



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 114702447 B

(45) 授权公告日 2023.07.11

(21) 申请号 202210445516.1

G01N 21/64 (2006.01)

(22) 申请日 2022.04.26

审查员 史骄阳

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 114702447 A

(43) 申请公布日 2022.07.05

(73) 专利权人 苏州大学

地址 215000 江苏省苏州市吴中区石湖西路188号

(72) 发明人 葛健锋 冯旭晨 孙如

(74) 专利代理机构 苏州市中南伟业知识产权代

理事务所(普通合伙) 32257

专利代理师 杨慧林

(51) Int. Cl.

G07D 221/14 (2006.01)

G09K 11/06 (2006.01)

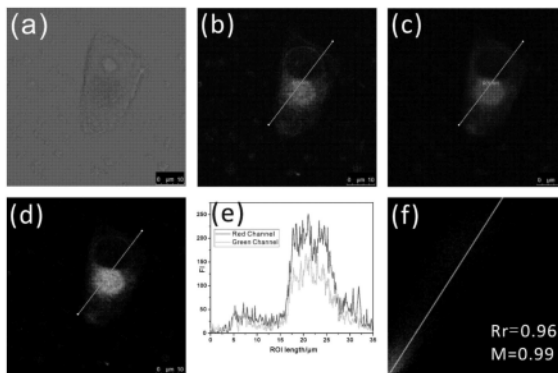
权利要求书2页 说明书10页 附图10页

(54) 发明名称

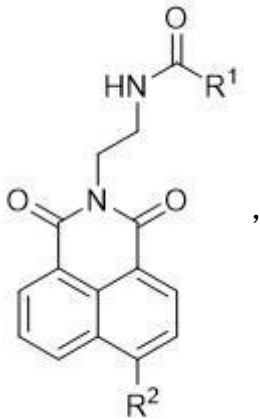
一种萘酰亚胺衍生物及其制备方法与应用

(57) 摘要

本发明公开了一种萘酰亚胺衍生物及其制备方法与应用,所述萘酰亚胺衍生物以乙二醇为桥梁,通过酰胺键分别与长碳链和荧光团相连接。本发明制备的萘酰亚胺衍生物可作为高尔基体绿色标记物,具有优异的高尔基体靶向能力、生物相容性好、定位时间短等优点,且可通过改变萘酰亚胺衍生物的荧光团来调控标记物的发射波长,以用于不同通道化合物的标记。此外,上述萘酰亚胺衍生物的合成方法简单、原料价廉易得,有利于降低高尔基体标记物的制备成本,具有重大的科学意义和商业价值。



1. 一种萘酰亚胺衍生物,其特征在于,所述萘酰亚胺衍生物具有如下结构通式:



其中,所述 R^1 为 $-C_{11}H_{23}$ 的直链烷基,所述 R^2 为 $-OH$ 、 $-NH_2$ 或 $-NHC_7H_{15}$, $-NHC_7H_{15}$ 中的 $-C_7H_{15}$ 为直链结构。

2. 一种权利要求1所述的萘酰亚胺衍生物的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

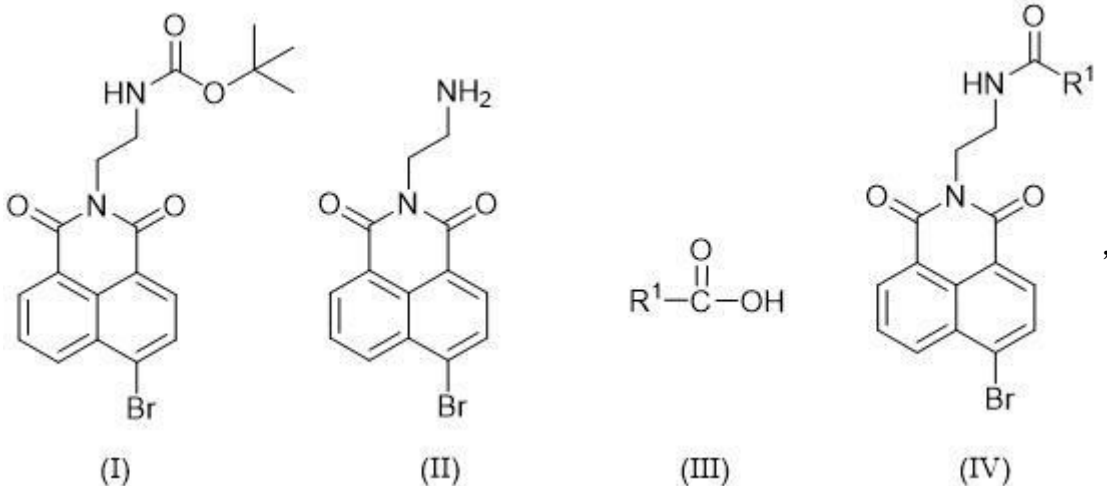
(1) 将4-溴代-1,8-萘二甲酸酐与N-叔丁氧羰基乙二胺在有机溶剂中反应得到式(I)所示的化合物1;

(2) 将步骤(1)中制备得到的化合物1溶于溶剂中,在强酸条件下脱保护得到式(II)所示的化合物2;

(3) 将步骤(2)制备的化合物2与式(III)所示的化合物在有机溶剂中发生缩合反应,制备得到式(IV)所示的化合物3;

(4) 将步骤(3)制备的化合物3与含供电子基团的化合物在有机溶剂中发生取代反应,得到所述的萘酰亚胺衍生物;所述含供电子基团的化合物为1-羟基-5-吡咯烷二酮、1-氨基庚烷或苯甲胺;

所述式(I)~式(IV)的结构式如下所示:



其中, R^1 为 $-C_{11}H_{23}$ 的直链烷基。

3. 根据权利要求2所述的制备方法,其特征在于,步骤(4)中,所述取代反应在催化剂存在的条件下进行,所述催化剂为碘化亚铜催化剂或钯催化剂。

4. 根据权利要求2所述的制备方法,其特征在于,步骤(4)中,所述取代反应的反应温度为 $85-125\text{ }^\circ\text{C}$ 。

5. 一种权利要求1所述的萘酰亚胺衍生物作为高尔基体荧光标记物在制备高尔基体荧光标记试剂中的应用,其特征在於,所述高尔基体荧光标记试剂靶向癌细胞的高尔基体。

6. 根据权利要求5所述的应用,其特征在於,利用所述高尔基体荧光标记试剂进行细胞成像的方法具体为:将所述高尔基体荧光标记试剂与细胞在37 °C及5% CO₂条件下共培养5 min以上,然后利用激光共聚焦显微镜进行细胞成像,收集荧光信号。

7. 根据权利要求6所述的应用,其特征在於,使用405 nm或458 nm的光源激发,收集500~600 nm范围内的荧光信号。

一种萘酰亚胺衍生物及其制备方法与应用

技术领域

[0001] 本发明涉及荧光标记物技术,具体涉及一种萘酰亚胺衍生物及其制备方法与应用。

背景技术

[0002] 高尔基体是存在于大多数真核细胞中的重要细胞器,其主要功能是从内质网接收、进一步修饰和转化蛋白质和脂质,然后最终通过小泡将修饰后的蛋白质传递到其他细胞器。因此,高尔基体的内稳态对于维持整个细胞的正常状态具有重要意义。高尔基体结构和功能的改变会影响蛋白质的合成,从而引起一些严重的疾病,如神经退行性疾病、缺血性中风和心血管疾病,等(参考:Zappa,F.,M.Failli,and M.A.De Matteis,The Golgi complex in disease and therapy.Curr Opin Cell Biol,2018.50:p.102-116.)。

[0003] 现代检测手段中,荧光标记因其灵敏度高、选择性好、使用方便、成本低等优点受到了越来越多科学家的青睐。因此,近年来具有细胞器靶向能力的荧光染料和荧光探针也越来越多(参考:Y.Niko,P.Didier,Y.Mely,G.Konishi,A.S.Klymchenko,Bright and photostable push-pull pyrene dye visualizes lipid order variation between plasma and intracellular membranes,Sci Rep,6(2016)18870.)。其中1,8-萘酰亚胺衍生物作为一类经典荧光团,具有很高的荧光量子产率和光化学稳定性(参考:Cao,J.,J.Gong,and N.Fu,A1,8-naphthalimide based fluorescent probe for sensing tyrosinase in zebrafish.Microchemical Journal,2022.173:p.107007.)。其良好的可修饰性使其广泛应用于各种功能染料和荧光探针的设计中(参考:Li,M.,et al.,Lysosomal tracking with a cationic naphthalimide using multiphoton fluorescence lifetime imaging microscopy.Chem Commun(Camb),2017.53(81):p.11161-11164.)。线粒体、溶酶体和脂滴等各种细胞器都有相应的1,8-萘酰亚胺衍生物标记(参考:Xu,Z.,et al.,The visualization of lysosomal and mitochondrial glutathione via near-infrared fluorophore and in vivo imaging application.Sensors and Actuators B:Chemical,2019.290:p.676-683.)。

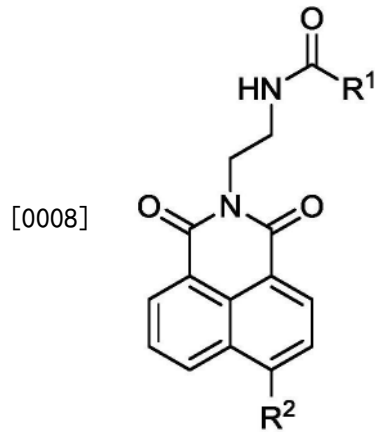
[0004] 由于高尔基体的重要性,在过去的一段时间内,已有一些能够靶向高尔基体的化合物,如对甲苯磺酰胺,L-半胱氨酸和氨基喹啉等(参考:Wang,H.,et al.,Ratiometric fluorescence imaging of Golgi H2O2 reveals a correlation between Golgi oxidative stress and hypertension.Chem Sci,2019.10(47):p.10876-10880.)。但构筑的这些用于靶向高尔基体的小分子存在细胞毒性较大、定位时间长的等问题,例如:采用氨基喹啉类化合物作为高尔基体标记物,在达到理想的亮度前,就发生实验细胞的大量死亡的现象;另外BODIPY类化合物存在定位时间过长,需要约30分钟才能完成定位,检测效率低。这些问题限制了现有的标记物在高尔基体成像上的应用,因此,亟需开发新的低毒性且能快速标记的高尔基体标记物。

发明内容

[0005] 本发明要解决的技术问题是提供一种萘酰亚胺衍生物及其制备方法与应用,所述萘酰亚胺衍生物以乙二醇为桥梁,通过酰胺键分别与长碳链和荧光团相连接得到,具有优异的高尔基体靶向能力、生物相容性好、定位时间短等优点,解决了现有技术中高尔基体标记物细胞毒性大、定位时间长等问题。

[0006] 为解决上述技术问题,本发明提供以下技术方案:

[0007] 本发明第一方面提供了一种萘酰亚胺衍生物,所述萘酰亚胺衍生物具有如下结构通式:

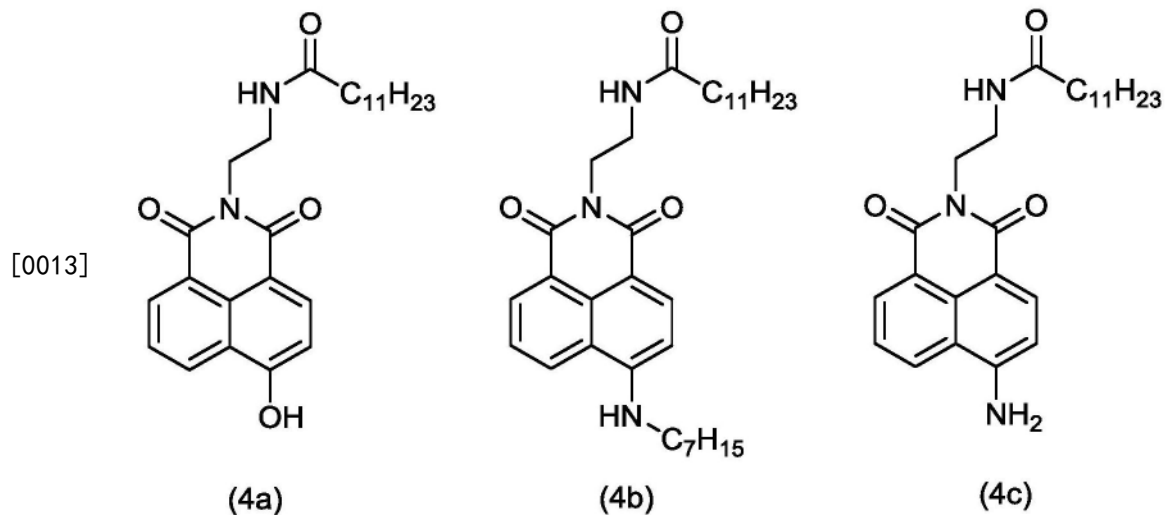


[0009] 其中, R^1 为C9~C20的烷基, R^2 为含O或N供电子基团。

[0010] 进一步地,所述 R^2 为-OH、-NH₂或-NHC₇H₁₅。

[0011] 进一步地,所述 R^1 为-C₁₁H₂₃的直链烷基。

[0012] 进一步地,所述高尔基体标记物选自以下结构式(4a)-(4c)中的一种:



[0014] 本发明第二方面提供了一种第一方面所述萘酰亚胺衍生物的制备方法,包括以下步骤:

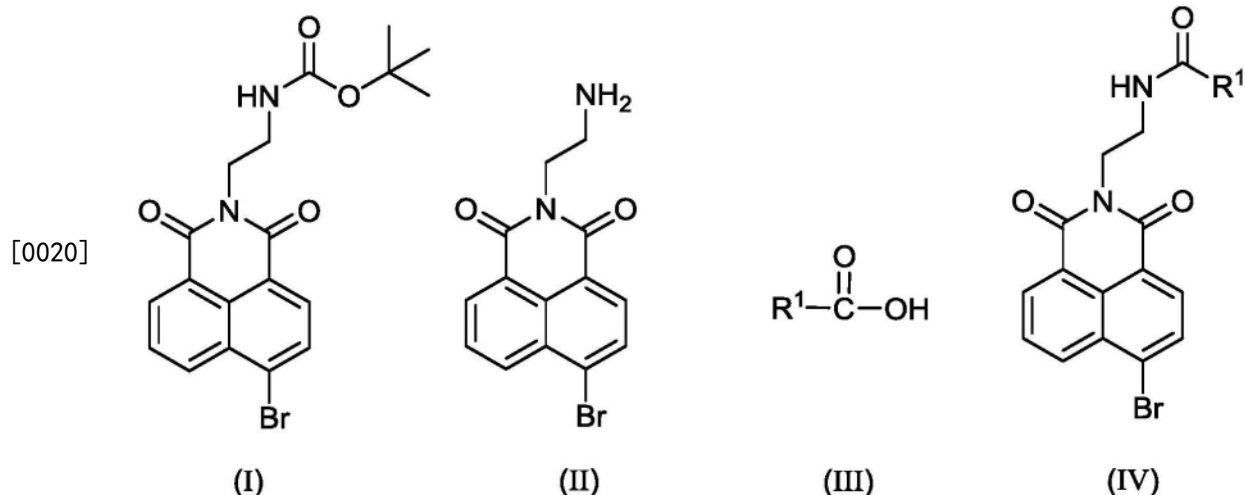
[0015] (1) 将1,8-萘二甲酸酐与N-叔丁氧羰基乙二醇在有机溶剂中反应得到式(I)所示的化合物1;

[0016] (2) 将步骤(1)中制备得到的化合物1溶于溶剂中,在强酸条件下脱保护得到式(II)所示的化合物2;

[0017] (3) 将步骤(2)制备的化合物2与式(III)所示的化合物在有机溶剂中发生缩合反应,制备得到式(IV)所示的化合物3;

[0018] (4) 将步骤(3)制备的化合物3与含给电子基团的化合物在有机溶剂中发生取代反应,得到所述的高尔基体荧光标记物;

[0019] 所述式(I)~式(IV)的结构式如下所示:



[0021] 其中, R^1 为C9~C20的烷基。

[0022] 进一步地,步骤(1)中,所述有机溶剂为乙醇;所述反应为回流反应,所述回流反应的温度为80-100℃,例如88℃。

[0023] 进一步地,步骤(2)中,所述溶剂为二氯甲烷;所述强酸为三氟乙酸或浓盐酸。

[0024] 进一步地,步骤(3)中,所述缩合反应在1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳化二亚胺盐酸盐、4-二甲氨基吡啶存在下进行;所述有机溶剂为N,N-二甲基甲酰胺;所述缩合反应的温度为110-130℃,例如120℃。

[0025] 进一步地,步骤(4)中,所述取代反应在催化剂存在条件下进行,所述催化剂为碘化亚铜催化剂或钯催化剂。

[0026] 进一步地,步骤(4)中,所述取代反应的反应温度为85-125℃。

[0027] 本发明第三方面提供了一种第一方面所述的萘酰亚胺衍生物作为高尔基体荧光标记物在制备高尔基体荧光标记试剂中的应用。

[0028] 进一步地,所述高尔基体荧光标记试剂靶向癌细胞的高尔基体。

[0029] 进一步地,利用所述高尔基体荧光标记试剂进行细胞成像的方法具体为:将所述高尔基体荧光标记试剂与细胞在37℃及5%CO₂条件下共培养5min以上,然后利用激光共聚焦显微镜进行细胞成像,收集荧光信号。

[0030] 进一步地,含高尔基体荧光标记物的培养基中,所述高尔基体荧光标记物在培养基中的浓度为3~5μM。

[0031] 进一步地,当高尔基体荧光标记试剂包括式(4a)所示的萘酰亚胺衍生物时,采用405nm光源激发,收集500~600nm范围内的荧光信号;式(4a)所示的萘酰亚胺衍生物高尔基体荧光标记物为高尔基体绿色标记物。

[0032] 进一步地,当高尔基体荧光标记试剂包括式(4b)或式(4c)所示的萘酰亚胺衍生物时,使用蓝通道激发,具体使用458nm光源激发,收集500~600nm范围内的荧光信号;式(4b)

或式(4c)所示的萘酰亚胺衍生物高尔基体荧光标记物为高尔基体绿色标记物。

[0033] 本发明的有益效果在于：

[0034] 1. 本发明以乙二胺为桥梁通过酰胺键分别与长碳链和荧光团相连接得到一类萘酰亚胺衍生物的高尔基体标记物，能够快速准确地靶向高尔基体，仅需5min即可实现细胞中高尔基体荧光成像，且与市售的高尔基体红色标记物Golgi Tracker Red (100nm)的共定位系数可高达0.96；此外，本发明保护的萘酰亚胺衍生物类高尔基体标记物具有良好的细胞兼容性，在10 μ M的高浓度下细胞的存活率仍>82，而现有技术中氨基喹啉类的高尔基体标记物的浓度为3-5 μ M时，培育的细胞会大量死亡。

[0035] 2. 本发明制备的一类萘酰亚胺衍生物高尔基体标记物可通过改变荧光团调控标记物的发射波长，以应用于不同通道化合物的标记，可设计性强；此外，本发明所述的萘酰亚胺衍生物的合成步骤简单，反应条件温和，原料价廉易得，有利于降低高尔基体标记物的制备成本，适于工业化量产。

附图说明

[0036] 图1为染料4a-c的合成路线；

[0037] 图2为染料6a-6c的合成路线；

[0038] 图3为染料4a的紫外-可见光吸收光谱及荧光发射光谱的叠图；

[0039] 图4为染料4b的紫外-可见光吸收光谱及荧光发射光谱的叠图；

[0040] 图5为染料4c的紫外-可见光吸收光谱及荧光发射光谱的叠图；

[0041] 图6为染料6a的紫外-可见光吸收光谱及荧光发射光谱的叠图；

[0042] 图7为染料6b的紫外-可见光吸收光谱及荧光发射光谱的叠图；

[0043] 图8为染料6c的紫外-可见光吸收光谱及荧光发射光谱的叠图；

[0044] 图9为染料4a标记高尔基体的细胞成像图：9(a)为染料4a的明场，9(b)为染料4a的细胞成像图，9(c)为高尔基体红色标记物的细胞成像图，9(d)为绿光通道和红光通道的叠加图，9(e)为叠加图中ROI线的荧光强度，9(f)为共定位实验；

[0045] 图10为染料4b标记高尔基体的细胞成像图：10(a)为染料4b的明场，10(b)为染料4b的细胞成像图，10(c)为高尔基体红色标记物的细胞成像图，10(d)为绿光通道和红光通道的叠加图，10(e)为叠加图中ROI线的荧光强度，10(f)为共定位实验；

[0046] 图11为染料4c标记高尔基体的细胞成像图：11(a)为染料4c的明场，11(b)为染料4c的细胞成像图，11(c)为高尔基体红色标记物的细胞成像图，11(d)为绿光通道和红光通道的叠加图，11(e)为叠加图中ROI线的荧光强度，11(f)为共定位实验；

[0047] 图12为染料4a标记线粒体的细胞成像图：12(a)为染料4a的明场，12(b)为染料4a的细胞成像图，12(c)为线粒体红色标记物的细胞成像图，12(d)为绿光通道和红光通道的叠加图，12(e)为叠加图中ROI线的荧光强度，12(f)为共定位实验；

[0048] 图13为染料4a标记溶酶体的细胞成像图：13(a)为染料4a的明场，13(b)为染料4a的细胞成像图，13(c)为溶酶体红色标记物的细胞成像图，13(d)为绿光通道和红光通道的叠加图，13(e)为叠加图中ROI线的荧光强度，13(f)为共定位实验；

[0049] 图14为染料4a标记内质网的细胞成像图：14(a)为染料4a的明场，14(b)为染料4a的细胞成像图，14(c)为内质网红色标记物的细胞成像图，14(d)为绿光通道和红光通道的

叠加图,14(e)为叠加图中ROI线的荧光强度,14(f)为共定位实验;

[0050] 图15为染料6a-6c的细胞成像图:15(a)为染料6a的明场,15(b)为染料6b的明场,15(c)为染料6c的明场,15(d)为染料6a的细胞成像图,15(e)为染料6b的细胞成像图,15(f)为染料6c的细胞成像图;

[0051] 图16为染料4a-4c的光稳定性测试结果;

[0052] 图17为染料4a-4c的细胞毒性测试结果(1a-1c分别代表采用染料为4a-4c培育HeLa细胞的细胞成活率)。

具体实施方式

[0053] 下面结合附图和具体实施例对本发明作进一步说明,以使本领域的技术人员可以更好地理解本发明并能予以实施,但所举实施例不作为对本发明的限定。

[0054] 除非另有定义,本文所使用的所有的技术和科学术语与属于本发明的技术领域的技术人员通常理解的含义相同。本文中在本发明的说明书中所使用的术语只是为了描述具体的实施例的目的,不是旨在于限制本发明。本文所使用的术语“及/或”包括一个或多个相关的所列项目的任意的和所有的组合。

[0055] 本发明涉及的化合物合成中,原料比例以及纯化方法采用常规比例或者常规纯化方法,实施例及对比例中制备的化合物均通过核磁、碳谱以及高分辨质谱验证产物结构的正确性。

[0056] 实施例高尔基体标记物4a-4c的制备

[0057] 本实施例涉及高尔基体标记物4a-4c的制备,合成路线如图1所示,具体制备过程如下:

[0058] 高尔基体标记物4a的制备:

[0059] (1)将1,8-萘二甲酸酐(908mg,4mmol)与N-叔丁氧羰基乙二胺(640mg,4mmol)溶解在20mL的乙醇中,反应在88℃下回流8h。在真空下去除溶剂后,用乙醇重结晶,得到黄色固体化合物1,产率68%;

[0060] (2)将化合物1(836mg,2mmol)溶解于10mL的二氯甲烷和5mL的三氟乙酸的混合溶剂中。在氮气保护下,在55℃下搅拌反应2小时,然后冷却至室温,再通过旋转蒸发器蒸发溶剂,得到黄色粉末状固体化合物2,产率97%;

[0061] (3)将化合物2(475mg,1.5mmol)、月桂酸(400mg,2mmol)、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳化二亚胺盐酸盐(576mg,3mmol)和4-二甲氨基吡啶(183mg,1.5mmol)溶解于5mL的DMF中。在氮气保护下,在120℃下搅拌反应9h。用DCM(20mL)和H₂O(10mL×3)萃取反应液,然后通过旋转蒸发器去除有机层的溶剂,最终产物通过DCM/MeOH(20:1,v/v)色谱纯化,得到黄色固体化合物3,产率47%;

[0062] (4)将化合物3(150mg,0.3mmol)、1-羟基吡咯烷酮-2.5-二酮(57.5mg,0.5mmol)和碳酸钾(79mg,0.5mmol)溶解在5mL的DMSO中,并在120℃下回流3小时,溶液逐渐呈现橙色荧光,将溶液倒入20毫升蒸馏水中,并逐滴添加盐酸,有棕色固体析出,过滤并干燥可得纯净的染料4a,产率97%。对染料4a进行核磁氢谱、碳谱以及质谱表征,表征结果如下:

[0063] ¹H NMR(300MHz,DMSO-d₆):δ(ppm) 11.87(s,1H,ArO-H),8.33-8.52(d,3H,J=7.5Hz,3×Ar-H),7.84(t,1H,J=9.5Hz,NH),7.76(t,1H,J=12Hz,Ar-H),7.16(d,1H,J=

7.8Hz, Ar-H), 4.11 (t, 2H, J=12.5Hz, CH₂), 1.94 (t, 2H, J=12.5Hz, CH₂), 1.11-1.22 (m, 20H, J=7.5Hz, 10×CH₂), 0.85 (t, 3H, J=12.5Hz, CH₃)。

[0064] ¹³C NMR (151MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) 172.7, 164.3, 163.3, 160.6, 133.8, 131.4, 129.8, 129.2, 125.9, 122.8, 122.5, 113.3, 110.3, 36.8, 35.9, 31.7, 29.5, 29.4, 29.2, 29.1, 29.0, 25.5, 22.5, 14.39。

[0065] HRMS (ESI⁺): m/z calcd C₂₆H₃₄N₂O₄⁺ for [M+Na]⁺ 461.2411, found: 461.2456。

[0066] 高尔基体标记物4b的制备:

[0067] 将化合物3 (251mg, 0.5mmol)、N-庚胺 (575mg, 5mmol)、碘化亚铜 (25.1mg, 0.13mmol) 和碳酸钾 (34.5mg, 0.25mmol) 溶解于二甲基亚砜中。在100℃下搅拌反应3.5h。用DCM (20mL) 和H₂O (10mL×3) 萃取反应液, 然后通过旋转蒸发器去除有机层的溶剂。最终产物用乙醇重结晶, 得黄色固体染料4b, 产率90%。对染料4b进行核磁氢谱以及质谱表征, 表征结果如下:

[0068] ¹H NMR (300MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) 8.16-8.65 (d, 3H, J=7.5Hz, 3×Ar-H), 7.74 (m, 2H, J=7.5Hz, 2×NH), 7.60 (t, 1H, J=12Hz, Ar-H), 6.67 (d, 1H, J=7.5Hz, Ar-H), 4.03 (t, 2H, J=9.3Hz, CH₂), 1.85 (t, 2H, J=12.5Hz, CH₂), 1.64 (m, 2H, J=11.6Hz, CH₂), 1.03-1.15 (m, 30H, J=17.3Hz, 15×CH₂), 0.79 (t, 6H, J=6.7Hz, 2×CH₃)。

[0069] HRMS (ESI⁺): m/z calcd C₃₃H₅₀N₃O₃⁺ for [M]⁺ 535.3774, found: 535.3766。

[0070] 高尔基体标记物4c的制备:

[0071] 将化合物3 (251mg, 0.5mmol)、苯甲胺 (535mg, 5mmol)、碘化亚铜 (25.1mg, 0.13mmol) 和碳酸钾 (34.5mg, 0.25mmol) 溶解于二甲基亚砜中。在100℃下搅拌反应3.5h。用DCM (20mL) 和H₂O (10mL×3) 萃取反应液, 然后通过旋转蒸发器去除有机层的溶剂。最终产物通过DCM/MeOH (30:1, v/v) 色谱纯化, 得黄色固体染料4c, 产率11%。对染料4c进行核磁氢谱、碳谱以及质谱表征, 表征结果如下:

[0072] ¹H NMR (300MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) 8.17-8.59 (d, 3H, J=7.5Hz, 3×Ar-H), 7.83 (t, 1H, J=12.5Hz, NH), 7.64 (t, 1H, J=11.3Hz, Ar-H), 7.42 (s, 2H, NH₂), 6.82 (d, 1H, J=7.5Hz, Ar-H), 4.09 (t, 2H, J=12.5Hz, CH₂), 1.93 (t, 2H, J=12.5Hz, CH₂), 1.13-1.22 (m, 20H, J=7.5Hz, 10×CH₂), 0.85 (t, 3H, J=12.2Hz, CH₃)。

[0073] ¹³C NMR (151MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) 172.7, 164.5, 163.6, 153.1, 134.3, 131.3, 130.3, 129.6, 124.4, 122.5, 119.9, 108.5, 108.3, 37.0, 35.9, 31.8, 29.5, 29.4, 29.3, 29.2, 29.1, 29.0, 25.6, 22.6, 14.4。

[0074] HRMS (ESI⁺): m/z calcd C₂₆H₃₅N₃O₃⁺ for [M+Na]⁺ 460.2571, found: 460.2602。

[0075] 对比例1染料6a的制备

[0076] 本对比例涉及染料6a的制备, 合成路线如图2所示, 具体制备过程如下:

[0077] 将1,8-萘二甲酸酐 (227mg, 1mmol)、十二烷-1-胺 (740mg, 4mmol)、碘化亚铜 (25.1mg, 0.12mmol) 和碳酸钾 (70mg, 0.5mmol) 溶解于二甲基亚砜中, 在120℃下搅拌反应3h。用DCM (20mL) 和H₂O (10mL×3) 萃取反应液, 然后通过旋转蒸发器除去有机层的溶剂, 最终产物经DCM层析纯化, 得到黄色固体染料6a, 产率89%。对染料6a进行核磁氢谱以及质谱表征, 表征结果如下:

[0078] ¹H NMR (300MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) 8.23-8.71 (d, 3H, J=7.5Hz, 3×Ar-H), 7.73 (t,

1H, J=6.8Hz, NH), 7.66 (t, 1H, J=8.5Hz, Ar-H), 6.74 (d, 1H, J=7.5Hz, Ar-H), 3.99 (t, 2H, J=3.5Hz, CH₂), 3.37 (t, 2H, J=12.5Hz, CH₂), 0.92-1.21 (m, 40H, J=7.5Hz, 20×CH₂), 0.84 (t, 6H, J=12.2Hz, 2×CH₃)。

[0079] HRMS (ESI⁺): m/z calcd C₃₆H₅₆N₂O₂⁺ for [M]⁺ 548.4342, found: 548.4333。

[0080] 对比例2染料6b的制备

[0081] 本对比例涉及染料6b的制备, 合成路线如图2所示, 具体制备过程如下:

[0082] 将实施例中的化合物1 (209mg, 0.5mmol)、C₁₂H₂₅NH₂ (925mg, 5mmol)、碘化亚铜 (25.1mg, 0.13mmol) 和碳酸钾 (34.5mg, 0.25mmol) 溶解于二甲基亚砜中。在100℃下搅拌反应3.5h。用EA (20mL) 和H₂O (10mL×3) 萃取反应液, 然后通过旋转蒸发器去除有机层的溶剂, 将石油醚添加到生成的固体中, 得到最终产物绿色固体染料6b, 产率75%。对染料6b进行核磁氢谱以及质谱表征, 表征结果如下:

[0083] ¹H NMR (300MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) 8.23-8.71 (d, 3H, J=7.5Hz, 3×Ar-H), 7.70 (t, 1H, J=6.8Hz, NH), 7.66 (t, 1H, J=5.9Hz, Ar-H), 6.84 (s, 1H, NH), 6.74 (d, 1H, J=7.8Hz, Ar-H), 4.09 (t, 2H, J=7.5Hz, CH₂), 3.20 (d, 2H, J=7.5Hz, CH₂), 1.69 (t, 2H, J=12.5Hz, CH₂), 1.25 (m, 9H, J=12.5Hz, 3×CH₃), 1.21-1.23 (m, 20H, J=7.5Hz, 10×CH₂), 0.84 (t, 3H, J=12.5Hz, CH₃)。

[0084] ¹³C NMR (151MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) 164.5, 163.6, 156.1, 151.0, 134.6, 131.0, 130.1, 128.9, 124.6, 122.6, 120.6, 108.2, 104.1, 77.9, 43.3, 38.5, 31.8, 29.5, 29.4, 29.3, 29.2, 28.6, 28.3, 27.1, 22.6, 14.4。

[0085] HRMS (ESI⁺): m/z calcd C₃₁H₄₅N₃O₄⁺ for [M+Na]⁺ 546.3302, found: 546.3315。

[0086] 对比例3染料6c的制备

[0087] 本对比例涉及染料6c的制备, 合成路线如图2所示, 具体制备过程如下:

[0088] (1) 将实施例中的化合物2 (475mg, 1.5mmol)、无水乙酸 (120mg, 2mmol)、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳化二亚胺盐酸盐 (576mg, 3mmol) 和4-二甲氨基吡啶 (183mg, 1.5mmol) 溶解于DMSO中, 在氮气保护下, 在120℃下搅拌反应9h, 用DCM (20mL) 和H₂O (10mL×3) 萃取反应液, 然后通过旋转蒸发器去除有机层的溶剂, 最终产物通过DCM/MeOH (20:1, v/v) 色谱纯化, 得到黄色固体化合物5, 产率47%;

[0089] (2) 将化合物5 (181mg, 0.5mmol)、氮戊环 (355mg, 5mmol)、碘化亚铜 (25.1mg, 0.13mmol) 和碳酸钾 (34.5mg, 0.25mmol) 溶解于二甲基亚砜中。在100℃下搅拌反应3.5h。用EA (20mL) 和H₂O (10mL×3) 萃取反应液, 然后通过旋转蒸发器去除有机层的溶剂, 最终产物通过DCM/MeOH (50:1, v/v) 色谱纯化, 得黄色固体染料6c, 产率36%。对染料6c进行核磁氢谱以及质谱表征, 表征结果如下:

[0090] ¹H NMR (300MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) 7.37-7.86 (d, 3H, J=7.5Hz, 3×Ar-H), 7.10 (t, 1H, J=7.5Hz, NH), 6.76 (t, 1H, J=5.4Hz, Ar-H), 6.01 (d, 1H, J=7.8Hz, Ar-H), 3.24 (t, 2H, J=7.5Hz, CH₂), 2.91 (s, 4H, 2×CH₂), 1.65 (s, 2H, CH₂), 1.17 (s, 4H, 2×CH₂), 0.86 (s, 3H, CH₃)。

[0091] ¹³C NMR (151MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) 169.7, 164.5, 163.5, 152.7, 133.3, 133.0, 131.2, 131.0, 123.7, 122.3, 122.2, 109.5, 108.9, 53.3, 37.1, 26.1, 23.0。

[0092] HRMS (ESI⁺): m/z calcd C₃₁H₄₅N₃O₄⁺ for [M]⁺ 351.1583, found: 351.1587。

[0093] 性能研究

[0094] (1) 测试不同染料的紫外吸收和荧光发射

[0095] 测试上述实施例及对比例制备的染料4a-4c、6a-6c在二氯甲烷中(染料浓度为 $10\mu\text{m}$)的紫外吸收和荧光发射,结果如图3-图8所示,图中横坐标为波长,纵坐标分别为吸光度和荧光强度。

[0096] 图3为染料4a的紫外-可见光吸收光谱及荧光发射光谱的叠图,由图可知,染料4a的最大吸收波长为 377nm ;在激发波长为 377nm ,狭缝宽度为 $3\text{nm}/1.5\text{nm}$,其最大发射波长为 456nm ;

[0097] 图4为染料4b的紫外-可见光吸收光谱及荧光发射光谱的叠图,由图可知,染料4b的最大吸收波长为 433nm ;在激发波长为 433nm ,狭缝宽度为 $3\text{nm}/1.5\text{nm}$,其最大发射波长为 519nm ;

[0098] 图5为染料4c的紫外-可见光吸收光谱及荧光发射光谱的叠图,由图可知,染料4c的最大吸收波长为 413nm ;在激发波长为 413nm ,狭缝宽度为 $3\text{nm}/1.5\text{nm}$,最大发射波长为 517nm ;

[0099] 图6为染料6a的紫外-可见光吸收光谱及荧光发射光谱的叠图,由图可知,染料6a的最大吸收波长为 455nm ;在激发波长为 445nm ,狭缝宽度为 $3\text{nm}/1.5\text{nm}$,其最大发射波长为 527nm ;

[0100] 图7为染料6b的紫外-可见光吸收光谱及荧光发射光谱的叠图,由图可知,染料6b的最大吸收波长为 444nm ;在激发波长为 444nm ,狭缝宽度为 $3\text{nm}/1.5\text{nm}$,其最大发射波长为 531nm ;

[0101] 图8为染料6c的紫外-可见光吸收光谱及荧光发射光谱的叠图,由图可知,染料6c的最大吸收波长为 451nm ;在激发波长为 451nm ,狭缝宽度为 $3\text{nm}/1.5\text{nm}$,其最大发射波长为 516nm 。

[0102] (2) 荧光标记能力研究

[0103] a. 测试实施例制备的染料的荧光标记能力

[0104] 标记高尔基体的试验:

[0105] 使用二甲基亚砜将实施例制备的各染料分别配制成母液,然后加入常规细胞培养基中,使得染料在细胞培养基中的浓度为 $2\mu\text{M}$,再与HeLa细胞在饱和湿度、 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 培养箱中共同培养10分钟,随后分别加入市售的高尔基体红色标记物Golgi Tracker Red (100nm)再培养10分钟,然后经PBS缓冲液洗三次后,利用激光共聚焦显微镜进行细胞成像;绿光通道选用 405nm 或 458nm 激发(染料4a采用 405nm 波长的光激发,染料4b、4c采用 458nm 波长的光激发),收集 $500-600\text{nm}$ 范围内的荧光信号,红光通道使用 561nm 激发,收集 $570-750\text{nm}$ 范围内的荧光信号。

[0106] 染料4a标记高尔基体的测试结果如图9所示:9(a)为染料4a的明场,9(b)为染料4a的细胞成像图,9(c)为高尔基体红色标记物的细胞成像图,9(d)为绿光通道和红光通道的叠加图,9(e)为叠加图中ROI线的荧光强度,9(f)为共定位实验,数据显示两种荧光标记物的共定位系数为0.96。

[0107] 染料4b标记高尔基体的测试结果如图10所示:10(a)为染料4b的明场,10(b)为染料4b的细胞成像图,10(c)为高尔基体红色标记物的细胞成像图,10(d)为绿光通道和红光通道的叠加图,10(e)为叠加图中ROI线的荧光强度,10(f)为共定位实验,数据显示两种荧

光标标记物的共定位系数为0.84。

[0108] 染料4c标记高尔基体的测试结果如图11所示:11(a)为染料4c的明场,11(b)为染料4c的细胞成像图,11(c)为高尔基体红色标记物的细胞成像图,11(d)为绿光通道和红光通道的叠加图,11(e)为叠加图中ROI线的荧光强度,11(f)为共定位实验,数据显示两种荧光标记物的共定位系数为0.92。

[0109] 由上述表征结果可知,染料4a-4c的荧光图像与市售的高尔基体红色标记物Golgi Tracker Red的荧光图像在高尔基体中的分布情况一致,且强度相近,表明染料4a-4c在HeLa细胞中具有高尔基体标记能力,可作为高尔基体绿色标记物。

[0110] 标记线粒体的试验:

[0111] 使用二甲基亚砜将染料4a配制成母液,随后加入常规细胞培养基中,使得染料4a在细胞培养基中的浓度为2 μ M,再与HeLa细胞在饱和湿度、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂培养箱中共同培养10分钟,随后分别加入商用线粒体红色标记物Mito Tracker Red(100nm)再培养10分钟;然后经PBS缓冲液洗三次后,利用激光共聚焦显微镜进行细胞成像;绿光通道选用405nm激发,收集500-600nm范围内的荧光信号,红光通道使用561nm激发,收集570-750nm范围内的荧光信号。

[0112] 染料4a标记线粒体的测试结果如图12所示:12(a)为染料4a的明场,12(b)为染料4a的细胞成像图,12(c)为线粒体红色标记物的细胞成像图,12(d)为绿光通道和红光通道的叠加图,12(e)为叠加图中ROI线的荧光强度,12(f)为共定位实验,数据显示两种荧光标记物的共定位系数为0.62。结果表明,染料4a的荧光图像与商用线粒体红色标记物Mito Tracker Red的荧光图像在细胞中的分布情况不一致,表明染料4a在HeLa细胞中标记的不是线粒体。

[0113] 标记溶酶体的试验:

[0114] 实验方法与上述标记高尔基体、线粒体一致,仅将商用红色标记物更换为对应的溶酶体红色标记物Lyso-Tracker Red,其余不变;测试结果如图13所示:13(a)为染料4a的明场,13(b)为染料4a的细胞成像图,13(c)为溶酶体红色标记物的细胞成像图,13(d)为绿光通道和红光通道的叠加图,13(e)为叠加图中ROI线的荧光强度,13(f)为共定位实验,数据显示两种荧光标记物的共定位系数分别为0.68。结果表明,染料4a的荧光图像与商用溶酶体红色标记物的荧光图像在细胞中的分布情况不一致,表明染料4a在HeLa细胞中标记的不是溶酶体。

[0115] 标记内质网的试验:

[0116] 实验方法与上述标记高尔基体、线粒体一致,仅将商用红色标记物更换为对应的内质网红色标记物ER-Tracker Red,其余不变;测试结果如图14所示:14(a)为染料4a的明场,14(b)为染料4a的细胞成像图,14(c)为内质网红色标记物的细胞成像图,14(d)为绿光通道和红光通道的叠加图,14(e)为叠加图中ROI线的荧光强度,14(f)为共定位实验,他们的共定位系数分别为0.50。结果表明,染料4a的荧光图像与商用红色内质网标记物在HeLa细胞中的分布情况不一致,表明染料4a在HeLa细胞中标记的细胞器不是内质网。

[0117] b. 测试对比例制备的染料对高尔基体的荧光标记能力

[0118] 使用二甲基亚砜将对比例制备的各染料分别配制成母液,然后加入常规细胞培养基中,使得染料在细胞培养基中的浓度为2 μ M,再与HeLa细胞在饱和湿度、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂培养

箱共同培养10分钟,然后经PBS缓冲液洗三次后,利用激光共聚焦显微镜进行细胞成像;绿光通道选用458nm激发,收集500-600nm范围内的荧光信号。测试结果如图15所示:15(a)为染料6a的明场,15(b)为染料6b的明场,15(c)为染料6c的明场,15(d)为染料6a的细胞成像图,15(e)为染料6b的细胞成像图,15(f)为染料6c的细胞成像图。结果表明,染料6a-6c的荧光图像无明显的细胞器靶向能力,在HeLa细胞中不具有高尔基体标记能力,不能作为高尔基体绿色标记物。

[0119] (3) 稳定性研究

[0120] 对实施例制备的不同染料进行光稳定性测试,具体操作为:称取相应质量的染料4a-4c,分别将染料各自溶解在乙腈中配制染料浓度为10 μ M的溶液,用飞利浦碘钨灯(500W)照射所有的样品,灯与样品间的距离设为25cm。在灯和样品之间放置一个8cm厚的NaNO₂(60g·L⁻¹)冷阱,以消除热量和短波长光。连续照射6小时,其中每半小时进行一次紫外荧光测试,六小时后,光稳定性根据不同时间照射后的吸收强度与初始吸收强度对比来计算剩余吸收率。

[0121] 测试结果如图16所示,连续照射6小时染料4a-4c的剩余吸收分别是4a:73%,4b:60%,4c:79%,由此可知染料4a-4c具有良好的光稳定性。

[0122] (4) 细胞毒性研究

[0123] 对实施例制备的不同染料进行细胞毒性测试,使用CCK-8方法测量HeLa细胞在不同浓度、不同种类的染料存在下的活力。具体操作为:将HeLa细胞分别与不同浓度(0、2、4、6、8和10 μ M)、不同种类(染料4a、4b、4c)的染料中孵育6小时。

[0124] 染料4a-4c的细胞毒性测试结果如图17所示,1a-1c分别代表采用染料为4a-4c培育HeLa细胞的细胞成活率,在染料浓度为10 μ M的培养基中孵育6小时,细胞存活率分别为4a:83%,4b:82%,4c:100%,结果表明本发明制备的高尔基体标记物细胞毒性低,适合活细胞成像。

[0125] 细胞存活率(%) = $(A_{\text{sample}} - A_b) / (A_c - A_b)$,其中A_c:阴性对照(包括培养基和细胞,无待测染料添加),A_b:空白(包括待测染料和培养基,无细胞添加),A_{sample}:测试组(包括培养基、细胞和待测染料)。

[0126] 以上所述实施例仅是为充分说明本发明而所举的较佳的实施例,本发明的保护范围不限于此。本技术领域的技术人员在本发明基础上所作的等同替代或变换,均在本发明的保护范围之内。本发明的保护范围以权利要求书为准。

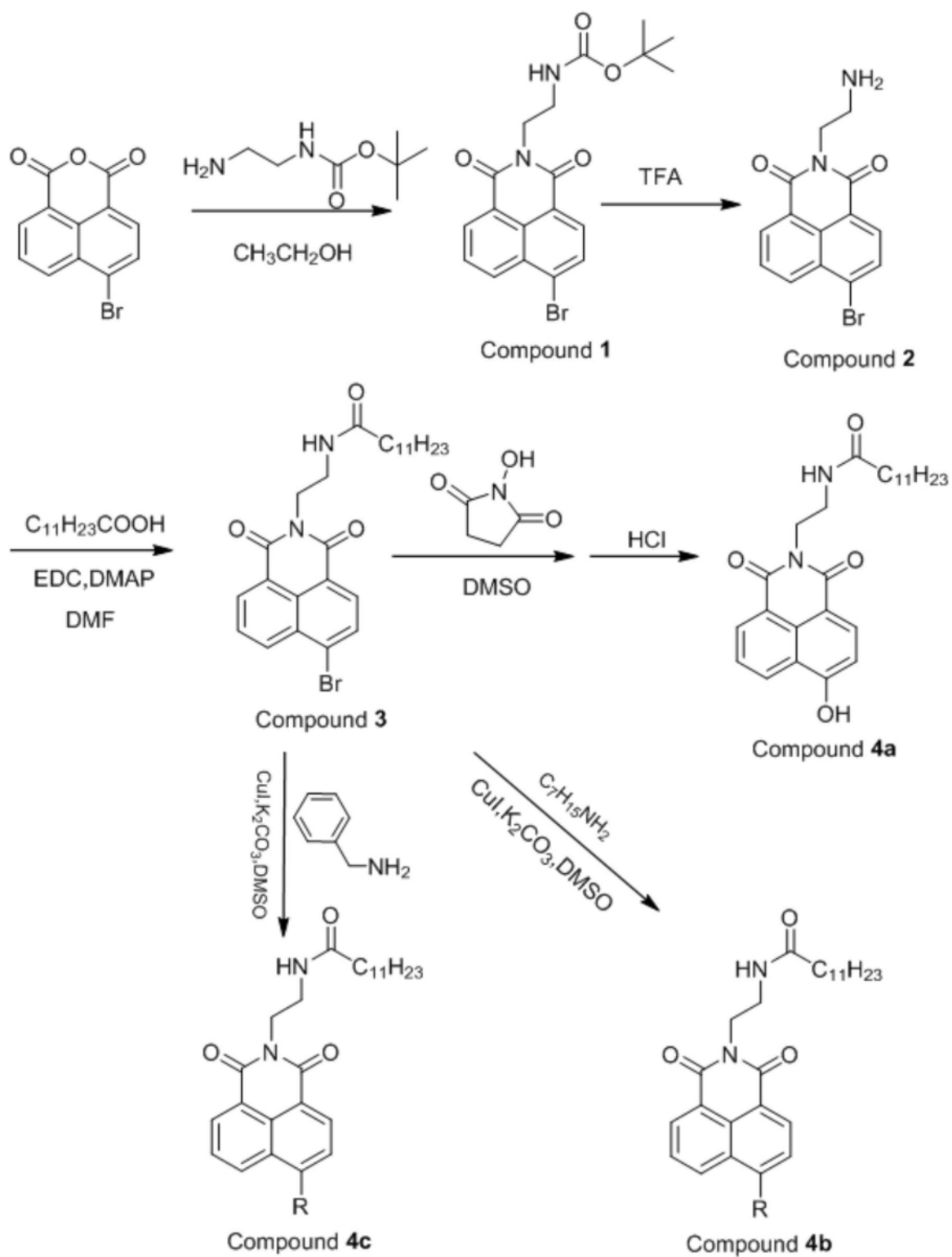


图1

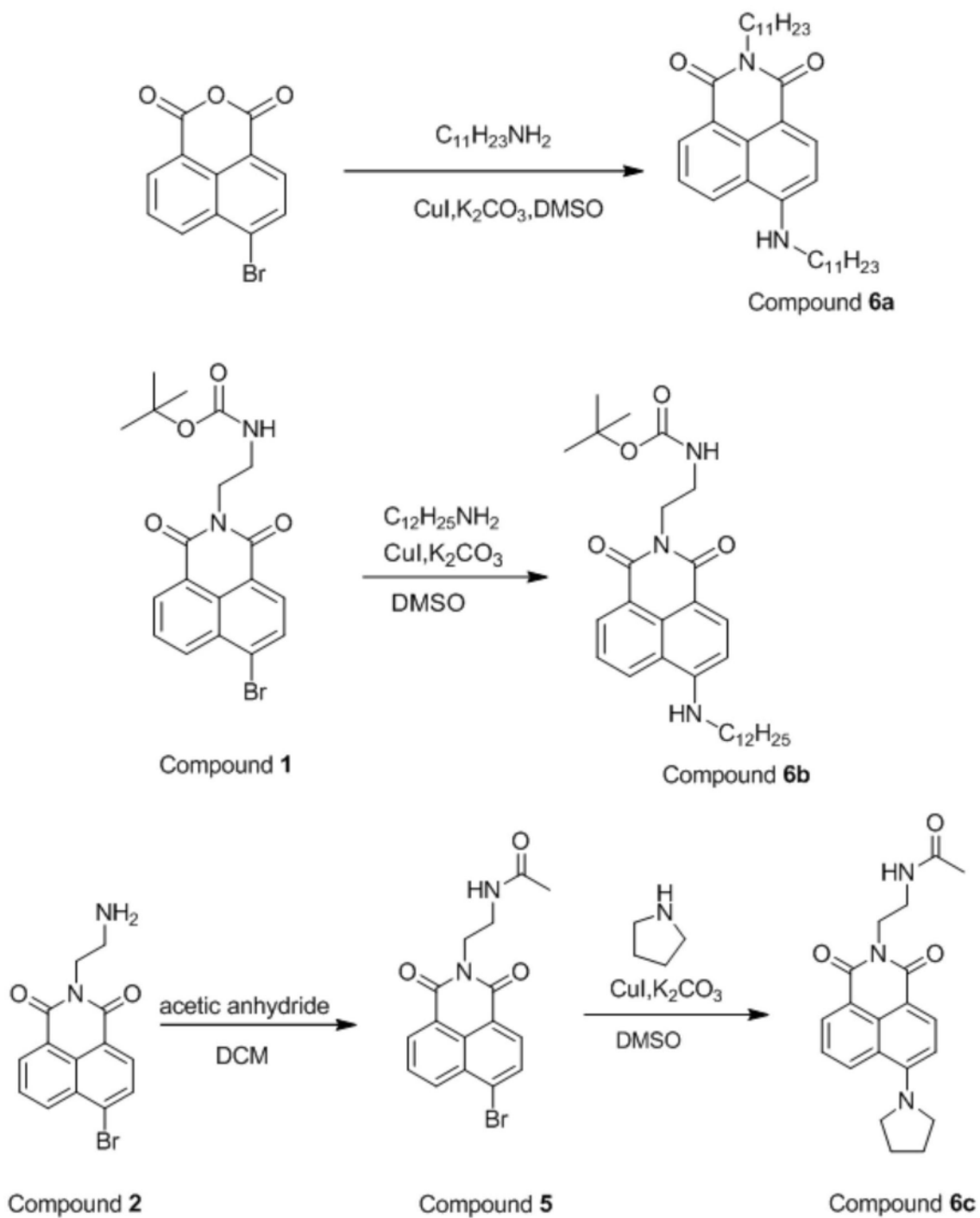


图2

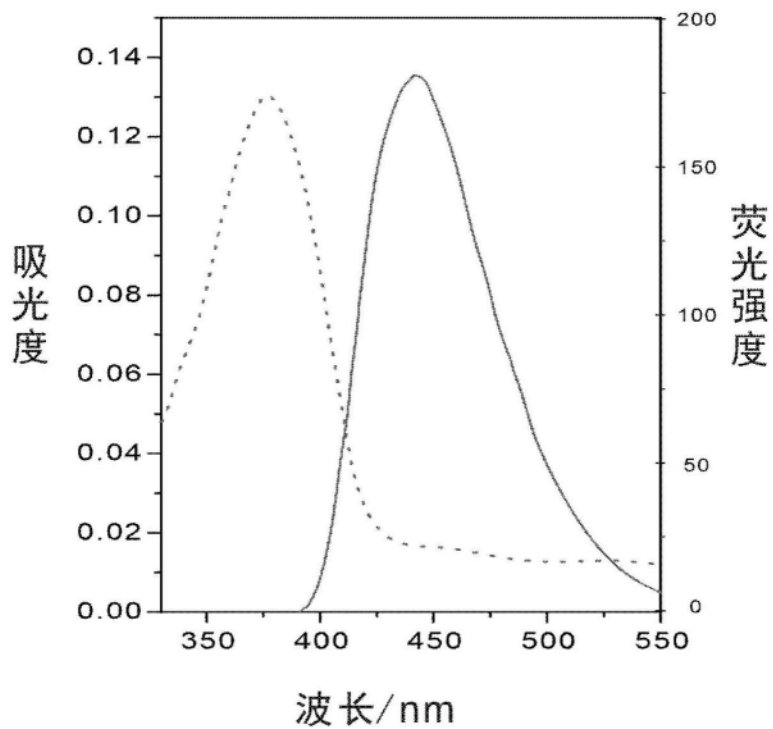


图3

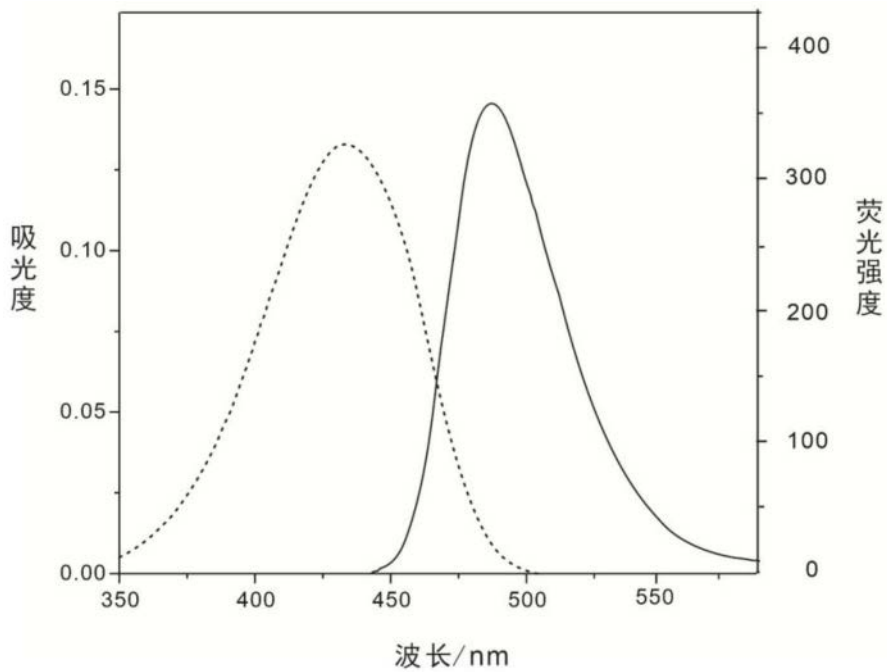


图4

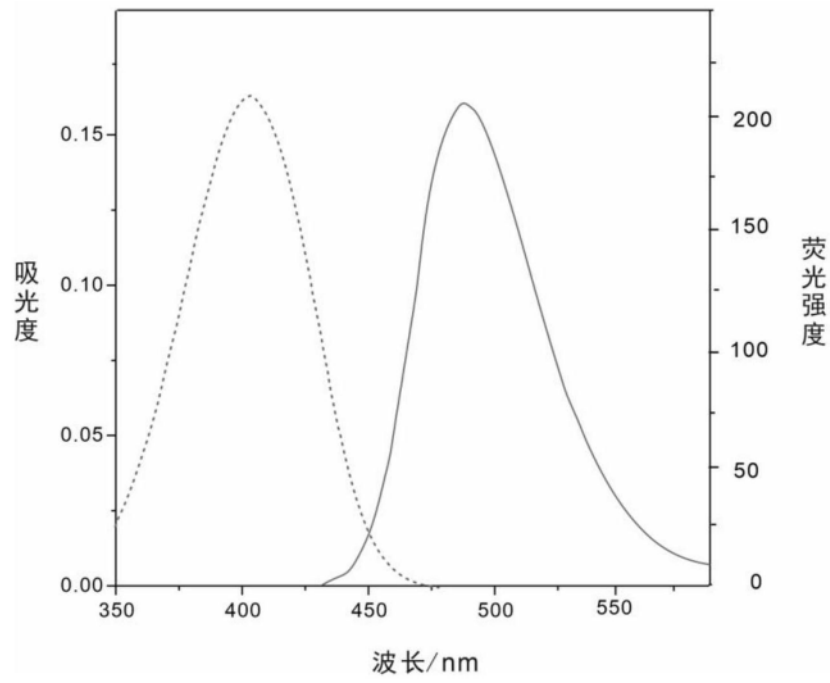


图5

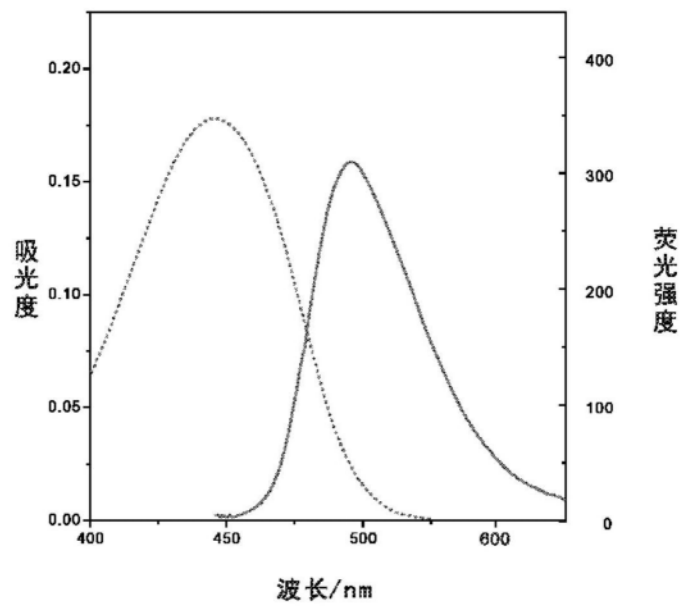


图6

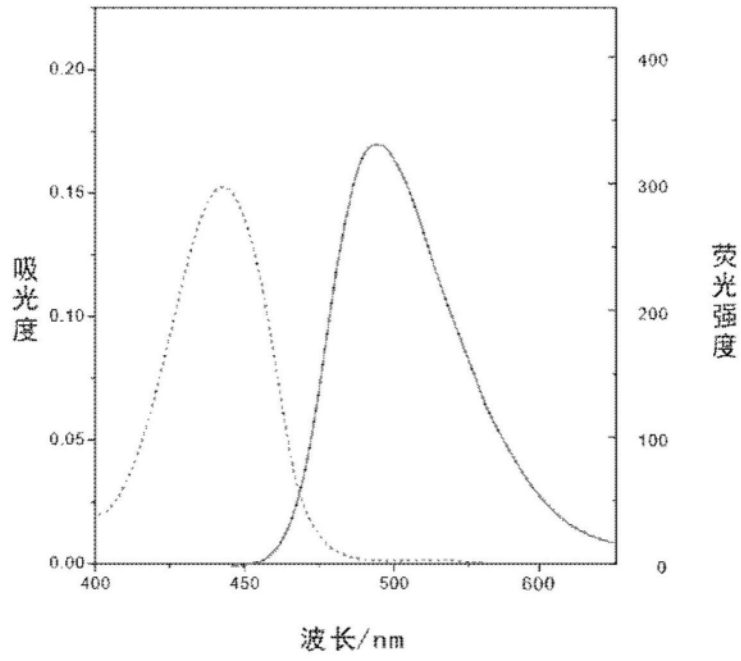


图7

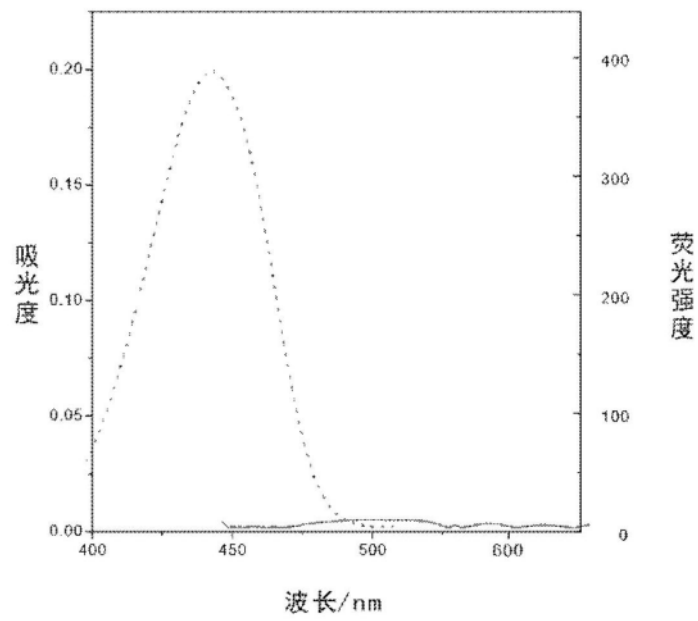


图8

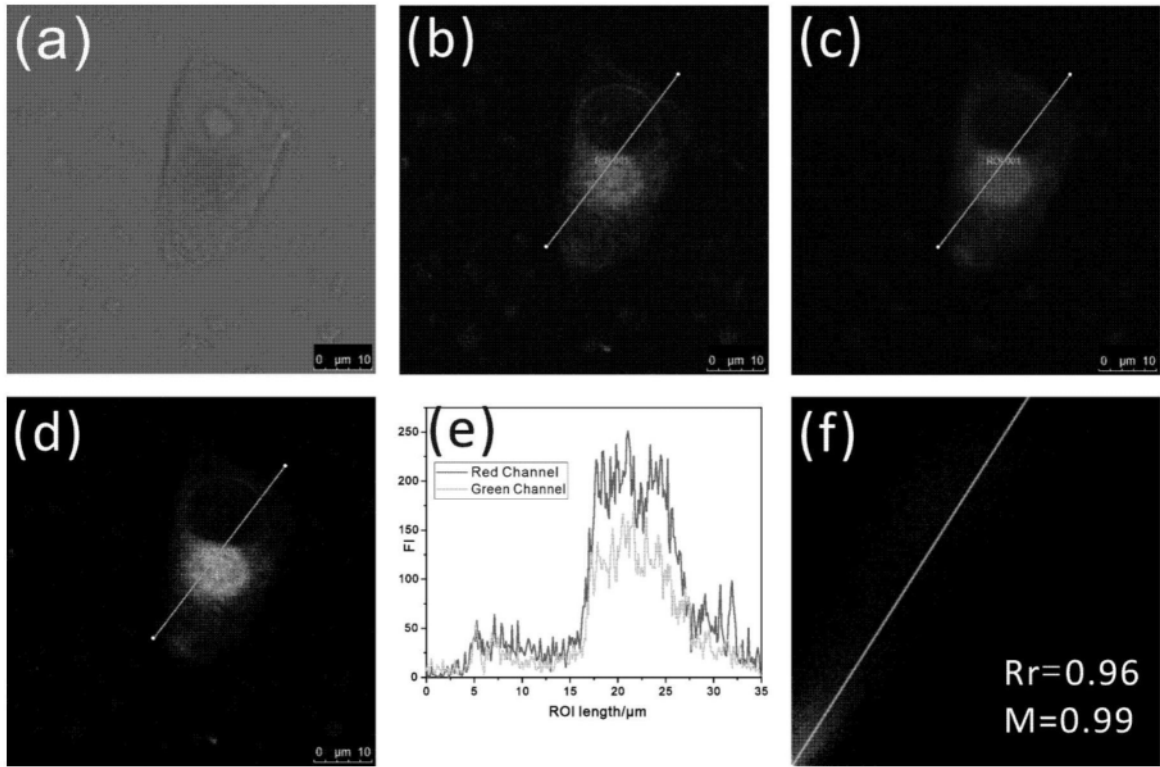


图9

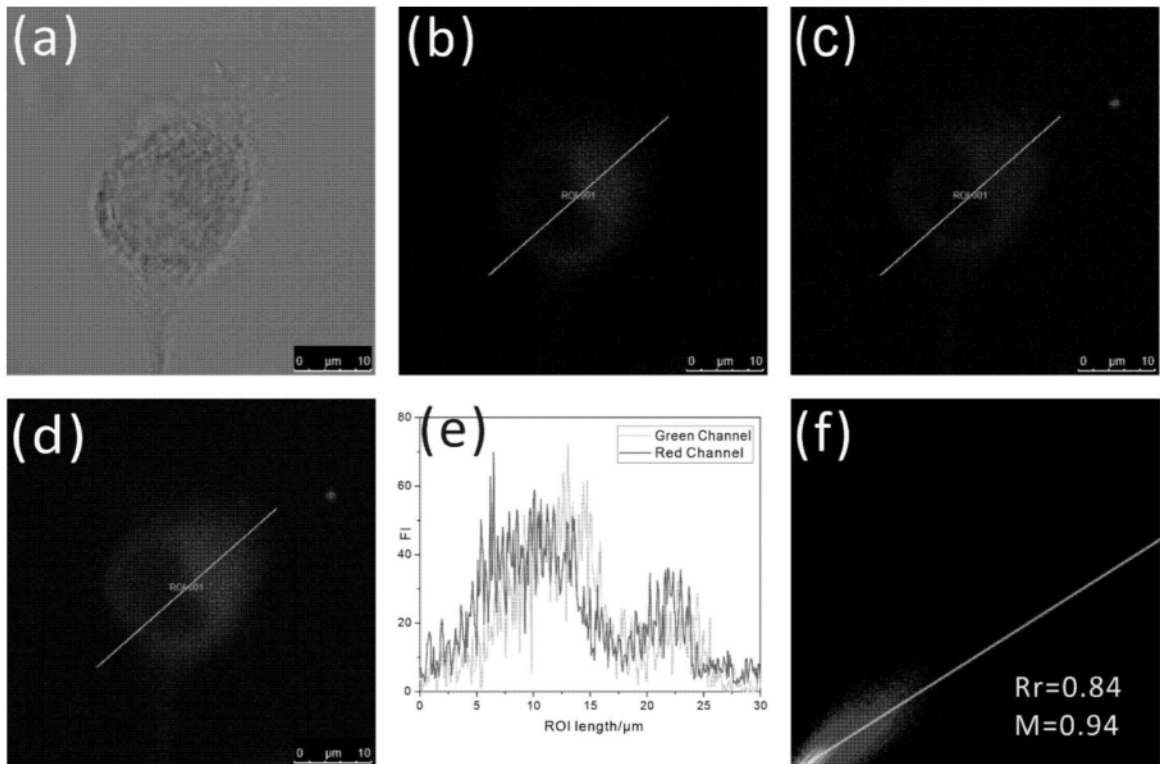


图10

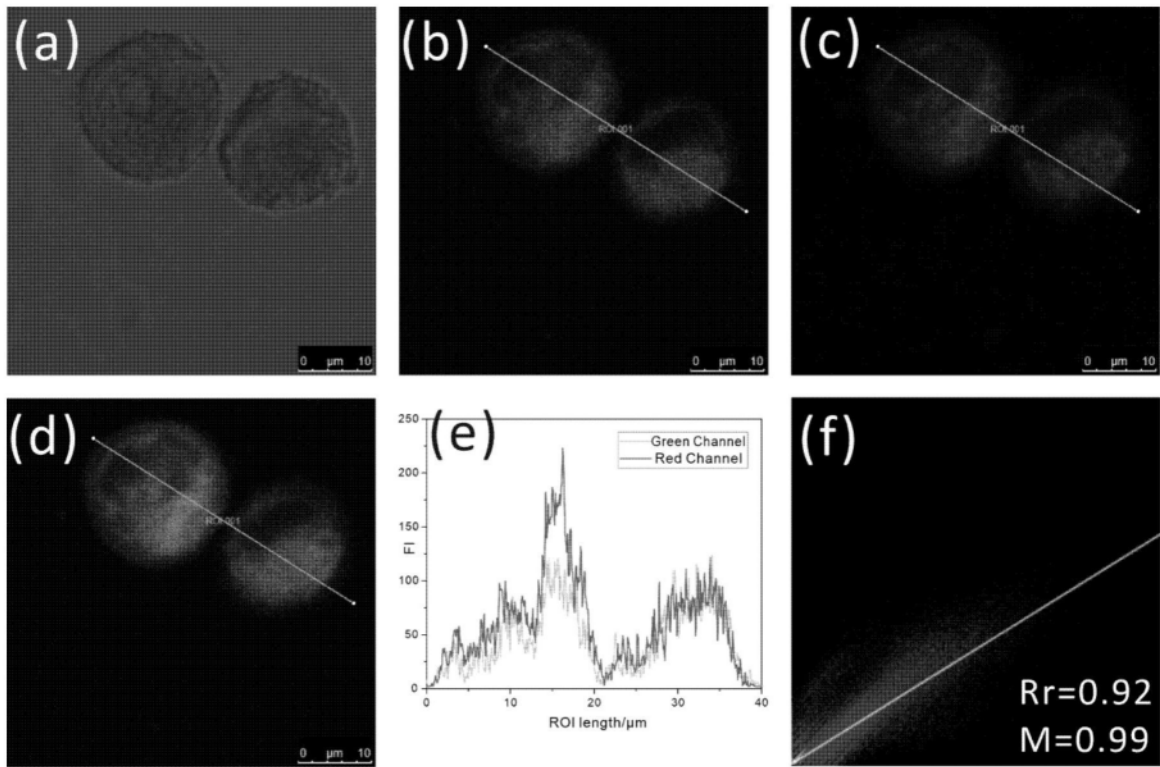


图11

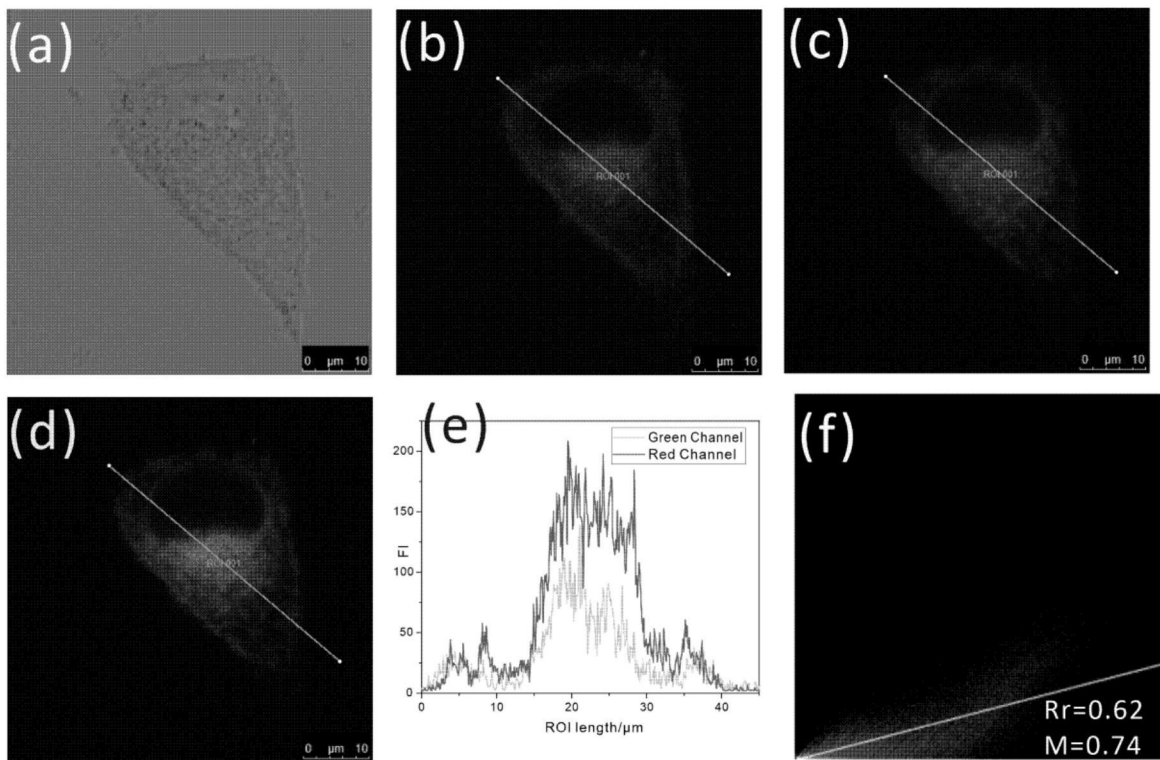


图12

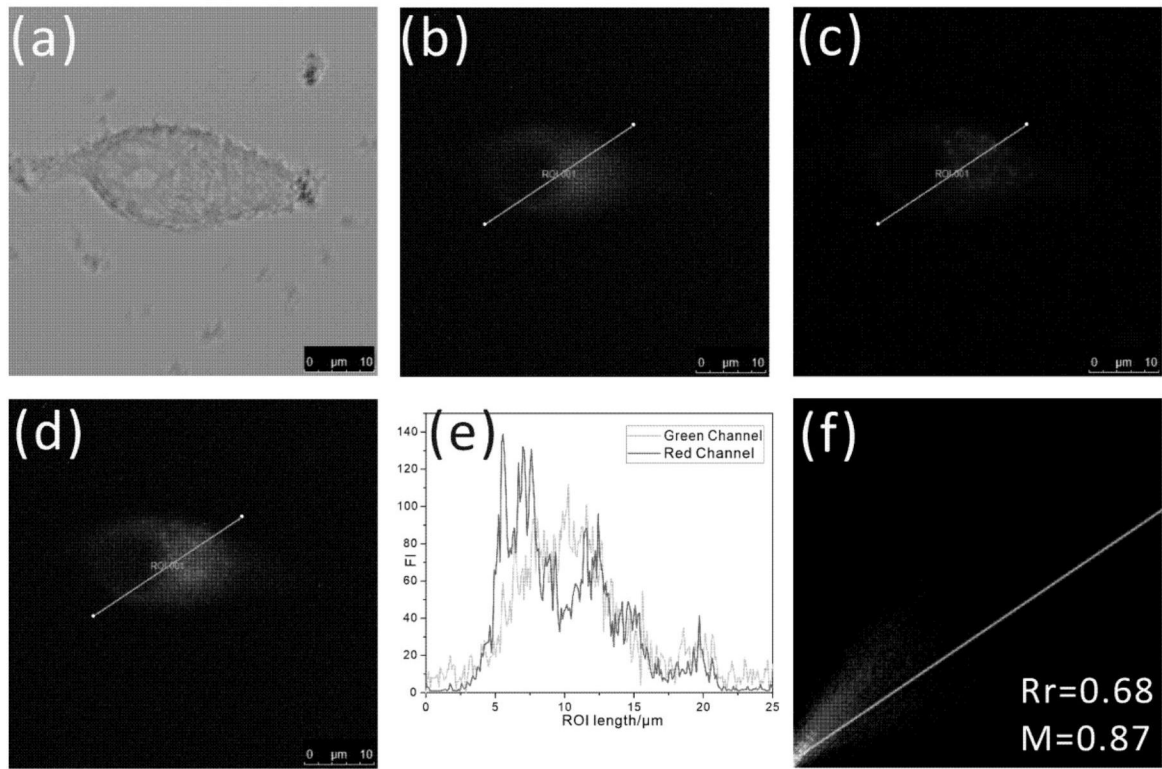


图13

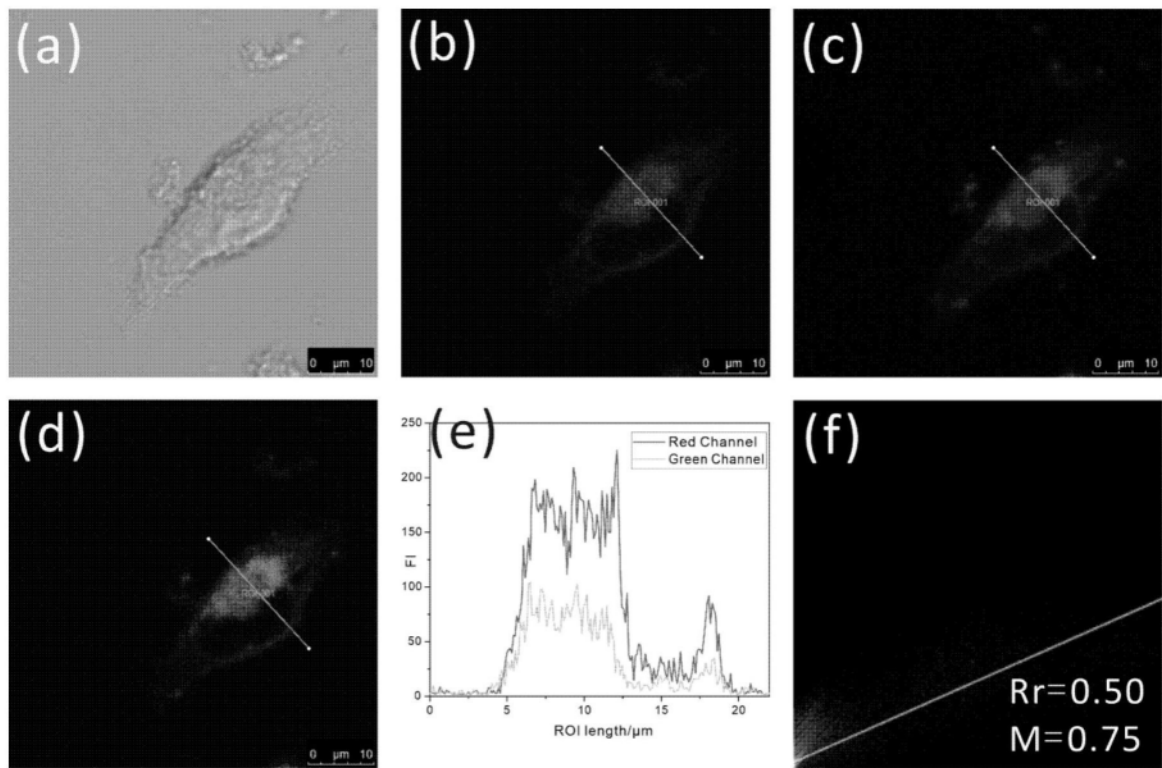


图14

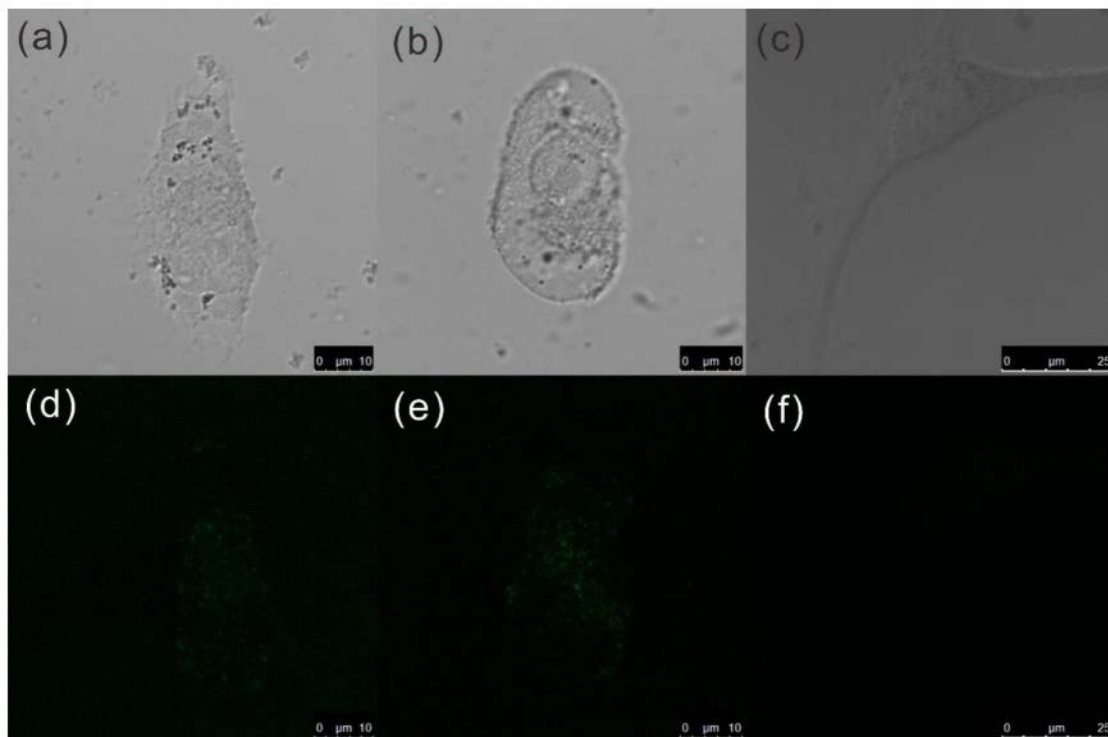


图15

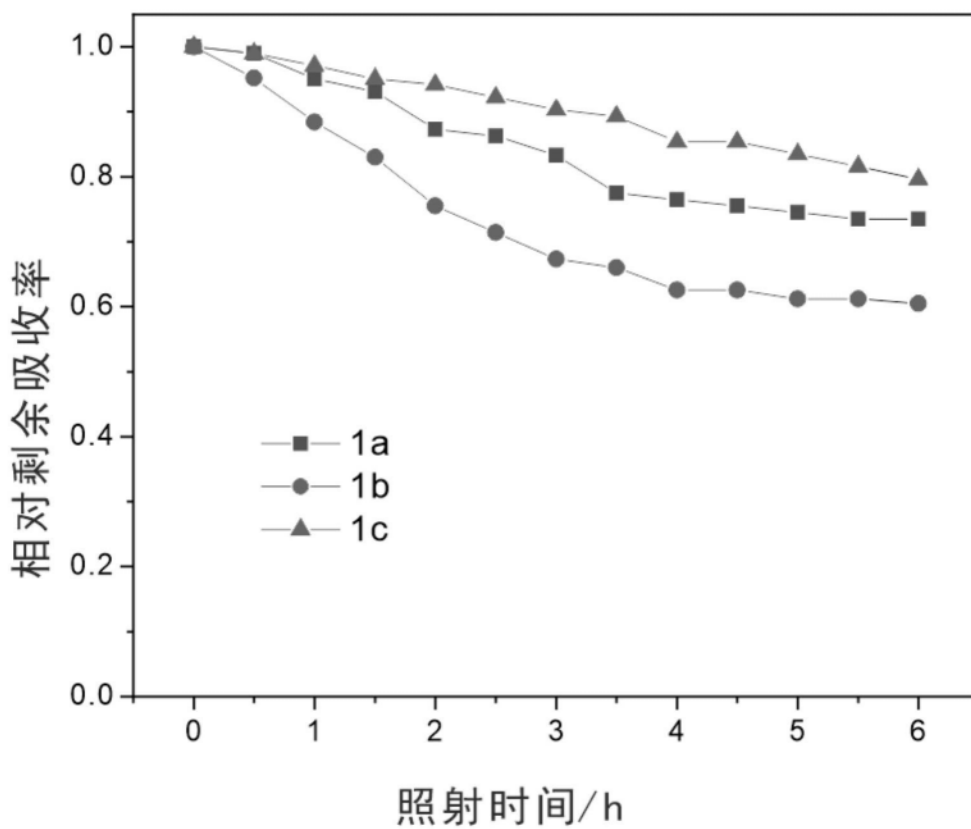


图16

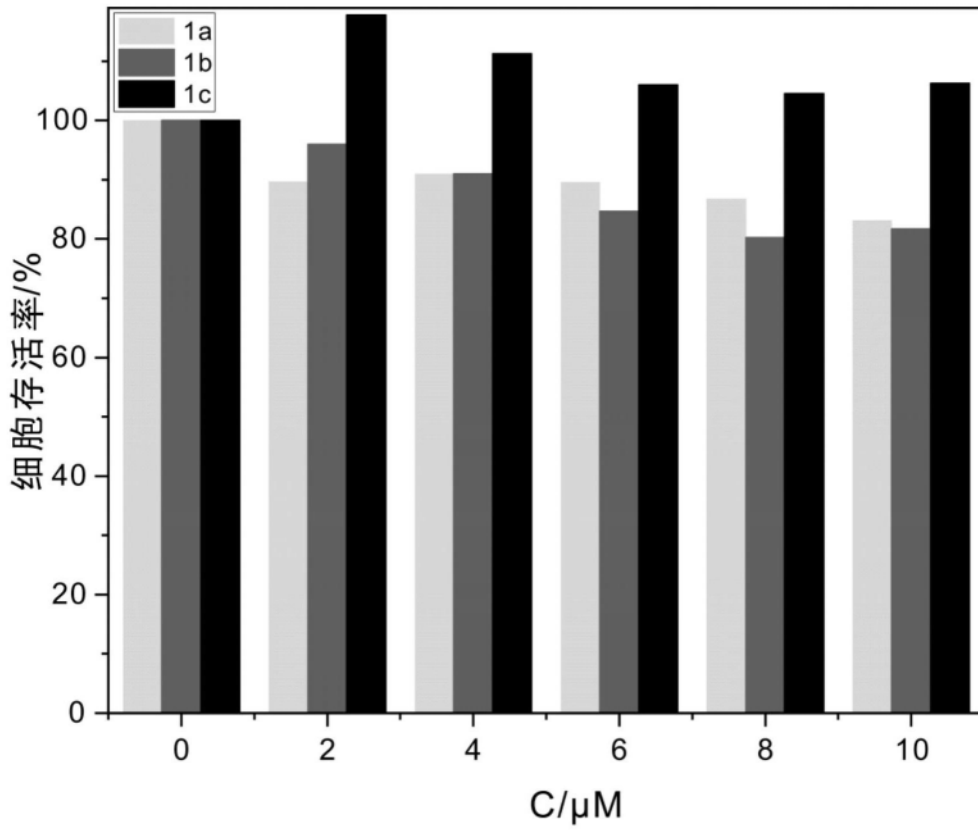


图17