(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108398409 A
(43)申请公布日 2018.08.14

(21)申请号 201810116645.X

(22)申请日 2018.02.06

(71)申请人 河南牧业经济学院
地址 450046 河南省郑州市郑东新区龙子湖高校园区龙子湖北路6号

(72)发明人 马志伟 陈晓培 刘志景 刘俊桃 吴金松 崔丽伟 吕全建

(74)专利代理机构 郑州优盾知识产权代理有限公司 41125
代理人 郑园 张志军

(51)Int.Cl.
G01N 21/64(2006.01)

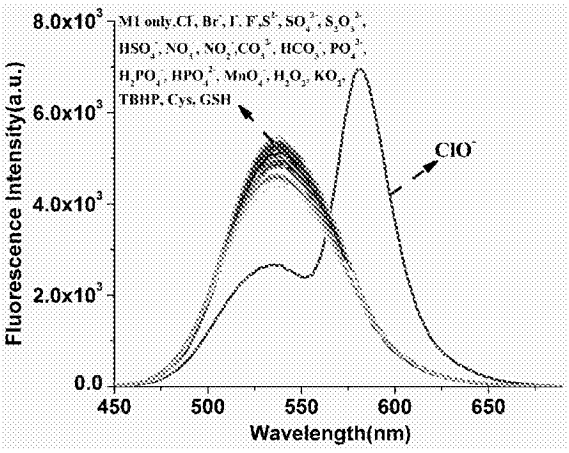
权利要求书1页 说明书7页 附图5页

(54)发明名称

一种荧光比率检测次氯酸根的方法

(57)摘要

本发明提供了一种荧光比率检测次氯酸根的方法，是基于一种罗丹明-萘酰亚胺缀合物(M1)比率检测次氯酸根的方法。具体检测方法是：将M1作为荧光试剂，在HEPES缓冲弄溶液中，通过测定两个不同波长(580 nm和534 nm)的荧光发射强度比率作为定量依据，实现对次氯酸根的比率检测。该检测方法，对次氯酸根显示了较高的灵敏性，检出限低至1.36×10^{-8} mol/L，检测过程简便、抗干扰能力强、快速、灵敏，检测结果准确，在生物分子检测领域具有广阔的应用前景。



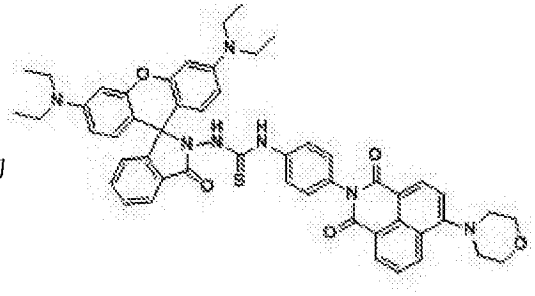
CN 108398409 A

1.一种荧光比率检测次氯酸根的方法，其特征在于包括如下步骤：

(1)将HEPES缓冲溶液与乙腈按体积比4:1混匀后制备混合溶液A，用乙腈配制浓度为1 mM的探针M1溶液；

(2)用蒸馏水配置次氯酸根溶液，把3 mL的混合溶液A和30 μL的探针M1乙腈溶液加到干净的荧光比色皿中，逐渐加入次氯酸根溶液的体积分别为0，3 μL，6 μL，9 μL，12 μL，15 μL，18 μL，21 μL，24 μL，27 μL，30 μL，60 μL，90 μL，同时在荧光光谱仪上测定534 nm和580 nm处的荧光发射强度，以次氯酸根的浓度为横坐标，以荧光强度$F_{580\ nm}/F_{534\ nm}$的比值为纵坐标，得到次氯酸根浓度的工作曲线，线性回归方程为：$F_{580\ nm}/F_{534\ nm}$的比值=0.27466C+0.60854；

(3)将3000 μL的混合溶液A和30 μL的探针M1乙腈溶液加到干净的荧光比色皿中，用微量进样器吸取V μL待测样品溶液，加入到此干净的荧光比色皿中，在荧光光谱仪上测试，将测得的$F_{580\ nm}/F_{534\ nm}$的比值代入步骤(3)的线性回归方程中，得到浓度C，待测样品的浓度$C_{待测样}$=3000• C/V，$C_{待测样}$的单位为μmol/L。

2.根据权利要求1所述的一种荧光比率检测次氯酸根的方法，其特征在于：所述探针M1的结构为。

M1

3.根据权利要求1所述的一种荧光比率检测次氯酸根的方法，其特征在于：所述步骤(1)中HEPES缓冲溶液的浓度为10 mM ，pH=7.4。

4.根据权利要求1所述的一种荧光比率检测次氯酸根的方法，其特征在于：所述步骤(2)中次氯酸根溶液的浓度为100 μmol/L。

5.根据权利要求1所述的一种荧光比率检测次氯酸根的方法，其特征在于：所述探针M1荧光法检测次氯酸根的浓度线性范围为0-3 μM，最低检出限为1.36×10^{-8} mol/L。

一种荧光比率检测次氯酸根的方法

技术领域

[0001] 本发明属于次氯酸根(ClO^-)检测技术领域，具体涉及一种比率检测次氯酸根的方法。

背景技术

[0002] 次氯酸是生物体内起重要生理作用的一种氧化能力较强的活性氧，在生物体的免疫系统中具有重要的作用。在生理条件下，次氯酸可以解离出次氯酸根来完成抗菌消炎的重要生理防护使命。次氯酸根与我们的日常生活息息相关。例如生活中常见的漂白水、消毒液的主要成分就是次氯酸钠。日常生活中次氯酸(一般是其钠盐)被广泛用作漂白剂、除臭剂和消毒剂。作为一种重要的活性氧物种，次氯酸在维持细胞内的氧化还原平衡状态起着非常重要的作用，但是一旦细胞中次氯酸的浓度发生异常，就会引起包括风湿性关节炎、心血管疾病和癌症在内的多种疾病，检测生物体系中次氯酸的浓度已成为一个重要的课题。

[0003] 荧光探针是检测生物体内次氯酸根的有效手段之一。与传统的检测技术相比，荧光探针法作为一种非侵入性检测技术，具有作用前后荧光变化明显、对目标分子响应速度快、检测灵敏度高、可以实现原位检测等众多优点。目前报道的用于次氯酸根检测的荧光探针方法主要作用机制是基于荧光增强或荧光淬灭，这类探针易受环境中如pH、极性、温度等易变因素的干扰，还具有难以定量等缺点。因此迫切需要设计一种高效、高灵敏性、高选择性且不容易受到识别检测环境因素干扰且容易定量的快速检测方法，从而实现对次氯酸根的快速实时定量检测。

发明内容

[0004] 本发明的目的是针对上述问题，提供一种体系简单、操作方便、选择性高的比率识别检测次氯酸根的方法；本发明提供的比率识别检测次氯酸根的方法，是一种基于罗丹明-萘酰亚胺缀合物检测次氯酸根的方法。

[0005] 一种荧光比率检测次氯酸根的方法，包括如下步骤：

(1)将HEPES缓冲溶液与乙腈按体积比4:1混匀后制备混合溶液A，用乙腈配制浓度为1 mM的探针M1溶液；

(2)用蒸馏水配置次氯酸根溶液，把3 mL的混合溶液A和30 μL的探针M1乙腈溶液加到干净的荧光比色皿中，逐渐加入体积分别为0，3 μL，6 μL，9 μL，12 μL，15 μL，18 μL，21 μL，24 μL，27 μL，30 μL，60 μL，90 μL的次氯酸根溶液，随着次氯酸根溶液的加入，以420 nm为激发波长，次氯酸根使得探针在534 nm处的荧光发射强度降低，在580 nm处的荧光发射强度增强，且随着次氯酸根浓度的增大，$F_{580\ nm}/F_{534\ nm}$的比值也增大；同时在荧光光谱仪上测定534 nm和580 nm处的荧光发射强度，以次氯酸根的浓度为横坐标，以荧光强度$F_{580\ nm}/F_{534\ nm}$的比值为纵坐标，得到次氯酸根浓度的工作曲线，线性回归方程为：$F_{580\ nm}/F_{534\ nm}$的比值=0.27466C+0.60854，C的单位为μmol/L；

(3)将3000 μL的混合溶液A和30 μL的探针M1乙腈溶液加到干净的荧光比色皿中，用微

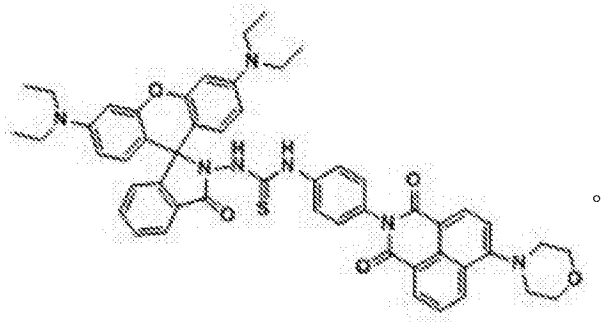
量进样器吸取V μL待测样品溶液，加入到此干净的荧光比色皿中，在荧光光谱仪上测试，将测得的$F_{580\ nm}/F_{534\ nm}$的比值代入步骤(3)的线性回归方程中，得到浓度C，待测样品的浓度$C_{待测样}$=3000 *C*/V，$C_{待测样}$的单位为μmol/L。

[0006] 所述步骤(1)中HEPES缓冲溶液的浓度为10 mM ，pH=7.4。

[0007] 所述步骤(2)中次氯酸根溶液的浓度为100 μmol/L。

[0008] 所述步骤(3)中探针M1荧光法检测次氯酸根的浓度线性范围为0-3 μM，最低检出限为1.36×10^{-8} mol/L。

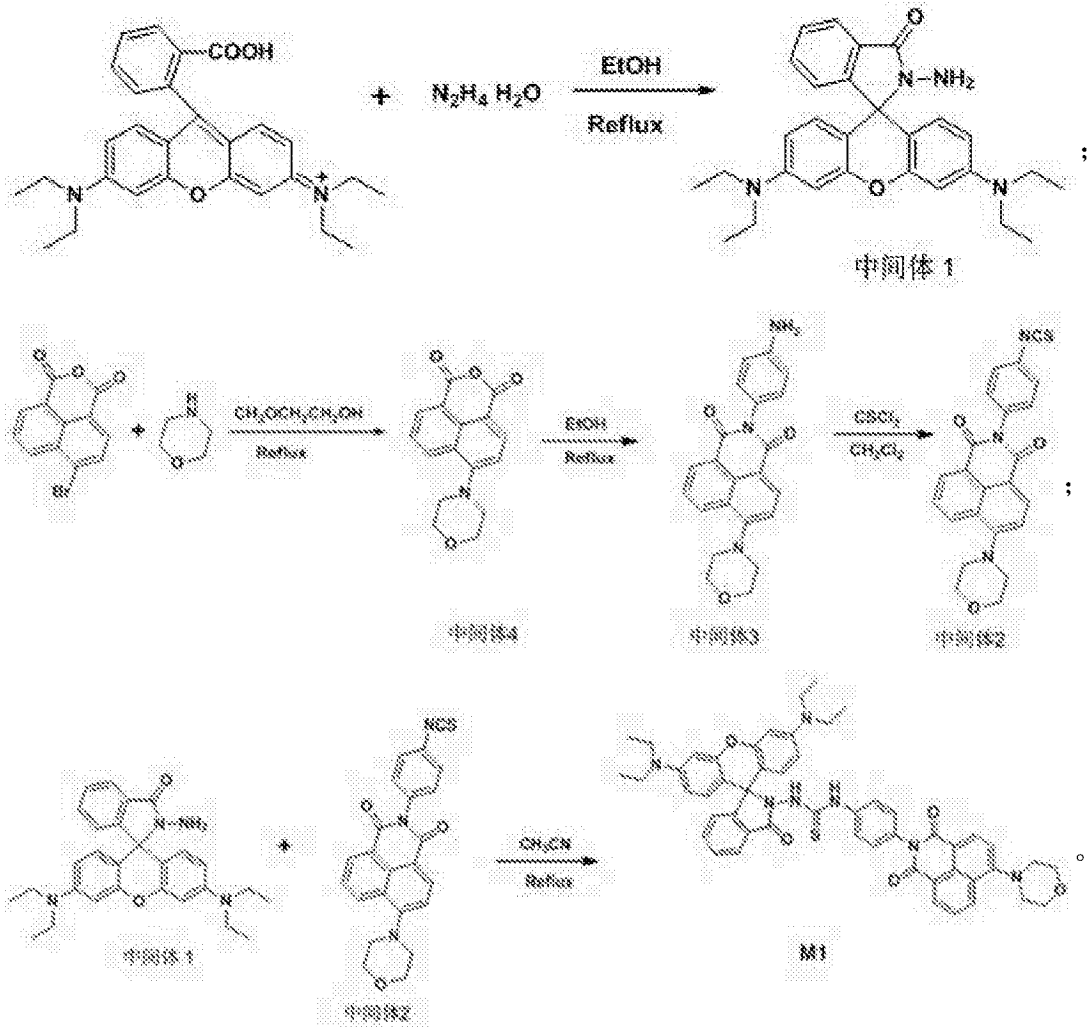
[0009] 所述探针M1为罗丹明-萘酰亚胺缀合物，探针M1的结构为：



。

M1

[0010] 所述探针M1的合成技术路线为：



[0011] 所述探针M1的制备步骤为：

S1. 在50 mL单口烧瓶中，室温搅拌下，将3.0 mL的水合肼溶液逐滴滴加至含1.2 g罗丹明B盐酸盐的30 mL乙醇溶液中，加热回流约两小时，TLC检测反应完毕，冷却至室温，减压除去溶剂得到红色固体，加入约50 mL二氯甲烷使固体完全溶解，体系用饱和NaCl溶液(10 mL)洗涤三次，有机相用无水硫酸钠干燥，过滤，减压除去溶剂得到1.03 g浅黄色的固体产物即为中间体1，产率90 %。

[0012] S2. 在50 mL单口烧瓶中，将商业购买的4-溴-1,8-萘酐(413.8 mg, 1.5 mmol)和吗啡啉(0.2 g, 2.3 mmol)溶解于25 mL的乙二醇单甲醚溶液中，氮气保护下回流反应12小时。反应完全后，冷却至室温，减压去除溶剂，柱层析分离(甲醇：二氯甲烷=1:10，体积比)得到0.55黄色固体(产率90%)即为中间体4。

[0013] S3. 在100 mL的圆底烧瓶内，称取4-吗啡啉-1,8-萘酐(中间体4，0.1 g，0.35 mmol)和对苯二胺(0.76 g, 0.70 mmol)溶于50 mL无水乙醇中，回流反应24小时，反应完全后将体系冷却至室温，将体系中析出的固体过滤并用少量乙醇(10 mL*3次)洗涤，得到黄色固体即为中间体3，产率73%。

[0014] S4. 在50 mL单口烧瓶中，将中间体3 (0.1 g, 0.26 mmol)溶解于10 mL的无水二氯甲烷中，并缓慢滴入含二氯硫化碳(75 μL, 0.1 mmol)和三乙胺(1 mL)的无水二氯甲烷(12 mL)溶液中，滴加完成后，反应体系室温搅拌5小时，反应完全后，体系用饱和NaCl溶液(10 mL)洗涤三次，有机相用无水硫酸钠干燥，过滤，减压下除去溶剂，采用柱层析分离的方法提纯 (二氯甲烷为洗脱剂)，得到浅黄色固体即为中间体2，产率90%。

[0015] S5. 在100 mL的圆底烧瓶内，称取0.3 g (0.72 mmol)中间体2和0.457 g (1 mmol) 中间体1溶于50 mL无水乙腈中，搅拌下升温加热回流12 h，通过TLC检测反应完全；冷却反应液，减压下除去溶剂，用二氯甲烷溶解残留物，再加入蒸馏水，在分液漏斗中提取，收集有机相，用无水硫酸钠干燥。过滤得滤液，减压下除去溶剂，得到粗产品，采用柱层析分离的方法提纯 (甲醇:二氯甲烷=1:30)，得到橙红色泡沫状固体即为探针M1，产率65%。

[0016] 产物探针M1的产品表征为：

核磁共振氢谱测定：^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 1.18 (q, J = 5.3 Hz, 12 H), 3.28 (t, J = 8.0 Hz, 4 H), 3.35 (q, J = 6.7 Hz, 8 H), 4.02 (d, J = 4.0 Hz, 4 H), 6.34 (q, J = 4.0 Hz, 2 H), 6.46 (d, J = 4.0 Hz, 2 H), 6.52 (d, J = 8.0 Hz, 2 H), 7.05 (s, 1 H), 7.11 (d, J = 8.0 Hz, 2 H), 7.24 (d, J = 8.0 Hz, 1 H), 7.30 (m, 2 H), 7.70 (m, 3 H), 8.02 (s, 1 H), 8.45 (d, J = 4.0 Hz, 1 H), 8.53 (d, J = 4.0 Hz, 1 H), 8.58 (t, J = 4.0 Hz, 1 H)。

[0017] 核磁共振碳谱测定：^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz) δ182.45, 167.17, 164.34, 163.85, 162.56, 155.90, 154.32, 150.24, 149.38, 137.83, 134.31, 132.86, 132.74, 131.50, 130.43, 130.21, 129.09, 129.06, 128.68, 128.08, 127.66, 126.21, 125.89, 124.97, 124.76, 123.87, 123.41, 117.09, 114.98, 108.43, 104.23, 98.37, 77.48, 77.16, 76.85, 67.16, 66.94, 53.43, 44.44, 12.63。

[0018] 高分辨质谱测定：HR-ESI-MS calcd for $C_{51}H_{49}N_7O_5S$：871.3516, found 872.3522 [M+H$^+$]。

[0019] 所述探针M1荧光法检测次氯酸根(ClO^-)时，其他共存的阴离子(Br^-, Cl^-, F^-, I^-,

CO_3^{2-}, HCO_3^-, PO_4^{3-}, HPO_4^{2-}, $H_2PO_4^-$, S^{2-}, SO_4^{2-}, HSO_4^-, NO_3^-, MnO_4^-)和活性物质(H_2O_2, KO_2, TBHP,NO_2^-)之一,在浓度等于次氯酸根时,对次氯酸根的测定无干扰。

[0020] 所述探针M1荧光法检测次氯酸根的浓度线性范围为0-3 μM,最低检出限为1.36×10^{-8} mol/L。

[0021] 本发明的有益效果:

1、传统的荧光探针检测次氯酸根的方法是简单的荧光增强型,其作用机制是基于荧光增强或荧光淬灭,这类探针易受环境中如pH、极性、温度等易变因素的干扰,还具有难以定量等缺点。本发明制备的比率检测次氯酸根的方法中荧光探针M1为比率型荧光探针,比率检测次氯酸根的方法识别机理为荧光共振能量转移机理(FRET),该机理通过使用在两个不同波长出测定的荧光强度比值作为定量依据,可以进行探针分子内自校准,能够消除或者有效消除环境温度、酸碱度、检测器效率等外界因素对测量荧光强度的干扰,从而实现对痕量次氯酸根含量的实时定性定量检测。

[0022] 2、本申请制备的探针M1主要是由能量受体罗丹明基团和能量供体4-溴-1,8-萘酰亚胺组成;该探针结构中含有的罗丹明基团部分因具有高的吸收系数,荧光发射在可见光区和较好的荧光量子产率等优良性能;螺环形式的罗丹明衍生物荧光很弱且无色,但当环状结构打开后,就会产生强烈的荧光发射,并伴随着溶液的颜色变成粉红色,在该探针M1结构中选择罗丹明衍生物作为体系中能量的受体和金属离子的识别基团、选择4-溴-1,8-萘酰亚胺作为体系中能量的供体,是因为其为平面刚性结构,存在一个较大的共轭体系,一端连有强供电子基团 (4位被氨基取代),另一端连接有强吸电子基团,在这个系统中的电子就易受到光的照射而被激发后发生跃迁,产生很强的荧光,通过柔性链或共轭基团的方式将能量受体罗丹明的衍生物和能量供体萘酰亚胺连接起来,形成两个荧光团的二聚体,从而实现对次氯酸根的比率检测,并且将该探针M1成功应用于生物活体细胞内的次氯酸根的比率成像检测。

[0023] 3、本发明所述比率检测次氯酸根的方法核心部分是探针分子和次氯酸根发生不可逆的化学反应,对次氯酸根表现出高选择性,离子选择性好,可以有效区分次氯酸根离子和其他活性物质离子、阴离子等。通过紫外、荧光光谱研究等实验结果,推测出探针M1识别次氯酸根的可能机理如附图8所示:单独的探针M1结构中罗丹明部分是闭环结构,不显示荧光,只有萘酰亚胺部分显示534 nm处的荧光,当探针溶液中加入次氯酸根,由于次氯酸根的强氧化作用导致探针M1结构中罗丹明部分螺环打开,释放出荧光(580 nm),同时由于发生分子内荧光共振能量转移导致探针溶液在萘酰亚胺部分的荧光(534 nm)明显减弱。探针M1在识别次氯酸根的过程中罗丹明基团和萘酰亚胺基团发生了FRET作用,生成了新的含1,2,4-恶二唑的化合物(计算分子量为838.3711)通过HR-MS对产物含1,2,4-恶二唑的化合物的结构进行了确证。实验结果表明,HR-MS结果显示为 838.3648。该数据确证了附图8所示作用机理。

[0024] 4、本发明的比率检测次氯酸根的方法对次氯酸根的最低检测限为1.36×10^{-8} mol/L,适合微量检测,可以应用于生物活细胞中检测次氯酸根,具备较强的实际应用价值。

附图说明

[0025] 图1为本发明的荧光探针M1荧光选择性图,激发波长420 nm。

[0026] 图2为本发明的荧光探针M1荧光选择性比率型柱状图，激发波长420 nm，发射波长580 nm和534 nm。

[0027] 图3为本发明的荧光探针M1紫外选择性图。

[0028] 图4为本发明的荧光探针M1紫外选择性比率型柱状图，吸收波长566 nm和 398 nm。

[0029] 图5为本发明的荧光探针M1识别OCl^-的抗其他活性物质干扰性图(比率型柱状图)，激发波长420 nm，发射波长580 nm和534 nm。

[0030] 图6为本发明的荧光探针M1识别OCl^-的荧光滴定图，激发波长420 nm。

[0031] 图7为本发明的荧光探针M1识别OCl^-的工作曲线图(比率型线性图)，激发波长420 nm，发射波长580 nm和534 nm。

[0032] 图8为本发明的荧光探针M1识别OCl^-的识别机理图。

[0033] 图9为本发明的荧光探针M1应用于细胞中对外源性ClO^-进行荧光成像图。

具体实施方式

[0034] 下面将结合本发明实施例，对本发明的技术方案进行清楚、完整地描述，显然，所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例，而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例，本领域普通技术人员在没有付出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例，都属于本发明保护的范围。

[0035] 本申请所使用的探针M1的制备步骤为：

S1. 在50 mL单口烧瓶中，室温搅拌下，将3.0 mL的水合肼溶液逐滴滴加至含1.2 g罗丹明B盐酸盐的30 mL乙醇溶液中，加热回流约两小时，TLC检测反应完毕，冷却至室温，减压除去溶剂得到红色固体，加入约50 mL二氯甲烷使固体完全溶解，体系用饱和NaCl溶液(10 mL)洗涤三次，有机相用无水硫酸钠干燥，过滤，减压除去溶剂得到1.03 g浅黄色的固体产物即为中间体1，产率90 %。

[0036] S2. 在50 mL单口烧瓶中，将商业购买的4-溴-1,8-萘酐(413.8 mg, 1.5 mmol)和吗啡啉(0.2 g, 2.3 mmol)溶解于25 mL的乙二醇单甲醚溶液中，氮气保护下回流反应12小时。反应完全后，冷却至室温，减压去除溶剂，柱层析分离(甲醇:二氯甲烷=1:10，体积比)得到0.55黄色固体(产率90%)即为中间体4。

[0037] S3. 在100 mL的圆底烧瓶内，称取4-吗啡啉-1,8-萘酐(中间体4，0.1 g，0.35 mmol)和对苯二胺(0.76 g, 0.70 mmol)溶于50 mL无水乙醇中，回流反应24小时，反应完全后将体系冷却至室温，将体系中析出的固体过滤并用少量乙醇(10 mL*3次)洗涤，得到黄色固体即为中间体3，产率73%。

[0038] S4. 在50 mL单口烧瓶中，将中间体3 (0.1 g, 0.26 mmol)溶解于10 mL的无水二氯甲烷中，并缓慢滴入含二氯硫化碳(75 μL, 0.1 mmol)和三乙胺(1 mL)的无水二氯甲烷(12 mL)溶液中，滴加完成后，反应体系室温搅拌5小时，反应完全后，体系用饱和NaCl溶液(10 mL)洗涤三次，有机相用无水硫酸钠干燥，过滤，减压下除去溶剂，采用柱层析分离的方法提纯 (二氯甲烷为洗脱剂)，得到浅黄色固体即为中间体2，产率90%。

[0039] S5. 在100 mL的圆底烧瓶内，称取0.3 g (0.72 mmol)中间体2和0.457 g (1 mmol) 中间体1溶于50 mL无水乙腈中，搅拌下升温加热回流12 h，通过TLC检测反应完全；

冷却反应液，减压下除去溶剂，用二氯甲烷溶解残留物，再加入蒸馏水，在分液漏斗中提取，收集有机相，用无水硫酸钠干燥。过滤得滤液，减压下除去溶剂，得到粗产品，采用柱层析分离的方法提纯（甲醇:二氯甲烷=1:30），得到橙红色泡沫状固体即为探针M1，产率65%。

[0040] 产物探针M1的产品表征为：

核磁共振氢谱测定：^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 1.18 (q, J = 5.3 Hz, 12 H), 3.28 (t, J = 8.0 Hz, 4 H), 3.35 (q, J = 6.7 Hz, 8 H), 4.02 (d, J = 4.0 Hz, 4 H), 6.34 (q, J = 4.0 Hz, 2 H), 6.46 (d, J = 4.0 Hz, 2 H), 6.52 (d, J = 8.0 Hz, 2 H), 7.05 (s, 1 H), 7.11 (d, J = 8.0 Hz, 2 H), 7.24 (d, J = 8.0 Hz, 1 H), 7.30 (m, 2 H), 7.70 (m, 3 H), 8.02 (s, 1 H), 8.45 (d, J = 4.0 Hz, 1 H), 8.53 (d, J = 4.0 Hz, 1 H), 8.58 (t, J = 4.0 Hz, 1 H)。

[0041] 核磁共振碳谱测定：^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz) δ182.45, 167.17, 164.34, 163.85, 162.56, 155.90, 154.32, 150.24, 149.38, 137.83, 134.31, 132.86, 132.74, 131.50, 130.43, 130.21, 129.09, 129.06, 128.68, 128.08, 127.66, 126.21, 125.89, 124.97, 124.76, 123.87, 123.41, 117.09, 114.98, 108.43, 104.23, 98.37, 77.48, 77.16, 76.85, 67.16, 66.94, 53.43, 44.44, 12.63。

[0042] 高分辨质谱测定：HR-ESI-MS calcd for $C_{51}H_{49}N_7O_5S$：871.3516, found 872.3522 [$M+H^+$]。

[0043] 下面结合具体检测实施例对本发明的进行进一步的解释说明：

实施例1

配制浓度为pH=7.4, 10 mM的HEPES缓冲溶液，并用乙腈配置体积比为4:1的混合溶液A，用乙腈配制浓度为1 mM的探针M1溶液。用荧光光谱仪考察了探针M1对次氯酸根的选择性。如附图1所示，在激发波长为420 nm的激发条件下，单独的探针M1 (10 μM)在混合溶液A中只在534 nm处具有较强的荧光发射强度，当加入次氯酸根(100 μM)后，在534 nm处的荧光发射强度明显降低，在580 nm处的荧光发射强度明显增强，但是加入其它分析物 (100 μM) 时，溶液体系的荧光发射强度与单独探针体系的荧光发射强度相比没有明显变化。附图2为上述结果以荧光发射强度比率(F_{580}/F_{534})柱状图。以上实验结果表明，该探针对次氯酸根具有较好的专一选择性。

[0044] 实施例2

配制浓度为pH=7.4, 10 mM的HEPES缓冲溶液，并用乙腈配置体积比为4:1的混合溶液A，用乙腈配制浓度为1 mM的探针M1溶液。用紫外-可见光谱仪考察了探针M1对次氯酸根的选择性。如附图3所示，单独的探针M1 (10 μM)在混合溶液A中只在398 nm处具有较强的紫外吸收强度，当加入次氯酸根(100 μM)后，在566 nm处的紫外吸收强度明显增强，但是加入其它分析物 (100 μM) 时，溶液体系的紫外吸收强度与单独探针体系的荧光发射强度相比没有明显变化。附图2为上述结果以紫外吸收强度比率(F_{566}/F_{398})柱状图。以上实验结果表明，该探针对次氯酸根具有较好的专一选择性。

[0045] 应用例1

为了测试探针M1对次氯酸根识别作用在复杂体系中的抗干扰能力，在荧光发射光谱中分别测试了其抗常见活性物质的干扰性。配制浓度为pH=7.4, 10 mM的HEPES缓冲溶液，并用乙腈配置体积比为4:1的混合溶液A，用乙腈配制浓度为1 mM的探针M1溶液。在18个干净

的荧光比色皿中，分别加入3000 μL的混合溶液A和30 μL的探针M1乙腈溶液，再分别加入10个摩尔当量的ClO^-和10个摩尔当量的其他分析物(Br^-, Cl^-, F^-, I^-, CO_3^{2-}, HCO_3^-, PO_4^{3-}, HPO_4^{2-}, $H_2PO_4^-$, S^{2-}, HSO_4^-, NO_2^-, NO_3^-, MnO_4^-, SO_4^{2-}, H_2O_2, KO_2, TBHP)，在激发波长为420 nm的激发条件下，在其他活性物质存在时加入次氯酸根与单独加入次氯酸根时所得到的荧光发射强度比率(F_{580}/F_{534})基本相同，得到荧光发射柱状图(附图5)。

[0046] 经实验证明，其他分析物不干扰体系对ClO^-的测定。

[0047] 应用例2

配制浓度为pH=7.4, 10 mM的HEPES缓冲溶液，并用乙腈配置体积比为4:1的混合溶液A，用乙腈配制浓度为1 mM的探针M1溶液。固定探针M1浓度为10 μM，测定其对不同浓度的次氯酸根的响应强度，在激发波长为420 nm的激发条件下，随着次氯酸根浓度的增加，体系荧光发射强度在534 nm处不断降低，同时在580 nm处不断增强(附图6)，研究发现溶液荧光发射强度比率($F_{580\ nm}/F_{534\ nm}$)在次氯酸根浓度为0-3 μM间呈线性(R^2 = 0.992)(附图7)，经计算(3σ/k)得出该探针M1对次氯酸根的最低检出限为1.36×10^{-8} mol/L，该检出限可满足国家对城市自来水中次氯酸根含量的限量要求，表明该探针M1在城市自来水质量安全方面具有潜在的应用价值。

[0048] 应用例3

探针M1对细胞外源性次氯酸根荧光成像

将本发明探针M1应用于Eca109(食管癌细胞)，对外源性的次氯酸根进行荧光成像，具体步骤如下：

a) 将10 μM探针M1溶液加入到育有Eca109细胞的培养液(2 mL)中，在二氧化碳培养箱中培养20 min，用HEPES缓冲溶液洗涤2次，明场成像，如图(A)，可以看到细胞大致的轮廓；

b) 将 a)中细胞用420 nm激光激发，绿光通道成像，得到具有较强绿色荧光的图(B)，没有红色荧光；

c) 将10 μM探针M1溶液加入到育有Eca109细胞的培养液(2 mL)中，在二氧化碳培养箱中培养20 min，加入20 μM的次氯酸钠水溶液后，在二氧化碳培养箱中培养20 min，用HEPES缓冲溶液洗涤2次，明场成像，如图(C)，可以看到细胞大致的轮廓；

d) 将 c)中细胞用420 nm激光激发，红光通道成像，得到具有较强红色荧光的图(D)，没有绿色荧光；

根据附图9所示，没有加入次氯酸钠溶液的细胞在420 nm的激发下在绿光通道有较强的绿色荧光发出。然而，另一份在加入次氯酸钠溶液后，在420 nm的激发下在红光通道具有较强的红色荧光发出。这说明本发明探针M1可以对细胞中外源性的次氯酸根进行荧光成像。

[0049] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已，并不用以限制本发明，凡在本发明的精神和原则之内，所作的任何修改、等同替换、改进等，均应包含在本发明的保护范围之内。

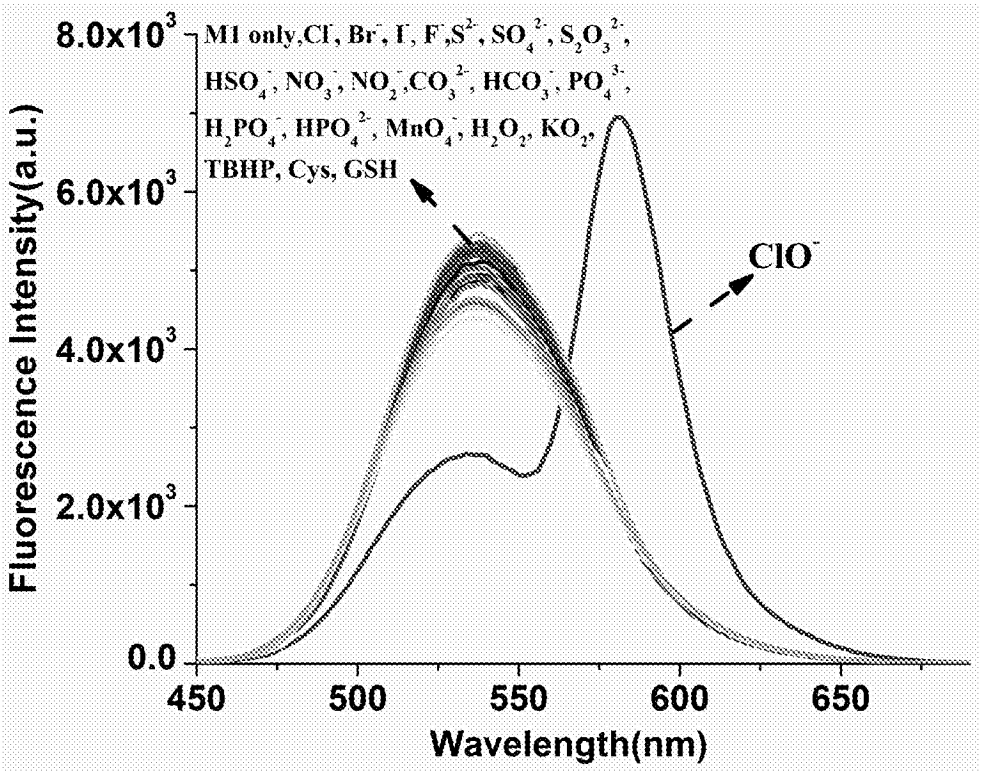

M1 only,Cl⁻, Br⁻, I⁻, F⁻,S²⁻, SO₄²⁻, S₂O₃²⁻,
HSO₄⁻, NO₃⁻, NO₂⁻,CO₃²⁻, HCO₃⁻, PO₄³⁻,
H₂PO₄⁻, HPO₄²⁻, MnO₄⁻, H₂O₂, KO₂,
TBHP, Cys, GSH
ClO⁻
Fluorescence Intensity(a.u.)
8.0x10³
6.0x10³
4.0x10³
2.0x10³
0.0
450
500
550
600
650
Wavelength(nm)

图1

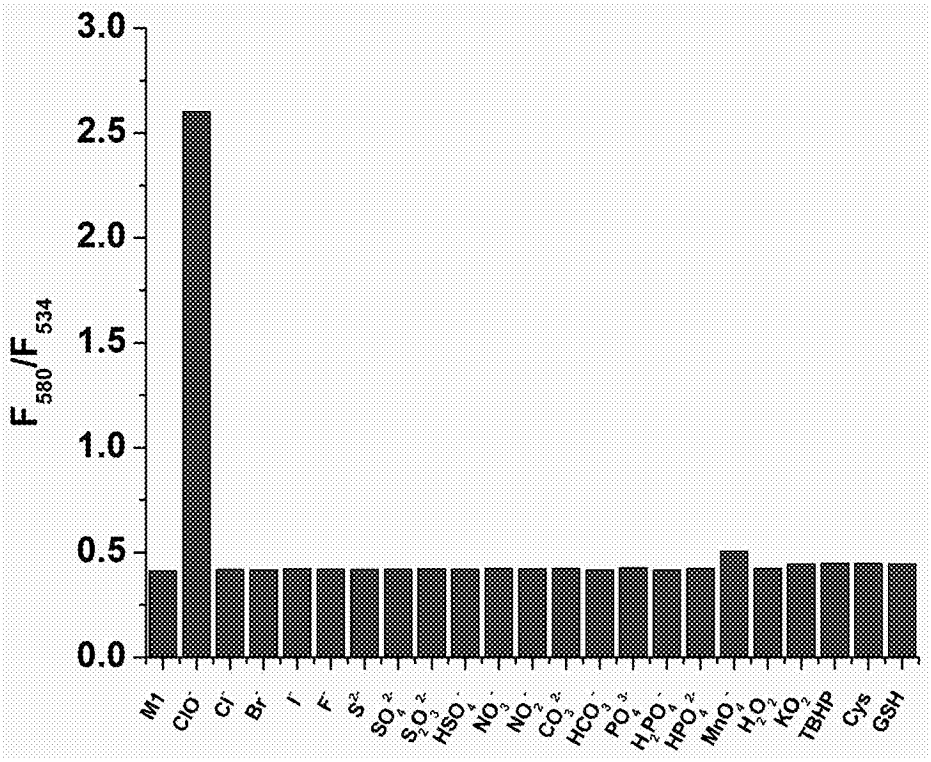

F580/F534
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
M1
ClO⁻
Cl⁻
Br⁻
I⁻
F⁻
S²⁻
SO₄²⁻
S₂O₃²⁻
HSO₄⁻
NO₃⁻
NO₂⁻
CO₃²⁻
HCO₃⁻
PO₄³⁻
H₂PO₄⁻
HPO₄²⁻
MnO₄⁻
H₂O₂
KO₂
TBHP
Cys
GSH

图2

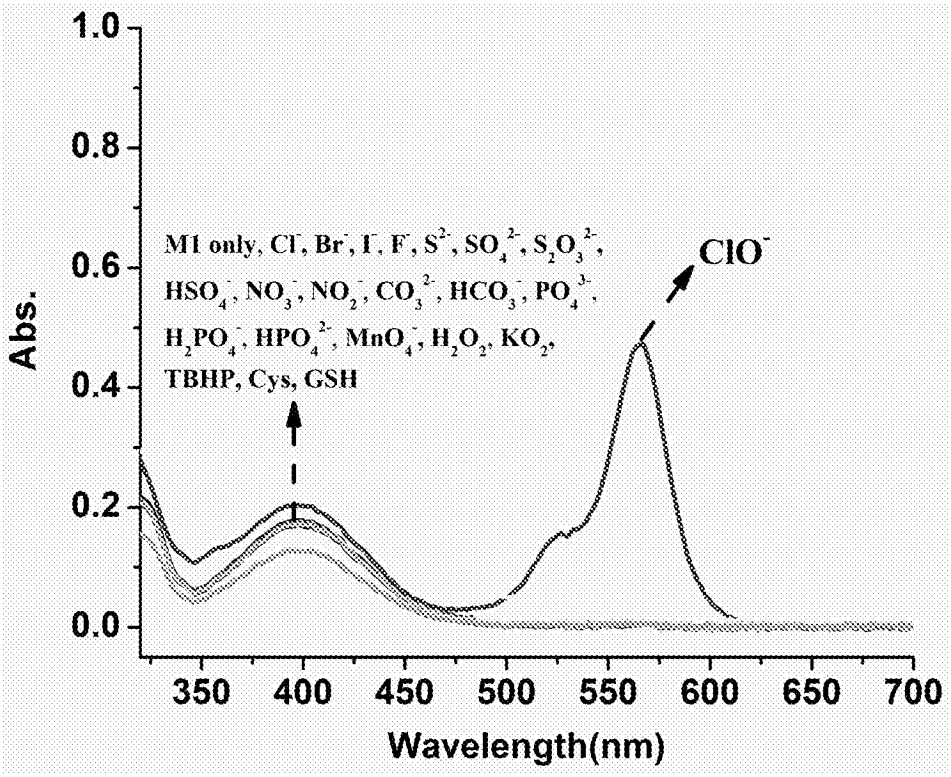

1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
Abs.
M1 only, Cl⁻, Br⁻, I⁻, F⁻, S²⁻, SO₄²⁻, S₂O₃²⁻,
HSO₄⁻, NO₃⁻, NO₂⁻, CO₃²⁻, HCO₃⁻, PO₄³⁻,
H₂PO₄⁻, HPO₄²⁻, MnO₄⁻, H₂O₂, KO₂,
TBHP, Cys, GSH
ClO⁻
350 400 450 500 550 600 650 700
Wavelength(nm)

图3

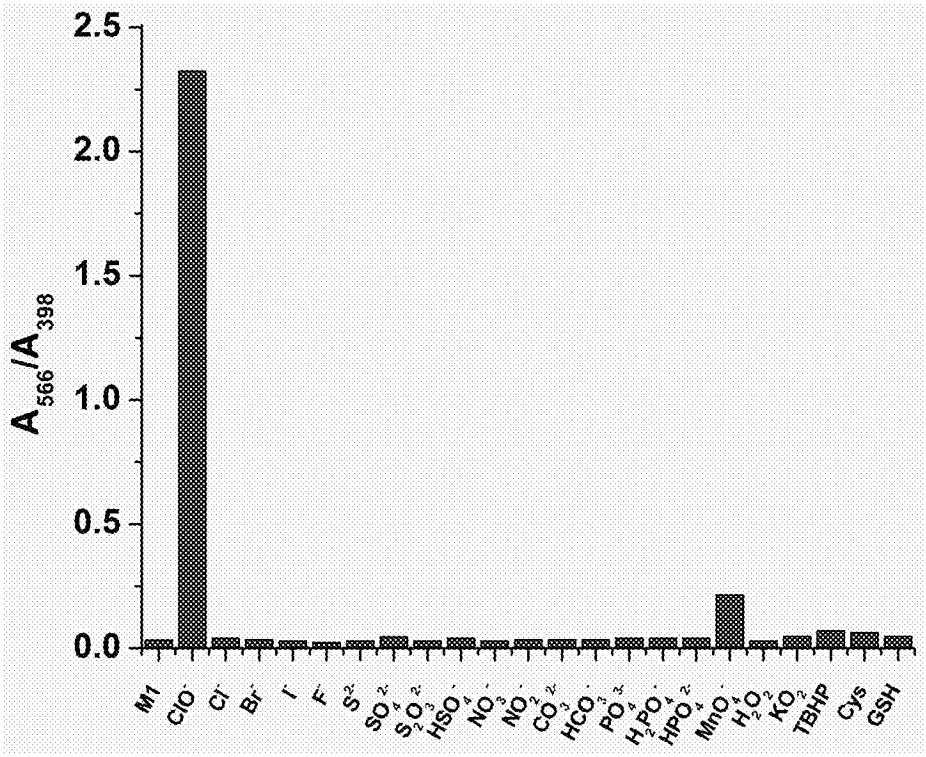

2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
A566/A398
M1
ClO⁻
Cl⁻
Br⁻
I⁻
F⁻
S²⁻
SO₄²⁻
S₂O₃²⁻
HSO₄⁻
NO₃⁻
NO₂⁻
CO₃²⁻
HCO₃⁻
PO₄³⁻
H₂PO₄⁻
HPO₄²⁻
MnO₄⁻
H₂O₂
KO₂
TBHP
Cys
GSH

图4

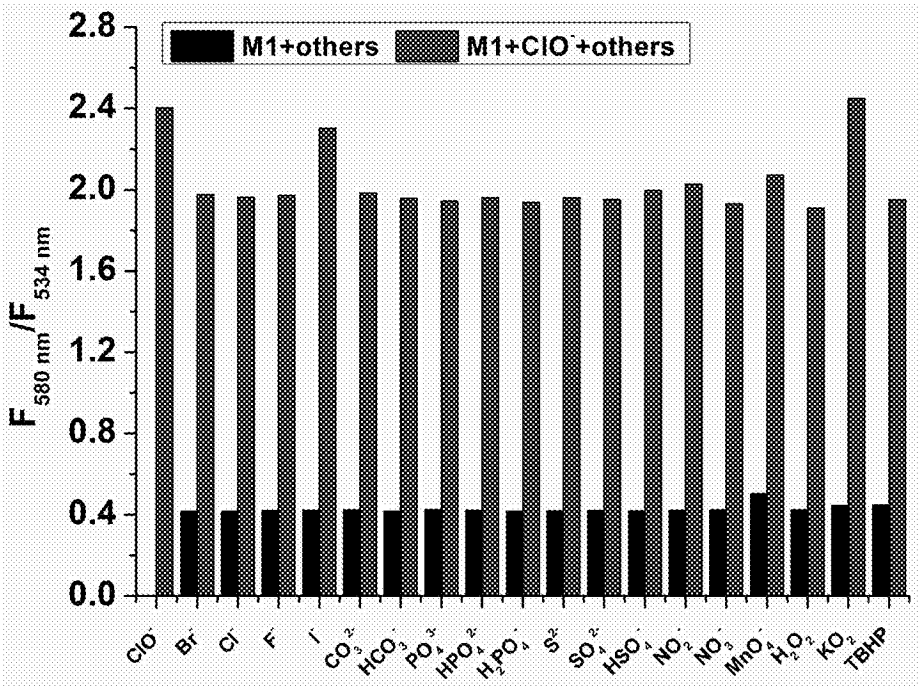

M1+others
M1+ClO⁻+others
F580 nm/F534 nm
2.8
2.4
2.0
1.6
1.2
0.8
0.4
0.0
ClO⁻
Br⁻
Cl⁻
F⁻
I⁻
CO3 2-
HCO3⁻
PO4 3-
HPO4 2-
H2PO4⁻
S2-
SO4 2-
HSO4⁻
NO2⁻
NO3⁻
MnO4⁻
H2O2
KO2
TBHP

图5

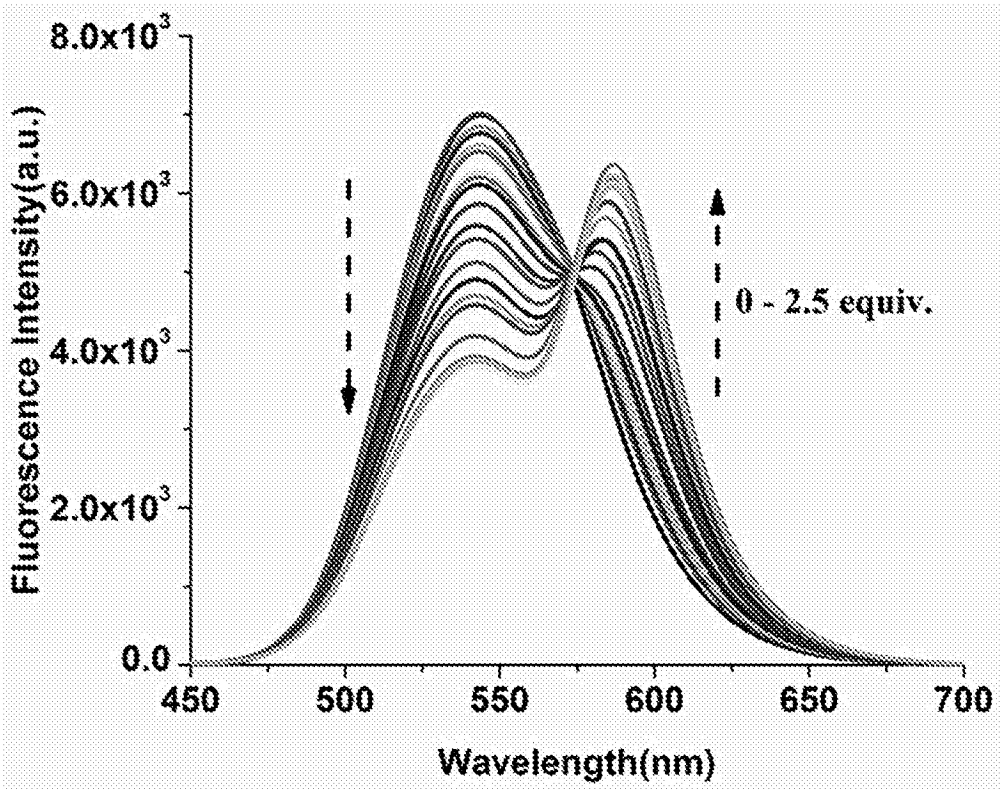

Fluorescence Intensity(a.u.)
8.0x10³
6.0x10³
4.0x10³
2.0x10³
0.0
450
500
550
600
650
700
Wavelength(nm)
0 - 2.5 equiv.

图6

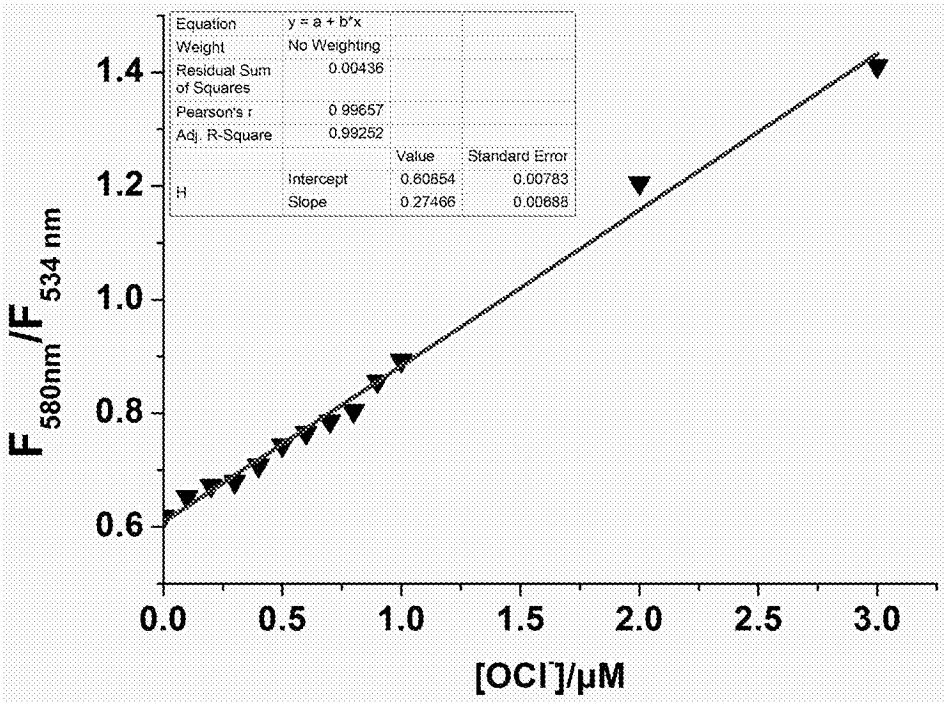

Equation y = a + b*x
Weight No Weighting
Residual Sum of Squares 0.00436
Pearson's r 0.99657
Adj. R-Square 0.99252
Value Standard Error
H Intercept 0.60854 0.00783
Slope 0.27466 0.00688
F580nm/F534 nm
[OCl-]/μM
0.0 0.5 1.0 1.5 2.0 2.5 3.0
0.6 0.8 1.0 1.2 1.4

图7

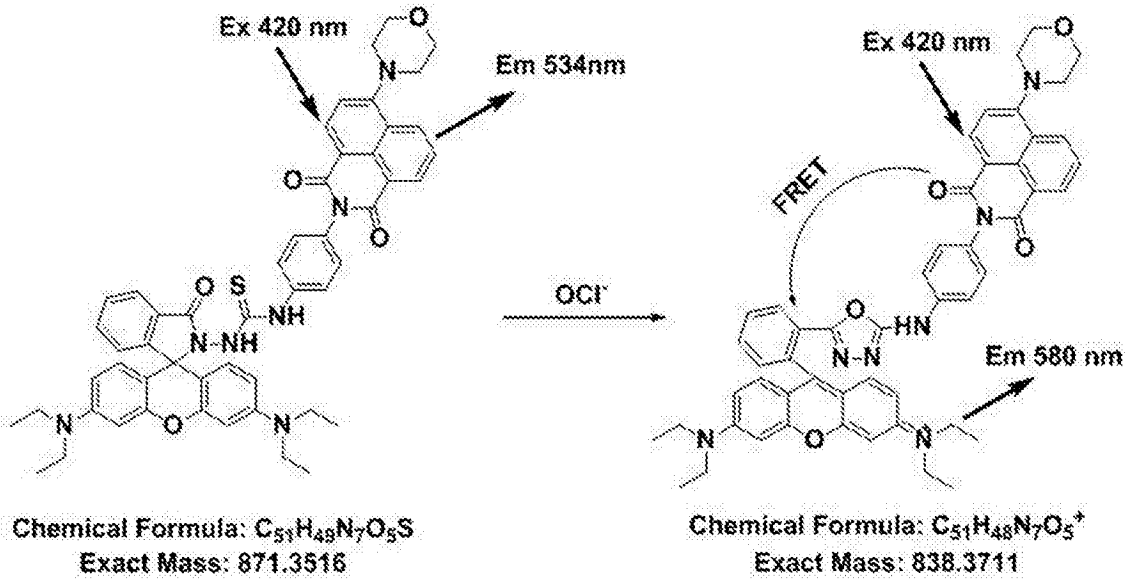

Ex 420 nm
Em 534nm
OCl-
FRET
Ex 420 nm
Em 580 nm
Chemical Formula: C51H49N7O5S
Exact Mass: 871.3516
Chemical Formula: C51H48N7O5+
Exact Mass: 838.3711

图8

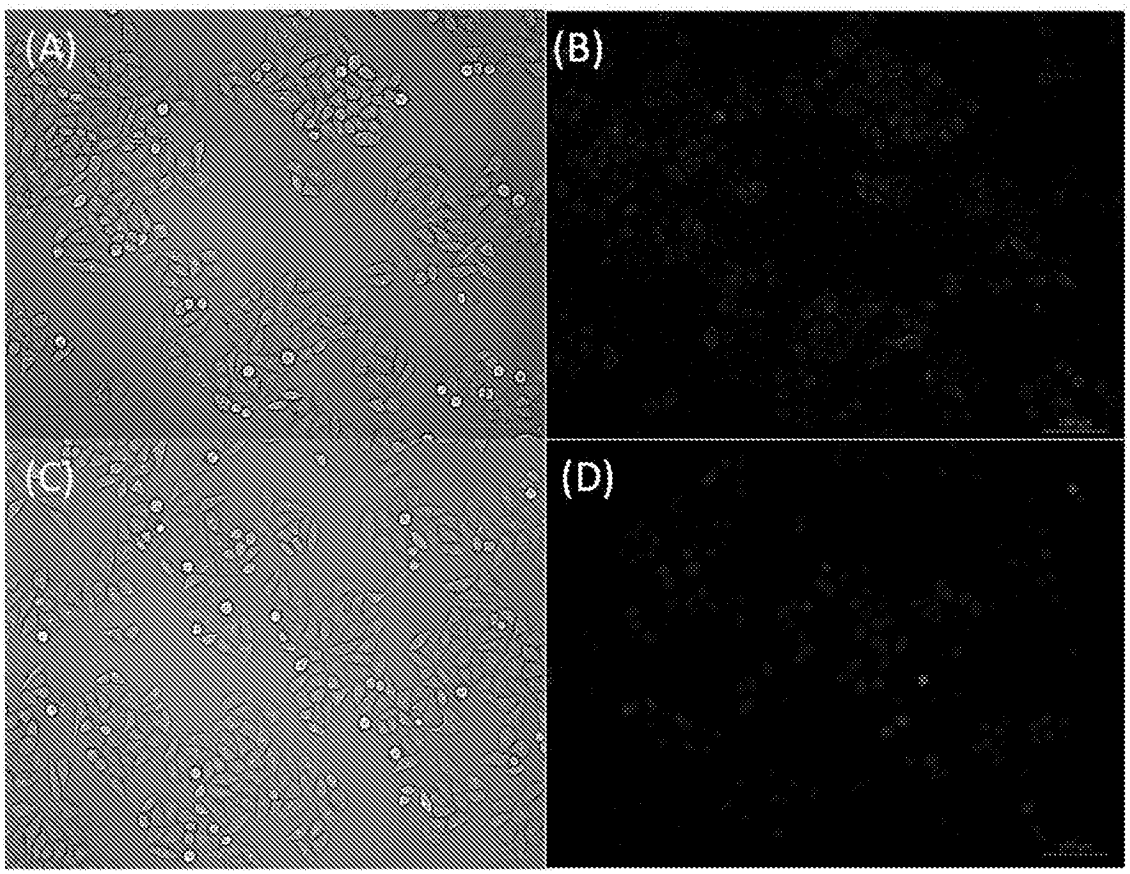


图9