

荧光分子探针的合成及水相中氟离子检测 的综合实验设计

李新民, 杨明焱, 吕佳佳, 吴庆, 袁泽利*

(遵义医科大学药学院, 遵义 563000)

摘要: 荧光探针技术是指用荧光光敏分子对待测物质进行标记, 从而实现对待测物定性定量分析的一种技术手段。氟离子是人体重要的微量元素之一, 适当摄入氟离子有助于预防蛀牙和骨质疏松症, 而过量摄入氟离子会引起多种疾病, 因此开发能够检测生物体内氟离子的荧光探针具有重要意义。以教师最新科研成果转换为实验教学内容, 设计了“荧光探针的合成及水相中氟离子检测的综合性实验”。通过实验的实施, 学生的有机合成能力、光学分析仪器的操作能力以及实验数据分析等能力均得到较大提高。

关键词: 荧光探针; 氟离子; 综合设计性实验

Comprehensive designing experiment of the synthesis of fluorescence probe and detection of fluorine ions in aqueous phase

LI Xin-Min, YANG Ming-Yan, LV Jia-Jia, WU Qing, YUAN Ze-Li*

(School of Pharmacy, Zunyi Medical University, Zunyi 563000, China)

ABSTRACT: Fluorescence probe technology refers to a technical means of labeling the substance to be measured with fluorescence probe, enabling qualitative and quantitative analysis of the measured substance. Fluoride ion is one of the important trace elements in human body, proper intake of fluoride ion can help prevent tooth decay and osteoporosis, while excessive intake of fluoride ion can cause a variety of diseases. Therefore, it is of great significance to develop fluorescence probes that can detect fluoride ions in organisms. The latest scientific research results were converted into comprehensive designing experiment “the synthesis of fluorescence probe and detection of fluorine ions in aqueous phase”. Through the implementation of the experiment, the students’ ability of organic synthesis, the operation of optical analytical instruments and the analysis of experimental data will be greatly improved.

KEY WORDS: fluorescence probe; fluoride ion; comprehensive design experiment

0 引言

药学综合实验是为药学类专业开设的一门系统的综合性实

验课程。围绕药物分子开发实践过程, 设置多个学科的实验内容, 突出体现药学多学科相互交叉渗透、相互融合的特点, 完整串联药学专业的相关基本知识和实验操作技能, 着重于综合

基金项目: 遵义医科大学教育教学改革计划项目 (XJJG2018-06-088); 贵州省高等学校金师及金课建设项目

Fund: Supported by Educational reform program of Zunyi Medical University (XJJG2018-06-088) and Golden Course project of Guizhou Province

* 通信作者: 袁泽利, 博士, 教授, 研究方向为荧光探针开发工作。E-mail: zlyuan@zmu.edu.cn

*Corresponding author: YUAN Ze-Li, Ph.D, Professor, Zunyi Medical University, Zunyi 563000, China. E-mail: zlyuan@zmu.edu.cn

实验设计能力训练, 培养学生的动手能力和科研意识。离子化合物广泛存在于生物系统中, 参与物质运输、能量转换、信息传递和代谢调节等诸多关键生化过程, 因此生物体内的离子分析在药学及医学领域具有重要价值^[1-3]。基于药学综合实验的特点, 设计合成一种有机化合物并可以实现细胞内离子的分析检测, 既能训练学生的有机合成能力、又能融合分析化学、仪器分析以及生物化学的知识, 充分体现了药学综合实验的相互融合特点^[4]。

氟离子(F^-)是重要的微量元素之一, 人体适当摄入 F^- 有助于预防蛀牙和骨质疏松症^[1]。然而, 过量摄入 F^- 会使骨骼和牙齿钙化, 导致氟斑牙、氟骨症、尿石症和肾衰竭等疾病, 因此开发简单高效的 F^- 检测方法具有重要意义^[5-6]。目前已存在几种分析技术, 包括 ^{19}F NMR、离子色谱法、反相高效液相色谱、离子选择电极、原子吸收光谱和分子吸收光谱、质谱等可用于 F^- 的定量测定^[7]。然而, 以上方法存在一定具有局限性, 与以上方法相比, 荧光探针检测技术具有操作简单、实验成本低、选择性高、检测限低和灵敏度高优势, 并且还可以应用于细胞中的 F^- 活成像^[8]。但由于 F^- 具有电负性强及亲核性强、易于与水形成强氢键的能力, 使 F^- 在水相和生物体系中的检测较为困难^[9]。氟化硼二吡咯(简称BODIPY)是一种常见的有机荧光染料。分子母体结构包括两个五元吡咯环和一个六元杂环, 两侧的吡咯环在络合的硼桥键和甲川桥键的共同作用下固定于同一个平面上处于极好的共轭状态, 因此BODIPY类荧光染料不仅光学性能优良而且具有良好的稳定性^[10]。基于此背景以及结合教师的最新科研成果, 设计一个有机化学与分析化学结合的综合性实验“荧光分子探针的合成及水相中氟离子检测”, 构建以氟化硼二吡咯(BODIPY)为母核的近红外荧光探针分子, 将其用于水相中的氟离子检测, 实现教学与科研的深度融合。

1 材料与方法

1.1 实验仪器

磁力搅拌器(巩义市予华仪器有限责任公司)、旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂)、微波反应器(美国CEM公司)、核磁共振仪(德国布鲁克公司)、紫外-可见分光光度计(北京谱析仪器公司)、荧光分光光度计(美国Agilent公司)、电子分析天平(上海菁海仪器有限公司)、超纯水制水器(杭州泽南科技有限公司)。

1.2 实验试剂

实验所用试剂均为分析纯, 购自萨恩化学技术(上海)有限公司, 包括哌啶、冰醋酸、甲苯、无水二氯甲烷、乙酸钠、十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)、4-羟乙基哌啶乙磺酸(HEPES)、二甲基亚砜、乙酸乙酯、石油醚、二氯甲烷、二甲基亚砜、PBS。

1.3 荧光探针分子的合成

荧光探针分子合成路线如图1所示: 将BODIPY-1(151.83 mg, 0.3 mmol), N, N-二乙基-4-氨基苯甲醛(63.81 mg, 0.36 mmol), 哌啶(0.76 mL), 冰醋酸(0.76 mL)和20 mL干燥的甲苯加入50 mL微波玻璃反应管中。混合物在功率200 W, 温度190°C反应条件下, 在微波仪中反应30分钟。反应结束后浓缩得粗产品, 经硅胶柱层析提纯, 用15/1(v/v)二氯甲烷/石油醚洗脱, 得到蓝色粉末(85.00 mg, 收率42%)。

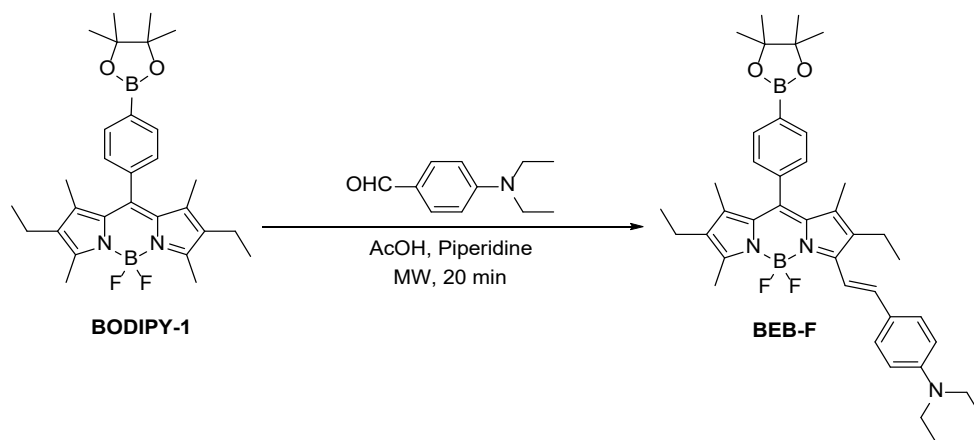


图1 荧光探针分子的合成步骤

Fig.1 The synthesis route of probe

1.4 荧光探针分子 BEB-F 光谱性质测试

1.4.1 探针储备液的配制

使用电子分析天平准确称取一定量的探针 BEB-F 溶解于 1 mL 二甲基亚砜(Dimethyl sulfoxide, DMSO)中, 使 BEB-F

的最终浓度为 3 mM 备用。

1.4.2 待测物储备液配制

使用电子分析天平准确称取一定量的四丁基氟化铵(TBAF), 使用去离子水稀释到最终浓度为 30 mM 备用。

1.4.3 浓度滴定与检测限

向含有 10 μM 探针 BEB-F 的测试体系中加入不同体积的氟离子储备液, 使氟离子最终浓度为 0-120 μM , 反应 0.5 h 后, 测试紫外吸收光谱和荧光发射光谱, 考察 BEB-F 的光谱变化情况。

2 结果与分析

2.1 荧光探针分子的结构表征

利用核磁共振氢谱对荧光探针分子 BEB-F 进行结构表征, 其谱图数据解析如下: $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.89 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H), 7.48 (d, $J = 8.6$ Hz, 3H), 7.31 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H),

7.18 (d, $J = 16.6$ Hz, 1H), 6.66 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 3.39 (d, $J = 9.2$ Hz, 4H), 2.58 (t, $J = 8.1$ Hz, 5H), 2.30 (q, $J = 7.6$ Hz, 2H), 1.40 (s, 12H), 1.27 - 1.25 (m, 6H), 1.19 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H), 1.14 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H), 0.98 (t, $J = 7.5$ Hz, 3H)。

2.2 荧光探针分子对氟离子的荧光响应

在 HEPES (10 mM, $\text{pH} = 7.4$) 缓冲液中, 以 100 μM CTAB 为助剂, 对 BEB-F 与 F^- 响应前后的光谱性质进行测试。如图 2 所示, BEB-F 的最大吸收峰为 630 nm, 在加入 F^- 后该峰略有蓝移。在 600 nm 激发下, 加入 F^- 后在 677 nm 处的荧光强度显著增强。

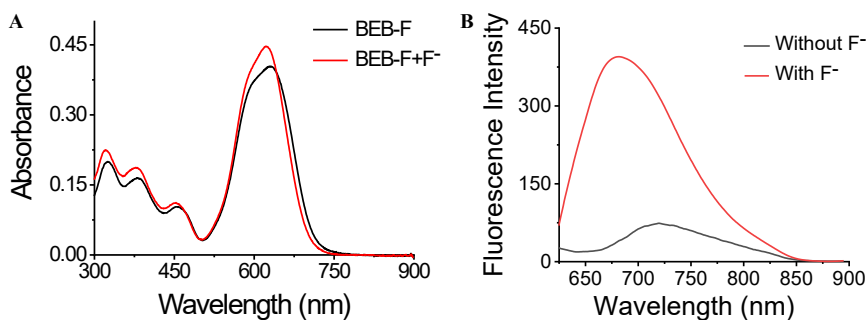


图 2 BEB-F 与 F^- 响应前后的吸收光谱 (A) 和荧光光谱 (B)。

Fig.2 Absorption spectra (A) and fluorescence spectra (B)

2.3 BEB-F 的浓度滴定与检测限

为了进一步研究 BEB-F 和 F^- 之间的相互作用, 进行了荧光滴定实验。如图 3 所示, 探针 BEB-F 的荧光强度随 F^- 浓度的升高呈现线性增强, F^- 浓度 (x) 与荧光强度 (F) 之间的关

系如下: $F = 33.99 + 3.61x$ (相关系数 $R^2 = 0.9850$), 检测限 (Limit of detection, LOD) 为 231 nM F^- , 结果表明探针 BEB-F 可以有效地在水溶液中检测 F^- 。

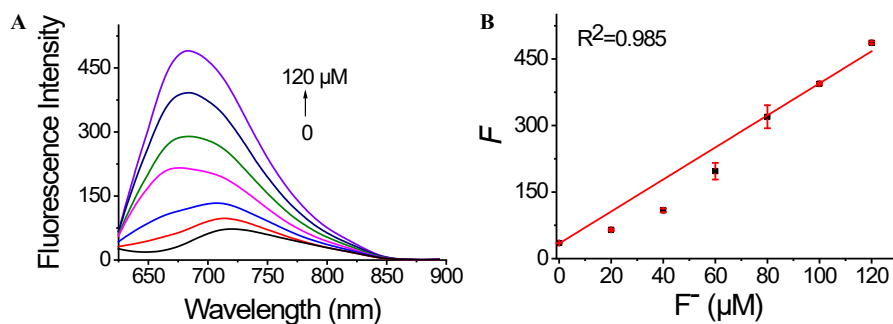


图 3 (A) BEB-F 与不同浓度 F^- 响应后的荧光光谱。

(B) 响应后荧光强度与 F^- 浓度的线性关系。

Fig.3 (A) Fluorescence response of the probe toward F^- at varied concentrations.

(B) Linear fitting curve of F against the concentration of F^- .

3 讨论与结论

3.1 荧光分子探针合成收率的影响因素

荧光分子探针的合成策略是利用 Knoevenagel 缩合反应合成最终产品, 该策略的特点是利用微波反应仪进行反应。经典的 Knoevenagel 缩合反应时间为 12 小时以上, 利用微波反应

仪可以将反应时间缩短为 30 分钟。该反应的收率为 42%, 反应收率低的原因可能由于几个方面导致, 包括称量错误导致 N, N-二乙基-4-氨基苯甲醛的量降低而影响产品收率; 使用未除水处理的甲苯导致产品收率低; 反应时间较短导致原料消耗不完, 或者反应时间过长导致副产物增多。其中最容易出现的问题是柱层析分离过程中, 由于流动相选择错误导致副产物与主

产物无法分离, 导致产品产量与纯度均有较大程度降低。

3.2 氟离子探针响应的机制分析

推测由于硼酸酯基团中硼原子具有空的 p 轨道, 而 F^- 具有较强亲核性, 因此 F^- 可能进入硼的空轨道而形成氟硼酸盐, 使硼原子从 sp^2 杂化变为 sp^3 杂化, 从而打破硼中心与芳香基团之间的 $p-\pi$ 共轭, 导致探针分子的光谱性质发生变化。需要通过 ^{11}B NMR 对 BEB-F 与 F^- 的反应情况进行研究, 经过核磁共振谱的分析, BEB-F 中的硼酸酯基团在 21.65 ppm 处呈现单峰, 在与 F^- 响应后该单峰蓝移至 4.37 ppm 处, 这进一步验证了 sp^2 杂化的硼酸酯基团转变为 sp^3 杂化的氟硼酸盐。

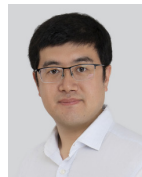
3.3 结论

本实验是在教师科研课题“氟离子荧光探针的构建与应用”转化成的综合性实验。将科学研究前沿和热点检测技术引入教学实践, 不仅有利于加深学生对荧光探针发光原理与荧光性质之间关系的理解, 更能拓展专业知识, 激发学生的实验兴趣。实验过程中学生需要利用有机合成方法构建荧光探针分子, 然后操作紫外可见光谱仪、荧光分光光度计完成探针分子的光谱学研究以及氟离子响应的测试, 因此也涵盖仪器分析、荧光性质表征等丰富的知识内容, 综合性较强。本实验可作为高年级综合实验开设, 有助于培养学生的研究兴趣以及独立思考解决问题的能力。

参考文献

- [1] 董向辉, 姜宾, 吕媛媛, 等. 低氟饮水对饮水型地氟病区氟骨症患者骨密度的影响分析 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2020, 26(11): 1664-1667.
- [2] 卢丽, 吴亮, 陈珺, 等. 钠离子对成骨细胞的影响及其与上皮钠通道的关系 [J]. 南方医科大学学报, 2011, 31(11): 1871-1874.
- [3] 赵娴, 曾锦, 左东川, 等. 钙离子对人牙囊细胞增殖、迁移和成骨分化的影响 [J]. 上海口腔医学, 2019, 28(06): 572-577.
- [4] LIU Y, ZHOU Y, LI H, *et al.* Near-infrared turn-on fluorescent probe for aqueous fluoride ion detection and cell imaging [J]. ACS Omega, 2022, 7, 34317-34325.
- [5] 张伯友, 高静, 叶红兵, 等. 2022 年贵州省 7 个县 (区) 地方性氟骨症患者调查 [J]. 微量元素与健康研究, 2024, 41(02): 49-50.
- [6] 杨世榕, 刘纯, 丁琪, 等. 饮水型慢性氟中毒大鼠硬组织氟蓄积的对比研究 [J]. 环境与职业医学, 2022, 39(02): 174-178.
- [7] 韩晓鸥, 余波, 刘顺鑫, 等. 固相萃取-离子色谱法测定人尿液中钙、镁、氟、磷酸根离子 [J]. 化学分析计量, 2022, 31(07): 48-52.
- [8] 曲衍杰, 李亚军, 鲍红丽. 反应型氟离子探针的研究进展 [J]. 有机化学, 2023, 43(03): 809-825.
- [9] 董萍, 李丹, 文兴莲, 等. 快速响应氟离子反应型荧光探针的设计合成与光谱学研究 [J]. 化学研究与应用, 2023, 35(01): 66-74.
- [10] 马翠云, 罗海澜, 张福华, 等. 3-Pyrrolyl BODIPY 的绿色生物合成、光物理性质及应用研究 [J]. 有机化学, 2024, 44(01): 216-223.

作者简介



李新民, 副教授, 主要研究方向为荧光探针开发工作。



袁泽利, 博士, 教授, 研究方向为荧光探针开发工作。