(d, 4H, J=7.2 Hz, CH), 7.49~7.51(d, 2H, J=8.0 Hz, CH), 7.67(s, 2H, CH). ESI-MS, m/z: [M-2H+K]⁻(649.1), [M-H]⁻(611.2), [M-2H]²⁻(305.1)。

3d: ¹H NMR, δ: 1.71[s, 12H, C(CH₃)₂], 5.39(s, 4H, CH₂), 5.83(s, 2H, CH), 7.20~7.22(d, 4H, J=7.6 Hz, CH), 7.24~7.26(d, 2H, J=8.8 Hz, CH), 7.35~7.39(t, 4H, CH), 7.28~7.31(t, 2H, CH), 7.58~7.60(d, 2H, J=8.4 Hz, CH), 7.72(s, 2H, CH). ESI-MS, m/z: [M-2H+K]⁻(773.1), [M-H]⁻(735.2), [M-2H]²⁻(367.1)。

3e: ¹H NMR, δ: 1.70[s, 12H, C(CH₃)₂], 2.26(s, 6H, CH₃), 5.28(s, 4H, CH₂), 5.80(s, 2H, CH), 7.09~7.11(d, 4H, J=8.0 Hz, CH), 7.15~7.17(d, 2H, J=7.6 Hz, CH), 7.23~7.25(d, 4H, J=8.4 Hz, CH), 7.56~7.58(d, 2H, J=8.0 Hz, CH), 7.70(s, 2H, CH). ESI-MS, m/z: [M-2H+K]⁻(801.2), [M-H]⁻(763.3), [M-2H]²⁻(321.1)。

3f: ¹H NMR, δ: 1.70[s, 12H, C(CH₃)₂], 5.38(s, 4H, CH₂), 5.80(s, 2H, CH), 7.18~7.20(d, 2H, J=8.0 Hz, CH), 7.22~7.24(d, 4H, J=8.0 Hz, CH), 7.24~7.28(t, 4H, CH), 7.57~7.59(d, 2H, J=8.4 Hz, CH), 7.72(s, 2H, CH). ESI-MS, m/z: [M-2H+K]⁻(809.2), [M-H]⁻(771.3), [M-2H]²⁻(385.1)。

2 结果与讨论

2.1 染料的吸收和发射光谱

染料 3d 在水溶液中的吸收光谱和发射光谱如图 1 所示。从图 1 可以看出,它们的最大吸收波长和最大发射波长在近红外区的 625~675 nm 范围内,吸收和发射光谱峰形较窄,斯托克斯位移较小(约 15 nm),与已知的多甲川菁染料光谱特征完全一致^[10]。

将 6 种染料在不同溶剂中的光谱数据归纳于表 1。表 1 中染料的相对荧光量子产率 Φ 以罗丹明 B 在乙醇中(Φ = 0.560)的荧光量子产率作为参比^[11],根据下列公式^[12]计算:

$$\Phi_x = \Phi_s (F_x/F_s) (\varepsilon_s/\varepsilon_x) (E_s/E_x) (n_x/n_s)^2$$

式中, F 为发射光谱曲线积分值, ε 为染料在激发

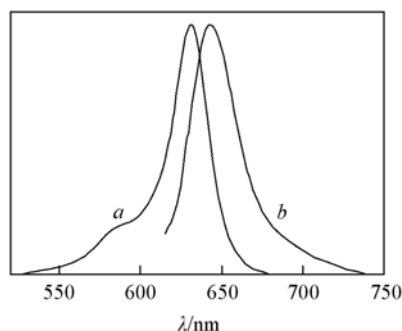


Fig. 1 Absorption(a) and emission(b) spectra of dye 3d in water

波长处的摩尔吸收系数, E 为激发光能量, n 为所用溶剂的折射系数, s 和 x 代表相应的标准染料(罗丹明 B) 和被测染料.

Table 1 Spectral data of the cyanines in the different solvents

Dye	Solvent	λ_{ab}/nm	λ_{em}/nm	Stockes shift/nm	$10^{-5}\epsilon(\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{L})$	Φ
3a	Water	631	646	15	2.42	0.021
	Methanol	638	655	17	2.11	0.170
	Ethanol	641	657	16	2.28	0.101
	DMF	654	668	14	2.22	0.185
	DMSO	656	670	14	2.39	0.157
3b	Water	632	643	11	0.75	0.023
	Methanol	638	652	14	1.17	0.184
	Ethanol	641	656	15	1.23	0.111
	DMF	653	667	14	1.11	0.147
	DMSO	656	668	12	1.16	0.153
3c	Water	628	639	11	1.92	0.008
	Methanol	634	648	14	2.54	0.047
	Ethanol	638	650	12	2.56	0.048
	DMF	649	662	13	2.25	0.088
	DMSO	652	666	14	2.31	0.089
3d	Water	631	646	15	2.44	0.017
	Methanol	638	652	14	2.72	0.065
	Ethanol	641	654	13	2.33	0.136
	DMF	653	667	14	2.62	0.117
	DMSO	656	672	16	2.67	0.114
3e	Water	631	646	15	2.11	0.011
	Methanol	638	653	15	2.57	0.068
	Ethanol	642	655	13	2.03	0.144
	DMF	653	667	14	2.33	0.136
	DMSO	656	669	14	2.38	0.119
3f	Water	631	647	16	0.67	0.014
	Methanol	637	651	14	0.73	0.117
	Ethanol	640	653	13	0.76	0.164
	DMF	652	662	10	0.81	0.221
	DMSO	655	665	10	0.69	0.151

从表 1 可以看出, 染料 3a ~ 3f 在不同溶剂下的紫外吸收光谱规律一致. 随着溶剂极性增大, 其吸收光谱发生蓝移, 表现为负向溶剂化效应. 在一般分子中, 基态极性比激发态小, 激发态更容易被极性溶剂稳定, 所以有明显的正向溶剂化效应. 本文所合成染料都是两性离子方酸菁染料, 其基态分子处于电荷分离状态, 激发态的极性小于基态, 这是这些染料不同于其它染料表现为负向溶剂化效应的原因^[13]. 在质子性溶剂中, 染料吸收光谱蓝移较明显, 这可能是由于染料与溶剂的氢键作用, 基态分子形成更大的稳定能所致. 从荧光量子产率数据可以看出, 染料在其它极性有机溶剂中的荧光量子产率是水中的 9 ~ 10 倍, 这可能是由于染料与水分子相互作用导致非辐射衰减过程的增加所致. 对于方酸染料, 非辐射衰减的主要方式是吡啶环和方酸环之间的 C—C 键的旋转, 方酸染料与水分子的作用使得染料分子的扭曲角增大, 破坏了分子的共平面性, 导致非辐射衰减过程的增加, 从而使染料在水中的荧光有较显著的猝灭.

2.2 染料的光稳定性

考察了 6 种染料的光稳定性, 结果如图 2 所示. 从图 2 可知, 染料的水溶液在距 500 W 碘钨灯 30 cm 处照射 8 h 后, 几种染料均有不同程度的褪

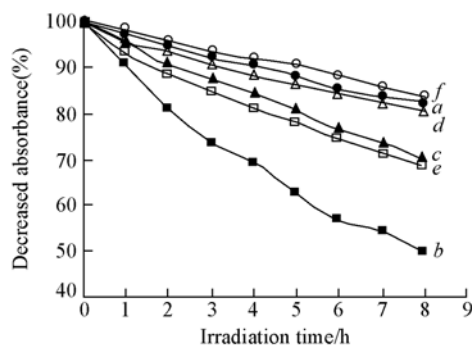


Fig. 2 Photofading behavior of dyes 3a—3f in water

a. 3a; b. 3b; c. 3c; d. 3d; e. 3e; f. 3f.

色现象. 不同 N 位取代基的光稳定性大小的顺序依次为氟苄基(3f) > 羧苄基(3a) > 苄基(3d) > 乙基(3c) > 甲苄基(3e) > 羧戊基(3b). 实验结果表明, 在喹啉环的 N 原子所连基团上引入空间体积较大的苯环, 能够阻止单线态氧的进攻^[14], 从而提高了菁染料的光稳定性, 同时还发现菁染料 N 位上苄基所连基团的供、吸电子能力对染料的光稳定性也有影响. 随着取代基吸电子能力的增大, 染料的光稳定性增强, 反之, 染料的光稳定性降低. 这可能是因为吸电子取代基会降低染料分子的电子云密度, 增强染料分子的抗氧化性和光稳定性^[15]. N-羧苄基方酸菁染料具有相对较好的光稳定性, 有望作为荧光探针在生物分析技术领域应用.

参 考 文 献

- [1] SHI Feng(施锋), LI Hong-Yang(李宏洋), PENG Xiao-Jun(彭孝军). *Fine Chemicals(精细化工)*[J], 2003, (5): 15—19
- [2] CHEN Xiu-Ying(陈秀英), PENG Xiao-Jun(彭孝军). *Dyestuffs Coloration(染料与染色)*[J], 2004, 41(6): 315—319
- [3] YANG Man-Man(杨曼曼), XI Xiao-Li(席小莉), YANG Pin(杨频). *Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)*[J], 2006, 27(4): 687—691
- [4] Wang Li-Qiu, Peng Xiao-Jun, Zhang Rong, *et al.*. *Dyes and Pigments*[J], 2002, 54: 107—111
- [5] Waggoner A. S.. *Cyanine Dyes as Labeling Reagents for Detection of Biological and Other Materials by Luminescence Methods*, US 5627027 [P], 1997-05-06
- [6] Mishra A., Behera R. K., Behera P. K., *et al.*. *Chem. Rev.* [J], 2000, 100: 1973—2011
- [7] WANG Li-Qiu(王立秋), PENG Xiao-Jun(彭孝军). *Dyestuff Industry(染料工业)*[J], 2002, 39(4): 8—12
- [8] HE Xiao-Xiao(何晓晓), CHEN Ji-Yun(陈基耘), WANG Ke-Min(王柯敏), *et al.*. *Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)*[J], 2006, 27(10): 1835—1839
- [9] LOU Kai-Yan(楼开炎), QIAN Xu-Hong(钱旭红), SONG Gong-Hua(宋恭华). *J. East China University Science Technology(华东理工大学学报)*[J], 2002, 28(2): 212—215
- [10] WANG Li-Qiu(王丽秋), LI Qiu-Rong(李秋荣), YAN Li(闫丽), *et al.*. *J. Yanshan University(燕山大学学报)*[J], 2006, 30(1): 91—94
- [11] Karstens T., Kobs K.. *J. Phy. Chem.* [J], 1980, 84(14): 1871—1872
- [12] Steven A. S., Quincy L. M.. *J. Am. Chem. Soc.* [J], 1994, 116: 3144—3152
- [13] De Silva A. P., Gunaratne H. Q. N., Gunlaugsson T., *et al.*. *Chem. Rev.* [J], 1997, 97(5): 1515—1566
- [14] WANG Wei(王伟), YAO Zu-Guang(姚祖光). *Photographic Science Photochem. (感光科学与光化学)*[J], 1997, 15(4): 321—326
- [15] Murphy S., Schuster G. B.. *J. Phys. Chem.* [J], 1995, 99: 8516—8518

Synthesis and Spectral Properties of New Water-soluble Fluorescent Label Squarylium Indocyanine Dyes

SONG Bo^{1,2}, ZHANG Qian², PENG Xiao-Jun^{1*}, MA Wen-Hui^{1,2}, WANG Bing-Shuai¹, FU Xin-Mei¹

(1. State Key Laboratory of Fine Chemical, Dalian University of Technology, Dalian 116012, China;

2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Qiqihar University, Qiqihar 161006, China)

Abstract Six water-soluble squarylium indocyanine dyes were synthesized and their structures were confirmed by ¹H NMR and MS spectroscopy. The absorption and emission spectra of these dyes in water, methanol, ethanol, DMF, DMSO were studied. The spectra of these dyes exhibit a negative solvatochromism. The photo stability of these dyes in water was investigated as well. It is demonstrated that the electron-withdrawing group on N-position of cyanine dyes improves the photo stability as compared with the dyes with electron-donating group which decreases the photo stability obviously.

Keywords Squaric acid; Cyanine dye; Water-solubility; Photo stability

(Ed.: H, J, Z)