

苯乙烯嘧啶化合物的合成及其作为 pH 探针的光谱特点

熊小琴* 翟秋阁 薛灵芬 郑 斐 谢 旭

(信阳师范学院化学化工学院 信阳 464000)

摘 要 合成并表征了化合物 4,6-二[(4'-二乙基氨基)苯乙烯基]嘧啶-2-醇。通过研究该化合物在不同 pH 值的磷酸盐缓冲溶液中紫外-可见吸收光谱和荧光光谱的变化,发现 λ_{\max} 约为 500 nm 的吸收峰在溶液 pH = 6.78 中吸收强度最大。荧光发射峰随着 pH 值的升高逐渐减弱,直至淬灭(pH = 5.51)。

关键词 苯乙烯嘧啶, pH 探针, 吸收光谱, 荧光光谱

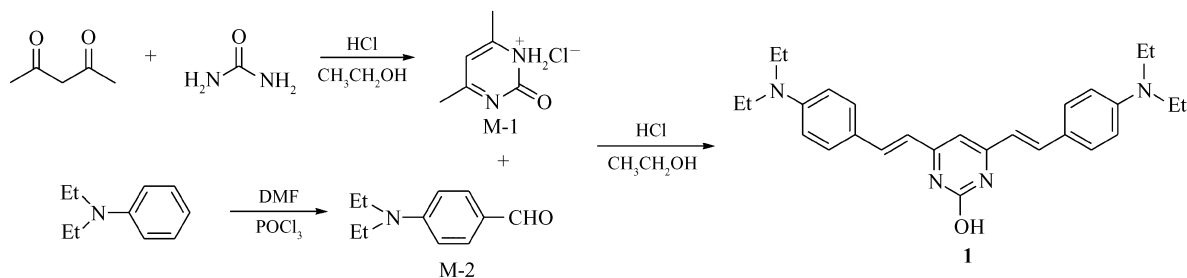
中图分类号: O656

文献标识码: A

文章编号: 1000-0518(2012)11-1262-04

DOI: 10.3724/SP.J.1095.2012.00578

生物体液的 pH 值变化是衡量生物体生理变化的重要指标之一^[1]。血红蛋白的分子结构会随着血浆中 H^+ 浓度的变化而改变,甚至导致蛋白的解聚^[2]。目前,生物体内 pH 值的检测,如微电极法和核磁共振法等^[3],需使用相对复杂的仪器,其使用受到一定的限制。由于荧光分析法灵敏度高及操作简便,已受到越来越多研究者的重视。由于苯乙烯类菁染料的 N 原子在不同酸度化学环境中可以发生质子化和去质子化反应,而引起其吸收光谱和荧光光谱的变化,可被用于溶液 pH 值的检测^[3-7]。本文合成了含叔胺基的苯乙烯嘧啶类化合物,测试了其作为 pH 探针的紫外和荧光光谱性能,合成路线如 Scheme 1 所示。



Scheme 1 Synthetic route of 4,6-bis[(4'-diethylamino)styryl] pyrimidin-2-ol (1)

1 实验部分

1.1 试剂和仪器

N,N-二甲基甲酰胺 (DMF), 分析纯, 经 CaH_2 干燥 12 h 后, 减压蒸馏, 收集后加分子筛, 保存于干燥器中; 三氯氧磷 ($POCl_3$), 用前重蒸; *N,N*-二乙基胺基苯, 分析纯, 减压蒸馏后避光保存在干燥器中。其它试剂均为化学纯或分析纯, 购于上海国药公司。所用有机溶剂按常规方法干燥后使用, 所有样品溶液均在测试前配制。核磁共振谱 (1H NMR) 在美国 Varian 公司 MERCURY-VX300 型核磁共振仪上测定; 质谱在美国 Finnigan 公司 Trance 型质谱仪上测定; 熔点分别在 WRS-2A 型微机熔点仪 (上海精密仪器厂) 和 X-4 型数字显微熔点仪 (北京泰克仪器厂) 上测定; 紫外-可见光谱和荧光光谱分别在 Shimadzu 160A spectrometer 型紫外-可见光谱仪 (日本 SHIMADZU) 和 F-4500 型荧光光谱仪 (日本 Hitachi 公司) 上

2011-12-30 收稿, 2012-03-19 修回

河南省高校科技创新人才基金 (2010HASTIT025)、河南省科技创新人才项目 (104100510020)、河南省教育厅自然科学研究项目 (2009A150023) 资助

通讯联系人: 熊小琴, 讲师; Tel: 0376-6390207; E-mail: xxq_smile@163.com; 研究方向: 有机合成、生物化学

测定。

1.2 化合物 1 的合成

1.2.1 4,6-二甲基嘧啶-2-酮盐酸盐(M-1)的合成 参照文献[8-9]方法,将 6.0 g(0.1 mol)尿素溶于 50.0 mL 乙醇中,加热回流下加入 10.0 g(0.1 mol)乙酰丙酮,再慢慢滴加 13.5 mL 浓盐酸(37%),继续回流 24 h。冷却至室温,过滤,滤饼分别用冷乙醇和乙醚洗涤,真空干燥,得白色固体 11.8 g,产率 73.7%,熔点 253 ~ 255 °C(文献值^[9]:255 ~ 256 °C)。

1.2.2 *N,N*-二乙基苯甲醛(M-2)的合成 参照文献[10]方法,在冰浴冷却下,向装有 10.0 mL 无水 DMF 的圆底烧瓶中,缓慢滴加 1.69 g(13.0 mmol)三氯氧磷,搅拌反应 0.5 h,得浅黄色溶液。再加入 1.2 g(10.0 mmol)*N,N*-二乙基苯胺,继续反应 0.5 h。升温至 80 °C,搅拌反应 3 h,反应停止,倒入冰水中。用 NaOH 溶液中和,析出大量黄色沉淀。过滤,水洗滤饼,干燥。产物经硅胶色谱柱层析分离,*V*(乙酸乙酯):*V*(石油醚)=1:3 为淋洗剂,旋除溶剂,干燥后得淡黄色液体 1.5 g,放置后固化,产率 85%。熔点 40 ~ 42 °C(文献值^[10] 41 °C)。¹H NMR(300 MHz, CDCl₃), δ : 1.20(t, *J* = 6.9 Hz, 6H, CH₃), 3.42(q, *J*₁ = 6.9 Hz, *J*₂ = 13.8 Hz, 4H, N—CH₂), 6.65(d, *J* = 9.0 Hz, 2H, Ar—H), 7.69(d, *J* = 9.0 Hz, 2H, Ar—H), 9.68(s, 1H, CHO)。

1.2.3 4,6-二[(4'-二乙基氨基)苯乙烯基]嘧啶-2-醇(1)的合成 向 10 mL 95% 的乙醇溶液中,分别加入 0.39 g(2.2 mmol)醛和 0.16 g(1 mmol) M-1,充分溶解后滴加浓盐酸 4 ~ 5 滴(约 0.3 mL),回流反应 12 h。冷却至室温,倒入冰水中,用 NaOH 溶液中和。氯仿萃取,水洗有机相 3 次,用无水硫酸钠干燥。过滤,浓缩滤液后经硅胶色谱柱层析分离,*V*(甲醇):*V*(乙酸乙酯):*V*(氯仿)=1:5:30 洗脱,旋蒸除溶剂后得红色粉末,再在氯仿和乙醇混合溶剂中重结晶。产率 27%。熔点 246 ~ 248 °C(熔化并分解);EI-MS:*m/z*, 441.6(M-H);¹H NMR(300 MHz, CDCl₃), δ : 1.21(t, *J* = 7.2 Hz, 12H, CH₃), 3.42(q, *J*₁ = 6.6 Hz, *J*₂ = 13.8 Hz, 8H, N—CH₂), 6.53(s, 1H, pyrimidine), 6.65(d, *J* = 8.7 Hz, 4H, phenyl), 6.72(d, *J* = 16.5 Hz, 2H, CH=CH), 7.52(d, *J* = 8.1 Hz, 4H, phenyl), 7.76(d, *J* = 15.3 Hz, 2H, CH=CH), 12.65(b, 1H, OH);元素分析值(计算值)/%:C 75.77(75.98), H 7.48(7.74), N 12.37(12.66)。

1.3 待测液的配制

准确称取适量的化合物 1,溶于 25 mL 四氢呋喃(THF)中,配成浓度为 1×10^{-4} mol/L 的储备液。分别移取浓度为 0.2 mol/L 的 Na₂HPO₄ 和 NaH₂PO₄ 溶液,充分混合。再以 HCl 或 NaOH 溶液调节至所需的 pH 值,配成磷酸盐缓冲溶液(PBS)。分别移取 1.0 mL 储备液于 10 mL 容量瓶中,用一定 pH 值的 PBS 溶液定容为 10 mL,得一系列不同 pH 值、浓度为 1×10^{-5} mol/L 的工作溶液,用于紫外和荧光光谱的测定。

2 结果与讨论

2.1 化合物 1 的合成

中间体 M-2 通过 Vilsmier 反应制备。Vilsmier 试剂对水很敏感,控制体系隔绝潮气是取得反应成功的关键。此外,由于反应中会有大量的酸生成,因此在后处理过程中进行中和操作时,速度不能过快,否则容易引起其它副反应,产生的杂质(在硅胶柱上呈蓝绿色)很难与产物分离。

化合物 1 是由中间体 M-1 和 M-2 通过 Knoevenagel 缩合反应合成的,反应时间较长但是收率不高。其原因主要是嘧啶杂芳环中的一个甲基反应后,引入的强给电子体系降低了另外一个甲基的活性,不利于反应继续进行造成的。

2.2 化合物 1 的紫外-可见吸收光谱

化合物 1 在 pH 值为 3.69 ~ 10.48 磷酸盐缓冲溶液中的紫外-可见吸收光谱如图 1 所示。化合物 1 在强酸中(pH = 3.69)有 2 个吸收带, λ_{\max} 分别位于 377 和 607 nm,并在约 500 nm 处有一明显的肩峰,溶液为蓝紫色。随着溶液 pH 值升高, $\lambda_{\max} = 607$ nm 处的吸收强度逐渐减弱,而约 500 nm 处的吸收强度逐渐增强。当溶液 pH = 6.78 时, $\lambda_{\max} = 607$ nm 处的吸收峰完全消失。而在强碱溶液中则变为橙红色。

化合物 1 在所监测 pH 值范围的磷酸盐缓冲液中,均存在 500 nm 附近的吸收峰,其峰强度和峰位

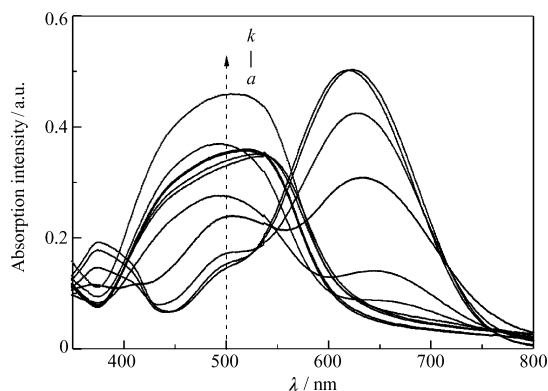


图 1 化合物 **1** (1×10^{-5} mol/L) 在不同 pH 值的磷酸盐缓冲溶液中的紫外-可见吸收光谱

Fig. 1 UV-Vis spectra of 1×10^{-5} mol/L compound **1** in PBS at different pH value

pH: $a \sim k$. 3.69, 3.75, 3.94, 4.15, 4.88, 10.48, 9.43, 8.38, 7.39, 5.51, 6.78

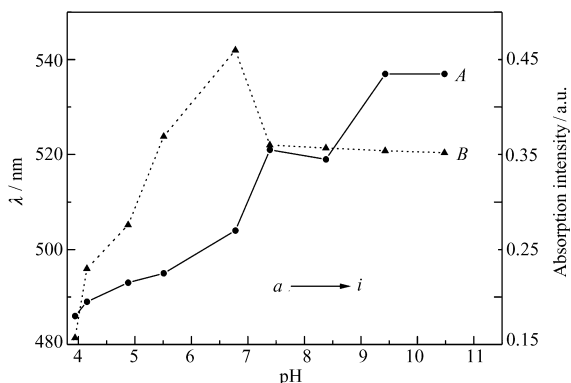


图 2 化合物 **1** 在 500 nm 附近紫外吸收峰的波长 (A) 和吸收强度 (B) 与 pH 值的关系曲线

Fig. 2 The pH-dependent wavelength (A) and absorption intensity (B) of the peak located at ~ 500 nm of compound **1**

The pH values are 3.94, 4.15, 4.88, 5.51, 6.78, 7.39, 8.38, 9.43, 10.48 from a to i

与 pH 值的关系如图 2 所示。当溶液的 pH 值为 3.69 ~ 6.78 范围时, 500 nm 处的吸收峰随着 pH 值的升高而显著增强, ($\text{pH} = 6.78, A = 0.460$), 并伴随明显的红移。当溶液 $\text{pH} = 7.39$ 时, 该峰的强度立刻下降至 0.360, 并红移。继续调节所测溶液 pH 值至碱性时 (pH 值为 8.38 ~ 10.48), 峰的强度相同, 峰的位置随 pH 值的增强出现微小的红移。这是由于在碱性溶液中, 嘧啶环上的羟基脱去质子, O 原子带有负电荷, 形成 $p-\pi$ 共轭, 具有强推电子作用, 导致分子中的共轭程度加强, 吸收峰红移。在酸性溶液中, 叔胺 N 原子易结合质子带正电荷, $p-\pi$ 共轭消失, 使得分子的共轭程度减弱, 比 $\lambda_{\text{max}} = 521$ nm ($\text{pH} = 7.39$) 时吸收峰蓝移。并且从图 1 和图 2 均可以清晰地看出, 随着溶液 pH 值减小, 该吸收峰蓝移变得非常明显。

2.3 化合物 **1** 的荧光光谱

激发波长 $\lambda_{\text{ex}} = 380$ nm, 最大发射波长 $\lambda_{\text{em}} = 460$ nm, 化合物 **1** 在 pH 值为 3.22 ~ 10.48 溶液中的荧光强度随着溶液 pH 值升高而减弱, 至 $\text{pH} = 5.51$ 以后, 荧光被淬灭。图 3 为化合物 **1** 在酸性溶液中的荧光发射谱。

这主要是由于在酸性条件下 (pH 值为 3.22 ~ 4.48), 分子中叔胺 N 原子被质子化后, 化合物以阳离子形式存在。缺电子的 N 原子 (NH^+) 与未质子化的 N 原子通过共轭体系可发生推拉电子的共轭效应, 使其以荧光体的形式存在而产生荧光。而在碱性条件下, 嘧啶环上的羟基质子解离, 主要以 2-羰基嘧啶的形式存在, NH^+/N 的推拉电子效应遭到破坏, 荧光淬灭。这表明该化合物在溶液中的荧光变化可以作为溶液 pH 值的探针。

从荧光强度随 pH 值的变化曲线可知, 在中性 pH 值条件下, 探针荧光强度很弱, 而在酸性范围内, 探针的荧光强度相对增强。这将有利于细胞中 pH 探测时避免中性细胞质的干扰, 提高探测灵敏度, 表明该化合物的荧光发射可作为细胞内酸性细胞器测定的探针。

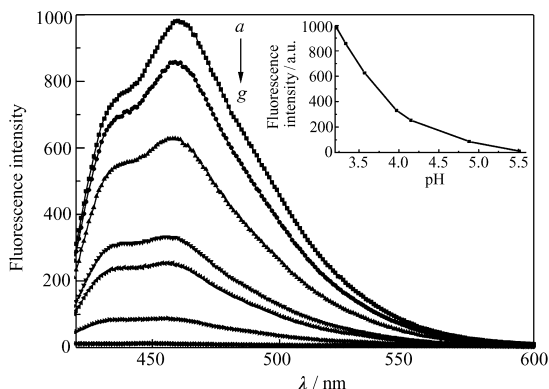


图 3 化合物 **1** (1×10^{-5} mol/L) 在不同 pH 值的磷酸盐缓冲溶液中的荧光发射谱

Fig. 3 Fluorescence spectra of 1×10^{-5} mol/L compound **1** in PBS at different pH value

pH: $a \rightarrow g$. 3.22, 3.3, 3.57, 3.97, 4.15, 4.88, 5.51; inset: pH-dependence of the fluorescence intensity, $\lambda_{\text{ex}} = 380$ nm

3 结 论

合成了 2-羟基嘧啶苯乙烯类衍生物,研究了在溶液中紫外-可见吸收光谱和荧光发射光谱随 pH 值的变化,发现该化合物在所考察的 pH 值范围内, $\lambda_{\max} \approx 500$ nm 的吸收峰随着 pH 值的升高而红移,当 pH 值接近中性时(pH = 6.78)吸收强度最大。荧光强度随着 pH 值的升高逐渐减弱,至中性时,荧光完全淬灭。这种光谱特征表明此探针能避免中性介质的干扰,适合作为酸性溶液 pH 值的荧光探针。

参 考 文 献

- [1] Safavi A, Abdollahi H. Optical Sensor for High pH Values[J]. *Anal Chim Acta*, 1998, **367**(2): 167-173.
- [2] WU Zhengjie, KANG Lili, HUANG Baotian, et al. The Effects of pH on The Structure and Function of Hemoglobin *in Vitro* [J]. *Acta Biophys Sin*, 2009, **25**(sup): 334-335 (in Chinese).
吴正洁, 康立丽, 黄宝添, 等. pH 值对人离体血红蛋白结构及功能的影响[J]. *生物物理学报*, 2009, **25**(增): 334-335.
- [3] WANG Bingshuai, WANG Li, WU Tong, et al. Synthesis of pH Probe Based on Styrylcyanine Dyes and Fluorescence Image in Live Cell[J]. *Chem J Chinese Univ*, 2010, **31**(6): 1148-1151 (in Chinese).
王炳帅, 王丽, 吴彤, 等. 苯乙烯类菁染料 pH 探针的合成与活细胞成像[J]. *高等学校化学学报*, 2010, **31**(6): 1148-1151.
- [4] Puyol M, Encinas C, Rivera L, et al. Nortricarbocyanine Dyes as Suitable Long Wavelength pH Indicators for Chemical Sensing[J]. *Sens Actuators B*, 2007, **122**(1): 53-59.
- [5] Miltsov S, Encinas C, Alonso J. New Cyanine Dyes; Norindosquarocyanines[J]. *Tetrahedron Lett*, 1999, **40**(21): 4067-4068.
- [6] Hilderbrand S A, Ralph W. Optimized pH-Responsive Cyanine Fluorochromes for Detection of Acidic Environments[J]. *Chem Commun*, 2007, **43**(26): 2747-2749.
- [7] XU Ke, LI Guangshen, ZHANG Xiquan, et al. Synthesis and Spectral Characterization of a Novel pH Sensor[J]. *Chinese J Pharm Anal*, 2010, **30**(3): 420-423 (in Chinese).
许柯, 李广申, 张喜全, 等. 一种新型 pH 探针的合成及其光谱性能研究[J]. *药物分析杂志*, 2010, **30**(3): 420-423.
- [8] Vlád G, Horváth I T. Improved Synthesis of 2,2'-Bipyrimidine[J]. *J Org Chem*, 2002, **67**(18): 6550-6552.
- [9] Reznik V S, Muslinkin A A, Shirshov A N, et al. Drug Synthesis Methods and Manufacturing Technology[J]. *Pharm Chem J*, 2001, **35**(12): 672-676.
- [10] Duff J C. A New Method for the Preparation of *p*-Dialkylamino-benzaldehydes[J]. *J Chem Soc*, 1945: 276-277.

Synthesis of Styrylpyrimidine and Its Spectral Characteristic as a pH Probe

XIONG Xiaoqin*, ZHAI Qiuge, XUE Lingfen, ZHENG Fei, XIE Xu
(Department of Chemistry, Xinyang Normal University, Xinyang 464000, China)

Abstract 4,6-Bis[(4'-diethylamino) styryl] pyrimidin-2-ol was synthesized and characterized. The UV-Vis and fluorescent properties were studied in phosphate buffer solutions at different pH value. The UV-Vis spectral results indicated that the peak located at ~ 500 nm reaches maximal intensity at pH = 6.78. The fluorescent spectra data suggested that the intensity of emission peak decreased with increasing pH value. The fluorescence was quenched when the pH was 5.51.

Keywords styrylpyrimidine, pH probe, absorption spectrum, fluorescence spectrum