

•化学实验•

doi: 10.3866/PKU.DXHX202208102

www.dxhx.pku.edu.cn

半硫杂竹脉[6]大环分子的合成与离子跨膜转运性质测定 ——推荐一个大学综合化学实验

鲁轶楠, 罗逸尘, 李艳, 孙鸿程*, 刘俊秋

杭州师范大学材料与化学化工学院, 杭州 311121

摘要: 介绍了一个以半硫杂竹脉[6]大环分子(stBU[6])为研究对象的综合实验, 涉及制备、表征、性能测试等实验基础步骤。该实验与学科热点、学术前沿紧密结合, 科教融合, 通过一系列荧光测试, 引导学生了解离子跨膜传输的作用机制, 熟悉大型仪器使用, 为学生拓展视野、提高综合实践能力等打好基础。

关键词: 荧光检测; 跨膜转运; 人工离子通道

中图分类号: G64; O6

Synthesis of Macrocyclic Semithiobambus[6]uril for Transmembrane Anion Transportation: A Comprehensive Chemical Experiment for Undergraduate Students

Yinan Lu, Yichen Luo, Yan Li, Hongcheng Sun *, Junqiu Liu

College of Material, Chemistry and Chemical Engineering, Hangzhou Normal University, Hangzhou 311121, China.

Abstract: Herein, a comprehensive experiment was carried out to study the macrocyclic molecules of semithiobambus[6]uril (stBU[6]), involving the preparation, characterization, and performance testing. Through a series of fluorescence tests, the students are guided to understand the mechanism of ion transmembrane transport, familiarize themselves with large-scale instruments, and broaden their horizons to lay a good foundation for improving their comprehensive practical skills.

Key Words: Fluorescence detection; Transmembrane transport; Artificial ion channel

综合创新实验是一门训练学生综合实验能力的重要课程, 一方面使学生对四大化学的基础理论知识得到充分的理解、运用, 另一方面也对学生的创新思维、实践能力提出了拔高性要求。但是, 当前高校的教学实验课程中对现代前沿技术的相关应用和介绍较少, 对学生后续的科研工作造成一定困难。随着交叉学科快速发展, 将其用于综合创新实验, 已然成为了促进当前学科进步发展的建设性内容。

结合目前化学与生物医学交叉学科的发展大趋势, 我们基于本课题组中具有教学性、可行性、完整性、实践性的工作内容, 科教融合, 积极推动相应的科研成果转化为有效的教学实验成果。

生物体离子转运是维持细胞生物功能的关键, 是实现多种细胞信号转导功能的重要过程, 而离子转运紊乱通常是导致一些疾病的主要原因。因此, 设计和合成人工通道^[1]来替代病变的蛋白通道, 具有重要的研究意义和药用开发价值。近年来, 穴状大环主体分子的结构与功能备受关注, 已被广

收稿: 2022-08-19; 录用: 2022-09-19; 网络发表: 2022-10-10

*通讯作者, Email: sunhc@hznu.edu.cn

基金资助: 2021年杭州师范大学教学建设与改革项目; 2021年杭州师范大学“星光计划”项目

泛用于设计分子器件、传感器,开发智能开关和高性能催化剂。其中,竹脲大环分子^[2]是一种极其有效的跨膜阴离子转运体,具有易合成、易检测的特点,是综合创新实验的优良研究对象。

所以,本实验以设计合成并验证一种跨膜阴离子转运体^[3]为教学内容,旨在让学生快速了解离子转运的相关作用机制,学习核磁、质谱、荧光这三种主要科研分析手段。在实验中,学生通过合成竹脲分子和磷脂囊泡^[4]等构建人工细胞,通过指示剂荧光信号变化判断人工转运体的传输性能。该实验方案涵盖了缩合反应、偶联反应等经典反应类型,旨在帮助学生由已学知识快速过渡前沿理论,提高理解力,培养学生创新和探索能力。同时本实验涉及了多步合成、分离纯化、结构表征、荧光分析等多个环节,帮助学生大型仪器的实验操作和数据处理,训练其综合实验能力。并且,本实验所涉及药品均为常规试剂,产物易合成、保存时间长且特征峰明显,结构明确,适合本科阶段的实验教学。

1 实验教学目的

- (1) 了解大环竹脲分子的合成方法及发展现状。
- (2) 学习核磁共振波谱仪和质谱仪的使用与数据分析。
- (3) 了解荧光光谱仪的工作原理,熟悉其基本操作与数据处理。
- (4) 学会用荧光分析法对跨膜离子转运体性能进行测定。

2 实验方案

竹环(Bambusurils, BU[*n*])是一类新型穴状大环分子,它是通过苕脲单元缩合形成的环状刚性结构,具有独特的表面静电、离子结合和可修饰性等特征。通过向竹环结构中引入极化能力较强的杂原子,其在空腔内部能够形成较强的电子阱,进而提高对阴离子的结合能力(图1)。以半硫杂竹脲[6](stBU[6])大环分子为例,利用4,5-二羟基咪唑啉-2-酮与 N,N' -二甲基硫脲偶联制备,制备硫代苕脲基元,再进一步通过与多聚甲醛在酸性条件下进行缩合反应,制备出粗产物,最后乙腈重结晶获得纯化的stBU[6]目标分子。

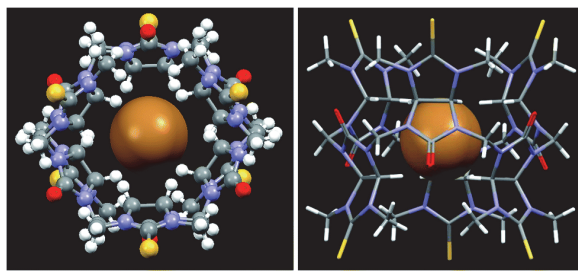


图1 半硫杂竹脲[6]大环分子结合离子示意图

黄色: S原子; 红色: O原子; 蓝色: N原子; 灰色: C原子; 白色: H原子, 橙色: 被传输离子
电子版为彩图

研究表明, stBU[6]大环分子能够通过腰部碳—碳单键旋转形成双层各三聚的孔道分子,能够对部分阴离子展现出较强的结合与快速转运能力。其离子转运性质可以使用人工合成的大单层磷脂囊泡(LUVs)作为细胞模型进行离子跨膜运输的实验测试,其原理如图2所示。利用离子响应探针的荧光信号变化对离子转运活性进行定量分析。

我们使用 E_0 、 E_∞ 及 E_t 分别代表初始荧光强度、最终荧光强度及 t 时刻的荧光强度值,则相对荧光强度变化 R_f 如公式(1)进行处理。

$$R_f = \frac{E_0 - E_t}{E_0 - E_\infty} \quad (1)$$

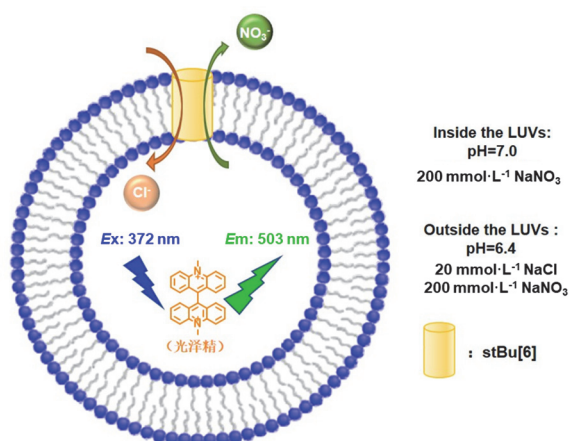


图2 荧光光谱分析测定离子转运模拟图

则转运体的离子转运速率的量化评价可以通过Hill方程(2)计算相关参数:

$$V = \frac{V_{\max} \cdot [S]^h}{K_{0.5}^h + [S]^h} \quad (2)$$

式中, V 为特定时长的相对荧光强度 R_f , $[S]$ 为加入异硫杂竹脒[6]的浓度, $V_{\max}$ 为最大氯离子传输时相对荧光强度, h 为Hill系数, $K_{0.5}$ 为最大转运效率50%时的浓度 IC_{50} 。

3 试剂与仪器

试剂: 4,5-二羟基四氢-2H-咪唑-2-酮、 N,N' -二甲基硫脲、多聚甲醛、对甲基苯磺酸、四丁基氯化铵、番红O、光泽精、胆固醇、1-棕榈酰基-2-油酰基卵磷脂(POPC)、曲拉通X-100、磷酸缓冲溶液(7.5)、氯化钠、溴化钠、碘化钠、硝酸钠、葡聚糖凝胶柱G-75柱料、浓盐酸、甲苯、甲醇、二甲基亚砜、氯仿、乙腈、蒸馏水。试剂均为分析纯。

仪器: RCH-1000加热磁力搅拌器(EYELA)、ME204E分析天平(梅特勒)、ZF-7A 型紫外灯(上海骥辉)、DHG-9140A鼓风干燥箱(上海一恒)、ADVANCE III 500 MHz 核磁共振仪(德国布鲁克)、RF-5301PC荧光光谱仪(日本岛津)、旋转蒸发仪(EYELA)、4度冰箱(中科美菱)

4 实验步骤

4.1 stBU[6]大环分子合成

stBU[6]大环分子合成步骤如图3所示, 具体如下: 将14.6 g的4,5-二羟基四氢-2H-咪唑-2-酮

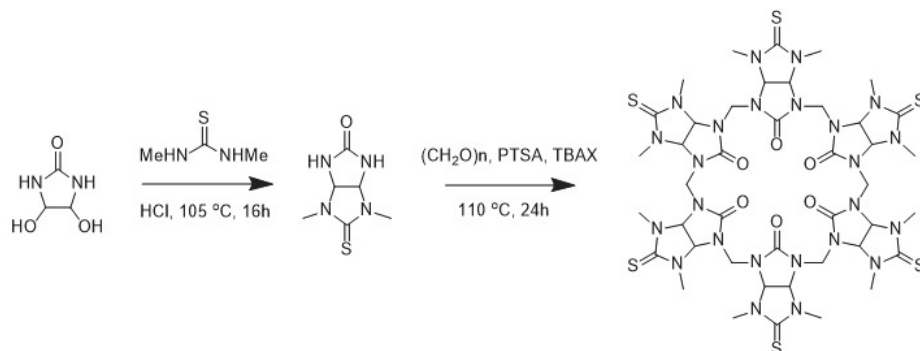


图3 stBU[6]大环分子的合成路线图

(0.1 mol)和10.4 g的 N,N' -二甲基硫脲(0.1 mol)分散在50 mL蒸馏水中,混合物加热至60 °C直至完全溶解。随后,将0.5 mL的浓盐酸滴加到上述混合溶液中并且继续加热2 h。趁热过滤除掉残余的固体不溶物,滤液冷却至室温析出固体,烘箱烘干得到淡黄色中间体,产率45%。

将1.0 g的中间体分子(5.5 mmol)、0.24 g的多聚甲醛(8.25 mmol)、0.58 g的对甲基苯磺酸(2.75 mmol)及0.28 g的四丁基氯化铵(0.88 mmol)溶解在60 mL的甲苯中。溶液在加热回流状态下反应12 h,冷却后减压蒸馏除去甲苯溶剂。粗产物在50 mL的甲醇中加热回流,趁热过滤两次,收集滤饼。将滤饼进一步溶解到50 mL的乙腈溶剂中并回流2 h,然后过滤、重结晶得到淡橘色得到stBU[6]目标产物,产率80%。 ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 5.13 (bs, 12H, CH), 4.87 (bs, 12H, CH_2), 2.84 (bs, 36H, CH_3); HRMS (TOF/ESI $^+$), m/z $\text{C}_{42}\text{H}_{60}\text{N}_{24}\text{O}_6\text{S}_6$ 计算值: 1188.3, 测定值: 1188.3。

4.2 LUVs囊泡的制备

阴离子选择性实验中LUVs 1的制备: 将10 mg的POPC卵磷脂首先溶解于3 mL的氯仿中,使其缓慢挥发形成一层磷脂膜。真空干燥3 h后,用1 mL含100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化钠的磷酸缓冲溶液(10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 6.4)于40 °C下水合2 h。使用温水浴-液氮反复冻融10次后,将混合溶液通过0.22 μm 的有机滤膜反复进行10次过滤挤出,即可得到均一的LUVs 1母液,浓度约为1.2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,于4 °C冰箱存储待用。

氯离子转运实验中LUVs 2的制备: 将10 mg的POPC卵磷脂首先溶解于3 mL的氯仿中,使其缓慢挥发形成一层磷脂膜。真空干燥3 h后,用含有光泽精(1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)的 NaNO_3 水溶液(200 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)于40 °C下水合2 h。使用温水浴-液氮反复冻融10次后,将混合溶液通过0.22 μm 的有机滤膜反复进行10次过滤挤出,即可得到均一的LUVs 2母液,浓度为0.3 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,于4 °C冰箱储存待用。

5 结果与讨论

5.1 产物核磁共振波谱(NMR)分析

利用 ^1H NMR对stBU[6]分子结构进行确认。其结果如图4所示, δ 5.13处的化学峰为4,6-二甲基-5-硫杂胍基元上的化学位移,4.88处出现亚甲基连接链段的化学峰,而2.84处的化学峰对应的是硫杂胍基元上的甲基峰,其峰面积比为1:1:3,与目标分子的理论值完全一致。进一步通过质谱分析发现分子的电离分子量为1188.34,与stBU[6]分子($\text{C}_{42}\text{H}_{60}\text{N}_{24}\text{O}_6\text{S}_6$)的理论值1188.3完全一致,证明了成功合成stBU[6]分子。

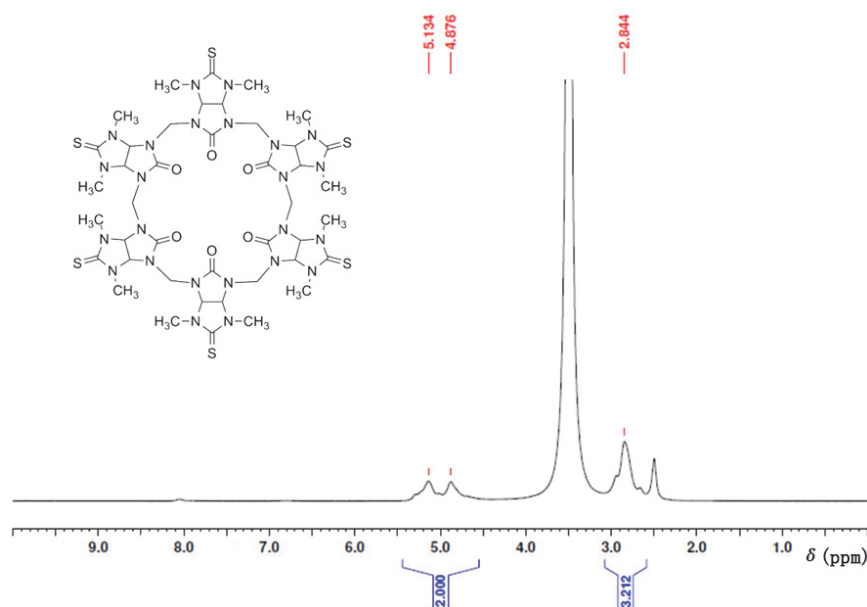


图4 stBU[6]大环分子的核磁图

5.2 stBU[6]离子跨膜传输性能测定

5.2.1 氯离子转运性能测定

利用含NaCl的LUVs 2对合成的stBU[6]大环分子的氯离子转运体的活力进行探究。在由POPC制备的大单层囊泡膜上施加氯离子梯度,通过检测光泽精的荧光强度指示氯离子的传输性能。将50 μL 的LUVs 2囊泡母液、1.95 mL含不同NaCl含量的 NaNO_3 溶液加入到荧光池中,在372 nm激发下记录503 nm处荧光发射强度 E_0 和 E_t 。最后,加入10 μL 50%的曲拉通X-100水溶液使所有的磷脂囊泡裂解记录 E_∞ 值。利用公示(1)计算任意时刻的 R_t 值。

如图5a所示, stBU[6]展现出优异的氯离子转运能力,而且随着浓度的升高,其离子转运速率也显著增大。为了对其活力进行定量的研究,对氯离子转运表现进一步进行了Hill分析。如图5b所示,通过计算300 s后的 R_t 与stBU[6]大环分子之间的相关关系,可以得出Hill系数 h 值为1.48,这表明其能够通过单分子转运的模式发挥其功能其半数转移时有效剂量 $K_{0.5}$ 值接近1.07 (mol%),代表着具有较高的氯离子转运活性^[5,6]。

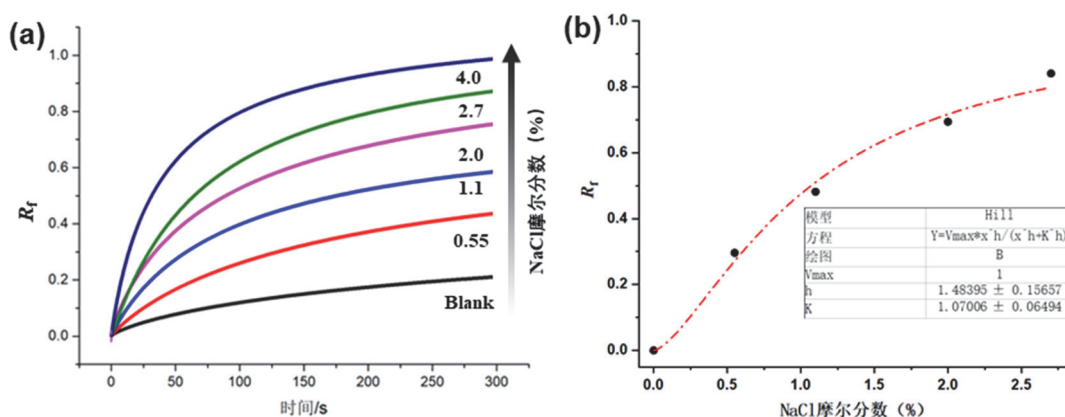


图5 氯离子转运性能测定

5.2.2 阴离子选择性转运性能测定

为了进一步研究stBU[6]大环分子对阴离子转运体的机理,使用含番红O的LUVs 1囊泡体系研究其对 Cl^- 、 Br^- 、 I^- 、 NO_3^- 的跨膜传输行为^[7]。因为番红O分子对于化学电位比较敏感,因此其荧光的变化就可以直接指示离子在囊泡内外的传输过程。

将10 μL 的囊泡母液、1.99 mL含有150 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 番红O和100 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 钠盐(NaA , $\text{A} = \text{Cl}^-$ 、 Br^- 、 I^- 、 NO_3^-)的磷酸缓冲溶液(10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 6.4)加入到荧光池子内,孵育一定时间后,将10 μL 、7.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的stBU[6]溶液加入到样品池中并持续搅拌,在522 nm激发下记录581 nm处荧光发射强度 E 随时间 t 的变化曲线。

如图6a所示,实验测得磷脂膜极化水平严重依赖于阴离子的种类, stBU[6]大环转运体对 NO_3^- 离子展现出较差的传输效率,而对 Cl^- 离子展现出最强的离子转运能力。通过分析300 s内stBU[6]对不同离子的转运效率可知(将 Cl^- 转运效率定义为100%),其对 Br^- 、 I^- 、 NO_3^- 的选择性转运效率分别为73%、54%和31% (图6b)。以上结果表明, stBU[6]转运体对 Cl^- 离子转运展现出较高的选择性,而且不同阴离子的选择性转运排序为: $\text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{I}^- > \text{NO}_3^-$ ^[8]。

6 实验组织运行的建议

(1) 本实验是将有机合成、结构表征、荧光分析以及生命中离子转运现象紧密结合的交叉类实验,具有操作简便、适用性强等优点。利用荧光光度计判定离子转运的速率,国内众多兄弟院校基本都能满足条件开设本实验。本综合实验可作为短学期选做实验项目,以自行组队的形式开展,每

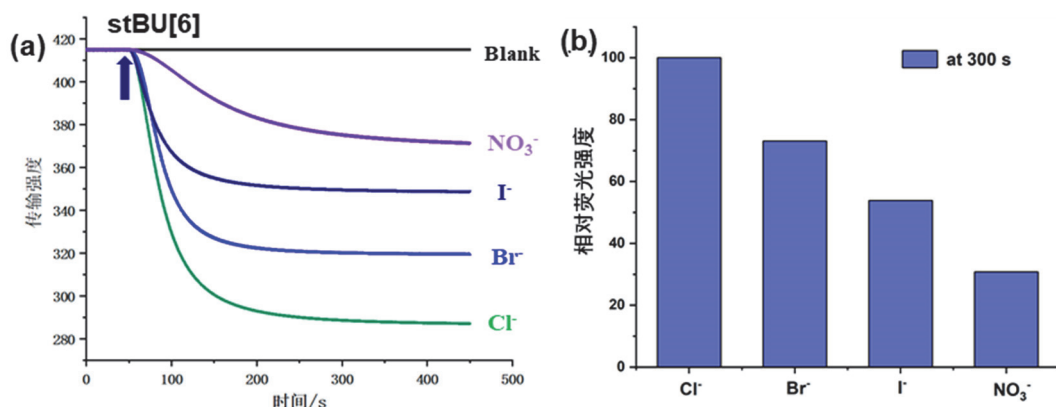


图6 阴离子选择性测定

组2–3人,建议准备及合成实验8课时,NMR、质谱表征与分析实验2课时,荧光测试4课时,共计14课时。各兄弟单位可根据教学大纲的课时安排,选做分子合成与核磁表征部分。

(2) 因核磁共振仪价格昂贵、维护成本高,可根据自身情况安排虚拟仿真实验,通过线上演示模拟与操作考核相结合,掌握仪器使用的正确方法和操作注意事项,达到实验教学效果^[9]。

(3) 实验过程中需要注意:① 控制试剂用量及配比,防止产率过低;② 制备LUVs囊泡时需要戴加厚手套,防止冻伤;③ 准确配制相应离子溶液时,注意pH对荧光强度的影响(太强或太弱都会影响其解离状态);④ 荧光测定时,搅拌溶液时动作快速且轻柔。

(4) 教师指导学生完成核磁共振谱图、质谱分析,介绍荧光强度计算公式的运用。实验报告强调学生对结果的分析 and 讨论,鼓励学生思考合成类似脲类化合物的路线,对实验结果进行合理分析。

7 结语

本实验采用缩合反应模块化合成大环竹脲分子,通过核磁、质谱对其结构进行表征,利用荧光光谱仪对其选择性等进行传输性能研究,将大学有机、分析基础知识与实验技术、学科前沿相结合。学生通过该实验提高文献检索、仪器使用、数据分析、方法讨论等能力,可将其应用到一系列分子生物学基本实验中,有利于学生完成接下来的毕业设计和研究生工作,对更广泛的学科背景和知识增添了解。

参 考 文 献

- [1] 鲁铁楠,钟思敏,孙鸿程,刘俊秋. 大学化学, **2022**, 37 (9), 2203064.
- [2] Lang, C.; Mohite, A.; Deng, X. L.; Yang, F. H.; Dong, Z. Y.; Xu, J. Y.; Liu, J. Q. *Chem. Commun.* **2017**, 53 (54), 7557.
- [3] 郭琦. 葫芦[6]脲与半葫芦[6]脲的合成、组装及结构[硕士学位论文]. 南宁: 广西大学, 2012.
- [4] 王常娇. 巨型磷脂囊泡内人工脂滴的水解行为初步研究[硕士学位论文]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2022.
- [5] Valkenier, H.; Judd, L. W.; Li, H.; Hussain, S.; Sheppard, D. N.; Davis, A. P. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, 136, 12507.
- [6] Bennett, W. F. D.; MacCallum, J. L.; Tieleman, D. P. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 1972.
- [7] Sidorov, V.; Kotch, F. W.; Kuebler, J. L.; Lamand, Y. F.; Davis, J. T. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 2840.
- [8] Soto-Cerrato, V.; Manuel-Manresa, P.; Hernando, E.; Calabuig-Fariñ, S.; Martínez-Romero, A.; Fernandez-Duenas, V.; Sahlholm, K.; Knöpfel, T.; García-Valverde, M.; Rodilla, A. M. *et al. J. Am. Chem. Soc.* **2015**, 137, 15892.
- [9] 何田,叶经涛,李洋,尹守春. 大学化学, **2023**, 38 (5), 143.