

稀土穴状荧光配合物的合成与光谱性质

常 宇 谢文兵 周誓红 李俊玲 刘宝峰 潘利华*

(中国科学院长春应用化学研究所, 高分子复合材料工程实验室 长春 130022)

摘 要 以 2,6-二甲基吡啶-3,5-二甲酸二乙酯为起始原料,经 *N*-溴代丁二酰亚胺(NBS)溴代、亲电取代反应合成了时间分辨荧光免疫分析双功能螯合剂 2,6- $\{N,N',N,N'\}$ -[二(2,2'-联吡啶-6,6'-二甲基)]二(氨基基)-吡啶-3,5-二羧酸二乙酯。经差热分析仪(DTA)、傅里叶变换红外光谱仪(FTIR)、核磁共振波谱仪(^1H NMR)、质谱仪(MS)等技术手段表征确认了化合物结构和性能。对该化合物与镧离子形成螯合物的荧光性质研究表明:激发光谱波长范围较宽,激发峰值为 322 nm;荧光发射峰为 597 nm ($^5D_0\text{-}^7F_1$)、618 nm ($^5D_0\text{-}^7F_2$);荧光寿命为 918 μs ;量子产率 $\Phi=0.249$ 。

关键词 均相时间分辨荧光免疫分析;螯合剂;合成;穴状联吡啶衍生物

中图分类号:O626

文献标识码:A

文章编号:1000-0518(2017)03-0361-06

DOI:10.11944/j.issn.1000-0518.2016.03.160232

时间分辨荧光免疫分析技术(TRFIA, Time-Resolved Fluoroimmunoassay)作为一项新型非放射性免疫分析技术^[1-4],利用稀土离子发射光谱窄、荧光寿命长、荧光强度高、斯道克斯位移大的特点,用稀土离子标记抗原和抗体等生物样品,采用时间分辨技术,克服了荧光免疫分析生物样品自身的大分子的散射等引起了高背景的缺点,极大地提高了分析灵敏度。

均相时间分辨荧光免疫分析(HTRF, Homogeneous Time-Resolved Fluoroimmunoassay)是对 TRFIA 技术的进一步发展,是 TRFIA 和荧光共振能量转移(FRET, Fluorescence Resonance Energy Transfer)的融合,提供了更高的灵敏度和稳定性^[5-9]。HTRF 系统除用于临床快速检测外,还可用于药物筛查、DNA 原位杂交分析、生物传感器、生物学领域的荧光探针、流式细胞仪、液相层析、电泳及组织化学研究等领域。对分子生物学、基础医学研究和临床诊断、生物制药、食品检验等行业发展具有重要价值。HTRF 技术的实验方法更灵活可靠,极大地拓展了 TRFIA 的应用领域。

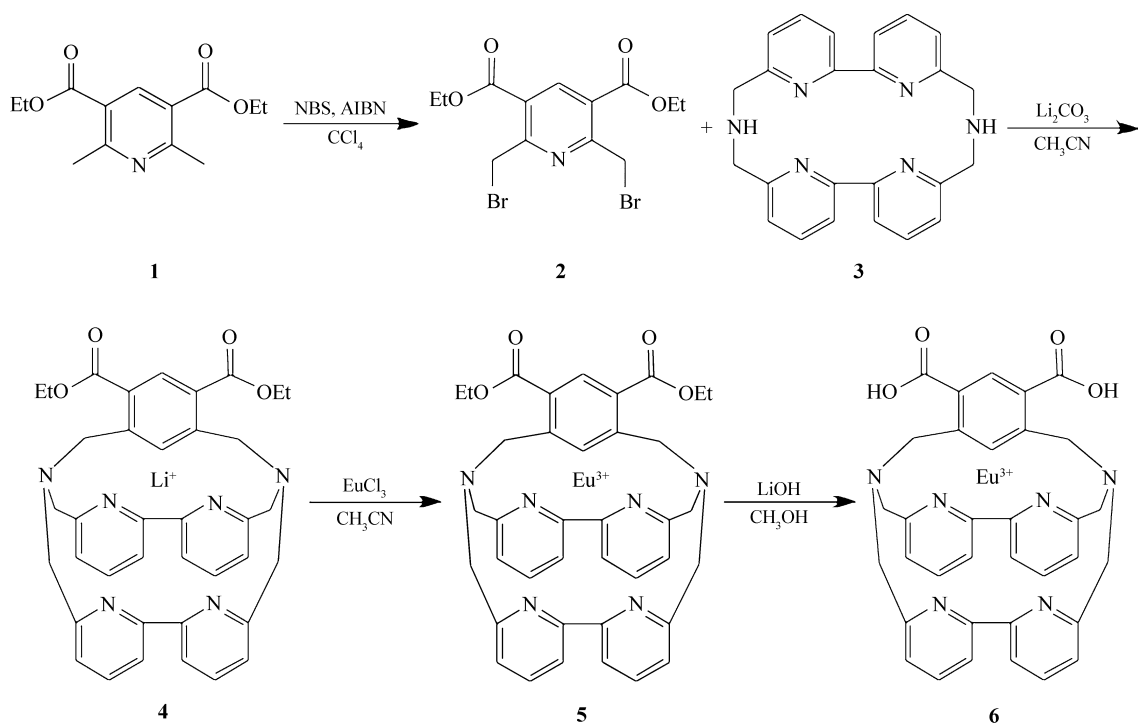
HTRF 最重要的核心技术是制备高效、高荧光强度的稀土双功能螯合剂的稀土配合物。用于免疫分析的稀土配合物与常规的稀土配合物不同,它必须存在可与生物物质连接的官能团,它不但要求高稀土量子产率、发光强度和动力学稳定性,而且还要求其在水中有较好的溶解性,荧光淬灭尽可能小,在荧光标记蛋白质时,不能使被标记物的免疫活性降低。因此,设计合成满足上述要求的稀土配合物,一直是在免疫分析领域具有挑战性的课题^[10-14]。而用于能量转移要求的 HTRF 系统,对稀土配合物提出了更高要求,因此探索一直在进行中。

本研究在合成 *N,N',N,N'*-[二(2,2'-联吡啶-6,6'-二甲基)]二胺基础上,以 2,6-二甲基吡啶-3,5-二甲酸二乙酯为原料经过甲基溴化、亲电取代等合成了化合物 2,6- $\{N,N',N,N'\}$ -[二(2,2'-联吡啶-6,6'-二甲基)]二(氨基基)-吡啶-3,5-二羧酸二乙酯。通过差热分析(DTA)、红外光谱(FTIR)、核磁共振(^1H NMR)、质谱(MS)等确认其结构。对该化合物与镧离子结合水解后所形成的螯合物荧光性质进行了研究。所设计螯合物的结构及合成路线如 Scheme 1 所示。

2016-06-02 收稿,2016-07-14 修回,2016-08-25 接受

吉林省科技发展计划资助项目(20150204010YY)

通讯联系人:潘利华,研究员;Tel:0431-85262167; E-mail:lihuap@ciac.ac.cn;研究方向:时间分辨荧光免疫分析



Scheme 1 Synthetic route of the target compound

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

Unity-400M 型核磁共振仪(美国 Varian 公司);Vertex 70 型傅里叶变换红外光谱仪(德国 BRUKER 公司);7.0 T 型超导磁体型傅里叶变换离子回旋共振质谱仪(美国 IonSpec 公司);DSC-7 型差热分析仪(美国 PerkinElmer 公司);FLSP-920 型研究级光谱仪(英国爱丁堡仪器公司);C10027 型光子多通道分析仪(日本 HAMAMATSU 公司);Hitachi F-7000 型荧光光谱仪(日本 HAMAMATSU 公司);荧光寿命测量仪(课题组自主研制)。

三氯甲烷、三氟乙酸、甲醇、四氯化碳、正己烷、环己烷、叔丁醇、二甲基甲酰胺、二甲亚砜、乙腈、碳酸锂、碳酸氢钠、氢氧化锂、无水硫酸钠、*N*-溴代丁二酰亚胺、偶氮二异丁腈均为市售分析纯试剂;柱层析硅胶(粒径 50 ~ 75 μm)、中性氧化铝(粒径 75 ~ 100 μm)购于国药试剂; C_{18} 反相硅胶购于济南博纳生物技术有限公司;2,6-二甲基吡啶-3,5-二甲酸二乙酯购于上海迈瑞尔化学技术有限公司。 N,N',N,N' -[二(2,2'-联吡啶-6,6'-二甲基)]二胺(本课题组自制),氧化铕(本单位制备)。实验用水为蒸馏水。

1.2 配体合成

1.2.1 2,6-二(溴甲基)吡啶-3,5-二甲酸二乙酯(化合物 2)的合成 将 2,6-二甲基吡啶-3,5-二甲酸二乙酯(1.00 g, 4.0 mmol)、*N*-溴代丁二酰亚胺(1.78 g, 10.0 mmol)和 8 mg 偶氮二异丁腈加入 50 mL 四氯化碳中回流 40 min。将反应物过滤,滤液倒入碳酸氢钠饱和溶液中,用三氯甲烷(60 mL $\times$ 3)萃取后水洗,无水硫酸镁干燥过夜。滤液浓缩干燥,经 $V(\text{环己烷}):V(\text{二氯甲烷}) = 8:2$ 硅胶柱层析,得到产物 0.50 g,产率 30.7%,熔点 68.83 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.2.2 2,6- $\{N,N',N,N'$ -[二(2,2'-联吡啶-6,6'-二甲基)]二(氨基甲基)}-吡啶-3,5-二羧酸二乙酯(化合物 4)的合成 将 N,N',N,N' -[二(2,2'-联吡啶-6,6'-二甲基)]二胺(118 mg, 0.3 mmol)和碳酸锂(222 mg, 3.0 mmol)加入 250 mL 乙腈溶液中, N_2 气保护下回流 40 min,然后于 2 h 内滴加 2,6-二(溴甲基)吡啶-3,5-二甲酸二乙酯的乙腈溶液(0.61 g/L) 200 mL,继续回流 22 h。将反应物过滤,滤液浓缩干燥,经 $V(\text{二氯甲烷}):V(\text{甲醇}) = 9:1$ 硅胶柱层析,得到 60 mg 2,6- $\{N,N',N,N'$ -[二(2,2'-联吡啶-6,6'-二甲基)]二(氨基甲基)}-吡啶-3,5-二羧酸二乙酯- Li^+ ,产率 31%。

1.3 螯合物制备

1.3.1 2,6- $\{N,N',N,N'-[二(2,2'-联吡啶-6,6'-二甲基)]二(氨基甲基)\}$ -吡啶-3,5-二羧酸二乙酯- Eu^{3+} (化合物 **5**) 的合成 将 2,6- $\{N,N',N,N'-[二(2,2'-联吡啶-6,6'-二甲基)]二(氨基甲基)\}$ -吡啶-3,5-二羧酸二乙酯- Li^+ (50 mg) 加入到 30 mL 的乙腈中, N_2 气保护下加入 $EuCl_3 \cdot 6H_2O$ (40 mg), 回流 48 h。混合物冷却过滤, 滤液浓缩后得到 Eu^{3+} 螯合物 53 mg ($bpy \cdot bpy \cdot py(CO_2Et)_2EuCl_3$), 产率 86%。

1.3.2 2,6- $\{N,N',N,N'-[二(2,2'-联吡啶-6,6'-二甲基)]二(氨基甲基)\}$ -吡啶-3,5-二羧酸- Eu^{3+} (化合物 **6**) 的合成 将 2,6- $\{N,N',N,N'-[二(2,2'-联吡啶-6,6'-二甲基)]二(氨基甲基)\}$ -吡啶-3,5-二羧酸二乙酯- Eu^{3+} (20 mg) 溶于 3 mL 甲醇中, 加入氢氧化锂水溶液 (1 mol/L) 0.15 mL, 室温下搅拌 3.5 h, 蒸干溶剂。反相硅胶柱色谱分离粗产物, 以粒径 50 μm C_{18} 反相硅胶为固定相, $V(乙腈):V(1\% 三氟乙酸水溶液) = 7:3$ 为淋洗剂, 得到 8 mg 2,6- $\{N,N',N,N'-[二(2,2'-联吡啶-6,6'-二甲基)]二(氨基甲基)\}$ -吡啶-3,5-二羧酸- Eu^{3+} ($bpy \cdot bpy \cdot py(CO_2H)_2EuCl_3$), 产率 45%。

1.4 螯合物溶液的配制

取 0.4 mg 2,6- $\{N,N',N,N'-[二(2,2'-联吡啶-6,6'-二甲基)]二(氨基甲基)\}$ -吡啶-3,5-二羧酸- Eu^{3+} 于烧杯中, 加入 0.1 mL 二甲基甲酰胺溶解, 再将此溶液移至 5 mL 容量瓶中, 二次蒸馏水定容, 得到浓度为 1.7×10^{-4} mol/L 的螯合物水溶液。

2 结果与讨论

2.1 穴状配位化合物结构

穴状化合物^[6-7,10]是将稀土离子包含在配体构成的分子空穴中。吡啶-二联吡啶的穴状结构作为吸光和能量传递基团, 可吸收紫外光, 并以非辐射能量的方式进行传递。穴状结构中的多个 N 原子与稀土离子形成高度配位, 可以减小阳离子的协同作用, 降低稀土离子自身因浓度效应而产生的荧光猝灭, 减少了 O—H 的振动而引起的能量损失, 从而保持了稀土荧光配合物的光物理、光化学的活性。因此, 具有吡啶共轭结构的空穴状稀土配合物可以很好地保护空穴中的稀土离子, 具有一般螯合物不能比拟的动力学和热力学稳定性。

2.2 化合物 2 的表征

如图 1A 所示为化合物 **2** 的 1H NMR 谱: δ 1.453 处的三重峰对应酯中 2 个甲基的 6 个氢, δ 4.469 处的四重峰对应酯中 2 个亚甲基的 4 个氢, δ 5.009 处的单峰对应 2 个溴甲基的 4 个氢, δ 8.795 处的单峰对应吡啶环 4 位的单个氢。 1H NMR 谱图各组峰的化学位移、氢原子积分数与化合物 **2** 分子结构吻合。图 1B 所示为化合物 **2** 的质谱图, $MS(70\text{ eV}) m/z [M+H]^+ = 410.1$, $[M+Na]^+ = 432.0$, 与其相对分子质量理论值相符。其 IR 谱(图 2) 出现了 1717 cm^{-1} 酯基特征峰, $631 \sim 567\text{ cm}^{-1}$ C—Br 键的伸缩振动峰, 证明甲基已被溴化。

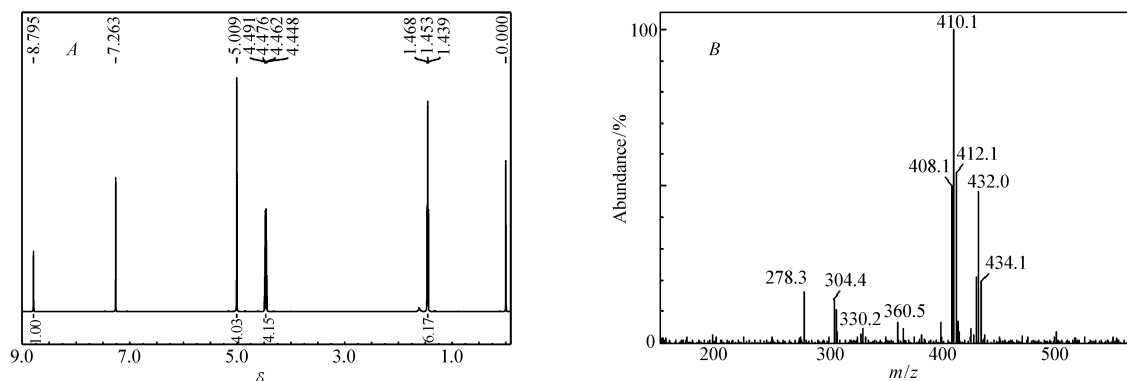


图 1 2,6-二(溴甲基)吡啶-3,5-二甲酸二乙酯(**2**)的 1H NMR 谱图(A)和质谱谱图(B)

Fig. 1 1H NMR spectrum(A) and mass spectrum(B) of 2,6-bis(bromomethyl)-pyridine-3,5-diethyl diester(**2**)

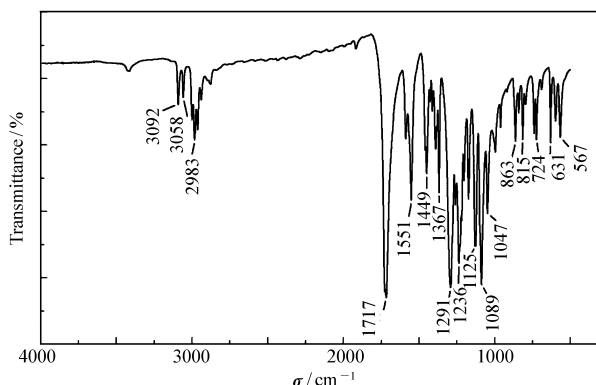


图2 2,6-二(溴甲基)吡啶-3,5-二甲酸二乙酯(2)的红外谱图

Fig. 2 Infrared spectrum of 2,6-bis(bromomethyl)-pyridine-3,5-diethyl diester(2)

2.3 化合物4的表征

图3A所示为化合物4的 ^1H NMR谱:1.429处的三重峰对应2个羧酸乙酯中甲基的6个氢,

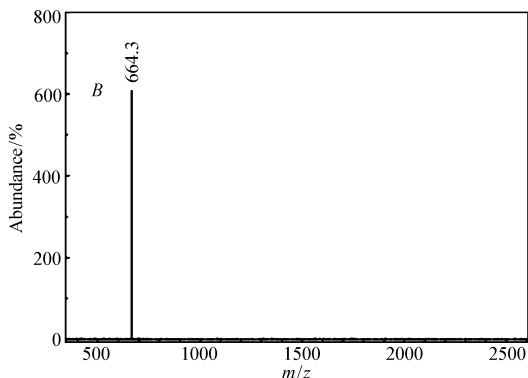
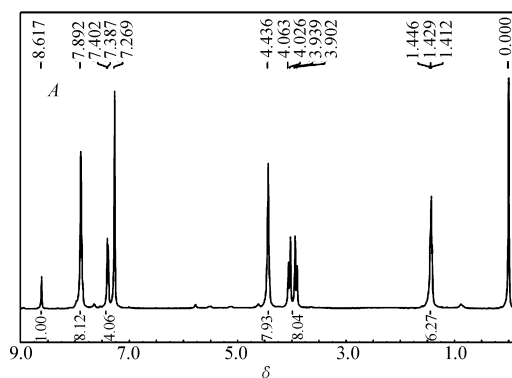


图3 2,6- $\{N,N',N,N'-[二(2,2'-联吡啶-6,6'-二甲基)]二(氨基甲基)\}$ -吡啶-3,5-二羧酸二乙酯(4)的 ^1H NMR谱图(A)和质谱谱图(B)

Fig. 3 ^1H NMR spectrum(A) and mass spectrum(B) of 2,6- $\{N,N',N,N'-[bis(2,2'-bipyridine-6,6'-dimethyl)]bis(aminomethyl)\}$ -pyridine-3,5-diethyl diester(4)

3.902~4.063处的峰对应酯基中2个亚甲基的4个氢和吡啶环2,2'位上亚甲基的4个氢,4.436处的单峰对应2个联吡啶环2,2'位上亚甲基的8个氢;7.387~7.402和7.892处的峰对应2个联吡啶环上的12个氢,8.617处的单峰对应吡啶环4位的氢。 ^1H NMR谱图各组峰的化学位移、氢原子积分数与化合物4分子结构吻合。图3B为化合物4的质谱图MS(70 eV) m/z : $[M+Na]^+=664.3$,与理论值相符。其IR谱(图4)中,631~567 cm^{-1} 处C—Br键的特征峰消失,1719 cm^{-1} 处酯基的特征峰仍然存在,另外,1574、1435 cm^{-1} 处吡啶环C=N、C=C的特征峰增强,说明化合物2与化合物3发生了亲电取代反应,生成了化合物4。

2.4 Eu^{3+} 螯合物的光谱性质

图5为螯合物溶液在荧光光谱仪测得的激发光谱谱图,最大激发位于322 nm处。其激发波长范围250~340 nm。

图6为螯合物6在氙灯激发下的荧光发射谱图(固定激发光波长322 nm)。三组发射峰分别归属于

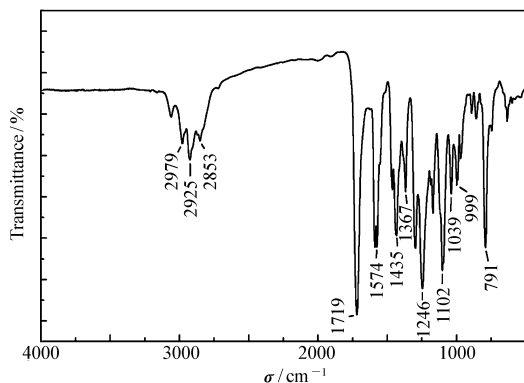


图4 化合物4的红外谱图

Fig. 4 Infrared spectrum of compound 4

$^5D_0-^7F_0$ (583 nm)、 $^5D_0-^7F_1$ (597 nm)、 $^5D_0-^7F_2$ (618 nm) 跃迁,其中最强发射波长为 597 和 618 nm。 Eu^{3+} 离子发射光谱不同峰的相对强弱与其所处的环境有关。根据 Judd-Ofelt 理论,当 Eu^{3+} 占据对称中心时,将以 $^5D_0 \rightarrow ^7F_1$ 允许的磁偶极跃迁为主。我们推测,由于本文合成的化合物分子对称性较好,所以螯合物 **6** 的发射光谱中 $^5D_0-^7F_1$ (597 nm) 的发射峰相对增强了,表现为 $^5D_0-^7F_1$ (597 nm) 和 $^5D_0-^7F_2$ (618 nm) 两个发射峰的强度基本一样。从图 6 还能看出,螯合物 **6** 的荧光发射强度高,发射峰尖锐。结合图 5 和图 6 可以看出,该稀土离子螯合物的斯托克斯位移大,荧光激发和发射最大波长之间相距 290 nm。

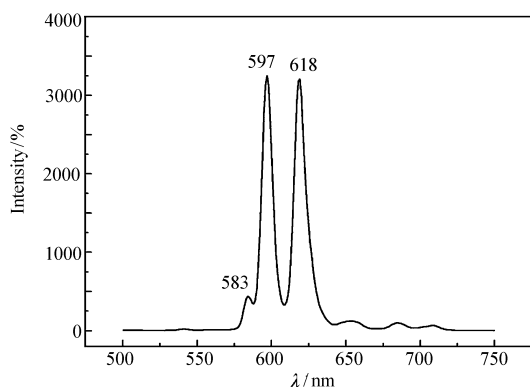
图6 Eu^{3+} 离子螯合物的发射光谱

Fig. 6 Emission spectrum of the Eu(III) complex

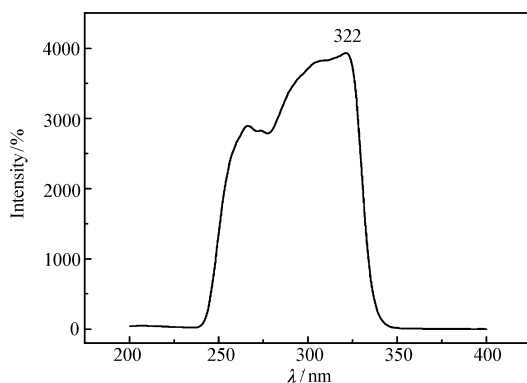
图5 Eu^{3+} 离子螯合物的激发光谱

Fig. 5 Excitation spectrum of the Eu(III) complex

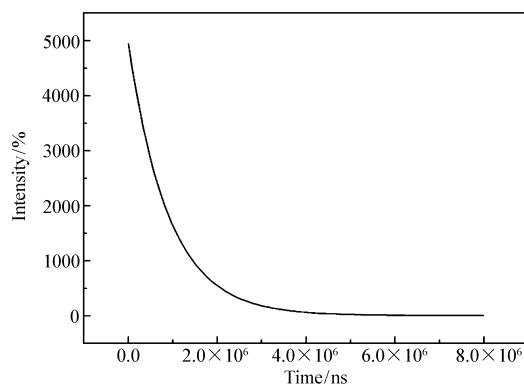
图7 Eu^{3+} 离子螯合物的荧光衰减曲线

Fig. 7 Fluorescence decay curve of the Eu(III) complex

图7为螯合物**6**在322 nm波长光激发下的荧光衰减曲线,通过单指数拟合测得其荧光寿命为918 μs。

量子产率 Φ 是表达所有处于激发态的 Eu^{3+} -荧光化合物中经过辐射跃迁(荧光)返回基态的分子个数与其总数的比值,这个比值越大物质的荧光发射强度越强,通常其介于0.1~1荧光之间。化合物**6** (Eu^{3+} 浓度为 1.7×10^{-4} mol/L)的样品在322 nm波长氙灯激发下的荧光量子产率为0.249。

3 结 论

本实验在合成 N,N',N,N' -[二(2,2'-联吡啶-6,6'-二甲基)]二胺基础上,以2,6-二甲基吡啶-3,5-二甲酸二乙酯为初始原料,经 N -溴代丁二酰亚胺自由基溴化、亲电取代、稀土离子螯合、酯基水解等反应过程合成了螯合物2,6- $\{N,N',N,N'$ -[二(2,2'-联吡啶-6,6'-二甲基)]二(氨基甲基)-吡啶-3,5-二羧酸- Eu^{3+} ,并对产物结构进行了确认。2,6- $\{N,N',N,N'$ -[二(2,2'-联吡啶-6,6'-二甲基)]二(氨基甲基)-吡啶-3,5-二羧酸- Eu^{3+} 的激发光谱谱带宽,最强激发峰波长在322 nm;发射光谱主要特征峰为597 nm ($^5D_0-^7F_1$)、618 nm ($^5D_0-^7F_2$);荧光寿命918 μs;较高的量子产率 $\Phi=0.249$ 。

参 考 文 献

- [1] Kuo J E, Milby K H, Hinsberg W D, *et al.* Direct Measurement of Antigens in Serum by Time-resolved Fluoroimmunoassay [J]. *Clin Chem*, 1985, **31**(1): 50-53.
- [2] Diamandis E P. Immunoassays with Time-resolved Fluorescence Spectroscopy: Principles and Applications [J]. *Clin Biochem*, 1988, **21**(2): 139-150.
- [3] NIU Qianqian, PAN Lihua, LI Zhen, *et al.* Preparation of 2,6-Dibromo-4-aminopyridine [J]. *J Mol Sci*, 2006, **22**(6): 401-404 (in Chinese).
- 钮倩倩, 潘利华, 李珍, 等. 2,6-二溴-4-氨基吡啶的合成 [J]. *分子科学学报*, 2006, **22**(6): 401-404.
- [4] Jiang L, Wu J, Wang G L, *et al.* Development of a Visible-light-sensitized Europium Complex for Time-resolved Fluorometric

- Application[J]. *Anal Chem*, 2010, **82**(6):2529-2535.
- [5] Bazin H, Preaudat M, Trinquet E, *et al.* Homogeneous Time Resolved Fluorescence Resonance Energy Transfer Using Rare Earth Cryptates as a Tool for Probing Molecular Interactions in Biology[J]. *Spectrochim Acta A*, 2001, **57**(11):2197-2211.
- [6] Smeulders L, Bunkens L, Vereycken I, *et al.* A Homogeneous Time-resolved Fluorescence Assay to Identify Inhibitors of HIV-1 Fusion[J]. *Methods Mol Biol*, 2013, **1030**(6):11-17.
- [7] Degorce F, Card A, Soh S, *et al.* HTRF: A Technology Tailored for Drug Discovery-A Review of Theoretical Aspects and Recent Applications[J]. *Curr Chem Genomics*, 2009, **3**(1):22-32.
- [8] Rossant C J, Matthews C, Neal F, *et al.* Versatility of Homogeneous Time-resolved Fluorescence Resonance Energy Transfer Assays for Biologics Drug Discovery[J]. *J Biomol Screen*, 2015, **20**(4):508-518.
- [9] Moore E G, Samuel A P S, Raymond K N. From Antenna to Assay: Lessons Learned in Lanthanide Luminescence[J]. *Acc Chem Res*, 2009, **42**(4):542-552.
- [10] Havas F, Leygue N, Danel M, *et al.* 6,6'-Dimethyl-2,2'-bipyridine-4-ester: A Pivotal Synthon for Building Tethered Bipyridine Ligands[J]. *Tetrahedron*, 2009, **65**(36):7673-7686.
- [11] Shi L F, Li Y W, Cao H R, *et al.* Synthesis of Novel Europium Complexes and Their Photoluminescence Properties[J]. *J Rare Earths*, 2012, **30**(1):17-20.
- [12] CAO Xijie, XIE Wenbing, PAN Lihua, *et al.* Synthesis and Characterization of 4,4'-Di(*p*-aminophenylethynyl)-6,6'-bis[*N,N*-bis(ethoxycarbonylmethyl)amino methyl]-2,2'-bipyridine[J]. *Chem J Chinese Univ*, 2012, **33**(7):1462-1465 (in Chinese).
曹熙杰, 谢文兵, 潘利华, 等. 4,4'-二(对氨基苯乙炔基)-6,6'-二[*N,N*-二(乙氧基羰甲基)氨基甲基]-2,2'-联吡啉的合成与表征[J]. *高等学校化学学报*, 2012, **33**(7):1462-1465.
- [13] XIE Wenbing, CHANG Yu, ZHANG Yongli, *et al.* Synthesis and Characterization of Rare Earth Fluorescent Compound for Biomolecules-labeling[J]. *Chinese J Anal Chem*, 2013, **41**(11):1749-1753 (in Chinese).
谢文兵, 常宇, 张永利, 等. 稀土荧光化合物的合成与表征[J]. *分析化学*, 2013, **41**(11):1749-1753.
- [14] Yang X Y, Dang D D, Zhu W, *et al.* Synthesis and Characterization of 4,4'-Di(*p*-aminophenylethynyl)-6,6'-bis(*N,N*-bis(*t*-butoxycarbonylmethyl)amino methyl)-2,2'-bipyridine[J]. *Asian J Chem*, 2014, **26**(8):2256-2258.

Synthesis and Spectroscopic Properties of a Cryptate Rare Earth Fluorescence Complex

CHANG Yu, XIE Wenbing, ZHOU Shihong, LI Junling, LIU Baofeng, PAN Lihua*

(Laboratory of Polymer Composites Engineering, Changchun Institute of Applied Chemistry Chinese Academy of Sciences, Changchun 130022, China)

Abstract A bifunctional cryptate chelate 2,6- $\{N, N', N, N'\}$ -[bis(2,2'-bipyridine-6,6'-dimethyl)]bis(aminomethyl)-pyridine-3,5-diethyl diester for homogeneous time-resolved fluorimmunoassay product was synthesized from the raw material diethyl 2,6-dimethylpyridine-3,5-dicarboxylate through *N*-bromobutanamide (NBS) bromination, electrophilic substitution. The structure and property were confirmed by differential thermal analysis (DTA) Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), proton nuclear magnetic resonance spectroscopy (^1H NMR) and mass spectrometry (MS). Also, the spectral properties of the Eu(III)-cryptate chelate, such as absorption spectra, emission spectra, and fluorescence lifetime, were discussed. The fluorescence spectroscopic properties of Eu(III)-cryptate are as follows: the excitation peak is at 322 nm, the narrow emission spectrum peaks are at 597 nm ($^5D_0 \rightarrow ^7F_1$) and 618 nm ($^5D_0 \rightarrow ^7F_2$), respectively, the Stokes shift is 290 nm, the fluorescence lifetime is 918 μs , and the fluorescence quantum yield is $\Phi = 0.249$.

Keywords homogeneous time-resolved fluorescence immunoassay; chelate; synthesis; cryptate bipyridine derivative

Received 2016-06-02; Revised 2016-07-14; Accepted 2016-08-25

Supported by the Science and Technology Development Project of Jilin Province of China (No. 20150204010YY)

Corresponding author: PAN Lihua, professor; Tel: 0431-85262167; E-mail: lihuap@ciac.ac.cn; Research interests: time-resolved fluoroimmunoassay