

文章编号: 1000-7032(2012)07-0790-06

# 新型锌离子荧光探针(5-(二甲基氨基)-N-(4-(2-(2-喹啉亚甲基)甲酰肼基)苯基)萘-1-磺酰胺)的研究

吴红梅\*, 郭宇

(辽宁工业大学 化学与环境工程学院, 辽宁 锦州 121001)

**摘要:** 以丹磺酰胺为荧光基团设计合成了新型  $Zn^{2+}$  荧光探针 DW1 (5-(二甲基氨基)-N-(4-(2-(2-喹啉亚甲基)甲酰肼基)苯基)萘-1-磺酰胺)。通过紫外光谱、荧光光谱及电喷雾质谱研究了 DW1 对  $Zn^{2+}$  的选择性识别作用。结果表明, DW1 与  $Zn^{2+}$  结合后荧光显著增强, 荧光发射光谱由 545 nm 蓝移至 515 nm, 量子产率达到 0.32, 且对  $Zn^{2+}$  具有较高的选择性, 受常见离子的干扰较小。光谱滴定和 ESI-MS 谱表明 DW1 与  $Zn^{2+}$  以 1:1 的化学计量数形成配合物, 平衡常数  $K = 1.75 \times 10^4 (\text{mol/L})^{-1}$ 。

**关键词:** 荧光探针; 锌离子; 丹磺酰胺; 蓝移

中图分类号: O482.31

文献标识码: A

DOI: 10.3788/fgxb20123307.0790

## Synthesis of (E)-5-(dimethylamino)-N-(4-(2-(quinolin-2-ylmethylene)-hydrazinecarbonyl)phenyl)naphthalene-1-sulfonamide for Detection of Zinc Ion

WU Hong-mei\*, GUO Yu

(School of Chemical and Environmental Engineering, Liaoning University of Technology, Jinzhou 121001, China)

\* Corresponding Author, E-mail: wuhongmei0331@126.com

**Abstract:** A novel dansyl sulfonamide-based fluorescence probe, (E)-5-(dimethylamino)-N-(4-(2-(quinolin-2-ylmethylene)hydrazinecarbonyl)phenyl)naphthalene-1-sulfonamide (DW1) was synthesized for detection of  $Zn^{2+}$ . UV-Vis, fluorescence and ESI-MS spectra of DW1 were measured to investigate the selective recognition. The results show that the fluorescence intensity increase significantly with high quantum yield ( $\Phi_f = 0.32$ ) and blue-shift emission from 545 nm to 515 nm after the coordination of DW1 with  $Zn^{2+}$ , manifesting DW1 could detect  $Zn^{2+}$  sensitively. Moreover, the selective and competitive fluorescent experiments show that DW1 is highly selective for recognition of  $Zn^{2+}$  over other common metal ions. Spectrophotometric titration and ESI-MS spectrum indicate the formation of a 1:1 DW1- $Zn^{2+}$  complex and the association constant  $K$  was calculated as  $1.75 \times 10^4 (\text{mol/L})^{-1}$ .

**Key words:** fluorescence probe; zinc ion; dansyl sulfonamide; blue shift

收稿日期: 2012-04-12; 修订日期: 2012-04-26

基金项目: 国家自然科学基金(20801008); 辽宁省教育厅科学研究一般项目(L2011105); 辽宁工业大学教师科研启动基金(X201116)资助项目

作者简介: 吴红梅(1979-), 女, 辽宁锦州人, 主要从事荧光探针的研究。

E-mail: wuhongmei0331@126.com, Tel: (0416)8091529

## 1 引言

锌在生命过程中扮演着重要的角色,无论在细胞内部还是外部,锌离子都发挥着重要的生理功能<sup>[1-6]</sup>。同时,自由的锌离子在细胞凋亡<sup>[7]</sup>、遗传基因表达<sup>[8]</sup>、神经传递<sup>[9]</sup>等方面还可以作为一种信号离子。但是,生物体中的锌大多以络合形式存在,分子内和分子间的游离  $Zn^{2+}$  的浓度很低,利用传统的方法检测自由的锌离子非常困难。因此发展高选择性、高灵敏度的锌离子化学传感器成为当今的热点问题。荧光探针法<sup>[10-12]</sup>具有简便快捷、实时检测、高灵敏度、高选择性、能够突破传统分析仪器的检测极限等优点,在分子、离子识别等方面得到广泛应用。目前,关于  $Zn^{2+}$  荧光探针方面的研究尽管有一些报道,但也存在一些问题,如,灵敏度较低、专一性不强、合成困难等缺陷。因此,迫切需要研究新型高效的  $Zn^{2+}$  荧光探针。

作为一类重要的荧光基团,丹磺酰胺具有荧光量子产率高、稳定性好、容易衍生等优点,备受化学家们的青睐,在多种分子、离子探针中都有应

用<sup>[13-14]</sup>,但在  $Zn^{2+}$  识别中应用较少。本文以丹磺酰胺作为荧光基团,设计合成了探针分子 DW1 (5-(二甲基氨基)-N-(4-(2-(2-喹啉亚甲基)甲酰肼基)苯基)萘-1-磺酰胺),并利用光谱滴定、质谱等手段研究其对  $Zn^{2+}$  识别的过程。

## 2 实验

### 2.1 仪器和试剂

C、H、N 元素分析使用 Elementar varioEL III 元素分析仪;<sup>1</sup>H NMR 使用 Varian INOVA-400MHz 核磁共振仪(TMS 为内标)测定;荧光光谱测定使用 JASCO FP-6500 荧光光谱仪;电喷雾质谱用 HPLC-Q-ToF MS 型质谱仪测定(甲醇作为流动相);紫外光谱测定使用 HP 8453 紫外-可见光谱仪;红外光谱使用 Nicolet NEXUS FT-IR 光谱仪测定(KBr 压片)。

所有试剂均为分析纯,使用前未经纯化。测定荧光量子产率采用的参比标准物为罗丹明 B ( $U=0.89$ )<sup>[15]</sup>。

### 2.2 实验过程

DW1 的合成路线如图 1 所示。

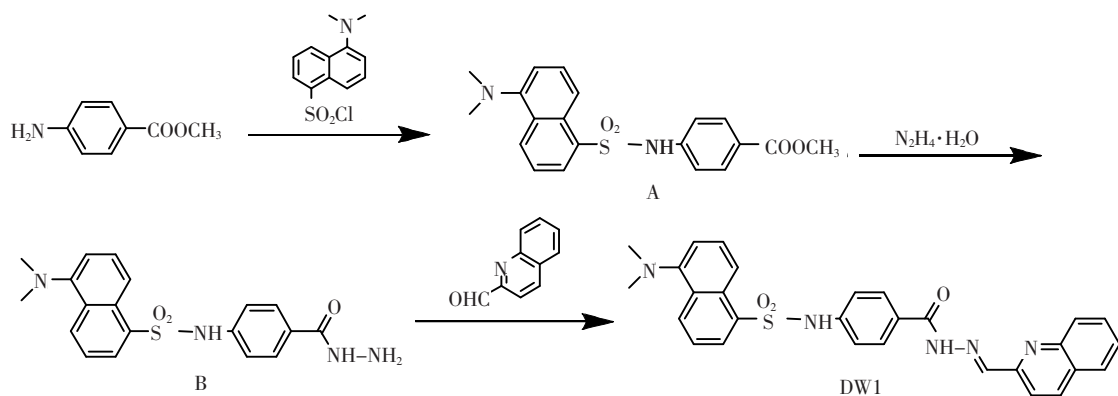


图 1 DW1 的合成路线

Fig. 1 Synthetic routes of DW1

**A 的合成:**在 100 mL 三口烧瓶里,将对氨基苯甲酸甲酯(12.1 mmol, 1.63 g)溶解在约 20 mL 的二氯甲烷中,在不断搅拌下加入三乙胺(60.3 mmol, 6.11 g)。然后,利用恒压漏斗将溶解在 30 mL 二氯甲烷中的丹磺酰氯(18.1 mmol, 4.88 g)逐滴加入上述烧瓶中,室温下搅拌 24 h。从反应开始到结束,溶液始终为黄色。反应结束后,反应液用水萃取 3 次,有机相用无水  $MgSO_4$  干燥 24 h,过滤,旋转蒸发除去溶剂,得到的产品为黄色

固体,产率 55.8%,直接用于下一步反应。

**B 的合成:**将 A (5.96 mmol, 2.20 g) 加入到在 250 mL 圆底烧瓶中,然后顺次加入 100 mL 左右的甲醇及过量(20 倍)的水合肼,加热回流,磁力搅拌 24 h。反应结束后,减压蒸馏除去溶剂得到油状物,利用约 20 mL 乙醚,超声震荡得到固体粉末,过滤,经  $P_2O_5$  真空干燥,得到产物 B,产率 89.1%。直接用于下一步反应。

**DW1 的合成:**在 250 mL 圆底烧瓶中,将 B

(3.84 mmol, 1.48 g) 和喹啉甲醛 (7.74 mmol, 1.23 g) 溶解在 100 mL 甲醇里, 加入约 5 滴冰醋酸, 加热回流, 磁力搅拌 24 h。反应结束后, 减压蒸馏得到黄色油状物, 向其中加入 20 mL 左右的乙醚, 超声震荡后得到粗产品。将粗产品用溶解在约 3 mL  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1:4, V/V) 中, 经过硅胶柱色谱分离(乙酸乙酯为洗脱剂), 最终得到黄色固体粉末, 产率 50.0%。

$^1\text{H NMR}$  ( $d_6$ -DMSO)  $\delta$ : 11.97 (s, 1H,  $\text{H}_{\text{CONH}}$ ), 11.18 (s, 1H,  $\text{H}_{\text{SO}_2\text{NH}}$ ), 8.48 (t,  $J = 8.8$  Hz, 2H), 8.33 ~ 8.42 (m, 3H), 8.08 (d,  $J = 7.6$  Hz, 1H), 7.99 ~ 8.04 (m, 2H), 7.75 ~ 7.81 (m, 3H), 7.61 ~ 7.67 (m, 3H), 7.26 (d,  $J = 7.6$  Hz, 1H), 7.20 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H), 2.80 (s, 6H)。

Anal. calcd for ( $\text{C}_{29}\text{H}_{25}\text{N}_5\text{O}_3\text{S}$ ): C 66.52, H 4.81, N 13.38; Found: C 64.06, H 4.84, N 12.37。

ESI-MS:  $m/z$ : 524.1 for  $[\text{DW1} + \text{H}]^+$ , calcd. for  $\text{C}_{29}\text{H}_{26}\text{N}_5\text{O}_3\text{S}$ , 524.1;  $m/z$ : 546.2 for  $[\text{DW1} + \text{Na}]^+$ , calcd. for  $\text{C}_{29}\text{H}_{25}\text{N}_5\text{O}_3\text{SNa}$ , 546.2。

IR (KBr 压片)  $\nu$ : 621 (w), 836 (m), 920 (w), 1061 (w), 1145 (s), 1234 (w), 1310 (m), 1503 (m), 1608 (m), 1661 (m), 3442 (w)  $\text{cm}^{-1}$ 。

### 2.3 光谱测定实验

配制 20  $\mu\text{mol/L}$  DW1 的  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$  (9:1, V/V) 溶液, 0.02 mol/L 的常见金属离子 ( $\text{K}^+$ 、 $\text{Li}^+$ 、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Ni}^{2+}$ 、 $\text{Pb}^{2+}$ 、 $\text{Cr}^{3+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Hg}^{2+}$ 、 $\text{Cd}^{2+}$ ) 的水溶液。

光谱滴定: 移取 2 mL DW1 的溶液到比色皿中, 用微量注射器加入  $\text{Zn}^{2+}$  水溶液, 使  $\text{Zn}^{2+}$  与 DW1 的比值不断增加直至达到平衡, 测定生成配合物的紫外-可见光谱。在相同条件下, 用波长 400 nm 的光激发, 测定配合物在 400 ~ 800 nm 的荧光发射光谱。

荧光选择性实验: 在若干比色皿中, 分别加入 2 mL DW1 的溶液, 用微量注射器加入常见的各种金属离子, 激发波长为 400 nm, 分别测定每种金属离子加入到 DW1 中的荧光发射光谱。

竞争性实验: 在若干比色皿中, 分别加入 2 mL DW1 的溶液, 在每个比色皿中用微量注射器加入 20 倍金属离子及 2 倍的  $\text{Zn}^{2+}$ , 激发波长为 400 nm, 分别测定在每种常见金属离子存在下 DW1 对  $\text{Zn}^{2+}$  识别的抗干扰能力。

## 3 结果与讨论

### 3.1 电喷雾质谱

利用电喷雾质谱测定在溶液中荧光探针分子 DW1 与  $\text{Zn}^{2+}$  的配位情况。在 DW1 中引入  $\text{Zn}^{2+}$  后, 观察到两个峰:  $m/z = 586.17$  可以归属为  $[\text{DW1} + \text{Zn}^{2+} - \text{H}^+]^+$ ;  $m/z = 649.18$  可以归属为  $[\text{DW1} + \text{Zn}^{2+} + \text{NO}_3^-]^+$ 。这与 IsoPro 3.0 program 的模拟结果相吻合, 表明在溶液中 DW1 与  $\text{Zn}^{2+}$  配位形成了 1:1 的物种, 如图 2 所示。

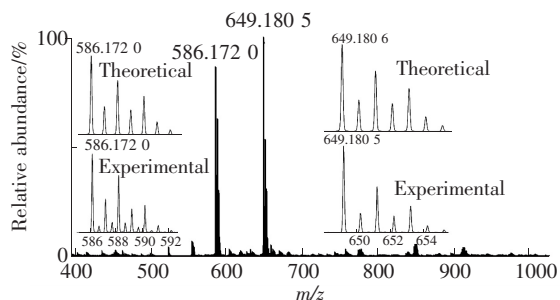


图 2 DW1-Zn 电喷雾质谱

Fig. 2 ESI-MS spectra of DW1-Zn

### 3.2 紫外、荧光光谱分析

图 3 为向 DW1 中滴加  $\text{Zn}^{2+}$  后的紫外滴定曲线, 溶剂为  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$  (9:1, V/V)。由图可见, DW1 的自由分子在波长 410 nm 处没有吸收峰, 但加入  $\text{Zn}^{2+}$  后, 在 410 nm 处出现新的吸收峰, 随着  $\text{Zn}^{2+}$  与 DW1 比值的增大而逐渐增大, 该吸收峰可归属为 DW1 与  $\text{Zn}^{2+}$  结合后的配合物产生的金属到配体间的电荷跃迁光谱带 (MLCT)。波长 330 nm 处的吸收峰随着  $\text{Zn}^{2+}$  与 DW1 比值的增大而逐渐降低, 直至达到平衡。在 360 nm 处等吸收点表明  $\text{Zn}^{2+}$  与 DW1 配位后促进了 DW1 分子内

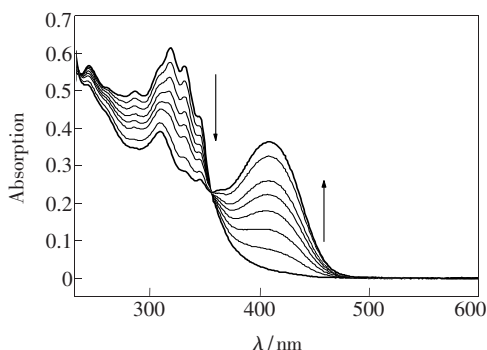


图 3 在 DW1 中加入  $\text{Zn}^{2+}$  后的紫外滴定曲线

Fig. 3 Change in absorption spectra of DW1 with  $\text{Zn}^{2+}$  addition

的电荷转移,形成了稳定的配合物。

由图4可以看出,当探针分子 DW1 与  $Zn^{2+}$  比值达到 1:1 后,紫外吸光强度不再增大,达到平衡,说明 DW1 与  $Zn^{2+}$  以 1:1 的化学计量比配位结合,这与上述电喷雾质谱(图1)结果相吻合。对紫外滴定曲线按照  $Zn^{2+}/DW1$  为 1:1 的最小二乘法拟合计算公式<sup>[16]</sup>进行线性拟合(相关系数  $R = 0.9991$ ),如图4插图所示,得到平衡常数  $K = 1.75 \times 10^4$  ( $\text{mol/L}$ )<sup>-1</sup>。

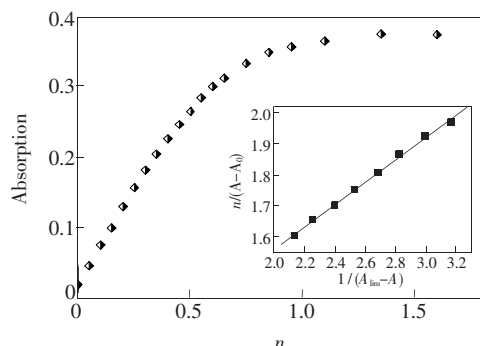


图4 DW1 的紫外吸收强度随  $Zn^{2+}/DW1$  倍数的变化关系( $\lambda = 410$  nm)。插图: $Zn^{2+}$  对 DW1 滴定的紫外光谱数据线性拟合图, $A_{lim}$  是加入过量  $Zn^{2+}$  后的 DW1 饱和紫外吸收强度, $A_0$  是 DW1 自由分子的紫外吸收强度, $A$  是加入  $Zn^{2+}$  后的 DW1 的紫外吸收强度, $R$  为相关系数。

Fig. 4 The UV-Vis titration profile of DW1 at 410 nm upon addition of  $Zn^{2+}$ . The insert exhibits the linear fitting of the UV-Vis titration of DW1 upon the addition of  $Zn^{2+}$ .  $A_{lim}$  is the absorption intensity of the saturated value of DW1 in the presence of  $Zn^{2+}$ .  $A_0$  is the absorption intensity of free probe (DW1),  $A$  is the absorption intensity of DW1 after addition of a given amount of  $Zn^{2+}$ ,  $R$  is the related coefficient.

图5为 DW1 及滴加  $Zn^{2+}$  后的荧光光谱,激发波长为 400 nm。由图可见,在  $CH_3CN/H_2O$  (9:1, V/V) 溶液中,单纯探针分子 DW1 在 545 nm 处呈现一定强度的荧光发射峰,可以归属丹磺酰胺的特征发射峰。当向 DW1 中引入  $Zn^{2+}$  后,随着  $Zn^{2+}$  浓度(0~200  $\mu\text{mol/L}$ ) 的增加荧光强度逐渐增强(荧光强度增加将近3倍),且荧光发射峰由 545 nm 逐渐蓝移至 515 nm,斯托克斯位移达到 30 nm。 $Zn^{2+}$  与 DW1 结合后引起荧光信号的双重变化(增强和蓝移)是 PET(光诱导电子转移)和 PCT(光诱导电荷转移)共同作用的结果。尽管 DW1 自由分子具有一定强度的背景荧光,但是加

入  $Zn^{2+}$  后的荧光发射峰相对原来的 DW1 自由分子发生了 30 nm 的蓝移,说明 DW1 分子本身的背景荧光并不会对  $Zn^{2+}$  的识别产生干扰,且 DW1 与  $Zn^{2+}$  配位后的荧光强度明显增强,这更有利于对  $Zn^{2+}$  的识别。用罗丹明 B 作参照物测得 DW1- $Zn^{2+}$  荧光量子产率  $\phi_f$  高达 0.32。

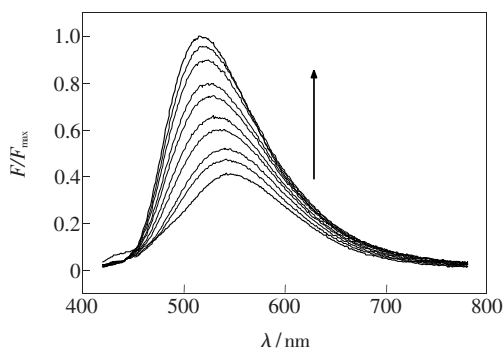


图5 在 DW1 中加入  $Zn^{2+}$  的荧光滴定曲线, $c(DW1) = 20 \mu\text{mol/L}$ ,  $\lambda_{ex} = 400$  nm。

Fig. 5 Luminescent titration of DW1 with increasing  $Zn^{2+}$ ,  $c(DW1) = 20 \mu\text{mol/L}$ ,  $\lambda_{ex} = 400$  nm.

### 3.3 选择性测试及竞争性测试

众所周知,对于一个良好的探针分子对物种的识别能否具有高选择性是至关重要的。图6为 DW1 分子对  $Zn^{2+}$  识别的荧光选择性实验。由图可见,DW1 仅在  $Zn^{2+}$  的存在下,才会出现荧光的显著增强,且荧光发射波长发生 30 nm 的蓝移;而向 DW1 分子中加入其它常见的金属离子,如  $K^+$ 、 $Li^+$ 、 $Na^+$ 、 $Ca^{2+}$  和  $Mg^{2+}$  等碱金属和碱土金属离子,  $Ni^{2+}$ 、 $Pb^{2+}$ 、 $Cr^{3+}$ 、 $Mn^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Fe^{2+}$ 、 $Co^{2+}$ 、 $Hg^{2+}$  以及  $Cd^{2+}$  等过渡金属离子,荧光强度均不会显著增强。尽管探针分子 DW1 可能和金属离子发生反应,但是这些化合物并不能发射荧光。另外,虽然  $Zn^{2+}$  与  $Cd^{2+}$  处于同一主族,性质上有相

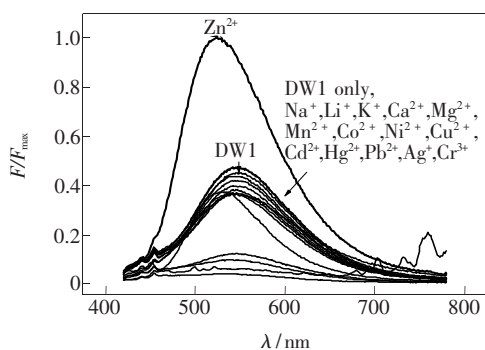


图6 DW1 对各种金属离子的荧光响应

Fig. 6 Fluorescent emission changes of DW1 upon addition of the metal ions of interest

似之处,但是本文所合成的  $Zn^{2+}$  荧光探针分子 DW1 能很好的区分  $Zn^{2+}$  和  $Cd^{2+}$ , 当向 DW1 中引入  $Cd^{2+}$  时体系的荧光光谱没有变化。结果表明 DW1 探针分子对  $Zn^{2+}$  具有高选择性。

图 7 为探针化合物 DW1 对各种金属离子的竞争实验结果。从图中可以看出,生命体系中大量存在的  $K^+$ 、 $Li^+$ 、 $Na^+$ 、 $Mg^{2+}$  和  $Ca^{2+}$  以及少数过渡金属离子  $Mn^{2+}$ 、 $Cd^{2+}$ 、 $Ag^+$  等都不影响 DW1 分子对  $Zn^{2+}$  的识别。这可能由于碱金属、碱土金属

及少数过渡金属与探针化合物 DW1 的亲性和较弱,因此它们的存在不会干扰 DW1- $Zn^{2+}$  的荧光增强作用。在二价的第一过渡系金属离子中,  $Co^{2+}$ 、 $Ni^{2+}$ 、 $Cr^{3+}$ 、 $Hg^{2+}$ 、 $Pb^{2+}$  等的存在减弱了体系的荧光,这可能是因为 DW1 能与这些过渡金属离子形成稳定的配合物,在金属离子和荧光团之间的电子转移削弱了体系的荧光强度,从而致使荧光猝灭<sup>[17]</sup>。综合分析, $Zn^{2+}$  荧光探针对于生命体系的金属离子及部分过渡金属离子的抗干扰能力较强。

## 4 结 论

利用简便方法设计合成了结构简单、以丹磺酰胺为荧光基团的新型  $Zn^{2+}$  荧光探针 DW1 (5-(二甲基氨基)-N-(4-(2-(2-喹啉亚甲基)甲酰肼基)苯基)萘-1-磺酰胺)。研究发现,探针 DW1 与  $Zn^{2+}$  作用后,荧光强度明显增强,且发射波长发生蓝移,对  $Zn^{2+}$  的识别不会受背景荧光的干扰,量子产率达到 0.32,平衡常数  $K = 1.75 \times 10^4$  ( $mol/L$ )<sup>-1</sup>,受常见金属离子干扰小,是一种比较理想的  $Zn^{2+}$  荧光探针。

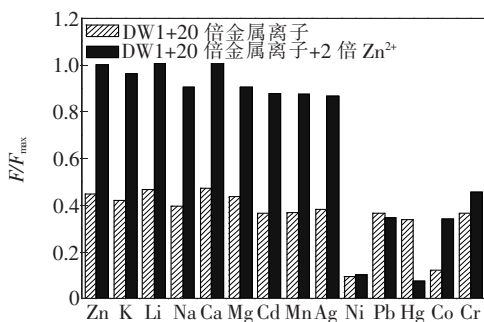


图 7 DW1 的荧光竞争性实验

Fig. 7 Fluorescence responses of DW1 to the various metal ions in aqueous solutions  $CH_3CN:H_2O(9:1, V/V)$

## 参 考 文 献:

- [1] Jiang P, Guo Z. Fluorescent detection of zinc in biological systems: Recent development on the design of chemosensors and biosensors [J]. *Coord. Chem. Rev.*, 2004, 248(1-2):205-229.
- [2] Lim N C, Freake H C, BrMckner C. Illuminating zinc in biological system [J]. *Chem. Eur. J.*, 2005, 11(1):38-49.
- [3] Berg J M, Shi Y. The galvanization of biology: A growing appreciation for the role of zinc [J]. *Science*, 1996, 271(5252):1081-1085.
- [4] Wu H M, He C, Wang J, et al. Hydrolysis-activated fluorophore system as a molecular sensor for selective detection of  $Zn^{2+}$  [J]. *Chin. J. Lumin.* (发光学报), 2009, 30(3):275-284 (in English).
- [5] Truong-Tran A Q, Carter J, Ruffin R E, et al. The role of zinc in caspase activation and apoptotic cell death [J]. *Biometals*, 2001, 14(3-4):315-330.
- [6] Falchuk K H. The molecular basis for the role of zinc in developmental biology [J]. *Mol. Cell. Biochem.*, 1998, 188(1-2):41-48.
- [7] Frederickson C J, Bush A I. Synaptically released zinc: Physiological functions and pathological effects [J]. *Biometals*, 2001, 14(3-4):353-366.
- [8] Tang Y Y, Luo C H, Wu Z Y, et al. A novel near-infrared fluorescent probe for  $Zn^{2+}$  [J]. *Acta Chim. Sinica* (化学学报), 2007, 65(13):1229-1233 (in Chinese).
- [9] Yang A B, Xu Z X, Wu J, et al. Synthesis of 1-Acetyl-3-(2-hydroxyl-4,6-dimethoxyphenyl)-5-phenyl-2-pyrazoline and studies on its zinc ion probe [J]. *Chem. J. Chinese Universities* (高等学校化学学报), 2010, 31(7):1365-1368 (in Chinese).
- [10] Jiang P J, Chen L Z, Lin J, et al. Novel zinc fluorescent probe bearing dansyl and aminoquinoline groups [J]. *Chem. Commun.*, 2002, (13):1424-1425.
- [11] Zhao X W, Zhang Y N, He G J, et al. Highly sensitive fluorescent coumarin-based probes for selective detection of copper



- ion [J]. *Chin. J. Lumin.* (发光学报), 2010, 31(3):433-438 (in Chinese).
- [12] Zhang Y N, Yang L L, Zhou P, *et al.* Fluorescent emission of coumaric aldehyde molecule enhanced by dihydrogen phosphate [J]. *Chin. J. Lumin.* (发光学报), 2011, 32(9):962-967 (in Chinese).
- [13] Lim M H, Lippard S J. Fluorescent nitric oxide detection by copper complexes bearing anthracenyl and dansyl fluorophore ligands [J]. *Inorg. Chem.*, 2006, 45(22):8980-8989.
- [14] Nicole M B, Vladimir S T, Raymond J B, *et al.* New fluorogenic dansyl-containing calix[4]arene in the partial cone conformation for highly sensitive and selective recognition of lead(II) [J]. *Inorg. Chem.*, 2008, 47(9):3549-3558.
- [15] Yang X, Pan Z T, Ma Y. Rhodamine B as standard substance to measure the fluorescence-quantum yield of dichlorofluorescein [J]. *J. Anal. Sci.* (分析科学学报), 2003, 10(6):588-589 (in Chinese).
- [16] Bourson J, Pouget J, Valeur B. Ion-responsive fluorescent compounds. 4. effect of cation binding on the photophysical properties of a coumarin linked to monoaza- and diaza-crown ethers [J]. *J. Phys. Chem.*, 1993, 97(17):4552-4557.
- [17] Fan J L. Fluorescent Sensors for Zn<sup>2+</sup> based on Bis(2-picolyl) amine [D]. Dalian: Dalian University of Technology, 2005.