

文章编号 1672-6634(2023)03-0096-15

DOI 10.19728/j.issn1672-6634.2022120001

一石二鸟:单分子双波长荧光定量和手性识别氨基酸

韩苗¹,曹明磊^{1,2},段文增¹,龚树文¹

(1. 聊城大学 化学化工学院 聊城 252059; 2. 山东信发瑞捷新材料科技有限公司 聊城 252000)

摘要 近年来,为了便于手性荧光分子探针应用于高通量手性分析,通过一次荧光测定同时测定手性底物的浓度和对映体组成成为科学家们关注的热点问题。综述了四类用于双波长荧光定量和手性识别氨基酸的荧光探针分子,根据其设计合成及识别机制,研究了其识别优缺点和应用前景。探针(R)-4和(R)-9可识别多种氨基酸;(S)-12和(S)-17仅对组氨酸和精氨酸双重响应识别。同时,探针(R)-4,(S)-12和(S)-17水溶性差,且与氨基酸形成的中间体在水溶液中不稳定,测量主要在有机溶液中进行,不利于生物应用研究。这些机制研究可达到一石二鸟的效果:既可以定量检测氨基酸的浓度,又可以手性识别氨基酸对映体组成,这为后期双波长荧光定量和手性识别手性化合物的研究提供参考。

关键词 荧光探针分子;氨基酸;浓度;对映体组成

中图分类号 O656

文献标识码 A

开放科学(资源服务)标识码(OSID)



Two Birds with One Stone: Quantitative and Enantioselective Recognition of Amino Acids Using One Molecule with Dual-Wavelength Emission

HAN Miao¹, CAO Minglei^{1,2}, DUAN Wenzeng¹, GONG Shuwen¹

(1. School of Chemistry and Chemical Engineering, Liaocheng University, Liaocheng 252059, China; 2. Shandong Xinfafa Ruijie New Material Co. Ltd, Liaocheng 252000, China)

Abstract Recently, to facilitate the application of enantioselective fluorescent probes for high-throughput chiral analysis, the simultaneous determination of the concentration and chiral substrate composition by a single fluorescence assay is attracting scientists' interest. This paper mainly summarizes the design, synthesis and response mechanism of four types of fluorescent probes based on the simultaneous determination of the concentration and enantiomeric composition during the development of chiral fluorescent sensors for rapid assay chiral amino acids. Probes(R)-4 and(R)-9 can determine many types amino acids;(S)-12 and (S)-17 can selectively dual recognize histidine and arginine, respectively. Moreover, probes(R)-4,(S)-12 and(S)-17 are water-insoluble, and the intermediates with amino acids are unstable in aqueous solution, the detections are mainly limited to organic solutions, which is not suitable for the biological application research. The response research will play the role of two birds with one stone: both the concentration

收稿日期:2022-12-01

基金项目:国家自然科学基金项目(21801108);山东省自然科学基金项目(ZR2022MB145)资助

通讯作者:段文增,男,汉族,博士,副教授,研究方向:有机合成化学;E-mail: duanwenzeng@lcu.edu.cn;龚树文,男,汉族,博士,教授,研究方向:有机合成化学;E-mail: gongshw@lcu.edu.cn.

and the enantiomeric composition of amino acids can be determined, and will provide a reference for the study of dual-wavelength quantitative and enantioselective recognition of chiral compounds.

Key words fluorescence probes; amino acids; concentration; enantiomeric composition

1 引言

氨基酸是自然界中普遍存在的重要有机分子,在化学、生物工业和实验室中也随处可见^[1,2]。其两种构型中 *L*-氨基酸是构成生物体蛋白质的基本单位,与生物体的生命活动有着密切关系;非天然的 *D*-氨基酸虽然不是构成蛋白质的基本结构单元,但广泛存在于真核肽、细菌和动物(包括人类)中^[3-5]。游离氨基酸不仅可用于营养补充和食品加工,在生物系统中发挥多种功能,它们还是制备结构多样的有机化合物的起始材料。如在不对称合成中,光学活性氨基酸通常被用作手性源。因此,由于氨基酸的重要作用,许多分析工具被开发用来研究氨基酸,特别是对其对映体的鉴别^[6,7]。

近几年,利用分子探针对手性氨基酸的对映选择性荧光识别已经成为化学家们研究的热点,很多探针被设计合成出来并展现出优异的不对称识别效果^[8-17]。这些探针可以用于快速分析不对称反应或生物过程产生的氨基酸的对映体组成。与用荧光分子探针分析非手性底物不同,荧光分子探针分析非手性底物通常只需要获得一个参数,即底物的浓度,而手性氨基酸的分析需要确定两个参数,包括浓度和对映体组成。因为浓度和对映体组成都会影响荧光响应,所以通常需要有两种独立的方法来确定这两个参数。如果在不分离氨基酸对映体的情况下只使用一个荧光探针同时获得氨基酸的浓度和对映体组成,这将是一个重大的挑战。使用一种荧光分子探针同时进行浓度和对映体组成测定,这种“一石二鸟”的策略存在很多优点:(1) 检测方法简单,成本较低;(2) 不需要分离手性底物;(3) 高灵敏度、高选择性;(4) 具有安全性和很强的复用能力。因此,本文在前期研究的基础上^[18],结合近几年手性荧光分子探针手性识别氨基酸进展,重点综述了四种可同时检测氨基酸的浓度和对映体组成的荧光化合物,并对其设计合成理念和双响应识别机制进行了详细研究。第一种双响应荧光分子探针(R)-4,当(R)-4在 $\text{Zn}(\text{OAc})_2$ 的存在下被各种手性胺处理时,会与 2-萘胺发生换位反应,由于 2-萘胺恢复发射,其在 $\lambda_3 = 427 \text{ nm}$ (I_3) 处显示出较大的荧光增强。剩余的手性二萘基单元与手性底物结合,在 $\lambda_4 > 500 \text{ nm}$ (I_4) 处产生高度对映选择性的荧光增强。由于 I_3 只依赖于浓度,不依赖于手性构型,因此它可以测定底物浓度。而 I_4 依赖于手性构型,所以它可以测定对映体的组成。因此,可以使用一个荧光探针和一次荧光测量,同时确定底物浓度和对映体组成^[19]。第二种双响应荧光分子探针(R)-9,它是一种由 1,1'-联二萘酚(BINOL)和香豆素制成的新型荧光探针,其在中性缓冲溶液中,以 $\lambda_5 = 365 \text{ nm}$ 激发时,与氨基酸作用,在 465 nm 处显示荧光增强,但两种对映体之间的差异非常小。当在 $\lambda_6 = 467 \text{ nm}$ 激发时,在 534 nm 处表现出高度的对映选择性荧光增强。这样通过调整不同的激发波长就可以同时测定氨基酸的浓度和对映体组成^[20]。第三种双响应荧光分子探针(S)-12,当(S)-12被组氨酸和 Zn^{2+} 处理时,可以产生一种六配位的 $\text{Zn}(\text{II})$ 配合物,限制 BINOL 单元的旋转,从而显示荧光增强。同时由于组氨酸的 *L*-和 *D*-对映体可能导致六配位的 $\text{Zn}(\text{II})$ 配合物的稳定性或结构刚性不同,从而进行不同的对映体选择性反应。其他氨基酸没有组氨酸的咪唑取代基,不能产生六配位的配体结构,从而在不同激发波长下,组氨酸的浓度和对映选择性可以被(S)-12同时检测到^[21]。第四种双响应分子探针(S)-17是一种具有多个活性检测位点的 BINOL 荧光探针。当(S)-17被精氨酸处理时,两个醛基与精氨酸的氨基进行缩合,丙烯酸酯提供一个额外的反应位点,只与特定的精氨酸对映体进行 Michael 加成形成环状化合物,虽然未反应完全,但经历了强烈的 ICT(分子内电荷转移)发出强烈的荧光,从而可以同时检测精氨酸浓度和对映体组成^[22]。

2 第一个双响应荧光探针的发现

2012 年有文章报道了 1,1'-联二萘酚(BINOL)基三氟甲基酮(S)-1(表 1)在手性二胺的荧光识别中的应用^[23]。发现非荧光化合物(S)-1在与反式-1,2-环己二胺的两个对映体相互作用时,在 $\lambda_1 = 370 \text{ nm}$ 和 $\lambda_2 = 438 \text{ nm}$ 处显示双重荧光增强,在 λ_1 处,(S)-1对两种对映体都有较大的荧光增强作用,但对映选择性很小;在 λ_2 处,(*R,R*)-反式-1,2-环己二胺对荧光的增强作用远大于(*S,S*)对映体。因此,在 λ_1 处的荧光响应可测定环己二胺的浓度,而在 λ_2 处的荧光响应可测定手性二胺的对映体组成。自此,可同时测定浓度和

对映体组成的单分子荧光传感器开始迅速发展。

表 1 文中化合物名称缩写及结构

缩写	结构	缩写	结构	缩写	结构
(S)-1		7		13	
(R)-2		8		(S)-14	
3		(R)-9		(S)-15	
(R)-4		(S)-10		(S)-16	
(S, S)-5 和 (R, R)-5		11		(S)-17	
(R)-6		(S)-12			

尽管(S)-1 可用于手性二胺的浓度和对映选择性识别,但其不适用于检测手性氨基酸,不过其双重响应检测机制是相通的。这一发现促使 Pu 实验室提出了一种潜在的通用策略,将对映选择性荧光传感器转化为同时测定手性化合物浓度和对映体组成的双响应荧光传感器^[19]。如图 1 所示,将发射波长为 λ_1 的非手性荧光团 A 连接到对映选择性荧光传感器 B 上。选择 B 的标准是该传感器与手性底物在不同波长 λ_2 的相

互作用下显示对映选择性荧光增强。将 A 和 B 之间引入适当的键,以使 A 的荧光在 $[A + B]$ 双单元中猝灭。再结合一种连锁裂解机制,以允许添加手性底物时释放出 A 在 λ_1 处恢复其发射。因此,在 λ_1 处的荧光增强与底物浓度密切相关,其受对映体组成的影响可以忽略。键断裂后,得到的 B 与底物的对映体结合后,在 λ_2 处应表现出对映选择性荧光增强。因此, $[A + B]$ 双单元可用于测定 λ_1 处的底物浓度和 λ_2 处的对映体组成,即一次荧光测量可以给出两个参数结果。

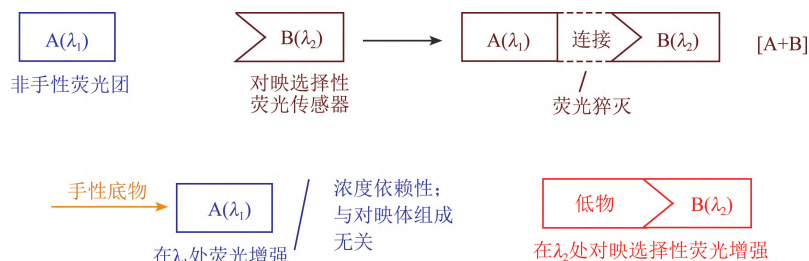


图1 将对映选择性荧光传感器转换为双重响应传感器的拟议一般策略^[19]

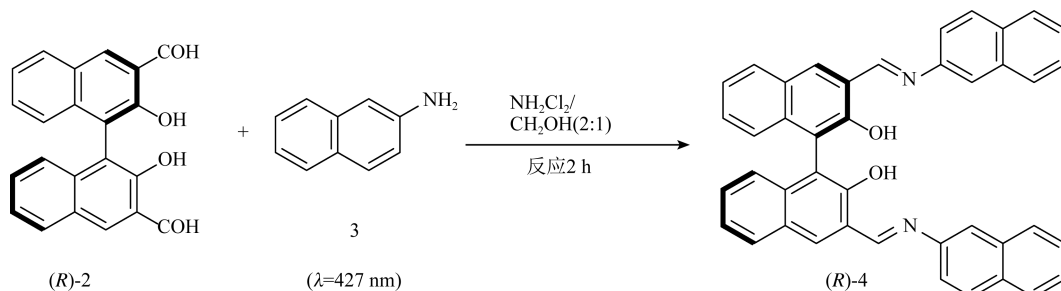


图2 双响应荧光分子探针(R)-4的合成路线

3 双响应荧光分子探针(R)-4研究进展

3.1 双响应荧光分子探针(R)-4的设计与合成

2014年研究报道了(R)-2与 Zn^{2+} 结合得到的对映选择性荧光传感器^[24],其可广泛应用于二胺、氨基醇和氨基酸等手性功能胺的识别研究。在 Zn^{2+} 存在下,(R)-2与手性功能胺反应,在 $\lambda > 500\text{ nm}$ (λ_4)处表现出高度的对映选择性荧光增强。根据图1中提出的同时测定浓度和对映体组成的策略可将该化合物设计为双响应荧光传感器。将(R)-2与化合物3缩合生成相应的席夫碱(R)-4(图2)^[19],产率为33%。该反应为亲核加成反应,由于(R)-2有两个醛基,会与3形成单取代的席夫碱,所以产率不高,但是该反应产物易分离提纯,实验操作较简单。在(R)-4生成过程中,化合物3在427 nm (λ_3)处的强发射被猝灭,这可能是由于该化合物中双酚羟基氢与亚胺氮之间的分子内氢键作用,这表明化合物(R)-4可作为图1中所示的双单元 $[A + B]$ 传感器。同时,在 Zn^{2+} 存在下用氨基酸处理时,(R)-4的2-萘胺单元可被更碱性的脂肪胺取代恢复427 nm (λ_3)的发射,由此形成的新的亚胺-锌配合物在 $\lambda > 500\text{ nm}$ (λ_4)时应显示对映选择性荧光增强峰,可直接用于(R)-4 + Zn^{II} 对氨基酸的对映选择性荧光识别。

3.2 双响应荧光分子探针(R)-4的响应机制

Pu等人首先研究了在 Zn^{2+} 的存在下,(R)-4对反式-1,2-环己二胺(S,S)-5和(R,R)-5对映体的荧光响应^[19]。当(R)-4(在 $CH_3OH / 2\% CH_2Cl_2$ 中 $2.0 \times 10^{-5}\text{ mol} \cdot L^{-1}$)用 $Zn(OAc)_2$ ($4.0 \times 10^{-5}\text{ mol} \cdot L^{-1}$)处理时,由于 Zn^{2+} 与亚胺单元的相互作用,它在555 nm处发出一个微弱的发射信号。当用(S,S)-5 ($1.5 \times 10^{-2}\text{ mol} \cdot L^{-1}$)处理(R)-4 + $Zn(II)$ 溶液时,在 $\lambda_3 = 427\text{ nm}$ 和 $\lambda_4 = 525\text{ nm}$ 的双发射下观察到较大的荧光

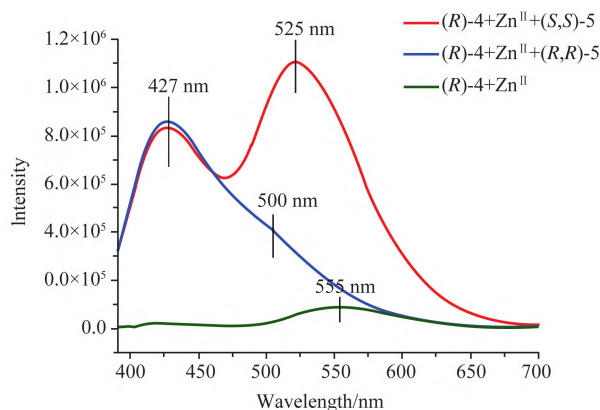


图3 在(S,S)-5和(R,R)-5存在的条件下, (R)-4 + Zn^{II} 的荧光光谱^[18]

增强。当使用对映体(*R,R*)-5与(*R*)-4相互作用时,在 $\lambda_3=427\text{ nm}$ 处观察到相同的荧光增强,但在 λ_4 处的荧光增强峰要小得多。因此,在 λ_3 处的发射与手性构型无关,而 λ_4 处的发射具有高度的对映选择性识别(图3),这样就得到了一种用于识别手性胺的双响应荧光传感器。

图4解释了观察到的双响应荧光识别的机制。(R)-4 + Zn(II) 配合物与手性胺的亚胺发生换位反应释放化合物3,以恢复其在 $\lambda_3=427\text{ nm}$ 处的发射,而且 Zn^{2+} 的存在并没有改变化合物3的荧光。与手性胺反应形成的新的BINOL-亚胺- Zn^{II} 配合物(*R*)-6在 $\lambda > 500\text{ nm}$ 处产生对映选择性发射,该发射与之前报道的在 Zn^{2+} 存在下直接使用(*R*)-2荧光识别的情况几乎一致,但是引入2-萘胺基后,可以产生双重响应荧光测试。

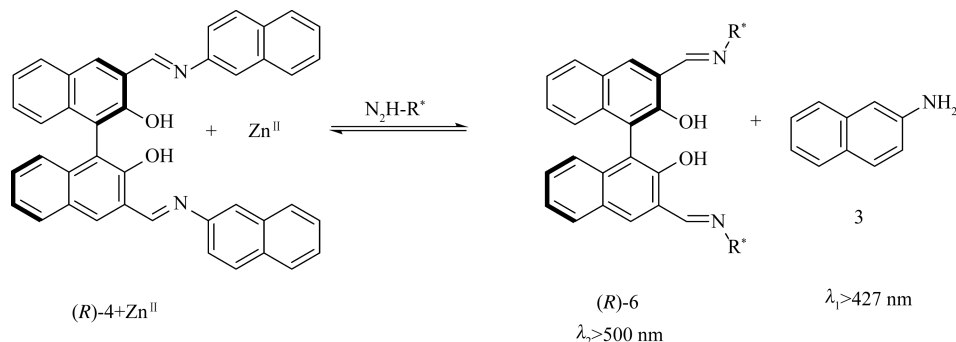


图4 (R)-4 + Zn^{II} 与手性胺的亚胺换位反应

在 Zn^{2+} 存在下,(R)-4还可以对手性氨基酸进行双荧光响应识别,这些氨基酸包括丙氨酸、谷氨酸、组氨酸、丝氨酸和苯丙氨酸。以(R)-4对苯丙氨酸的手性识别为例,如图5a, b所示,在(R)-4($2.0 \times 10^{-5}\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ /2 % CH_2Cl_2)的混合溶液中加入L-苯丙氨酸和四丁基铵后,在 $\lambda_1=427\text{ nm}$ 和 $\lambda_2=509\text{ nm}$ 下均产生荧光增强,但是短波长下荧光增强的幅度小于长波长荧光增强。图5c绘制了(R)-4 + Zn^{II} 在 $\lambda=427\text{ nm}$ 下对不同浓度的L-和D-苯丙氨酸的荧光强度 I_{427} 。结果表明,氨基酸的手性构型对 I_{427} 几乎没有影响,可用于检测氨基酸浓度。图5d绘制了 I_{509} 与L-和D-苯丙氨酸浓度的对比图,该图说明在波长为509 nm下,(R)-4对苯丙氨酸显示了优异的对映选择性识别效果。

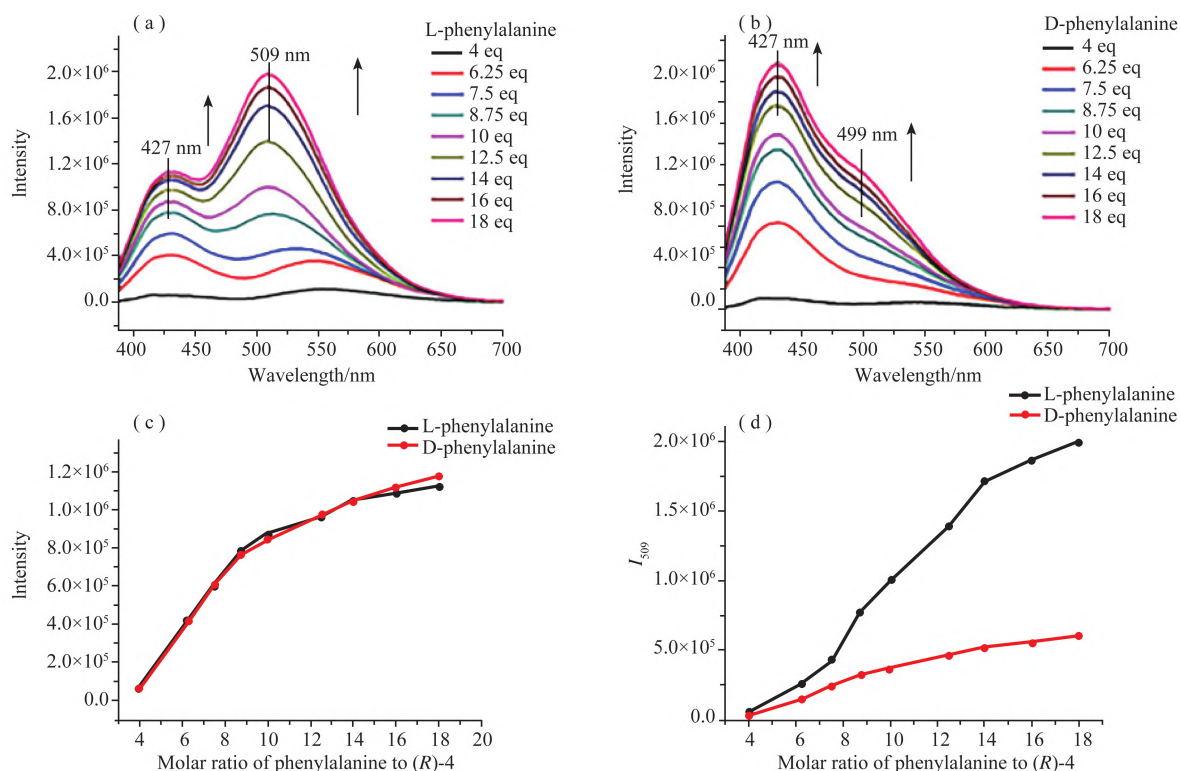


图5 (R)-4 + Zn^{II} 对(a)L-苯丙氨酸,(b)D-苯丙氨酸的荧光响应;(c) I_{427} ,(d) I_{509} 与D-和L-苯丙氨酸的浓度比率图^[19]

同时,该文章还研究了(R)-4($2.0 \times 10^{-5}\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 在 CH_3OH / 2 %二氯甲烷) + Zn^{II} (2当量)传感溶

液与苯丙氨酸和氢氧化四丁基铵在不同浓度和对映体组成下的荧光响应。考虑到仅氨基酸的浓度影响 I_{427} , 作者得到了 I_{427} 、 I_{509} 和 L -苯丙氨酸的三维图(图6), 其中 I_{509} 与底物的手性构型有很强的相关性。因此, 通过对映体组成的可以确定苯丙氨酸的不同对映体组成和浓度。因此, 三维图一次荧光测试同时得到氨基酸浓度和对映体组成。

4 双响应荧光分子探针(R)-9 研究进展

4.1 双响应荧光分子探针(R)-9 的设计与合成

由 BINOL 衍生的手性醛与 Zn^{2+} 结合, 对手性氨基酸具有对映选择性荧光增强^[24,25]。据报道, 一种非手性香豆素醛在氨基酸中不需要添加 Zn^{2+} 即可增强荧光, 但没有对映选择性^[26]。因此, Pu 课题组将 BINOL 的手性结构与香豆素醛结构^[27-29] 结合, 在没有 Zn^{2+} 的情况下对手性氨基酸进行对映选择性荧光识别。9 含有两个亲电位点, 分别可以与氨基酸的氨基进行 1,2-亲核加成^[14] 和 1,4-亲核加成^[30,31]。这两种反应途径产生不同的荧光。其中手性联二萘结构可以为亲核加成提供立体控制, 与联二萘基连接的吡啶基可为氨基酸提供额外的结合位点, 以增强手性偏倚。

将香豆素氯化物(8)^[32,33] 与(R)-联二萘酚和 2-溴甲基吡啶的氢溴酸盐(7)在乙腈中, K_2CO_3 的存在下混合反应, 回流, 制备得到(R)-9(图7)

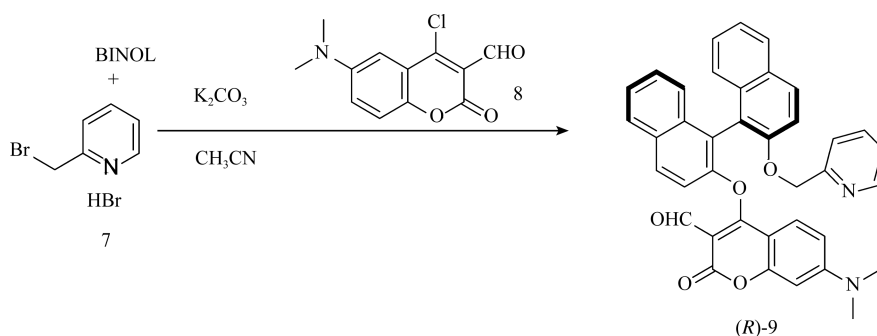


图7 双响应荧光分子探针(R)-9 的合成路线

4.2 双响应荧光分子探针(R)-9 的响应机制

以(R)-9 在 HEPES 缓冲溶液(pH=7.4)中对 D/L -缬氨酸的荧光响应为例(图8)。在 HEPES 溶液中, (R)-9 在 $\lambda_s = 365$ nm 处激发后在 $\lambda = 554$ nm 处显示出一个宽发射, 表明由于 $\lambda < 500$ nm 的发射减少, 联二萘单元对萘酚-香豆素偶联物的有效能量转移减少。当用缬氨酸(50.0 当量)处理, 在 365 nm 处激发时, 在 $\lambda = 465$ nm 处出现较大的荧光增强。结果发现, D -缬氨酸和 L -缬氨酸在这种激发下都引起了类似的荧光增强。长波长($\lambda = 554$ nm)的发射减少, 而短波长($\lambda = 465$ nm)的发射大大增强, 表明 1,4-加成会破坏萘酚单元与香豆素环的结合^[30,31]。

当(S)-9 的 HEPES 缓冲溶液在 $\lambda_s = 467$ nm 处被激发时, 在 $\lambda = 558$ nm 处出现了宽发射。结果表明, 该发射带在与缬氨酸反应时表现出高度的对映选择性响应。如图 9(a,b) 所示, L -Val 的加入增强了(S)-9 的荧光, 而 D -Val 的加入则导致了 558 nm 处的荧光猝灭, 而且在氨基酸存在的情况下, 发射峰最大值出现了轻微的蓝移。图 9(c) 比较了(S)-9 与 100 当量 D -Val 和 L -Val 反应后的荧光光谱, 得到了在 $\lambda =$

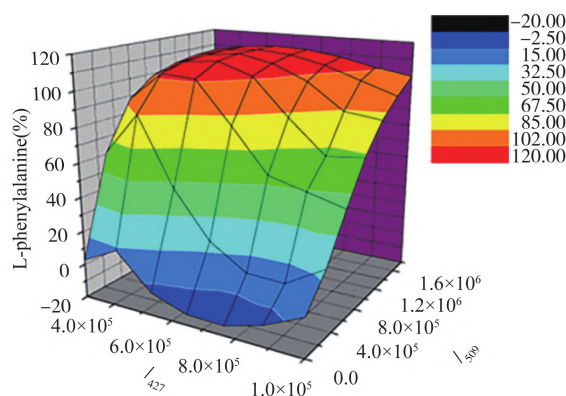


图6 (R)-4 + Zn^{2+} 对不同浓度和不同对映体组成的苯丙氨酸在 I_{427} 和 I_{527} 处的荧光响应^[19]。

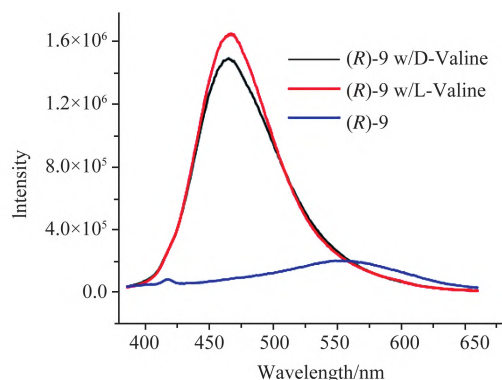


图8 (R)-9 与 D/L -Val 作用的荧光光谱图^[20]

534 nm时的荧光比 I_L/I_D 为 12.5。从图 9d 可以看出, I_L/I_D 所代表的对映选择性随着氨基酸浓度的增加而增加, 在氨基酸为 100 当量时达到最大值。具体反应过程是: (S)-9 (1.0 mmol/L 在 DMSO 中, 1.0 当量) 与 L-Val 和 D-Val (5.0~100.0 当量) 在 HEPES 缓冲液中反应 2 h, 然后用 HEPES 稀释至 $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。将得到的溶液放置 1 小时后, 观察并记录了相对稳定的荧光响应。这种增强的长波长发射 [$\lambda = 467$ (激发) / 534 (发射) nm] 与短波长的荧光响应 [$\lambda = 365$ (激发) / 465 (发射) nm] 对比表明, 这两种荧光响应于 (S)-9 与氨基酸的不同反应。也就是说, 在萘酚单位和香豆素环之间的结合保留过程中, 加入的氨基酸促进了在探针上的 1,2-加成反应形成了亚胺。

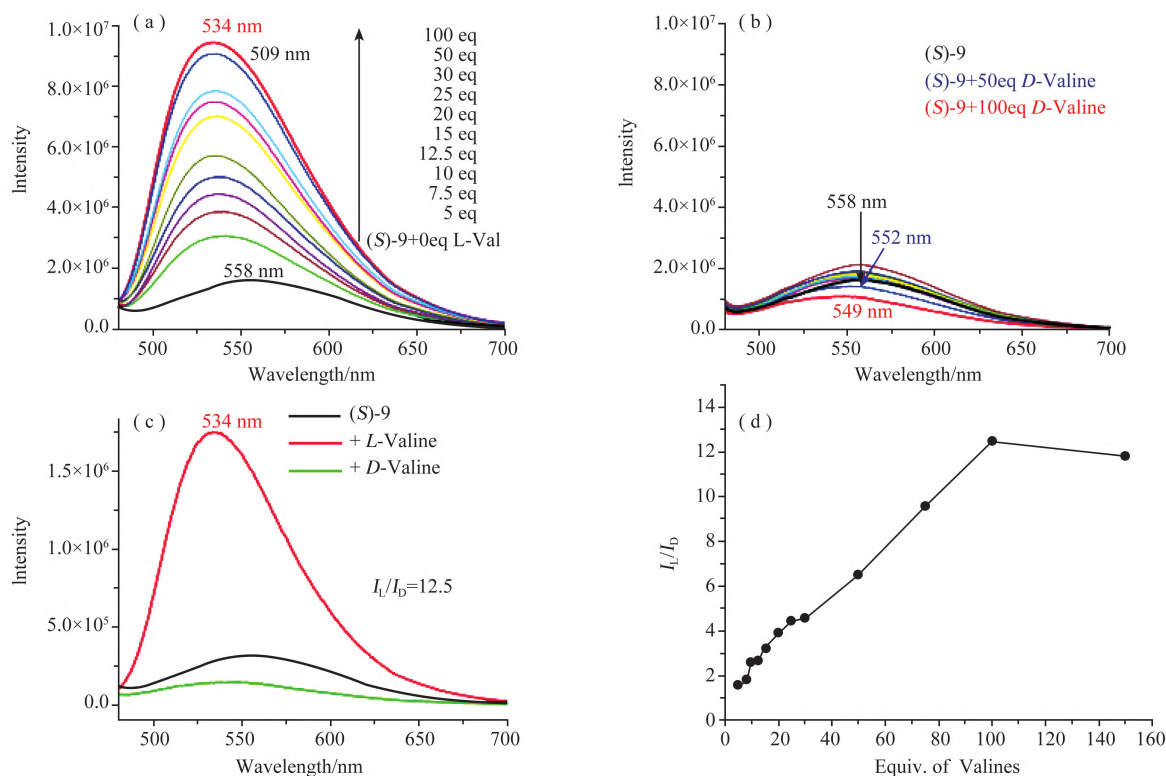


图 9 (S)-9 与(a)L-Val, (b)D-Val, (c)L-和 D-Val 及(d)534 nm 时的荧光强度比 I_L/I_D 与缬氨酸浓度的荧光谱图^[20]

图 10 研究了在不同对映体组成下 (S)-9 和 (R)-9 对缬氨酸的荧光响应。图中绘制了该对映体探针在 534 nm 处的荧光强度与缬氨酸的对映体过量值 $ee = ([L] - [D]) / ([L] + [D])$ 的关系, 结果显示了该对映体探针与对映体过量值间的镜像关系, 可用于确定氨基酸的对映体组成。

当激发波长为 365 nm 时, 氨基酸的两个对映体与探针作用; 然而, 当激发波长为 467 nm 时, 氨基酸的一个对映体增强了探针的荧光, 而另一个对映体则。因此, 对于该荧光探针, 当在 365 nm 处激发时可以测定氨基酸的浓度, 在 467 nm 处激发可以测定对映体的组成。

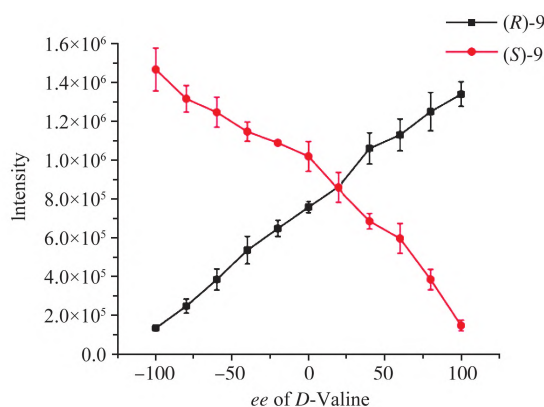


图 10 (R)-9 和 (S)-9 在 534 nm 处的荧光强度与缬氨酸对映体组成的对应关系^[20]

5 双响应荧光分子探(S)-12 研究进展

5.1 双响应荧光分子探针(S)-12 的设计与合成

此前, 研究发现当 BINOL 的二醛 (R)-2 与 Zn(II) 结合后通过胺-醛缩合反应, Zn(II) 离子配位和分子间结合, 产生了像配合物 13 这样的二聚体配合物产生了对映选择性荧光增强^[23]。针对这一过程, 作者提出了一种两步骤的荧光增强机制: (1) Zn(II) 与亚胺的配位限制了激发态 C=N 键的异构化; (2) 大环二聚体产物 13 的形成使结构僵化, 并限制了 BINOL 单元围绕其 1,1'-键的旋转^[22,32]。(R)-2 可以对几种氨基酸表现

出对映选择性的荧光识别,但它对特定的氨基酸底物却不能进行化学选择性识别。为了对组氨酸等特定氨基酸进行同时具有化学选择性和对映选择性的荧光识别,该文章对 BINOL-醛基探针的结构进行了系统的修饰(图 11)。

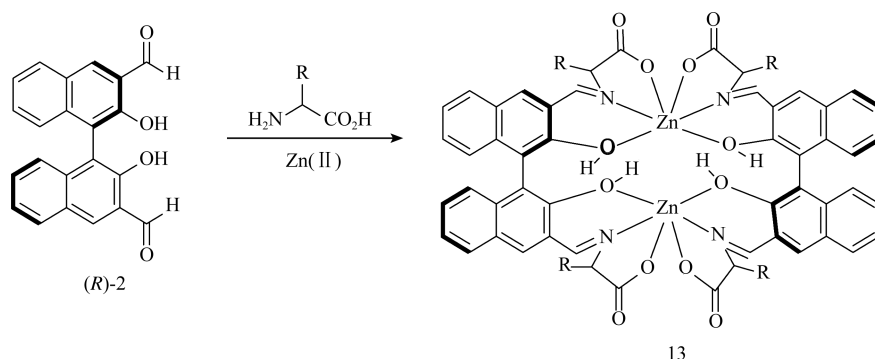


图 11 荧光探针(R)-2 与氨基酸和 Zn(II) 的反应

该文章设计制备了单醛探针(S)-12,用于在 Zn(II)存在下对组氨酸进行选择识别。当(S)-12 与组氨酸和 Zn^{2+} 反应后,可以产生一个像13 这样的六配位的 Zn(II)配合物14,以限制 BINOL 单元的旋转,从而增强荧光信号。同时因为组氨酸的 L-和 D-对映体会导致14 的稳定性或结构刚性不同,从而产生不同的对映体选择性响应。其他的氨基酸因为没有组氨酸的咪唑取代基不能产生类似配合物14 的结构,从而使得组氨酸可以被(S)-12 化学选择性地检测。因此,(S)-12 和 Zn(II)可以作为一种高化学选择性和高对映选择性识别组氨酸的荧光探针(图 12)。

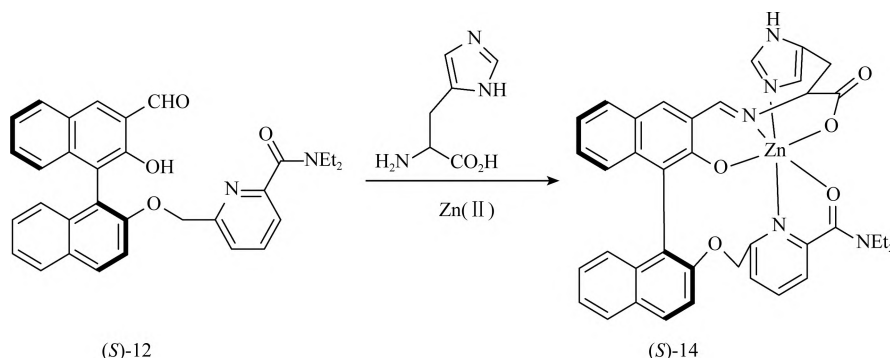


图 12 (S)-12 与组氨酸和 Zn(II)反应形成(S)-14 的反应。

探针(S)-12 是在 80 °C 碱存在条件下,由(S)-10^[25]与11^[35]反应先得到 MOM 保护的中间体,再用无水乙醚的氯化氢溶液去除该 MOM 保护基团得到的(图 13)

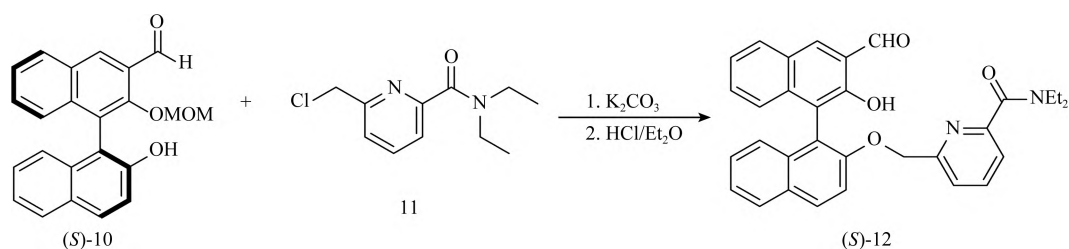


图 13 双响应荧光分子探针(S)-12 的合成路线

5.2 双响应荧光分子探针(S)-12 的响应机制

化合物(S)-12 在 378 nm 激发时在 470 nm 处显示发射峰[图 14(a)]。对于该发射峰,Zn(II)离子的加入对荧光强度没有显著影响。但是,当 D-或 L-组氨酸逐渐加入后均降低了(S)-12 + Zn(II)溶液在 $\lambda_7 = 470$ nm 处的荧光强度[图 14(a~d)]。也就是说,在这个波长下的荧光猝灭过程与氨基酸的手性结构无关,可用于检测不同组氨酸的浓度变化。

同时,当(S)-12 + Zn^{2+} 被组氨酸处理时,在 $\lambda_8 = 560$ nm ($\lambda_{\text{exc}} = 450$ nm)处出现了一个新的发射峰。如图 15 所示,加入 D-组氨酸后该波长下荧光急剧增强,但加入 L-组氨酸后荧光变化不大。因此,荧光探针

(S)-12 + Zn(II)在 λ_8 波长对组氨酸表现出较高的对映选择性识别。当加入 10 当量组氨酸后,对映选择性荧光增强比值[$ef = (I_D - I_0) / (I_L - I_0)$, I_0 :未加 D-和 L-组氨酸的的荧光强度]为 24.3[图 15(a)]。

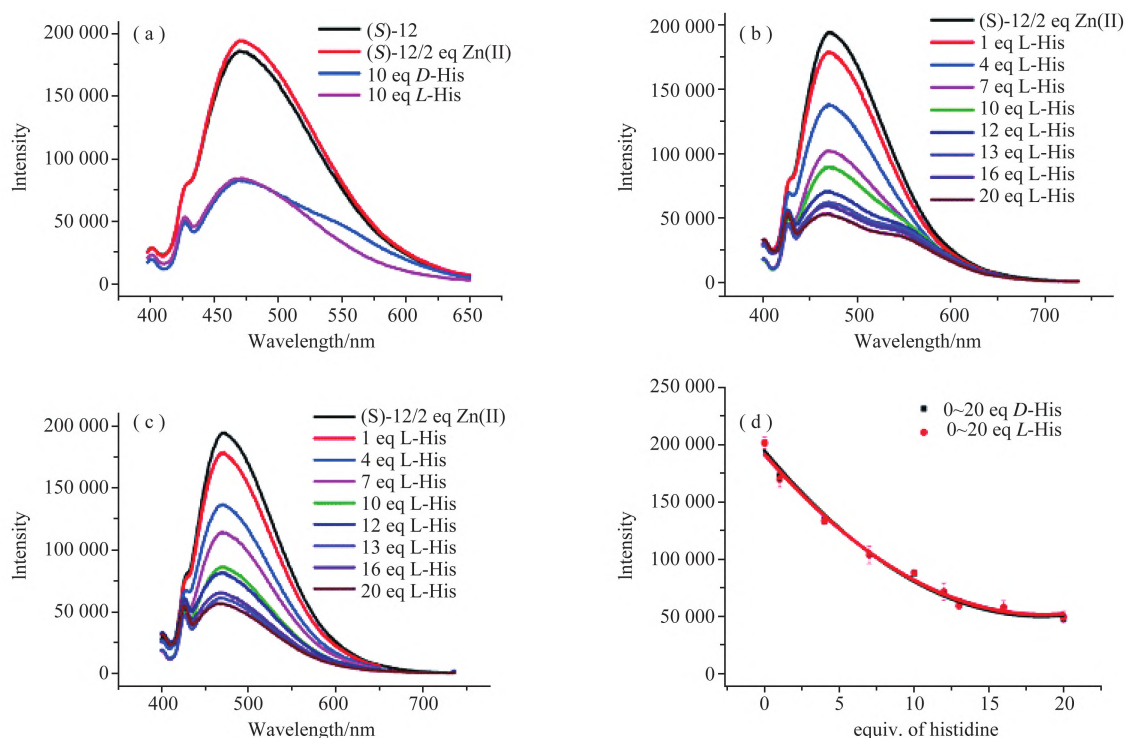


图 14 (S)-12 + Zn(OAc)₂ 与(a)D-和 L-组氨酸,(b)不同浓度的 D-组氨酸,(c)不同浓度的 L-组氨酸的荧光谱图,
(d)在 470 nm 处的荧光强度与逐渐加入的 D-和 L-组氨酸当量之比^[21]

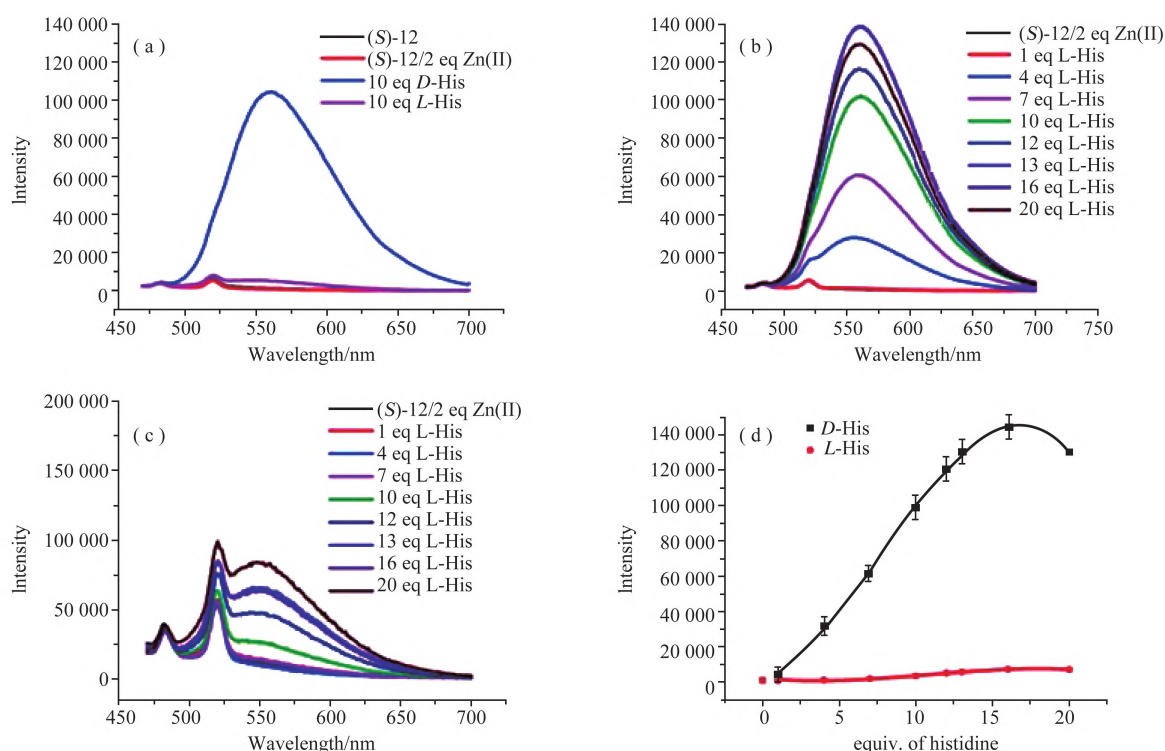


图 15 (S)-12 + Zn(OAc)₂ 与(a)D-和 L-组氨酸,(b)不同当量的 D-组氨酸,(c)不同当量的 L-组氨酸的荧光谱图,
(d)在 560 nm 处的荧光强度与 D-和 L-组氨酸的当量之比^[21]

当(S)-12 + Zn(II)对 17 对常见氨基酸(包括组氨酸)的进行荧光响应研究时,在相同的条件下,所有 17 个氨基酸都降低了探针在 $\lambda_7 = 470$ nm($\lambda_{exc} = 378$ nm)处的荧光强度,没有对映选择性响应。然而,在 $\lambda_8 = 560$ nm($\lambda_{exc} = 450$ nm)时,只有 L-组氨酸显示出显著荧光增强(图 16)。因此,该探针(S)-12 + Zn(II)对

组氨酸的荧光识别具有高度的化学选择性。



图 16 (S)-12 + Zn(OAc)₂ 对 17 种氨基酸的荧光响应^[21]

6 双响应荧光分子探针(S)-17 研究进展

6.1 双响应荧光分子探针(S)-17 的设计与合成

2022 年,研究报道了一种基于双 BINOL 的荧光传感器,它可以化学选择性地识别精氨酸(Arg),但它没有表现出良好的对映选择性识别效果。作者推测当加入一个活性更高的反应位点时,可以获得一种新的、更简化的荧光识别机制。作为候选基团,丙烯酸酯因在迈克尔加成反应中作为良好的亲电试剂,广泛应用于聚合物合成中^[37,38],因此其也可用作荧光识别基团。

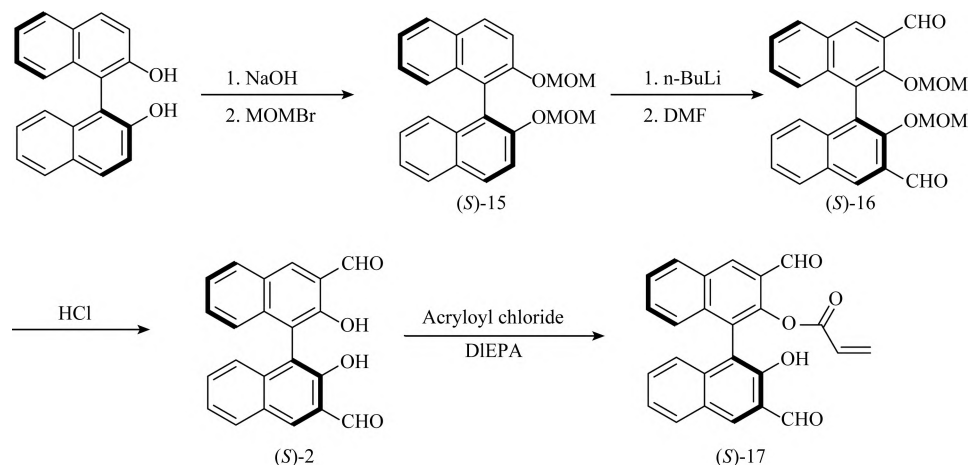


图 17 双响应荧光分子探针(S)-17 的合成路线

图 17 提出了一种基于 BINOL 的荧光探针(S)-17 的高效合成方法。该方法为先在氢化钠存在的情况下,用过量的 MOMBr 处理(S)-BINOL,得到了双 MOM 保护的 BINOL(S)-15。随后用过量的正丁基锂脱质子化和 DMF 甲酰化,得到中间体(S)-16。后在酸性条件下去除 MOM 保护基团,得到(S)-2,最后在弱有机碱二异丙基乙胺的存在下,(S)-2 与丙烯酰氯反应,在 BINOL 环的一侧得到一个丙烯酸酯,反应产率为 39%。

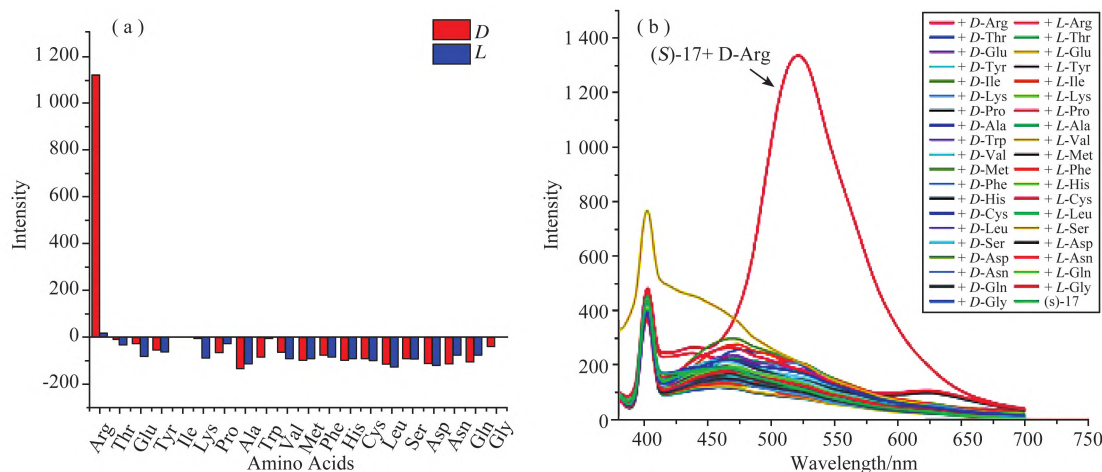


图 18 (S)-17 对 20 种氨基酸对映体的荧光响应^[21]

6.2 双响应荧光分子探针(S)-17 的响应机制

在图 18 中,发射波长为 525 nm 时,(S)-17 与大多数常见氨基酸的 *D*-或 *L*-对映体作用时,只产生了非常小的荧光增强。然而,*D*-Arg 在 $\lambda=525$ nm 处的荧光却显著增强,其强度比 *L*-Arg 高出 528%。对映体选择性比值为 487。除此之外,(S)-17 还具有化学选择性,其对 *D*-Arg 的荧光响应远远高于其他任何一种氨基酸。因此,(S)-17 仅对 Arg 不仅有对映选择性识别还有化学选择性识别。

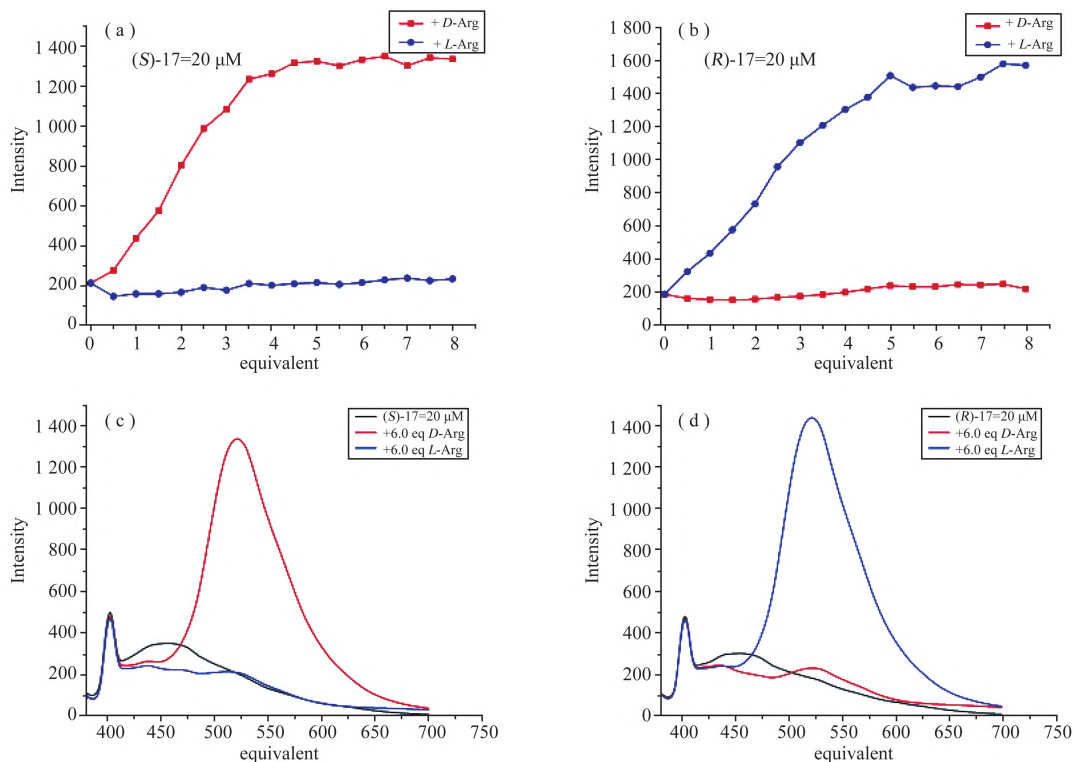


图 19 传感器的手性导致对精氨酸对映体的不同荧光响应^[22]

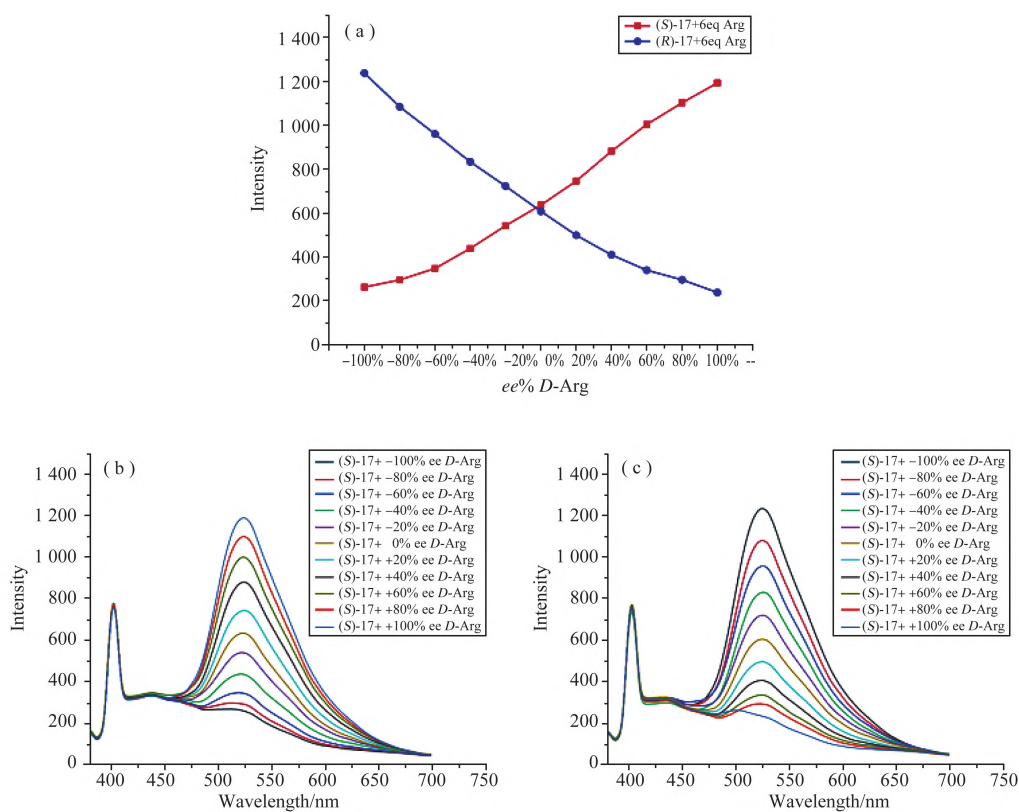


图 20 手性传感器对精氨酸对映体的对映选择性荧光增强图^[22]

当用已知浓度的(S)-17 溶液测定其对 *L*-和 *D*-Arg 的响应,如图 19(a)所示,荧光强度随着 Arg 浓度的增加而增加,当加入到 5 当量 *D*-Arg,此时荧光增强峰值达到饱和。在对映体 0~5 当量范围内,线性回归系数 $R^2 > 0.99$ 。因此,确定 *D*-Arg 的检测限(LOD)为 50 nmol/L($LOD = 3 \times SD/k$,其中 SD 为空白标准偏差, k 为校准曲线的斜率)。在相同的条件下使用(*R*)-17 进行类似的实验,如图 19(b)和图 19(d)所示,与 *L*-Arg 作用时下荧光显著增强。这证实了所观察到的对精氨酸对映体的差异荧光响应来源于手性识别过程。

同时,如图 20 所示,还研究了精氨酸溶液在不同对映体过量值情况下的荧光响应($ee = [D-L]/[D+L]$)。不同对映体过量值下的(*S*)-17 和(*R*)-17 的荧光响应呈现出近似镜像的关系。因此,与图 19 中所示的结果一致,不同 ee 的荧光响应研究进一步证实了所观察到的对映体选择性识别来源于手性匹配关系。

令人惊奇的是该 Arg 的对映选择性识别可以通过肉眼来区分。当加入 *D*-Arg 后,探针溶液呈现深棕色(图 21),而 *L*-Arg 的加入使溶液变为浅棕色,其他氨基酸都没有显著地颜色变化。这一现象表明,探针(*S*)-17 与 Arg 的反应机理是完全不同的。

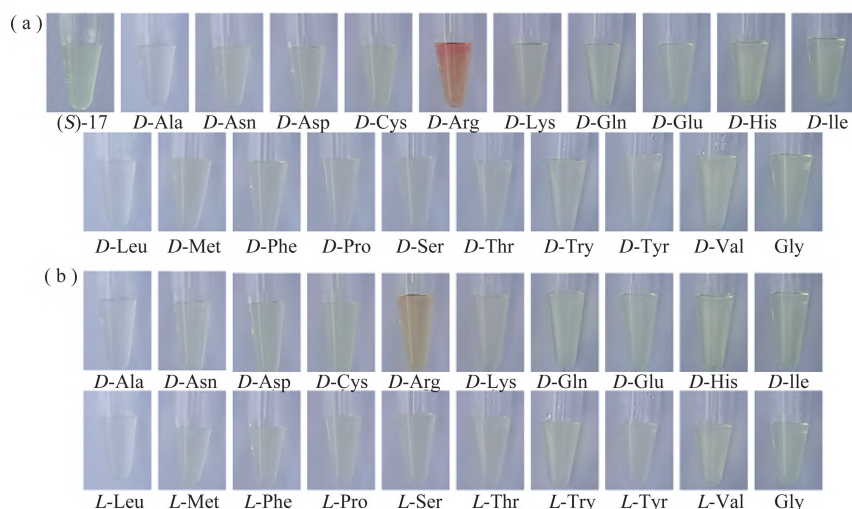


图 21 (*S*)-17 的比色检测实验^[22]

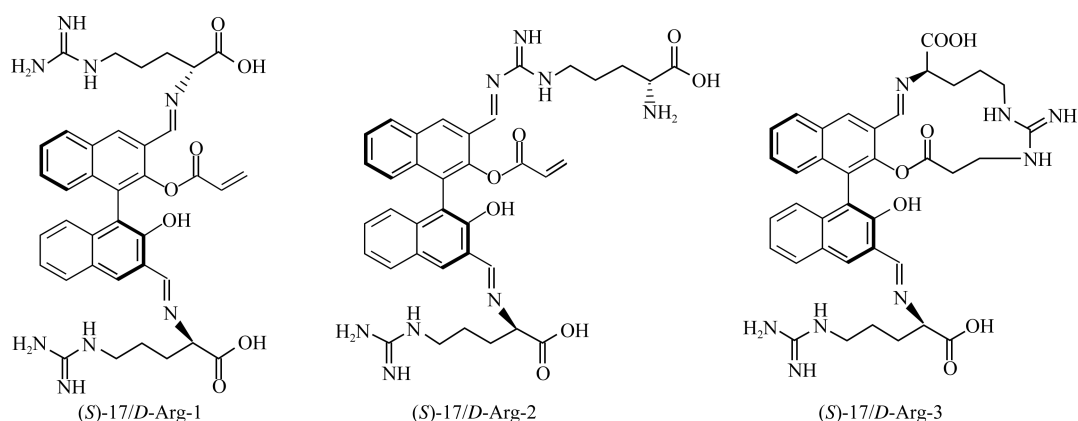


图 21 传感反应可能的产物^[22]

认为形成了图 21 所示的产物,并通过量化计算研究了其发光机制,认为是传感反应产物中的分子内电子转移(ICT)导致了荧光增强现象。

7 结论与展望

(*R*)-4 的设计合成及手性荧光识别应用证实了对映选择性荧光传感器可以作为双响应荧光传感器,同时确定手性底物的浓度和对映体组成,极大地促进手性氨基酸化合物的快速测定。该探针的设计原理逐渐成为开发双响应荧光传感器的一种通用策略。该策略为:化合物(*R*)-4 在 Zn^{2+} 存在下识别手性功能胺,如二胺、氨基醇和氨基酸时,(*R*)-4 中的 2-萘胺单元可以与各种手性胺底物进行换位反应,从而呈现两个波长的荧光增强效应,一个波长可用于底物浓度识别,另一个波长用于底物对映体选择性识别。因此,在这两个发射波长上的荧光响应的一次测量可以测定浓度和对映体组成。

表 2 四类不同探针分子应用特点总结

荧光分子探针	响应机制	适用条件	对氨基酸识别应用范围	优点	缺点
(R)-4	(R)-4 中的 2-萘胺单元可以与各种手性胺底物进行换位反应从而呈现两个波长的荧光增强效应,一个波长可用于底物浓度识别,以一个波长用于底物对映体选择性识别	① 在 Zn^{2+} 存在的条件下进行识别;② 在甲醇/二氯甲烷溶液中检测	双响应检测苯丙氨酸、丙氨酸、谷氨酸、组氨酸和丝氨酸	① 可双响应检测手性二胺、氨基醇和氨基酸;② 两个反应底物两个波长,相互影响小	① 可以对 5 种氨基酸产生双重荧光响应,但部分选择性效果差;② 水溶性差,与氨基酸反应产生的中间体在水溶液中不稳定,主要在有机溶剂中进行测量;③ 需要在 Zn^{2+} 存在的条件下进行测试
(R)-9	荧光探针(R)-9 的双波长识别机制为与氨基酸的氨基亲核加成反应通过 1,4-加成和 1,2-亲核加成两种不同的途径产生不同的中间体和产物,从而产生双重荧光识别	在 HEPES 缓冲溶液/二甲基亚砜($pH = 7.4$)溶液中检测	能双响应识别 11 种氨基酸(丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、丝氨酸、苏氨酸、蛋氨酸、天门冬氨酸、天门冬酰胺、谷氨酸、谷氨酰胺)	① 不需要添加金属离子;② 该探针识别氨基酸主要在水溶液中	化学选择性差
(S)-12	(S)-12 可与组氨酸, Zn^{2+} 反应形成了一个六配位的 $Zn(II)$ 配合物,因组氨酸的 <i>L</i> -和 <i>D</i> -对映体导致配合物的稳定性和/或结构刚性不同,从而给出对映体选择性响应。同时,因为反应过程不断消耗探针(S)-12,从而可对氨基酸浓度进行响应。	① 在 Zn^{2+} 存在条件下;② 在 <i>N</i> , <i>N</i> -二甲基甲酰胺/1% pH 6.35 磷酸缓冲溶液检测	仅对 17 种常见氨基酸中组氨酸有双响应识别	该荧光分子探针仅对 17 种常见氨基酸组氨酸有较高的对映选择性识别,化学选择性好	① 水溶性差,与氨基酸反应产生的中间体在水溶液中不稳定,主要在有机溶剂中进行测量;② 需要在 Zn^{2+} 存在的条件下进行测试
(S)-17	当(S)-17 可与精氨酸进行 Michael 加成形成环状化合物,虽然未反应完全,但经历了强烈的分子内电荷转移发出强烈的荧光,从而可以同时检测精氨酸浓度和对映体组成	在二甲基亚砜(含 1.25% 二氯甲烷和 1.25% 水)溶液中进行检测	仅对 20 种常见氨基酸中 <i>D</i> -精氨酸具有高的双响应识别	化学选择性好,无金属离子添加,快速响应和比色检测等	实验介质主要局限在有机溶剂中,水溶液中亚胺产物不稳定

但该传感器的应用也存在一些问题,该传感器可以对种氨基酸产生双重荧光响应,化学选择性效果差。而且其与苯丙氨酸相互作用时,对映选择性比值 ef 高达 13,但对其他氨基酸的对映选择性比值要低得多($ef=1\sim 4$),针对这一现象的机理解释有待进一步研究。此外,由于该探针水溶性差,且与氨基酸形成的席夫碱配合物在水溶液中不稳定,测量主要在甲醇溶液中进行,不利于后期生物应用研究。荧光探针(R)-9 的双波长识别机制为与氨基酸的氨基亲核反应通过两种途径进行,一种是通过 1,4-加成反应脱掉香豆素单元 8,8 再与氨基酸反应;另一种是与氨基酸的氨基进行 1,2-亲核加成反应形成亚胺。两种不同的途径产生不同的中间体和产物,从而产生不同的荧光。与之前报道的基于 BINOL 的氨基酸荧光探针需要添加 Zn^{2+} 配位产生对映选择性荧光增强相比,该探针不需要添加金属阳离子,而且该探针识别氨基酸主要在水溶液中进行,这使得它更便于实际应用。对于探针(S)-12,其与组氨酸和 Zn^{2+} 反应,形成了一个六配位的 $Zn(II)$ 配合物,限制了 BINOL 单元的旋转,从而显示荧光增强。同时因组氨酸的 *L*-和 *D*-对映体可能导致 14 的稳定性和/或结构刚性不同,从而给出对映体选择性响应。该荧光分子探针仅对组氨酸有较高的对映选择性识别,对其他 *D*-和 *L*-氨基酸均没有荧光响应,原因是其他氨基酸没有组氨酸的咪唑取代基不能产生配合物 14 这样的结构,使得仅组氨酸可以被(S)-12 选择性地检测到。但是探针(S)-12 对组氨酸的检测是在 DMF 溶剂中进行的,这导致在生物细胞领域当中的应用受到限制。探针(S)-17 具有多个反应位点,可以特异性识别常见 20 种氨基酸中的精氨酸,具有化学选择性识别;同时其对精氨酸的对映选择性识别效果也很好, ef 值

可达到 487。该荧光探针对手性精氨酸的特异性识别来源于探针结构引入的丙烯酸酯基团,该基团产生了一个额外的反应位点,只与某种精氨酸对映体形成环状化合物。量化计算研究支持了这样的假设,因形成的迈克尔加成产物,具有强烈的分子内电子转移,从而发出强烈的荧光,产生了化学选择性和对映选择性识别。与其他用于检测手性氨基酸的荧光探针相比,该探针具有特异性检测精氨酸,无金属离子添加,快速响应和比色检测等优点。

目前,很多仪器识别方法发展起来用于识别氨基酸的对映异构体,这些光学纯度分析方法有 CD^[39]、HPLC^[40]和电化学方法^[41]等,但是这些分析方法需要较高的仪器成本,精密和仔细的操作,费时费力,无法适用于痕量氨基酸分析,特别是对一些先导药物筛选及细胞内涉及手性物质代谢的原位分析等方面难以达到预期效果。而通过对细胞代谢的一些重要产物或中间体氨基酸进行细胞内原位分析,可阐明此类化合物的代谢过程,手性药物的作用机制等。在诸多对手性氨基酸的检测方法中,荧光检测借助其高灵敏度、高选择性、响应时间短、可原位检测、多种检测模式、高吞吐量分析潜能和无创性实时成像等优点在手性识别分析中备受关注。特别是用单一-荧光探针双波长同时测定手性底物浓度和对映体组成,可以极大地促进手性化合物的快速分析。因此对近几年所发表的在手性识别氨基酸方面的双响应荧光传感器进行总结整理,窥一斑而知全豹,以此为起点,知晓这一测定思路,可以指导并开发其他类手性双响应荧光传感器。同时,该领域仍有一些问题存在,需要在未来加以解决。第一,由于特定氨基酸的结构相似,对其单个对映体的特异性检测仍然是一个巨大的挑战。第二,荧光分子探针对氨基酸检测由于金属的加入以及反应条件的影响,在细胞领域应用受限。第三,荧光分子探针识别氨基酸,为什么对某一种氨基酸存在荧光响应,而对其他结构相似的氨基酸没有荧光响应或荧光响应较弱,其中的机制仍需进一步研究。相信在未来的诸多学者的不懈努力下,一定会有更多简单而又高效的双响应传感器产生,并在生物细胞领域得到广泛的应用。

参 考 文 献

- [1] LI P, YIN Y L, LI D F, et al. Amino acids and immune function[J]. British Journal of Nutrition, 2007, 98(2): 237-252.
- [2] HU M, FENG H T, YUAN Y X, et al. Chiral AIEgens-chiral recognition, CPL materials and other chiral applications[J]. Coordination Chemistry Reviews, 2020, 416: 213329.
- [3] CAVA F, LAM H, DE PEDRO M A, et al. Emerging knowledge of regulatory roles of D-amino acids in bacteria[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2011, 68(5): 817-831.
- [4] WEATHERLY C A, DU S Q, PARPIA C, et al. D-amino acid levels in perfused mouse brain tissue and blood: a comparative study[J]. ACS Chemical Neuroscience, 2017, 8(6): 1251-1261.
- [5] KIRIYAMA Y, NOCHI H. D-amino acids in the nervous and endocrine systems[J]. Scientifica, 2016, 2016: 6494621.
- [6] PU L. Enantioselective fluorescent recognition of free amino acids: challenges and opportunities[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2020, 59(49): 21814-21828.
- [7] RUTHERFORD S M, GILANI G S. Amino acid analysis[J]. Current Protocols in Protein Science, 2009, 58(1): 11.9.1-11.9.37.
- [8] PAGLIARI S, CORRADINI R, GALAVERNA G, et al. Enantioselective fluorescence sensing of amino acids by modified cyclodextrins: role of the cavity and sensing mechanism[J]. Chemistry-A European Journal, 2004, 10(11): 2749-2758.
- [9] CORRADINI R, PAGANUZZI C, MARCHELLI R, et al. Fast parallel enantiomeric analysis of unmodified amino acids by sensing with fluorescent β -cyclodextrins[J]. Journal of Materials Chemistry, 2005, 15(27-28): 2741-2746.
- [10] WANG H, CHAN W H, LEE A W M. Cholic acid-based fluorescent probes for enantioselective recognition of trifunctional amino acids [J]. Organic & Biomolecular Chemistry, 2008, 6(5): 929-934.
- [11] KWONG H L, WONG W L, LEE C S, et al. Zinc(II) complex of terpyridine-crown macrocycle: a new motif in fluorescence sensing of zwitterionic amino acids[J]. Inorganic Chemistry Communications, 2009, 12(9): 815-818.
- [12] YANG X, LIU X C, SHEN K, et al. A chiral perazamacrocyclic fluorescent sensor for cascade recognition of Cu(II) and the unmodified α -amino acids in protic solutions[J]. Organic Letters, 2011, 13(13): 3510-3513.
- [13] SONG L, WANG S F, KOTOV N A, et al. Nonexclusive fluorescent sensing for L/D enantiomers enabled by dynamic nanoparticle-nanorod assemblies[J]. Analytical chemistry, 2012, 84(17): 7330-7335.
- [14] LI F, LI L, YANG W, et al. Chiral Ar-BINMOL-derived salan as fluorescent sensor for recognition of CuCl and cascade discrimination of α -amino acids[J]. Tetrahedron Letters, 2013, 54(12): 1584-1588.
- [15] FENG H T, ZHANG X, ZHENG Y S. Fluorescence turn-on enantioselective recognition of both chiral acidic compounds and α -amino acids by a chiral tetraphenylethylene macrocycle amine[J]. The Journal of Organic Chemistry, 2015, 80(16): 8096-8101.
- [16] ASWATHY B, SONY G. Fluorescence turn-on recognition of chiral amino acids using dye incorporated β -CD functionalized AuNPs as-

- sembly[J]. Journal of Luminescence, 2014, 154: 541-548.
- [17] ZENG C, ZHANG X L, PU L. Enantioselective fluorescent imaging of free amino acids in living cells[J]. Chemistry-A European Journal, 2017, 23(10): 2432-2438.
- [18] PU L. Chemoselective and enantioselective fluorescent identification of specific amino acid enantiomers[J]. Chemical Communications, 2022, 58(58): 8038-8048.
- [19] WEN K L, YU S S, HUANG Z, et al. Rational design of a fluorescent sensor to simultaneously determine both the enantiomeric composition and the concentration of chiral functional amines[J]. Journal of the American Chemical Society, 2015, 137(13): 4517-4524.
- [20] WANG Q, WU X D, PU L. Excitation of one fluorescent probe at two different wavelengths to determine the concentration and enantiomeric composition of amino acids[J]. Organic Letters, 2019, 21(22): 9036-9039.
- [21] MAO Y F, ABED M A, LEE N B, et al. Determining the concentration and enantiomeric composition of histidine using one fluorescent probe[J]. Chemical Communications, 2021, 57(5): 587-590.
- [22] YU X Z, ZHANG B J, FAN C L, et al. Rapid, enantioselective and colorimetric detection of *D*-arginine[J]. Iscience, 2022, 25(9): 104964.
- [23] YU S S, PLUNKETT W, KIM M, et al. Simultaneous determination of both the enantiomeric composition and concentration of a chiral substrate with one fluorescent sensor[J]. Journal of the American Chemical Society, 2012, 134(50): 20282-20285.
- [24] WU D, SEDGWICK A C, GUNNLAUGSSON T, et al. Fluorescent chemosensors: the past, present and future[J]. Chemical Society Reviews, 2017, 46(23): 7105-7123.
- [25] ZHU Y Y, WU X D, GU S X, et al. Free amino acid recognition: a bisbinaphthyl-based fluorescent probe with high enantioselectivity[J]. Journal of the American Chemical Society, 2019, 141(1): 175-181.
- [26] FEUSTER E K, GLASS T E. Detection of amines and unprotected amino acids in aqueous conditions by formation of highly fluorescent iminium ions[J]. Journal of the American Chemical Society, 2003, 125(52): 16174-16175.
- [27] JIAO J M, LIU X H, MAO X R, et al. A coumarin-based chiral fluorescence sensor for the highly enantioselective recognition of phenylalaninol[J]. New Journal of Chemistry, 2013, 37(2): 317-322.
- [28] YUE Y K, HUO F J, NING P, et al. Dual-site fluorescent probe for visualizing the metabolism of Cys in living cells[J]. Journal of the American Chemical Society, 2017, 139(8): 3181-3185.
- [29] CAO D X, LIU Z Q, VERWILT P, et al. Coumarin-based small-molecule fluorescent chemosensors[J]. Chemical Reviews, 2019, 119(18): 10403-10519.
- [30] WU X D, WANG Q, DICKIE D, et al. Mechanistic study on a BINOL-coumarin-based probe for enantioselective fluorescent recognition of amino acids[J]. The Journal of Organic Chemistry, 2020, 85(10): 6352-6358.
- [31] KIM Y, MULAY S V, CHOI M, et al. Exceptional time response, stability and selectivity in doubly-activated phenyl selenium-based glutathione-selective platform[J]. Chemical Science, 2015, 6(10): 5435-5439.
- [32] LIU J, SUN Y Q, HUO Y Y, et al. Simultaneous fluorescence sensing of Cys and GSH from different emission channels[J]. Journal of the American Chemical Society, 2014, 136(2): 574-577.
- [33] ZHANG P P, LIU W M, NIU G L, et al. Coumarin-based boron complexes with aggregation-induced emission[J]. The Journal of Organic Chemistry, 2017, 82(7): 3456-3462.
- [34] SONG T, CAO Y, ZHAO G, et al. Fluorescent recognition of Zn^{2+} by two diastereomeric salicylaldehydes: dramatically different responses and spectroscopic investigation[J]. Inorganic Chemistry, 2017, 56(8): 4395-4399.
- [35] BRAVARD F, BRETONNIERE Y, WIETZKE R, et al. Solid-state and solution properties of cationic lanthanide complexes of a new neutral heptadentate N_4O_3 tripodal ligand[J]. Inorganic chemistry, 2003, 42(24): 7978-7989.
- [36] YU X Z, ZHANG B J, LIAO P, et al. A chemoselective fluorescent probe for arginine in aqueous phase[J]. Dyes and Pigments, 2022, 203: 110339.
- [37] DE K, LEGROS J, CROUSSE B, et al. Solvent-promoted and-controlled aza-Michael reaction with aromatic amines[J]. The Journal of Organic Chemistry, 2009, 74(16): 6260-6265.
- [38] FARLEY A J M, SANDFORD C, DIXON D J. Bifunctional iminophosphorane catalyzed enantioselective sulfa-Michael addition to unactivated α -substituted acrylate esters[J]. Journal of the American Chemical Society, 2015, 137(51): 15992-15995.
- [39] LEE C S, TENG P F, WONG W L, et al. New C_2 -symmetric 2,2'-bipyridine crown macrocycles for enantioselective recognition of amino acid derivatives[J]. Tetrahedron, 2005, 61(33): 7924-7930.
- [40] WANG J, CHATRATHI M P, TIAN B M. Micromachined separation chips with a precolumn reactor and end-column electrochemical detector[J]. Analytical chemistry, 2000, 72(23): 5774-5778.
- [41] VARDANEGA D, GIRARDET C. Nonlinear polarization effects in superchiral nanotube sensors of amino acids[J]. Chemical Physics Letters, 2009, 469(1-3): 172-176.

(责任编辑:刘庆松)