



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102618060 A

(43) 申请公布日 2012. 08. 01

(21) 申请号 201210070864. 1

(22) 申请日 2012. 03. 17

(71) 申请人 江南大学

地址 214122 江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号

(72) 发明人 陈秀英 郭琳 张丹

(74) 专利代理机构 无锡市大为专利商标事务所 32104

代理人 殷红梅

(51) Int. Cl.

C09B 23/06 (2006. 01)

C09K 11/06 (2006. 01)

G01N 21/64 (2006. 01)

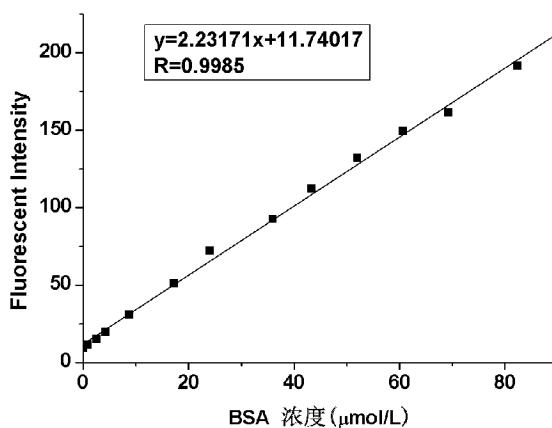
权利要求书 3 页 说明书 9 页 附图 3 页

(54) 发明名称

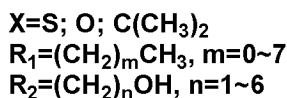
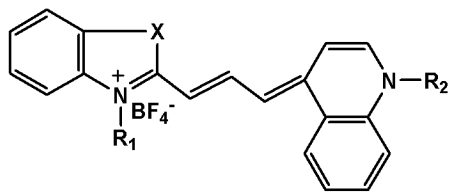
一种不对称菁染料的制备及其用于牛血清白蛋白检测的方法

(57) 摘要

本发明涉及一种不对称菁染料,具体涉及一种不对称菁染料的制备及其用于牛血清白蛋白检测的方法,属于化工高新技术化学及生物化学分析技术领域。本发明提供了实验室定量测量微量牛血清白蛋白的一种简单可操作的方法,普通的实验室科研人员可以依据此原理,合成出合适的染料,并经过配制溶液后作出标准曲线,用于牛血清白蛋白的微量定量分析。其制备 2-甲基-3-烷基取代苯并噻唑季铵盐时,收集产物后继续加热回流反应,回流结束后冷却过滤,母液再重复加热回流,冷却过滤,大大提高了产物的产率,其产率由原来的 20% 提高到 95% 以上。采用荧光光谱仪对微量牛血清白蛋白进行检测,检测灵敏度高,可以达到微摩尔级的染料浓度;染料合成方法简单,采用重结晶方法,纯化效率高。



1. 一种用于牛血清白蛋白检测的不对称菁染料,其特征是结构通式如式(1)所示:

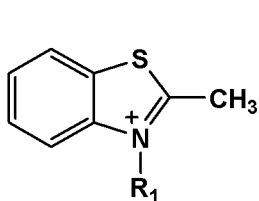


式(1)

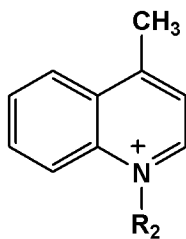
其中 X 为硫原子、氧原子或 $-C(CH_3)_2$, R_1 为长链烷基 $-(CH_2)_mCH_3$, $m = 0 \sim 7$; 另一端为喹啉环, 喹啉环中的氮原子上连接的 R_2 为一端含有羟基的长链烷基 $-(CH_2)_nOH$, $n = 1 \sim 6$, 其中 m, n 为正整数;

将不对称菁染料配置成的染料母液加入到 pH 值 4 ~ 8 的磷酸盐缓冲溶液中, 配制成检测牛血清白蛋白的荧光试剂, 同时将牛血清白蛋白配制成牛血清白蛋白溶液, 然后将牛血清白蛋白溶液加入到荧光试剂中, 用荧光光谱仪连续扫描记录下一定浓度的荧光试剂及分批次加入牛血清白蛋白溶液以后的荧光光谱图, 记录最大荧光发射强度, 以牛血清白蛋白的浓度为横坐标、最大荧光发射强度为纵坐标做成标准曲线; 然后将未知浓度的牛血清白蛋白样品, 在同样的条件下与牛血清白蛋白溶液作用, 测其荧光光谱图, 取最大荧光强度值, 在标准曲线上即得到未知样品的牛血清白蛋白的浓度。

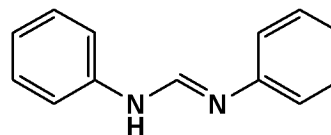
2. 一种用于牛血清白蛋白检测的不对称菁染料的制备方法, 其特征是由式(2)所示化合物与式(3)所示化合物通过与式(4)所示化合物经缩合反应制得;



(2)



(3)



(4)

其中 X 为硫原子、氧原子或 $-C(CH_3)_2$, R_1 为长链烷基 $-(CH_2)_mCH_3$, $m = 0 \sim 7$; 另一端为喹啉环, 喹啉环中的氮原子上连接的 R_2 为一端含有羟基的长链烷基 $-(CH_2)_nOH$, $n = 1 \sim 6$, 其中 m, n 为正整数;

起始原料为 2-甲基苯并噻唑、2-甲基苯并噁唑或 2,3,3-三甲基-3H-吲哚衍生物, 优选的原料为 2-甲基苯并噻唑, 通过与卤代烷以摩尔比 1 : 1 ~ 2 反应得到 2-甲基苯并噻唑季铵盐, 再与缩合剂 N,N-二苯基甲脒按摩尔比 1 : 1 ~ 1.1 反应, 得到的产物 3-烷基-2-(2-亚乙烯基苯胺)苯并噻唑季铵盐最后与 4-甲基喹啉季铵盐按摩尔比 1 : 1 ~ 1.2 结合得到目标产物。优选的 4-甲基喹啉季铵盐为 1-羟乙基-4-甲基喹啉季铵盐。

具体步骤如下:

(1) 2-甲基-3-烷基取代苯并噻唑季铵盐的合成: 按 2-甲基苯并噻唑: 卤代烷摩尔比为 1 : 1 ~ 2 取原料, 加入到 10mL ~ 100mL 的不与原料反应的溶剂中搅拌溶解, 50 ~ 90°C 加热搅拌回流 3-10h; 冷却, 过滤后收集固体粉末, 剩余母液继续加热反应, 过滤后收集固

体粉末,产品未纯化直接做下一步反应;

(2) 4-甲基喹啉季铵盐的合成:将 4-甲基喹啉和 $\text{Br}(\text{CH}_2)_n\text{-OH}$ 按照摩尔比 1 : 1 ~ 1.5, 依次加入到单口烧瓶中, 80 ~ 110°C 搅拌 3h-5h, 冷却过滤, 空气中干燥后得到固体;

(3) 3-烷基-2-(2-亚乙烯基苯胺) 苯并噻唑季铵盐的合成:将摩尔比为 1 : 1 ~ 1.1 的步骤 (1) 制备的 2-甲基-3-烷基取代苯并噻唑季铵盐和 N, N-二苯基甲脒溶解于 5 ~ 100mL 不与原料和产物发生反应的溶剂中, 在 60 ~ 90°C 加热搅拌 1.5 ~ 5h, 冷却后用正己烷洗涤, 析出固体后过滤, 得黄色固体;

(4) 不对称菁染料的合成:按步骤 (3) 制备的 3-烷基-2-(2-亚乙烯基苯胺) 苯并噻唑季铵盐:步骤 (2) 制备的 4-甲基喹啉季铵盐摩尔比为 1 : 1 ~ 1.2 取料, 溶于 5mL ~ 100mL 吡啶中, 在 70 ~ 100°C 搅拌下反应 1h ~ 5h, 将金属钠盐或钾盐溶于 1mL ~ 5mL 的 N, N-二甲基甲酰胺中, 其中, 3-烷基-2-(2-亚乙烯基苯胺) 苯并噻唑季铵盐与金属钠盐或钾盐摩尔比为 1 : 1 ~ 2, 加入到反应混合物中, 继续搅拌 15 ~ 60min, 析出沉淀经过滤, 乙醇重结晶得到蓝紫色固体粉末, 即得产品不对称菁染料。

3. 如权利要求 2 所述用于牛血清白蛋白检测的不对称菁染料的制备方法, 其特征是: 步骤 (1) 所述溶剂为甲醇、乙醇、乙酸乙酯、丙酮、二氯甲烷、乙醚或乙腈。

4. 如权利要求 2 所述用于牛血清白蛋白检测的不对称菁染料的制备方法, 其特征是: 步骤 (1) 所述卤代烷为溴代烷、碘代烷或对甲基苯磺酸甲酯。

5. 如权利要求 2 所述用于牛血清白蛋白检测的不对称菁染料的制备方法, 其特征是: 步骤 (3) 所述溶剂为醋酸、丙酸、甲醇、乙醇或乙腈。

6. 如权利要求 2 所述用于牛血清白蛋白检测的不对称菁染料的制备方法, 其特征是: 步骤 (4) 所述金属钠盐或钾盐为氯化钠、溴化钠、碘化钠、氟硼酸钠、氯化钾、溴化钾、碘化钾或氟硼酸钾。

7. 一种用于牛血清白蛋白检测的不对称菁染料的荧光测试方法, 其特征是步骤如下:

(1) 染料母液的配制:精确称取 1 ~ 50mg 菁染料纯品, 加入 1 ~ 100mL 无水乙醇溶解, 配制成 $10^{-6} \sim 10^{-3}\text{mol/L}$ 的染料母液冷藏备用;

(2) 牛血清白蛋白溶液的配制:精确称取 500mg 牛血清白蛋白, 加入 2mL 二次蒸馏得到的蒸馏水中溶解, 配制成 $10^{-6} \sim 10^{-3}\text{mol/L}$ 的牛血清白蛋白母液;

(3) 缓冲溶液的选择:选择 pH 值在 4 ~ 8 的缓冲液;

(4) 数据记录:精确移取 1 ~ 3mL 步骤 (3) 配置的缓冲溶液到 1cm×1cm 的荧光比色皿中, 精确移取 100 μL 步骤 (1) 制备的染料母液到比色皿中, 将缓冲溶液和染料混合物搅拌均匀; 3-5min 后, 采用荧光光谱仪测量其荧光光谱, 记录扫描数据;

(5) 牛血清白蛋白浓度测定:在步骤 (4) 制备得到的混合物中分次加入 10 μL 步骤 (2) 制备的蛋白质母液, 采用荧光光谱仪分别扫描其荧光光谱图, 记录数据; 依据蛋白质加入量和总体积换算成浓度后和荧光发射强度最大值之间做曲线, 得到标准曲线; 标准曲线做好后, 相同的条件下, 取未知浓度的牛血清白蛋白溶液测量荧光光谱, 通过荧光发射最大值, 在标准曲线中找到对应的牛血清白蛋白浓度, 即测知其浓度值。

8. 如权利要求 3 所述用于牛血清白蛋白检测的不对称菁染料的荧光测试方法, 其特征是: 步骤 (1) 所述溶剂为甲醇、乙醇、丙酮、三氯甲烷、乙腈、N, N-二甲基甲酰胺 DMF 或二甲基亚砷 DMSO。

9. 如权利要求 3 所述用于牛血清白蛋白检测的不对称菁染料的荧光测试方法,其特征是:所述缓冲溶液为 pH 为 7、浓度为 0.2mol/L 的磷酸盐缓冲溶液、羟乙基哌嗪乙磺酸缓冲溶液、Tri-HCl 缓冲溶液或醋酸 - 醋酸铵缓冲溶液。

10. 如权利要求 3 所述用于牛血清白蛋白检测的不对称菁染料的荧光测试方法,其特征是:所述荧光光谱仪激发和发射的狭缝宽度值选择 3 ~ 20,选用最大激发波长为 400 ~ 620nm。

一种不对称菁染料的制备及其用于牛血清白蛋白检测的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种不对称菁染料,具体涉及一种不对称菁染料的制备及其用于微量牛血清白蛋白检测的方法,属于化工高新技术化学及生物化学分析技术领域。

背景技术

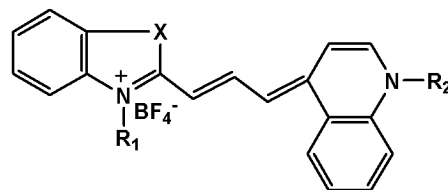
[0002] 菁染料是一种商品化的生物荧光标记用染料,自从 1856 年 Williams 发现“豆粉”蓝菁染料以来,光导性能优异的各类菁染料一直受到学者们的广泛关注。每年在各种不同的应用领域都有大量的文献相继报道。如:用作感光胶片的卤化银乳剂的增感剂及无机半导体材料、光盘的记录介质、太阳能电池光敏剂、激光材料、生物分子的荧光探针等。菁染料的合成开发主要研究组有国外 Patonay 组和 Waggoner 组等。厦门大学等对花菁染料所做的研究工作较多,他们主要是借鉴 Narayanant 和 Patonay 等人的工作来合成用于标记生物大分子的染料。而姚祖光研究组主要研究其在 CD-R 光盘介质方面的应用。噻唑橙类染料是由 Lee 等人发现的一类用于网状红细胞分析的不对称菁染料,该类染料与核酸结合后荧光显著增强,目前已被研究者熟悉和使用。但该类染料与牛血清白蛋白相互作用的文献报道不多。本发明提供了一种不对称菁染料用于牛血清白蛋白分子的检测方法。该方法通过染料与牛血清白蛋白的相互作用,利用荧光分光光度计精确的检测出微量的牛血清白蛋白。本发明简单实用,线性响应范围宽,在牛血清白蛋白的定量分析检测领域具有潜在的实际应用价值。

发明内容

[0003] 本发明的目的在于克服上述不足之处,提供一种不对称菁染料的制备方法及其用于牛血清白蛋白分子的检测方法。该发明合成了一类不对称菁染料,该类染料对微量的牛血清白蛋白具有荧光响应,染料溶液自身几乎无荧光,加入微量的牛血清白蛋白溶液后,染料与蛋白分子相互作用,使染料发出强荧光,依据加入蛋白的量和荧光强度之间呈线性关系,可以用于定量检测牛血清白蛋白分子。

[0004] 按照本发明提供的技术方案,一种用于牛血清白蛋白检测的不对称菁染料,结构通式如下:

[0005]



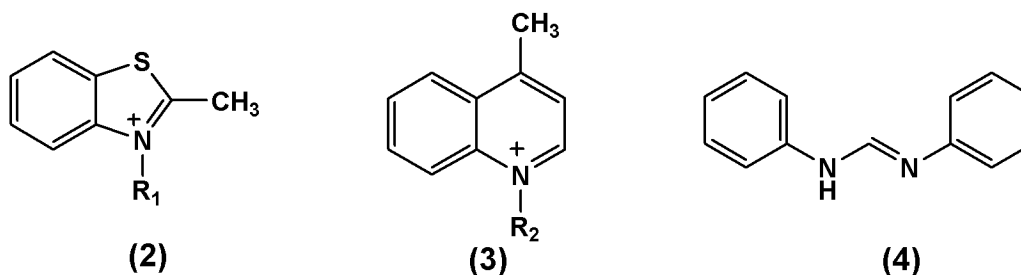
X=S; O; C(CH₃)₂
 R₁=(CH₂)_mCH₃, m=0~7
 R₂=(CH₂)_nOH, n=1~6

[0006] 其中 X 为硫原子、氧原子或 $-C(CH_3)_2$, 优选硫原子和氧原子; R_1 为长链烷基 $-(CH_2)_mCH_3$, $m = 0 \sim 7$, 优选 $m = 0 \sim 2$; 另一端为喹啉环, 喹啉环中的氮原子上连接的 R_2 为一端含有羟基的长链烷基 $-(CH_2)_nOH$, $n = 1 \sim 6$, 优选 $n = 1 \sim 3$ 。其中 m, n 为正整数。

[0007] 将不对称菁染料配置成的染料母液加入到 pH 值 4 ~ 8 的磷酸盐缓冲溶液中, 配制成检测牛血清白蛋白的荧光试剂, 同时将牛血清白蛋白配制成牛血清白蛋白溶液, 然后将牛血清白蛋白溶液加入到荧光试剂中, 用荧光光谱仪连续扫描记录下一定浓度的荧光试剂及分批次加入牛血清白蛋白溶液以后的荧光光谱图, 记录最大荧光发射强度, 以牛血清白蛋白的浓度为横坐标、最大荧光发射强度为纵坐标做成标准曲线; 然后将未知浓度的牛血清白蛋白样品, 在同样的条件下与牛血清白蛋白溶液作用, 测其荧光光谱图, 取最大荧光强度值, 在标准曲线上即得到未知样品的牛血清白蛋白的浓度。

[0008] 一种用于牛血清白蛋白检测的不对称菁染料的制备方法, 由式 (2) 所示化合物与式 (3) 所示化合物通过与式 (4) 所示化合物经缩合反应制得;

[0009]



[0010] 其中 X 为硫原子、氧原子或 $-C(CH_3)_2$, R_1 为长链烷基 $-(CH_2)_mCH_3$, $m = 0 \sim 7$; 另一端为喹啉环, 喹啉环中的氮原子上连接的 R_2 为一端含有羟基的长链烷基 $-(CH_2)_nOH$, $n = 1 \sim 6$, 其中 m, n 为正整数;

[0011] 起始原料为 2- 甲基苯并噻唑、2- 甲基苯并噁唑或 2,3,3- 三甲基 -3H- 吡啶衍生物, 优选的原料为 2- 甲基苯并噻唑, 通过与卤代烷以摩尔比 1 : 1 ~ 2 反应得到 2- 甲基苯并噻唑季铵盐, 再与缩合剂 N,N- 二苯基甲脒按摩尔比 1 : 1 ~ 1.1 反应, 得到的产物 3- 烷基 -2-(2- 亚乙烯基苯胺) 苯并噻唑季铵盐最后与 4- 甲基喹啉季铵盐按摩尔比 1 : 1 ~ 1.2 结合得到目标产物。优选的 4- 甲基喹啉季铵盐为 1- 羟乙基 -4- 甲基喹啉季铵盐。

[0012] 具体合成步骤:

[0013] (1) 2- 甲基 -3- 烷基取代苯并噻唑季铵盐的合成: 按 2- 甲基苯并噻唑: 卤代烷摩尔比为 1 : 1 ~ 2 取原料, 加入到 10mL ~ 100mL 的不与原料反应的溶剂中搅拌溶解, 50 ~ 90°C 加热搅拌回流 3-10h; 冷却, 过滤后收集固体粉末, 剩余母液继续加热反应, 过滤后收集固体粉末, 产品未纯化直接做下一步反应;

[0014] 所述卤代烷为溴代烷、碘代烷或对甲基苯磺酸甲酯, 如溴甲烷、溴乙烷、溴丙烷、碘甲烷、碘乙烷、碘丙烷等, 优选对甲基苯磺酸甲酯, 其次为碘代烷。

[0015] 所述溶剂为甲醇、乙醇、乙酸乙酯、丙酮、二氯甲烷、乙醚或乙腈, 优选乙酸乙酯。

[0016] (2) 4- 甲基喹啉季铵盐的合成: 将 4- 甲基喹啉和 $Br(CH_2)_n-OH$ 按照摩尔比 1 : 1 ~ 1.5, 依次加入到单口烧瓶中, 80 ~ 110°C 搅拌 3h-5h, 冷却过滤, 空气中干燥后得到固体;

[0017] (3) 3- 烷基 -2-(2- 亚乙烯基苯胺) 苯并噻唑季铵盐的合成: 将摩尔比为 1 : 1 ~ 1.1 的步骤 (1) 制备的 2- 甲基 -3- 烷基取代苯并噻唑季铵盐和 N,N- 二苯基甲脒溶于

5-100mL 不与原料和产物发生反应的溶剂中,在 60 ~ 90℃加热搅拌 1.5 ~ 5h,冷却后用正己烷洗涤,析出固体后过滤,得黄色固体;

[0018] 所述溶剂为醋酸、丙酸、丁酸、甲醇、乙醇或乙腈,优选醋酸。

[0019] (4) 不对称菁染料的合成:按步骤(3)制备的 3-烷基-2-(2-亚乙烯基苯胺)苯并噻唑季铵盐:步骤(2)制备的 4-甲基喹啉季铵盐摩尔比为 1 : 1 ~ 1.2 取料,溶于 5mL ~ 100mL 吡啶中,在 70 ~ 100℃搅拌下反应 1h ~ 5h,将金属钠盐或钾盐溶于 1mL ~ 5mL 的 N,N-二甲基甲酰胺中,其中,3-烷基-2-(2-亚乙烯基苯胺)苯并噻唑季铵盐与金属钠盐或钾盐摩尔比为 1 : 1 ~ 2,加入到反应混合物中,继续搅拌 15 ~ 60min,析出沉淀经过滤,乙醇重结晶得到蓝紫色固体粉末,即得产品不对称菁染料。

[0020] 金属钠盐或钾盐为氯化钠、溴化钠、碘化钠、氟硼酸钠、氯化钾、溴化钾、碘化钾或氟硼酸钾,优选氟硼酸钠,其次是氯化钠。

[0021] 步骤(1)中,反应液回流结束后冷却析出固体,经过滤后收集固体,一般都会将剩余母液倒掉,本发明将母液收集后继续加热回流反应,回流结束后再冷却过滤,母液继续加热,重复上述操作步骤,直到产物不再析出为止,大大提高了产物的产率,其产率由原来的 20% 提高到 95% 以上。

[0022] 一种用于牛血清白蛋白检测的不对称菁染料的荧光测试方法,步骤如下:

[0023] (1) 染料母液的配制:精确称取 1 ~ 50mg 菁染料纯品,加入 1 ~ 100mL 无水乙醇溶解,配制成 $10^{-6} \sim 10^{-3}$ mol/L 的染料母液冷藏备用。

[0024] 优选染料母液的浓度为 10^{-5} mol/L。

[0025] 所述溶剂为甲醇、乙醇、丙酮、三氯甲烷、乙腈、N,N-二甲基甲酰胺 DMF 或二甲基亚砷 DMSO,优选溶剂为无水乙醇。

[0026] (2) 牛血清白蛋白溶液的配制:精确称取 500mg 牛血清白蛋白,加入 2mL 二次蒸馏得到的蒸馏水中溶解,配制成 $10^{-6} \sim 10^{-3}$ mol/L 的牛血清白蛋白母液。

[0027] 优选浓度为 $10^{-5} \sim 10^{-4}$ mol/L。

[0028] (3) 缓冲溶液的选择:选择 pH 值在 4 ~ 8,优选 pH 值为 6.8-7.5 的缓冲液;缓冲溶液加入的量在 1 ~ 3mL 之间,缓冲溶液起到调节 pH 值的作用,加入的量要保证染料母液能够很好的溶解在其中。

[0029] 所述缓冲溶液为 pH 为 7、浓度为 0.2mol/L 的磷酸盐缓冲溶液、羟乙基哌嗪乙磺酸缓冲溶液、Tri-HCl 缓冲溶液或醋酸-醋酸铵缓冲溶液。

[0030] 以磷酸盐缓冲溶液为例,配制方法为:先配制好 0.2mol/L 的磷酸氢二钠和磷酸氢钠各 100mL,再分别取磷酸二氢钠 19mL,磷酸氢二钠 81mL 混合均匀,配制成 pH = 7.4 的缓冲溶液。

[0031] (4) 数据记录:精确移取 1 ~ 3mL,最佳为 2.5mL 步骤(3)配置的缓冲溶液到 1cm×1cm 的荧光比色皿中,精确移取 100 μ L 步骤(1)制备的染料母液到比色皿中,将缓冲溶液和染料混合物搅拌均匀;3-5min 后,采用荧光光谱仪测量其初始荧光光谱,记录扫描数据。

[0032] 菁染料母液称取的体积大小和配制的母液浓度有关,配制的母液浓度大,选用的量小,配制的母液浓度小,选用的量大,一般在 0.001 ~ 1mL 之间,不影响检测信号强度即可。

[0033] (5) 牛血清白蛋白浓度测定:在步骤(4)制备得到的混合物中分次加入5~100 μ L 步骤(2)制备的蛋白质母液,优选10~50 μ L,采用荧光光谱仪分别扫描其荧光光谱图,记录数据;依据蛋白质加入量和总体积换算成浓度后和荧光发射强度最大值之间做曲线,得到标准曲线;标准曲线做好后,相同的条件下,取未知浓度的牛血清白蛋白溶液测量荧光光谱,通过荧光发射最大值,在标准曲线中找到对应的牛血清白蛋白浓度,即测知其浓度值。

[0034] 所述荧光光谱仪是市售的荧光光谱仪,激发和发射的狭缝宽度值选择3~20,优选狭缝宽度值为5,选用最大激发波长为400~620nm,最好在550~600nm之间,最佳为560nm,记录下每次扫描的最大荧光强度值。

[0035] 本发明具有如下优点:本发明制备2-甲基-3-烷基取代苯并噻唑季铵盐时,收集产物后继续加热回流反应,回流结束后再冷却过滤,大大提高了产物的产率,其产率由原来的20%提高到95%以上。

[0036] 本发明提供了实验室定量测量微量牛血清白蛋白的一种简单可操作的方法,普通的实验室科研人员可以依据此原理,合成出合适的染料,并经过配制溶液后作出标准曲线,用于牛血清白蛋白的微量定量分析。其采用荧光光谱仪对微量牛血清白蛋白进行检测,检测灵敏度高,可以达到微摩尔级的染料浓度;染料合成方法简单,采用重结晶方法,纯化效率高。

附图说明

[0037] 图1 不对称菁染料 I 与牛血清白蛋白相互作用的荧光光谱。

[0038] 图2 不对称菁染料 I 染料荧光发射最大值与牛血清白蛋白浓度之间的线性关系。

[0039] 图3 不对称菁染料 II 染料荧光发射最大值与牛血清白蛋白浓度之间的线性关系。

[0040] 图4 不对称菁染料 I II 染料荧光发射最大值与牛血清白蛋白浓度之间的线性关系。

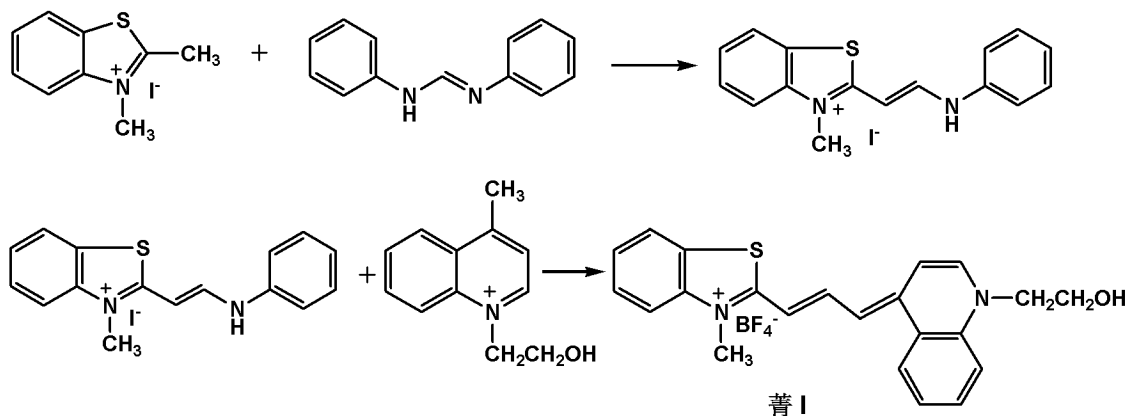
[0041] 图5 不对称菁染料 I 核磁结构表征示意图。

具体实施方式

[0042] 实施例1 一种用于牛血清白蛋白检测的不对称菁染料 I 的制备方法

[0043] 合成路线如下:

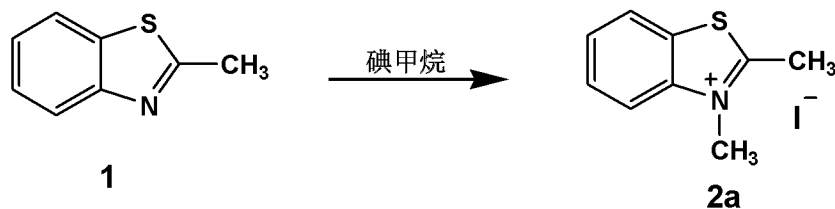
[0044]



[0045] 具体步骤为：

[0046] (1) 中间体 2a(2,3-二甲基苯并噻唑季铵盐) 的合成：

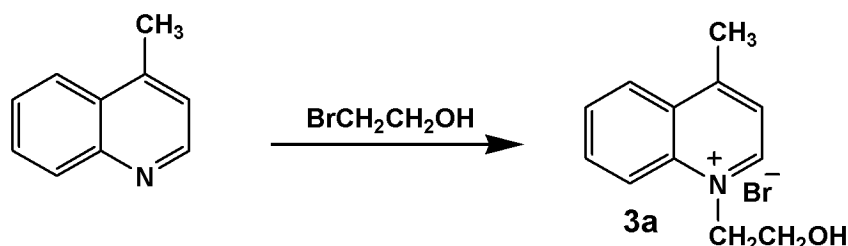
[0047]



[0048] 将 7.4g 中间体 1(50mmol) 和 3.3mL 碘甲烷(53mmol) 加入到 10mL 乙酸乙酯中 70℃ 加热搅拌回流 3h。冷却, 过滤后得到白色粉末。剩余母液继续加热反应, 过滤后收集固体粉末, 共得到白色固体 10g, 粗收率 60%, 产品未纯化直接做下一步反应。

[0049] (2) 4-甲基喹啉季铵盐的合成：

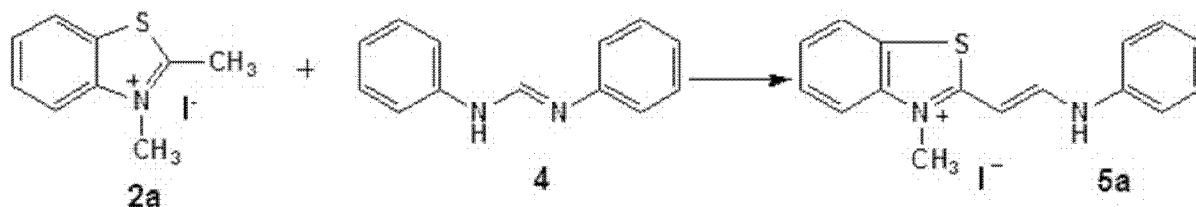
[0050]



[0051] 将 4-甲基喹啉 1.43g(10mmol), 2-溴乙醇 1.23g(10mmol) 依次加入到 50mL 单口烧瓶中, 90℃ 下暗室搅拌 3h, 冷却过滤, 空气中干燥后得到固体 2.26g, 未经纯化直接用做下一步反应, 粗收率 85%。

[0052] (3) 中间体 5a(3-甲基-2-(2-亚乙烯基苯胺)苯并噻唑季铵盐) 的合成：

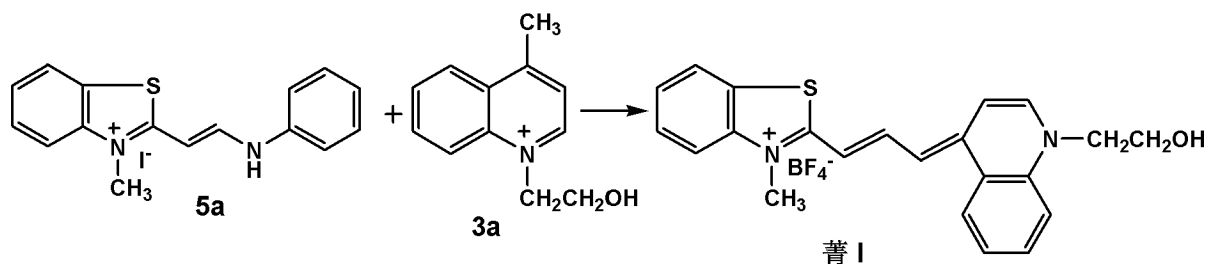
[0053]



[0054] 将 2.9g 中间体 2a 溶于 10mL 醋酸中, 再加入 N,N-二苯基甲脒(4) 3g, 70℃ 加热搅拌 1.5h。冷却后用 300mL 正己烷洗涤, 析出固体。过滤后, 得黄色固体 2.5g, 粗收率为 60%, 产品未经纯化直接做下一步反应。

[0055] (4) 不对称菁染料 I 的合成：

[0056]



[0057] 称取 0.268g 中间体 3a(1mmol) 和 0.394 中间体 5a(1mmol) 溶于 5mL 吡啶中, 90℃

搅拌下反应 1h, 将 0.160g (1.5mmol) 氟硼酸钠溶于 1mL DMF 中, 加入到反应混合物中, 继续搅拌 15min, 析出沉淀经过滤, 乙醇重结晶得到蓝紫色固体粉末 0.291g, 收率 65%。

[0058] 经质谱 ES-MS 和 $^1\text{H-NMR}$ 核磁表征, 结构正确, 核磁图如图 5 所示。

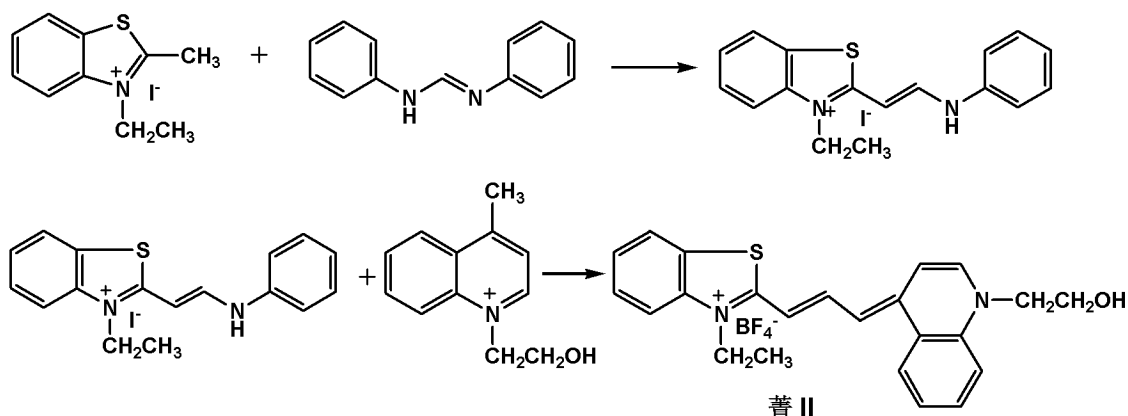
[0059] $^1\text{H-NMR}$ (d^6 -DMSO) : δ 3.73 (s, 3H, NCH_3), 3.83 (t, 2H, NCH_2), 4.64 (t, 2H, OCH_2), 6.47 (d, 1H, $J = 12\text{Hz}$, $\text{CH} = \text{C}$), 7.14 (d, 1H, $J = 12\text{Hz}$, $\text{CH} = \text{C}$), 7.28-8.49 (m, 10H, Ar-H), 7.71 (t, 1H, $J = 12\text{Hz}$, $\text{CH} = \text{C}$). MS (m/z) : 361.2 [M] $^+$.

[0060] 在乙醇中的最大吸收波长 $\text{Abs}_{\text{max}} = 631\text{nm}$; 最大荧光发射波长 $\text{Em}_{\text{max}} = 662\text{nm}$ 。

[0061] 实施例 2 一种用于牛血清白蛋白检测的不对称菁染料 II 的制备方法

[0062] 合成路线如下:

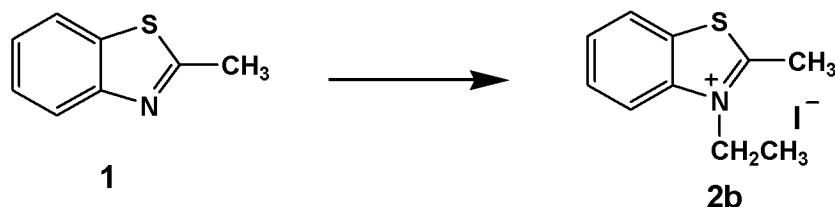
[0063]



[0064] 具体步骤为:

[0065] (1) 中间体 2b (2-甲基-3-乙基苯并噻唑季铵盐) 的合成:

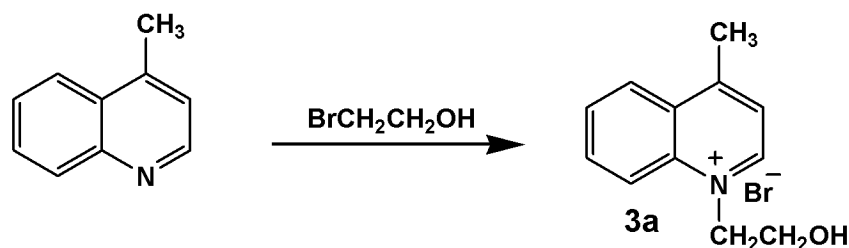
[0066]



[0067] 将 7.4g 中间体 1 (50mmol) 和 43mL 碘乙烷 (53mmol) 加入到 10mL 乙酸乙酯中 70°C 加热搅拌回流 3h。冷却, 过滤后得到白色粉末。剩余母液继续加热反应, 过滤后收集固体粉末, 共得到白色固体 13g, 粗收率 79%, 产品未纯化直接做下一步反应。

[0068] (2) 4-甲基喹啉季铵盐的合成:

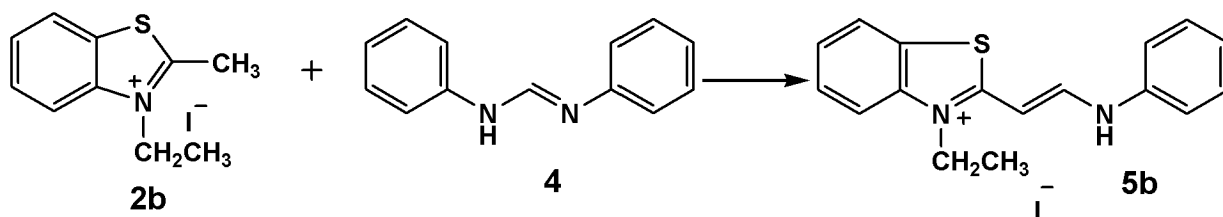
[0069]



[0070] 将 4-甲基喹啉 1.43g (10mmol), 2-溴乙醇 1.23g (10mmol) 依次加入到 50mL 单口烧瓶中, 90°C 下暗室搅拌 3h, 冷却过滤, 空气中干燥后得到固体 2.26g, 未经纯化直接用做下一步反应, 粗收率 85%。

[0071] (3) 中间体 5b(3-乙基-2-(2-亚乙烯基苯胺)苯并噻唑季铵盐)的合成:

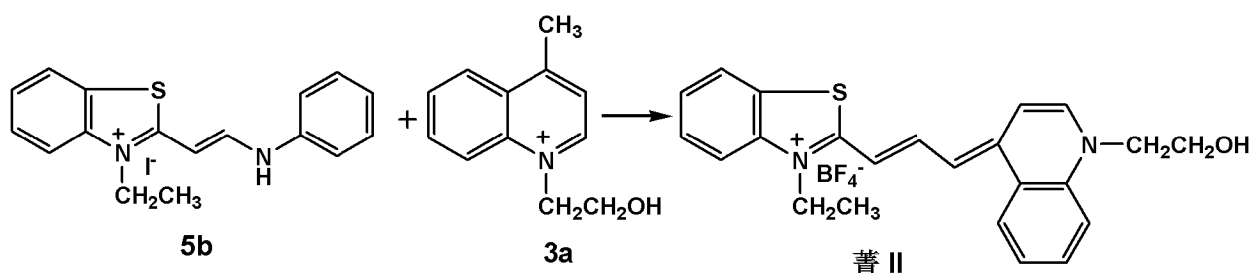
[0072]



[0073] 将 3.1g 中间体 2b 溶于 10mL 醋酸中,再加入 N,N'-二苯基甲脒 (4) 3g, 70°C 加热搅拌 1.5h。冷却后用 300mL 正己烷洗涤,析出固体。过滤后,得黄色固体 2.6g,粗收率为 60%,产品未经纯化直接做下一步反应。

[0074] (4) 不对称菁染料 II 的合成:

[0075]



[0076] 称取 0.268g 中间体 3a (1mmol) 和 0.408 中间体 5b (1mmol) 溶于 5mL 吡啶中, 90°C 搅拌下反应 1h, 将 0.160g (1.5mmol) 氟硼酸钠溶于 1mL DMF 中, 加入到反应混合物中, 继续搅拌 15min, 析出沉淀经过滤, 乙醇重结晶得到蓝紫色固体粉末 0.272g, 收率 60%。

[0077] 经质谱 ES-MS 和 $^1\text{H-NMR}$ 核磁表征, 结构正确。

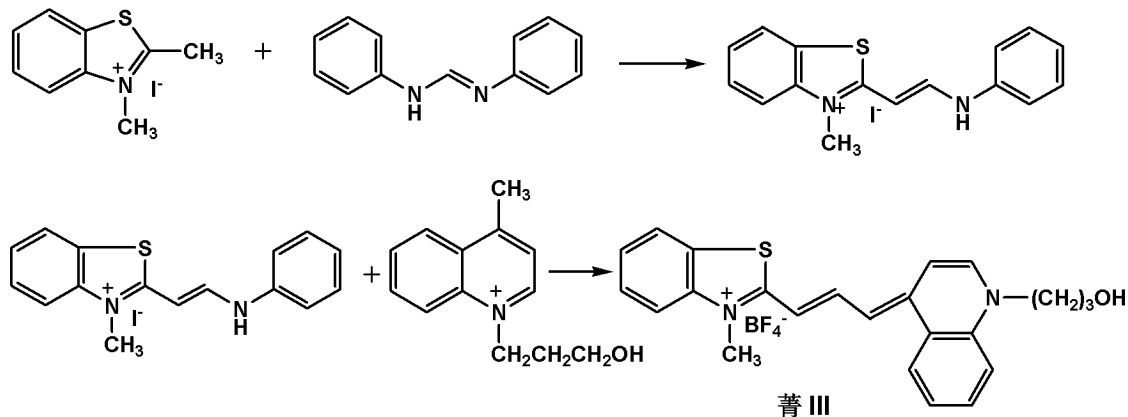
[0078] $^1\text{H-NMR}$ (d^6 -DMSO): δ 1.89 (m, 3H, NCH_2CH_3), δ 3.65 (m, 2H, NCH_2CH_3), 3.82 (t, 2H, NCH_2), 4.62 (t, 2H, OCH_2), 6.46 (d, 1H, $J = 12\text{Hz}$, $\text{CH} = \text{C}$), 7.16 (d, 1H, $J = 12\text{Hz}$, $\text{CH} = \text{C}$), 7.29-8.47 (m, 10H, Ar-H), 7.72 (t, 1H, $J = 12\text{Hz}$, $\text{CH} = \text{C}$). MS (m/z): 375.2 $[\text{M}]^+$.

[0079] 在乙醇中的最大吸收波长 $\text{Abs}_{\text{max}} = 632\text{nm}$; 最大荧光发射波长 $\text{Em}_{\text{max}} = 665\text{nm}$ 。

[0080] 实施例 3

[0081] 合成路线如下:

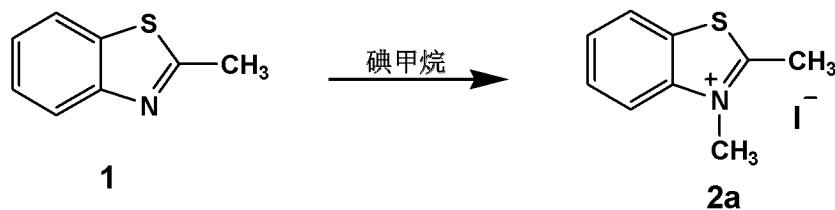
[0082]



[0083] 具体步骤为:

[0084] (1) 中间体 2a(2,3-二甲基苯并噻唑季铵盐)的合成:

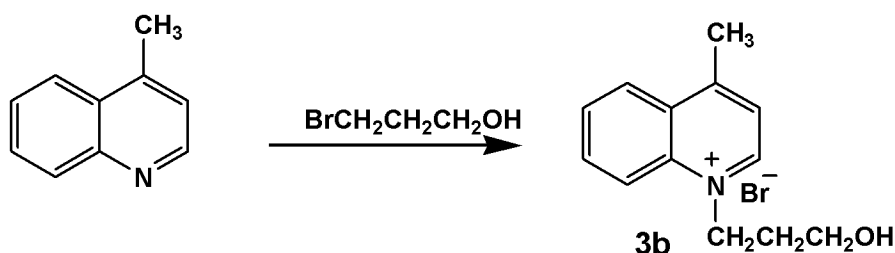
[0085]



[0086] 将 7.4g 中间体 1 (50mmol) 和 3.3mL 碘甲烷 (53mmol) 加入到 10mL 乙酸乙酯中 70℃ 加热搅拌回流 3h。冷却, 过滤后得到白色粉末。剩余母液继续加热反应, 过滤后收集固体粉末, 共得到白色固体 10g, 粗收率 60%, 产品未纯化直接做下一步反应。

[0087] (2) 中间体 3b(1-羟丙基-4-甲基喹啉季铵盐) 的合成

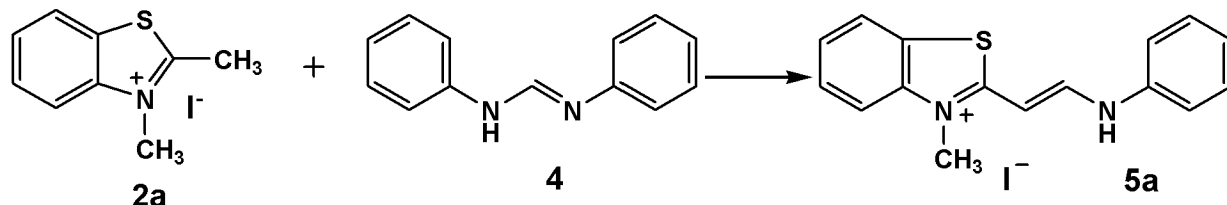
[0088]



[0089] 将 4-甲基喹啉 1.43g (10mmol), 3-溴丙醇 1.38g (10mmol) 依次加入到 50mL 单口烧瓶中, 90℃ 下暗室搅拌 3h, 冷却过滤, 空气中干燥后得到固体 2.12g, 未经纯化直接用做下一步反应, 粗收率 80%。

[0090] (3) 中间体 5a(3-甲基-2-(2-亚乙烯基苯胺)苯并噻唑季铵盐) 的合成:

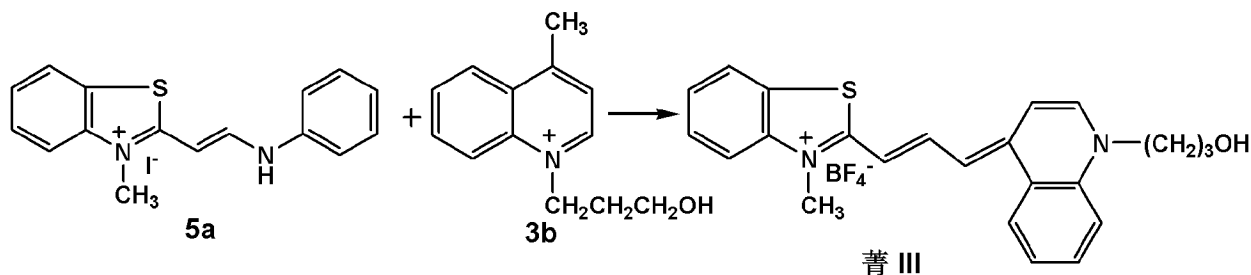
[0091]



[0092] 将 2.9g 中间体 2a 溶于 10mL 醋酸中, 再加入 N,N-二苯基甲脒 (4) 3g, 70℃ 加热搅拌 1.5h。冷却后用 300mL 正己烷洗涤, 析出固体。过滤后, 得黄色固体 2.5g, 粗收率为 60%, 产品未经纯化直接做下一步反应。

[0093] (4) 不对称菁染料 III 的合成

[0094]



[0095] 称取 0.281g 中间体 3b (1mmol) 和 0.394g 中间体 5a (1mmol) 溶于 5mL 吡啶中, 90℃ 搅拌下反应 1h, 将 0.160g (1.5mmol) 氟硼酸钠溶于 1mL DMF 中, 加入到反应混合物中, 继续搅拌 15min, 析出沉淀经过滤, 乙醇重结晶得到蓝紫色固体粉末 0.277g, 收率 60%。

[0096] 经质谱 ES-MS 和 $^1\text{H-NMR}$ 核磁表征, 结构正确。

[0097] $^1\text{H-NMR}$ (d^6 -DMSO) : δ 1.91 (m, 2H, NCH_2CH_2), δ 3.65 (m, 2H, NCH_2CH_3), 3.82 (t, 2H, NCH_3), 4.65 (t, 2H, OCH_2), 6.44 (d, 1H, $J = 12\text{Hz}$, $\text{CH} = \text{C}$), 7.13 (d, 1H, $J = 12\text{Hz}$, $\text{CH} = \text{C}$), 7.22-8.44 (m, 10H, Ar-H), 7.70 (t, 1H, $J = 12\text{Hz}$, $\text{CH} = \text{C}$). MS (m/z) : 375.2 [M] $^+$.

[0098] 在乙醇中的最大吸收波长 $\text{Abs}_{\text{max}} = 633\text{nm}$; 最大荧光发射波长 $\text{Em}_{\text{max}} = 665\text{nm}$ 。

[0099] 实施例 4

[0100] (1) 染料母液的配制: 精确称量 3mg 不对称菁染料 I 溶解于 5mL 无水乙醇中作为染料母液。

[0101] (2) 牛血清白蛋白溶液的配制: 精确称取 500mg 牛血清白蛋白, 加入 2mL 二次蒸馏得到的蒸馏水中溶解, 配制成 $10^{-6} \sim 10^{-3}\text{mol/L}$ 的牛血清白蛋白母液。

[0102] (3) 磷酸盐缓冲溶液的配制: 先配制好 0.2mol/L 的磷酸氢二钠和磷酸氢钠各 100mL, 再分别取磷酸二氢钠 19mL, 磷酸氢二钠 81mL 混合均匀, 配制成 $\text{pH} = 7.4$ 的缓冲溶液。

[0103] (4) 数据记录: 精确移取 2.5mL 上述 $\text{pH} = 7.4$ 的磷酸盐缓冲溶液到 $1\text{cm} \times 1\text{cm}$ 的荧光比色皿中, 精确移取 100 μL 步骤 (1) 制备的染料母液到比色皿中, 将缓冲溶液和染料混合物搅拌均匀。5 分钟后, 测量其初始荧光光谱, 记录扫描数据。

[0104] (5) 牛血清白蛋白浓度测定: 在所述 (4) 中分次加入 10 μL 蛋白质母液, 分别扫描荧光光谱图, 记录数据。依据蛋白质加入量和总体积换算成浓度后和荧光发射强度最大值之间做曲线, 得到标准曲线。标准曲线做好后, 相同的条件下, 取未知浓度的牛血清白蛋白溶液测量荧光光谱, 通过荧光发射最大值, 在标准曲线中找到对应的牛血清白蛋白浓度, 即可测知其浓度值。

[0105] 不对称菁染料 I 与牛血清白蛋白相互作用的荧光光谱如图 1 所示。

[0106] 不对称菁染料 I 染料荧光发射最大值与牛血清白蛋白浓度之间的线性关系如图 2 所示。

[0107] 实施例 5

[0108] 采用不对称菁染料 II 对牛血清白蛋白浓度进行测定, 实施过程同实施例 4。

[0109] 不对称菁染料 II 染料荧光发射最大值与牛血清白蛋白浓度之间的线性关系如图 3 所示。

[0110] 实施例 6

[0111] 采用不对称菁染料 III 对牛血清白蛋白浓度进行测定, 实施过程同实施例 4。

[0112] 不对称菁染料 III 染料荧光发射最大值与牛血清白蛋白浓度之间的线性关系如图 4 所示。

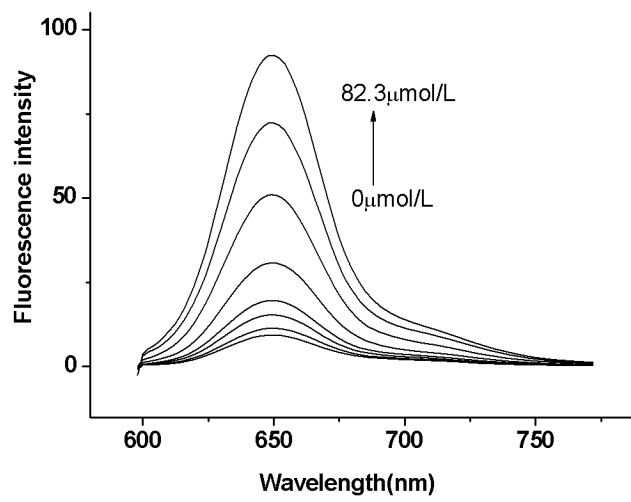


图 1

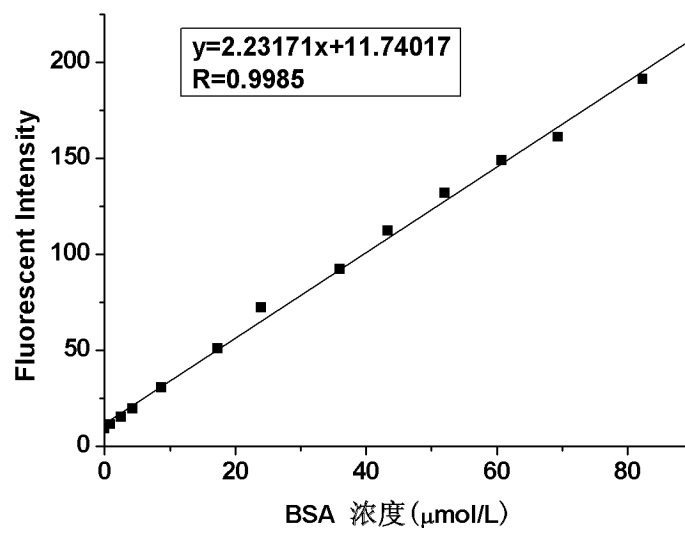


图 2

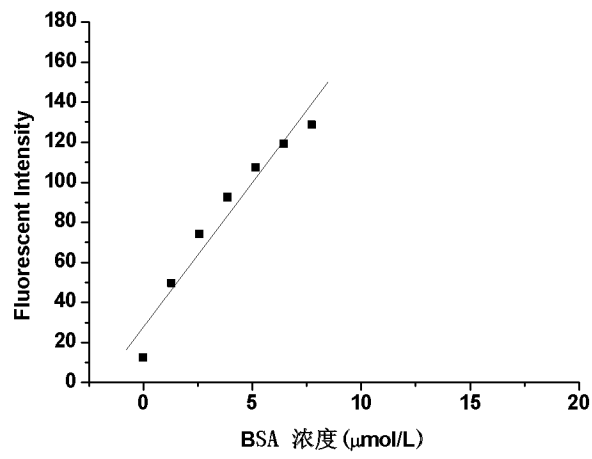


图 3

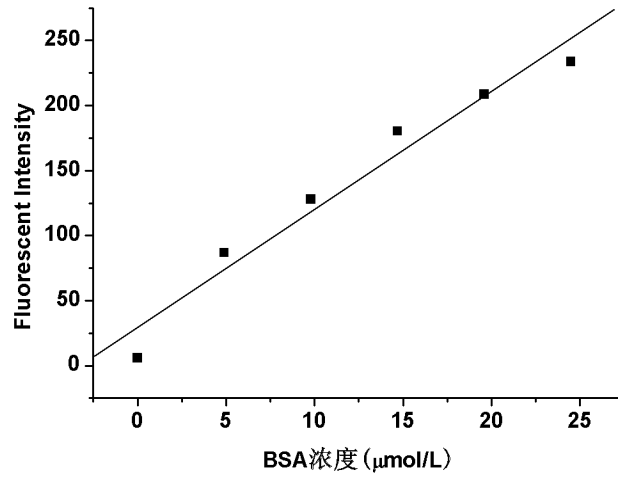


图 4

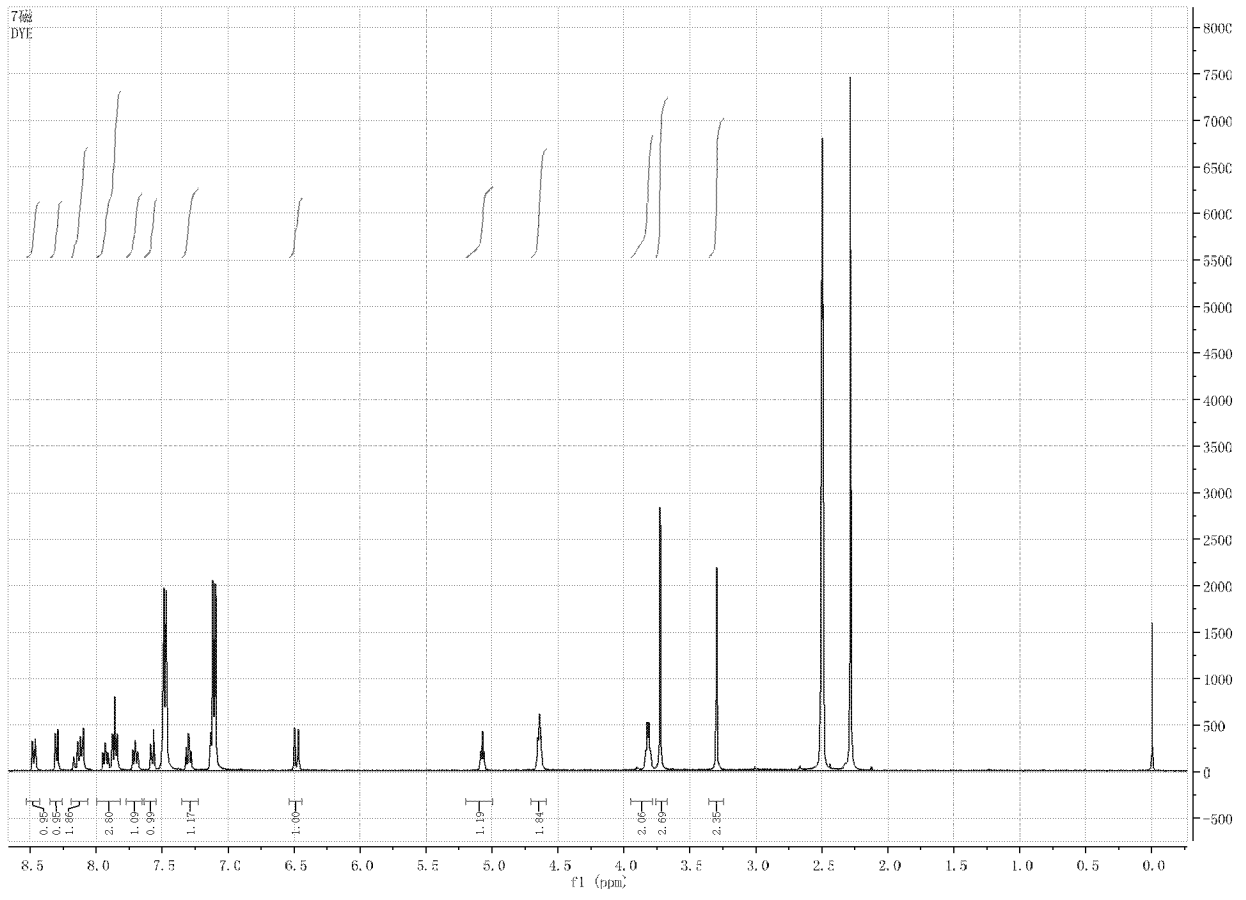


图 5