

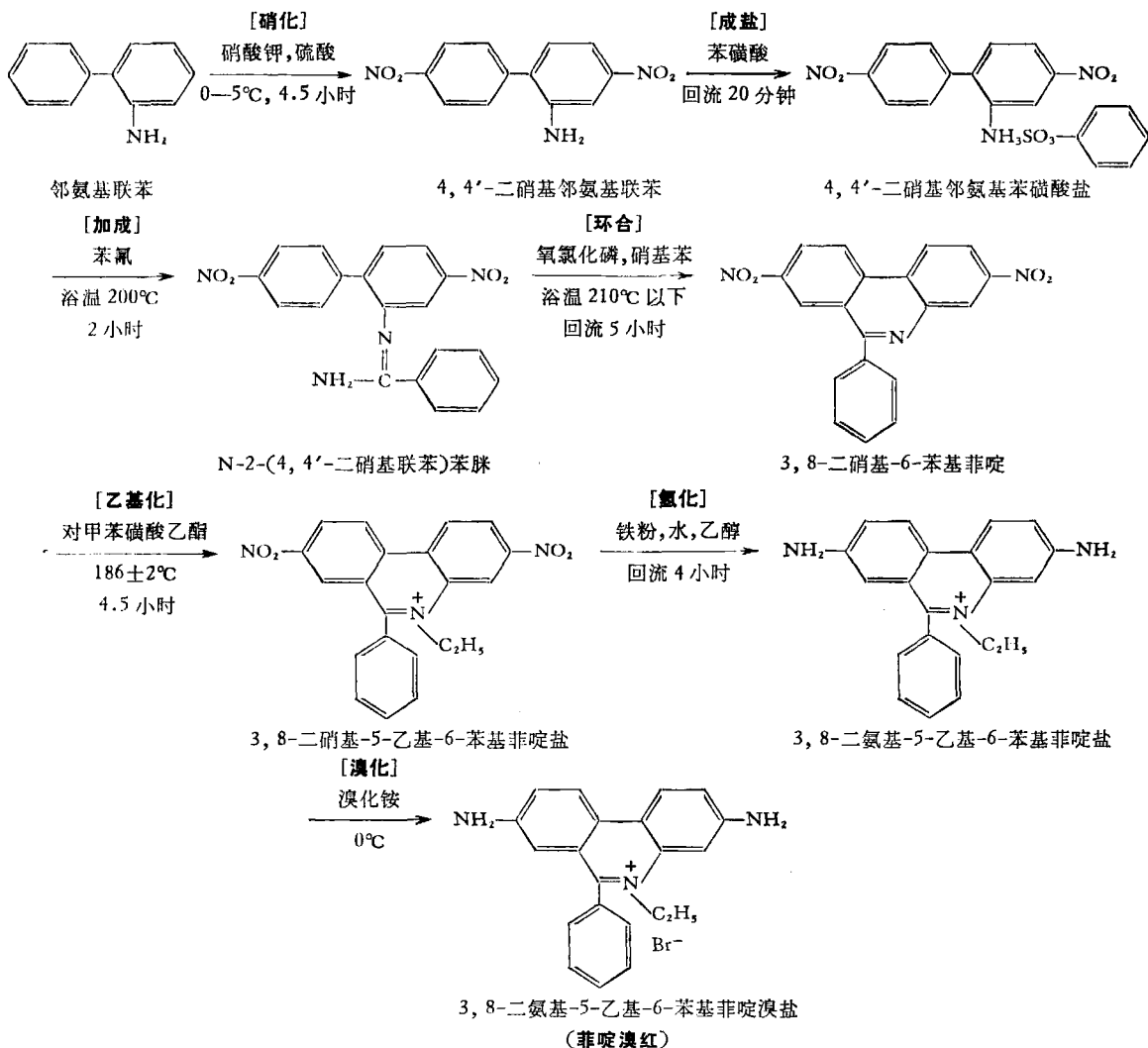
荧光染料菲啉溴红的合成

中国科学院生物物理研究所 一室二组
制备组

荧光染料菲啉溴红 (简称 EthBr 或 EB) 与核酸 (DNA、RNA 和双链多聚核苷酸) 有特异的结合能力, 它能反映核酸的量与结构的变化, 对体内核酸的合成和有关的核酸酶有抑制作用。菲啉溴红原是五十年代合成的一种抗锥虫药物, 1964 年发现它与核酸结合后荧光显著增强的现象以来, 即被广泛地用作核酸的一

种荧光探针。由于这种荧光的测定方法简便、快速和灵敏, 故近年来它越来越多的被应用于分子生物学研究领域。根据研究工作的需要, 我们遵照**独立自主、自力更生**的方针, 团结合作, 参考有关资料设计合成路线, 利用原有实验室条件, 全部采用国产试剂, 合成了荧光染料菲啉溴红。现介绍其合成方法和鉴定结果如下。

一、化学合成路线



二、操作步骤

1. 4, 4'-二硝基邻氨基联苯的制备

将邻氨基联苯 28.5 克溶于 333 毫升 95% 硫酸中, 在冰浴中冷却到 0℃; 在搅拌下慢慢加入粉状硝酸钾 35 克, 1 小时左右加完, 内部温度保持在 0—5℃, 共搅拌 4.5 小时。然后将反应液慢慢倾入 1,000 毫升冰水中, 析出黄色固体, 过滤, 水洗, 分离出黄色固体。用 70 毫升 5N 氢氧化钠研成粉状, 过滤, 水洗至中性, 干燥后在乙二醇乙醚中结晶。得到的针状或方形桔黄色结晶, 即 4, 4'-二硝基邻氨基联苯。熔点 205—206℃。收率 52%。

2. 4, 4'-二硝基邻氨基联苯苯磺酸盐的制备

上述所得 4, 4'-二硝基邻氨基联苯加入 200 毫升 40% 苯磺酸水溶液研磨, 回流 20 分钟, 趁热过滤, 滤液冷却后析出淡黄白色片状结晶, 即苯磺酸盐粗品。未作用完的 4, 4'-二硝基邻氨基联苯, 可以反复利用原滤液重复上述操作, 直至全部转化成苯磺酸盐为止。熔点为 236—238℃。收率 95% 以上。

3. N-2-(4, 4'-二硝基联苯) 苯脒的制备

4, 4'-二硝基邻氨基联苯苯磺酸盐粗品 34 克和苯脒 9.5 克混合, 油浴 200℃, 加热 2 小时, 冷却后呈黑色的溶化物, 用约 5,000 毫升 0.1N 盐酸分多次煮沸提取, 直至大部份产物被提出。提取液冷却到 0℃, 除去不溶的深褐色稠状物, 用 5N 氢氧化钠中和至偏碱性, 产生大量淡黄色沉淀物, 即 N-2-(4, 4'-二硝基联苯) 苯脒粗品。熔点 162℃ 左右。收率 53%。将粗品在氯仿中结晶, 得柠檬黄色稜型针晶, 熔点 171—171.5℃。

不溶于稀盐酸的黑色固体, 用 5N 氢氧化钠研成粉状, 用氯仿提取, 活性炭脱色, 析出淡黄色针晶, 这是脒的第二种形式, 再用氯仿重结晶可以转化为脒的第一种形式。熔点 169℃ 左右。

4. 3, 8-二硝基-6-苯基非啉的制备

N-2-(4, 4'-二硝基联苯) 苯脒粗品 17 克溶于 170 毫升硝基苯, 加入 73 克氧氯化磷, 油浴温度保持在 210℃ 以下, 回流 5 小时。在最初的 15 分钟内反应猛烈, 放出大量的氯化氢; 随着反应的进行, 内部温度逐步增高, 最高可升至 173℃。反应结束后, 冷至 110℃ 减压蒸馏, 去除硝基苯和氧氯化磷, 冷却后残渣用 10 份 5N 氢氧化钠研成粉状, 将析出的非啉滤集, 从氯仿中结晶, 得淡黄色针晶。熔点 266—267℃。收率 46%。

5. 3, 8-二氨基-5-乙基-6-苯基非啉溴盐的制备

(1) 乙基化 7.5 克 3, 8-二硝基-6-苯基非啉和 22.5 克对甲苯磺酸乙酯混合, 油浴加热 4.5 小时, 内部温度保持在 186±2℃, 同时搅拌。反应液冷却到 100℃ 左右, 在搅拌下加入 280 毫升甲苯, 放置过夜。

倾去甲苯, 红褐色胶状残渣用 20 毫升甲苯洗, 此胶状残渣再用 83 毫升和 30 毫升混合液提取两次。混合液按如下配比制备, 乙醇: 水: 5N 硫酸 = 120: 80: 1 (毫升)。

(2) 氢化 上述提取液立即加到悬浮 5.7 克还原铁粉的 150 毫升水中, 回流加热 4 小时, 同时搅拌, 混合液呈深紫红色。

(3) 溴化 上述反应毕, 使反应液冷却到室温, 加入 150 毫升甲苯和 57 毫升 40% (重量比) 氢氧化钠溶液, 搅拌 20 分钟, 抽滤, 从滤液中分出甲苯层。甲苯层用 20 毫升水洗两次, 然后用 122 毫升 0.1N 盐酸提取, 再用 30 毫升的酸水 (含有 0.1N 盐酸 10 毫升) 提取, 合并两次提取液 (呈玫瑰红色), 用稀氨水 (0.8M) 调至 pH 7.2—7.8, 待有焦油沉淀出现, 混合物立即加热到沸过滤, 滤液加入 19 克溴化铵饱和溶液, 在 0℃ 放置过夜。底层析出焦油状固体, 弃去上清液, 将焦油状固体溶于 28 毫升热水中, 再加入 15 毫升 95% 乙醇和 0.7 克溴化铵, 冷却时析出暗红色结晶, 过滤收集, 得非啉溴红结晶粗品, 再用 70% 乙醇重结晶, 得暗红色棒状或针状结晶, 此即为非啉溴红成品 (图 1)。熔点 248.5—251.0℃ (分解)。收率为 18%。

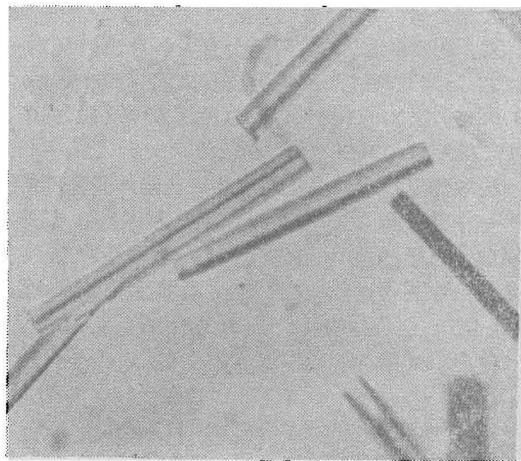


图 1 非啉溴红结晶

关于操作步骤的几点说明如下:

(1) 在制备 4, 4'-二硝基邻氨基联苯混酸硝化时, 搅拌速度应较快, 加入硝酸钾要慢, 这样有利于接上对位硝基。反应毕将溶液倾入冰水, 如冰水量过少, 析不出固体。结晶条件不同可以得到不同晶形。

(2) 制备苯磺酸盐时, 也可以采用 60—80% 苯磺酸, 反应效果亦较好。一般配比, 4, 4'-二硝基邻氨基联苯: 苯磺酸 = 1: 3 (克分子)。

(3) 在制脒过程中, 往往有一种掺杂在粗脒中的橙红色稠状物, 妨碍脒在氯仿中结晶, 可以用 0.1N 盐酸酸化沸水再次对粗脒提取, 以获得较纯的粗脒。熔点在 160℃ 左右的粗品, 就可供下步反应使用。苯脒的第二种形式产量很少。

(4) 在制备非啶时,最后一步残渣用碱磨成粉,所得非啶粗品比较粘稠,不易过滤收集;可以直接用几百毫升氯仿分几次提取,提取液用水洗至中性,并用无水硫酸钠干燥放置,浓缩氯仿,即析出非啶结晶。

(5) 在不同结晶条件下可得不同晶形的非啶溴红。

三、产品的鉴定

我们对所合成的荧光染料非啶溴红进行了一般的理化性质和各种光谱鉴定。吸收光谱用 CF-4 型分光光度计测定,荧光光谱用 SV-50 型紫外分光光度计荧光附件测定,红外光谱用 UR-10 型红外光谱仪测定。所用小牛胸腺脱氧核糖核酸是中国科学院上海生物化学研究所东风生化试剂厂的产品,含量 85%。鉴定结果如下:

非啶溴红为暗红色短棒状或针状结晶,味苦,能溶于水、乙醇和氯仿。用毛细管方法测非啶溴红的熔点,封管观察它的分解点即溴气逸出时的温度,测得熔点(分解)为 248.5—250℃;用显微熔点测定仪测得熔点(分解)为 238—240℃。

元素分析* 结果表明,在非啶溴红产品中的碳、氢、氮、溴四种元素的实际百分含量与理论值基本一致。各元素的实际值(理论值)如下:碳 63.36% (63.96%),氢 5.96% (5.11%),氮 9.60% (10.66%),溴 19.79% (20.26%)。

吸收光谱 非啶溴红的水溶液在紫外区和可见区各有一个吸收峰(285 毫微米和 479 毫微米),紫外区的吸收比可见区大 10 倍(见图 2)。如果在非啶溴红的水溶液中加入过量的脱氧核糖核酸,则所形成 EthBr-DNA 络合物的吸收峰向长波位移,例如从可见区 479 毫微米向 518 毫微米位移。

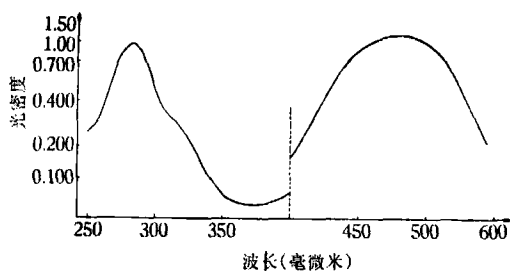


图 2 非啶溴红的吸收光谱

紫外区: EthBr 8 微克/毫升;
可见区: EthBr 80 微克/毫升;
溶剂为二次重蒸馏水

荧光发射光谱 非啶溴红本身能发出很微弱的荧光,当加入过量的 DNA 形成 EthBr-DNA 络合物时,其荧光强度显著增大;无论用紫外区(310 毫微米)或可见区(525 毫微米)的波长激发,络合物的荧光发射光

谱最高峰值都在可见区同一波长范围(597—598 毫微米),游离的非啶溴红荧光发射光谱最高峰值稍向长波位移(610 毫微米左右),见图 3。此外,如果在非啶溴红溶液中加入酵母 RNA 或多聚 I-C,也观察到其络合物的荧光强度显著增大。

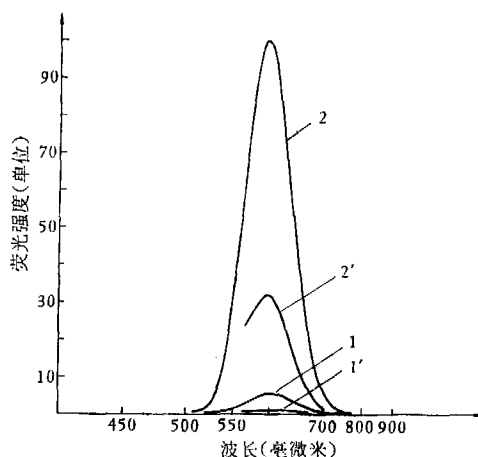


图 3 游离的和络合的非啶溴红荧光发射光谱

曲线 1 和 1' 为游离 EthBr 8 微克/毫升;曲线 2 和 2' 为 EthBr 8 微克/毫升 + DNA 350 微克/毫升;溶剂为 0.1M Tris-HCl 缓冲液, 0.1M NaCl, pH 7.7;曲线 1, 2 和 1', 2' 的激发波长分别为 310 毫微米和 525 毫微米

荧光激发光谱 游离的非啶溴红和与 DNA 络合的非啶溴红,在紫外区和可见区的荧光激发光谱均有一个峰值,游离的非啶溴红的峰值分别在 286 毫微米和 466 毫微米,络合的非啶溴红峰值向长波位移,分别为 303 毫微米和 520 毫微米,见图 4。

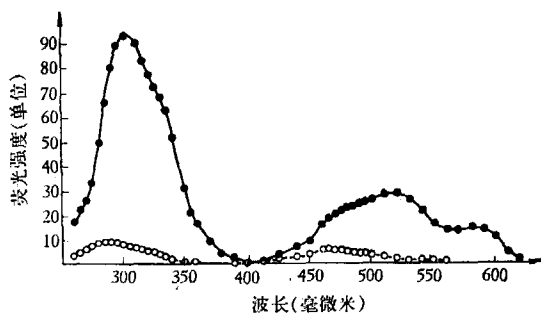


图 4 游离的和络合的非啶溴红荧光激发光谱

○---○ 为 EthBr 8 微克/毫升; ●——● 为 EthBr 8 微克/毫升 + DNA 350 微克/毫升;溶剂为 0.1M Tris-HCl 缓冲液, 0.1M NaCl, pH 7.7;发射波长为 595 毫微米

红外光谱 见图 5。

(下转第 27 页)

* 承中国科学院化学研究所协助测定

表3 本底测量

实验序号	1	2	3	4	5	6	7	8
暗电流 (10^{-10} 安)	4	6	6	6	7	10	10	10
减去暗电流后的 本底值(10^{-10} 安)	40 ± 1.6	26 ± 2	20 ± 1.2	22 ± 1.4	21 ± 1.5	23 ± 1.7	16 ± 1	27 ± 1.3
实验序号	9	10	11	12	13	14	15	16
暗电流 (10^{-10} 安)	9	10	16	15	15	22	28	25
减去暗电流后的 本底值(10^{-10} 安)	19 ± 2.8	10 ± 2	20 ± 2	16 ± 2	17 ± 2	23 ± 4.5	15 ± 3.3	19 ± 5

测量了 $\text{CaSO}_4(\text{Dy})$ 在照射 0.5 毫伦以后的读数, 都比本底高 10×10^{-10} 安以上, 读数的相对标准偏差为 $\pm 25\%$; 照射 1 毫伦的读数均比本底高 20×10^{-10} 安以上, 读数的相对标准偏差为 $\pm 15\%$ 。

由上所述, 当剂量小于 1 毫伦时, 光电倍增管的暗电流、加热盘黑体辐射产生的电流已可与信号相比较。要进一步降低测量阈值, 则需采取一些措施降低本底。例如, 可用半导体致冷降低光电倍增管的暗电流; 将加热盘的表面镀银, 使盘的黑体辐射减到最小; 采用线性加热等。

三、应用

1. 本底监测

将 $\text{CaSO}_4(\text{Dy})$ 用胶片盒包装, 置于室内不同地点, 分批测量本底增长, 其结果列在表 4 中; 并用图 4 示出本底线性增长的情况。

表4 室内本底增长情况

读数 (10^{-10} 安)	时间(天)					毫伦/天
	0	9	16	34	58	
存放地点						
铅室* 中	10	17	27	46	77	0.052
外加 1 毫米铜置于桌内	10	44	87	174	272	0.2
桌内	10	50	95	210	311	0.24
水泥台上	10	66	118	238	408	0.3

* 由钢砖、铅砖垒砌而成, 最薄处的厚度为 15 厘米

2. 剂量监测

将 $\text{CaSO}_4(\text{Dy})$ 用于剂量监测也作了初步尝试。北京友谊医院用 X 光机照射治疗肿瘤, 病人脸部局部剂量 300 伦; 我们用 $\text{CaSO}_4(\text{Dy})$ 配合玻璃剂量计测定眼睛、胸部、腹部由于散射所受的剂量, 使用 1 毫米塑料盒和 1 毫米锡盒(内加有 1 毫米塑料)两种包装。测得 X 光能量约为 60—70 千电子伏; 进行能量修正后, 得到眼睛、胸部和腹部的剂量, 并与玻璃剂量计所得结果进行比较, 两者相差 20%。

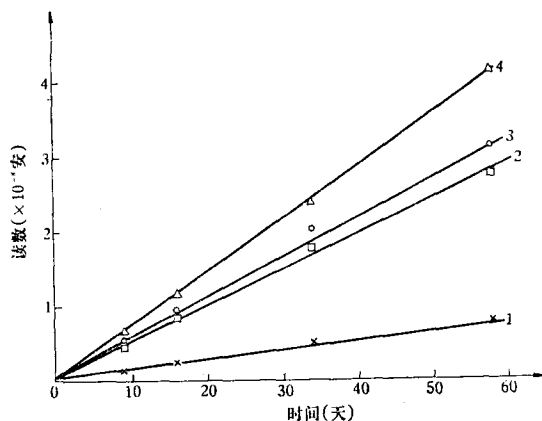


图4 本底增长曲线

1——铅室中; 2——1毫米铜屏蔽、桌内;
3——桌内; 4——水泥台上

四、结束语

用 Dy 活化的 CaSO_4 发光体制备简单, 能测量 0.5 毫伦—1,000 伦的 γ 剂量, 每月衰退小于 2%, 辐照温度效应小, 作为环境辐射监测是一种比较理想的加热发光体。由于它对紫外光灵敏, 测量过程中应避免阳光直接照射。此外, 发光体可以重复使用, 但灵敏度有所下降, 应经常进行灵敏度校正。

参考资料

[1] Becker, K.: *N. I. M.*, 104, 405, 1972.

[本文于 1974 年 9 月 23 日收到]

(上接第 30 页)

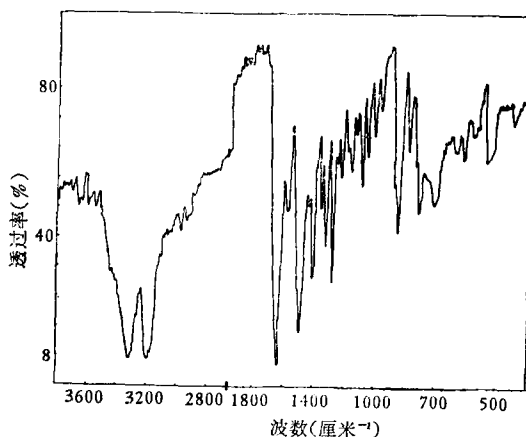


图5 非溴澳红的红外光谱

通过对所合成的非溴澳红的鉴定, 表明其各项指标符合要求, 产品质量良好, 可供有关研究工作使用。

[本文于 1974 年 10 月 21 日收到]