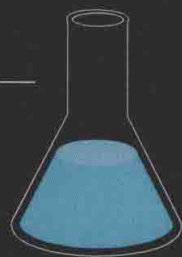


荧光功能材料在 生物体识别中的应用

Application of Fluorescent Functional Materials
in Biological Recognition



申有名 唐裕才 编著



复旦大学出版社

白马湖优秀出版物出版资助

荧光功能材料在 生物体识别中的应用

Application of Fluorescent Functional Materials
in Biological Recognition

申有名 唐裕才 编著

 復旦大學出版社

图书在版编目(CIP)数据

荧光功能材料在生物体识别中的应用/申有名,唐裕才编著. —上海:复旦大学出版社,2021.12
ISBN 978-7-309-16019-2

I. ①荧… II. ①申…②唐… III. ①荧光分析-应用-生物物理学 IV. ①Q6②0657.32

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2021)第 236280 号

荧光功能材料在生物体识别中的应用

申有名 唐裕才 编著

责任编辑/王 珍

复旦大学出版社有限公司出版发行

上海市国权路 579 号 邮编:200433

网址: fupnet@fudanpress.com http://www.fudanpress.com

门市零售: 86-21-65102580 团体订购: 86-21-65104505

出版部电话: 86-21-65642845

当纳利(上海)信息技术有限公司

开本 787×1092 1/16 印张 14.75 字数 241 千

2021 年 12 月第 1 版第 1 次印刷

ISBN 978-7-309-16019-2/Q·112

定价: 78.00 元

如有印装质量问题, 请向复旦大学出版社有限公司出版部调换。

版权所有 侵权必究

内容提要

本书共6章，第1章介绍荧光材料的发光机理以及常见的荧光材料；第2章介绍荧光功能材料对重金属离子的检测应用；第3章介绍荧光功能材料对活性氮氧化物的检测应用；第4章介绍荧光功能材料对常见阴离子的检测；第5章介绍荧光功能材料对硫化物的检测应用；第6章介绍荧光功能材料在酶/农药领域的检测应用。本书可作为本科生创新性训练参考书，也可作为从事生物化学尤其是以小分子荧光探针为研究工具的科研工作者的参考用书。

前 言

随着生物科学技术的发展,人类对于生命现象的认知越来越深入,特别是对生物体内物质与生理过程的关联性的探究成为生物医学中较活跃的领域之一。荧光功能材料作为光致发光材料,其利用自身的识别基团,通过与检测物的特异性结合,使荧光强度或者波长发生改变来检测目标物质的浓度,分析其与疾病的关系,也能为体外物质提供精准检测。与其他常规检测方法相比,荧光检测法具有信噪比高,操作简单,灵敏度好,选择性高,设备价格便宜,能够不破坏生物体进行成像分析的优点,它已成为当今研究和应用最多的检测方法之一。

本书介绍了荧光功能材料在生物成像领域的最新进展,并结合了作者在小分子荧光材料设计、合成领域及其在生物体成像领域多年研究成果编写而成,本书共分为6章。第1章主要介绍荧光材料的发光机理以及常见的荧光材料。第2章主要介绍荧光功能材料对重金属离子的检测应用。第3章主要介绍荧光功能材料对活性氮氧化物的检测应用。第4章主要介绍荧光功能材料对常见阴离子的检测。第5章主要介绍荧光功能材料对硫化物的检测应用。第6章主要介绍荧光功能材料在酶/农药领域的检测应用。这些方面是当前荧光功能材料在生物化学领域中的主要应用方向,也是研究最为活跃的地方。

本书是荧光功能材料的应用综述,可作为本科生创新性训练参考书,也可作为从事生物化学尤其是以小分子荧光探针为研究工具的科研工作者的参考书。

本书得到了湖南文理学院白马湖优秀出版物出版资助,同时得到复旦大

学出版社编辑的很多宝贵意见,在此表示衷心感谢。

本书在撰写过程中参考了大量的文献资料,在此向这些文献的作者表示感谢。由于编者水平有限,研究方向有偏重,书中缺点和错漏之处,恳请专家和读者批评指正。

编者

2021年9月

目 录

第 1 章	绪论	001
1.1	荧光产生的原理	002
1.2	荧光强弱的影响因素	002
1.3	表征荧光性能的参数	004
1.4	常见的荧光染料介绍	006
1.5	荧光功能材料的识别机理	010
1.6	小结	014
	参考文献	014
第 2 章	有机小分子荧光材料对金属离子的检测	019
2.1	引言	019
2.2	基于有机小分子荧光探针对金属离子的检测	020
2.3	对铜离子的检测	041
2.4	对钯的检测	066
2.5	对 Zn^{2+} 的检测	073
2.6	对 $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ 的检测	076
2.7	对 Al^{3+} 的检测	080
2.8	小结	084
	参考文献	085

第 3 章	有机小分子荧光材料对活性氮氧物质的检测	100
3.1	引言	100
3.2	基于有机小分子荧光探针对 ROS/RNS 的检测	101
3.3	小结	151
	参考文献	151
第 4 章	有机小分子荧光材料对阴离子的检测研究	158
4.1	引言	158
4.2	基于小分子荧光探针对阴离子的检测	158
4.3	小结	182
	参考文献	182
第 5 章	有机小分子荧光材料对含硫化物的检测研究	187
5.1	引言	187
5.2	基于有机小分子荧光探针对硫化物的检测	187
5.3	小结	208
	参考文献	209
第 6 章	有机小分子荧光材料在葡萄糖/酶/农药中的检测研究	215
6.1	引言	215
6.2	基于有机小分子荧光探针对葡萄糖/酶/农药的检测	215
6.3	小结	224
	参考文献	224

第 1 章 绪论

随着生物科学技术的发展,人类对于生命现象的认知越来越深入。尤其是进入 21 世纪以来,随着转基因食品的出现、基因疗法的运用、克隆技术的突破等,生命科学成为 21 世纪科技发展的过程中非常活跃的领域,科学家们正在从分子水平的尺度上认识生命现象。生物大分子是生物体内最重要的组成部分,约占生物体质量的 $1/3$ 以上,主要包括 4 类化合物:蛋白质、糖、核酸、脂。它们是构成生物体和维持生命现象的最基本的物质基础和功能基础。因此研究生命运动的规律,就必须对这些化合物的结构及其发生的转化过程进行准确的检测,在此基础上对现代检测技术提出更高的要求。

传统的生物检测方法包括放射性同位素标记、显微观察法和电化学检测手段,然而这些方法在应用过程中都存在较大的局限性,如放射线同位素标记法对人体具有危害性、对环境不友好以及检测信号及灵敏度会随半衰期而减弱,显微观察法不能有效地揭示生物物质反应的靶点和结合方式等生命活动过程中的细节,而电化学方法极易受到设备材料及检测过程的影响,这些方法越来越不适应现代检测技术的要求而逐渐被淘汰。近几十年来,荧光分析检测技术得到了快速发展,在生物化学研究领域得到了广泛应用,利用荧光探针对细胞中的活性生物小分子动态、原位可视化成像分析是目前生物学、化学及医学领域研究的前沿热点之一。相较传统的检测方法,荧光检测法具有信噪比高、灵敏度好、操作方便可靠、环境相对友好、对人体无辐射危害等优点。这种技术以带有识别基团的荧光化合物分子作为检测底物,通过与靶标物质结合前后引起荧光信号的改变如荧光强度、荧光偏振、荧光波长前后移动、出现不同荧光发生峰等相关参数,从而达到跟踪、检测和分析生命物质与生理现象的目的。而作为这种分析手段的关键组成部分之一的荧光染料是荧光分析手段用于生化检测领域的前提,其性能的优劣将直接影响检测结果的准确性与灵

敏度。

本章将主要介绍荧光的产生原理、荧光强弱的影响因素、常见的荧光材料及荧光功能材料的检测机理,为后续荧光探针的设计提供理论依据。

1.1 荧光产生的原理

荧光产生的具体过程如图 1-1 所示^[1-3]。通常情况下,荧光试剂分子处于基态,吸收外界能量后,试剂分子中的电子被激发而处于激发态,电子跃迁到高能级。分子中的电子从基态 S_0 跃迁到激发态 S_1 、 S_2 比较容易发生,一般进行得很快(大约 10^{-4} s 内完成),而从基态单重态到激发态三重态(T_1 、 T_2)不易发生。高能级的单重态激发态分子(如 S_2)可以与其他同类分子或溶剂分子碰撞,通过内转换(无辐射跃迁)回到激发态的最低能级 S_1 ,这一过程大约为 10^{-12} s。处于最低激发态(S_1)的分子回到基态(S_0)的过程中会放出光子,这时产生的光就是荧光(F),这个过程一般在 $10^{-4} \sim 10^{-8}$ s 完成,其中从 S_1 到 T_1 能量转化过程是系间跨越(ise)的。从 T_1 回到 S_0 有 2 种过程,一种是系间跨越的过程,无能量释放;另一种是放出光子的过程,即磷光,在 $10^{-4} \sim 10$ s 完成。

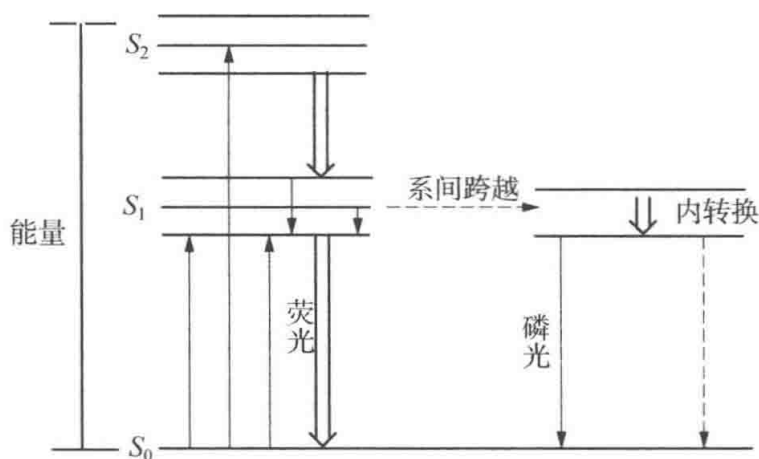


图 1-1 荧光与磷光产生过程

1.2 荧光强弱的影响因素

在上述部分介绍了荧光的产生原理,但并不是所有的物质在吸收能量后



都会产生荧光。物质产生荧光的首要条件是该物质的分子中必须具有吸收特征频率光能的基团和分子中具有与照射光能量相同的电子能级跃迁;其次是该物质还应具有一定的量子产率和适宜的环境,如适宜的温度、pH 值、所用溶液状态等。从物质的结构出发,强荧光物质应有如下特征:

(1) 大的 π 键共轭结构:具有共轭体系结构的分子能产生荧光。其中分子体系中 π 电子结构的共轭程度越大,非定域 π 电子就越容易被激发,荧光越容易产生,因此能产生荧光的物质大多数含有芳香环或杂环。

(2) 刚性的平面结构:除了上述需要 π 电子共轭体系外,强荧光物质具有强烈荧光的有机物质,大多数分子是刚性平面结构。刚性及共平面性越大,其有效的 π 电子离域性越高,荧光也就越强^[4]。此外,分子结构中的立体异构现象也影响着荧光材料的荧光性能,顺式和反式同分异构体常具有不同的荧光性质^[5]。

(3) 取代基团对荧光强弱的影响:取代基的性质(尤其是发色基团)对荧光体的荧光强弱有强烈的影响。综合各方面的因素,取代基大致上分为三类:①供电子基团使得荧光增强,如 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHR}$ 、 $-\text{NR}_2$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{OCH}_3$ 等;②拉电子基团使荧光减弱,如 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{C}=\text{O}$ 、 NO_2 、 NO 、 $-\text{F}$ 、 $-\text{Cl}$ 、 $-\text{Br}$ 、 $-\text{I}$ 等;③对荧光强弱影响不明显的基团,如 $-\text{SO}_3^-$ 、 $-\text{NH}_3^+$ 等。另外,取代基的原子质量对荧光强弱也有一定的影响,一般情况下随着取代基原子质量的增加,化合物的量子产率会降低。如卤素(Cl 、 Br 、 I)、 S 、 P 等都存在这样一种加重效应(又称为重原子效应)^[6]。

除了上述物质的结构影响着其荧光特性外,荧光的发射还需要一个适宜的外部环境,影响荧光产生的外部环境因素主要有以下几个方面:

(1) 温度的影响:温度对于溶液的荧光强度有显著的影响。一般情况荧光物质的溶液随着温度的降低而荧光效率升高,荧光强度增大。当温度上升时荧光强度下降,其主要原因是分子内部能量的转换作用随温度升高而加快,同时处于激发态的分子和溶剂分子之间可能发生某些可逆的光化学反应,这也是荧光强度下降的原因之一。

(2) 溶剂的影响:不同的溶剂会使物质的荧光谱带位置(有时还有强度)发生改变。随着溶剂极性的增加,向波长较短方向(或向蓝)移动,通常称为负向溶剂化显色。相应的向波长较长方向(或向红移)称为正向溶剂化显色。溶剂的极性改变对最大吸收位置会产生影响,主要是由于当溶剂的极性改变时,

基态和激发态溶质分子的溶剂化能产生差异,即由溶剂对溶质分子基态和激发态的稳定化作用不同引起的。对于不具有非键电子的共振 π 体系,同样具有极性激发态。因此在极性愈强的溶剂中由偶极-偶极作用引起的溶剂化作用也会导致激发态的稳定化作用加强,从而降低 $\pi - \pi^*$ 跃迁的能差,使红移增强。

(3) 氢键的影响:除了上述溶剂极性的影响外,溶剂也常通过与荧光材料间形成氢键来影响物质的荧光。不同溶剂形成氢键的能力为:水>甲醇>乙醇>氯仿>己烷。荧光物质与溶剂或其他溶质分子之间发生氢键有 2 种情况:一是在激发之前,即荧光物质处在基态时与溶剂或其他溶质分子形成的氢键;二是在激发之后,即荧光物质处在激发态时与溶剂或其他溶质分子形成的氢键。在第一种情况下产生的氢键将对物质的吸收光谱和荧光光谱都产生影响,而第二种情况只对物质的荧光光谱产生作用。溶剂的氢键供体或受体能力及溶剂的极性都将影响荧光物质的实际光谱移动。

(4) pH 值的影响:未解离的(弱酸或弱碱)分子和它们的离子常呈现出不同的荧光性质。若分子中的酸性和碱性基团属于生色团的部分,或直接连在生色团上,那么溶液中的 pH 值的改变会引起绝大多数含有这些基团的化合物的基态和激发态的酸碱性或解离形态的变化。此外,溶液的浓度对荧光强度也有影响,在较低范围内,荧光强度随浓度的增大而增大,达到一定值后,再增加浓度,荧光强度反而降低了,直至荧光完全猝灭(大约浓度为 1 g/L)。

1.3 表征荧光性能的参数

1.3.1 荧光光谱与 Stokes 位移

荧光光谱包括荧光激发光谱和荧光发射光谱。将荧光物质溶液置于荧光光度计光路中,固定荧光发射波长和狭缝宽度,扫描得到荧光激发波长和相应荧光强度的关系曲线,即荧光激发光谱。通过荧光激发光谱可以确定最佳的激发波长。荧光发射光谱即荧光光谱的获得的过程、固定激发波长和狭缝宽度、扫描得到荧光发射波长和相应荧光强度的关系曲线。荧光物质的荧光激发光谱和发射光谱形状相似且成镜像对称。Stokes 位移指的是最大发射波长与最大吸收波长的差值。

1.3.2 荧光强度、量子产率及荧光寿命

1. 荧光强度

荧光强度是指在一定条件下仪器所测得的荧光物质发射荧光大小的一种量度。由于荧光物质所发射的荧光无固定方向,实际上所测量的只是某一方向的荧光,它除与物质本身的荧光量子产率有关外,还与介质、环境、仪器性能等因素有关。物质吸收光越多,处于激发态的分子数越多,发出的荧光强度就越大。

$$F = K \times \Phi_f \times I_0 \times \xi \times b \times c$$

式中: F 为荧光强度; K 为仪器常数; Φ_f 为荧光量子产率; I_0 为照射到被测物质上的光强度; ξ 为该物质的摩尔吸光系数; b 为检测样品池的光径长度; c 为样品浓度。

2. 荧光量子产率

荧光量子产率也称为荧光效率,是物质的固有属性,理论上定义为荧光物质吸收光后所发射的荧光光子数与吸收的激光光子数之比。在同一浓度下,比值越大,荧光强度越大。染料的荧光量子产率可用下面的计算公式来获得:

$$\Phi = \Phi_s \times (A_s/A_x)(F_x/F_s)(n_x/n_s)^2$$

式中: Φ 代表量子产率, A 代表染料的吸收强度, F 代表荧光光谱线下的积分面积, n 代表测量中所使用的溶剂的折射率,下标 s 和 x 分别代表标准的荧光染料(测定过程中,应根据待测染料的吸收与发射波长选定合理标准染料)和待测的染料。

3. 荧光寿命

荧光寿命(τ)可以用下式测定:

$$\ln F_0 - \ln F_t = -t/\tau \text{ 或 } F_t = F_0 \times e^{-t/\tau}$$

F_0 和 F_t 分别代表 $t=0$ 和 $t=\tau$ 时的荧光强度,通过实验测量不同时间的 F_t 值,确定 $\ln F_t - t$ 的关系曲线,其斜率就是荧光寿命。该式表达了荧光物质被一瞬时光脉冲激发产生的荧光随时间的衰减。荧光寿命 t 就是荧光强度下降到最大荧光强度 F_0 的 $1/e$ 时所需要的时间。

1.4 常见的荧光染料介绍

可用于生物标记与分析检测的荧光染料种类很多,下面仅做简单介绍。

1.4.1 咕吨类荧光染料

咕吨类荧光染料主要是指荧光素和罗丹明两类经典的染料,如图 1-2 所示。此类荧光染料的特点是水溶性好,吸收发射波长可从可见光到近红外区,量子产率高,光稳定性较好;但是由于染料中羟基和氨基的存在,使得该类染料对 pH 值敏感,在应用于离子或者生物分子探针时,对工作环境的酸碱性有特定的要求^[7]。

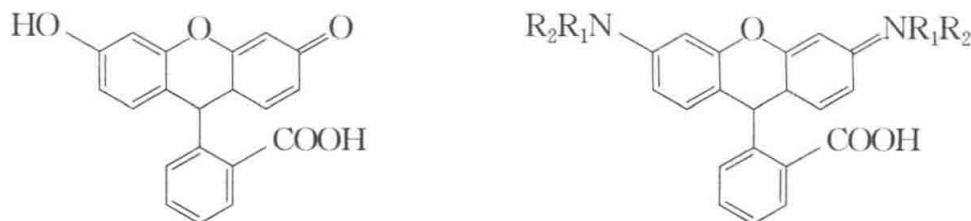


图 1-2 荧光素(左)和罗丹明(右)的分子结构

1.4.2 萘酰亚胺类荧光染料

萘酰亚胺类染料(图 1-3)能与 DNA 相互作用,是一种 DNA 嵌入剂,稳定性好,量子产率较高,是很有用的生物标记用荧光染料^[8]。不过萘酰亚胺类染料的最大吸收发射波长小于 500 nm,属于较短波长的一类荧光染料。通过对 R_2 、 R_3 位的基团修饰(如供电基团氨基)则可以很好地促使光谱波长红移。另外,萘酰亚胺类染料的摩尔消光系数较低,染料的颜色较浅。

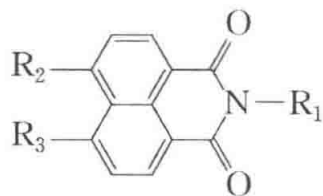


图 1-3 萘酰亚胺类染料结构

1.4.3 芘类荧光染料

芘类染料母体本身荧光不强,但是其含有供电基团的衍生物的荧光量子产率可达 0.5 以上。其中的 a 位是反应活性位点,可以与含羰基的化合物反应,引入活性基团(图 1-4)。由于该染料分子为平面结构,在溶剂中有很强的积聚效应,并在 470 nm 附近出现长波长的荧光发射,这个性质常常被用来设计成芘基激缔合物荧光探针^[9],另外芘的平面性也使得它比较适合作为 DNA 的嵌入型探针。芘染料极其稳定,长时间接受光照或酸碱都不会引起结构的变化,但最大吸收波长过短($<370\text{ nm}$),荧光受生物体内各种物质强烈干扰。另外芘的溶解性也很差,提高溶解度的方法通常是引入特定的取代基。

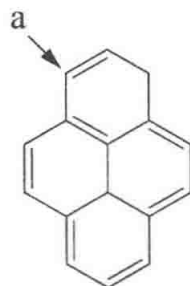


图 1-4 芘的母体结构

1.4.4 菁类荧光染料

在近红外荧光标记染料中,菁类染料发挥着最重要的作用。图 1-5 是含有磺酸基的典型的菁染料结构示意图。一般来说,这类染料的最大吸收和最大发射波长都超过了 600 nm,并且可通过改变中间共轭碳链的长短(如 Cy3, Cy5, Cy7 等)在极广的范围内调节其光谱性质;它们还具有很高的摩尔消光系数,并且可以方便地引入水溶性基团(如羧基、磺酸基和羟基);同时中间的甲川链可用刚性的芳香环或芳香杂环来取代,更大地提高了其光谱性能,具有广泛的应用价值。此类染料最大的缺点是光稳定性稍差,多甲川结构容易在光照下氧化断裂,导致染料分解。另外,此类染料荧光量子产率通常不高,也影响了其自身的广泛应用。

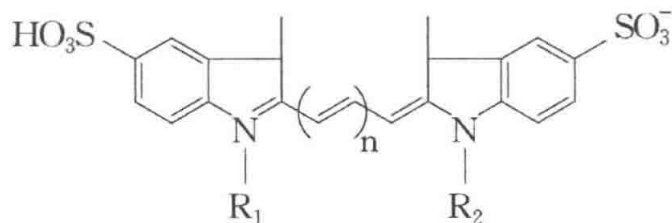


图 1-5 含磺酸基的菁染料结构

1.4.5 香豆素类荧光染料

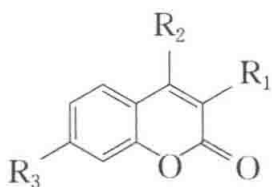


图 1-6 香豆素的母体结构

香豆素类染料的母体本身并无荧光,但其荧光的有无或强弱与母体分子上取代基的种类和位置有很大的关系(图 1-6),如羟基香豆素在紫外灯下大多能显示出蓝色荧光,在碱溶液中荧光会明显增强。此类染料 Stokes 位移较大,光照稳定性较好,而且由于染料分子的体积比较小,能较容易地穿透细胞。其不足之处是吸收发射波长较短($<400\text{ nm}$),且分子中的不饱和内酯结构在碱性溶液中会渐渐水解生成顺邻羟桂皮酸盐,加热后可进一步不可逆地转化为反邻羟桂皮酸盐(安定状态),因此香豆素在碱性条件下是不稳定的^[10]。

1.4.6 含四吡咯(Tetrapyrrole-based)基团类荧光染料

这类染料包括卟啉(Porphyrin)与酞菁(Phthalocyanine),它们属于近红外荧光染料(图 1-7)。卟啉主要用于研究生物大分子,如 DNA 和蛋白质的结构、性能与功能,并通过荧光技术,测定其性能和结构的改变。卟啉与 DNA 的作用中有 3 种作用模式:静电作用、嵌入作用及堆积作用^[11]。与卟啉相比,酞菁染料对光、氧、热有较好的稳定性,广泛用于疾病诊断与组织造影方面^[12-15]。这类染料的缺点是溶解度较差,体积较大,在生物应用时会影响生物分子的生理性能。

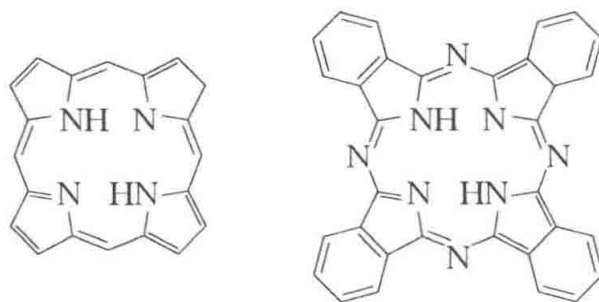


图 1-7 卟啉(Porphyrin)与酞菁(Phthalocyanine)的母体结构

1.4.7 噻嗪和噁嗪类染料

噻嗪和噁嗪类染料均含有可用来进行标记的氨基基团,目前常用的这类染料有耐尔蓝^[16]、耐尔红^[17,18]、亚甲基蓝^[19,20]、噻嗪 750^[21]等(图 1-8)。噻嗪