

BODIPY 基荧光探针的合成、表征及对铜离子的检测 ——推荐一个大学综合化学实验

何 田 顾峥烨 曾雨霏 胡余宗 尹守春*

(杭州师范大学材料与化学化工学院, 杭州 310036)

摘要: 介绍了一个大学综合化学实验——BODIPY 基荧光探针的合成、表征及对铜离子的检测。该实验是一个科研转化的大学生综合化学实验, 内容包括 3,5-二氯 BODIPY 的合成、BODIPY 基荧光探针分子的合成, 以及利用紫外-可见分光光度计和荧光光谱仪检测目标分子对金属离子的响应性。通过本实验, 使学生了解 BODIPY 基荧光传感器这一科研前沿领域, 激发学生对科学研究的兴趣, 培养学生的科研探究能力。本实验综合了有机化学、仪器分析和应用波谱学知识点的学习, 培养学生的实验操作技能, 提升学生的综合及创新能力, 建议纳入高年级综合化学实验课程。

关键词: 3,5-二氯 BODIPY; 荧光探针; 紫外-可见光谱; 荧光; 综合化学实验

中图分类号: G64; O6

Synthesis and Characterization of a BODIPY Fluorescent Probe and Its Application in Detection of Cu^{2+} Ions: A Comprehensive Chemical Experiment for College Students

HE Tian GU Zheng-Ye ZENG Yu-Fei HU Yu-Zong YIN Shou-Chun*

(College of Material, Chemistry and Chemical Engineering, Hangzhou Normal University,
Hangzhou 310036, P. R. China)

Abstract: A new comprehensive chemical experiment for college students is introduced, including the synthesis and characterization of a fluorescent probe based on BODIPY, as well as its application in detection of Cu^{2+} ions. This experiment is from the achievements of scientific research. It includes the synthesis of 3,5-dichloro-8-(4-tolyl)BODIPY, the synthesis of a fluorescent probe based on BODIPY, and the detection of metal ions by UV-Vis spectrometer and Fluorescence spectrometer. Students' interest in fluorescent sensor based on BODIPY research can be stimulated and cultivated by this experiment. Furthermore, the experiment involves the knowledge of organic chemistry, instrumental analysis and applied spectroscopy, which can be used to improve students' experimental skills, comprehensive and innovative abilities. Thus, it is recommended to be included in the advanced comprehensive chemical experiment course.

Key Words: 3,5-dichloro-8-(4-tolyl)BODIPY; Fluorescent probe; UV-Vis spectroscopy; Fluorescence; Comprehensive chemical experiment

*通讯作者, Email: yinsc@hznu.edu.cn

基金资助: 浙江省“十二五”省级实验教学示范中心重点建设项目(浙教办函(2015)173号); 杭州师范大学高等教育课堂教学改革研究项目

开设综合化学实验的主要目的是培养学生运用所学的“四大类化学”理论知识,巩固基本实验技能,提高学生分析和解决问题的能力。近年来,国内部分高校通过改革综合化学实验,将其与教师的科研成果以及学生创新科研活动结合在一起,构成研究型综合化学实验,取得良好的实验效果^[1-3]。杭州师范大学材料与化学化工学院的学生经过一年级的基本实验操作后,在二年级大部分学生以科研助理的身份进入学院的各个科研课题组参与科研工作。为了更好地激发学生的自主探索和创造性,学院鼓励教师将个人的科研工作和实验教学结合起来,进行综合化学实验的改革。

近年来,BODIPY (4,4-二氟-4-硼-3a,4a-二氮杂-s-引达省)荧光染料由于具有高摩尔消光系数和荧光量子产率、良好的化学稳定性、窄的吸收和发射峰以及易于通过分子结构修饰调控吸收和发射波长等优点,引起人们广泛的研究兴趣^[4-5]。BODIPY 现已被广泛地应用于荧光探针、光捕获系统、DNA 标记及测序、荧光发光材料和光动力疗法的光敏剂等领域^[6-11]。

本实验内容是我们课题组关于 BODIPY 基荧光探针研究成果的一部分,以廉价易得的药品作为初始原料,首先通过缩合、卤代、氧化和成环反应合成 3,5-二氯 BODIPY,然后通过简单的 S_N2 取代反应合成荧光探针分子。利用核磁共振仪和质谱仪对其进行结构表征后,采用紫外-可见分光光度计和荧光光谱仪对荧光探针分子进行金属离子响应性的测定。通过本综合实验的具体操作,学生不仅可以巩固抽滤、萃取和硅胶色谱柱等有机化学基本操作,而且可以掌握仪器分析化学中的紫外-可见分光光度计和荧光光谱仪等仪器的使用和数据处理方法。同时,本综合实验还可以通过肉眼可见的溶液颜色变化,把实验现象和光谱的理论知识(即溶液颜色和波段相对应,出现蓝光和红光等)结合起来,让学生完成一个可以“看得见”的综合化学实验,体会到知识应用的乐趣,为日后从事相关行业的工作或者研究生的科研工作打下扎实的基础。

1 实验目的

(1) 通过文献查阅,熟悉化学几大资源数据库的使用,了解 BODIPY 基荧光探针在各个领域的研究现状以及应用前景;

(2) 掌握基础的合成实验方法操作,提升各种分离纯化方法的实验技能;

(3) 掌握旋转蒸发仪、紫外-可见分光光度计和荧光光谱仪等仪器的操作;了解核磁共振仪和质谱仪的检测原理以及操作方法;学会核磁、质谱、紫外和荧光等仪器的数据处理和图谱分析。

2 实验原理

BODIPY 基荧光探针分子的合成原理如下:以市面可售的吡咯和对甲基苯甲醛为起始原料,通过缩合、卤化、氧化以及成环反应后,再经过滤、洗涤、干燥和萃取分离等手段得到纯的 3,5-二氯 BODIPY。然后,3,5-二氯 BODIPY 与二(吡啶-2-甲基)胺在乙腈溶液中进行 S_N2 取代反应得到高产率的 BODIPY 基荧光探针分子。合成路线如图 1 所示。

分子内电荷转移(intramolecular charge transfer, ICT)荧光探针分子通常是荧光团上同时连有推电子基团(电子给体, Donor)和吸电子基团(电子受体, Acceptor),通过 π 键提供电子转移的通道,形成强的推-拉作用的共轭体系,其吸电子基团或推电子基团本身充当识别基团的一部分。当识别基团和客体结合时,会对荧光团的推-拉电子作用产生影响,减弱或强化分子内电荷转移,从而导致荧光光谱的变化,主要是光谱发生蓝移或红移。

3 试剂与仪器

试剂:对甲基苯甲醛,吡咯,去离子水,浓盐酸,氨水,石油醚,二氯甲烷,乙酸乙酯,四氢呋喃,N-氯代丁二酰亚胺,2,3-二氯-5,6-二氰对苯醌(DDQ),三氟化硼-乙醚,三乙胺,二(吡啶-2-甲基)胺,

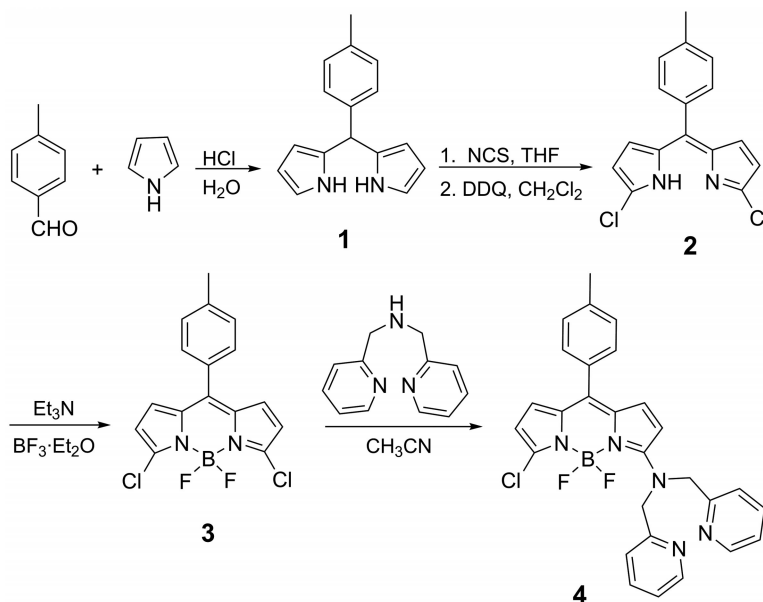


图1 BODIPY基荧光探针分子的合成路线图

乙腈, 无水硫酸钠, 碳酸氢钠, 无水硫酸镁, 三水合高氯酸钡, 六水合高氯酸镉, 六水合高氯酸镁, 六水合高氯酸钴, 六水合高氯酸镍, 六水合高氯酸铜, 六水合高氯酸亚铁, 六水合高氯酸锌, 无水高氯酸银, 三水合高氯酸铅, 四水合高氯酸钙, 六水合高氯酸锰, 无水高氯酸钾, 一水合高氯酸钠, 所用试剂均为分析纯。

仪器: 旋转蒸发仪, 磁力搅拌器, 电子天平, 循环水式真空泵, 低温反应仪, 紫外分析仪, 核磁共振仪, 质谱仪, 紫外-可见分光光度计, 荧光光谱仪。

4 实验步骤

4.1 2,2'-(*p*-甲基甲烷)-双(1*H*-吡咯)(化合物1)的合成

氩气保护下, 将吡咯(4 mL, 57.8 mmol)、浓盐酸(5 mL)和去离子水(200 mL)加入到500 mL锥形瓶中, 室温反应0.5 h。然后, 将对甲基苯甲醛(1.14 mL, 9.63 mmol)加入到上述混合液中, 继续室温反应1 h。反应结束后, 加入氨水(2 mL)淬灭反应。抽滤, 用去离子水和石油醚各洗涤3次后, 得到灰白色的固体(1.73 g, 76%)。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 293K): δ 7.91 (s, 2H), 7.12 (m, 4H), 6.69 (dd, 2H, $J = 4.4$ Hz, 2.8 Hz), 6.16 (dd, 2H, $J = 5.6$ Hz, 2.8 Hz), 5.93 (dd, 2H, $J = 5.6$ Hz, 4.4 Hz), 5.45 (s, 1H), 2.34 (s, 3H)。

4.2 2-氯-5-((5-氯-2*H*-吡咯基-2-亚基)(*p*-甲基甲烷)-1*H*-吡咯(化合物2)的合成

将化合物1 (0.95 g, 4.0 mmol)溶于80 mL四氢呋喃, 通入氮气10 min后, 待低温反应仪达到-78 °C后, 将反应瓶置于其中, 用恒压滴液漏斗缓慢滴加80 mL含*N*-氯代丁二酰亚胺(1.06 g, 8.0 mmol)的四氢呋喃溶液后, 在-78 °C搅拌反应2 h。然后, 将温度升至室温, 继续反应18 h。将100 mL含DDQ (539 mg, 2.38 mmol)的二氯甲烷溶液逐滴加入到上述溶液中, 反应混合液继续室温搅拌反应1 h。加入20 mL饱和NaHCO₃水溶液淬灭反应后, 再加入200 mL水, 收集有机层, 有机层用无水Na₂SO₄干燥。用柱色谱以石油醚: 二氯甲烷 = 1:1 (*V/V*)为展开剂分离, 得到红色固体(510 mg, 78%)。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 293K) δ (ppm): 7.32 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz), 7.24 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz), 6.55 (d, 2H, $J = 4.4$ Hz), 6.25 (d, 2H, $J = 4.4$ Hz), 2.44 (s, 3H)。

4.3 3,5-二氯-8-(4-甲基苯基)-4,4-二氟-4-硼-3a,4a-二氮杂-s-引达省(化合物3)的合成

将化合物2 (460 mg, 1.50 mmol)溶于60 mL二氯甲烷, 加入2 mL三乙胺, 室温反应1 h, 再加入三氟化硼乙醚溶液(3.75 mL, 30.2 mmol)后, 继续反应12 h。然后, 加入100 mL去离子水, 收集有机层, 有机层用无水 Na_2SO_4 干燥。用柱色谱以石油醚:二氯甲烷=1:1 (V/V)为展开剂分离, 得到深红色固体(508 mg, 92%)。 ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 , 293K) δ : 7.40 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 7.33 (d, J = 7.8 Hz, 2H), 6.87 (d, J = 4.1 Hz, 2H), 6.44 (d, J = 4.3 Hz, 2H), 2.48 (s, 3H)。

4.4 3-氯-5-*N*-(2-吡啶甲基)氨基-8-(4-甲基苯基)-4,4-二氟-4-硼-3a,4a-二氮杂-s-引达省(化合物4)的合成

将化合物3 (110 mg, 0.25 mmol)和二(吡啶-2-甲基)胺(80 mg, 0.4 mmol)溶于20 mL乙腈中, 在氩气保护下反应12 h。旋蒸除去溶剂后, 用二氯甲烷(100 mL $\times$ 3)进行萃取。收集有机层, 有机层用无水 MgSO_4 干燥。减压旋蒸除去二氯甲烷后, 用柱色谱以石油醚:乙酸乙酯=1:4 (V/V)为展开剂分离, 得到橘红色固体(124 mg, 92%)。 ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 , 293K) δ (ppm): 8.47 (d, J = 4.7 Hz, 2H), 7.59 (s, 2H), 7.35 (s, 2H), 7.26 (s, 2H), 7.18 - 7.11 (m, 4H), 6.74 (d, J = 5.1 Hz, 1H), 6.26 (d, J = 3.9 Hz, 1H), 6.21 (d, J = 5.1 Hz, 1H), 6.13 (d, J = 3.9 Hz, 1H), 5.18 (s, 4H), 2.35 (s, 3H)。

5 结果与讨论

5.1 BODIPY基荧光探针分子的结构表征

BODIPY基荧光探针分子的结构可采用核磁共振氢谱、高分辨质谱和红外图谱来进行表征。图2为BODIPY基荧光探针分子的核磁共振氢谱。由图2可知, 8.47、7.59、7.35和7.26处分别为二(吡啶-2-甲基)胺苯环上N原子的邻、对、间位上的8个氢(图2中分子结构式中标注11-18); 7.18-7.11区间的4个氢, 为苯环上的氢(标注7-10); 6.74、6.26、6.21和6.13处的4个氢, 为BODIPY环上的氢(标注3-6)。BODIPY基荧光探针分子计算得到值为 $\text{C}_{28}\text{H}_{23}\text{BClF}_2\text{N}_5$ 513.1812, 通过高分辨质谱测得值为513.1833, 两者相符合。

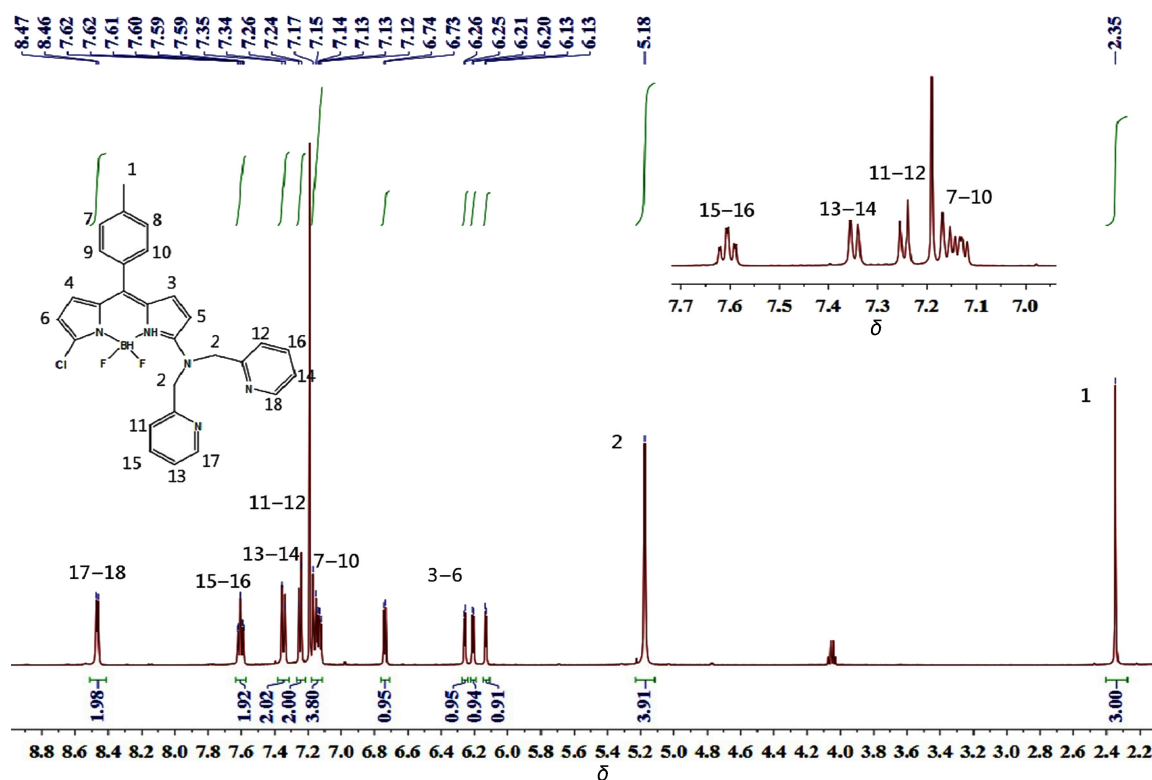


图2 BODIPY基荧光探针分子的核磁共振氢谱图

图3为BODIPY基荧光探针分子的红外图谱。由图3可知, 2926、2856 cm^{-1} 是甲基上的C—H的伸缩振动峰, 1580–1416 cm^{-1} 是苯环上的C—H伸缩振动峰, 1350 cm^{-1} 是二(吡啶-2-甲基)胺苯环C—N的伸缩振动峰, 820 cm^{-1} 是苯环对位取代的C—H面外弯曲振动峰。

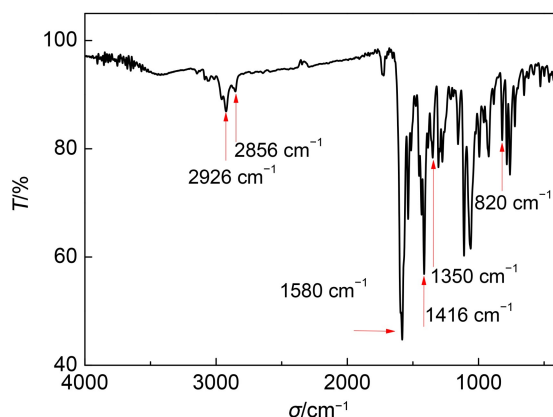


图3 BODIPY基荧光探针分子的红外谱图

5.2 BODIPY基荧光探针分子的生色效应

将BODIPY基荧光探针分子配制成浓度为 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的乙腈溶液, 再选取 Na^+ 、 K^+ 、 Ag^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Co^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Fe^{2+} 这14种金属离子的高氯酸盐, 分别配制成浓度为 $500 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的乙腈溶液。用移液枪分别移取 $2.5 \mu\text{L}$ 上述14种金属离子溶液, 然后加入到3 mL的荧光探针分子溶液中, 实验结果如图4所示。在自然光下, Cu^{2+} 离子的加入会导致溶液颜色由原来的黄色变为粉红色, 而加入其他金属离子溶液后, 原来溶液的颜色基本没有发生明显变化。在365 nm紫外灯照射下, 也只有 Cu^{2+} 溶液呈现出明亮的桔粉色。这些结果说明此荧光探针分子对 Cu^{2+} 具有唯一响应性, 并且可以通过肉眼观察到。

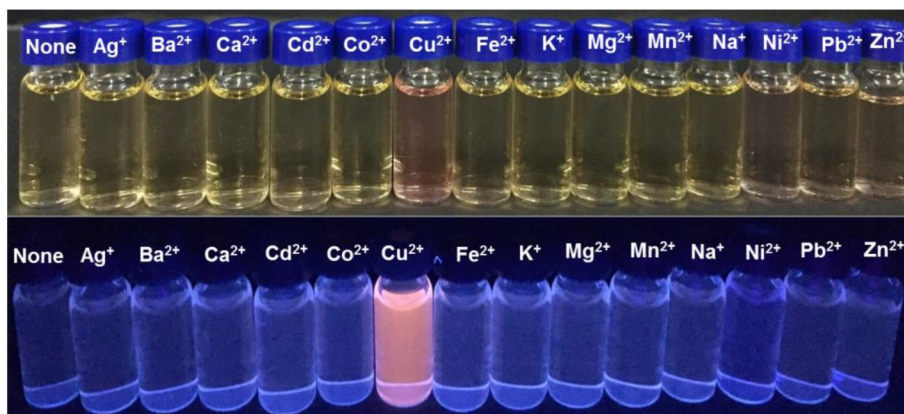


图4 在自然光和紫外灯(365 nm)照射下14种金属离子和空白荧光探针溶液的颜色对比图
电子版为彩色

紫外-可见和荧光光谱的结果进一步验证了上述结论。如图5所示: 除了 Cu^{2+} 外, 其他金属离子加入到BODIPY基荧光探针的乙腈溶液后, 紫外-可见光吸收光谱图并没有发生显著的变化。然而, 当加入 Cu^{2+} 离子后, 在545和575 nm处出现两个新的紫外吸收峰; 相较于未加 Cu^{2+} 的525 nm处紫外吸收峰, 加入铜离子会导致BODIPY基荧光探针的紫外吸收峰红移50 nm。这是由于荧光探针分子和 Cu^{2+} 发生络合反应后, 发生了分子内电荷转移。

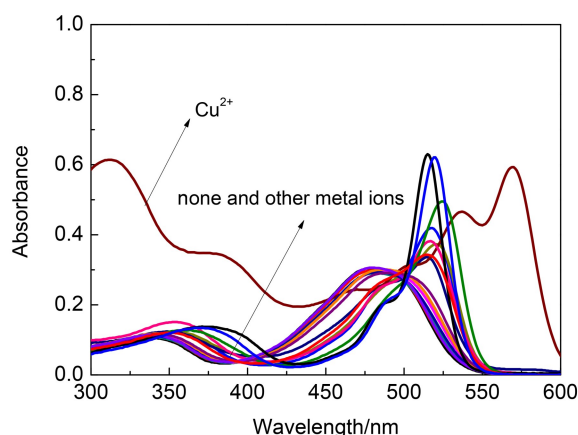


图5 含和不含金属离子($500 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)的荧光探针乙腈溶液($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)的紫外-可见吸收光谱对比图

使用 365 nm 激发波长激发含金属离子($500 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)和空白的荧光探针乙腈溶液($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 分别测得相应的荧光光谱图。由图6可知, 除了 Cu^{2+} 外, 其他金属离子和空白的荧光探针分子乙腈溶液相比, 荧光发射峰的位置几乎相同, 荧光强度略有不同。而 Cu^{2+} 的加入, 荧光探针乙腈溶液在 557 nm 处的荧光发射峰强度明显增强, 并且在 585 nm 处出现一个新的强荧光发射峰。

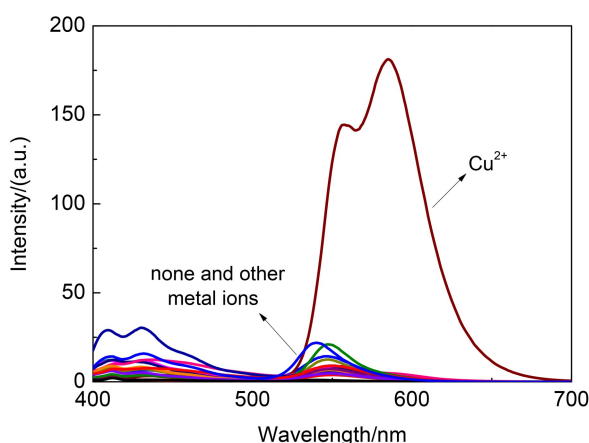
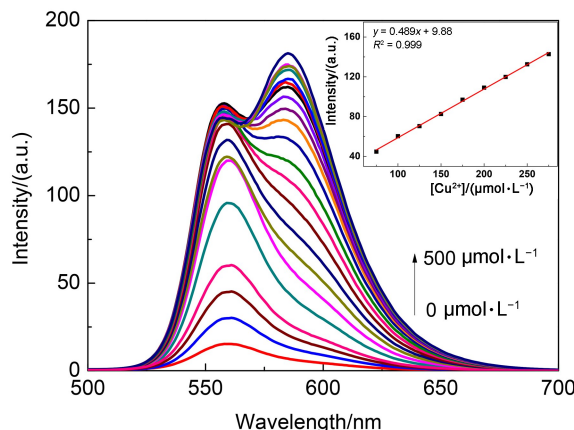
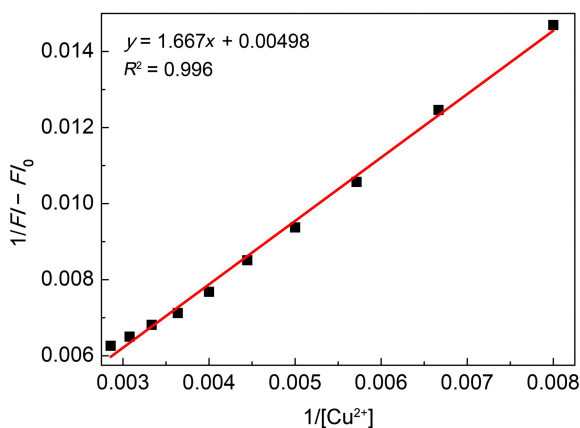


图6 含和不含金属离子($500 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)的荧光探针乙腈溶液($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)的荧光光谱对比图($\lambda_{\text{ex}} = 365 \text{ nm}$)

5.3 BODIPY 基荧光探针分子的检测极限和结合常数 K_a 的测定

将 $100 \mu\text{L}$ 浓度为 $500 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Cu^{2+} 乙腈溶液逐步滴定(每次加入 $5 \mu\text{L}$)到 3 mL 浓度为 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 BODIPY 基荧光探针分子乙腈溶液中, 测定每次滴加后的荧光发射图谱。如图7所示, 随着 Cu^{2+} 浓度的增大, 557 nm 处的荧光发射峰强度逐渐增强, 并且在 585 nm 处出现一个新的荧光发射峰。585 nm 处的荧光强度可增强至原来的 180 倍。通过测试 20 组空白样品的荧光发射, 可计算出标准偏差 S 为 4.395; 对荧光滴定曲线进行线性拟合后(图7插图所示), 可得到斜率 k 为 0.489。根据检测极限的计算公式 $DL = 3\delta/k$, 可计算出该 BODIPY 基荧光探针分子对 Cu^{2+} 离子的检测极限为 $26.96 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

以 $1/[\text{Cu}^{2+}]$ 为横坐标, $1/(FI - FI_0)$ 为纵坐标对上述滴定曲线进行作图(图8), 其中 FI 是在 585 nm 处不同浓度的 Cu^{2+} 溶液的荧光强度, FI_0 是在 585 nm 处未加 Cu^{2+} 离子的荧光强度。根据 Benesi-Hildebrand 方程: $1/(FI - FI_0) = 1/\{K_a \times (FI - FI_0) \times [\text{Cu}^{2+}]\} + 1/(FI - FI_0)$, 可计算得到 BODIPY 基荧光探针分子与 Cu^{2+} 离子的结合常数 K_a 值为 $2.99 \times 10^3 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L}$ 。

图7 荧光探针乙腈溶液($10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)的 Cu^{2+} 滴定荧光光谱图($[\text{Cu}^{2+}]$: $0\text{--}500\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)图8 $1/[\text{Cu}^{2+}]$ 与 $1/(FI - FI_0)$ 的线性关系图

6 实验注意事项

本实验建议在短学期开设,因涉及实验内容较多,学生一般分为4-6人一组,集中10天时间完成实验。根据前几届学生的实验操作情况,实验指导教师需注意以下几点:

- (1) 实验步骤4.1和4.4小节在进行氩气保护操作时,需用氩气进行除氧操作,这样有助于提高产率;
- (2) 实验步骤4.2小节中低温操作前,一定要事先检查圆底烧瓶是否有破损,以免烧瓶低温下被冻坏。同时,圆底烧瓶须缓慢放入低温反应仪中;
- (3) 实验合成过程中需叮嘱学生注意反应混合液颜色的变化,及时淬灭反应,否则产物会被氧化;
- (4) 进行紫外-可见和荧光滴定实验须提醒学生仪器操作的规范性,不可随意操作,以免出现仪器故障。

7 结 语

本实验是科研转化成教学的综合化学实验,整个实验过程主要包括3,5-二氯BODIPY的合成、BODIPY基荧光探针的合成、紫外-可见滴定和荧光滴定实验。该综合实验有效地将有机化学、仪器分析以及应用波谱学的实验教学内容紧密地关联起来,因此适合对高年级段的学生开设此实验。杭州师范大学的综合实验设在短学期集中开设,“四大化学”各提供数个实验由学生自主选择其中2个,

根据实验课时数、实验室条件和学生的科研兴趣,又可将此实验分成有机合成和分析应用2个部分开展:(1)荧光探针分子的合成和结构表征,实验内容主要包括实验部分的4和5.1小节;(2)荧光探针分子对不同金属离子的响应性、对 Cu^{2+} 离子的最低检测限以及结合常数 K_a 的计算,见实验部分的5.2和5.3小节。实验过程中学生可对旋转蒸发仪、紫外-可见分光光度计和荧光光谱仪等仪器进行自主操作,掌握操作方法,提升实验操作技能;充分了解科研工作应包含的实验过程;根据实验结果进行数据分析,提高他们的科研素质和解决问题的能力;为毕业论文设计、今后的深造或者走向工作岗位奠定扎实的基础。经过前几届学生实验所取得良好的教学效果,建议本实验纳入高年级段的学生综合实验。

结合实验教学知识点,可设相关思考题如下:

- (1) 查阅相关文献,3,5-二氯BODIPY可进行哪些反应?
- (2) 分离纯化有几种方法,本实验操作时有哪些注意事项?
- (3) 低温合成的实验操作需要注意哪几点?
- (4) 为得到理想的荧光光谱数据,在进行紫外-可见吸收光谱测试时应将吸光度控制在什么范围内,对溶液浓度有怎样的要求?
- (5) 什么是生色效应?

参 考 文 献

- [1] 吕占霞,贺维军,高 珍,范星河. 大学化学, **2011**, 26 (1), 14.
- [2] 张逢星,李 珺,郭慧林. 大学化学, **2009**, 24 (3), 19.
- [3] 牛国兴,高 翔,徐华龙. 大学化学, **2012**, 27 (4), 27.
- [4] Loudet, A.; Burgess, K. *Chem. Rev.* **2007**, 107 (11), 4891.
- [5] Ulrich, G.; Zissel, R.; Harriman, A. *Angew Chem. Int. Ed.* **2008**, 47 (7), 1184.
- [6] Li, Z.; Miller, E. W.; Pralle, A.; Isacoff, E. Y.; Chang, C. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128 (1), 10.
- [7] Peng, X. J.; Du, J. J.; Fan, J. L.; Wang, J. Y.; Wu, Y. K.; Zhao, J. Z.; Sun, S. G.; Xu, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129 (6), 1500.
- [8] Cheng, T. Y.; Xu, Y. F.; Zhang, S. Y.; Zhu, W. P.; Qian, X. H.; Duan, L. P. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130 (48), 16160.
- [9] Lee, H. Y.; Bae, D. R.; Park, J. C.; Song, H.; Han, W. S.; Jung, J. H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48 (7), 1239.
- [10] Harriman, A.; Izzet, G.; Zissel, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128 (33), 10868.
- [11] Liu, J. Y.; Ermilov, E. A.; Röder, B.; Ng, D. K. P. *Chem. Commun.* **2009**, 1517.