



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 115232120 B

(45) 授权公告日 2023. 09. 05

(21) 申请号 202110443627.4

(22) 申请日 2021.04.23

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 115232120 A

(43) 申请公布日 2022.10.25

(73) 专利权人 香港理工大学深圳研究院
地址 518057 广东省深圳市南山区高新园
南区粤兴一道18号香港理工大学产学
研大楼205室

(72) 发明人 黄文健 邓杰仁 薛凯怡 余琼
柯子斌 陈颖祥

(74) 专利代理机构 深圳中一专利商标事务所
44237
专利代理师 高星

(51) Int. Cl.

G07D 455/03 (2006.01)

G09K 11/06 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 107964257 A, 2018.04.27

CN 104177357 A, 2014.12.03

US 2010256378 A1, 2010.10.07

US 2021048393 A1, 2021.02.18

WO 2021015544 A1, 2021.01.28

Deng, Jie-Ren 等. Photosensitizer-free visible light-mediated gold-catalyzed cis-difunctionalization of silyl-substituted alkynes. Chemical Science. 2017, 第8卷(第11期), 第7537-7544页.

审查员 刘晓旭

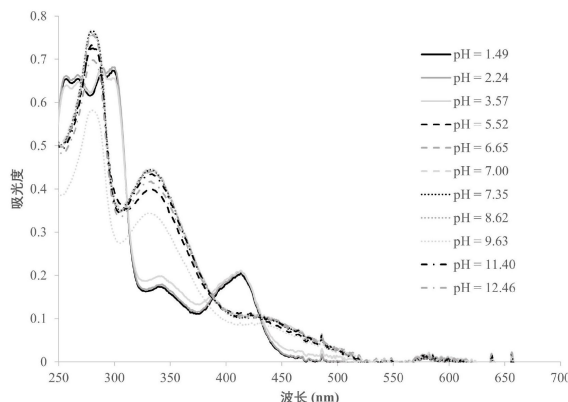
权利要求书2页 说明书16页 附图10页

(54) 发明名称

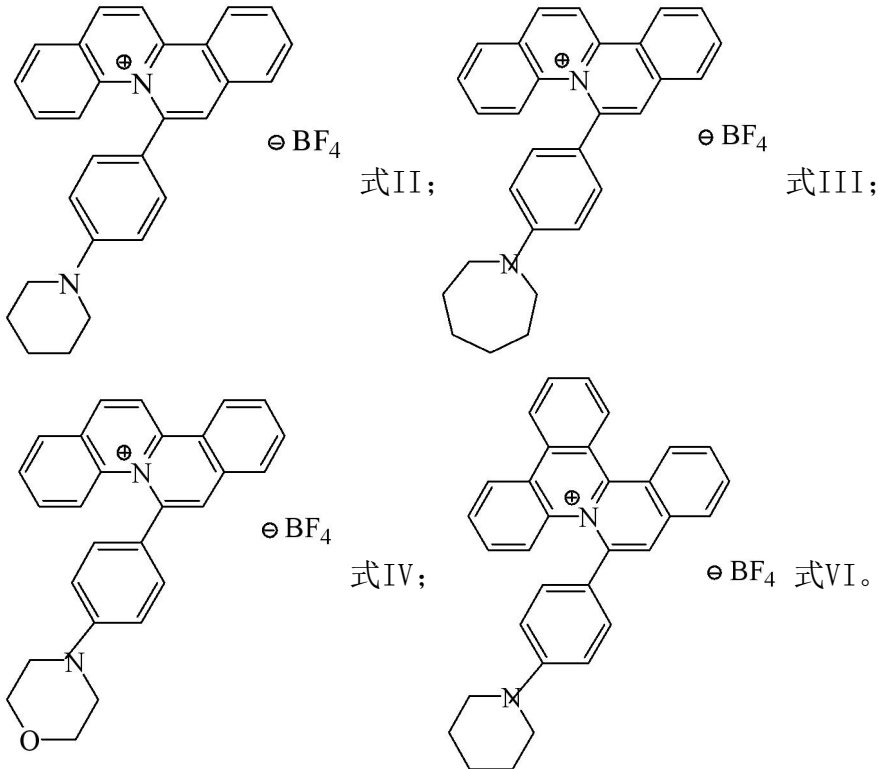
pH荧光探针及其合成方法与应用

(57) 摘要

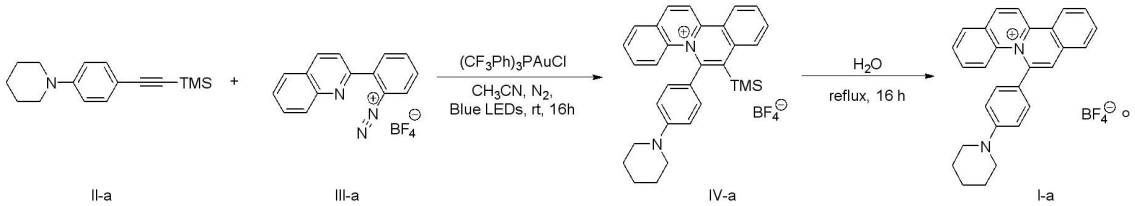
本申请涉有机小分子荧光探针技术领域, 提供了一种pH荧光探针, 其包括喹啉鎓离子为骨架, 通过碳碳单键与喹啉鎓离子骨架结构相连的对叔氨基苯基以及抗衡离子; 该pH荧光探针在pH为4~7的变化范围内荧光强度变化非常明显, 其荧光强度随pH的降低而逐渐增强; 此外, 该化合物的分子结构以410nm为激发波长, 其最大发射波长为478-509nm; 且化合物的分子结构具有特殊的穿透性, 能穿过细胞膜, 但不能穿透细胞核膜, 故可以选择性地标记在亚细胞层次的特殊位置; 同时其具有较大的斯托克位移, 可以降低信噪比, 适合广泛应用于细胞内外弱酸性环境pH的检测。



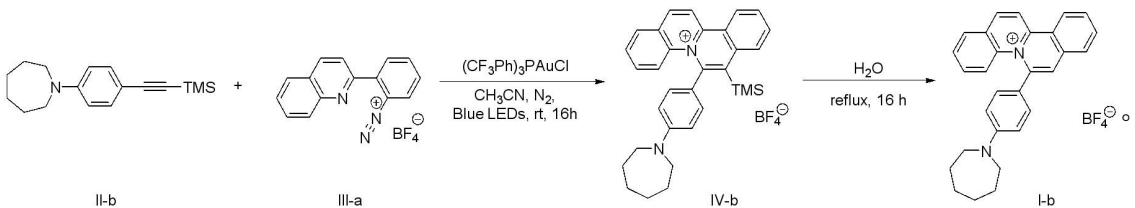
1. 一种pH荧光探针,其特征在于,所述pH荧光探针为如下结构式的化合物:



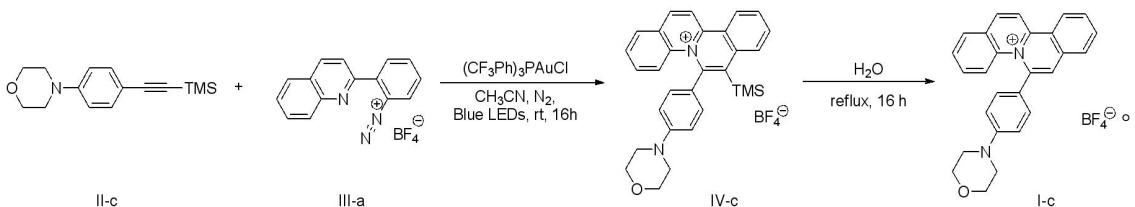
2. 一种如权利要求1所述的式II所示的pH荧光探针的制备方法如以下反应式所示,



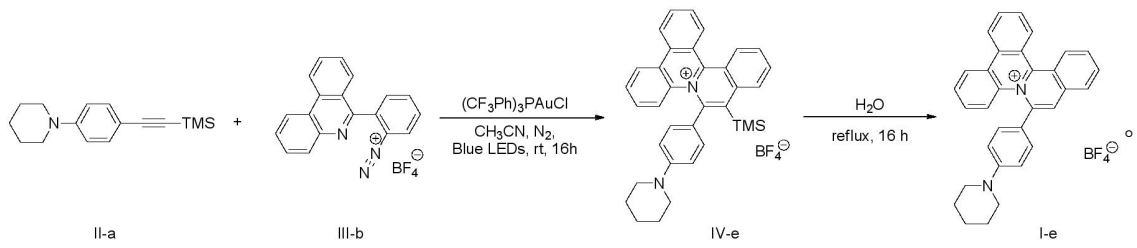
3. 一种如权利要求1所述的式III所示的pH荧光探针的制备方法如以下反应式所示,



4. 一种如权利要求1所述的式IV所示的pH荧光探针的制备方法如以下反应式所示,



5. 一种如权利要求1所述的式VI所示的pH荧光探针的制备方法如以下反应式所示,



6. 根据权利要求1所述的pH荧光探针或者由权利要求2~5任一所述的制备方法制备的pH荧光探针在非诊断目的的pH的荧光定性检测中的应用。

pH荧光探针及其合成方法与应用

技术领域

[0001] 本申请属于有机小分子荧光探针技术领域,尤其涉及一种pH荧光探针及其合成方法与应用。

背景技术

[0002] 氢离子是人体内最重要的离子之一,在细胞和细胞器内众多的生理过程中发挥了重要作用,比如:离子运输、细胞增殖和凋亡、内吞作用、多重耐药、细胞黏附、肌肉收缩等,因此维持pH平衡对人体健康至关重要。通常pH的细微变化可能会导致许多功能障碍,如膜收缩力破坏、蛋白质变性、酶功能异常和自由基生成失败等。例如,溶菌酶在pH为4.5-5.5环境下可能会导致细胞代谢中蛋白质的降解。同时pH也与许多严重的神经系统退行性疾病、癌症和心肺疾病密切相关。如肿瘤在发展过程中,会出现缺氧,使得细胞内外造成酸中毒,从而表现出pH降低,最终导致异常的细胞活动。所以,实时精确且快速地检测人体细胞内外的pH值对研究人体的生理病理过程和疾病的诊断都具有重要意义。

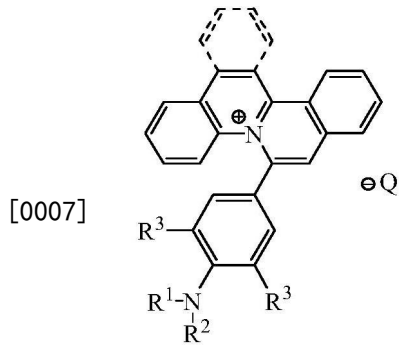
[0003] 相对于微电极、核磁共振波谱法(NMR)、吸光光谱法这些检测生物样品pH值方法,荧光光谱法具有独特的优势:操作简单、高选择性、高灵敏度、可实时检测、成本低、不受外界电磁场影响,且大多数情况下对细胞无害。pH荧光分子探针通常由三部分组成:荧光基团,连接基团,还有识别基团。未结合质子之前,探针分子不发射荧光,或荧光很弱,一旦识别基团与质子作用,分子中抑制荧光的条件消失,荧光团发出强烈的荧光,从而实现检测pH的目的。目前开发的pH荧光探针中常用的荧光基团有荧光素(Fluorescein)、罗丹明(Rhodamine)、香豆素(Coumarin)、氟硼荧(BODIPY)及花青素(Cyanine)等。此类荧光基团大部分本身无法选择标记的细胞器,需要另外连接靶向基团,再辅之以检测的识别基团,分子探针的合成步骤会变得较为复杂,其合成成本也较高。另外,因为难以简单改变其发光波长,要实现同时检测不同种分子或同结构分子在不同细胞器中的过程变得较为困难。而且这些荧光探针上的荧光基团存在一些不足之处:次优激发和发射波长、光漂白、光谱变化微弱等。因此,由于现有技术的pH荧光探针发光波长不可调节,不具有靶向作用,影响了pH荧光探针的广泛应用。

发明内容

[0004] 本申请的目的在于提供一种pH荧光探针及其合成方法与应用,旨在解决现有技术中pH荧光探针发光波长不可调节且不具有靶向作用的问题。

[0005] 为实现上述申请目的,本申请采用的技术方案如下:

[0006] 第一方面,本申请提供一种pH荧光探针,包括喹啉鎓离子为骨架,通过碳碳单键与喹啉鎓离子骨架结构相连的对叔氨基苯基以及抗衡离子,所述pH荧光探针的结构通式如式I所示,



式 I,

[0008] 其中, R^1 和 R^2 各自独立地选自哌啶、环己亚胺、吗啉、甲基中的任意一种, R^3 选自氢或甲基, Q 选自四氟硼酸根、六氟磷酸根、高氯酸根、六氟合锑、三氟甲磺酸根离子中的任意一种。

[0009] 第二方面, 本申请提供一种pH荧光探针的制备方法, 包括如下步骤:

[0010] 提供第一化合物, 所述第一化合物的结构通式为

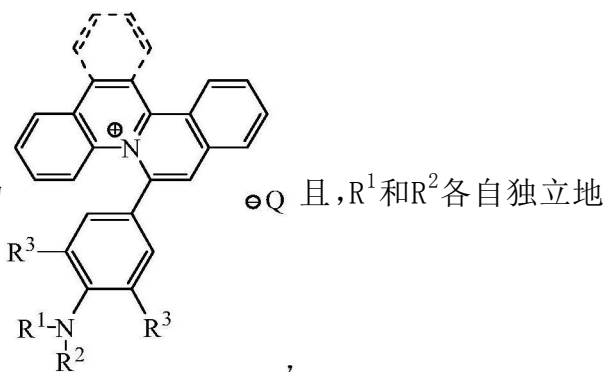
[0011] 提供第二化合物, 所述第二化合物的结构通式为

[0012] 在惰性气氛下, 将所述第一化合物和所述第二化合物溶于有机溶剂中, 以一价金配合物作为催化剂, 进行催化加成反应, 再进行第一纯化处理, 得到第三化合物, 所述第三

化合物的结构通式为

[0013] 将所述第三化合物进行回流处理, 再进行第二纯化处理, 得到pH荧光探针,

[0014] 其中,所述pH荧光探针的结构通式为



选自哌啶、环己亚胺、吗啉、甲基中的任意一种, R^3 选自氢或甲基, Q 选自四氟硼酸根、六氟磷酸根、高氯酸根、六氟合锑、三氟甲磺酸根离子中的任意一种。

[0015] 第三方面,本申请提供一种pH荧光探针或者由所述的制备方法制备的pH荧光探针在pH的荧光定性检测中的应用。

[0016] 本申请第一方面提供的pH荧光探针,pH荧光探针的结构通式如式I所示,pH荧光探针包括喹啉鎓离子为骨架,通过碳碳单键与喹啉鎓离子骨架结构相连的对叔氨基苯基以及抗衡离子,其中,还包括 R^1 、 R^2 、 R^3 三个取代基;通过改变结构通式上的取代基的种类,使二烷基氨基和苯基之间形成不同的位阻效应,进而改变取代基的给电子能力,可选择性地调整分子的发光波长和pKa值,进而达到pH的荧光定性检测。在荧光定性检测过程中,当pH大于7时,pH荧光探针为无荧光的,即探针中的荧光团喹啉鎓离子骨架是被淬灭的,随着pH减小,氨基作为pH荧光探针的敏感基团,叔氨基苯基中二烷基氨基的氮原子发生质子化,形成季铵盐离子,喹啉鎓离子骨架荧光恢复,从而实现了荧光发光的效果,该pH荧光探针在pH为4~7的变化范围内荧光强度变化非常明显,其荧光强度随pH的降低而逐渐增强;此外,该化合物的分子结构以410nm为激发波长,其最大发射波长为478-509nm;且化合物的分子结构具有特殊的穿透性,能穿过细胞膜,但不能穿透细胞核膜,故可以选择性地标记在亚细胞层次的特殊位置;同时其具有较大的斯托克位移,可以降低信噪比,该pH荧光探针可根据取代基的不同调节发光波长,同时基于其分子结构具有一定的靶向作用,适合广泛应用于细胞内外弱酸性环境pH的检测。

[0017] 本申请第二方面提供的pH荧光探针的制备方法,该制备方法以两种小分子化合物为反应物,在一价金催化剂的作用下进行催化加成反应,再进行回流和纯化处理,该制备方法可以有效、快速得到pH荧光探针,该制备方法原料易得,反应过程简单方便,操作步骤简单,反应速率高,能够有效提高其生产效率,降低生产成本。

[0018] 本申请第三方面提供的pH荧光探针或者由所述的制备方法制备的pH荧光探针在pH的荧光定性检测中的应用。由于该pH荧光探针可根据取代基的不同调节发光波长,同时基于其分子结构具有一定的靶向作用,适合广泛应用于细胞内外弱酸性环境pH的检测,因此,得到的pH荧光探针在pH的荧光定性检测中检测灵敏度高,效果佳,有利于广泛应用。

附图说明

[0019] 为了更清楚地说明本申请实施例中的技术方案,下面将对实施例或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图仅仅是本申请的一些实施例,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据这些附

图获得其他的附图。

[0020] 图1为本发明实施例1得到的pH荧光探针II随pH值变化的紫外吸收光谱图。

[0021] 图2为本发明实施例1得到的pH荧光探针II的荧光强度随pH值变化曲线。

[0022] 图3为本发明实施例2得到的pH荧光探针III随pH值变化的紫外吸收光谱图。

[0023] 图4为本发明实施例2得到的pH荧光探针III的荧光强度随pH值变化曲线。

[0024] 图5为本发明实施例3得到的pH荧光探针IV随pH值变化的紫外吸收光谱图。

[0025] 图6为本发明实施例3得到的pH荧光探针IV的荧光强度随pH值变化曲线。

[0026] 图7为本发明实施例4得到的pH荧光探针V随pH值变化的紫外吸收光谱图。

[0027] 图8为本发明实施例4得到的pH荧光探针V的荧光强度随pH值变化曲线。

[0028] 图9为本发明实施例5得到的pH荧光探针VI随pH值变化的紫外吸收光谱图。

[0029] 图10为本发明实施例5得到的pH荧光探针VI的荧光强度随pH值变化曲线。

[0030] 图11为本发明实施例1得到的pH荧光探针II的荧光强度在测试波长478nm处不同pH值下的荧光强度图。

[0031] 图12为本发明实施例2的pH荧光探针III的荧光强度在测试波长478nm处不同pH值下的荧光强度图。

[0032] 图13为本发明实施例3的pH荧光探针IV的荧光强度在测试波长476nm处不同pH值下的荧光强度图。

[0033] 图14为本发明实施例4的pH荧光探针V的荧光强度在测试波长482nm处不同pH值下的荧光强度图。

[0034] 图15为本发明实施例5的pH荧光探针VI的荧光强度在测试波长509nm处不同pH值下的荧光强度图。

[0035] 图16为本发明实施例1得到的5 μ M至25 μ M的pH荧光探针II与HeLa细胞孵育后的细胞成像图。

[0036] 图17为本发明实施例1得到的pH荧光探针II的IC₅₀图。

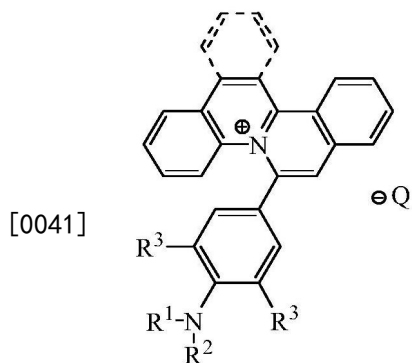
[0037] 图18为本发明HeLa细胞与pH荧光探针II或与pH荧光探针II、50nM LysoTracker®深红(Invitrogen™)孵育后的细胞成像图。

[0038] 图19为本发明pH荧光探针II和伴刀豆霉素A处理的细胞成像图。

具体实施方式

[0039] 为了使本申请要解决的技术问题、技术方案及有益效果更加清楚明白,以下结合实施例,对本申请进行进一步详细说明。应当理解,此处所描述的具体实施例仅仅用以解释本申请,并不用于限定本申请。

[0040] 本申请实施例第一方面提供一种pH荧光探针,包括喹啉鎓离子为骨架,通过碳碳单键与喹啉鎓离子骨架结构相连的对叔氨基苯基以及抗衡离子,pH荧光探针的结构通式如式I所示,



[0042] 其中, R^1 和 R^2 各自独立地选自哌啶、环己亚胺、吗啉、甲基中的任意一种, R^3 选自氢或甲基, Q 选自四氟硼酸根、六氟磷酸根、高氯酸根、六氟合锑、三氟甲磺酸根离子中的任意一种。

[0043] 本申请第一方面提供的pH荧光探针, pH荧光探针的结构通式如式I所示, pH荧光探针以喹啉鎓离子为骨架, 包括通过碳碳单键与喹啉鎓离子骨架结构相连的对叔氨基苯基以及抗衡离子, 其中, 还包括 R^1 、 R^2 、 R^3 三个取代基; 通过改变结构通式上的取代基的种类, 使二烷基氨基和苯基之间形成不同的位阻效应, 进而改变取代基的给电子能力, 可选择性地调整分子的发光波长和 pK_a 值, 进而达到pH的荧光定性检测。在荧光定性检测过程中, 当pH大于7时, pH荧光探针为无荧光的, 即探针中的荧光团喹啉鎓离子骨架是被淬灭的, 随着pH减小, 氨基作为pH荧光探针的敏感基团, 叔氨基苯基中二烷基氨基的氮原子发生质子化, 形成季铵盐离子, 喹啉鎓离子骨架荧光恢复, 从而实现了荧光发光的效果, 该pH荧光探针在pH为4~7的变化范围内荧光强度变化非常明显, 其荧光强度随pH的降低而逐渐增强; 此外, 该化合物的分子结构以410nm为激发波长, 其最大发射波长为478-509nm; 且该化合物的分子结构具有特殊的穿透性, 能穿过细胞膜, 但不能穿透细胞核膜, 故可以选择性地标记在亚细胞层次的特殊位置; 同时其具有较大的斯托克位移, 可以降低信噪比, 该pH荧光探针可根据取代基的不同调节发光波长, 同时基于其分子结构具有一定的靶向作用, 适合广泛应用于细胞内外弱酸性环境pH的检测。

[0044] pH荧光探针的pH值检测范围能够从 pK_a 反映, pK_a 值是酸的电离常数(K_a)的负对数, 因此它表示pH值, 在该pH值下, 酸的浓度和分子的共轭碱形式相同。 K_a 是指溶液中酸形式的强度, 是酸离解反应的平衡常数。所以, 如果分子的酸形式强, 则 K_a 较小, 酸相对难以解离, 故导致较大的 pK_a 。 pK_a 值揭示了分子捐赠质子所需的pH值, 即: 如果pH荧光探针的质子化更有利, 酸形式难以解离, 则 K_a 较小, pK_a 较大, 则pH值检测范围越偏向高pH值范围, 反之亦然。

[0045] 具体的, 所提供的pH荧光探针的结构通式以喹啉鎓离子为骨架, 所提供的pH荧光探针的结构通式包括通过碳碳单键与喹啉鎓离子骨架结构相连的对叔氨基苯基。其中, pH荧光探针的荧光强度的显著增加是由于叔氨基苯基中二烷基氨基的氮原子的质子化。二烷基氨基是供电子基团, 在光激发时通过从其HOMO转移电子到受激发荧光探针的半填充HOMO上而引起荧光猝灭。结果, 在探针的中性形式下, 荧光在光诱导电子转移(PET)时被胺淬灭。当质子浓度增加而pH值达到 pK_a 值时, 氨基的质子化作用导致其向激发的荧光染料的HOMO

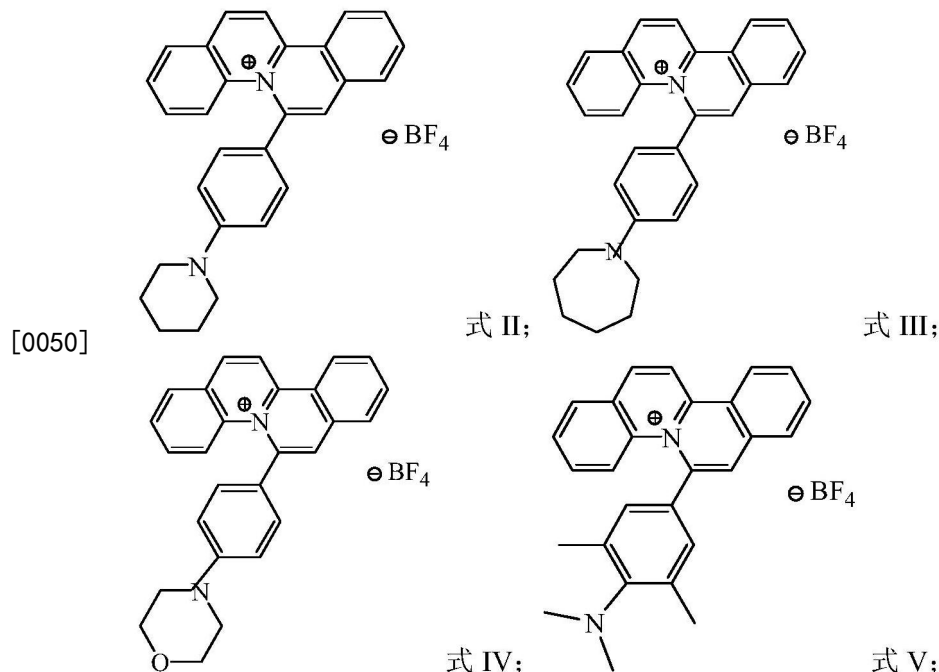
供电子的能力降低,因此荧光强度随着增加。因此,pH荧光探针的响应性与二烷基氨基的氮原子的质子化的容易性相关,其为pKa值,故二烷基氨基的质子化越容易,获得的pKa值越高。

[0046] 具体的,pH荧光探针的结构通式I中, R^1 和 R^2 各自独立地选自哌啶、环己亚胺、吗啉、甲基中的任意一种, R^3 选自氢或甲基。二烷基氨基的氮原子的质子化程度会因应叔氨基苯基的不同构象而有不同的影响,几何结构越趋向平面型则越难质子化。叔氨基苯基的构象会根据 R^1 、 R^2 、 R^3 三个取代基的种类不同,使二烷基氨基和苯基之间形成不同的位阻效应,不同的位阻效应使氮原子的几何结构趋向三角锥(sp^3 杂化)或平面(sp^2 杂化)。因此,pH荧光探针的结构通式中,需要同时控制 R^1 、 R^2 、 R^3 三个取代基的种类,才能确定形成的几何结构是趋向三角锥型或是平面型,进而判断其二烷基氨基的质子化的程度,并明确得到的pKa值。

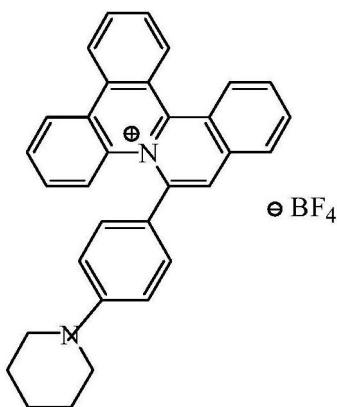
[0047] 其中,当 R^1 和 R^2 选自环己亚胺, R^3 选自氢;得到的pH荧光探针的结构通式中,叔氨基苯基的几何结构更接近于平面(sp^2 杂化)时,位阻效应对共振的作用较小,因此氮原子的孤偶电子对与芳环的共振作用较大,氮原子与芳环之间较强的共振相互作用使共轭性更好,使氮原子和芳环之间更强的共振相互作用导致二烷基氨基拥有更强的供体强度。氮原子与芳族环较高的共轭性导致二烷基氨基的质子化的难度较高,因此pKa值较低,此时pH值检测范围越偏向低pH值范围。

[0048] 其中,当 R^1 和 R^2 选自哌啶, R^3 选自氢;或当 R^1 选择甲基, R^2 选自甲基, R^3 选自甲基;得到的pH荧光探针的结构通式中,叔氨基苯基的几何结构更接近于三角锥(sp^3 杂化)时,位阻效应对共振的作用较大,因此氮原子的孤偶电子对与芳环的共振作用较小,氮原子与芳环之间较弱的共振相互作用使共轭性较差,使氮原子和芳环之间较差的共振相互作用导致二烷基氨基拥有较差的供体强度。氮原子与芳族环较低的共轭性导致二烷基氨基的质子化的难度较易,因此pKa值较高,此时pH值检测范围越偏向高pH值范围。

[0049] 在一些实施例中,pH荧光探针包括如下结构式的化合物:



[0051]



式 VI。

[0052] 其中,式II中,pH荧光探针的取代基为六元哌啶环,呈椅子构象,哌啶环相对于芳环的扭曲角较大,因此氮原子共轭至芳环的程度很小,并降低了氮原子与芳环之间的共振相互作用。因此,六元哌啶环有利于二烷基氨基的质子化,并导致较高的pKa值。

[0053] 式III中,pH荧光探针的取代基为七元哌啶环,七元环显示较小的扭曲角,从而导致氮原子共轭至芳环的程度更大,并增加了氮原子与芳环之间的共振相互作用。因此,二烷基氨基的质子化较困难,并导致较低的pKa值。

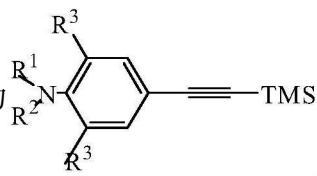
[0054] 式IV中,pH荧光探针的取代基为吗啉,吗啉中氧原子为吸电子基团,趋向将电子吸引至自身,并因此降低了氮原子的碱性。因此,二烷基氨基的质子化较困难,获得了最低的pKa值。

[0055] 式V中,pH荧光探针的取代基为甲基,得到的N,N,2,6-四甲基苯胺中的邻位碳有取代基。N,N,2,6-四甲基苯胺中邻-二甲基基团与二甲氨基基团之间强烈的位阻效应导致二甲氨基基团相对于苯环扭曲出平面,因此,二甲氨基基团的更大扭曲变形降低了氮原子与芳环之间的共振相互作用,并促进了二烷基氨基的质子化,从而获得了最高的pKa值。

[0056] 式VI中,pH荧光探针的喹啉鎓离子骨架为由5个稠合的杂环苯环组成的多环芳烃,取代基为六元哌啶环。跟式II的结构相比,它们之间的区别是式VI的喹啉鎓上有一个额外的苯环。由于式II和式VI的取代基都是六元哌啶环,因此表明其哌啶与苯环之间的共振相互作用是相同的,从而导致相似的pKa值。喹啉鎓上额外苯环的存在不会显著影响哌啶与苯环之间的共振相互作用。取而代之的是,式V的喹啉鎓上存在额外的苯环,扩展了共轭系统,引起长波位移,其中发射波长增加。

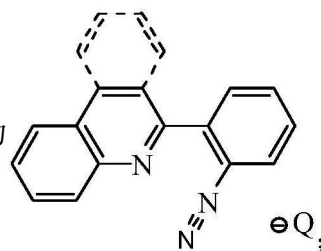
[0057] 本申请实施例第二方面提供一种pH荧光探针的制备方法,包括如下步骤:

[0058] S01. 提供第一化合物,第一化合物的结构通式为

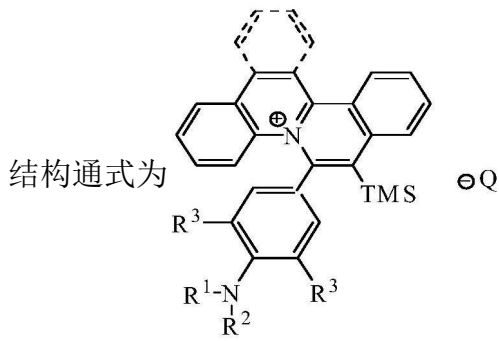


;

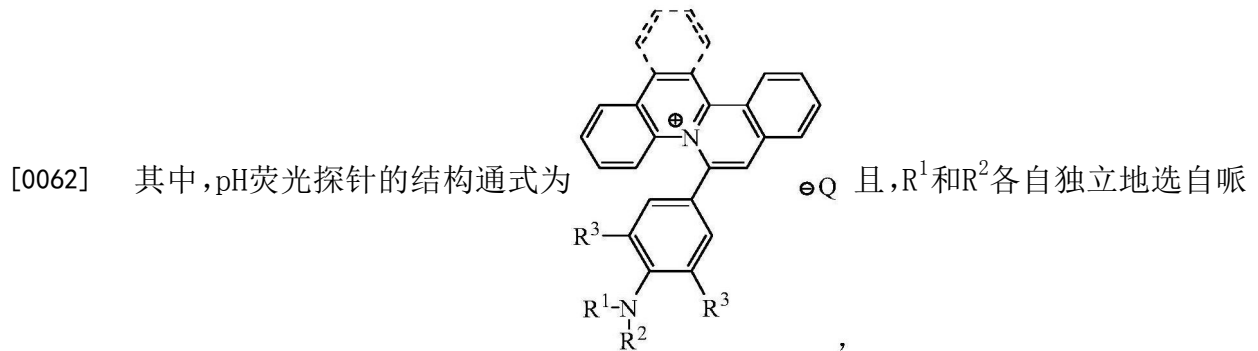
[0059] S02. 提供第二化合物,第二化合物的结构通式为



[0060] S03.在惰性气氛下,将第一化合物和第二化合物溶于有机溶剂中,以一价金配合物作为催化剂,进行催化加成反应,再进行第一纯化处理,得到第三化合物,第三化合物的

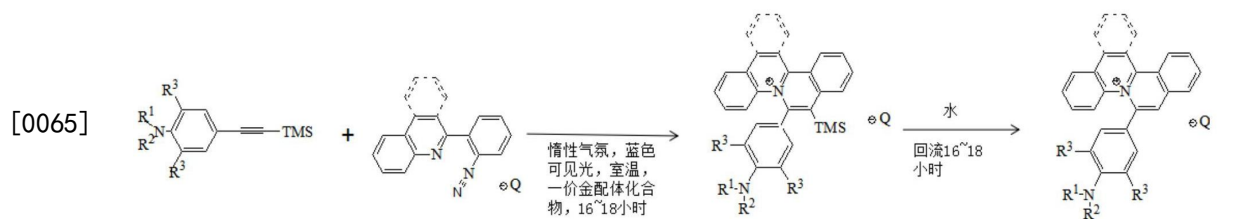


[0061] S04.将第三化合物进行回流处理,再进行第二纯化处理,得到pH荧光探针,

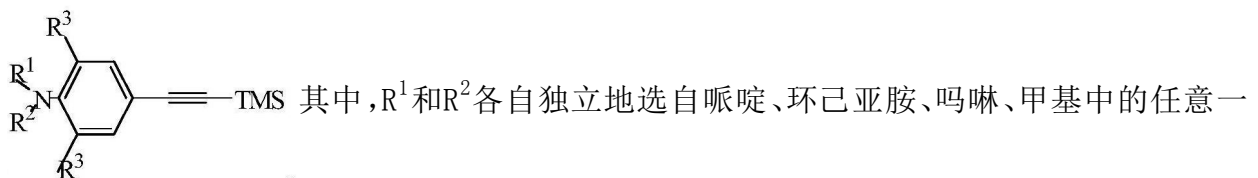


[0063] 本申请第二方面提供的pH荧光探针的制备方法,该制备方法以两种小分子化合物为反应物,在一价金催化剂的作用下进行催化加成反应,再进行回流和纯化处理,该制备方法可以有效、快速得到pH荧光探针,该制备方法原料易得,反应过程简单方便,操作步骤简单,反应速率高,能够有效提高其生产效率,降低生产成本。

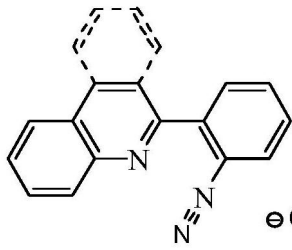
[0064] 其中,该制备方法的整体流程如以下反应方程所示,



[0066] 步骤S01中,提供第一化合物,第一化合物的结构通式如式VII,式VII为



[0067] 步骤S02中,提供第二化合物,第二化合物的结构通式如式VIII,式VIII为

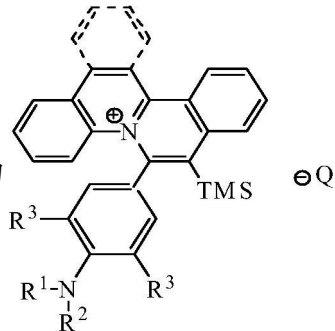


其中, Q选自四氟硼酸根、六氟磷酸根、高氯酸根、六氟合锑、三氟甲

磺酸根离子中的任意一种,其可以通过现有技术文献制备得到。

[0068] 步骤S03中,在惰性气氛下,将第一化合物和第二化合物溶于有机溶剂中,以一价金配合物作为催化剂,进行催化加成反应,再进行第一纯化处理,得到第三化合物,第三化

合物的结构通式为



[0069] 在一些实施例中,在惰性气氛下进行反应,保证得到的产物纯度较高,且保证在反应过程中不会发生氧化等副作用。其中,惰性气氛选自氮气、氦气、氩气、氙气、氪气、氙气、氪气中的任意一种。

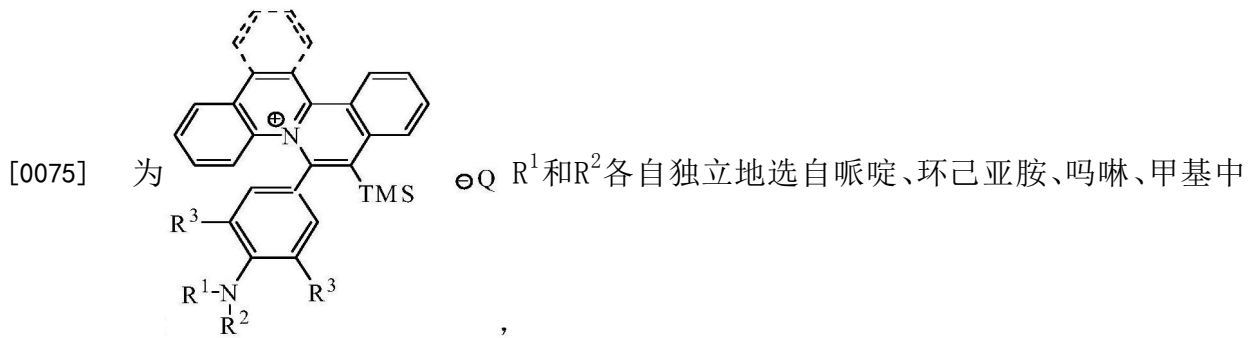
[0070] 在一些实施例中,将第一化合物和第二化合物溶于有机溶剂中,其中,有机溶剂选自乙腈,或有机溶剂选自甲醇、乙醇、丙醇、丁醇、甲苯、氯仿中的至少一种与乙腈的混合溶液。基于相似相容的原理,第一化合物和第二化合物在乙腈溶液中的溶解性高,有利于进行反应,且得到的有机溶剂不会与化合物发生反应。

[0071] 在一些实施例中,以一价金配合物作为催化剂,一价金配合物选自氯[三(对三氟甲基苯基)膦]金(I),采用该一价金配合物能够有效催化反应的进行,提高反应效率。

[0072] 进一步的,为了提高产率,且获得纯度较高的产物,第一化合物、第二化合物和一价金配合物的摩尔比为(1.0~1.5):(1.5~2.0):(0.05~0.1)。更进一步的,第一化合物、第二化合物和一价金配合物的摩尔比为1.0:1.5:0.05,采用该比例进行反应,得到的产物纯度高且产率高。

[0073] 在一些实施例中,进行催化加成反应的步骤中,在室温条件和可见光照射下进行催化加成反应16~18小时,其中,所述可见光选自蓝色光源,且所述蓝色光源的功率 ≥ 3 瓦。通过控制反应的光源以满足以上条件,才能催化加成反应的进行,进而得到相应的产物。进一步的,室温条件下即控制室温温度为10~30 $^{\circ}$ C下进行反应。

[0074] 在一些实施例中,再进行第一纯化处理,第一纯化处理采用硅胶柱层析的方法进行纯化处理。在本发明具体实施例中,第一纯化处理的具体方法如下:将催化加成反应得到的产物进行旋蒸除去有机溶剂,所得残余物;提供硅胶柱,用二氯甲烷和甲醇的混合溶液作为洗脱液进行梯度洗脱,合并旋蒸除去溶剂,加入二氯甲烷后用水进行多次萃取,合并水相,最后旋蒸除去水,得到第三化合物,第三化合物的结构通式如式IX,式IX

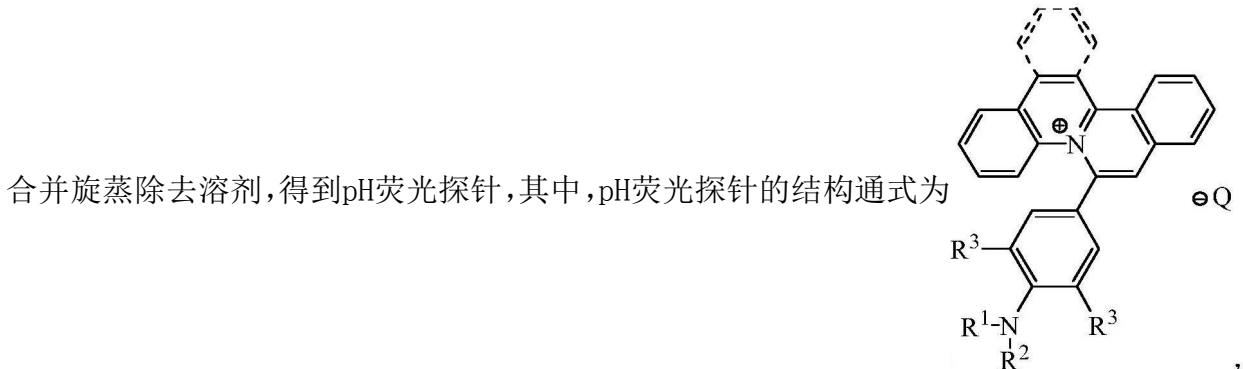


的任意一种, R^3 选自氢或甲基, Q 选自四氟硼酸根、六氟磷酸根、高氯酸根、六氟合锑、三氟甲磺酸根离子中的任意一种。

[0076] 步骤S04中,将第三化合物进行回流处理,再进行第二纯化处理,得到pH荧光探针。

[0077] 在一些实施中,将第三化合物进行回流处理中,包括如下步骤:将第三化合物溶于水中,加热至180~185℃进行回流处理16~18小时。

[0078] 在一些实施例中,进行第二纯化处理,第二纯化处理采用硅胶柱层析的方法进行纯化处理。在本发明具体实施例中,第二纯化处理的具体方法如下:将反应结束后旋蒸除去水,得到的残余物;提供硅胶柱,用二氯甲烷和甲醇的混合溶液作为洗脱液进行梯度洗脱,



且, R^1 和 R^2 各自独立地选自哌啶、环己亚胺、吗啉、甲基中的任意一种, R^3 选自氢或甲基, Q 选自四氟硼酸根、六氟磷酸根、高氯酸根、六氟合锑、三氟甲磺酸根离子中的任意一种。

[0079] 该制备方法利用可见光和催化剂一价金配合物协同进行催化,得到如结构式I的pH荧光探针,该反应方法高效、易控;得到的反应产物纯度高,无其他杂质生成。

[0080] 本申请实施例第三方面提供一种pH荧光探针或者由权利要求3~9任一的制备方法制备的pH荧光探针在pH的荧光定性检测中的应用。

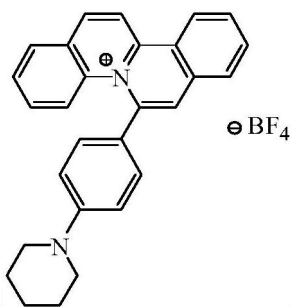
[0081] 本申请第三方面提供的pH荧光探针或者由制备方法制备的pH荧光探针在pH的荧光定性检测中的应用。由于该pH荧光探针可根据取代基的不同调节发光波长,同时基于其分子结构具有一定的靶向作用,适合广泛应用于细胞内外弱酸性环境pH的检测,因此,得到的pH荧光探针在pH的荧光定性检测中检测灵敏度高,效果佳,有利于广泛应用。

[0082] 下面结合具体实施例进行说明。

[0083] 实施例1

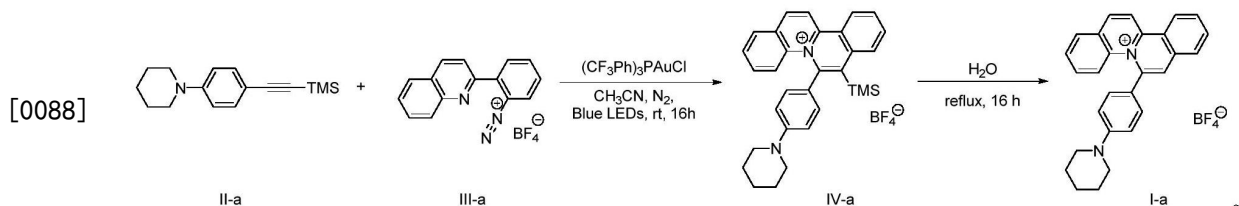
[0084] pH荧光探针II及其制备方法

[0085] pH荧光探针II的结构式为



[0086] pH荧光探针II的制备方法

[0087] pH荧光探针II的制备方法如下反应式所示，



[0089] pH荧光探针II的制备方法包括如下步骤：

[0090] 提供0.5mmol三甲基硅烷,0.6mmol具有喹啉结构的重氮盐；

[0091] 在惰性氮气气氛下,将三甲基硅烷和具有喹啉结构的重氮盐溶于5mL乙腈溶剂中,以 $(CF_3Ph)_3PAuCl$ (0.05mmol) 作为催化剂,在蓝色LED光源照射和室温条件下进行催化加成反应16小时,反应完成后,旋蒸除去有机溶剂,所得残余物,提供硅胶柱,用二氯甲烷和甲醇的混合溶液进行梯度洗脱,合并旋蒸除去溶剂,加入二氯甲烷后用水多次萃取,合并水相,最后旋蒸除去水,得到第三化合物；

[0092] 将得到的第三化合物溶于水中,加热至 $180^{\circ}C$ 回流反应16个小时,减压除去溶剂,提供硅胶柱,用二氯甲烷和甲醇的混合溶液进行梯度洗脱,合并旋蒸除去溶剂,最终得到深红色固体产物pH荧光探针式II,两步产率为22%。

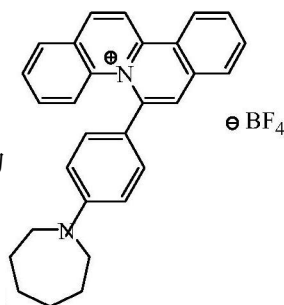
[0093] pH荧光探针II的NMR结果

[0094] 1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) δ 9.41 (d, $J=9.2Hz$, 1H), 9.22 (d, $J=8.6Hz$, 1H), 9.08 (d, $J=9.0Hz$, 1H), 8.52 (s, 1H), 8.38 (d, $J=7.7Hz$, 1H), 8.34 (d, $J=8.1Hz$, 1H), 8.22 (t, $J=7.5Hz$, 1H), 8.08 (t, $J=7.8Hz$, 1H), 7.99 (d, $J=9.0Hz$, 1H), 7.82 (t, $J=7.5Hz$, 1H), 7.60 (t, $J=8.0Hz$, 1H), 7.34 (d, $J=8.6Hz$, 2H), 6.99 (d, $J=8.7Hz$, 2H), 3.29-3.25 (m, 4H), 1.59 (s, 6H) .

[0095] 实施例2

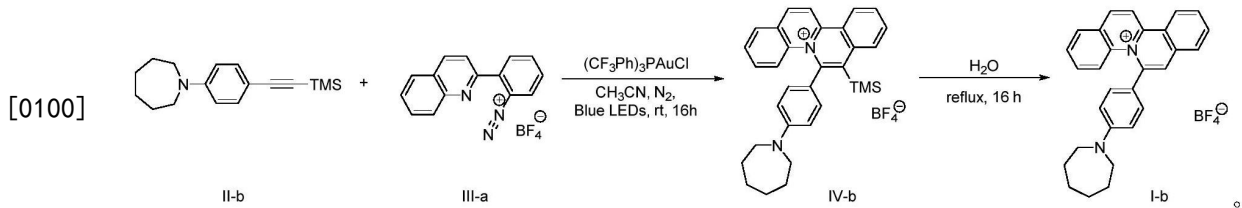
[0096] pH荧光探针III及其制备方法

[0097] pH荧光探针III的结构式为



[0098] pH荧光探针III的制备方法

[0099] pH荧光探针III的制备方法如以下反应式所示，



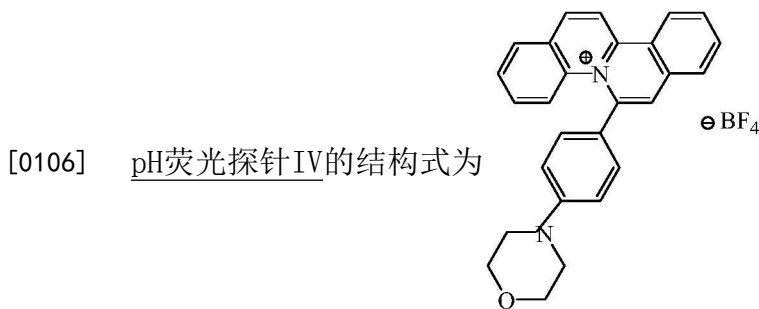
[0101] pH荧光探针III的制备方法的具体操作参见实施例1所示，得到的产物为深红色固体，产率14%。

[0102] pH荧光探针III的NMR结果

[0103] ^1H NMR (400MHz, DMSO-d_6) δ 9.38 (d, $J=9.2\text{Hz}$, 1H), 9.20 (d, $J=8.6\text{Hz}$, 1H), 9.05 (d, $J=9.1\text{Hz}$, 1H), 8.51 (s, 1H), 8.36 (d, $J=7.9\text{Hz}$, 1H), 8.32 (d, $J=8.0\text{Hz}$, 1H), 8.20 (t, $J=7.5\text{Hz}$, 1H), 8.07 (d, $J=7.9\text{Hz}$, 1H), 8.03 (d, $J=8.8\text{Hz}$, 1H), 7.82 (t, $J=7.5\text{Hz}$, 1H), 7.57 (t, $J=8.1\text{Hz}$, 1H), 7.30 (d, $J=8.5\text{Hz}$, 2H), 6.75 (d, $J=8.6\text{Hz}$, 2H), 3.52 (t, $J=6.0\text{Hz}$, 4H), 1.72 (s, 4H), 1.47 (s, 4H).

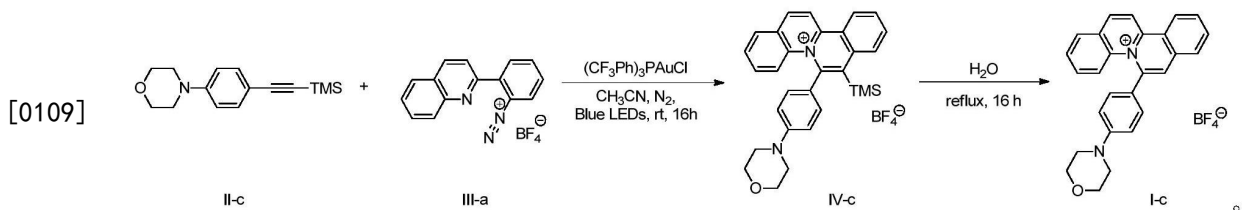
[0104] 实施例3

[0105] pH荧光探针IV及其制备方法



[0107] pH荧光探针IV的制备方法

[0108] pH荧光探针IV的制备方法如以下反应式所示，



[0110] pH荧光探针IV的制备方法的具体操作参见实施例1所示，得到的产物为深红色固体，产率38%。

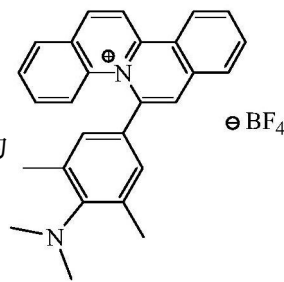
[0111] pH荧光探针IV的NMR结果

[0112] ^1H NMR (400MHz, DMSO-d_6) δ 9.43 (d, $J=9.2\text{Hz}$, 1H), 9.24 (d, $J=8.6\text{Hz}$, 1H), 9.09 (d, $J=9.1\text{Hz}$, 1H), 8.54 (s, 1H), 8.39 (d, $J=7.9\text{Hz}$, 1H), 8.35 (d, $J=7.9\text{Hz}$, 1H), 8.23 (t, $J=7.5\text{Hz}$, 1H), 8.10 (t, $J=7.8\text{Hz}$, 1H), 7.97 (d, $J=9.0\text{Hz}$, 1H), 7.83 (t, $J=7.5\text{Hz}$, 1H), 7.61 (t, $J=8.0\text{Hz}$, 1H), 7.39 (d, $J=8.5\text{Hz}$, 2H), 7.03 (d, $J=8.6\text{Hz}$, 2H), 3.73-3.78 (m, 4H), 3.21-3.25 (m, 4H).

[0113] 实施例4

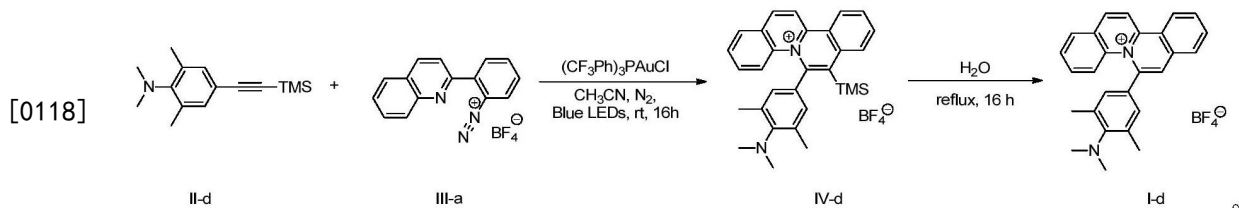
[0114] pH荧光探针V及其制备方法

[0115] pH荧光探针V的结构式为



[0116] pH荧光探针V的制备方法

[0117] pH荧光探针V的制备方法如以下反应式所示，



[0119] pH荧光探针V的制备方法的具体操作参见实施例1所示,得到的产物为橘黄色固体,产率3%。

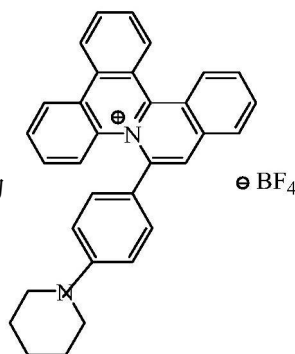
[0120] pH荧光探针V的NMR结果

[0121] ^1H NMR (400MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ .9.45 (d, $J=9.2\text{Hz}$, 1H) , 9.26 (d, $J=8.6\text{Hz}$, 1H) , 9.12 (d, $J=9.1\text{Hz}$, 1H) , 8.58 (s, 1H) , 8.41 (d, $J=8.1\text{Hz}$, 1H) , 8.36 (d, $J=8.0\text{Hz}$, 1H) , 8.24 (t, $J=7.5\text{Hz}$, 1H) , 8.12 (t, $J=7.8\text{Hz}$, 1H) , 7.91 (d, $J=8.9\text{Hz}$, 1H) , 7.85 (t, $J=7.6\text{Hz}$, 1H) , 7.61 (t, $J=8.0\text{Hz}$, 1H) , 7.17 (s, 2H) , 2.80 (s, 6H) , 2.21 (s, 6H) .

[0122] 实施例5

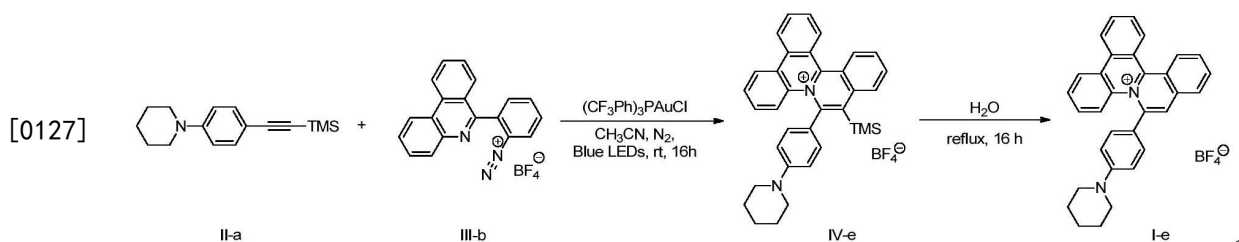
[0123] pH荧光探针VI及其制备方法

[0124] pH荧光探针VI的结构式为



[0125] pH荧光探针VI的制备方法

[0126] pH荧光探针VI的制备方法如以下反应式所示，



[0128] pH荧光探针VI的制备方法的具体操作参见实施例1所示,得到的产物为黑色固体,产率23%。

[0129] pH荧光探针VI的NMR结果

[0130] ^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) δ .9.00 (d, J=8.2Hz, 1H) , 8.89 (d, J=8.6Hz, 1H) , 8.85 (d, J=8.1Hz, 1H) , 8.81 (d, J=8.3Hz, 1H) , 8.56 (s, 1H) , 8.40 (d, J=8.1Hz, 1H) , 8.28-8.26 (m, 1H) , 8.26-8.23 (m, 1H) , 8.07 (d, J=7.3Hz, 1H) , 8.03 (d, J=7.4Hz, 1H) , 7.77 (s, 1H) , 7.76-7.73 (m, 1H) , 7.47 (d, J=7.9Hz, 1H) , 7.45-7.39 (m, 2H) , 6.97 (d, J=8.7Hz, 2H) , 3.21 (s, 4H) , 1.58 (s, 6H) .

[0131] 性质测试

[0132] (1) 实施例1~5得到的pH荧光探针的光学性质测试。

[0133] 测试方法:将2mol/L HCl水溶液和2mol/L NaOH水溶液混合并在pH计的监测下制备具有各种pH值的2mol/L HCl/NaOH缓冲液。通过在乙腈中将pH荧光探针稀释至 5×10^{-4} mol/L来制备储备溶液。分别将各种pH值的2mol/L HCl/NaOH缓冲液与乙腈储备溶液以19比1的体积比混合,得到 2.5×10^{-5} mol/L的稀释溶液。

[0134] 在不同的pH值下测量的pH荧光探针吸收和发射光谱。

[0135] (2) 实施例1~5得到的pH荧光探针的pKa分析。

[0136] 从(1)中的吸收光谱及荧光光谱(图1-10)可见,激发波长为410nm,而pH荧光探针II、pH荧光探针III、pH荧光探针IV、pH荧光探针V、pH荧光探针VI的最大发射波长分别为478nm,478nm,476nm,482nm和509nm。将实施例1~5得到的pH荧光探针的最大发射波长获得的荧光强度与pH值进行汇总,得到的关于pH值的归一化荧光强度曲线,其中,归一化强度的一半的pH值,估计为pKa值。

[0137] (3) 实施例1得到的pH荧光探针II的细胞毒性测定。

[0138] 提供HeLa细胞系,补充44mmol/L碳酸氢钠(Sigma-Aldrich),10%v/v胎牛血清(Gibco)和100U/mL青霉素(Gibco)的Dulbecco改良的Eagle's Medium(DMEM)(Gibco)和100ug/mL链霉素(Gibco)培养,温度为37°C,含5%CO₂。在细胞毒性测定实验前一天,将 5×10^3 细胞接种到96孔板中,将细胞与 $5 \mu\text{mol/L}$ 至 $25 \mu\text{mol/L}$ 的pH荧光探针II在37°C,5%CO₂下孵育72小时。温育后,除去培养基并用新鲜培养基代替。将10 μL MTS混合物(0.92mg/mL PMS, Sigma-Aldrich;2mg/mL MTS, Promega, 1:20)添加到每个孔中。将平板在37°C和5%CO₂中孵育1小时,测定490nm处的吸光度并计算IC₅₀数值。

[0139] (4) 实施例1得到的pH荧光探针II的细胞成像。

[0140] 将HeLa细胞接种在35mm玻璃底皿(SPL)上,并在37°C和5%CO₂细胞培养箱中过夜粘附。将细胞与单独的pH探针或与pH荧光探针、50nmol/L LysoTracker®深红(Invitrogen™)一起孵育2小时。在共聚焦显微镜(Leica TCS SP8 MP)下检查图像。

[0141] (5) 实施例1得到的pH荧光探针II的细胞内pH变化感应。

[0142] 为了进一步确认pH荧光探针II是否由于溶酶体的酸性而发出荧光,用刀豆球蛋白A(一种导致溶酶体pH升高的V-ATPase抑制剂)处理了细胞,进一步分析是否显示荧光信号。

[0143] 结果分析

[0144] (1) 实施例1~5得到的pH荧光探针的光学性质测试,测试结果如图1~图10所示。

[0145] 图1为本发明实施例1得到的pH荧光探针II随pH值变化的紫外吸收光谱图,图2为本发明实施例1得到的pH荧光探针II的荧光强度随pH值变化的曲线;从图1和图2中可以看出实施例1得到的pH荧光探针II,当pH范围为1.49至3.57时,可以观察到最大吸收波长为

410nm,位于可见光区域内;当被最大吸收波长激发时,pH值为1.49的情况下在478nm处观察到很强的发射峰,其光度在1.49至5.52的pH范围下逐渐变弱。

[0146] 图3为本发明实施例2得到的pH荧光探针III随pH值变化的紫外吸收光谱图,图4为本发明实施例2得到的pH荧光探针III的荧光强度随pH值变化的曲线;从图3和图4中可以看出实施例2得到的pH荧光探针III,当pH范围为0.33至3.56时,可以观察到最大吸收波长为410nm,位于可见光区域内;当被最大吸收波长激发时,pH值为0.33的情况下在478nm处观察到很强的发射峰,其光度在0.33至3.56的pH范围下逐渐变弱。

[0147] 图5为本发明实施例3得到的pH荧光探针IV随pH值变化的紫外吸收光谱图,图6为本发明实施例3得到的pH荧光探针IV的荧光强度随pH值变化的曲线;从图5和图6中可以看出实施例3得到的pH荧光探针IV,当pH范围为0.36至3.00时,可以观察到最大吸收波长为410nm,位于可见光区域内;当被最大吸收波长激发时,pH值为0.36的情况下在476nm处观察到很强的发射峰,其光度在0.36至3.00的pH范围下逐渐变弱。

[0148] 图7为本发明实施例4得到的pH荧光探针V随pH值变化的紫外吸收光谱图,图8为本发明实施例4得到的pH荧光探针V的荧光强度随pH值变化的曲线;从图7和图8中可以看出实施例5得到的pH荧光探针V,当pH范围为0.57至6.72时,可以观察到最大吸收波长为410nm,位于可见光区域内;当被最大吸收波长激发时,pH值为0.57至5.26的情况下在482nm处观察到很强的发射峰,其光度在为6.72或以上的pH范围下急剧下降。

[0149] 图9为本发明实施例5得到的pH荧光探针VI随pH值变化的紫外吸收光谱图,图10为本发明实施例5得到的pH荧光探针VI的荧光强度随pH值变化的曲线,从图9和图10中可以看出实施例5得到的pH荧光探针VI,当pH范围为0.56至4.61时,可以观察到最大吸收波长为410nm,位于可见光区域内;当被最大吸收波长激发时,pH值为0.56的情况下在509nm处观察到很强的发射峰,其光度在0.56至4.61的pH范围下逐渐变弱。

[0150] (2)实施例1~5得到的pH荧光探针的pKa分析,分析结果如图11~图15所示。

[0151] 从吸收光谱及荧光光谱(图1~10)可见,激发波长为410nm,而pH荧光探针II、pH荧光探针III、pH荧光探针IV、pH荧光探针V、pH荧光探针VI的最大发射波长分别为478nm,478nm,476nm,482nm和509nm,图11-15为从最大发射波长获得的荧光强度,获得关于pH值的归一化荧光强度曲线。将归一化强度的一半的pH值,估计为pKa值。当归一化强度达到其一半时,意味着喹啉鎓化合物的质子化形式和非质子化形式的浓度相同。

[0152] 图11为本发明实施例1的pH荧光探针II的荧光强度在测试波长478nm处不同pH下的荧光强度图,得到其pKa值为4.6。

[0153] 图12为本发明实施例2的pH荧光探针III的荧光强度在测试波长478nm处不同pH下的荧光强度图,得到其pKa值为2.8。

[0154] 图13为本发明实施例3的pH荧光探针IV的荧光强度在测试波长476nm处不同pH下的荧光强度图,得到其pKa值为<2.2。

[0155] 图14为本发明实施例4的pH荧光探针V的荧光强度在测试波长482nm处不同pH下的荧光强度图,得到其pKa值为6.1。

[0156] 图15为本发明实施例5的pH荧光探针VI的荧光强度在测试波长509nm处不同pH下的荧光强度图,得到其pKa值为4.3。

[0157] 其中实施例1的pH荧光探针II,实施例4的pH荧光探针V和实施例5的pH荧光探针VI

的pH值检测范围在4~7之间。

[0158] (3) 实施例1得到的pH荧光探针II的细胞毒性测定。

[0159] 用EnSpire多模式读板仪(PerkinElmer)测量5 μ mol/L至25 μ mol/L的pH荧光探针II与HeLa细胞孵育后,于490nm处放光的细胞成像图,如图16所示,荧光强度随着pH荧光探针的浓度增加而变强,这表明pH荧光探针具有浓度依赖型的信号反应能力。 IC_{50} 值通过GraphPad Prism计算,如图17所示, IC_{50} 为28.08 μ mol/L。

[0160] (4) 实施例1得到的pH荧光探针II的细胞成像。

[0161] 采用共聚焦显微镜(Leica TCS SP8 MP)下检查图像,如图18所示,图18A和图18B为pH荧光探针在不同选定细胞中的荧光显微镜图像,图18C和图18D为LysoTracker®深红(Invitrogen™)在不同选定细胞中的荧光显微镜图像,图18E和图18F为不同选定细胞的明场显微镜图像,图18G和图18H为pH荧光探针和LysoTracker®深红(Invitrogen™)在不同选定细胞中的合并荧光显微镜图像。

[0162] 对于pH荧光探针II和溶酶体示踪剂,观察到荧光信号的共定位,表明该化合物定位于溶酶体。证明该类分子结构能穿过细胞膜,不能穿透细胞核膜,可以选择性地标记在亚细胞层次的特殊位置。

[0163] (5) 实施例1得到的pH荧光探针II的细胞内pH变化感应。

[0164] 如图19所示,图19A和图19B为对照组的pH荧光探针在不同选定细胞的荧光显微镜图像(未经伴刀豆霉素A处理),图19C和图19D为对照组的不同选定细胞的明场显微镜图像,图19E和图19F为经伴刀豆霉素A处理后pH荧光探针在不同选定细胞的荧光显微镜图像,图19G和图19H为经伴刀豆霉素A处理后不同选定细胞的明场显微镜图像。

[0165] 用pH荧光探针II和伴刀豆霉素A处理的细胞显示出荧光信号的完全丧失,表明pH荧光探针II在体内起pH感应的作用。

[0166] 因此,本申请提供的pH荧光探针,在pH为4~7的变化范围内荧光强度变化非常明显,其荧光强度随pH的降低而逐渐增强;此外,该化合物的分子结构以410nm为激发波长,其最大发射波长为478-509nm;且化合物的分子结构具有特殊的穿透性,能穿过细胞膜,但不能穿透细胞核膜,故可以选择性地标记在亚细胞层次的特殊位置;同时其具有较大的斯托克位移,可以降低信噪比,该pH荧光探针可根据取代基的不同调节发光波长,同时基于其分子结构具有一定的靶向作用,适合广泛应用于细胞内外弱酸性环境pH的检测。

[0167] 以上所述仅为本申请的较佳实施例而已,并不用以限制本申请,凡在本申请的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换和改进等,均应包含在本申请的保护范围之内。

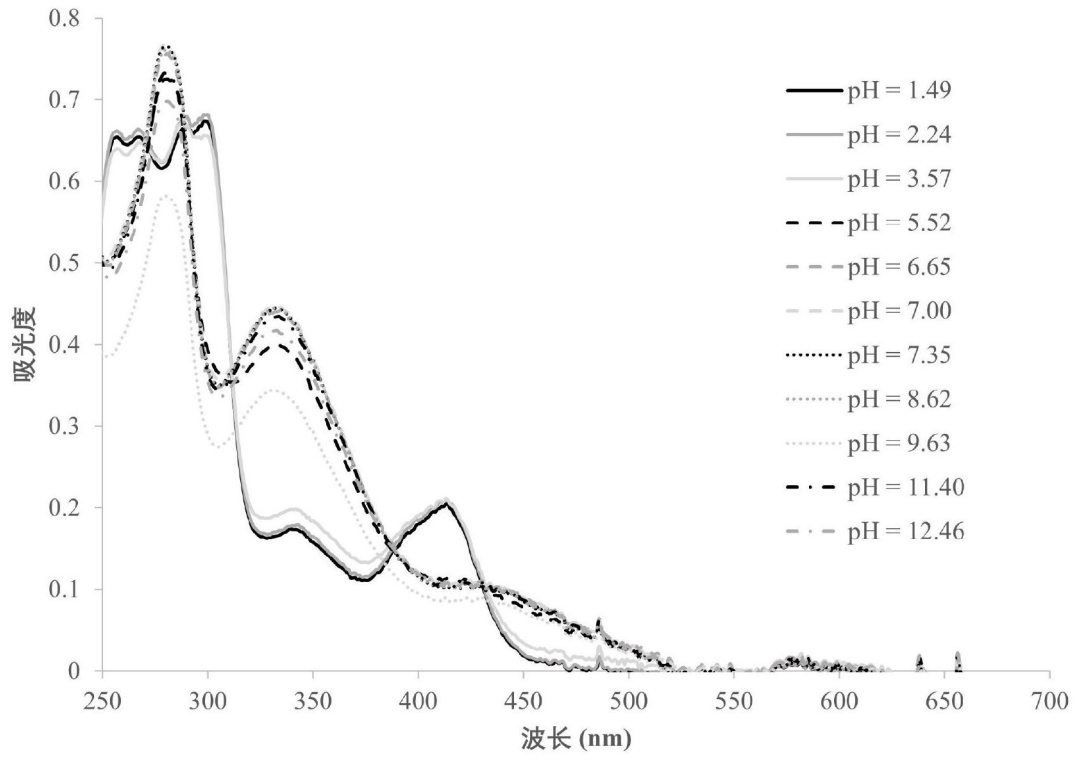


图1

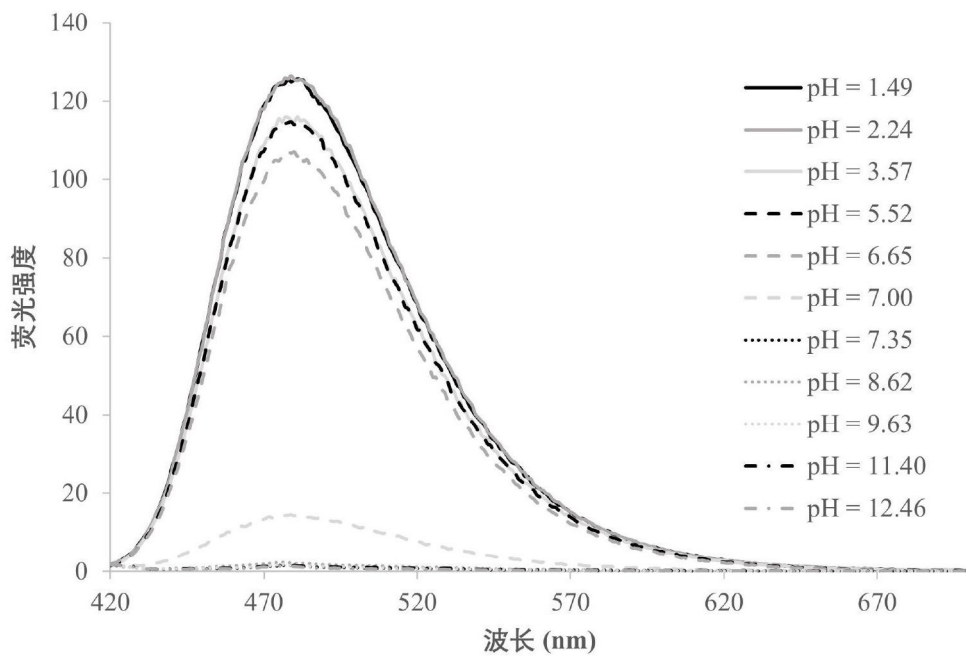


图2

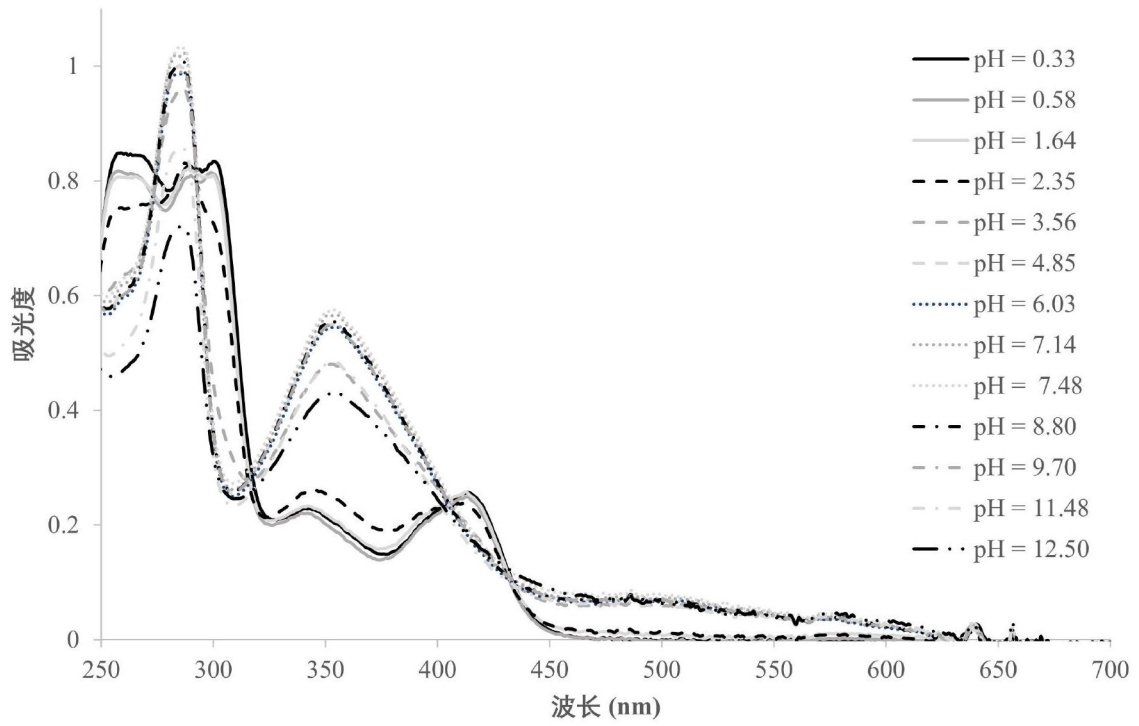


图3

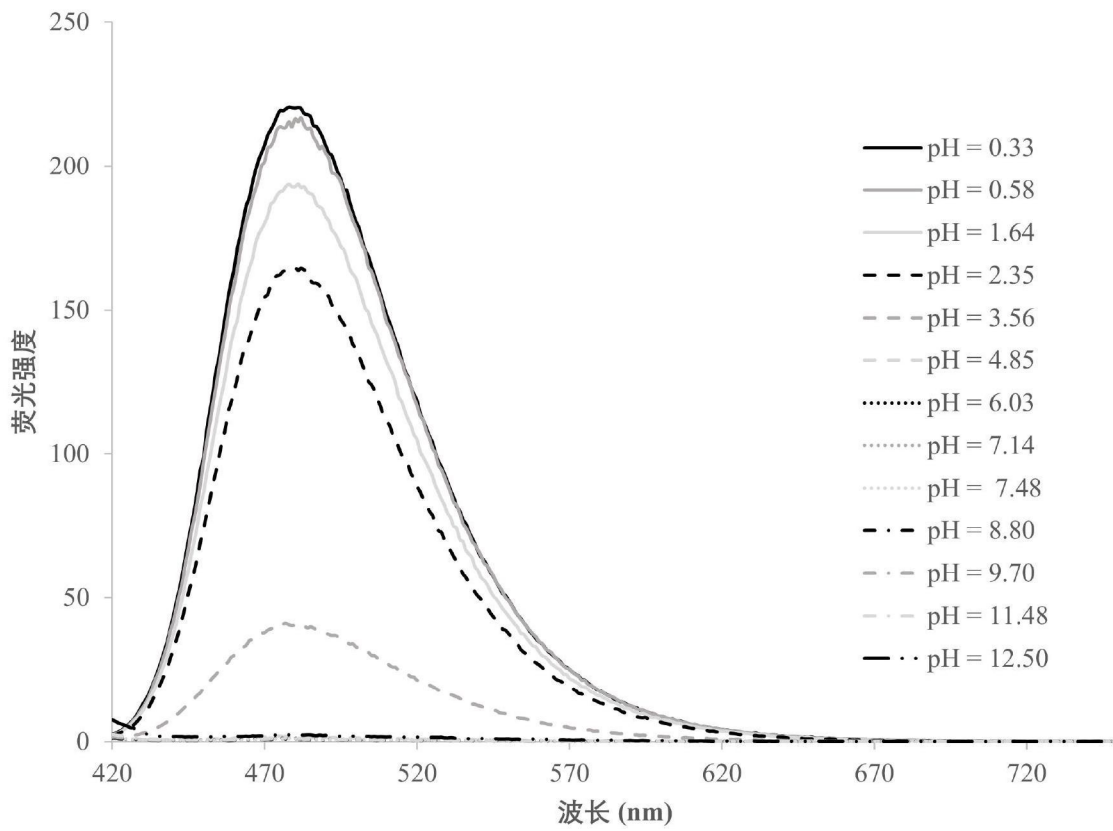


图4

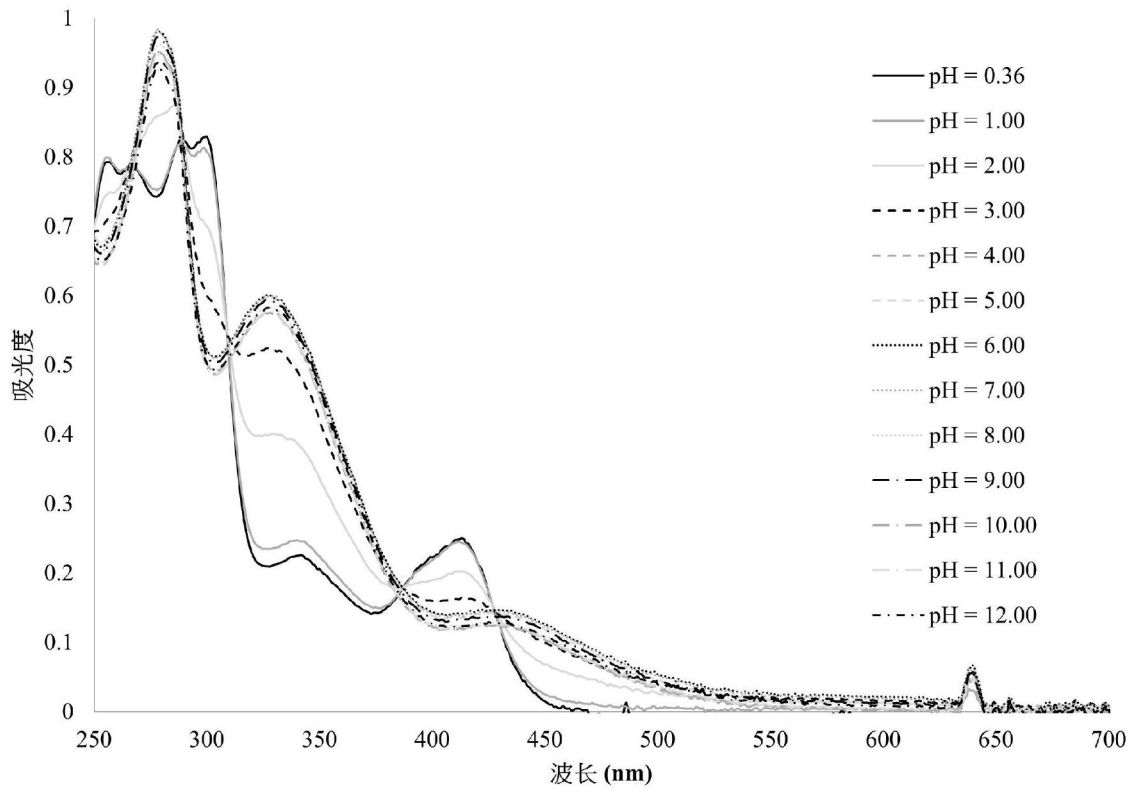


图5

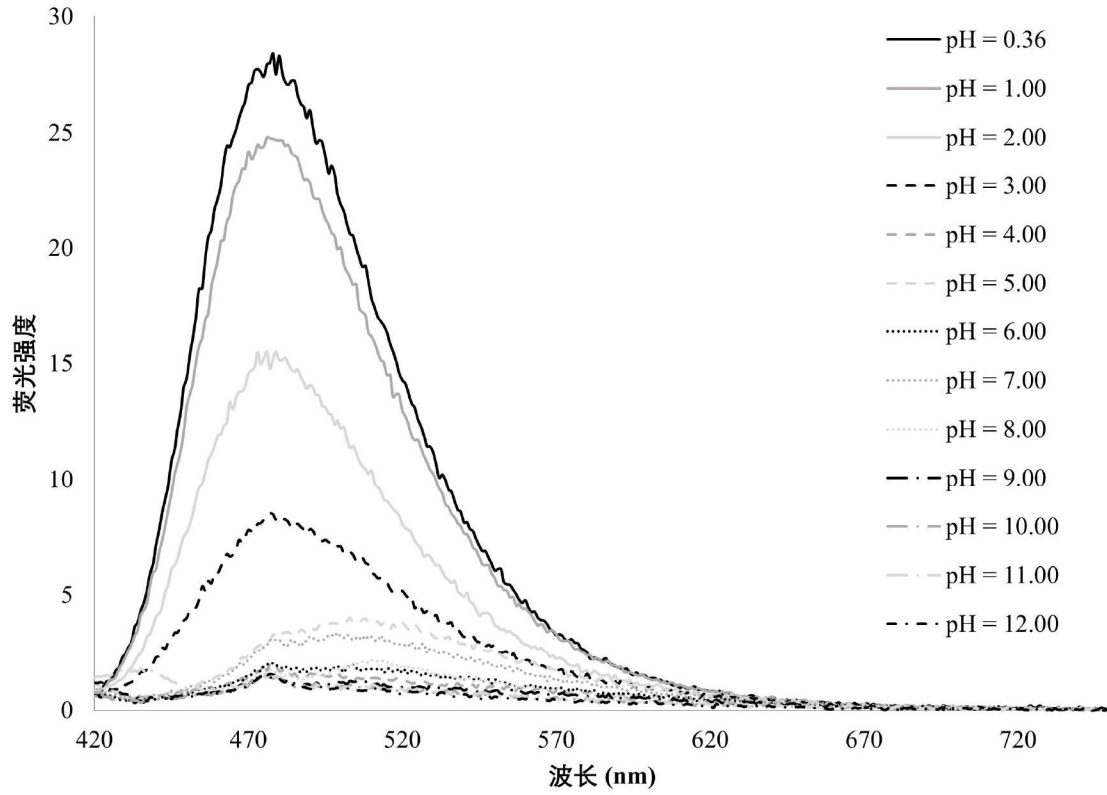


图6

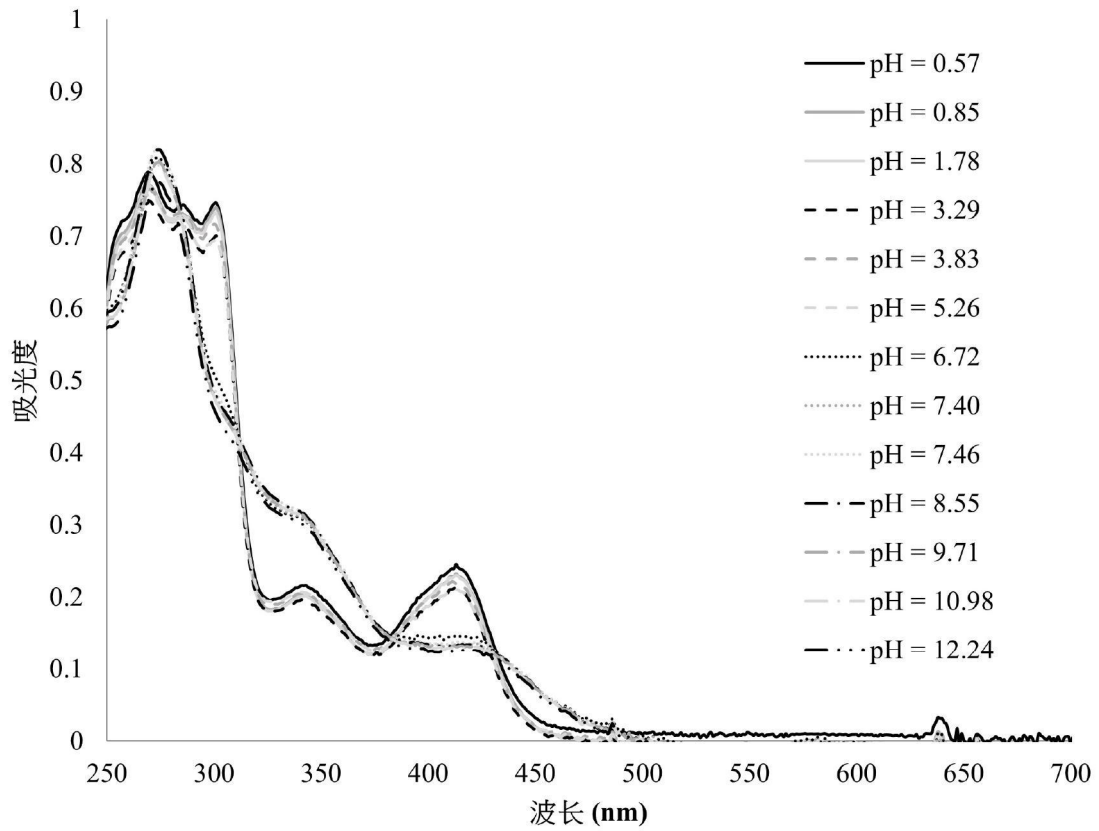


图7

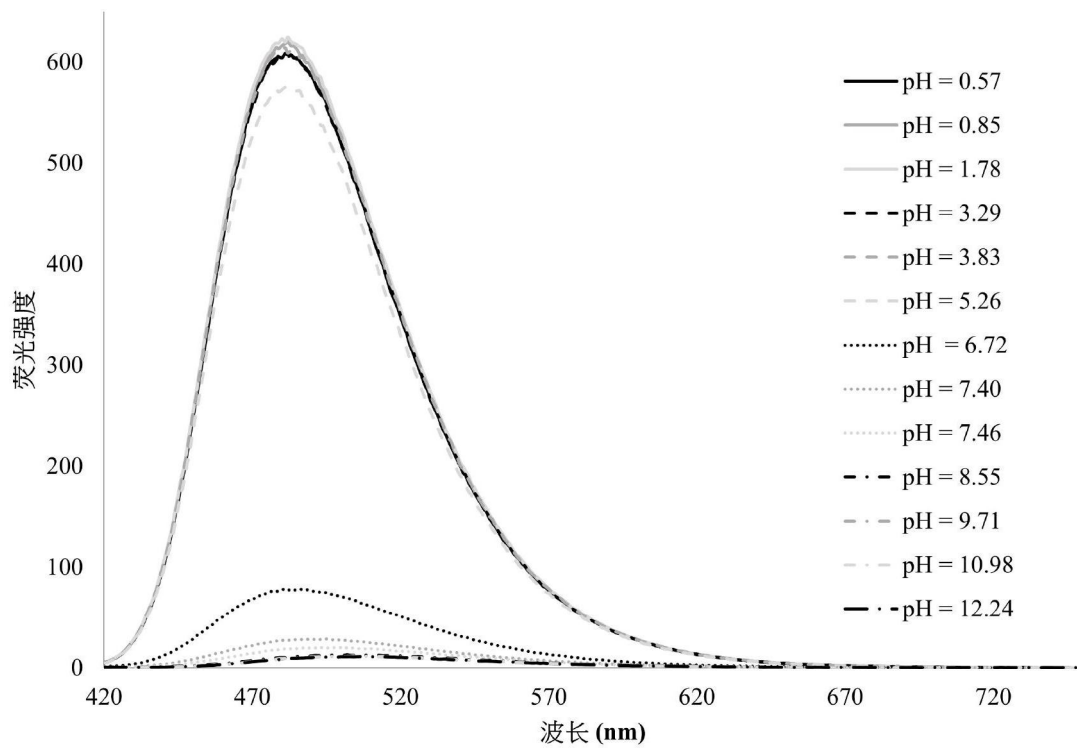


图8

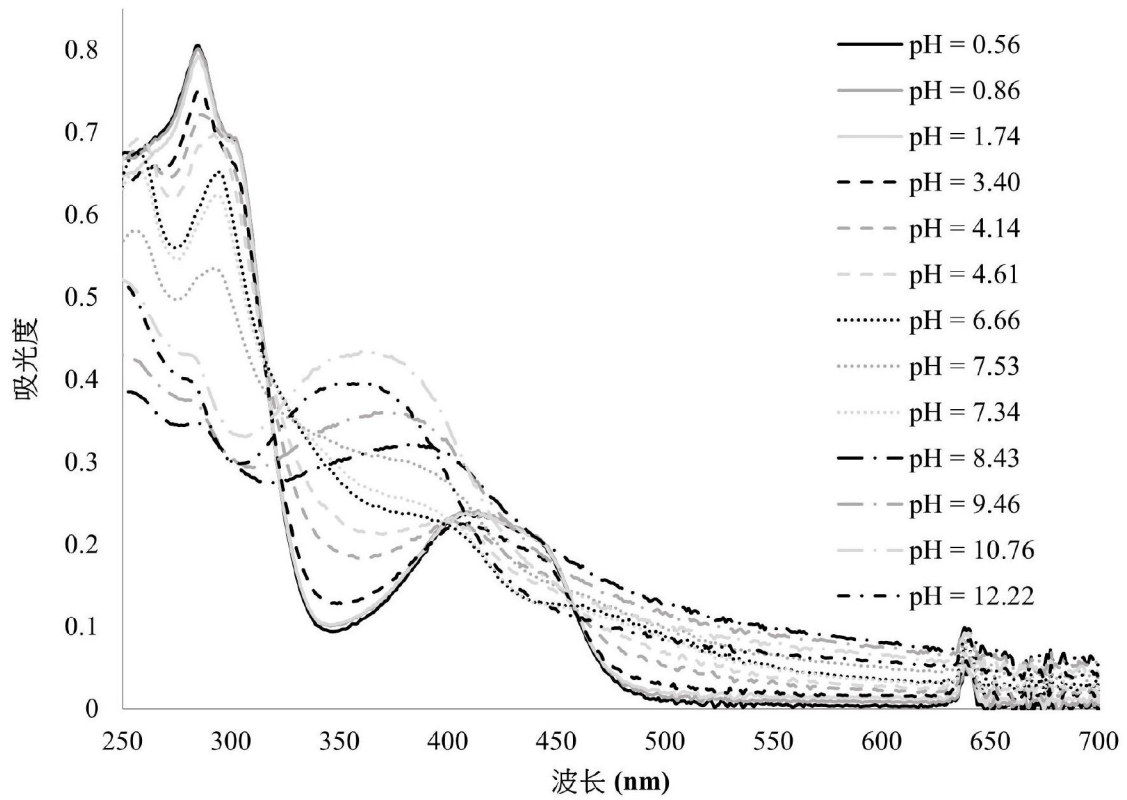


图9

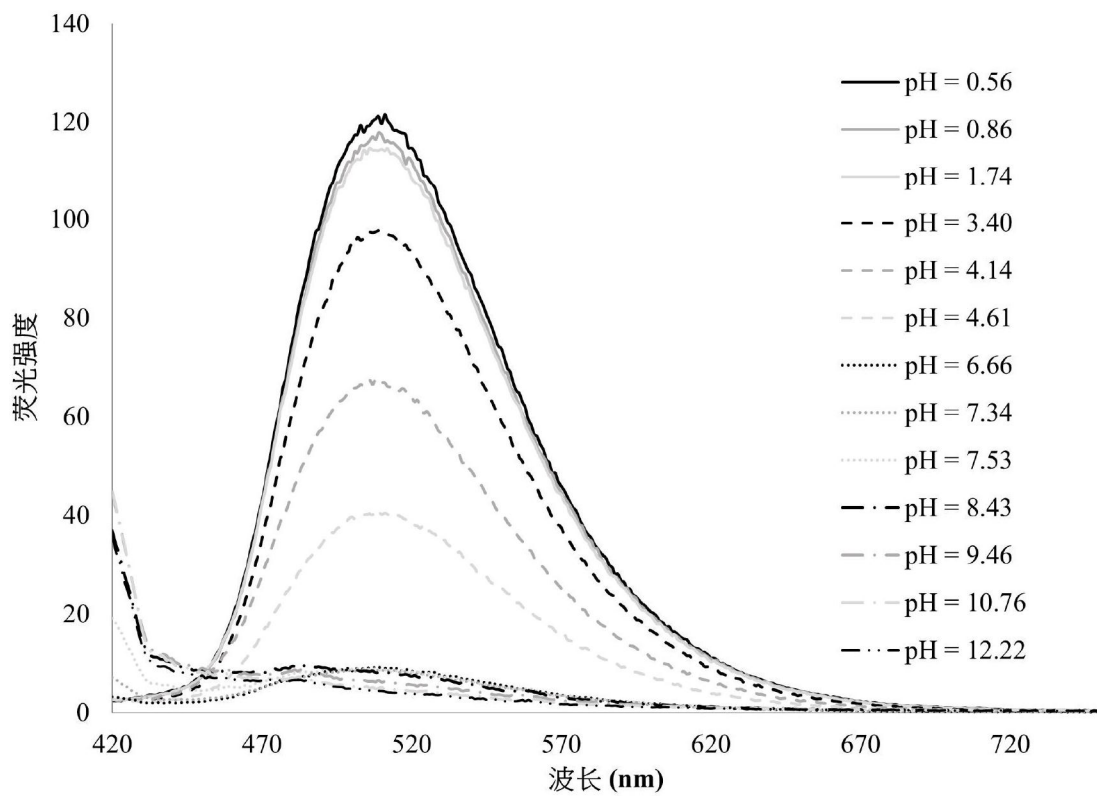


图10

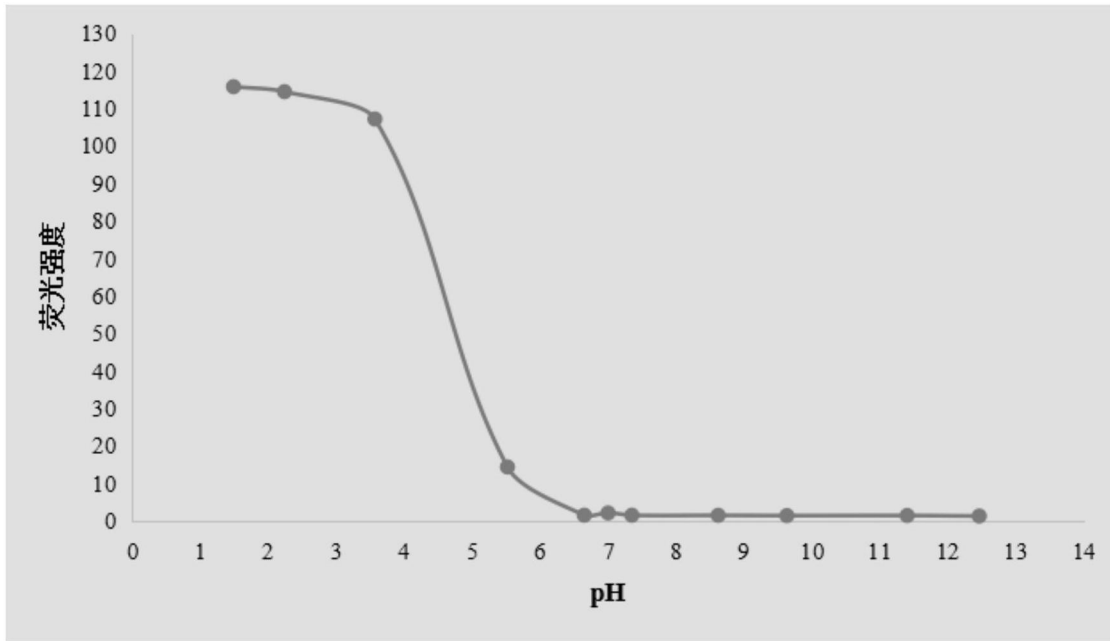


图11

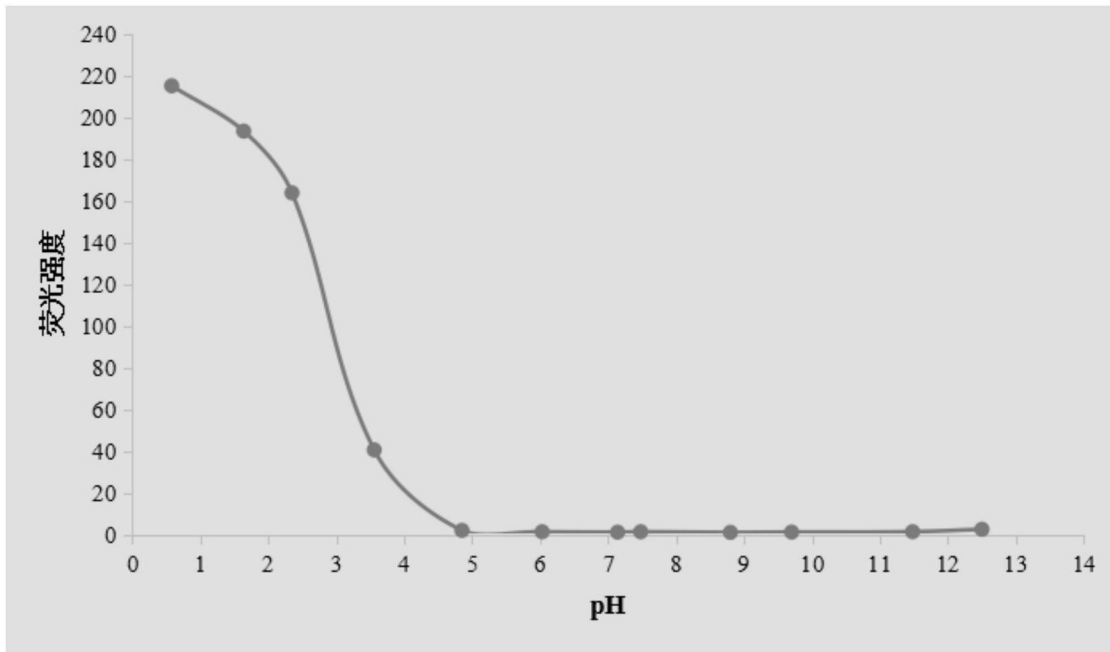


图12

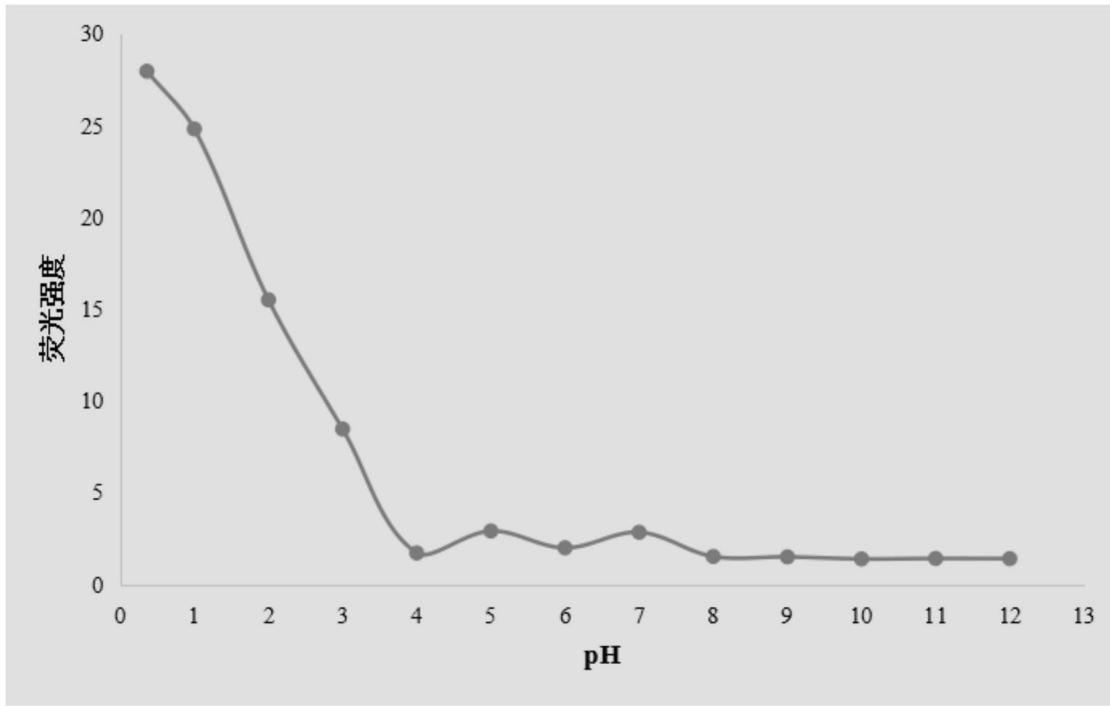


图13

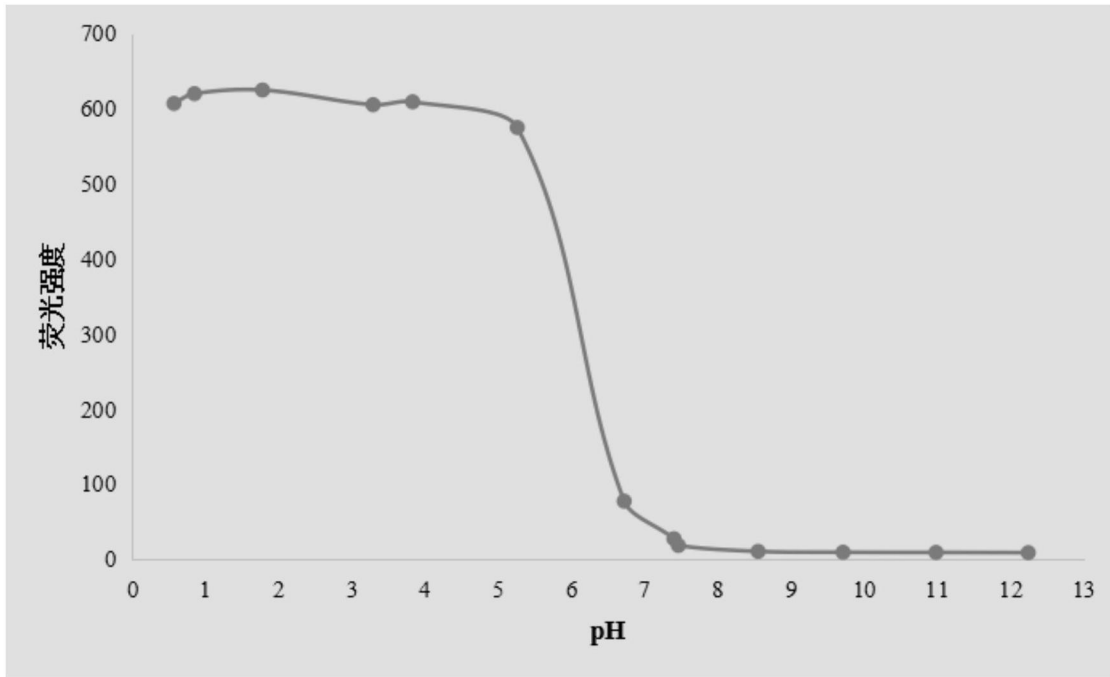


图14

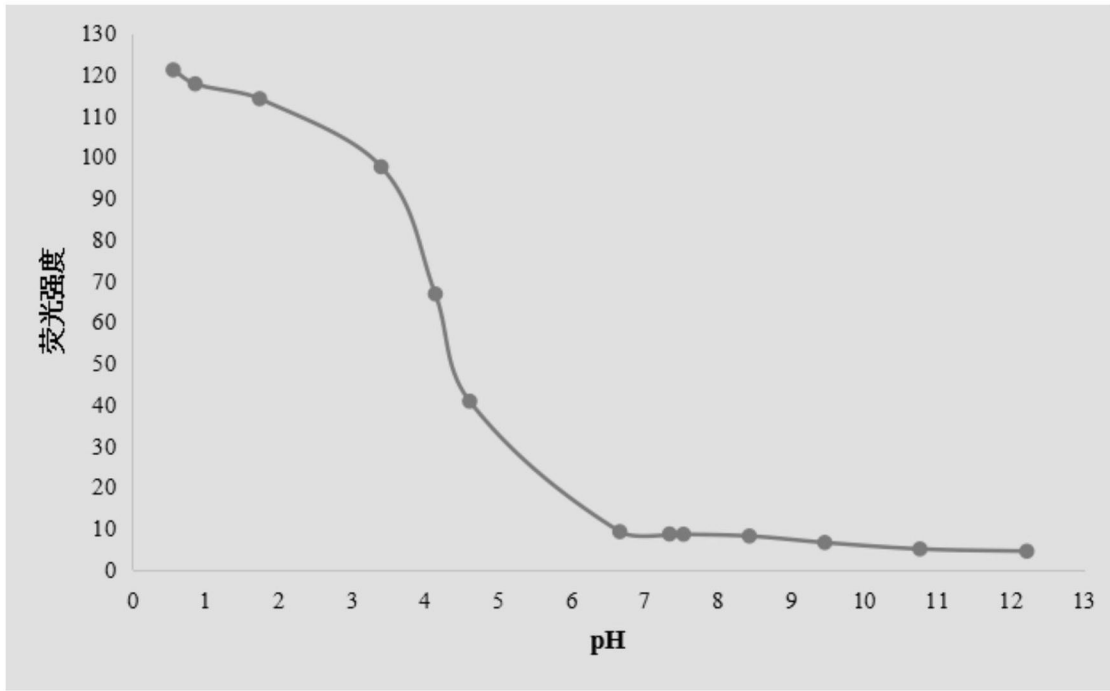


图15

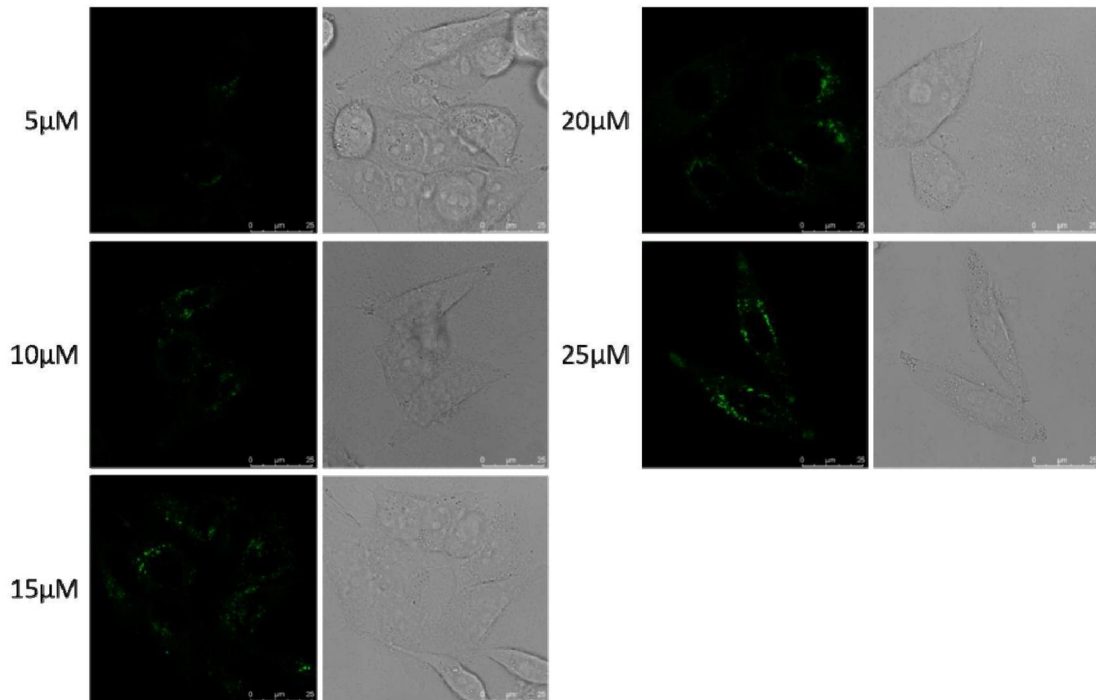


图16

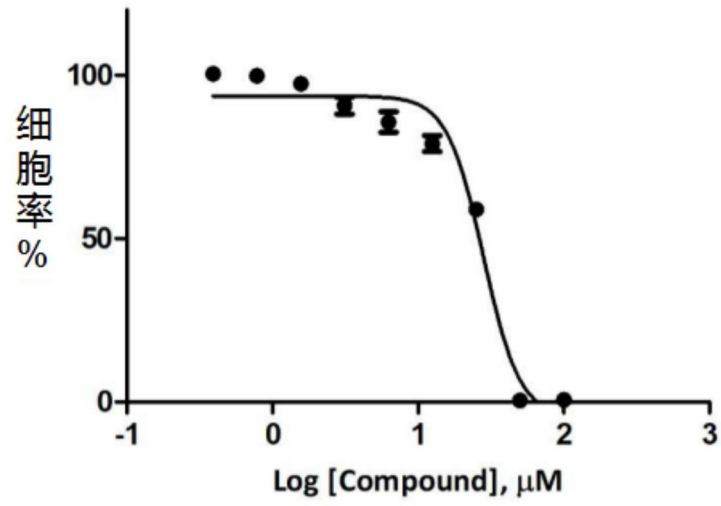


图17

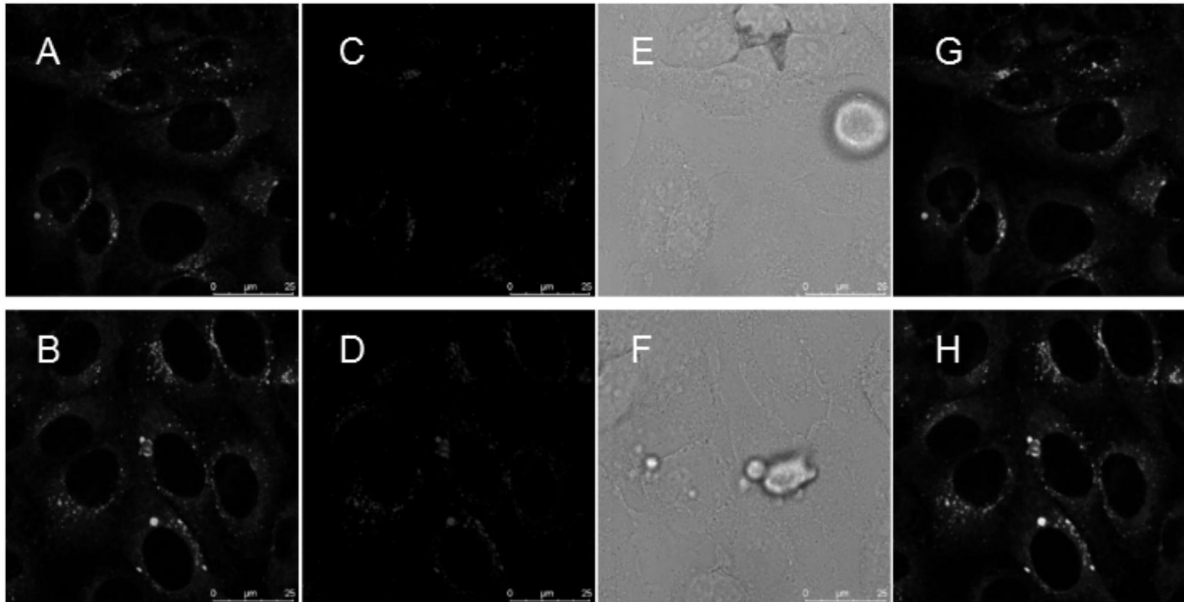


图18

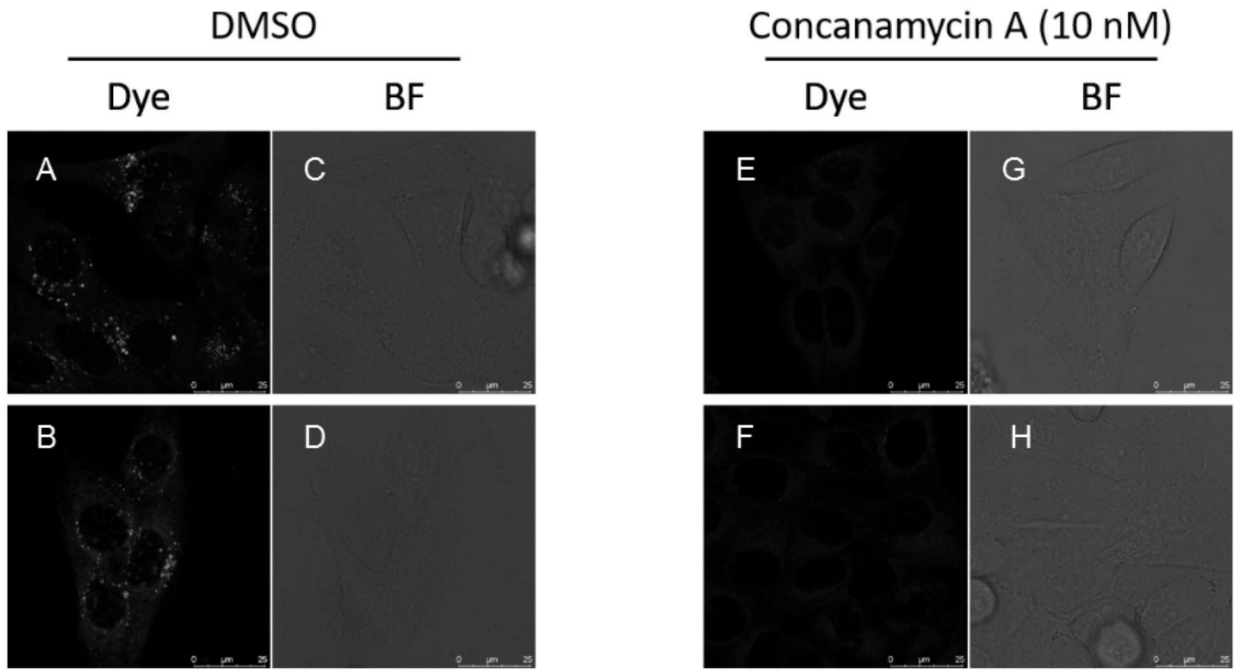


图19