

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680045462.9

[51] Int. Cl.

*C07D 493/10 (2006.01)*

*C07D 403/06 (2006.01)*

*C07F 5/02 (2006.01)*

*C07C 49/213 (2006.01)*

*G01N 31/22 (2006.01)*

[43] 公开日 2008 年 12 月 10 日

[11] 公开号 CN 101321767A

[22] 申请日 2006.8.25

[21] 申请号 200680045462.9

[30] 优先权

[32] 2005.10.7 [33] US [31] 11/245,529

[86] 国际申请 PCT/CN2006/002177 2006.8.25

[87] 国际公布 WO2007/041923 英 2007.4.19

[85] 进入国家阶段日期 2008.6.3

[71] 申请人 香港大学

地址 中国香港薄扶林道

[72] 发明人 D·扬 H·王 Z·孙 J·沈

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司  
代理人 曹雯 李连涛

权利要求书 6 页 说明书 26 页 附图 24 页

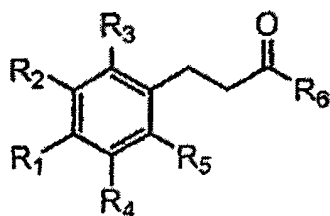
[54] 发明名称

用于高度专一性检测过亚硝酸根的试剂

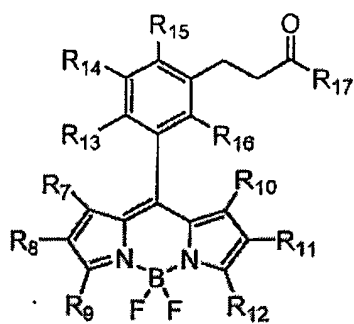
[57] 摘要

本发明提供了能与过亚硝酸根发生专一性反应，而不与其他的活性氧中间体和活性氮中间体反应的组合物。本发明还提供了用于测定过亚硝酸根的相关试剂。本发明还提供了利用这样的组合物和试剂测定样品中过亚硝酸根的相关方法、检测过亚硝酸根的高通量筛选荧光法和筛选化合物的高通量方法，所述化合物能增加或减少过亚硝酸根的产生。

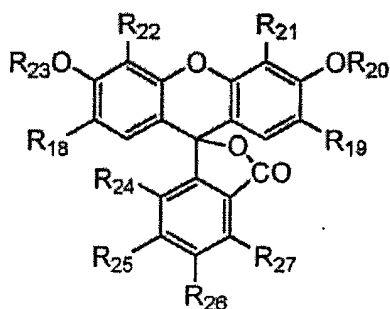
1. 一种组合物，其组合物与过亚硝酸根发生专一性反应，而不与其它的活性氧中间体和活性氮中间体反应，所述组合物包含以下通式 (I)、(II)、(III) 表示的化合物或其盐：



(I)



30 (II)



(III)

其中：

$R_1$  为  $OR_1'$  或  $NR_2'R_3'$ ，其中  $R_1'$ 、 $R_2'$  和  $R_3'$  独立地为氢或选自烷基、烯基、炔基、烷氧基烷基、烷酰基、烯酰基、炔酰基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、烷芳基、芳烷基、芳酰基或聚醚的基团；

$R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$  和  $R_5$  独立地为氢或选自卤素、烷基、烷氧基、聚醚的基团； $R_2$  和  $R_3$  共同形成 5、6 或 7 元环，其选自芳基、杂环、杂芳基或杂芳环；或者  $R_4$  和  $R_5$  共同形成 5、6 或 7 元环，其选自芳基、杂环、杂芳基或杂芳环；

$R_6$  是吸电子基团，选自  $CF_3$ 、卤原子取代的低级烷基或  $(C=O)-O-W_1$ ，其中  $W_1$  是选自烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、烷芳基或芳烷基的基团；

荧光团可与  $R_i$  ( $i=1\sim 5$ ) 之一共价键合；

$R_7$  和  $R_{10}$  独立地为氢或选自卤素、低级烷基、低级烯基、卤代烷基、CN 或  $NO_2$  的基团；

$R_8$ 、 $R_9$ 、 $R_{11}$  和  $R_{12}$  独立地为氢、卤素、烷基、卤代烷基、烯基，或为选自酮基、醛、羧酸根、羧酸酯、烷基氨基、羟基、烷氧基、烷氧基烷基、聚醚、硫醇、烷基硫代、氰基、硝基的基团，或者具有  $(C=O)-Y$  或  $(C=O)-X-Y$  的形式，其中  $X$  是低级烷基或烯基链， $Y$  是氢或选自烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、烷芳基、芳烷基、酮基、醛、羧酸根、羧酸酯、氨基甲酸酯、酰胺、氨基、烷基氨基、羟基、烷氧基、聚醚、硫醇、烷基硫代、氰基、硝基、磺酰基、无机酯的基团，或者为 5~7 元杂环，其中环原子选自碳、氮、氧和硫，其中环原子包括 3~6 个碳原子以及不超过 2 个的杂原子；

$R_{13}$  是  $OR_4'$  或  $NR_5'R_6'$ ，其中  $R_4'$ 、 $R_5'$  和  $R_6'$  独立地为氢或选自烷基、烯基、炔基、烷氧基烷基、烷酰基、烯酰基、炔酰基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、烷芳基、芳烷基、芳酰基或聚醚的基团；

$R_{14}$  和  $R_{15}$  独立地为氢、卤素、烷基、烷氧基、聚醚；或者  $R_{14}$  和  $R_{15}$  共同形成 5、6 或 7 元环，其选自芳基、杂环、杂芳基或杂芳环；

$R_{16}$  是氢、烷基、烷氧基或聚醚；

$R_{17}$  是吸电子基团，其选自  $CF_3$ 、卤素取代的低级烷基或  $(C=O)-O-W_2$ ，其中  $W_2$  是选自烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、烷芳基或芳烷基的基团；

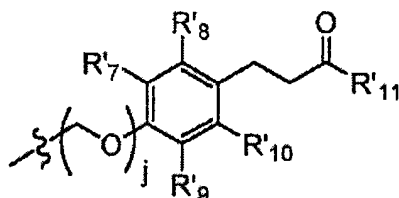
$R_{18}$  和  $R_{19}$  独立地为氢、卤素、烷基或烷氧基；

$R_{20}$  是氢或选自烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、烷芳基、芳烷基、羧基烷基、羧酸酯或氨基烷基的基团；

$R_{21}$  和  $R_{22}$  独立地为氢或选自烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、

芳基、烷芳基、芳烷基、酮基、羧基烷基、羧酸根、羧酸酯、氨基甲酸酯、酰胺、氨基、烷基氨基、聚醚、烷基硫代、氰基、硝基、磺酰基或无机酯的基团；以及

$R_{23}$  选自下式所示基团：



其中：

$j=0$  或  $1$ ；

$R_7'$ 、 $R_8'$ 、 $R_9'$ 和  $R_{10}'$ 独立地为氢或选自卤素、烷基、烷氧基、烷基氧基、聚醚的基团； $R_7'$ 和  $R_8'$ 共同形成 5、6 或 7 元环，其选自芳基、杂环、杂芳基或杂芳环；或者  $R_9'$ 和  $R_{10}'$ 共同形成 5、6 或 7 元环，其选自芳基、杂环、杂芳基或杂芳环；

$R_{11}'$ 是吸电子基团，其选自  $CF_3$ 、卤素取代的低级烷基或  $(C=O)-O-W_3$ ，其中  $W_3$ 是选自烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、烷芳基或芳烷基的基团；以及

$R_{24}$ 、 $R_{25}$ 、 $R_{26}$ 和  $R_{27}$ 独立地为氢或选自烷基、烯基、炔基、烷氧基、烷基氧基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、烷芳基、芳烷基、酮基、醛、羧酸根、羧酸、羧酸酯、氨基甲酸酯、酰胺、氨基、烷基氨基、聚醚、硫醇、烷基硫代、氰基、硝基、磺酰基、无机酯的基团； $R_{24}$ 和  $R_{25}$ 共同形成 5、6 或 7 元环，其选自环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂环或杂芳基或杂芳环； $R_{25}$ 和  $R_{26}$ 共同形成 5、6 或 7 元环，其选自环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂环或杂芳基或杂芳环；或  $R_{26}$ 和  $R_{27}$ 共同形成 5、6 或 7 元环，其选自环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂环或杂芳基或杂芳环。

2. 权利要求 1 所述的化合物，其中  $R_1'$ 是  $CH_3$ 。

3. 权利要求 1 所述的化合物，其中  $R_1'$ 是  $OCH_2OZ_1$ 。

4. 权利要求 3 所述的化合物，其中  $Z_1$ 是选自烷基、烯基、炔基、烷氧基烷基、烷酰基、烯酰基、炔酰基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、烷芳基、芳烷基、芳酰基或聚醚的基团。

5. 权利要求 4 所述的化合物，其中  $Z_1$ 是  $CH_3$ 。

6. 权利要求 1 所述的化合物, 其中  $R_1'$  是  $NR_2'R_3'$ 。
7. 权利要求 6 所述的化合物, 其中  $R_2'$  是氢。
8. 权利要求 7 所述的化合物, 其中  $R_3'$  是  $(C=O)Z_2$ 。
9. 权利要求 8 所述的化合物, 其中  $Z_2$  是选自烷基、烯基、炔基、烷氧基烷基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、烷芳基、芳烷基或聚醚的基团。
10. 权利要求 1 所述的化合物, 其中  $R_2$  和  $R_3$  共同形成 5、6 或 7 元环, 其选自芳基、杂环或杂芳基或杂芳环。
11. 权利要求 1 所述的化合物, 其中  $R_4$  和  $R_5$  共同形成 5、6 或 7 元环, 其选自芳基、杂环或杂芳基或杂芳环。
12. 权利要求 1 所述的化合物, 其中  $R_6$  是卤素取代的低级烷基。
13. 权利要求 12 所述的化合物, 其中  $R_6$  是  $CF_nH_{3-n}$ 。
14. 权利要求 13 所述的化合物, 其中“n”为 1 或 2。
15. 权利要求 1 所述的化合物, 其中  $W_1$  是  $CH_3$ 。
16. 权利要求 1 所述的化合物, 其中  $W_1$  是叔丁基。
17. 权利要求 1 所述的化合物, 其中  $R_7$  是  $CH_3$ 。
18. 权利要求 1 所述的化合物, 其中所述荧光团选自吡啶橙、葱环、别藻蓝蛋白、BODIPY、花青、香豆素、Edans、曙红、赤藓红、荧光胺、荧光素、FAM (羧基荧光素)、HEX (六氯荧光素)、JOE (6-羧基-4',5'-二氯-2',7'-二甲氧基荧光素)、俄勒冈绿、藻蓝蛋白、藻红蛋白、若丹明、ROX (羧基-X-若丹明)、TAMRA (羧基四甲基若丹明)、TET (四氯荧光素)、德克萨斯红、四甲基若丹明和黄嘌呤。
19. 权利要求 1 所述的化合物, 其中  $R_9$  是  $(C=O)NR_1''R_2''$ 。
20. 权利要求 19 所述的化合物, 其中  $R_1''$  是  $-(CH_2)_k-CH_3$ 。
21. 权利要求 20 所述的化合物, 其中  $k=0\sim 24$ 。
22. 权利要求 19 所述的化合物, 其中  $R_2''$  是  $-(CH_2)_l-CH_3$ 。
23. 权利要求 22 所述的化合物, 其中  $l=0\sim 24$ 。
24. 权利要求 1 所述的化合物, 其中  $R_8$  和  $R_9$  共同形成 5、6 或 7 元环, 其选自环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂环、杂芳基或杂芳环。
25. 权利要求 1 所述的化合物, 其中  $R_{12}$  选自  $(C=O)NR_3''R_4''$ 。
26. 权利要求 25 所述的化合物, 其中  $R_3''$  是  $-(CH_2)_p-CH_3$ 。

27. 权利要求 26 所述的化合物, 其中  $p=0\sim 24$ 。
28. 权利要求 25 所述的化合物, 其中  $R_4''$  是  $-(CH_2)_q-CH_3$ 。
29. 权利要求 28 所述的化合物, 其中  $q=0\sim 24$ 。
30. 权利要求 1 所述的化合物, 其中  $R_{11}$  和  $R_{12}$  共同形成 5、6 或 7 元环, 其选自环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂环或杂芳基或杂芳环。
31. 权利要求 1 所述的化合物, 其中  $R_4'$  是  $CH_3$ 。
32. 权利要求 1 所述的化合物, 其中  $R_4'$  是  $OCH_2OZ_3$ 。
33. 权利要求 32 所述的化合物, 其中  $Z_3$  是选自烷基、烯基、炔基、烷氧基烷基、烷酰基、烯酰基、炔酰基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、烷芳基、芳烷基、芳酰基或聚醚的基团。
34. 权利要求 33 所述的化合物, 其中  $Z_3$  是  $CH_3$ 。
35. 权利要求 1 所述的化合物, 其中  $R_{13}'$  是  $NR_5'R_6'$ 。
36. 权利要求 35 所述的化合物, 其中  $R_5'$  是氢。
37. 权利要求 36 所述的化合物, 其中  $R_6'$  是  $(C=O)Z_4$ 。
38. 权利要求 37 所述的化合物, 其中  $Z_4$  是选自烷基、烯基、炔基、烷氧基烷基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、烷芳基、芳烷基、聚醚的基团。
39. 权利要求 1 所述的化合物, 其中  $R_{14}$  和  $R_{15}$  共同形成 5、6 或 7 元环, 其选自芳基、杂环、杂芳基或杂芳环。
40. 权利要求 1 所述的化合物, 其中  $R_{17}$  是卤素取代的低级烷基。
41. 权利要求 40 所述的化合物, 其中  $R_{17}$  是  $CF_nH_{3-n}$ 。
42. 权利要求 41 所述的化合物, 其中“n”为 1 或 2。
43. 权利要求 1 所述的化合物, 其中  $W_2$  是  $CH_3$ 。
44. 权利要求 1 所述的化合物, 其中  $W_2$  是叔丁基。
45. 权利要求 1 所述的化合物, 其中  $R_{18}$  是 Cl、Br 或 I。
46. 权利要求 1 所述的化合物, 其中  $R_{18}$  是  $CH_3$ 。
47. 权利要求 1 所述的化合物, 其中  $R_{19}$  是 Cl、Br 或 I。
48. 权利要求 1 所述的化合物, 其中  $R_{19}$  是  $CH_3$ 。
49. 权利要求 1 所述的化合物, 其中  $R_{20}$  是  $-(CH_2)_m-COOH$ 。
50. 权利要求 49 所述的化合物, 其中  $m=1\sim 24$ 。
51. 权利要求 1 所述的化合物, 其中  $R_7'$  和  $R_8'$  共同形成 5、6 或 7 元环, 其选

自芳基、杂环或杂芳基或杂芳环。

52. 权利要求 1 所述的化合物，其中  $R_9'$  和  $R_{10}'$  共同形成 5、6 或 7 元环，其选自芳基、杂环、杂芳基或杂芳环。

53. 权利要求 1 所述的化合物，其中  $R_{11}'$  是卤素取代的低级烷基。

54. 权利要求 40 所述的化合物，其中  $R_{11}'$  是  $CF_nH_{3-n}$ 。

55. 权利要求 41 所述的化合物，其中“n”为 1 或 2。

56. 权利要求 1 所述的化合物，其中  $W_3$  是  $CH_3$ 。

57. 权利要求 1 所述的化合物，其中  $W_3$  是叔丁基。

58. 权利要求 1 所述的化合物，其中  $R_{24}$  和  $R_{25}$  共同形成 5、6 或 7 元环，其选自环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂环或杂芳基或杂芳环。

59. 权利要求 1 所述的化合物，其中  $R_{25}$  和  $R_{26}$  共同形成 5、6 或 7 元环，其选自环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂环或杂芳基或杂芳环。

60. 权利要求 1 所述的化合物，其中  $R_{26}$  和  $R_{27}$  共同形成 5、6 或 7 元环，其选自环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂环或杂芳基或杂芳环。

61. 用于测定过亚硝酸根的试剂，其包含根据权利要求 1 所述的化合物。

62. 测定样品中过亚硝酸根的方法，其包括以下步骤：

a) 使根据权利要求 1 所述的化合物与样品接触；

b) 测定所述化合物与样品中存在的过亚硝酸根之间反应产生的所得化合物的荧光。

63. 权利要求 62 所述的方法，其中所述样品是化学样品或生物样品。

64. 权利要求 63 所述的方法，其中所述生物样品是动物细胞、动物组织、植物细胞、植物组织或微生物。

65. 用于检测过亚硝酸根的高通量筛选荧光法，其包括使用根据权利要求 61 所述的试剂。

66. 用于筛选化合物的高通量方法，所述化合物能增加或减少过亚硝酸根的产生，所述方法包括使用根据权利要求 1 所述的化合物。

## 用于高度专一性检测过亚硝酸根的试剂

在本说明书中引用了多篇参考文献，这些参考文献的整体内容通过参考结合入本说明书中，以便更充分地描述本发明所涉及的技术现状。

### 技术领域

本发明一般涉及过亚硝酸根（peroxynitrite）的检测领域。更具体地，本发明涉及可用作专一性检测过亚硝酸根的试剂的化合物。本发明包括探针分子、其制备方法及其作为试剂在检测和测定活体细胞和活体组织中的过亚硝酸根的运用。

### 背景技术

过亚硝酸根（ $\text{ONOO}^-$ ）是硝酸根的异构体，为人所知的历史已有约一个世纪。由于它在生物和医药领域具有潜在重要作用，在过去十年里，人们对它做了广泛研究，参见 Beckman, J. S., *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 1996, 271, C1424-1437; Goldstein, S.等, *Free Radical Biol. & Med.* 1996, 21, 965-974; Groves, J. T., *Curr. Opin. Chem. Biol.* 1999, 3, 226; Radi, R.等, *Free Radical Biol. & Med.* 2001, 30, 463-488; Tarpey, M. M.等, *Circ. Res.* 2001, 89, 224-236; Koppenol, W. H., *Redox Report* 2001, 6, 339-341。过亚硝酸根可通过氧化氮（NO）和超氧根（superoxide）（ $\text{O}_2^-$ ）以 1:1 的化学计量比率在活体中发生扩散控制的反应（ $k=0.4-1.9 \times 10^{10} \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ）来形成（Kissner, R.等, *Chem. Res, Toxicol.* 1997, 10, 1285-1292），在产生过亚硝酸根的过程中，NO 的浓度是关键控制因素。当 NO 的浓度增加时，氧化氮与超氧根发生反应，并能克服超氧化物歧化酶引起的歧化反应。当氧化氮（NO）在受细胞因子刺激的诱导型氧化氮合酶（iNOS）作用下过量产生时，就会发生这种情况。ONOO<sup>-</sup>的病理活性同它跟生物中普遍存在的  $\text{CO}_2$  之间的反应有关，该反应产生高反应活性的自由基  $\text{CO}_3^{\cdot-}$  和  $\text{NO}_2^{\cdot-}$ ，产率约为 35%（Radi, R.等, *Free Radical Biol. & Med.* 2001, 30, 463-488）。结果，过亚硝酸根能够使酪氨酸发生硝化（Ischiropoulos, H., *Arch. Biochem. Biophys.* 1998, 356, 1-11, 以及 Beckman J. S.等, *Arch Biochem. Biophys.*, 1992, 298, 438-445），并氧化蛋白质、脂质（Radi, R.等, *Arch Biochem. Biophys.*, 1991, 288, 481, 以及 Shi, H.



等, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1999, 257, 651) 和生物分子中的铁及硫簇 (Radi, R.等, *J. Biol. Chem.*, 1991, 266, 4244-4250)。与生物活体中的其他氧化剂类似, 过亚硝酸根及其质子化形式既产生有益作用, 也具有有害作用。巨嗜细胞产生过亚硝酸根, 作为对细菌入侵的宿主防御反应。然而, 若干研究表明, 过亚硝酸根在许多人类疾病中是导致组织损伤的一个因素, 所述疾病例如为缺血再灌注损伤、风湿性关节炎、脓毒性休克、多发性硬化、动脉硬化症、中风、炎症性肠病、癌症以及几种神经变性疾病 (MacMillan-Crow, L. A.等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996, 93, 11853; Rodenas, J.等, *Free Radical. Biol. & Med.* 2000, 28, 374; Cuzzocrea, S.等, *Pharmacol Rev.* 2001, 53, 135; Szabo, C. *Toxicol. Lett.* 2003, 140, 105; White, C. R.等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994, 91, 1044; Lipton, S. A.等, *Nature* 1993, 364, 626; Pappolla, M. A.等, *J. Neural Transm.* 2000, 107, 203; 以及 Beal, M. F., *Free Radical Biol. & Med.* 2002, 32, 797-803)。

对过亚硝酸根在生物活体中所起关键作用作出解释变得日益重要。虽然过亚硝酸根在碱性溶液中稳定, 但它在生理 pH 下发生质子化后迅速分解。由于过亚硝酸根在生物体系中的半衰期短 (在中性 pH 值的缓冲剂中为 1 秒, 在细胞中短于 100 毫秒), 所以不可能将其直接分离出来 (Radi, R., *Chem. Res. Toxicol.* 1998, 11, 720-721; Denicola, A.等, *Arch. Biochem. Biophys.* 1996, 333, 49-58)。即便在有确凿证据证明活体内形成了过亚硝酸根的情况下, 还没有工具可用来明确检测并定量细胞和组织中的过亚硝酸根。

迄今为止, 用来检测和测定过亚硝酸根的可用分析方法可分为三类。第一类是电化学传感器, 其用来估测在氧化应激下细胞中所产生的过亚硝酸根的量 (Augusto, O.等, *J. Methods Enzymol.* 1996, 269, 346-354; Gatti, R. M.等, *FEBS Lett.*, 1994, 348, 287-290; Gatti, R. M.等, *Arch. Biochem. Biophys.* 1998, 349, 36-46; 以及 Karoui, H.等, *J. Biol. Chem.* 1996, 271, 6000-6009)。但此方法需要操作复杂的设备, 且无法得到过亚硝酸根的立体图像。

第二类方法依赖氧化探针的使用。例如, 可被过亚硝酸根氧化成高荧光分子的 DCFH (2',7'-二氯二氢荧光素) 和 DHR 123 (二氢若丹明 123), 已被用来监测细胞和组织中的过亚硝酸根 (Royall, J. A.等, *Arch. Biochem. Biophys.* 1993, 302, 348-355; Kooy, N. W.等, *Free Radic. Biol. Med.* 1994, 16, 149-156; Kooy, N. W.等, *Free Radic. Res.* 1997, 27, 245-254; Crow, J. P., *Nitric Oxide.* 1997, 1, 145-157;

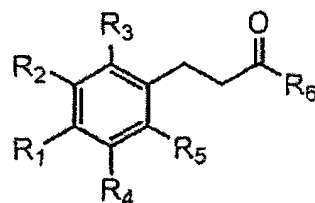
Ischiropoulos, H.等, *Methods Enzymol.* 1999, 301, 367-373; 以及 Miles, A. M.等, *J. Biol. Chem.* 1996, 271, 40-47)。然而, 过亚硝酸根氧化 DCFH 和 DHR 的机理还有大量不清楚之处, 这些探针也能被细胞产生的许多其他 ROS (活性氧中间体 (species)) 氧化。用来检测细胞培养液中的过亚硝酸根的鲁米诺化学发光体系也存在类似的问题。HPF (羟苯基荧光素) 可用来鉴别过亚硝酸根和氧化氮, 但它与羟基作用时给出的荧光信号比跟过亚硝酸根作用时给出的荧光信号强 (Setsukinai, K.等, *J. Biol. Chem.* 2003, 278, 3170-3175; 国际公开 WO 01/64664 (Nagano 等); 以及国际公开 WO2004040296 (Nagano 等))。

第三类方法利用生物分子的足迹反应。例如, 可用免疫化学方法检测 3-硝基酪氨酸, 其是在生物体系中蛋白质上的酪氨酸残基被过亚硝酸根氧化后产生的硝化产物 (Kaur, H.等, *FEBS Lett.* 1994, 350, 9-12)。近来也有人通过荧光法, 用 NADH (还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸) 来监测缓冲液中过亚硝酸根的浓度。然而, 目前还没有一种化学修饰方法能够使探针或生物分子获得完全专一性, 使它们能够直接而明确地显示细胞中是否产生了过亚硝酸根。这意味着生物体系中存在的其它活性氧中间体和活性氮中间体可能与过亚硝酸根形成竞争, 干扰了结果。

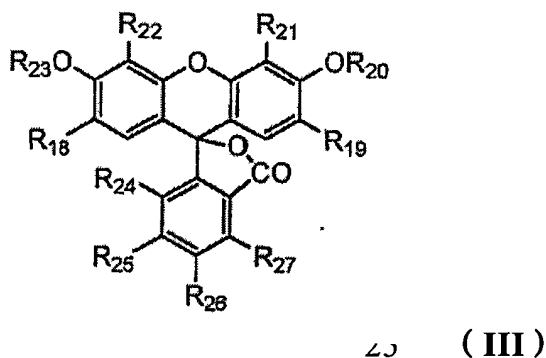
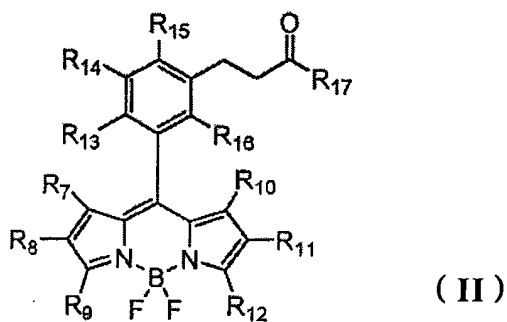
已知有若干方法用于检测/测定过亚硝酸根, 包括电化学方法、化学发光法和足迹法。然而, 这些方法需要做烦琐、耗时的对照实验, 实验中要联合使用清除剂和抑制剂, 灵敏度低, 专一性差。因此, 为了便于直接研究生物体系中的过亚硝酸根, 开发出灵敏度高、操作简便的专门用于检测和测定过亚硝酸根的方法是极为重要的。

### 发明概述

本发明涉及可用于确切检测和测定过亚硝酸根的新颖化合物。具体而言, 本发明提供了化合物或其盐, 它们与过亚硝酸根发生专一性反应, 而不与其他的活性氧中间体和活性氮中间体反应, 所述化合物由以下通式 (I)、(II)、(III) 表示:



(I)



其中  $R_i$  ( $i=1\sim 22$ ) 的定义见下面的“发明详述”。

本发明还提供了用于测定过亚硝酸根的试剂，该试剂包含上述任意化合物。

本发明还提供了测定样品中的过亚硝酸根的方法，其包括以下步骤：

a) 使上述任意化合物与样品接触；

b) 测定所述化合物与样品中存在的过亚硝酸根之间的反应产生的所得化合物的荧光。

本发明还提供了用于检测过亚硝酸根的高通量筛选荧光法 (high-throughput screening fluorescent method)，该方法包括采用测定过亚硝酸根的试剂，其中所述试剂包含上述任意化合物。

本发明还提供了用于筛选化合物的高通量方法，所述化合物能增加或减少过亚硝酸根的产生，所述方法包括使用上述任意化合物。

#### 附图说明

图 1 图示了用过亚硝酸根或 Oxone<sup>®</sup> ( $2\text{KHSO}_5 \cdot \text{KHSO}_4 \cdot \text{K}_2\text{SO}_4$ ) 氧化酮的反应 (1a/1b)。

图 2 显示了通式 (II) 所示化合物的一般合成方案，其中各  $R_i$  ( $i=7\sim 17$ ) 的定义见“发明详述”部分。

图 3 显示了通式 (III) 所示化合物的一般合成方案, 其中各  $R_i$  ( $i=18\sim 27$ ) 的定义见“发明详述”部分。

图 4~图 7 显示了实施例 1 的合成方案。

图 8 显示了实施例 1 中所得到的本发明化合物 (ss-6) 的  $20\mu\text{M}$  溶液的荧光光谱。

图 9 显示了 15 当量  $\text{ONOO}^-$  与 5 毫升  $20\mu\text{M}$  ss-6 反应 30 分钟后的溶液的荧光光谱。

图 10 显示了  $20\mu\text{M}$  ss-6 的吸收光谱。

图 11 显示了 ss-6 与浓度为  $0\sim 300\mu\text{M}$  的  $\text{ONOO}^-$  反应 30 分钟后获得的荧光光谱。

图 12 显示了荧光强度与  $\text{ONOO}^-$  浓度之间的线性关系。

图 13~图 18 显示了实施例 5 的合成方案。

图 19 显示了实施例 5 中所得到的本发明化合物 (ss-12) 的  $20\mu\text{M}$  溶液的荧光光谱。

图 20 显示了 15 当量  $\text{ONOO}^-$  与 5 毫升  $20\mu\text{M}$  ss-12 反应 30 分钟后的溶液的荧光光谱。

图 21 显示了  $20\mu\text{M}$  ss-12 的吸收光谱。

图 22 显示了 ss-6 与浓度为  $0\sim 300\mu\text{M}$  的  $\text{ONOO}^-$  反应 30 分钟后获得的荧光光谱。

图 23 显示了荧光强度与  $\text{ONOO}^-$  浓度之间的线性关系。

图 24 显示了经原代培养的神经元细胞的荧光显微镜检结果, 所述神经元细胞先用  $20\mu\text{M}$  的 ss-6 和 ss-12 孵育, 然后用  $10\mu\text{M}$  和  $100\mu\text{M}$  的 SIN-1 (3-吗啉代-斯德酮亚胺·盐酸) 处理。

## 发明详述

### 定义

除非另外明确指出, 本申请中所用下列各术语均应具有下面所描述的含义。

“烷基”指含有碳和氢的完全饱和的无环单价基团, 其可以是支链的或直链的。烷基的例子有甲基、乙基、正丁基、叔丁基、正庚基和异丙基。“低级烷基”指 1~6 个碳原子的烷基, 例如甲基、乙基、正丁基、异丁基、叔丁基、异戊基、正戊基和异戊基。

“烯基”指含有碳和氢的一价或二价不饱和（优选单不饱和）基团，其可以是环状的、支链的或直链的。“低级烯基”指具有 1~5 个碳原子的这样的基团。

“芳基”指取代或未取代的一价芳基，一般含有一个单环（例如苯）或稠合双环（例如萘）。一般优选单环芳基。该术语包括杂芳基，它是环中含有一个或多个氮原子、氧原子或硫原子的芳环基团，如咪唑基、吡咯基、吡啶基和吡啶。 “取代”是指芳基中一个或多个环上氢原子被一个或多个基团取代，所述基团优选选自氟、氯、溴、碘、甲基、乙基、羟基、羟甲基、硝基、氨基、甲基氨基、二甲氨基、甲氧基、卤代甲氧基和卤代甲基。

“芳烷基”指进一步被芳基取代的烷基（优选为低级烷基）取代基，其例子有苄基和苯乙基。

“荧光团”指能被光激发而发射荧光的小分子或大分子的一部分。优选地，在波长范围为约 200~约 1000 纳米，优选为约 500~约 800 纳米的光的激发下荧光团能有效地产生荧光。荧光团优选选自吡啶橙、葱环、别藻蓝蛋白、BODIPY、花青、香豆素、Edans、曙红、赤藓红、荧光胺、荧光素、FAM（羧基荧光素）、HEX（六氯荧光素）、JOE（6-羧基-4',5'-二氯-2',7'-二甲氧基-荧光素）、俄勒冈绿（Oregon Green）、藻蓝蛋白、藻红蛋白、若丹明、ROX（羧基-X-若丹明）、TAMRA（羧基四甲基若丹明）、TET（四氯荧光素）、德克萨斯红、四甲基若丹明和黄嘌呤。这样的基团报道于《荧光探针和研究产品手册》（*Handbook of Fluorescent Probes and Research Products*, 9th Edition, Molecular Probes, Eugene, Oregon, Haughland, 2003）中。

“无机酯”指无机酸与醇的反应产物。无机酯主要得自无机酸与醇的缩合。

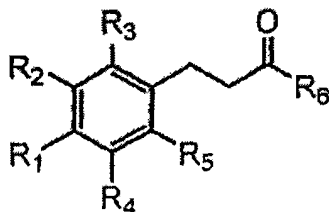
术语“盐”指标准酸碱反应的产物，其中碱性基团（如氨基）的平衡离子来自有机酸或无机酸。这样的平衡离子包括氯根、硫酸根、磷酸根、乙酸根、琥珀酸根、柠檬酸根、乳酸根、马来酸根、富马酸根、棕榈酸根、胆酸根、谷氨酸根、戊二酸根、酒石酸根、硬脂酸根、水杨酸根、甲磺酸根、苯磺酸根、山梨酸根、苦味酸根、苯甲酸根、肉桂酸根等。

术语“生理上可接受的盐”包括含有机阳离子和无机阳离子的羧酸盐，所述阳离子例如为碱金属阳离子和碱土金属阳离子（如锂、钠、钾、镁、钡和钙）；铵；或有机阳离子，例如二苄基铵、苄基铵、2-羟乙基铵、二(2-羟乙基)铵、苄基乙基苄基铵等。上述术语涵盖的其它阳离子包括普鲁卡因、奎宁和 N-甲基葡萄糖胺的

质子化形式，以及碱性氨基酸（如甘氨酸、鸟氨酸、组氨酸、苯丙氨酸、赖氨酸和精氨酸）的质子化形式。

### 本发明的实施方式

如上所述，本发明提供了与过亚硝酸根发生专一性反应而不与其它活性氧中间体和活性氮中间体发生反应的化合物。所述化合物具有以下通式 (I)：



(I)

其中：

$R_1$  为  $OR_1'$  或  $NR_2'R_3'$ ，其中  $R_1'$ 、 $R_2'$  和  $R_3'$  独立地为氢或选自烷基、烯基、炔基、烷氧基烷基、烷酰基、烯酰基、炔酰基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、烷芳基、芳烷基、芳酰基或聚醚的基团；

$R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$  和  $R_5$  独立地为氢或选自卤素、烷基、烷氧基、烷基氧基 (alkoxy)、聚醚的基团； $R_2$  和  $R_3$  共同形成 5、6 或 7 元环，其选自芳基、杂环 (heterocyclic)、杂芳基或杂芳环 (heteroaromatic)；或者  $R_4$  和  $R_5$  共同形成 5、6 或 7 元环，其选自芳基、杂环、杂芳基或杂芳环；

$R_6$  是吸电子基团，选自  $CF_3$ 、卤素取代的低级烷基（例如  $CF_nH_{3-n}$ ，其中  $n$  为 1 或 2）、或  $(C=O)-O-W_1$ ，其中  $W_1$  是选自烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、烷芳基或芳烷基的基团；并且

荧光团或掩蔽(masked)荧光团可与  $R_i$  ( $i=1\sim 5$ ) 之一共价键合。

此外，上面刚刚讨论过的化合物进一步具有以下实施方式：

$R_2$  和  $R_3$  共同形成 5、6 或 7 元环，其选自芳基、杂环、杂芳基或杂芳环；

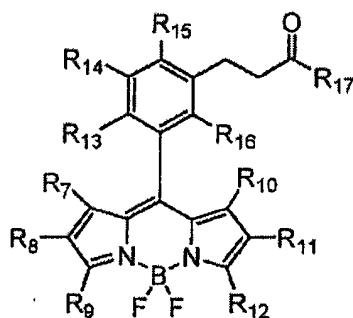
$R_4$  和  $R_5$  共同形成 5、6 或 7 元环，其选自芳基、杂环、杂芳基或杂芳环；

$R_1'$  是  $CH_3$  或  $OCH_2OZ_1$ ，其中  $Z_1$  是选自烷基、烯基、炔基、烷氧基烷基、烷酰基、烯酰基、炔酰基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、烷芳基、芳烷基、芳酰基或聚醚的基团；

$R_3'$ 是(C=O) $Z_2$ , 其中  $Z_2$ 是选自烷基、烯基、炔基、烷氧基烷基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、烷芳基、芳烷基、或聚醚的基团; 且/或

荧光团选自吡啶橙、葱环、别藻蓝蛋白、BODIPY、花青、香豆素、Edans、曙红、赤藓红、荧光胺、荧光素、FAM(羧基荧光素)、HEX(六氟荧光素)、JOE(6-羧基-4',5'-二氯-2',7'-二甲氧基荧光素)、俄勒冈绿、藻蓝蛋白、藻红蛋白、若丹明、ROX(羧基-X-若丹明)、TAMRA(羧基四甲基若丹明)、TET(四氯荧光素)、德克萨斯红、四甲基若丹明和黄嘌呤。

本发明还提供了在过亚硝酸根的测定中具有高度专一性和选择性的化合物。在一种实施方式中, 所述化合物具有以下通式(II):



(II)

其中:

$R_7$ 和 $R_{10}$ 独立地为氢或选自卤素、低级烷基、低级烯基、卤代烷基、CN或 $NO_2$ 的基团;

$R_8$ 、 $R_9$ 、 $R_{11}$ 和 $R_{12}$ 独立地为氢、卤素、烷基、卤代烷基、烯基, 或是选自酮基、醛、羧酸根、羧酸酯、烷基氨基、羟基、烷氧基、烷氧基烷基、聚醚、烷基硫代(alkylthio)、氰基、硝基的基团, 或者具有(C=O)-Y或(C=O)-X-Y形式, 其中X是低级烷基或烯基链, Y是氢或者选自烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、烷芳基、芳烷基、酮基、醛、羧酸根、羧酸酯、氨基甲酸酯、酰胺、氨基、烷基氨基、羟基、烷氧基、聚醚、烷基硫代、氰基、硝基、磺酰基、无机酯的基团, 或者为5~7元杂环, 其环原子选自碳、氮、氧和硫, 其中环原子进一步包括3~6个碳原子以及一般不超过2个的杂原子;

$R_{13}$ 是 $OR_4'$ 或 $NR_5'R_6'$ , 其中 $R_4'$ 、 $R_5'$ 和 $R_6'$ 独立地为氢或选自烷基、烯基、炔基、烷氧基烷基、烷酰基、烯酰基、炔酰基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、烷芳基、芳烷基、芳酰基或聚醚的基团;

$R_{14}$  和  $R_{15}$  独立地为氢、卤素、烷基、烷氧基、聚醚；或者  $R_{14}$  和  $R_{15}$  共同形成 5、6 或 7 元环，其选自芳基、杂环、杂芳基或杂芳环；

$R_{16}$  是氢、烷基、烷氧基或聚醚；以及

$R_{17}$  是吸电子基团，其选自  $CF_3$ 、卤素取代的低级烷基（例如  $CF_nH_{3-n}$ ，其中  $n$  为 1 或 2）或  $(C=O)-O-W_2$ ，其中  $W_2$  是选自烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、烷芳基或芳烷基的基团。

此外，上面讨论的通式 (II) 的化合物进一步具有以下实施方式：

$R_9$  是  $(C=O)NR_1''R_2''$ ，其中  $R_1''$  和  $R_2''$  是烷基（例如  $-(CH_2)_k-CH_3$ ，其中  $k=0\sim 24$ ，以及  $-(CH_2)_l-CH_3$ ，其中  $l=0\sim 24$ ）；

$R_8$  和  $R_9$  共同形成环，优选为 5、6 或 7 元环，以形成环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂环、杂芳基或杂芳环；

$R_{12}$  是  $(C=O)NR_3''R_4''$ ，其中  $R_3''$  和  $R_4''$  是烷基（例如  $-(CH_2)_p-CH_3$ ，其中  $p=0\sim 24$ ，以及  $-(CH_2)_q-CH_3$ ，其中  $q=0\sim 24$ ）；

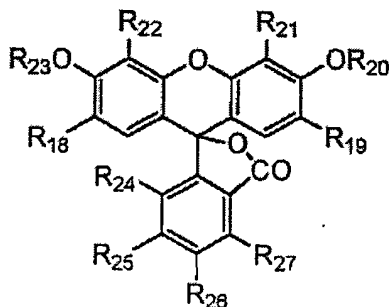
$R_{11}$  和  $R_{12}$  共同形成环，优选为 5、6 或 7 元环，以形成环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂环、杂芳基或杂芳环；和/或

$R_4'$  是  $CH_3$  或  $OCH_2OZ_3$ ，其中  $Z_3$  是选自烷基、烯基、炔基、烷氧基烷基、烷酰基、烯酰基、炔酰基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、烷芳基、芳烷基、芳酰基或聚醚的基团。

通式 (II) 表示的化合物可以盐的形式存在。生理上可接受的水溶性盐可适用于本发明的试剂和测定方法。此外，游离态的通式 (II) 所示化合物或其盐可以水合物或溶剂合物存在，这些物质中的任何一种均落入本发明的范围之内。对形成所述溶剂合物的溶剂类型没有特别限制。例如，乙腈、乙醇、水或乙腈-水混合物可以作为所述溶剂的例子。

在另一种实施方式中，在过亚硝酸根的测定中具有高度专一性和选择性的化合物具有以下通式 (III)：





(III)

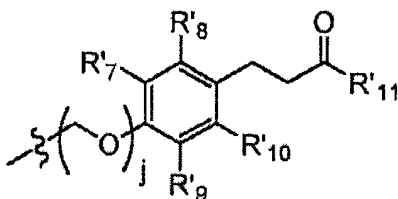
其中:

$R_{18}$  和  $R_{19}$  独立地为氢、卤素、烷基或烷氧基;

$R_{20}$  是氢、烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、烷芳基、芳烷基、羧基烷基、羧酸酯或氨基烷基;

$R_{21}$  和  $R_{22}$  独立地为氢或选自烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、烷芳基、芳烷基、酮基、羧基烷基、羧酸根、羧酸酯、氨基甲酸酯、酰胺、氨基、烷基氨基、聚醚、烷基硫代、氰基、硝基、磺酰基或无机酯的基团;

$R_{23}$  选自下式所示基团:



其中  $j=0$  或  $1$ ;

$R_{7'}$ 、 $R_{8'}$ 、 $R_{9'}$  和  $R_{10'}$  独立地为氢或选自卤素 (例如 Cl、Br 或 I)、烷基 (例如  $\text{CH}_3$ )、烷氧基、烷基氧基或聚醚的基团;

$R_{11'}$  是吸电子基团, 其选自  $\text{CF}_3$ 、卤素取代的低级烷基 (例如  $\text{CF}_n\text{H}_{3-n}$ , 其中  $n$  为  $1$  或  $2$ ) 或  $(\text{C}=\text{O})-\text{O}-\text{W}_3$ , 其中  $\text{W}_3$  是选自烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、烷芳基或芳烷基的基团; 以及

$R_{24}$ 、 $R_{25}$ 、 $R_{26}$  和  $R_{27}$  独立地为氢或选自烷基、烯基、炔基、烷氧基、烷基氧基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、烷芳基、芳烷基、酮基、醛、羧酸根、羧酸、羧酸酯、氨基甲酸酯、酰胺、氨基、烷基氨基、聚醚、烷基硫代、氰基、硝基、磺酰基、无机酯的基团;  $R_{24}$  和  $R_{25}$  共同形成  $5$ 、 $6$  或  $7$  元环, 其选自环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂环、杂芳基或杂芳环;  $R_{25}$  和  $R_{26}$  共同形成  $5$ 、 $6$  或  $7$  元环, 其选自环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂环、杂芳基或杂芳环; 或  $R_{26}$  和  $R_{27}$  共同形成  $5$ 、 $6$  或  $7$  元环, 其选自环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂环、

杂芳基或杂芳环。

此外，上面讨论的具有通式 (III) 的化合物进一步具有以下实施方式：

$R_7'$  和  $R_8'$  共同形成 5、6 或 7 元环，其选自芳基、杂环、杂芳基或杂芳环；

$R_9'$  和  $R_{10}'$  共同形成 5、6 或 7 元环，其选自芳基、杂环、杂芳基或杂芳环；

$R_{20}$  是  $-(CH_2)_m-COOH$ ，其中  $m=1\sim 24$ ；

$R_{24}$  和  $R_{25}$  共同形成 5、6 或 7 元环，其选自环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂环、杂芳基或杂芳环；

$R_{25}$  和  $R_{26}$  共同形成 5、6 或 7 元环，其选自环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂环、杂芳基或杂芳环；和/或

$R_{26}$  和  $R_{27}$  共同形成 5、6 或 7 元环，其选自环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂环、杂芳基或杂芳环。

通式 (III) 表示的化合物也可以盐的形式存在。生理上可接受的水溶性盐可适用于本发明的试剂和测定方法。此外，游离态的通式 (III) 所示化合物或其盐可以水合物或溶剂合物存在，这些物质中的任何一种均落入本发明的范围之内。对形成所述溶剂合物的溶剂类型没有特别限制。例如，乙腈、乙醇、水或乙腈-水混合物可以作为所述溶剂的例子。

已经发现，过亚硝酸根对通式 (I) 表示的某些特定酮的氧化方式类似于后者与过一硫酸根的反应，所述过一硫酸根的商业来源是 Oxone<sup>®</sup> ( $2KHSO_5 \cdot KHSO_4 \cdot K_2SO_4$ ) (产率为 30~55%，转化率为 100%) (图 1)。该反应经由二氧杂环丙烷 (dioxirane) 中间体进行。二氧杂环丙烷的形成及其随后在分子内对酚衍生物的氧化，为设计用于专一性检测细胞内的过亚硝酸根的探针提供了基础。此外，已经发现，生物体系中存在的酮与其它活性氧中间体或活性氮中间体之间不会发生类似的反应。进一步发现，通过用荧光团取代酮中的一些基团，可以合成针对过亚硝酸根的荧光探针。在一种实施方式中，可通过 PET (光诱导电子转移) 机理来控制 BODIPY 基探针的荧光性质。基于 PM3 计算方法，设计了受到依赖于 PET (光诱导电子转移) 的荧光灭/亮开关机理 (fluorescence off/on switching mechanism) 控制的荧光探针 (图 2)。在另一种实施方式中，在用过亚硝酸根氧化之前，将荧光团掩蔽起来，所述探针没有荧光性。然而，与过亚硝酸根反应后，该荧光团被释放出来，变得具有强荧光性。例如，荧光素/二氯荧光素的酚羟基处发生的衍生可显著降低荧光强度。因此，设计了不同的基

于荧光素/二氯荧光素的探针。还发现，通式(II)或(III)表示的基本无荧光的化合物在生理条件下与过亚硝酸根高效反应，给出强荧光信号。因此，通过测定氧化态荧光化合物的荧光，可以非常高的专一性和选择性来测定过亚硝酸根，由所述通式(II)或(III)所示无荧光化合物与过亚硝酸根在活细胞或活组织内反应生成该氧化态荧光化合物。

本发明还提供了用于测定过亚硝酸根的试剂，其包含上述任意化合物。

本发明还提供了用于测定化学或生物样品(例如来自动物或植物的细胞和组织，以及微生物)中的过亚硝酸根的方法，其包括如下步骤：

a)使上述任意化合物与化学或生物样品接触；

b)测定所述化合物与样品中存在的过亚硝酸根之间的反应产生的所得化合物的荧光。

本发明还提供了用于检测过亚硝酸根的高通量筛选荧光法，该方法包括使用以上提到的用于测定过亚硝酸根的试剂。

本发明还提供了筛选化合物的高通量方法，所述化合物能增加或减少过亚硝酸根的产生，所述方法包括采用上述任意化合物。

#### 通用合成程序

借助已知技术以及本文揭示的通用合成程序，有机合成领域的技术人员可以制备本发明的化合物。例如，通式(I)表示的一些化合物一般可利用 Yang 等概述的程序(*J. Org. Chem.*, 2000, 65, 4179-4184)来合成。

通式(II)的化合物一般可通过以下程序合成(Nagano, T.等, *J. Am. Chem. Soc.* 2004, 126, 3357-3367)。一般合成方案如图2所示。在室温~80℃的温度下，用催化量的TFA(三氟乙酸)在合适的溶剂(如二氯甲烷或1,2-二氯乙烷)中处理相应的(corresponding)吡咯部分和醛部分。当TLC监控显示相应的醛消耗完毕时，加入DDQ(2,3-二氯-5,6-二氧基-1,4-苯醌)，并继续搅拌15~30分钟。通过后处理(work-up)和柱纯化，可以分离出纯的中间体，然后用乙醚合三氟化硼和三乙胺在二氯甲烷中处理所述中间体。在室温下搅拌溶液1~4小时。通式(II)表示的本发明化合物可先后通过后处理和纯化而分离出来。用于实施合成反应的优选化合物见“实施例”部分。

其中，可独立制备相应的吡咯部分和醛部分，一些官能团可通过保护基予以

保护。上述合成方案有时可通过选择不同的保护基来优化。举例而言，有关保护基的详细解释和合适的保护基的选择技术可参见名为《有机合成中的保护基》一书 (*Protective Groups in Organic Synthesis*, Greene, T. W., John Wiley & Sons, Inc., 1999)。

通式(III)所示化合物一般可通过以下程序合成(John, E. T.等, *J. Chem. Soc., Perkin Trans I*, 1995, 1993; McWatt, M.等, *Eur. J. Org. Chem.* 2001, 2535-2545; Rychnovsky, S. D.等, *J. Am. Chem. Soc.* 1992, 114, 671~677)。该一般合成方案如图3所示。用叔丁醇钾在适当溶剂(如苯和甲醇的混合物)中的溶液处理相应的荧光素衍生物。当荧光素衍生物固体完全溶解时,真空蒸发溶剂,得到相应的钾盐。然后,加入溶于合适溶剂(如吡啶)中的 $R_{23}I$ 和 $CuCl$ ,其中 $R_{23}$ 如前文所定义。所得混合物在氩气下回流24小时。冷却至室温后,可先后通过后处理和纯化而分离出通式(III)所示的本发明化合物。用于实施合成反应的优选化合物见“实施例”部分。

其中,可独立制备相应的荧光素衍生物和 $R_{23}I$ ,一些官能团可通过保护基予以保护。跟通式(II)所示化合物的一般合成方案一样,上述合成方案有时可通过选择不同的保护基来优化。

术语“后处理”和“纯化”是指有机合成中所用的技术的组合,例如洗涤、过滤、萃取、蒸发、蒸馏、结晶、色谱处理等。中间体也可不经纯化而直接用于后续反应。

### 实施例

以下实施例1~4是对通式(II)所示化合物的制备和使用方法的详细描述。该详述落入上述“通用合成程序”的范围之内,并起示例作用,而所述“通用合成程序”构成本发明的一部分。这些实施例以及实施例5~9仅用于说明目的,无意限制本发明的范围。

#### 实施例1—ss-6的合成方案

##### 1) 吡咯-2-甲酸的合成(如图4所示)

将吡咯-2-甲醛(10.0克,105毫摩尔)溶解在50毫升甲醇中,然后用500毫升蒸馏水稀释。加入新鲜制备的氧化银(48.3克,210毫摩尔)和氢氧化钠(8.5克,212毫摩尔)。然后在室温下搅拌反应混合物1小时。滤出沉淀,用热水洗

涂。用乙醚（500 毫升）萃取合并的滤液和洗涤液，然后在 0℃用 37% 盐酸酸化。用乙醚（200 毫升×4）萃取所得溶液。用硫酸镁干燥合并的有机萃取液。减压蒸发溶剂，得到吡咯-2-甲酸[634-97-9]（9.9 克，产率 85%）。

### 2) N,N-二乙基-1H-吡咯-2-甲酰胺 (ss-1) 的合成 (如图 4 所示)

将吡咯-2-甲酸（10.0 克，90 毫摩尔）溶解在 250 毫升二氯甲烷中，随后在氩气气氛下于 0℃加入 DCC（N,N'-二环己基碳二亚胺）（20.4 克，99 毫摩尔）、DMAP（4-二甲基氨基吡啶）（2.2 克，18 毫摩尔）和二乙胺（10.2 毫升，99 毫摩尔）。在 0℃搅拌反应混合物 30 分钟，然后在室温搅拌 8 小时。用二氯甲烷稀释所得溶液，滤去固体。先后用稀盐酸和饱和碳酸氢钠溶液洗涤滤液。用硫酸钠干燥有机层，然后减压蒸发溶剂。用硅胶柱色谱纯化残留物（洗脱剂：乙酸乙酯/正己烷 = 1/2），得到 N,N-二乙基-1H-吡咯-2-甲酰胺，其为白色固体（10.5 克，产率 70%），熔点 78.6 - 79.9℃；<sup>1</sup>H NMR(300MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 10.1(br, 1H), 6.94-6.88(m, 1H), 6.57-6.51(m, 1H), 6.26-6.21(m, 1H), 3.95-3.86(m, 4H), 1.31-1.24(m, 6H); <sup>13</sup>C NMR(75.5Hz, CDCl<sub>3</sub>): δ 161.9, 120.7, 111.3, 110.1, 109.5, 41.9, 13.4; IR(CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)3442, 2981, 2937, 1716, 1600cm<sup>-1</sup>; LRMS(EI) m/z(%) 166(M<sup>+</sup>; 100); HRMS(EI):对于 C<sub>9</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O, 计算值: 166.1106, 测量值: 116.1106。

### 3) 4-甲氧基肉桂酸甲酯的合成 (如图 5 所示)

将对羟基肉桂酸（10.0 克，61 毫摩尔）溶解在 200 毫升丙酮中，在室温下加入碳酸钾（58.7 克，213 毫摩尔）。15 分钟后，在氩气下于室温加入硫酸二甲酯（16.4 毫升，213 毫摩尔），然后在氩气气氛下加热回流 8 小时。滤去固体，在滤液中加入 50 毫升水。减压蒸发溶剂，用 200 毫升乙酸乙酯萃取所得混合物两次。用硫酸钠干燥合并的有机层，然后减压蒸发溶剂。用硅胶柱色谱纯化残留物（洗脱剂：乙酸乙酯/正己烷 = 1/10），得到 4-甲氧基肉桂酸甲酯[832-01-9]（11.7 克，产率 99%）。

### 4) 3-(4-甲氧基苯基)丙酸甲酯的合成 (如图 5 所示)

将 4-甲氧基肉桂酸甲酯（11.7 克，61 毫摩尔）溶解在 300 毫升甲醇中。在强氩气流下缓慢加入钯（5% 位于活化碳粉上；1.1 克）。鼓泡通入氢气，将反应混合物剧烈搅拌 2 小时。滤出固体，用硫酸钠干燥滤液。减压蒸发溶剂，得到 3-(4-甲氧基苯基)丙酸甲酯[15823-04-8]（11.7 克，99%）。

5) 3-(3-甲酰基-4-甲氧基苯基)丙酸甲酯 (ss-2) 的合成 (如图 5 所示)

将 3-(4-甲氧基苯基)丙酸甲酯 (500 毫克, 2.56 毫摩尔) 溶解在 30 毫升无水二氯甲烷中, 随后在氩气下于  $-20^{\circ}\text{C}$  加入  $\text{TiCl}_4$  (2.1 毫升, 19 毫摩尔) 和  $\text{MeOCHCl}_2$  (0.81 毫升, 9.0 毫摩尔)。在  $-20^{\circ}\text{C}$  下搅拌反应混合物 6 小时。然后将反应混合物缓慢倒入稀盐酸溶液中。分离二氯甲烷层, 依次用水和盐水洗涤, 然后用硫酸镁干燥。减压蒸发溶剂。然后用硅胶柱色谱纯化粗残留物 (洗脱剂: 乙酸乙酯/正己烷 = 1/10), 得到 3-(3-甲酰基-4-甲氧基苯基)丙酸甲酯 (ss-2), 其为无色油状物 (429 毫克, 产率 75%)。 $^1\text{H NMR}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  10.4(s, 1H), 7.65(s, 1H), 7.40(dd,  $J=6.3, 1.6\text{Hz}$ , 1H), 6.92(d,  $J=6.4\text{Hz}$ , 1H), 3.91(s, 3H), 3.66(s, 3H); 2.92(t,  $J=5.6\text{Hz}$ , 2H), 2.61(t,  $J=5.6\text{Hz}$ , 2H);  $^{13}\text{C NMR}$  (100MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  189.7, 173.0, 160.4, 135.9, 132.7, 127.8, 124.6, 111.8, 55.7, 51.6, 35.4, 29.7; IR( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) 3055, 2945, 1734, 1682  $\text{cm}^{-1}$ ; LRMS(EI)  $m/z$ (%) 222( $\text{M}^+$ ; 61), 149(100); HRMS(EI): 对于  $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_4$ , 计算值: 222.0892, 测量值: 222.0892。

6) N,N-二乙基-5-[2-甲氧基-5-(3-甲氧基-3-氧代丙基)苯基]-10H-二吡咯甲烯 (dipyrin) -1,9-二甲酰胺 (ss-3) 的合成 (如图 6 所示)

在氩气气氛下将化合物 ss-1 (134 毫克, 0.81 毫摩尔) 和 ss-2 (90 毫克, 0.41 毫摩尔) 溶解在 30 毫升无水 1,2-二氯乙烷中。加入一滴 TFA (三氟乙酸), 加热回流所得溶液。当 TLC 监控 (二氧化硅;  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) 显示醛消耗完时, 加入 DDQ (2,3-二氯-5,6-二氧基-1,4-苯醌) (189 毫克, 0.81 毫摩尔) 在  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  中的溶液, 持续搅拌 15 分钟。用水洗涤反应混合物, 用  $\text{MgSO}_4$  干燥, 过滤, 蒸发。用硅胶柱色谱纯化粗化合物 (洗脱剂: 乙酸乙酯/二氯甲烷/正己烷 = 1/1/1), 得到化合物 ss-3, 其为棕红色油状物 (289 毫克, 67%)。  $^1\text{H NMR}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.27(dd,  $J=8.4, 1.9\text{Hz}$ , 1H), 7.07(d,  $J=1.9\text{Hz}$ , 1H), 6.92(d,  $J=8.4\text{Hz}$ , 1H), 6.62(d,  $J=4.3\text{Hz}$ , 2H), 6.45(d,  $J=4.3\text{Hz}$ , 2H); 3.72-3.60(m, 14H), 2.93(t,  $J=7.5\text{Hz}$ , 2H), 2.64(t,  $J=7.5\text{Hz}$ , 2H), 1.30-1.23(m, 12H);  $^{13}\text{C NMR}$  (75.5MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  172.8, 162.8, 155.7, 148.6, 141.7, 139.4, 131.5, 131.3, 129.8, 128.0, 125.1, 119.1, 111.0, 55.5, 51.3, 41.0(br), 35.5, 29.6, 12.5(br); IR( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) 3483, 2938, 1639  $\text{cm}^{-1}$ ; LRMS(EI)  $m/z$ (%) 534( $\text{M}^+$ ; 21), 463(100); HRMS(EI): 对于  $\text{C}_{30}\text{H}_{38}\text{N}_4\text{O}_5$ , 计算值: 534.2842, 测量值: 534.2842。

7) N,N-二乙基-8-[2-甲氧基-5-(3-甲氧基-3-氧代丙基)苯基]-4,4-二氟-4-硼-3a,4a,-二氮杂-s-引达省(indacene)-3,5-二甲酰胺(ss-4)的合成(如图7所示)

在氩气气氛下将化合物 ss-3 (100 毫克, 0.19 毫摩尔) 和三乙胺 (0.73 毫升, 5.2 毫摩尔) 溶解在 20 毫升无水二氯甲烷中, 室温下搅拌所得溶液 10 分钟。加入  $\text{BF}_3\text{-OEt}_2$  (0.73 毫升, 5.8 毫摩尔), 继续搅拌 40 分钟。用水和 2N NaOH 洗涤反应混合物。用  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  萃取水溶液。用  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  干燥合并的有机萃取液, 过滤, 蒸发。用硅胶柱色谱纯化粗化合物(洗脱剂: 乙酸乙酯/二氯甲烷 = 1/1), 得到化合物 ss-4, 其为橙色晶体(74 毫克, 产率 70%)。熔点: 77.0~77.9°C;  $^1\text{H}$  NMR(400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.33(dd,  $J=8.2, 2.2\text{Hz}$ , 1H), 7.12(d,  $J=2.2\text{Hz}$ , 1H), 6.98(d,  $J=8.5\text{Hz}$ , 1H), 6.78(d,  $J=4.2\text{Hz}$ , 2H), 6.44(d,  $J=4.2\text{Hz}$ , 2H), 3.73(s, 3H); 3.66(s, 3H), 3.58(q,  $J=7.1\text{Hz}$ , 4H), 3.29(q,  $J=7.1\text{Hz}$ , 4H), 2.95(t,  $J=7.5\text{Hz}$ , 2H), 2.64(t,  $J=7.5\text{Hz}$ , 2H), 1.25(t,  $J=7.1\text{Hz}$ , 6H), 1.10(t,  $J=7.1\text{Hz}$ , 6H);  $^{13}\text{C}$  NMR(100MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  172.7, 162.6, 155.4, 151.0, 145.1, 135.2, 131.9, 131.3, 131.2, 131.1, 121.9, 116.6, 111.3, 55.4, 51.4, 42.8, 38.4, 35.4, 29.5, 13.7, 11.9;  $^{19}\text{F}$  NMR(376.5MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  -144.2(m,  $J=30\text{Hz}$ ), -145.2(m,  $J=30\text{Hz}$ ); IR( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ )2980, 1734, 1640 $\text{cm}^{-1}$ ; LRMS(EI)  $m/z$ (%) 582( $\text{M}^+$ ; 21), 551(100); HRMS(EI):对于  $\text{C}_{30}\text{H}_{37}\text{BF}_2\text{N}_4\text{O}_5$ , 计算值: 582.2825, 测量值: 582.2831。

8) N,N-二乙基-8-[5-羧乙基-2-甲氧基苯基]-4,4-二氟-4-硼-3a,4a,-二氮杂-s-引达省-3,5-二甲酰胺(ss-5)的合成(如图7所示)

将化合物 ss-4 (100 毫克, 0.17 毫摩尔) 溶解在 3 毫升 THF 中, 然后加入 1 毫升甲醇和 1 毫升蒸馏水。加入一水合氢氧化锂(22 毫克, 0.52 毫摩尔), 持续搅拌 6 小时, 然后加入 1 毫升盐水。用 10 毫升  $\text{Et}_2\text{O}$  将所得溶液萃取 3 次。用  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  干燥合并的有机萃取液, 过滤, 蒸发。所得粗化合物无须进一步纯化, 直接用于下一步反应。

9) N,N-二乙基-8-[2-甲氧基-(4,4,4-三氟-3-氧代丁基)苯基]-4,4-二氟-4-硼-3a,4a,-二氮杂-s-引达省-3,5-二甲酰胺(ss-6)的合成(如图7所示)

将粗化合物 ss-5 (560 毫克, 约 1.0 毫摩尔) 溶解在 20 毫升无水二氯甲烷中, 然后在 0°C 和氩气气氛下加入草酰氯和一滴 DMF。然后在室温下搅拌所得反应混合物 30 分钟。蒸发溶剂, 在高真空条件下用泵抽掉痕量水和溶剂。然后, 将所得

固体重新溶解在 20 毫升无水二氯甲烷中。随后在 $-40^{\circ}\text{C}$ 和氩气气氛下加入三氟醋酐 (0.84 毫升, 6.0 毫摩尔) 和无水吡啶 (0.65 毫升, 8.0 毫摩尔)。然后在 $-20^{\circ}\text{C}$  搅拌反应混合物 4 小时。加入 5 毫升水, 使反应猝灭, 并用 20 毫升二氯甲烷萃取所得溶液 2 次。用  $\text{MgSO}_4$  干燥合并的有机萃取物, 过滤, 蒸发。用硅胶柱色谱纯化粗化合物 (洗脱剂: 乙酸乙酯/二氯甲烷 = 1/2), 得到化合物 ss-6, 其为红色晶体 (210 毫克, 约 34%)。熔点:  $83.6\sim 84.6^{\circ}\text{C}$ ;  $^1\text{H NMR}(300\text{MHz}, \text{CDCl}_3)$ :  $\delta$  7.32(d,  $J=8.6$ , 1H), 7.12(dd,  $J=6.5, 2.2\text{Hz}$ , 1H), 6.96(d,  $J=8.6\text{Hz}$ , 1H), 6.73(d,  $J=4.0\text{Hz}$ , 2H), 6.43(d,  $J=4.6\text{Hz}$ , 2H), 3.73(s, 3H); 3.59(q,  $J=7.2\text{Hz}$ , 4H), 3.31(q,  $J=7.2\text{Hz}$ , 4H), 3.06-3.00(m, 2H), 2.83-2.77(m, 1H), 2.08-2.03(m, 1H), 1.25(t,  $J=7.1\text{Hz}$ , 6H), 1.09(t,  $J=7.1\text{Hz}$ , 6H);  $^{13}\text{C NMR}(100\text{MHz}, \text{CDCl}_3)$ :  $\delta$  190.4(q,  $J_{\text{C-F}}=35.4\text{Hz}$ ), 162.9, 155.8, 151.2, 145.0, 135.3, 131.4, 131.2, 122.3, 116.8, 111.6(q,  $J_{\text{C-F}}=285\text{Hz}$ ), 55.6, 43.0, 38.7, 37.8, 36.1, 29.6, 27.2, 13.8, 12.0;  $^{19}\text{F NMR}(376.5\text{MHz}, \text{CDCl}_3)$ :  $\delta$  -79.3(m,  $J=11\text{Hz}$ ), -144.0(m,  $J=30\text{Hz}$ ), -145.3(m,  $J=30\text{Hz}$ ); IR( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) 2980, 1639, 1565  $\text{cm}^{-1}$ ; LRMS(EI)  $m/z$ (%) 620( $\text{M}^+$ ; 30), 589(100); HRMS(EI): 对于  $\text{C}_{30}\text{H}_{34}\text{BF}_5\text{N}_4\text{O}_4$ , 计算值: 620.2593, 测量值: 620.2598。

## 实施例 2

### 1) ss-6 的荧光光谱

将实施例 1 中得到的化合物 ss-6 溶解于  $\text{CH}_3\text{CN}$  至浓度为 2mM, 然后向该溶液中加入 100mM 磷酸钠缓冲液 (pH 7.4) 使其溶解, 终浓度为 20 $\mu\text{M}$ 。用 Perkin Elmer LS50 荧光光谱仪测定 20 $\mu\text{M}$  ss-6 溶液的激发光谱和荧光光谱。用于测定激发光谱和荧光光谱的狭缝宽度均为 5 纳米, 光电倍增管电压为 775 伏。在 515 纳米的激发光波长处进行测定。所得结果示于图 8。

为了研究 ss-6 与过亚硝酸根 ( $\text{ONOO}^-$ ) 之间的反应, 按照 Keith 和 Powell (Keith, W.G. & Powell, R.E.; *Kinetics of decomposition of peroxyntrous acid*; J. Chem. Soc. A., 1969, 1, 90) 的方法制备  $\text{ONOO}^-$  溶液。简而言之, 用盐酸 (0.6 摩尔/升) 酸化亚硝酸钠 (0.6 摩尔/升) 和过氧化氢 (0.7 摩尔/升) 的混合物, 在 1~2 秒内加入氢氧化钠 (1.5 摩尔/升) 以中和酸, 使溶液呈碱性。使该溶液通过二氧化锰, 以驱除过量的过氧化氢。然后冷冻该溶液, 分离出富含过亚硝酸根的暗黄色溶液, 用于以下所有试验。



利用  $1670 \text{ 厘米}^{-1}$  (摩尔/升) $^{-1}$  的消光系数 (302 纳米处) 估测所用储备溶液中过亚硝酸根的浓度 (Hughes & Nicklin; *The chemistry of pernitrites. Part I. Kinetics of decomposition of pernitrous acid; J. Chem. Soc. A., 1968, 2, 450-452*)。所制备的过亚硝酸盐溶液的碱性一般非常强 (pH 12)。当加入大量的过亚硝酸盐时, 在实验当天中和部分过量的碱。在研究开始和结束时, 都要检查该较低碱性的过亚硝酸盐溶液的吸光率, 以确定过亚硝酸根在所需孵育时间内没有分解。还要定期检查孵育管, 以确信加入过亚硝酸盐后, 最终的 pH 没有变化。

随后在室温和剧烈搅拌下, 向  $20 \mu\text{M}$  ss-6 溶液中缓慢加入不同浓度的 15 当量  $\text{ONOO}^-$  溶液。体积变化不得超过 1%。30 分钟后测定荧光强度的变化, 结果示于图 9。反应完成后, 利用上述相同条件测定溶液的激发光谱和荧光光谱。与图 8 相比, 可以看到荧光强度急剧增加。

## 2) ss-6 的紫外 - 可见光吸收光谱

将化合物 ss-6 溶解于二氯甲烷至浓度为  $20 \mu\text{M}$ , 测定所得  $20 \mu\text{M}$  ss-6 溶液的吸收光谱, 结果示于图 10。该结果证实了 ss-6 在 515 纳米附近有最大吸光度。

## 实施例 3 — 比较 ss-6 与不同活性氧中间体的专一性

将实施例 1 中得到的化合物 ss-6 溶解于  $\text{CH}_3\text{CN}$  至浓度为  $2 \text{mM}$ , 然后向所得溶液中加入  $100 \text{mM}$  磷酸钠缓冲液 (pH 7.4) 使其溶解, 终浓度为  $20 \mu\text{M}$ 。将 50 微升不同的活性氧中间体 (10 当量) 分别加入 5 毫升相应的 ss-6 溶液中。测定处理前后荧光强度的变化, 在实施例 2 中所述相同条件下测定荧光强度。上述荧光探针的浓度均为  $20 \mu\text{M}$  ( $100 \text{mM}$  磷酸钠缓冲液, pH 7.4)。结果示于表 1。结果证实了 ss-6 具有非常高的选择性。

表 1

ROS 探针	$\text{ONOO}^-$	SIN-1 <sup>a</sup>	$\cdot\text{OH}^b$	$^1\text{O}_2^c$	$\text{O}_2^{\cdot-}d$	$\text{H}_2\text{O}_2^e$
ss-6	750%	166%	2%	3%	-1%	-5%

(a) SIN-1 在缓冲液中能缓慢产生  $\text{ONOO}^-$ 。

(b) 加入  $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_2$  (25 微升,  $40 \text{mM}$  在缓冲液中) 和  $\text{H}_2\text{O}_2$  (25 微升,  $80 \text{mM}$ )。

(c) 在  $37^\circ\text{C}$  下加入 [3-(1,4-二氢-1,4-桥二氧-1-萘基)]丙酸 (50 微升,  $20 \text{mM}$ )。

(d) 首先加入黄嘌呤氧化酶, 待所有 XO 溶解后, 加入黄嘌呤 (50 微升,  $20 \text{mM}$ )。

#### 实施例 4 — ss-6 对过亚硝酸根的专一性检测

将实施例 1 中得到的化合物 ss-6 溶解于 CH<sub>3</sub>CN 至浓度为 2mM, 然后向该溶液中加入 100mM 磷酸钠缓冲液 (pH 7.4) 使其溶解, 终浓度为 20 $\mu$ M。然后加入过亚硝酸根, 使其终浓度达到 0、20、60、100、200、240 和 300 $\mu$ M, 30 分钟后测定荧光光谱。在与实施例 2 中相同的条件下测定荧光光谱, 结果示于图 11。从图 11 可清楚看到, ss-6 极大提高了荧光强度, 且荧光强度与 ONOO<sup>-</sup> 的浓度具有良好的线性关系 (如图 12 所示)。

以下实施例详细描述了通式 (III) 所示化合物的制备和使用方法。该详述落入上述“通用合成程序”的范围之内, 并起示例作用, 而所述“通用合成程序”构成本发明的一部分。这些实施例仅用于说明目的, 无意本限制发明的范围。

#### 实施例 5 — ss-12 的合成方案

##### 1) ss-7 的合成 (如图 13 所示)

向 2,7-二氯荧光素 (1.0 克, 2.5 毫摩尔) 的 DMF (二甲基甲酰胺) 溶液中加入烯丙基溴 (0.47 毫升, 5.0 毫摩尔)。在 60 $^{\circ}$ C 下搅拌反应混合物 3 小时后, 加水, 形成红色固体。过滤得到化合物 ss-7, 产率大于 99%。<sup>1</sup>H NMR(300MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  8.33(d, J=7.6, 1H), 7.78(t, J=7.3Hz, 1H), 7.74(t, J=7.3Hz, 1H), 7.30(d, J=7.3Hz, 1H), 7.03(d, J=2.8Hz, 2H), 6.96(s, 1H); 6.58(s, 1H), 6.12-6.00(m, 1H), 5.74-5.58(m, 1H), 5.56-5.38(m, 2H), 5.21-5.13(m, 2H), 4.75(d, J=6.2Hz, 2H), 4.53(d, J=5.8Hz, 2H); <sup>13</sup>C NMR(75MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  177.71, 164.54, 158.16, 157.79, 152.35, 149.52, 135.28, 133.55, 133.12, 131.59, 131.05, 130.97, 130.38, 130.27, 130.13, 128.03, 127.29, 120.43, 119.29, 119.08, 117.71, 115.04, 105.67, 101.14, 70.35, 66.10; IR(CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) 1718, 1589 cm<sup>-1</sup>; LRMS(EI) m/z(%) 480(M<sup>+</sup>; 100); HRMS(EI): 对于 C<sub>26</sub>H<sub>17</sub>C<sub>12</sub>O<sub>5</sub>, 计算值: 480.0453, 测量值: 480.0447。

##### 2) ss-8 的合成 (如图 14 所示)

将化合物 ss-7 (1.2 克, 2.5 毫摩尔) 溶解在丙酮 (50 毫升) 与 NaOH (1.25M, 50 毫升) 的混合物中, 将所得溶液加热至回流, 并保持 1 小时。冷却到室温后, 在反应混合物中加入 1N 盐酸, 以将溶液中和到 pH 2。加入乙酸乙酯进行萃取。有机层用盐水洗涤, 用硫酸钠干燥, 真空蒸发。用硅胶柱色谱纯化残留物, 得到化合物 ss-8 (760 毫克, 产率 68%)。<sup>1</sup>H NMR(400MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  8.30(br, 1H),

8.07 (d, J=7.1Hz, 1H), 7.72(t, J=7.3Hz, 1H), 7.68(t, J=7.3Hz, 1H), 7.16(d, J=7.4Hz, 1H), 6.91(s, 1H); 6.80(s, 1H), 6.73(s, 1H), 6.71(s, 1H), 6.10-6.03(m, 1H), 5.48(d, J=17.2Hz, 1H), 5.36(d, J=10.5Hz, 1H), 4.12(d, J=7.2Hz, 2H);  $^{13}\text{C}$  NMR(100MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  168.27, 155.21, 155.04, 151.51, 150.30, 149.98, 135.96, 132.59, 130.59, 128.27, 128.09, 125.83, 125.18, 123.95, 118.10, 117.26, 116.44, 111.48, 110.34, 103.62, 102.39, 81.23, 69.53; IR( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) 2955, 1771, 1597  $\text{cm}^{-1}$ ; LRMS(EI) m/z(%) 440( $\text{M}^+$ ; 3), 361(100); HRMS(EI):对于  $\text{C}_{23}\text{H}_{14}\text{Cl}_2\text{O}_5$ , 计算值: 440.0218, 测量值: 440.0222.

### 3) ss-9的合成(如图15所示)

在室温下, 在叔丁醇钾(230毫克, 2.0毫摩尔)在苯(8毫升)和甲醇(3毫升)的混合物中形成的溶液中加入 ss-8。当固体完全溶解后, 真空蒸发溶剂, 得到相应的钾盐。然后, 加入  $\text{CuCl}$ (204毫克, 1.9毫摩尔)和溶于吡啶(9毫升)中的化合物 ss-8(980毫克, 3.4毫摩尔)。所得混合物在氩气下回流24小时。冷却到室温后, 反应混合物用  $\text{HCl}$  水溶液酸化。用乙酸乙酯萃取所得混合物。有机层用盐水洗涤, 用硫酸钠干燥, 真空蒸发。用硅胶柱色谱纯化残留物, 得到化合物 ss-9(200毫克, 产率20%)。  $^1\text{H}$  NMR(300MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8.07(d, J=6.6Hz, 1H), 7.74(t, J=7.3Hz, 1H), 7.71(t, J=7.3Hz, 1H), 7.24(d, J=8.3Hz, 2H), 7.18(d, J=7.0Hz, 1H), 7.00(d, J=8.4Hz, 2H); 6.82(s, 1H), 6.74(s, 1H), 6.73(s, 1H), 6.71(s, 1H), 6.08-6.01(m, 1H), 5.46(d, J=17.2Hz, 1H), 5.34(d, J=10.5Hz, 1H), 4.62(d, J=5.0Hz, 2H), 3.70(s, 3H), 2.98(t, J=7.5Hz, 2H), 2.66(t, J=7.5Hz, 2H);  $^{13}\text{C}$  NMR(75MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  173.16, 168.74, 155.62, 155.33, 153.67, 151.91, 150.43, 150.37, 137.21, 135.51, 131.65, 130.38, 129.94, 129.36, 128.74, 126.34, 125.50, 123.81, 119.78, 118.83, 118.47, 115.29, 114.10, 111.32, 106.29, 101.52, 81.53, 69.83, 51.68, 35.64, 30.19; IR( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) 3055, 2928, 1765, 1589, 1475, 1412  $\text{cm}^{-1}$ ; LRMS(EI) m/z(%) 602( $\text{M}^+$ ; 100); HRMS(EI):对于  $\text{C}_{33}\text{H}_{24}\text{Cl}_2\text{O}_7$ , 计算值: 602.0899, 测量值: 602.0890.

### 4) ss-10的合成(如图16所示)

在室温下, 向化合物 ss-9(874毫克, 1.44毫摩尔)在 THF(10毫升)和水(3毫升)中的溶液里加入  $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (300毫克, 7.2毫摩尔)。在  $40^\circ\text{C}$  下搅拌

3 小时后, 用 1N 盐酸酸化反应混合物。用 NaCl 使所得溶液达到饱和, 并用乙酸乙酯进行萃取。用无水硫酸钠干燥合并的有机层, 浓缩得到 ss-10 (500 毫克, 产率 60%)。<sup>1</sup>H NMR(400MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.30(br, 1H), 8.08 (d, J=7.3Hz, 1H), 7.74(t, J=7.3Hz, 1H), 7.70(t, J=7.3Hz, 1H), 7.26(d, J=8.3Hz, 2H), 7.18(d, J=7.0Hz, 1H); 7.01(d, J=8.4Hz, 2H), 6.82(s, 1H), 6.74(s, 1H), 6.73(s, 1H), 6.71(s, 1H), 6.06-6.00(m, 1H), 5.46(d, J=17.2Hz, 1H), 5.33(d, J=10.5Hz, 1H), 4.61(d, J=5.0Hz, 2H), 2.99(t, J=7.5Hz, 2H), 2.72(t, J=7.5Hz, 2H); <sup>13</sup>C NMR(75MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 177.77, 168.81, 155.67, 155.30, 154.83, 151.93, 150.46, 150.42, 136.87, 135.55, 131.67, 130.42, 129.97, 129.41, 128.78, 126.38, 125.55, 123.83, 119.80, 118.89, 118.50, 115.37, 114.21, 111.35, 106.42, 101.56, 81.59, 69.87, 35.76, 29.93; IR(CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) 3421, 3055, 1765, 1624, 1416cm<sup>-1</sup>; FAB m/z 589(M<sup>+</sup>); HRMS(EI): 对于 C<sub>32</sub>H<sub>22</sub>Cl<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 计算值: 589.0821, 测量值: 589.0820。

#### 5) ss-11 的合成 (如图 17 所示)

在化合物 ss-10 (490 毫克, 0.83 毫摩尔) 的 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (15 毫升) 溶液中加入将草酰氯 (0.22 毫升, 2.5 毫摩尔), 在室温下搅拌所得溶液 3 小时。减压蒸发掉溶剂和过量的草酰氯。将所得酰基氯溶解在 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 毫升) 中, 然后在氮气下于 -40℃ 加入三氟醋酐 (0.7 毫升, 5 毫摩尔) 和吡啶 (0.54 毫升, 7 毫摩尔)。使所得混合物缓慢升温到 -20℃, 在该温度下持续搅拌 4 小时。缓慢加水, 使反应猝灭。用盐水洗涤反应混合物。用无水硫酸钠干燥有机层并浓缩。用快速柱色谱纯化残留物, 得到 ss-11, 其为黄色固体 (240 毫克, 产率 45%)。熔点: 85.0~86.1℃; <sup>1</sup>H NMR(400MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.08(d, J=7.4Hz, 1H), 7.76-7.68(m, 2H), 7.26(d, J=8.5Hz, 2H), 7.18(d, J=7.4Hz, 1H), 7.02(d, J=8.4Hz, 2H), 6.83(s, 1H); 6.74(s, 1H), 6.73(s, 1H), 6.71(s, 1H), 6.07-6.00(m, 1H), 5.46(d, J=17.2Hz, 1H), 5.33(d, J=10.5Hz, 1H), 4.62(d, J=4.4Hz, 2H), 3.10-3.07(m, 2H), 3.04-3.00(m, 2H); <sup>13</sup>C NMR(101MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 190.5(q, J<sub>C-F</sub>=35.3Hz), 168.72, 155.67, 155.09, 154.12, 151.91, 150.43, 150.41, 135.79, 135.53, 131.66, 130.41, 129.97, 129.44, 128.76, 126.36, 125.52, 123.81, 120.07, 119.82, 118.92, 118.47, 115.70(q, J<sub>C-F</sub>=292Hz), 114.41, 111.34, 106.60, 101.55, 81.49, 69.86, 37.99, 27.61; <sup>19</sup>F(376MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ -79.18; IR(CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) 3055, 1765, 1597, 1475, 1402cm<sup>-1</sup>; LRMS(EI) m/z (%) 640(M<sup>+</sup>),

561(100); HRMS(EI):对于  $C_{33}H_{21}Cl_2F_3O_6$ , 计算值: 640.0665, 测量值: 640.0667.

#### 6) ss-12 的合成 (如图 18 所示)

向化合物 ss-11 (260 毫克, 0.4 毫摩尔) 在混合溶剂  $CH_3CN$  (4 毫升)、 $CCl_4$  (4 毫升) 和水 (6 毫升) 中形成的溶液里依次加入催化剂  $RuCl_3 \cdot 3H_2O$  (5 毫克) 和  $NaIO_4$  (865 毫克, 4.0 毫摩尔)。在室温下剧烈搅拌所得混合物 1 小时, 然后加入  $CH_2Cl_2$ 。分离有机层, 用无水硫酸钠干燥, 浓缩后得到残留物。用快速柱色谱纯化残留物, 得到化合物 ss-12 (214 毫克, 产率 80%)。熔点:  $105.0 \sim 106.0^\circ C$ ;  $^1H$  NMR(400MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  8.09(d,  $J=7.2Hz$ , 1H), 7.76-7.71(m, 2H), 7.24(d,  $J=8.5Hz$ , 2H), 7.18(d,  $J=7.4Hz$ , 1H), 7.01(d,  $J=8.5Hz$ , 2H), 6.83(s, 1H); 6.78(s, 1H), 6.71(s, 1H), 6.67(s, 1H), 4.76(d,  $J=2.5Hz$ , 2H), 3.08(t,  $J=6.2Hz$ , 2H), 3.02(t,  $J=6.2Hz$ , 2H);  $^{13}C$  NMR(75MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  190.48(q,  $J_{C-F}=35.3Hz$ ), 172.44, 168.82, 155.23, 154.72, 153.97, 151.77, 150.32, 150.24, 135.88, 135.64, 130.51, 129.99, 129.40, 129.24, 126.21, 125.59, 123.82, 120.16, 119.87, 118.94, 115.46(q,  $J_{C-F}=292.2Hz$ ), 114.13, 112.71, 106.44, 101.67, 81.34, 65.49, 37.96, 27.57; IR( $CH_2Cl_2$ ) 3420, 3055, 1765, 1610, 1408  $cm^{-1}$ ; LRMS(EI) m/z (%) 614( $M^+-COOH$ ; 19), 579(100); HRMS(EI):对于  $C_{31}H_{18}Cl_2F_3O_6$ , 计算值: 613.0433, 测量值: 613.0469.

#### 实施例 6

##### 1) ss-12 的荧光光谱

将实施例 5 中得到的化合物 ss-12 溶解于  $CH_3CN$  至浓度为 2mM, 然后向所得溶液中加入 100mM 磷酸钠缓冲液 (pH 7.4) 使其溶解, 终浓度为 20 $\mu$ M。用 Perkin Elmer® LS50 荧光光谱仪测定 20 $\mu$ M ss-12 溶液的激发光谱和荧光光谱。用于测定激发光谱和荧光光谱的狭缝宽度均为 2.5 纳米, 光电倍增管电压为 775 伏。在 490 纳米的激发光波长处进行测定。所得结果示于图 19。

随后在室温和剧烈搅拌下, 向 20 $\mu$ M ss-12 溶液中缓慢加入不同浓度的 15 当量 ONOO $^-$  溶液。体积变化不得超过 1%。30 分钟后测定荧光强度的变化, 结果示于图 20。反应完成后, 利用上述相同条件测定溶液的激发光谱和荧光光谱。与图 19 相比, 可以看到荧光强度急剧增加。

##### 2) ss-12 的紫外 - 可见光吸收光谱

将化合物 ss-12 溶解于二氯甲烷至浓度为 20 $\mu$ M，测定所得的 20 $\mu$ M ss-12 溶液的吸收光谱，结果示于图 21。结果表明，ss-12 在 460 纳米和 490 纳米附近有两个吸收峰。

#### 实施例 7 — 比较 ss-12 与不同活性氧中间体的专一性

将实施例 5 中得到的化合物 ss-12 溶解于 CH<sub>3</sub>CN 至浓度为 2mM，然后向该溶液中加入 100mM 磷酸钠缓冲液 (pH 7.4) 使其溶解，终浓度为 20 $\mu$ M。将 50 微升不同的活性氧中间体 (10 当量) 分别加入到 5 毫升相应的 ss-12 溶液中。测定处理前后荧光强度的变化，在实施例 2 中所述相同条件下测定荧光强度。上述荧光探针的浓度均为 20 $\mu$ M (100mM 磷酸钠缓冲液, pH 7.4)。结果示于表 2。结果证实了 ss-12 具有非常高的选择性。

表 2

ROS 探针	ONOO <sup>-</sup>	<sup>1</sup> O <sub>2</sub> <sup>a</sup>	O <sub>2</sub> <sup>-a</sup>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> <sup>a</sup>	NO <sup>b</sup>
ss-12	579%	7%	9%	-3%	2%

(a)请参见实施例 3 表 1 中 ROS 的产生过程。

(b)通过 SNP(二水合亚硝基铁(III)氰化钠)产生 NO(Feelisch M., *Eur Heart J.* 1993, 14, 123-132)。

#### 实施例 8 — ss-12 对过亚硝酸根的专一性检测

将实施例 5 中得到的化合物 ss-12 溶解于 CH<sub>3</sub>CN 至浓度为 2mM，然后向该溶液中加入 100mM 磷酸钠缓冲液 (pH 7.4) 使其溶解，终浓度为 20 $\mu$ M。然后加入过亚硝酸根，使其终浓度达到 0、20、60、100、200、240 和 300 $\mu$ M，30 分钟后测定荧光光谱。在与实施例 6 中相同的条件下测定荧光光谱，结果示于图 22。从图 22 可清楚看到，ss-12 极大提高了荧光强度，且荧光强度与 ONOO<sup>-</sup> 的浓度具有良好的线性关系 (如图 23 所示)。

#### 实施例 9 — 细胞试验

在该研究的整个过程中，由胚龄为 15 天的 Sprague-Dawley 大鼠制备原代培养的皮质神经元。简而言之，在聚-L-赖氨酸包被的 6 孔板上 (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) 上用 Neurobasal/2% B27 (Gibco-BRL, Grand Island, NY) 平板培养 (plated) 解离的细胞悬浮体，密度为 2 $\times$ 10<sup>6</sup> 个细胞/孔，所述 Neurobasal/2% B27 中有含谷氨酸 (0.5mM, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO)、青霉

素 (100U/mL) 和链霉素 (100 $\mu$ g/mL)。在 5% CO<sub>2</sub>-95% 空气和 37 $^{\circ}$ C 条件下, 将细胞保持在增湿孵育器中。在第 10 天, 将培养的皮质细胞用于实验。用浓度为 20 $\mu$ M 的 ss-6 和 ss-12 在孵育所述经过原代培养的神经元细胞 15 分钟, 然后用磷酸钠缓冲液 (100mM, pH 7.4) 洗涤 3 次。随后, 分别用 10 和 100 $\mu$ M SIN-1 (3-吗啉代-斯德酮亚胺·盐酸) 处理细胞 15 分钟。用磷酸钠缓冲液 (100mM, pH 7.4) 洗涤后, 在荧光显微镜下观察细胞。结果表明, 探针在测定分子内 ONOO<sup>-</sup> 的产生方面给出了令人满意的结果 (如图 24 所示)。

### 参考文献

1. PCT 国际公开 WO 01/64664, 公开于 2001 年 9 月 7 日 (Nagano 等)。
2. PCT 国际公开 WO 2004040296, 公开于 2004 年 5 月 31 日 (Nagano 等)。
3. Augusto, O.; Radi, R. Gatti, R.M.; Vasquez-Vivar, J. *Methods Enzymol.* 1996, 269, 346-354.
4. Beal, M.F., *Free Radical Biol. & Med.* 2002, 32, 392.
5. Beckman, J. S., *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 1996, 271, C1424.
6. Beckman J. S., Ischiropoulos H, Zhu L, van der Woerd M, Smith C, Chen J, Harrison J, Martin J.C. and Tsai M., *Arch Biochem. Biophys.*, 1992, 298, 438-445.
7. Crow, J. P., *Nitric Oxide.* 1997, 1, 145-157.
8. Cuzzocrea, S., Riley, D. P., Caputi, A. P., Salvemini, D., *Pharmacol Rev.* 2001, 53, 135
9. Feelisch M., *Eur Heart J.* 1993, 14, 123-132.
10. Gatti, R. M., Alvarez, B., Vasquez-Vivar, J., Radi, R., Augusto, O., *Arch. Biochem. Biophys.* 1998, 349, 36-46.
11. Gatti, R. M., Radi, R., Augusto, O., *FEBS Lett.*, 1994, 348, 287-290.
12. Groves, J. T., *Curr. Opin. Chem. Biol.* 1999, 3, 226.
13. Gryglewski, R., *Nature* 1986, 320, 454.
14. Hughes, M. N., Nicklin, H. G., *J. Chem. Soc. A.*, 1968, 2, 450-452.
15. Ischiropoulos, H., *Arch. Biochem. Biophys.* 1998, 356, 1-11.
16. Ischiropoulos, H., Gow, A., Thom, S. R., Kooy, N. W., Royall, J. A., Ceow,

**J.P., Methods Enzymol. 1999, 301, 367-373.**

**17. John, E. T. Corrie, David R. Trentham, J. Chem. Soc., Perkin Trans I., 1995, 1993.**

**18. Kaur, H., Halliwell, B., FEBS Lett. 1994, 350, 9-12.**

**19. Keith, W.G., Powell, R.E., J. Chem. Soc. A., 1969, 1, 90.**

**20. Kooy, N. W., Royall, J. A., Ischiropoulos, H., Beckman, J. S., Free Radic. Biol. Med. 1994, 16, 149-156.**

**21. Kooy, N. W., Royall, J. A., Ischiropoulos, H., Free Radic. Biol. Med. 1997, 27, 245-254.**

**22. Koppenol, W. H., Redox Report 2001, 6, 339-341.**

**23. Lipton, S. A., Chol, Y.-B, Pan, Z.-H, Lei, S. -Z., Chen, H.-S.V., Sucher, N. J., Loscanizo, J., 24, Singel, D. J., Stamier, J. S., Nature 1993, 364, 626.**

**24. Mematt, M., Geert-Jan Boons., , Eur. J. Org. Chem. 2001, 2535-2545.**

**25. MacMillan-Crow, L. A; Crow, J. P.; Kerby, J. D.; Beckman, J. S.; Thomson, J.A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1996, 93, 11853.**

**26. Miles, A. M.; Bohle, D. S.; Glassbrenner, P. A.; Hansert, B.; Wink, D. A.; Grisham, M. S., J. Biol. Chem. 1996, 271, 40-47.**

**27. Nagano, T.; Gabe, Y.; Urano, Y.; Kikuchi K.; Kojima H., J. Am. Chem. Soc. 2004, 126, 3357-3367**

**28. Pappolla, M. A.; Chyan, Y.-J.; Poeggeler, B.; Frangione, B.; Wilson, G.; Ghiso, J.; Reiter, R. J., J. Neural Transm. 2000, 107, 203.**

**29. Radi, R., Chem. Res. Toxicol. 1998, 11, 720-721.**

**30. Radi, R.; Beckman, J. S.; Bush, K. M.; Freeman, B. A., Arch Biochem. Biophys., 1991, 288, 481.**

**31. Radi, R.; Beckman, J. S.; Bush, K. M. and Freeman, B. A., J. Biol. Chem., 1991, 266, 4244-4250.**

**32. Radi, R.; Peluffo, G.; Alvarez, M. N.; Naviliat, M.; Cayota, A, Free Radical Biol. & Med. 2001, 30, 463-488.**

**33. Rodenas, J.; Carbonell, T.; Mitjavila, M. T., Free Radical. Biol. & Med. 2000, 28, 374.**



- 
34. Romero, N.; Denicola, A.; Souza, J. M.; Radi, R., *Arch. Biochem. Biophys.*, 1999, 368, 23-30.
  35. Royall, J. A.; Ischiropoulos, H., *Arch. Biochem. Biophys.* 1993, 302, 348-355.
  36. Rychnovsky, S. D.; Skalitzky, D. J.; Pathirana, C.; Jensen, P. R.; Fenical, W., *J. Am. Chem. Soc.* 1992, 114, 671-677.
  37. Setsukinai, K.; Urano, Y.; Kakinuma, K; Nagano, T., *J. Biol. Chem.* 2003, 278, 3170-3175.
  38. Shi, H.; Noguchi, N.; Xu, Y.; Niki, E., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1999, 257, 651.
  39. Squadrito, G. L. and Pryor, W. A., *Free Radical Biol. & Med.* 1998, 25, 797.
  40. Szabo, C. *Toxicol. Lett.* 2003, 140, 105.
  41. Tarpey, M. M.; Fridovich, I., *Circ. Res.* 2001, 89, 224-236.
  42. White, C. R.; Brock, T. A.; Chang, L. Y.; Crapo, J.; Briscoe, P.; Ku, D.; Bradley, W. A.; Gianturco, S. H.; Gore, J.; Freeman, B. A.; Tarpey, M. M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994, 91, 1044.
  43. Yang, D.; Wong, M.-K.; Yan, Z.; *J. Org. Chem.*, 2000, 65, 4179-4184.
  44. *Handbook of Fluorescent Probes and Research Products*, 9th Edition, Molecular Probes, Eugene, Oregon, Haughland, 2003.
  45. *Protective Groups in Organic Synthesis*, Greene, T. W., John Wiley & Sons, Inc., 1999.

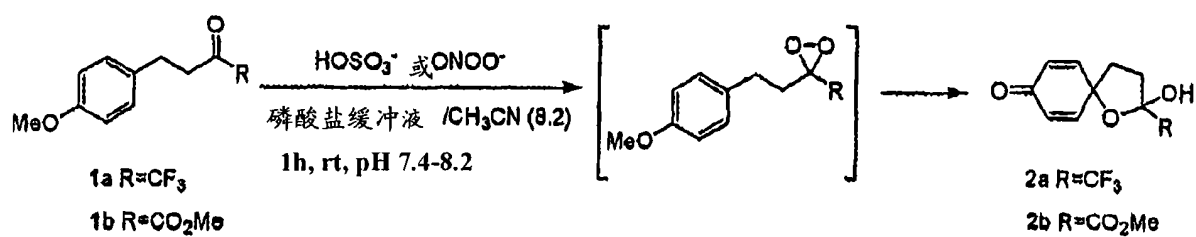


图 1

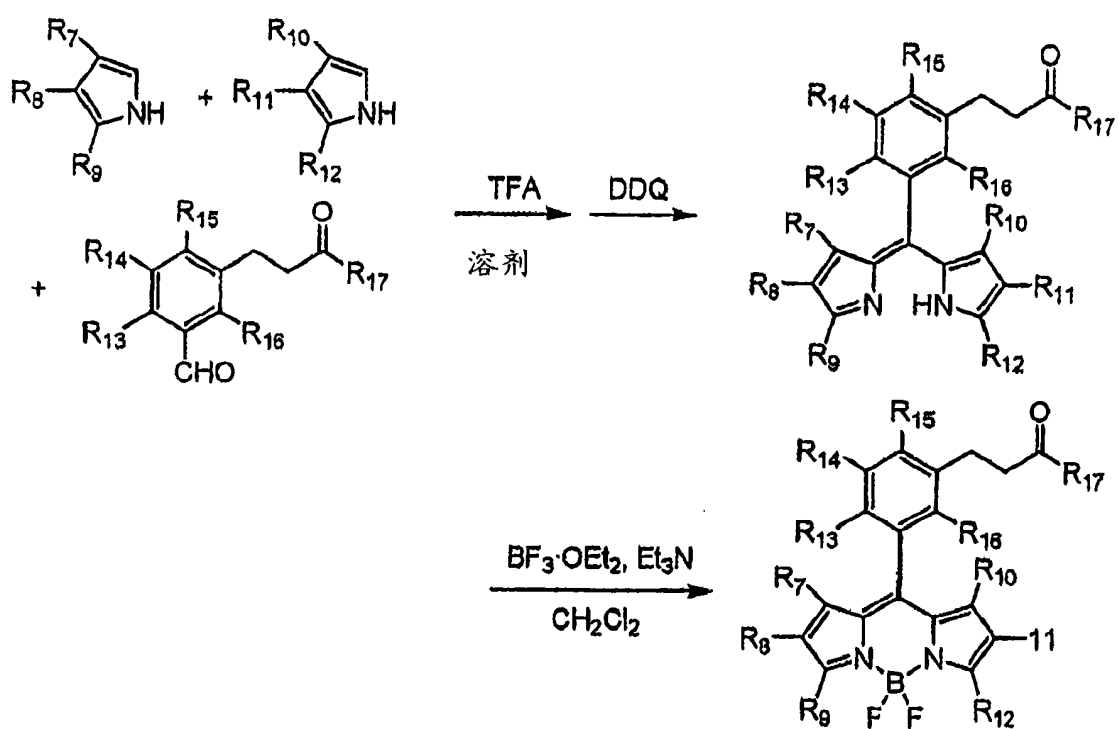


图 2

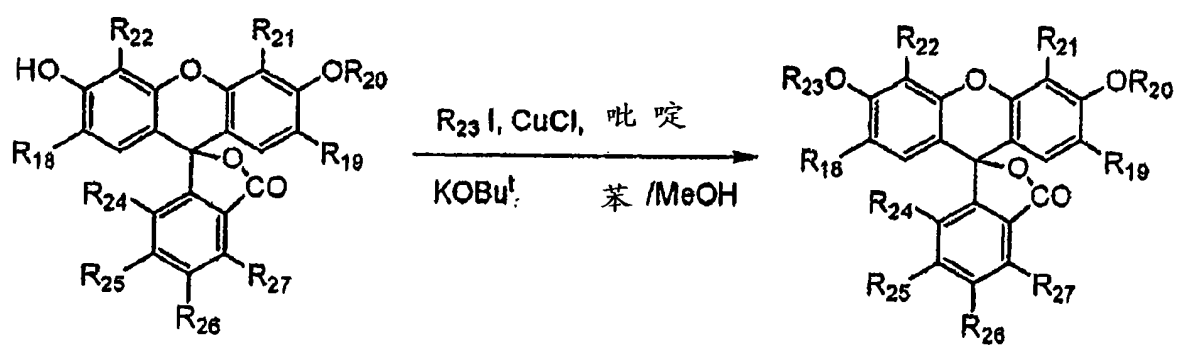


图 3

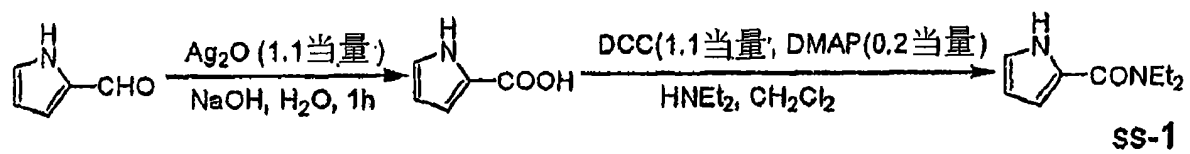


图 4

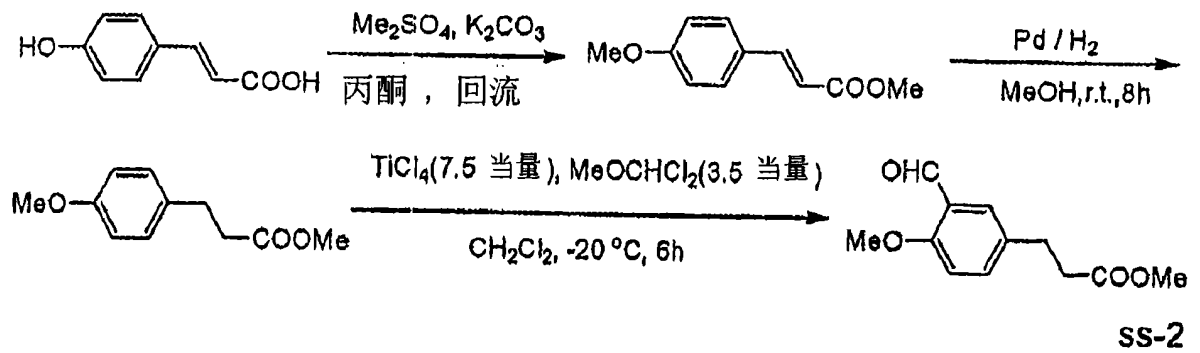


图 5

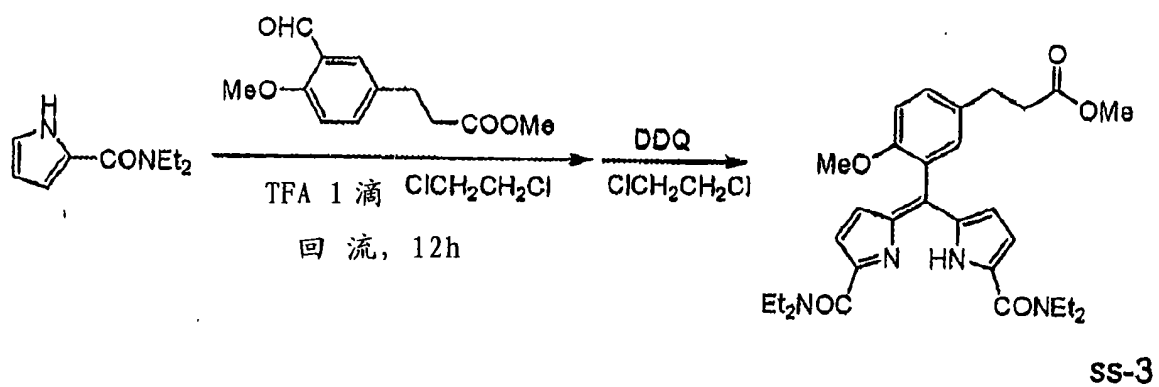


图 6

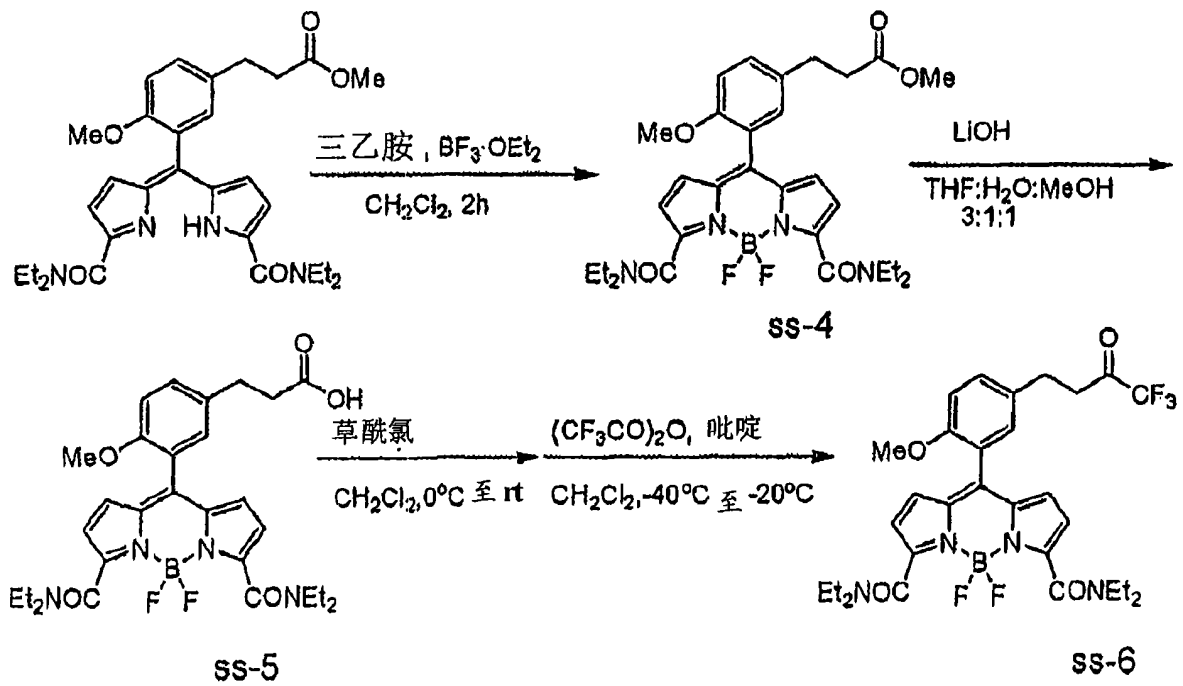
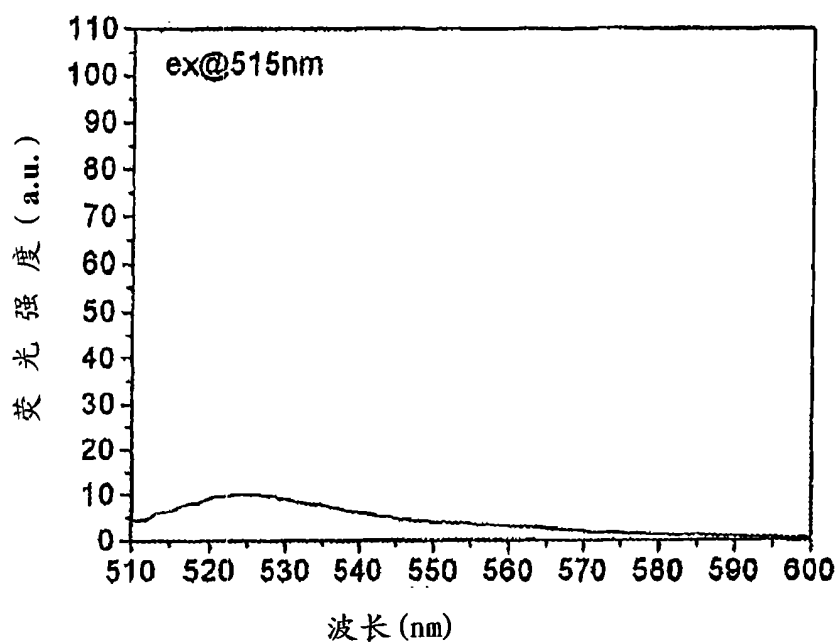


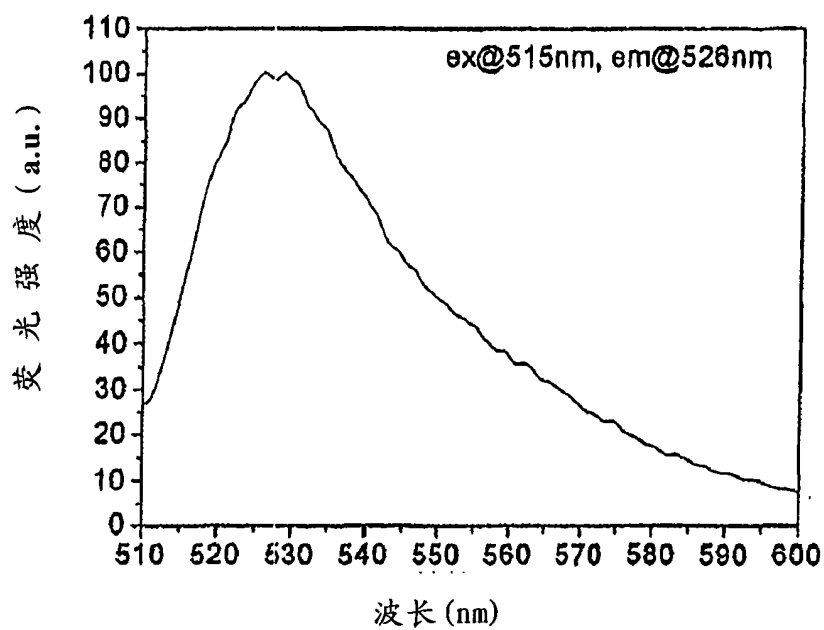
图 7





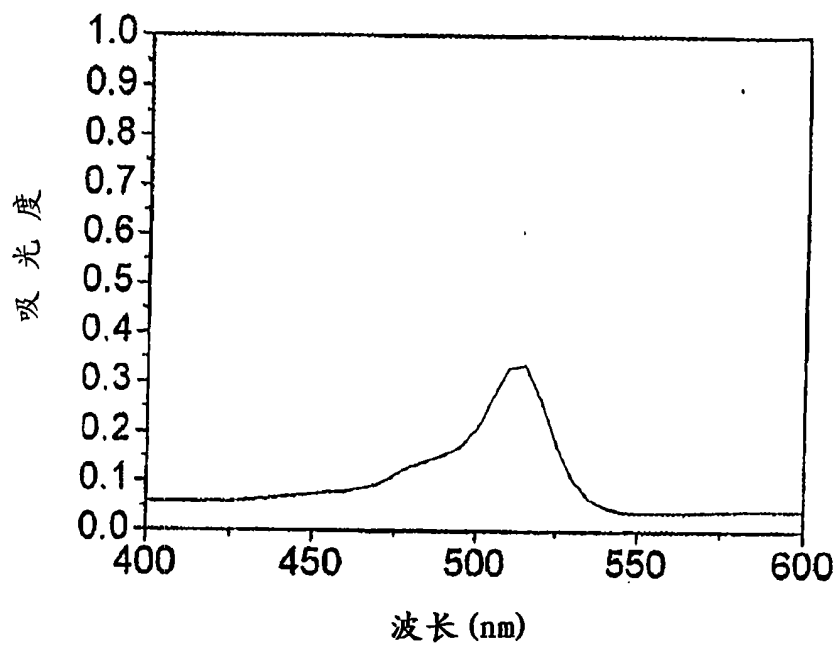
0.1M 磷酸钠缓冲液(pH7.4)中的 ss-6(20 $\mu$ M, 1% CH<sub>3</sub>CN)的发射光谱

图 8



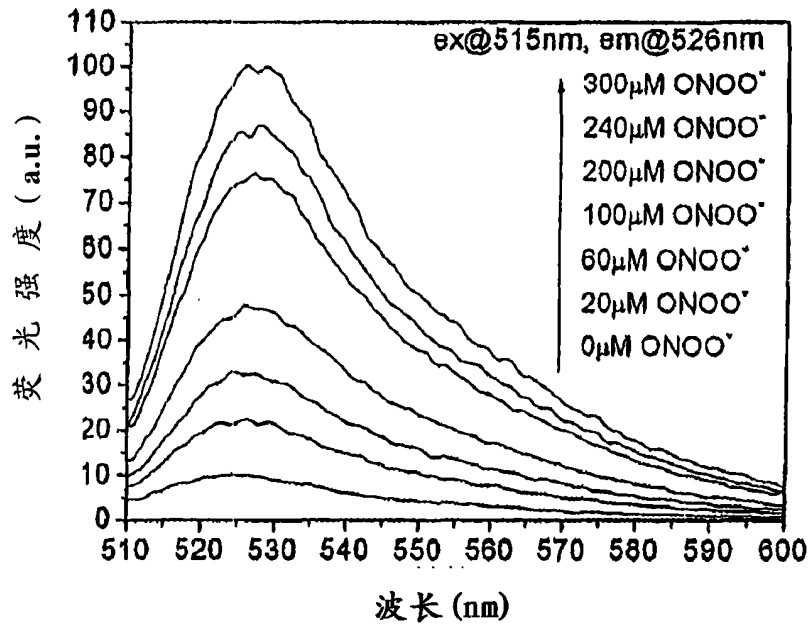
0.1M 磷酸钠缓冲液(pH7.4)中的 ss-6(20 $\mu$ M, 1% CH<sub>3</sub>CN)与 15 当量 ONOO<sup>-</sup>反应 0.5h 后的发射光谱

图 9



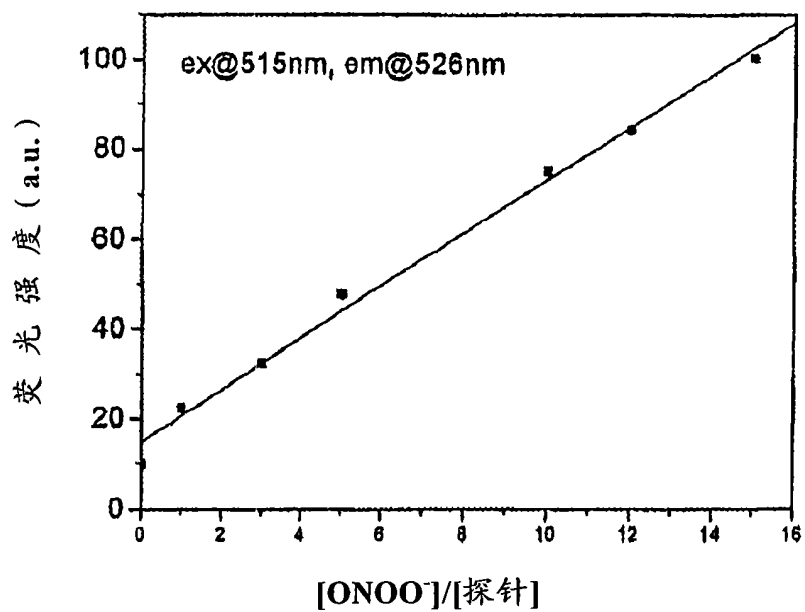
20μM ss-6 的吸收光谱

图 10



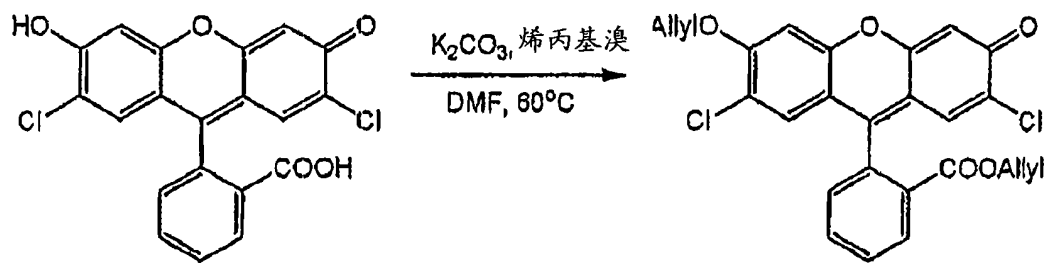
0.1M 磷酸钠缓冲液(pH7.4)中的 ss-6(20μM, 1% CH<sub>3</sub>CN)与 0~300μM 范围内的不同量的 ONOO<sup>-</sup>反应 0.5h 后的发射光谱

图 11



0.1M 磷酸钠缓冲液(pH7.4)中的 ss-6(20 $\mu$ M, 1% CH<sub>3</sub>CN)

图 12



ss-7

图 13

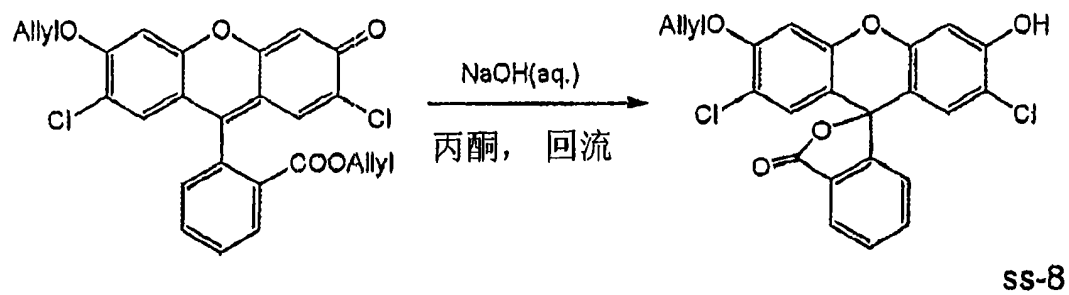


图 14

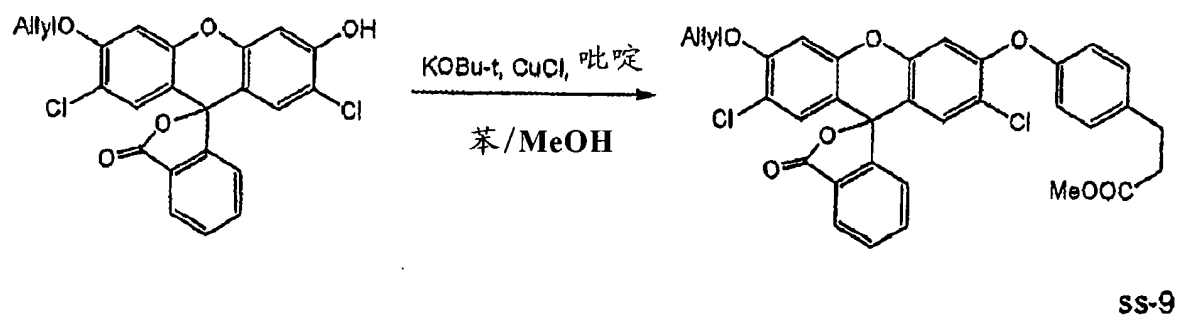


图 15



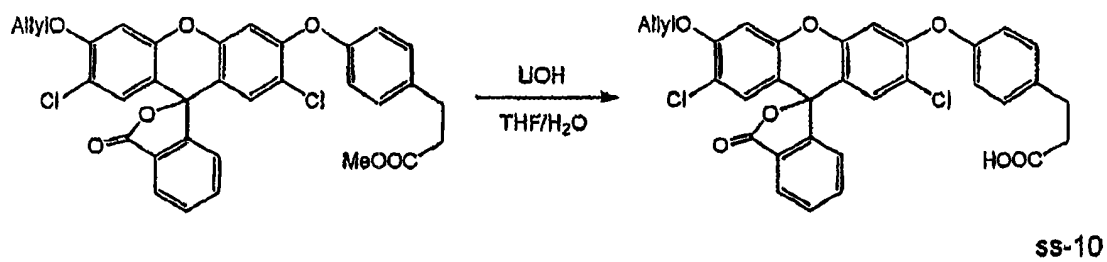


图 16

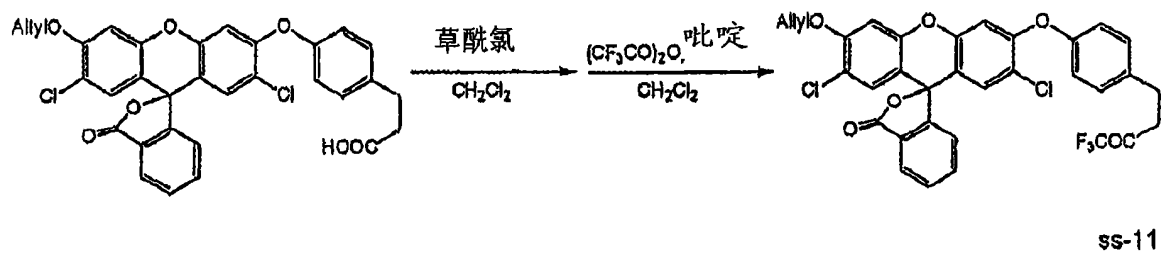
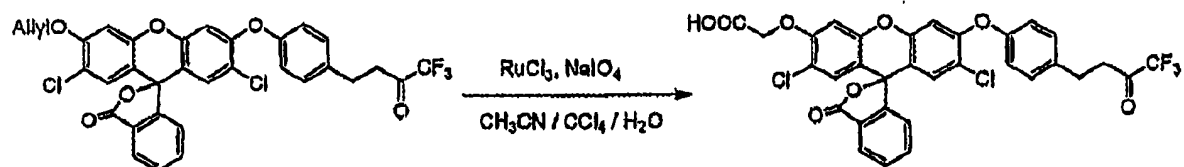
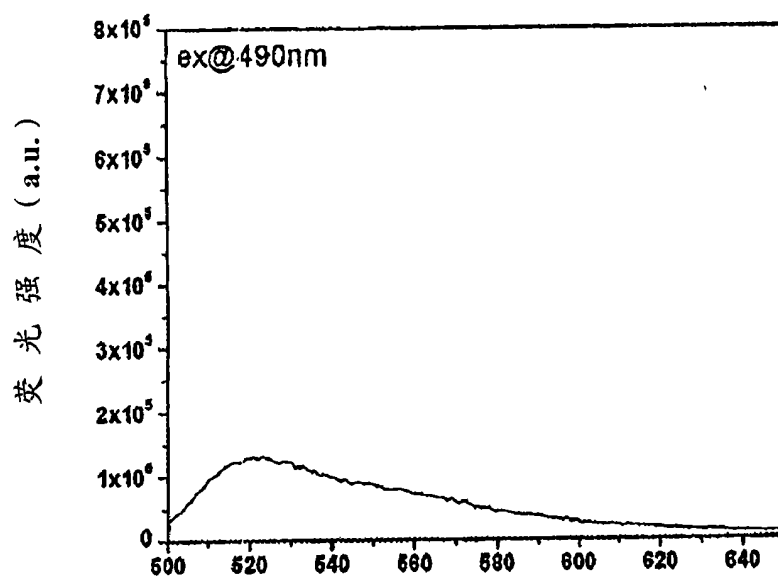


图 17



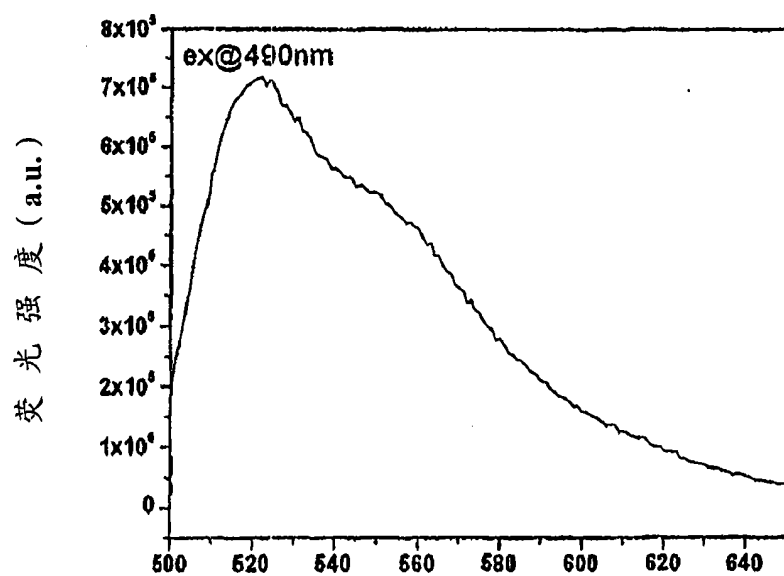
ss-12

图 18



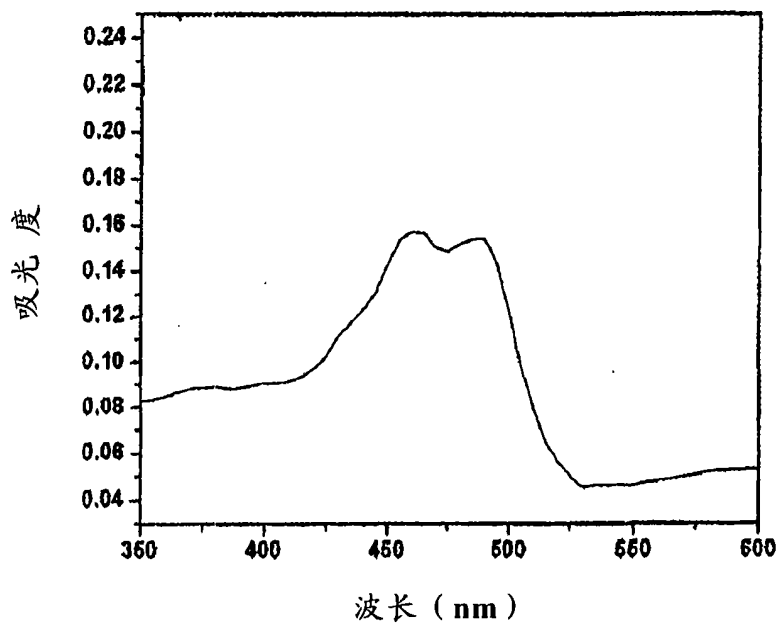
0.1M 磷酸钠缓冲液(pH7.4)中的 ss-12( $20\mu\text{M}$ , 1%  $\text{CH}_3\text{CN}$ )的发射光谱

图 19



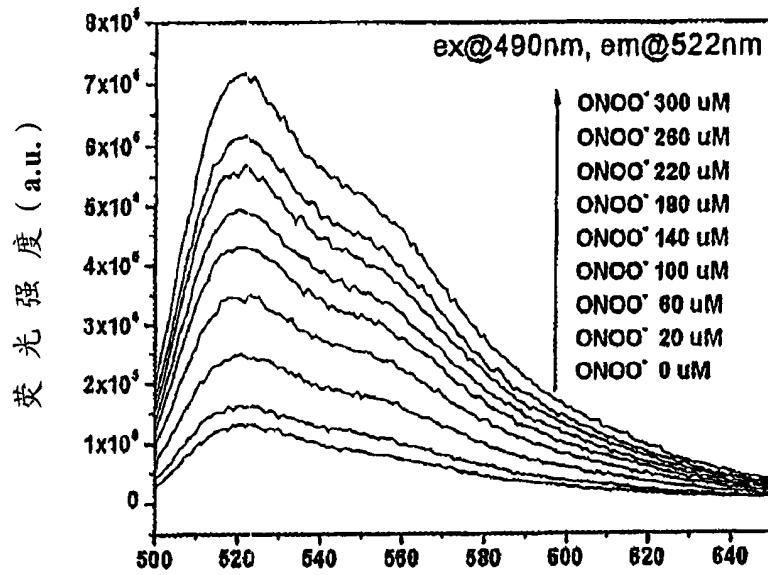
0.1M 磷酸钠缓冲液(pH7.4)中的 ss-12( $20\mu\text{M}$ , 1%  $\text{CH}_3\text{CN}$ )与 15 当量  $\text{ONOO}^-$  反应 0.5h 后的发射光谱

图 20



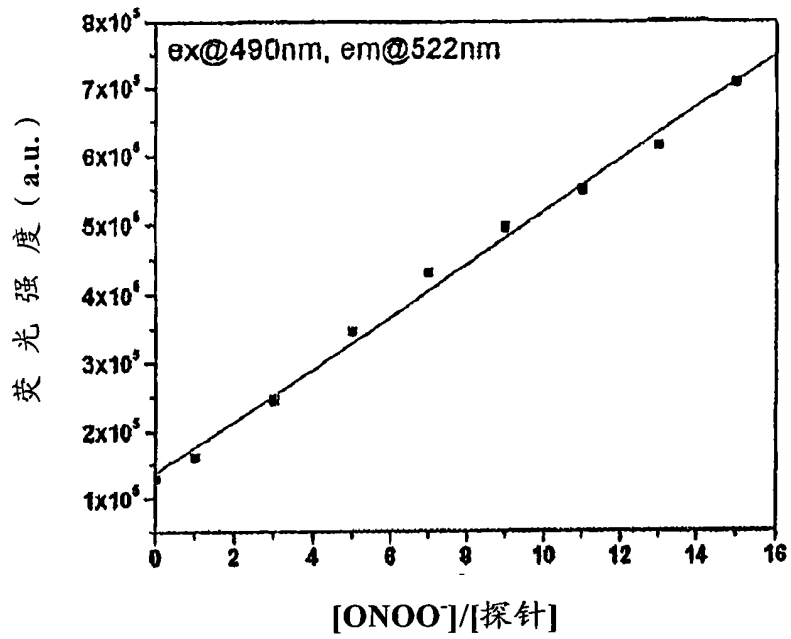
20µM ss-12 的吸收光谱

图 21



0.1M 磷酸钠缓冲液(pH7.4)中的 ss-12(20 $\mu\text{M}$ , 1%  $\text{CH}_3\text{CN}$ )与 0~300 $\mu\text{M}$ 范围内的不同量的  $\text{ONOO}^-$ 反应 0.5h 后的发射光谱

图 22



0.1M 磷酸钠缓冲液(pH7.4)中的 ss-12(20 $\mu$ M, 1% CH<sub>3</sub>CN)

图 23



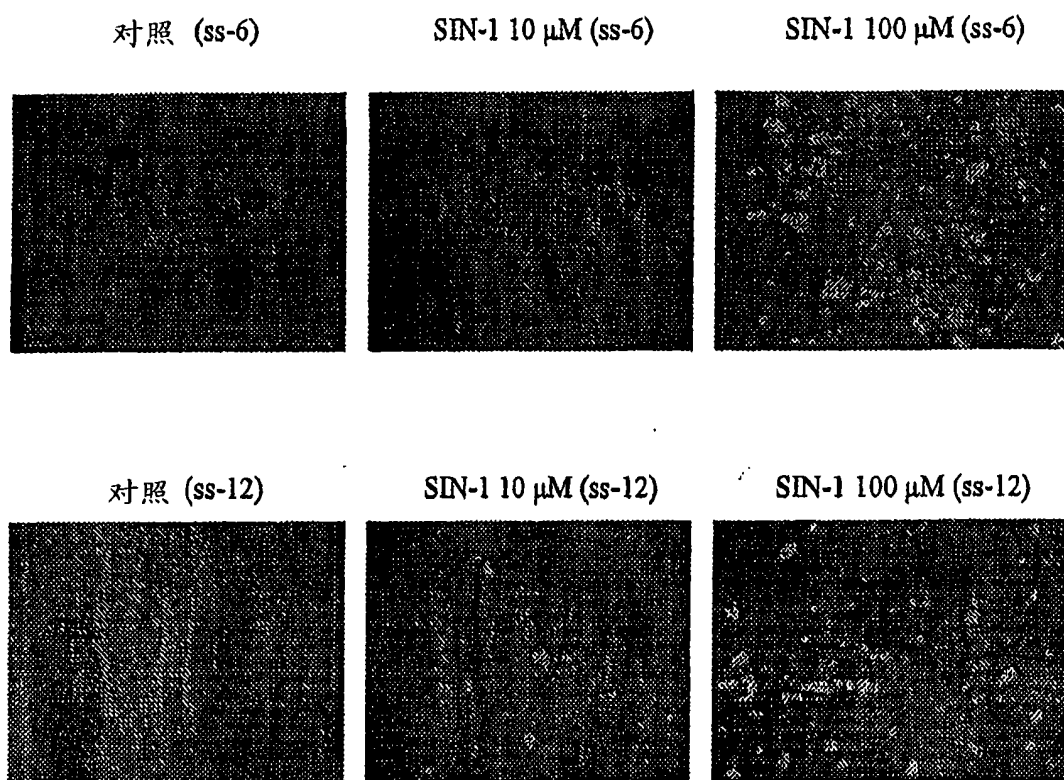


图 24