(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国 际 局

(43) 国际公布日
2020 年 6 月 4 日 (04.06.2020)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2020/107758 A1

(51) 国际专利分类号:
C07D 215/14 (2006.01) *G01N 21/64* (2006.01)
C09K 11/06 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2019/079616

(22) 国际申请日: 2019 年 3 月 26 日 (26.03.2019)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201811454833.X 2018年11月30日 (30.11.2018) CN

(71) 申请人: 华 南 理 工 大 学 (SOUTH CHINA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY) [CN/CN]; 中国广东省广州市天河区五山路 381 号, Guangdong 510640 (CN)。

(72) 发明人: 吴水珠 (WU, Shuizhu); 中国广东省广州市天河区五山路 381 号, Guangdong 510640 (CN)。 徐灵峰 (XU, Lingfeng); 中国广东省广州市天河区五山路 381 号, Guangdong 510640 (CN)。 倪凌 (NI, Ling); 中国广东省广州市天河区五山路381号, Guangdong 510640 (CN)。 曾钫 (ZENG, Fang); 中国广东省广州市天河区五山路381号, Guangdong 510640 (CN)。

(74) 代理人: 广 州 粤 高 专 利 商 标 代 理 有 限 公 司 (YOGO PATENT & TRADEMARK AGENCY LIMITED COMPANY); 中国广东省广州市天河区体育西路中石化大厦 B 塔 4416 室, Guangdong 510620 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明，要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,

WO 2020/107758 A1

(54) **Title:** FLUORESCENT PROBE FOR DETECTING NITROREDUCTASE, PREPARATION METHOD THEREFOR AND USE THEREOF IN ENZYMATIC REACTION

(54) 发明名称: 一种检测硝基还原酶的荧光探针及其制备方法与酶促反应的应用

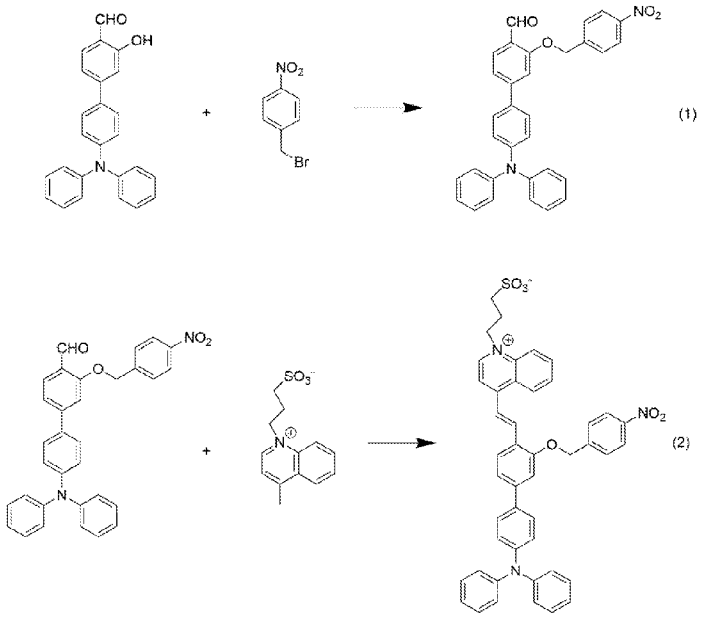


图 1

(57) **Abstract:** Disclosed are a fluorescent probe for detecting a nitroreductase, a preparation method therefor and the use thereof in an enzymatic reaction, wherein same fall within the technical field of industrial analysis and detection. The fluorescent probe is 3-(4-(2-(4'-(diphenylamino)-3-((4-nitrobenzyl)oxy)-[1,1'-biphenyl]-4-yl)vinyl)quinoline-1-bromo)propane-1-sulfonate. The probe compound of the present invention enhances the hydrophilicity thereof by introducing hydrophilic groups such as sulfonates and quino-

[见续页]

BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明，要求每一种可提供的地区保护)：ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

根据细则4.17的声明：

— 发明人资格(细则4.17(iv))

本国际公布：

— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

line salts, and performs 1,6-rearrangement and elimination reactions under the catalysis of a nitroreductase (NTR) to generate a hydroxyl, and realizes the detection and analysis of NTR in an enzymatic reaction by means of fluorescence variations triggered by an intramolecular charge transfer (ICT) effect. The method has the advantages of being simple to prepare, a high yield, and being suitable for detecting the content of a high-concentration enzyme in an enzymatic reaction, and also exhibits great application prospects in the enzyme detection field for enzymatic reaction systems in the field of chemistry.

(57) 摘要：本发明公开了一种检测硝基还原酶的荧光探针及其制备方法与酶促反应的应用，属于工业分析检测技术领域。所述荧光探针为 3-(4-(2-(4'-(二苯胺基)-3-((4- 硝基苄基) 氧基)-[1,1'- 联苯基]-4- 基) 乙烯基) 喹啉 -1- 溴) 丙烷 -1- 磺酸盐。本发明的探针化合物通过引入亲水性基团磺酸根和喹啉盐类增强其亲水性，在硝基还原酶（ NTR ）的催化下发生 1,6- 重排和消除反应，生成羟基，通过分子内电荷转移效应（ ICT ）引发的荧光变化来实现对酶促反应中 NTR 的检测分析。该方法具有制备简便、产率较高、且适用于检测酶促反应中高浓度酶含量等优点，在化工领域中的酶促反应体系酶检测领域显示了极大的应用前景。

一种检测硝基还原酶的荧光探针及其制备方法与酶促反应的应用

[1] 技术领域

[2] 本发明属于工业分析检测技术领域，具体涉及一种检测硝基还原酶的荧光探针及其制备方法与酶促反应的应用。

[3] 背景技术

[4] 硝基化合物广泛应用于医药、染料、农药和炸药等行业，但是它们大多数对人类有致癌作用，会引起诸多疾病，危害人类健康。而胺类化合物在农药、医药、染料、合成树脂、表面活性剂等诸多精细化工产品和中间体的合成中至关重要，因为，氨基的引入使得精细化学品功能的变化成为可能，例如氨基的引入可以使化合物的吸收和发射光谱红移，在染料生色基团的邻位引入氨基可以导致染料的颜色变化，氨基的引入可以改变染料的印染性能；更重要的是，和硝基化合物相比，胺类化合物毒性较小。目前，工业上大部分芳胺化合物都是经由芳香族硝基化合物还原制得，所以，硝基还原成氨基这一类反应在工业生产中有重要作用。

[5] 通常，工业上的主要还原方法是铁粉还原、硫化碱还原和催化加氢还原法等。但这些方法存在工艺流程复杂、后处理麻烦、过程中产生诸多废弃物、制备费用高昂等缺点。近年来，用生物方法将硝基化合物还原成氨基化合物发展迅速，成为构建环境友好的绿色化学的方法之一。酶，又称为酵素，是具有生物催化功能的生物大分子，是一类生物催化剂。绝大多数酶都是蛋白质，其具有较好的生物相容性和环境友好性。酶催化可以看作是介于均相和非均相催化反应之间的一种催化，既具有一 般催化剂的特征，也具有不同于一般催化剂的特殊性。相比于一般催化剂，酶催化剂具有诸多优点： 1 ）酶促反应具有很高的效率； 2 ）酶促反应具有高度的专一性； 3 ）酶促反应较为温和； 4 ）酶的种类的多样性，使得酶促反应的多样性； 5 ）可以通过调节酶的活性，进而调节酶促反应的效果。但由于大多数酶本身为蛋白质，其容易被反应过程中的温度、

酸碱度、被催化物的浓度等影响其活性甚至失活。因此，酶促反应应尽可能在水相中进行，有利于减少有机溶剂对环境的污染且利于酶促反应的进行。

[6] 近些年，随着酶分离纯化技术的提高，用游离酶直接作用于硝基化合物的还原成为生物有机化学中的一个崭新领域，其中氧化还原酶催化还原硝基化合物是研究的热点。目前主要用于此类酶促反应的氧化还原酶主要有硝基还原酶、硝酸还原酶等。其中，硝基还原酶是一类应用相对广泛的酶，且其来源广泛易得，酶促作用条件温和，酶促反应效果较好，对其研究比较深入，作用机理相对成熟，同时其具有对氧敏感和对氧不敏感的两种酶类型，应用范围广泛。因此，为了能够保证酶促反应在工业应用中的硝基类化合物转换成胺类化合物的高效性和稳定性，研究和开发能够测量此类硝基还原酶的荧光探针具有重要意义。

[7] 荧光法在分析检测上具有选择性佳、灵敏度高、响应速度快和使用方便等优异特点。同时，荧光化合物在化学结构上易于设计、修饰和改进，能满足不同检测样品的需 要；因此，荧光法非常适合工业上酶促反应中硝基还原酶的分析检测。中国专利 CN201610050741.X 制备了一种用于检测缺氧区硝基还原酶的双光子荧光探针，该化合物中的芳香硝基能够被硝基还原酶还原成芳胺基，并引发 1,6- 重排与消除反应，释放出荧光主体，导致荧光发生变化，但是该荧光探针水溶性一般，且具有聚集诱导淬灭的性质，难以实现高浓度和水相中的酶检测分析，同时使用双光子检测设备复杂且昂贵，应用领域主要集中于细胞中的缺氧区。中国专利 CN201610471060.0 公开了一种可以检测硝基还原酶的双光子荧光探针，将硝基直接接在荧光主体上，随着硝基还原酶浓度的增加，荧光强度逐渐增强，发射波长范围在 425-475 nm 和 500-550 nm 之间，该探针不利于在水相中使用，在高浓度的硝基还原酶存在时容易发生荧光淬灭，且主要应用于生物领域的细胞成像，不具备大规模工业酶促反应的应用潜质。

[8] 具有聚集诱导发光 (AIE) 性质的荧光材料在溶液分散状态中以单分子形式存在时，激发态的电子通过分子内的运动回到基态；当分子处于聚集态时，分子内运动受限制，激发态的电子只能通过辐射跃迁的方式回到基态，因而可以观察到荧光增强现象，在诸多领域中都有广泛应用。中国专利 CN201710009923.7 公

开了一种基于 AIE 的荧光探针用 于检测硝基还原酶，其将硝基直接接在四苯基乙烯上，未响应前由于 D-π-A 的电子效应，使得荧光明显，响应后由于 D-π-D 结构，导致使荧光变弱且蓝移，利用该荧光的变化实现对硝基还原酶的检测，但该探针主要应用在细胞中，且无法应用于工业酶促反应体系中酶浓度的检测分析。

[9] 尽管检测硝基还原酶的荧光探针在生物检测与成像领域目前已经取得了一些进展，但是鲜有将其应用于工业酶促反应中酶活性的检测分析。由此可见，工业酶促反应领域亟待开发能够检测具有特殊催化作用的酶活性检测分析探针。

[10] 发明内容

[11] 为了解决以上现有技术的缺点和不足之处，本发明的首要目的在于提供一种荧光探针化合物。该荧光探针具备聚集诱导发光特性，通过引入亲水性基团磺酸根和喹啉盐类增强其亲水性，在硝基还原酶（NTR）的催化下发生 1,6- 重排和消除反应，生成羟基，通过分子内电荷转移效应（ICT）引发的荧光变化来实现对工业酶促反应中 NTR 的检测分析。

[12] 本发明的另一目的在于提供上述荧光化合物的制备方法。

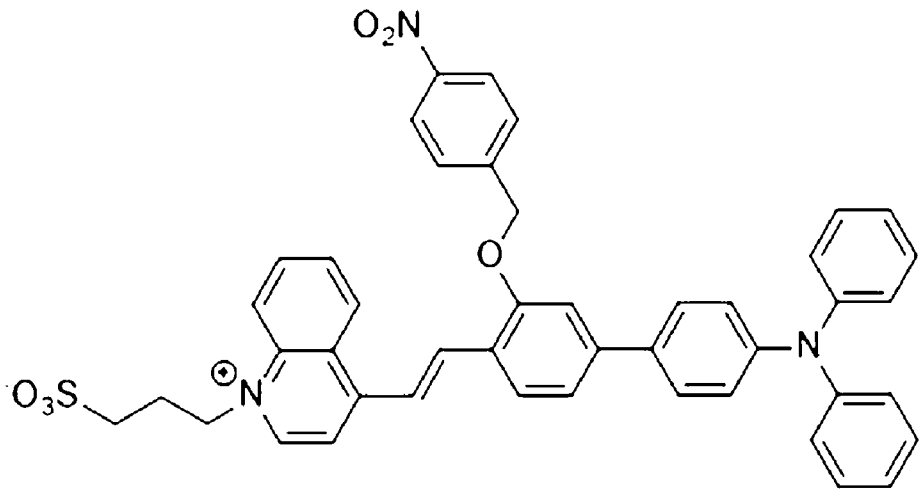
[13] 本发明的再一目的在于提供上述荧光化合物应用于芳香硝基转化为芳香胺基的工业酶促反应中检测硝基还原酶的活性。

[14] 本发明目的通过以下技术方案实现。

[15] 一种检测硝基还原酶的荧光探针，所述荧光探针为 3-(4-(2-(4'-(二苯胺基)-3-((4- 硝基苄基) 氧基)-[1,1'- 联苯基]-4- 基) 乙烯基) 喹啉 -1- 溴) 丙烷 -1- 磺酸盐，结构式如下：

[16]

[化1]



[17] 。

[18] 以上所述的一种检测硝基还原酶的荧光探针的制备方法，包括如下制备步骤：

[19] （1）将 4'-(二苯基胺基)-3- 羟基 -[1,1'- 联苯]-4- 甲醛溶于二甲基亚砜中，得溶液 1；将对硝基苄溴溶于四氢呋喃中，得溶液 2；分别超声溶液 1 和溶液 2 后混合在一起，并加入碳酸铯，控制反应温度为 50-150 ℃，反应产物经分离纯化，得到黄色固体粉末 4'-(二苯基胺基)-3-((4- 硝基苄基) 氧基)-[1,1'- 联苯基]-4- 甲醛；

[20] （2）将 3-(4- 甲基喹啉 -1- 溴) 丙烷 -1- 磺酸盐溶于吡啶中，再加入乙酸，充分混合后加入步骤（1）所得到的 4'-(二苯基胺基)-3-((4- 硝基苄基) 氧基)-[1,1'- 联苯基]-4- 甲醛，搅拌加热至 25-80 ℃反应，反应产物经分离纯化，得到紫红色固体粉末 3-(4-(2-(4'-(二苯胺基)-3-((4- 硝基苄基) 氧基)-[1,1'- 联苯基]-4- 基) 乙烯基) 喹啉 -1- 溴) 丙烷 -1- 磺酸盐。

[21] 优选地，步骤（1）中所述的 4'-(二苯基胺基)-3- 羟基 -[1,1'- 联苯]-4- 甲醛和对硝基苄溴用量的摩尔比为 1:(1.5-2)。

[22] 优选地，步骤（1）中所述碳酸铯和对硝基苄溴用量的摩尔比为 (4-5):1。

[23] 优选地，步骤（2）中所述的 3-(4- 甲基喹啉 -1- 溴) 丙烷 -1- 磺酸盐和 4'-(二苯基胺基)-3-((4- 硝基苄基) 氧基)-[1,1'- 联苯基]-4- 甲醛用量的摩尔比为 1:(1-2)。

[24] 优选地，步骤（2）中所述乙酸和 3-(4- 甲基喹啉 -1- 溴) 丙烷 -1- 磺酸用量的摩尔比为 (2-4):1。

[25] 优选地，步骤（1）所述反应的时间为 5 h - 48 h。

[26] 优选地，步骤（2）所述反应的时间为 3 h - 24 h。

[27] 优选地，步骤（1）所述分离纯化步骤为：反应液冷却至室温，用二氯甲烷 / 去离子水萃取，收集有机相，干燥，过滤，旋转蒸发除去溶剂，所得固体经硅胶层析柱纯化。

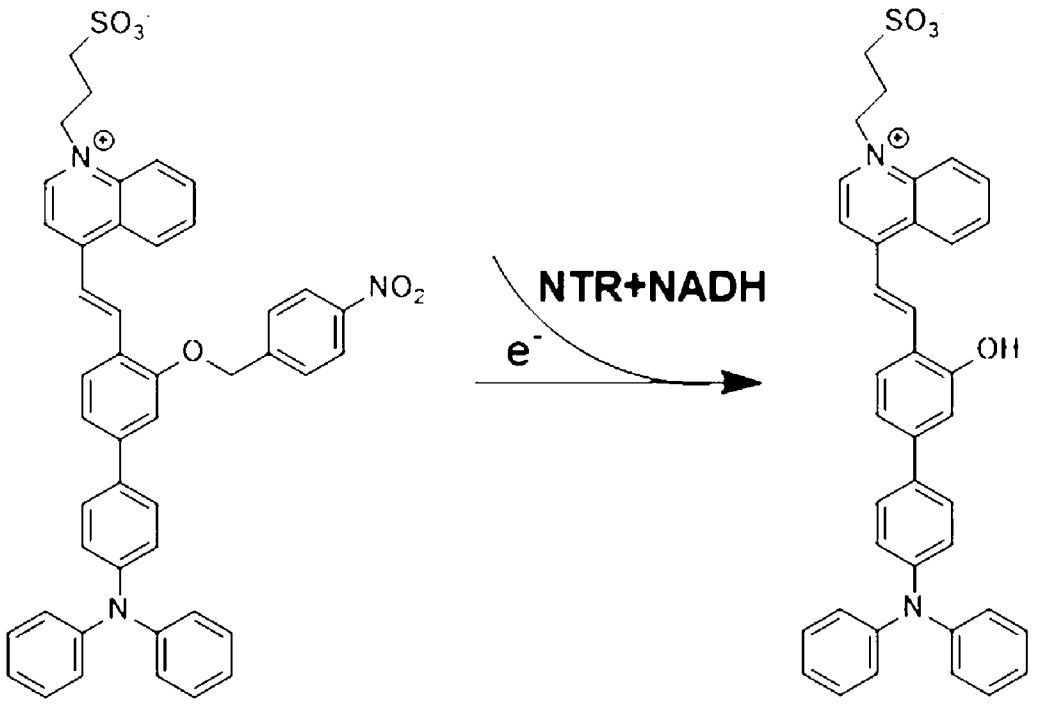
[28] 优选地，步骤（2）所述分离纯化步骤为：反应液冷却至室温，旋转蒸发仪除去溶剂，之后加入乙酸乙酯，并分别用盐酸和饱和食盐水洗涤，再干燥，过滤，旋转蒸发除去溶剂，所得固体经硅胶层析 柱纯化。

[29] 以上所述的一种检测硝基还原酶的荧光探针用于工业中芳香硝基转化为芳香胺基酶促反应中硝基还原酶的检测分析应用。

[30] 本发明所得产物荧光化合物为 3-(4-(2-(4'-(二苯胺基)-3-((4- 硝基苄基) 氧基)-[1,1'- 联苯基]-4- 基) 乙烯基) 喹啉 -1- 溴) 丙烷 -1- 磺酸盐（TAE-NQS），分子式为 $C_{45}H_{37}N_3O_6S$，相对分子质量为 747.24。 TAE-NQS 为紫红色无味固体粉末，微溶于水，易溶于 DMSO、 DMF 等溶剂。该化合物光稳定性好，无毒，适合应用于水相体系的酶促反应。因为 TAE-NQS 本身具有三苯胺基团，且其识别基团上的硝基可以很大程度地淬灭荧光，在 500 nm 的激发光下，在 750 nm 附近几乎没有荧光发射。而当 TAE-NQS 与硝基还原酶反应后，发生 1,6- 重排与消除反应，断裂后变成羟基（产物为 3-(4-(2-(4'-(二苯胺基)-3- 羟基 -[1,1'- 联苯基]-4- 基) 乙烯基) 喹啉 -1- 溴) 丙烷 -1- 磺酸盐 TAE-NQS-OH），并且由于供电子基羟基的存在，使得荧光有所变化，在 750 nm 附近发出强烈荧光，同时因为 AIE 基团的三苯胺存在，使得响应后的探针产物也具备聚集诱导发光特性。本发明荧光探针可用于芳香硝基转化为芳香胺基这一类工业酶促反应中对硝基还原酶活性的检测。其识别机理如下所示：

[31]

[化2]



TAE-NQS
极弱荧光

TAE-NQS-OH
强荧光

[32] 本发明提供了一种可用于检测工业酶促反应中苯硝基转化成苯胺基这一类反应的硝基还原酶荧光探针，该探针本身只有极弱荧光，但是在硝基还原酶作用下，苯硝基还原成苯胺基，引发 1,6- 重排与消除反应，断裂后变成羟基，发出强烈荧光。

[33] 相对于现有技术，本发明具有如下优点及有益效果：

[34] （1）本发明的荧光化合物 TAE-NQS 具有聚集诱导发光的特性，在化工领域的酶促反应中为了提高反应效率，大多数情况下会添加高浓度的酶参与反应，而本探针在高浓度的检测底物存在下，不会产生淬灭，所得检测效果灵敏度高、准确性好。

[35] （2）本发明的 TAE-NQS 探针在硝基还原酶的催化反应后，可以发生 1,6- 重排和消除反应，断裂后由于 AIE 基团三苯胺的存在，内部的'机械旋转'被限制，非辐射跃迁回基态的能量耗散通道被限制，依旧具备聚集诱导发光的特性，同时，由于羟基的生成，可以使得荧光发生变化，因此可用于工业中酶促反应特

别是芳香硝基转化为芳香胺基这一类反应中硝基还原酶的检测分析。

[36] （3）本发明的荧光探针本身具有较长的发射波长，达到 750 nm，且具有明显的荧光增强效果。

[37] （4）本发明的荧光探针能够适应在工业上的酶促反应中较苛刻和复杂的环境，结构稳定性良好，便于在化工行业的酶促反应中推广使用。

[38] 附图说明

[39] 图 1 为本发明所述荧光探针化合物的合成路线图。

[40] 图 2 为实施例 1 中 4'-(二苯基胺基)-3-((4- 硝基苄基) 氧基)-[1,1'- 联苯基]-4- 甲醛的核磁共振氢谱图。

[41] 图 3 为实施例 1 中 3-(4-(2-(4'-(二苯胺基)-3-((4- 硝基苄基) 氧基)-[1,1'- 联苯基]-4- 基) 乙烯基) 喹啉 -1- 溴) 丙烷 -1- 磺酸盐的核磁共振氢谱图。

[42] 图 4 为本发明的荧光探针响应前后的吸收光谱图。

[43] 图 5 为本发明的荧光探针响应前后的荧光光谱图。

[44] 图 6 为 TAE-NQS-OH 荧光探针响应后产物的聚集诱导发光效应荧光光谱图。

[45] 图 7 为 TAE-NQS 荧光探针对硝基还原酶不同响应时间的荧光光谱图。

[46] 图 8 为 TAE-NQS 荧光探针对不同浓度硝基还原酶响应的荧光光谱图。

[47] 具体实施方式

[48] 下面结合实施例及附图对本发明作进一步详细的描述，但本发明的实施方式不限于此。

[49] 本发明的荧光探针化合物的合成路线图如图 1 所示。

[50] 实施 **例 1**

[51] （1）将 365 mg 的 4'-(二苯基胺基)-3- 羟基 -[1,1'- 联苯]-4- 甲醛溶于 10 mL 二甲基亚砜，将 324 mg 对硝基苄溴溶于 10 mL 四氢呋喃，分别超声后混合在一起，并加入 1.96 g 碳酸铯，控制反应温度为 50 ℃，反应 5 h，反应液冷却至室温，用二氯甲烷 / 去离子水萃取，收集有机相，干燥，过滤，旋转蒸发除去溶剂，所得固体经硅胶层析柱纯化（所用的洗脱剂为二氯甲烷 / 石油醚，V/V=2:1），得到黄色固体粉末 4'-(二苯基胺基)-3-((4- 硝基苄基) 氧基)-[1,1'- 联苯基]-4- 甲醛 405 mg （产率 81%）；通过核磁共振氢谱对该产物进行表征，^{1}H NMR

(400 MHz, $CDCl_3$) δ (TMS, ppm): 10.58 (s, 1H), 8.27 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 8.07 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.74 (dd, *J* = 8.6, 2.4 Hz, 1H), 7.65 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.43 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.28 (s, 1H), 7.24 (d, *J* = 10.8, 4.8 Hz, 2H), 7.12 (d, *J* = 8.3 Hz, 6H), 7.04 (dd, *J* = 12.8, 5.6 Hz, 4H), 5.33 (s, 2H)。其中， 10.58 ppm 处的质子峰水杨醛结构上的醛基质子峰， 8.02ppm 、 7.75 ppm 和 7.28 ppm 处的质子峰为水杨醛芳环上的 3 个 H 质子峰， 8.26 ppm 和 7.66 ppm 处的质子峰为对硝基苄溴上的 4 个 H 质子峰， 7.40 ppm 和 7.27 ppm 附近为三苯胺其中一个芳环上的 4 个质子的特征峰，7.0-7.24 ppm 为三苯胺芳环上剩余的 10 个质子的特征峰， 5.33 ppm 处的质子峰为对硝基苄溴上的亚甲基特征峰。通过核磁的分析可以确定所合成的产物为目标中间体。所得产物的核磁共振氢谱图如图 2 所示。

[52] （ 2 ）取 265 mg 的 3-(4- 甲基喹啉 -1- 溴) 丙烷 -1- 磺酸盐溶于 10 mL 吡啶，再加入 114 μL 乙酸，充分混合后加入 500 mg 的 4'-(二苯基胺基)-3-((4- 硝基苄基) 氧基)-[1,1'- 联苯基]-4- 甲醛，搅拌加热至 25 ℃ 反应 3 h ，反应液冷却至室温，旋干溶剂，之后加入过量乙酸乙酯，并分别用盐酸和饱和食盐水洗涤 3 次和 1 次，再用无水硫酸钠干燥，抽滤，旋转蒸发除去溶剂，所得固体经硅胶层析 柱纯化 （所用的洗脱剂为二氯甲烷 / 甲醇， V/V=5:1 ） ， 得到紫红色固体粉末 3-(4-(2-(4'-(二苯胺基)-3-((4- 硝基苄基) 氧基)-[1,1'- 联苯基]-4- 基) 乙烯基) 喹啉 -1- 溴) 丙烷 -1- 磺酸盐 448 mg （产率 60% ） ；通过核磁共振氢谱对该产物进行表征， ^{1}H NMR (600 MHz, DMSO) δ (TMS, ppm): 9.41 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H), 8.81 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 8.64 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 8.46 (t, *J* = 11.2 Hz, 2H), 8.37-8.29 (m, 4H), 8.27-8.22 (m, 1H), 7.98-7.94 (m, 1H), 7.87 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.72 (dd, *J* = 20.4, 9.8 Hz, 3H), 7.37-7.31 (m, 4H), 7.30 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.11-7.04 (m, 8H), 5.53 (s, 2H), 5.02 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 2.12-2.05 (m, 2H), 1.76-1.69 (m, 2H)。其中， a 、 b 、 c 三处分别为烷基磺酸盐上的三个亚甲基质子特征峰， d 处为对硝基苄溴上的亚甲基质子的特征峰， e 为共轭双键结构上的质子特征峰， g 为三苯胺及其偶联的是水杨醛芳环结构上的 16 个 H 质子的特征峰， 7.78-9.5 ppm 为喹啉盐、对硝基苄溴上芳环结构以及水杨醛上偶联双键旁的质子峰，共计 11 个 H 质子的特征峰。通过核磁的分析可以确定所合成的产物为目标中间体。所得产物的核磁

共振氢谱图如图 3 所示。

[53] 实施**例 2**

[54] （1）将 365 mg 的 4'-(二苯基胺基)-3- 羟基 -[1,1'- 联苯]-4- 甲醛溶于 10 mL 二甲基亚砜，将 389 mg 对硝基苄溴溶于 10 mL 四氢呋喃，分别超声后混合在一起，并加入 2.64 g 碳酸铯，控制反应温度为 100 ℃，反应 24 h，反应液冷却至室温，用二氯甲烷 / 去离子水萃取，收集有机相，干燥，过滤，旋转蒸发除去溶剂，所得固体经硅胶层析柱纯化（所用的洗脱剂为二氯甲烷 / 石油醚，V/V=2:1），得到黄色固体粉末 4'-(二苯基胺基)-3-((4- 硝基苄基) 氧基)-[1,1'- 联苯基]-4- 甲醛 415 mg （产率 83%）；

[55] （2）取 265 mg 的 3-(4- 甲基喹啉 -1- 溴) 丙烷 -1- 磺酸盐溶于 10 mL 吡啶，再加入 171 μL 乙酸，充分混合后加入 750 mg 的 4'-(二苯基胺基)-3-((4- 硝基苄基) 氧基)-[1,1'- 联苯基]-4- 甲醛，搅拌加热至 50 ℃ 反应 12 h，反应液冷却至室温，旋转蒸发仪除去溶剂，之后加入过量乙酸乙酯，并分别用盐酸和饱和食盐水洗涤 3 次和 1 次，再用无水硫酸钠干燥，抽滤，旋转蒸发除去溶剂，所得固体经硅胶层析 柱纯化 （所用的洗脱剂为二氯甲烷 / 甲醇，V/V=5:1），得到紫红色固体粉末 3-(4-(2-(4'-(二苯胺基)-3-((4- 硝基苄基) 氧基)-[1,1'- 联苯基]-4- 基) 乙烯基) 喹啉 -1- 溴) 丙烷 -1- 磺酸盐 485 mg （产率 65%）。

[56] 本实施例所得荧光化合物 TAE-NQS 的中间体以及最终的化合物表征与实施例 1 中的结果是相同的。

[57] 实施 **例 3**

[58] （1）将 365 mg 的 4'-(二苯基胺基)-3- 羟基 -[1,1'- 联苯]-4- 甲醛溶于 10 mL 二甲基亚砜，将 432 mg 对硝基苄溴溶于 10 mL 四氢呋喃，分别超声后混合在一起，并加入 3.26 g 碳酸铯，控制反应温度为 150 ℃，反应 48 h，反应液冷却至室温，用二氯甲烷 / 去离子水萃取，收集有机相，干燥，过滤，旋转蒸发除去溶剂，所得固体经硅胶层析柱纯化（所用的洗脱剂为二氯甲烷 / 石油醚，V/V=2:1），得到黄色固体粉末 4'-(二苯基胺基)-3-((4- 硝基苄基) 氧基)-[1,1'- 联苯基]-4- 甲醛 430 mg （产率 86%）；

[59] （2）取 265 mg 的 3-(4- 甲基喹啉 -1- 溴) 丙烷 -1- 磺酸盐溶于 10 mL 吡啶，

再加入 228 μL 乙酸，充分混合后加入 1000 mg 的 4'-(二苯基胺基)-3-((4- 硝基苄基) 氧基)-[1,1'- 联苯基]-4- 甲醛，搅拌加热至 80 ℃ 反应 24 h ，反应液冷却至室温，旋转蒸发仪除去溶剂，之后加入过量乙酸乙酯，并分别用盐酸和饱和食盐水洗涤 3 次和 1 次，再用无水硫酸钠干燥，抽滤，旋转蒸发除去溶剂，所得固体经硅胶层析 柱纯化 （所用的洗脱剂为二氯甲烷 / 甲醇， V/V=5:1 ） ， 得到紫红色固体粉末 3-(4-(2-(4'-(二苯胺基)-3-((4- 硝基苄基) 氧基)-[1,1'- 联苯基]-4- 基) 乙烯基) 喹啉 -1- 溴) 丙烷 -1- 磺酸盐 470 mg （产率 63% ）。

[60] 本实施例所得荧光化合物 TAE-NQS 的中间体以及最终的化合物表征与实施例 1 中的结果是相同的。

[61] 本发明所得荧光探针化合物在酶促反应体系中检测硝基还原酶的活性测试：

[62] 将 1.5 mg 固体荧光化合物 3-(4-(2-(4'-(二苯胺基)-3-((4- 硝基苄基) 氧基)-[1,1'- 联苯基]-4- 基) 乙烯基) 喹啉 -1- 溴) 丙烷 -1- 磺酸盐（ TAE-NQS ，实施例 1 制备）溶于 2 mL 的 DMSO 中，配置成 1 mM 的荧光化合物母液。测试之前，用磷酸盐缓冲液（ 10 mM ， pH 7.4 ）稀释至荧光化合物浓度为 10 μM ，得到含有 1% DMSO 的测试溶液体系。

[63] （ 1 ）探针化合物 TAE-NQS 的荧光性质：

[64] 吸取 3 μL 上述荧光化合物母液，用 PBS 缓冲溶液（ 10 mM ， pH=7.4 ）配置空白对照样和测试样，控制空白样中探针化合物浓度为 10 μM ，其中不加入硝基还原酶和辅酶物质烟酰胺腺嘌呤二核苷酸（ NADH ）作为对照组，测试样中探针化合物浓度为 10 μM ，并控制最终硝基还原酶的浓度为 2 μg/mL ，辅酶物质 NADH 的浓度为 100 μM ，在 37 ℃ 温育 15 min ，之后分别检测 350 nm 到 700 nm 之间的吸收光谱，以及在波长 500 nm 的激发光照射下测试其荧光光谱，结果如图 4 和图 5 所示。测试样相比于空白样，吸收发生了红移，且荧光强度发生明显变化，这是因为测试样中的探针分子在 NTR 存在时，发生了 1,6- 重排和消除反应，断裂后生成的羟基为供电子基，得到 3-(4-(2-(4'-(二苯胺基)-3- 羟基 -[1,1'- 联苯基]-4- 基) 乙烯基) 喹啉 -1- 溴) 丙烷 -1- 磺酸盐（ TAE-NQS-OH ），导致了分子内电荷转移效应（ ICT 效应）发生，使得荧光发生红移；同时由于具有 AIE 基团的三苯胺存在，使得荧光分子本身具备较好的 AIE 效果。

TAE-NQS-OH 的 AIE 效果（通过调节水和 N,N- 二甲基甲酰胺的比例为 0%-99%，控制每组的探针浓度为 10 μM，配制成聚集诱导发光性质的测试体系）的测试具体结果如图 6 所示。

[65] （2）探针化合物 TAE-NQS 在 PBS 缓冲液中对不同浓度 NTR 的荧光响应测试，以及响应时间测试:

[66] 测试了当 NTR 浓度为 2 μg/mL，探针浓度为 10 μM 时，荧光强度随时间的变化，如图 7 所示。并且配置 NTR 浓度分别为 0、0.25、0.5、0.75、1、1.5、2、3、5 μg/mL，探针浓度为 10 μM 的一系列 PBS 缓冲液（pH=7.4），控制温度为 37 ℃，响应时间为 5 min，分别测定每组测试样在波长 500 nm 的激发波长下的荧光光谱图，测试结果如图 8 所示。从图 7 和图 8 中可以看出，本发明所制得的荧光探针对酶促反应体系中的 NTR 有较好的检测效果，随着 NTR（0-5 μg/mL）的增加在 30 min 内反应充分，响应前后荧光变化明显，可以说明其适用于芳香硝基转化为芳香胺基这一类反应中硝基还原酶的检测。

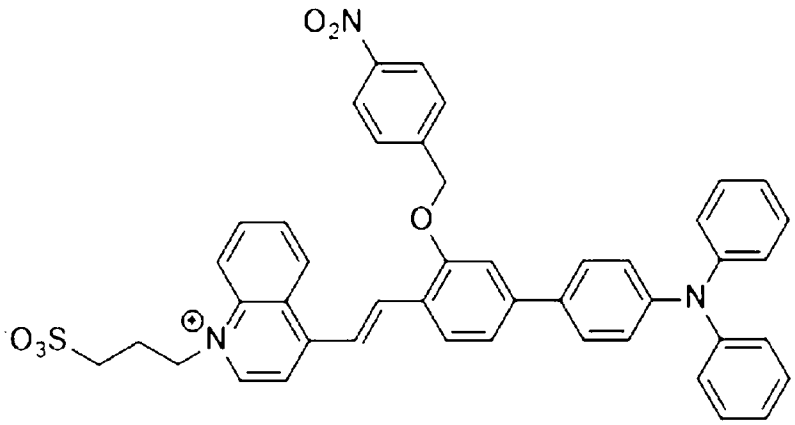
[67] 该方法具有制备简便、产率较高、且适用于酶促反应中检测高浓度含量酶等优点，在化工行业中的酶促反应体系酶检测领域显示了极大的应用前景。

[68] 上述实施例为本发明较佳的实施方式，但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制，其它的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化，均应为等效的置换方式，都包含在本发明的保护范围之内。

权利要求书

[权利要求 1] 一种检测硝基还原酶的荧光探针，其特征在于，所述荧光探针为 3-(4-(2-(4'-(二苯胺基)-3-((4- 硝基苄基) 氧基)-[1,1'- 联苯基]-4- 基) 乙烯基) 喹啉 -1- 溴) 丙烷 -1- 磺酸盐，结构式如下：

[化3]



。

[权利要求 2] 制备权利要求 1 所述的一种检测硝基还原酶的荧光探针的方法，其特征在于，包括如下制备步骤：

（ 1 ）将 4'-(二苯基胺基)-3- 羟基 -[1,1'- 联苯]-4- 甲醛溶于二甲基亚砜中，将对硝基苄溴溶于四氢呋喃中，分别超声后混合在一起，并加入碳酸铯，控制反应温度为 50-150 ℃ ，反应产物经分离纯化，得到黄色固体粉末 4'-(二苯基胺基)-3-((4- 硝基苄基) 氧基)-[1,1'- 联苯基]-4- 甲醛；

（ 2 ）将 3-(4- 甲基喹啉 -1- 溴) 丙烷 -1- 磺酸盐溶于吡啶中，再加入乙酸，充分混合后加入步骤（ 1 ）所得到的 4'-(二苯基胺基)-3-((4- 硝基苄基) 氧基)-[1,1'- 联苯基]-4- 甲醛，搅拌加热至 25-80 ℃ 反应，反应产物经分离纯化，得到紫红色固体粉末 3-(4-(2-(4'-(二苯胺基)-3-((4- 硝基苄基) 氧基)-[1,1'- 联苯基]-4- 基) 乙烯基) 喹啉 -1- 溴) 丙烷 -1- 磺酸盐。

[权利要求 3] 根据权利要 求 2 所 述的制备方法，其特征在于， 步骤（ 1 ）中所述

的 4'-(二苯基胺基)-3- 羟基 -[1,1'- 联苯]-4- 甲醛和对硝基苄溴用量的摩尔比为 1:(1.5-2)。

[权利要求 4] 根据权利要 求 2 所 述的制备方法，其特征在于， 步骤（ 1 ）中所述碳酸铯和对硝基苄溴用量的摩尔比为 (4-5):1 。

[权利要求 5] 根据权利要求 2 所述的制备方法，其特征在于，步骤（ 2 ）中所述的 3-(4- 甲基喹啉 -1- 溴) 丙烷 -1- 磺酸盐和 4'-(二苯基胺基)-3-((4- 硝基苄基) 氧基)-[1,1'- 联苯基]-4- 甲醛用量的摩尔比为 1:(1-2)。

[权利要求 6] 根据权利要 求 2 所 述的制备方法，其特征在于， 步骤（ 2 ）中所述乙酸和 3-(4- 甲基喹啉 -1- 溴) 丙烷 -1- 磺酸盐用量的摩尔比为 (2-4):1 。

[权利要求 7] 根据权利要求 2 所述的制备方法，其特征在于，步骤（ 1 ）所述反应的时间为 5 h - 48 h 。

[权利要求 8] 根据权利要求 2 所述的制备方法，其特征在于，步骤（ 2 ）所述反应的时间为 3 h - 24 h 。

[权利要求 9] 根据权利要求 2 所述的制备方法，其特征在于，步骤（ 1 ）所述分离纯化步骤为：反应液冷却至室温，用二氯甲烷 / 去离子水萃取，收集有机相，干燥，过滤，旋转蒸发除去溶剂，所得固体经硅胶层析柱纯化；步骤（ 2 ）所述分离纯化步骤为：反应液冷却至室温，旋转蒸发仪除去溶剂，之后加入乙酸乙酯，并分别用盐酸和饱和食盐水洗涤，再干燥，过滤，旋转蒸发除去溶剂，所得固体经硅胶层析 柱纯化。

[权利要求 10] 权利要求 1 所述的一种检测硝基还原酶的荧光探针用于工业中芳香硝基转化为芳香胺基酶促反应中硝基还原酶的检测分析应用。

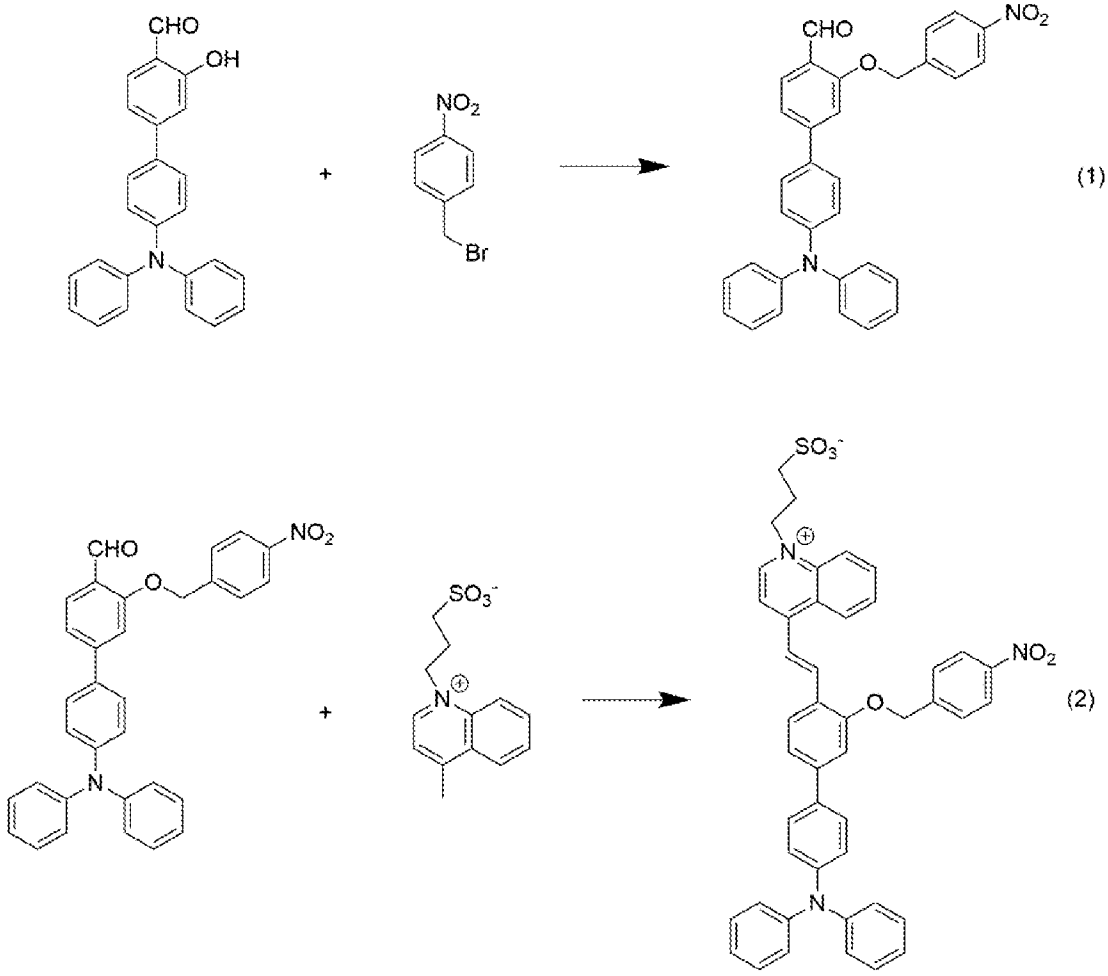


图 1

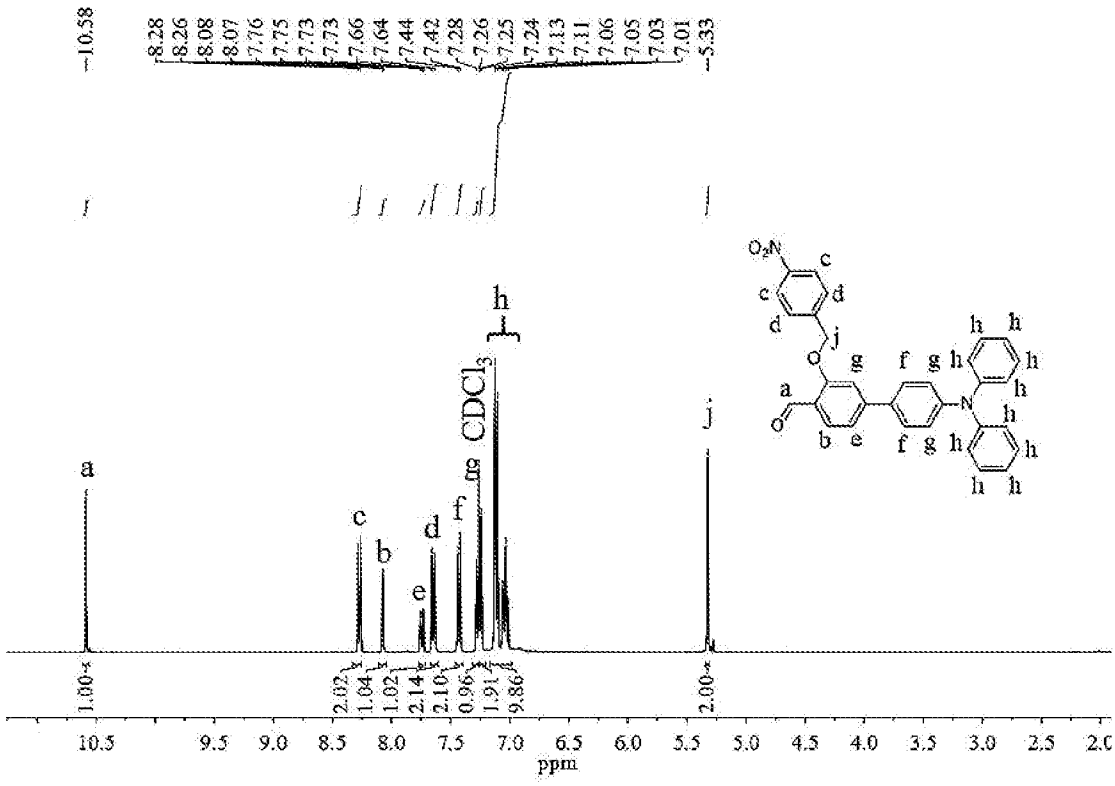

10.58
8.28
8.26
8.08
8.07
7.76
7.75
7.73
7.73
7.66
7.64
7.44
7.42
7.28
7.26
7.25
7.24
7.13
7.11
7.06
7.05
7.03
7.01
5.33
a
c
b
e
d
f
g
h
CDCl3
j
1.00
2.02
1.04
1.02
2.14
2.10
0.96
1.91
9.86
2.00
ppm

图 2

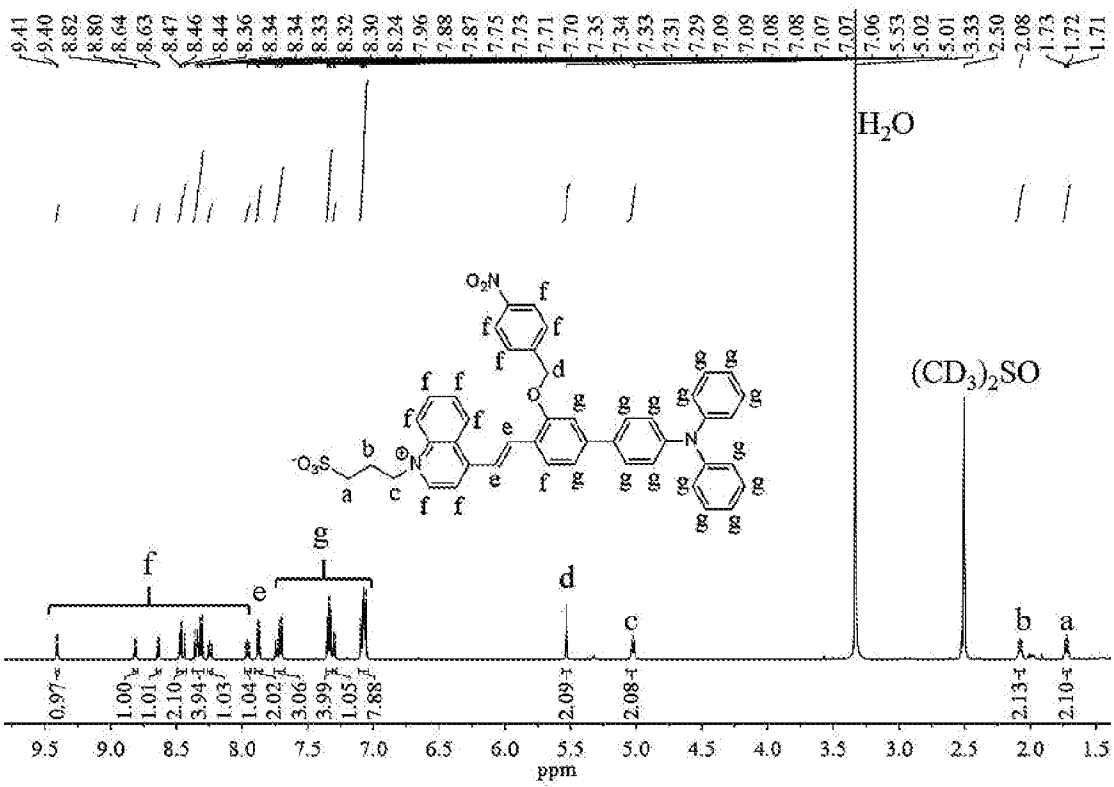


图 3

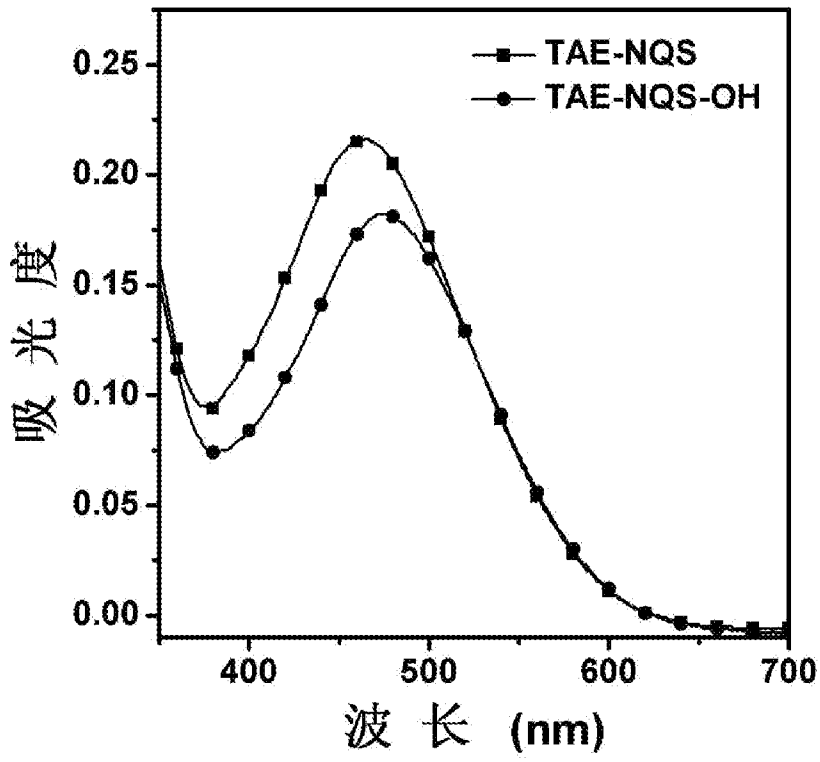


图 4

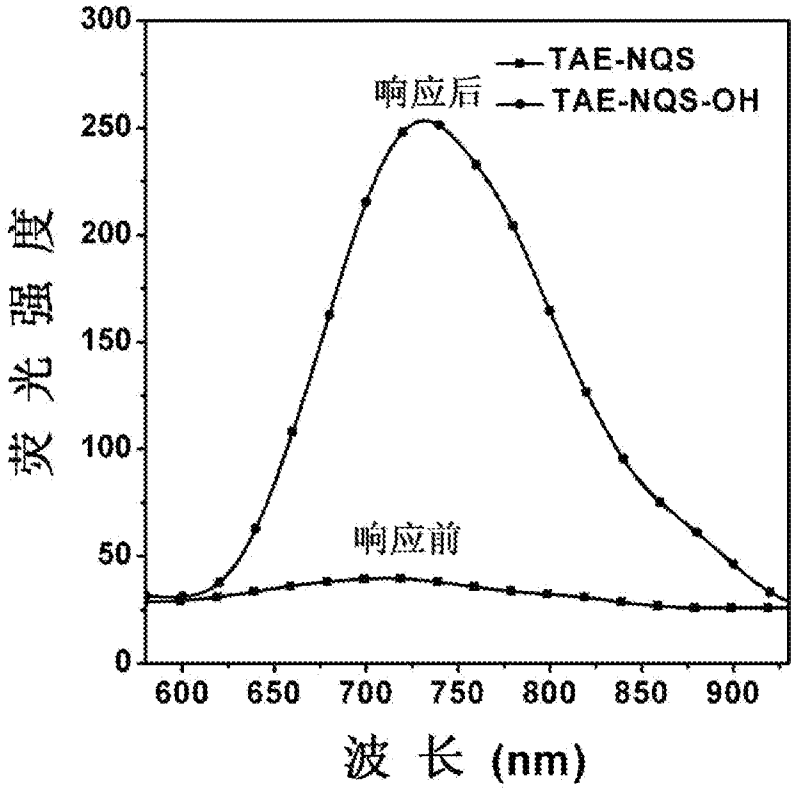

TAE-NQS
TAE-NQS-OH
响应后
响应前
荧光强度
波长 (nm)
0
50
100
150
200
250
300
600
650
700
750
800
850
900

图 5

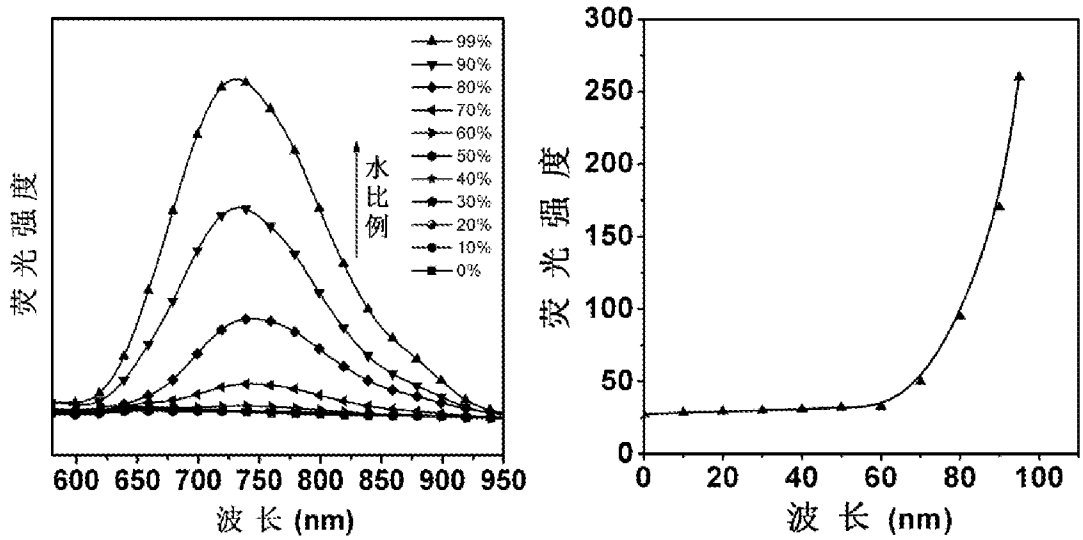

99%
90%
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
水比例
荧光强度
波长 (nm)
600 650 700 750 800 850 900 950
荧光强度
波长 (nm)
0 20 40 60 80 100
0 50 100 150 200 250 300

图 6

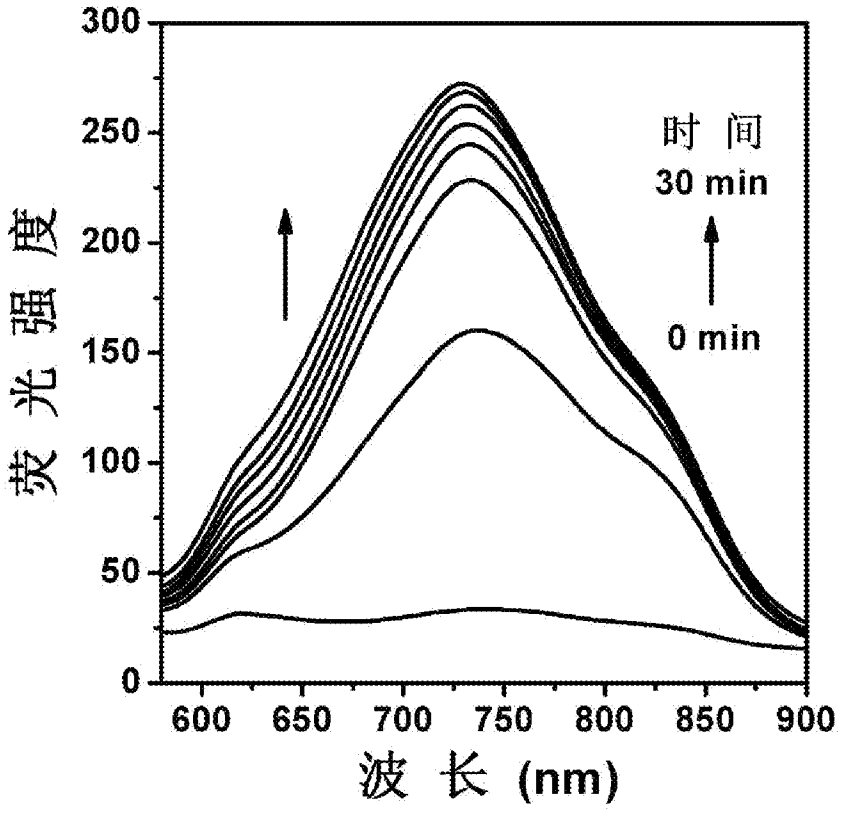

荧光强度
波长 (nm)
时间
30 min
0 min
0
50
100
150
200
250
300
600
650
700
750
800
850
900

图 7

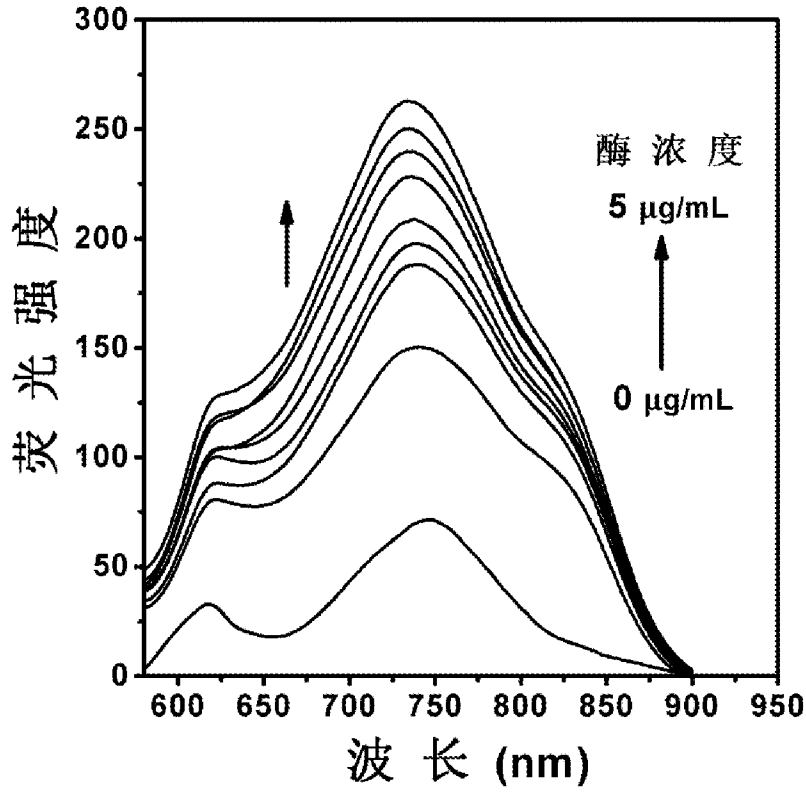

荧光强度
波长 (nm)
酶浓度
5 μg/mL
0 μg/mL
0
50
100
150
200
250
300
600
650
700
750
800
850
900
950

图 8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2019/079616

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07D 215/14(2006.01)i; C09K 11/06(2006.01)i; G01N 21/64(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07D215/-; C09K11/-; G01N21/-

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNPAT, CNLI, WPI, EPODOC, STN(Registry, CAplus): 发光, 荧光, 硝基还原酶, 检测, 探针, fluorescen+, probe, detect+, nitroreductase

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 109456264 A (SOUTH CHINA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY) 12 March 2019 (2019-03-12) entire document	1-10
A	CN 105732564 A (UNIVERSITY OF JINAN) 06 July 2016 (2016-07-06) entire document	1-10
A	CN 107056618 A (UNIVERSITY OF JINAN) 18 August 2017 (2017-08-18) entire document	1-10
A	CN 108727223 A (NANJING UNIVERSITY OF TECHNOLOGY) 02 November 2018 (2018-11-02) entire document	1-10
A	WO 2008030120 A1 (AUCKLAND UNISERVICES LTD. et al.) 13 March 2008 (2008-03-13) entire document	1-10
A	NAKATA, E. J. et al. "Design of a bioreductively-activated fluorescent pH probe for tumor hypoxia imaging" *Bioorganic & Meclicinal Chemistry*, Vol. 17, 21 August 2009 (2009-08-21), pages 6952-6958	1-10

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
12 August 2019	**19 August 2019**
Name and mailing address of the ISA/CN **China National Intellectual Property Administration (ISA/CN)** **No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088** **China** Facsimile No. **(86-10)62019451**	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2019/079616

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
CN 109456264 A	12 March 2019	None	
CN 105732564 A	06 July 2016	CN 105732564 B	26 June 2018
CN 107056618 A	18 August 2017	CN 107056618 B	09 April 2019
CN 108727223 A	02 November 2018	None	
WO 2008030120 A1	13 March 2008	US 2010173332 A1	08 July 2010

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2019/079616

A. 主题的分类

C07D 215/14(2006.01)i; C09K 11/06(2006.01)i; G01N 21/64(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C07D215/-; C09K11/-; G01N21/-

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称，和使用的检索词（如使用））

CNPAT,CNLI,WPI,EPODOC,STN(Registry, CAplus):发光，荧光，硝基还原酶，检测，探针，fluorescen+, probe, detect+, nitroreductase

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
PX	CN 109456264 A (华南理工大学) 2019年 3月 12日 (2019-03-12) 全文	1-10
A	CN 105732564 A (济南大学) 2016年 7月 6日 (2016-07-06) 全文	1-10
A	CN 107056618 A (济南大学) 2017年 8月 18日 (2017-08-18) 全文	1-10
A	CN 108727223 A (南京工业大学) 2018年 11月 2日 (2018-11-02) 全文	1-10
A	WO 2008030120 A1 (AUCKLAND UNISERVICES LTD等) 2008年 3月 13日 (2008-03-13) 全文	1-10
A	Eiji Nakata等. "Design of a bioreductively-activated fluorescent pH probe for tumor hypoxia imaging" Bioorganic & Meclicinal Chemistry, 第17卷，2009年 8月 21日 (2009-08-21), 6952-6958页	1-10

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。

☑ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：

"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件，或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件（如具体说明的）

"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

"T" 在申请日或优先权日之后公布，与申请不相抵触，但为了理解发明之理论或原理的在后文件

"X" 特别相关的文件，单独考虑该文件，认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

"Y" 特别相关的文件，当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时，要求保护的发明不具有创造性

"&" 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
2019年 8月 12日	2019年 8月 19日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451	受权官员 张丹 电话号码 62086317

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2019/079616

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	109456264	A	2019年 3月 12日		无		
CN	105732564	A	2016年 7月 6日	CN	105732564	B	2018年 6月 26日
CN	107056618	A	2017年 8月 18日	CN	107056618	B	2019年 4月 9日
CN	108727223	A	2018年 11月 2日		无		
WO	2008030120	A1	2008年 3月 13日	US	2010173332	A1	2010年 7月 8日