

功能材料

## 新型喹啉类 $Zn^{2+}$ 探针的合成及细胞成像研究

匡红波<sup>1</sup>, 王忠龙<sup>1</sup>, 张燕<sup>1</sup>, 徐徐<sup>1,2</sup>, 谷文<sup>1,2</sup>, 王石发<sup>1,2\*</sup>

(1. 南京林业大学 化学工程学院, 江苏 南京 210037; 2. 江苏省生物质能源与材料重点实验室, 江苏 南京 210037)

**摘要:** 以 2-乙酰基-8-羟基喹啉为原料, 与苯肼进行缩合反应合成了荧光分子探针 HSZn, 采用 FTIR、NMR、HRMS 对其结构进行了表征。紫外可见光谱和荧光光谱分析结果表明: 该探针在水相中对  $Zn^{2+}$  具有较好的荧光增强效应, 而其他金属离子对其干扰较小; HSZn 的荧光强度与  $Zn^{2+}$  浓度 ( $1.0 \times 10^{-5} \sim 1.0 \times 10^{-4}$  mol/L) 具有良好的线性关系, 检测限低至  $4.0 \times 10^{-8}$  mol/L; Job's 曲线和 LC-MS 分析表明:  $Zn^{2+}$  与 HSZn 的络合比为 1 : 2, 且探针在 pH=5~13 内对  $Zn^{2+}$  都有较灵敏的荧光响应。细胞成像实验表明: 该探针可在 HeLa 活细胞中实现对  $Zn^{2+}$  的荧光成像。

**关键词:** 8-羟基喹啉; 希夫碱; 锌离子; 荧光探针; 细胞成像; 功能材料

中图分类号: O622.6 文献标识码: A 文章编号: 1003-5214(2018)06-0928-06

## Novel Quinoline-Based Fluorescent Probes for Detecting $Zn^{2+}$ in Living Cells

KUANG Hong-bo<sup>1</sup>, WANG Zhong-long<sup>1</sup>, ZHANG Yan<sup>1</sup>, XU Xu<sup>1,2</sup>, GU Wen<sup>1,2</sup>, WANG Shi-fa<sup>1,2\*</sup>

(1. College of Chemical Engineering, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, Jiangsu, China; 2. Key Lab of Biomass Energy and Material, Jiangsu Province, Nanjing 210037, Jiangsu, China)

**Abstract:** A Schiff-based fluorescent molecular probe (HSZn) was synthesized by condensation of quinoline with phenylhydrazine and characterized by FTIR, NMR and HRMS. The UV-Vis spectroscopy and fluorescence spectroscopy studies demonstrated that the probe showed a significant fluorescence enhancement effect toward  $Zn^{2+}$  in aqueous medium while suffering from a slight interference in the presence of other metal ions. A good linear relationship between fluorescence intensity and  $Zn^{2+}$  concentrations ranging from  $1.0 \times 10^{-5}$  to  $1.0 \times 10^{-4}$  mol/L was obtained. This detection system had a detection limit of  $4.0 \times 10^{-8}$  mol/L. A 1 : 2 binding ratio of  $Zn^{2+}$ /HSZn for the complex was obtained by Job's plot and LC-MS. In addition, the fluorescent probe HSZn exhibited a sensitive fluorescence response toward  $Zn^{2+}$  in the pH range of 5 to 13. The cell imaging studies indicated that the probe was capable of detecting endogenous  $Zn^{2+}$  in live HeLa cells.

**Key words:** 8-hydroxyquinoline; Schiff-base; zinc ion; fluorescence probe; cell imaging; functional materials

**Foundation items:** Natural National Science Foundation of China (31470592); Major Project of Jiangsu Province University Natural Science (14KJ220001); Open Fund Project of Jiangsu Key Laboratory of Biomass Energy and Materials (JSBEM2014010)

$Zn^{2+}$  作为人体维持正常生命活动所必需的微量元素之一, 在人体生长发育、免疫、内分泌、生殖

遗传等生理过程中发挥着非常重要的作用。在人体的微量元素中, 锌含量仅次于铁, 位居第二<sup>[1]</sup>。许

收稿日期: 2017-07-06; 定用日期: 2017-10-26; DOI: 10.13550/j.jxhg.20170544

基金项目: 国家自然科学基金 (31470592); 江苏省高校自然科学研究重大项目 (14KJ220001); 江苏省生物质能源与材料重点实验室开放基金项目 (JSBEM2014010)

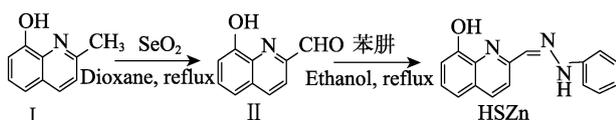
作者简介: 匡红波 (1992—), 男, 硕士生。联系人: 王石发 (1965—), 男, 教授, 电话: 025-85428369, E-mail: wangshifa65@163.com。

多研究表明,生物体内缺乏  $Zn^{2+}$  会导致如生长迟缓<sup>[2]</sup>、厌食症<sup>[3]</sup>、免疫系统功能障碍<sup>[4]</sup>和糖尿病<sup>[5]</sup>等各种疾病。此外,很多严重的神经系统疾病也与人体  $Zn^{2+}$  代谢失衡有关,包括阿尔茨海默病<sup>[6]</sup>、帕金森病<sup>[7]</sup>和癫痫<sup>[8]</sup>等。因此,在生物体内高效识别  $Zn^{2+}$  对生物学、临床医学等领域具有重大意义。

荧光分析法因具有选择性好、灵敏度高、操作简单、重现性好、与显微镜联用可实现对细胞内外金属离子高时空分辨率成像等优点<sup>[9-11]</sup>,设计和合成高效的荧光探针来检测痕量金属离子已经成为环境化学和生物学中最重要的课题之一。目前,关于锌离子荧光探针的报道很多<sup>[12-13]</sup>,其中,希夫碱类荧光传感器由于具有合成简单、水溶性好、络合金属离子能力强等特点而备受关注。2015年,Roy<sup>[14]</sup>等合成了 2-[(E)-(喹啉-8-亚氨基)甲基]羟基喹啉,当化合物溶液中加入  $Zn^{2+}$  后,其荧光光谱发生红移,荧光强度也显著增强,而加入其他金属离子则没有这种现象;2016年,Sun<sup>[15]</sup>等合成了一种具有希夫碱结构的  $Zn^{2+}$  荧光增强探针,该探针可与  $Zn^{2+}$  形成络合比 1:1 的络合物,其检测限为  $4.1 \times 10^{-8}$  mol/L; Qin<sup>[16]</sup>等合成了一种比率型双希夫碱类化合物,能在水相中对  $Zn^{2+}$  进行检测,检测限低至  $8.9 \times 10^{-7}$  mol/L; Yuan<sup>[17]</sup>等合成一种三唑类希夫碱化合物,通过荧光增强效应能选择性地检测  $Zn^{2+}$ ,检测限为  $5.1 \times 10^{-8}$  mol/L。

8-羟基喹啉作为仅次于乙二胺四乙酸(EDTA)的第二大金属离子螯合剂,因金属离子与其结合后可阻断其分子内激发态质子转移(ESIPT)导致荧光增强而被广泛应用于荧光传感分子的设计中<sup>[18]</sup>,该类传感器的主要缺点是对金属离子识别选择性较差,因此,在 8-羟基喹啉的 2 或 7 位引入额外的结合位点,增加其对金属离子识别的选择性,是该类荧光化学传感器研究的热点之一。

本文以乙醇为溶剂,在 8-羟基喹啉的 2 位进行修饰,合成出一种 8-羟基喹啉缩苯胍类希夫碱 HSZn,并对其光谱性质进行测定,旨在得到选择性高、抗干扰能力强的荧光增强型  $Zn^{2+}$  探针。合成路线如下:



## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

所用试剂均为市售 AR 或 CP,未作任何处理直接使用;金属离子溶液均为相应的硝酸盐或氯盐溶

于 HEPES 缓冲溶液〔 $V(\text{无水乙醇}):V(\text{水})=4:1$ 〕中配制而成;Hela 细胞成像实验中所用生物试剂及耗材由南京凯基科技发展有限公司提供。

DF-101S 型恒温磁力搅拌器,南京科尔公司;UV-2450 型紫外可见分光光度计,日本 Shimadzu 公司;Nicolet 380 型红外光谱仪(KBr 压片),美国 Nicolet 公司;7890A/5975C 型气质联用仪、1200/6310 型液质联用仪,美国 Agilent 公司;AV 400 MHz 核磁共振波谱仪,德国 Bruker 公司;X-6 型显微熔点测定仪,北京泰克公司;QSTAR Elite 高分辨液相串联质谱仪,美国 ABI 公司;LS-55 荧光/磷光分光光度计,美国珀金埃尔默公司;SW-CJ-1FD 型超净工作台,苏州净化公司;MCO-20AIC 型 CO<sub>2</sub> 培养箱,日本 Sanyo 公司;IX51 型生物倒置显微镜,日本 Olympus 公司。

### 1.2 目标化合物的合成

#### 1.2.1 中间体 II 的合成

中间体 2-甲酰基-8-羟基喹啉按照文献<sup>[19]</sup>制备,收率 74.0%。m.p. 90~92 °C (文献值<sup>[20]</sup>90 °C)。IR (KBr),  $\nu/\text{cm}^{-1}$ : 3404 (—OH), 2862, 1703 (C=O), 1623, 1588, 1503, 1469, 1331, 1186, 1083, 869, 750; <sup>1</sup>HNMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$ : 10.18 (s, 1H), 8.28 (d,  $J=8.4$  Hz, 1H), 8.17 (s, 1H), 8.02 (d,  $J=8.5$  Hz, 1H), 7.60 (t,  $J=8.0$  Hz, 1H), 7.40 (d,  $J=8.3$  Hz, 1H), 7.27 (d,  $J=8.7$  Hz, 1H); <sup>13</sup>CNMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$ : 193.38, 154.38, 150.34, 138.24, 137.55, 130.67, 130.58, 117.83, 117.16, 112.66。HRMS ( $m/z$ ): [M-H]<sup>-</sup> calcd for [C<sub>10</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>2</sub>-H]<sup>-</sup>: 172.0399; found: 172.0404。

#### 1.2.2 2-(2-苯基亚胍基甲基)-8-羟基喹啉(HSZn)的合成

在配有冷凝管、温度计和搅拌磁子的 50 mL 三口烧瓶中,加入 20 mL 无水乙醇和 0.32 g (3 mmol) 苯胍,充分搅拌后,将 0.34 g (2 mmol) 化合物 II 溶于 5 mL 无水乙醇逐滴加入到反应液中,再滴加 3 滴乙酸,升温至回流,TLC 监测反应进程。12 h 后反应结束,旋蒸除去溶剂,得到粗产品,经乙醇重结晶得到 0.3 g 淡黄色固体,最终收率 55.5%。m.p. 220~221 °C。IR (KBr),  $\nu/\text{cm}^{-1}$ : 3358 (—OH), 3289 (NH), 3043, 1597 (C=N), 1494, 1431, 1320, 1249, 1159, 1079, 879, 747; <sup>1</sup>HNMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$ : 10.92 (s, 1H), 9.60 (s, 1H), 8.23 (d,  $J=8.7$  Hz, 1H), 8.17~8.02 (m, 2H), 7.37 (q,  $J=7.9$  Hz, 2H), 7.28 (t,  $J=7.7$  Hz, 2H), 7.19 (d,  $J=7.8$  Hz, 2H), 7.08 (d,  $J=6.7$  Hz, 1H), 6.84 (t,  $J=7.2$  Hz, 1H); <sup>13</sup>CNMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$ : 152.87, 152.13, 143.96, 137.83, 137.33, 136.15, 129.63, 128.08, 127.71, 121.31, 118.64, 118.09, 113.36, 110.55。HRMS ( $m/z$ ): [M+H]<sup>+</sup> calcd for [C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>O+H]<sup>+</sup>: 264.1152; found: 264.1131。

## 2 结果与讨论

### 2.1 不同金属离子对化合物 HSZn 光谱性质的影响

加入不同金属离子后 HSZn 的紫外吸收光谱见图 1, 其中,  $c(\text{HEPES})=2 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$ ,  $c(\text{HSZn})=1.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ ,  $c(\text{M})=1.0 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 。

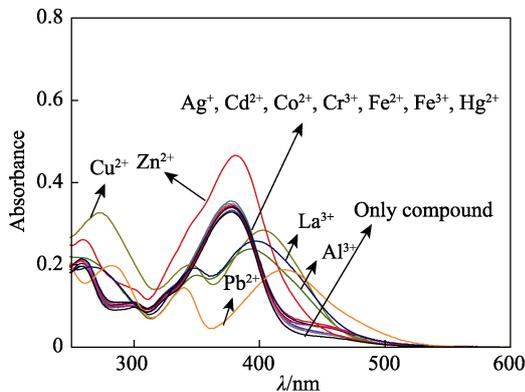


图 1 加入不同金属离子后 HSZn 的紫外吸收光谱  
Fig. 1 UV absorption spectra of HSZn in HEPES buffer solution upon addition of various metal ions

如图 1 所示,未加入金属离子前,HSZn 在 390 nm 处有一个较宽的紫外吸收峰。加入  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Pb}^{2+}$ 、 $\text{La}^{3+}$ 、 $\text{Al}^{3+}$ 和  $\text{Zn}^{2+}$ 后,HSZn 的吸收峰发生了变化,特别是加入  $\text{Zn}^{2+}$ 后,化合物在 390 nm 处的吸收峰明显变宽,吸光度也增高,而加入其他金属离子 ( $\text{Ag}^{+}$ 、 $\text{Cd}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Cr}^{3+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Hg}^{2+}$ )后 HSZn 的吸收峰并没有发生明显变化。原因可能是该化合物结构中含有一  $\text{C}=\text{N}$  和  $-\text{OH}$  等具有络合金属能力的基团,使得 HSZn 对  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Pb}^{2+}$ 、 $\text{La}^{3+}$ 、 $\text{Al}^{3+}$ 和  $\text{Zn}^{2+}$ 等离子有一定的络合作用,进而导致 HSZn 的紫外吸收曲线发生改变。

为了进一步研究 HSZn 对金属离子的识别作用,考察了它对 12 种金属离子的荧光响应性(激发波长为 400 nm,扫描范围 500~780 nm, Slit  $E_x=5.0 \text{ nm}$ , Slit  $E_M=20.0 \text{ nm}$ ,下同),  $c(\text{HSZn})=1.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ ,  $c(\text{M})=1.0 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ , 激发波长 400 nm。结果见图 2。由图 2 可以看出,加入不同金属离子后,HSZn 的荧光强度并没有发生明显变化,而加入  $\text{Zn}^{2+}$ 后,HSZn 的荧光强度发生了显著增强。因此,化合物 HSZn 可作为一种选择性检测  $\text{Zn}^{2+}$ 的荧光增强型探针。

### 2.2 $\text{Zn}^{2+}$ 浓度变化对 HSZn 光谱性质的影响

HSZn 的特殊化学结构使其对  $\text{Zn}^{2+}$ 会产生络合作用。为了进一步研究不同  $\text{Zn}^{2+}$ 浓度对络合作用的影响,保持 HSZn 的浓度不变 ( $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ ),使  $\text{Zn}^{2+}$ 浓度在  $1.0 \times 10^{-5} \sim 1.0 \times 10^{-4}$  内变化,得到不同  $\text{Zn}^{2+}$ 浓度下 HSZn 的紫外吸收和荧光光谱,结果见图 3、4。

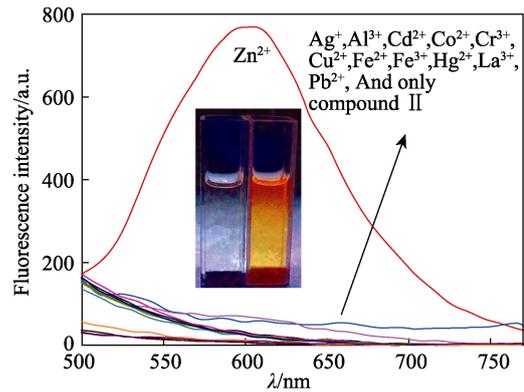


图 2 加入不同金属离子后 HSZn 的荧光光谱  
Fig. 2 Fluorescence emission spectra of HSZn upon addition of various metal ions

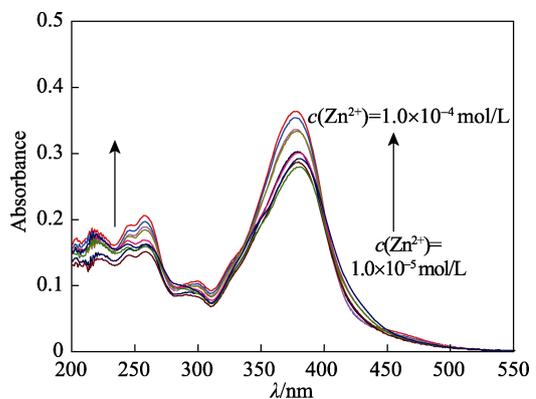


图 3 HSZn 的紫外吸收光谱随着  $\text{Zn}^{2+}$ 浓度的变化  
Fig. 3 Change of UV absorption spectra of HSZn in the HEPES buffer solution with the increase of concentrations of  $\text{Zn}^{2+}$

由图 3 可以看出,随着体系中  $\text{Zn}^{2+}$ 浓度不断增加,HSZn 的最大吸收波长发生了 15 nm 的蓝移(从 390 nm 蓝移到 375 nm),且其吸光度有一定增高;在 250 nm 处的吸收峰也发生一定程度增强。由此可以看出,HSZn 与  $\text{Zn}^{2+}$ 存在良好的络合作用。

不同  $\text{Zn}^{2+}$ 离子浓度下 HSZn 的荧光光谱及 600 nm 波长处的荧光强度线性关系如图 4 所示。

由图 4a 可知,随着体系中  $\text{Zn}^{2+}$ 浓度的不断增加,化合物的荧光强度呈线性增强。由图 4b 可知,600 nm 波长下的荧光强度呈线性关系,并得到了线性回归方程。通过公式  $\text{LOD}=3\sigma_{bi}/m$  计算出检测限  $\text{LOD}=4.0 \times 10^{-8} \text{ mol/L}$  (式中,  $\sigma_{bi}$  为 9 组空白样的标准偏差,  $m$  为线性回归方程的斜率)。

### 2.3 HSZn 与 $\text{Zn}^{2+}$ 的络合机理

为了确定 HSZn 与  $\text{Zn}^{2+}$ 之间的络合比,根据文献[21]方法,将 HSZn 和  $\text{Zn}^{2+}$ 的总浓度保持在  $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ ,物质的量比分别为 9:1、8:2、7:3、6:4、5:5、4:6、3:7、2:8、1:9,激发波长 400 nm,绘制 HSZn 和  $\text{Zn}^{2+}$ 的络合曲线,结果如图 5a 所示。由此可知, $\text{Zn}^{2+}$ 与 HSZn 的络合比为 1:2,质谱  $[\text{M}+\text{H}]^+=592.4$  (图 5b) 的离子峰也验证了上述

结论; 对比 HSZn 及 HSZn 和 Zn<sup>2+</sup>络合后的红外光谱图, 可以看出, HSZn 同 Zn<sup>2+</sup>络合后, HSZn 羟基的伸缩振动峰 (3358 cm<sup>-1</sup>) 和碳氮双键的伸缩振动峰 (3289 cm<sup>-1</sup>) 消失, 且喹啉环上的碳氮双键的伸缩振动也从 1597 cm<sup>-1</sup>变化到 1553 cm<sup>-1</sup>, 这说明羟基、碳氮双键和喹啉环上的氮原子都参与 Zn<sup>2+</sup>的络合; 综合以上分析结果, 推测 HSZn 与 Zn<sup>2+</sup>的络合方式如图 5c 所示。

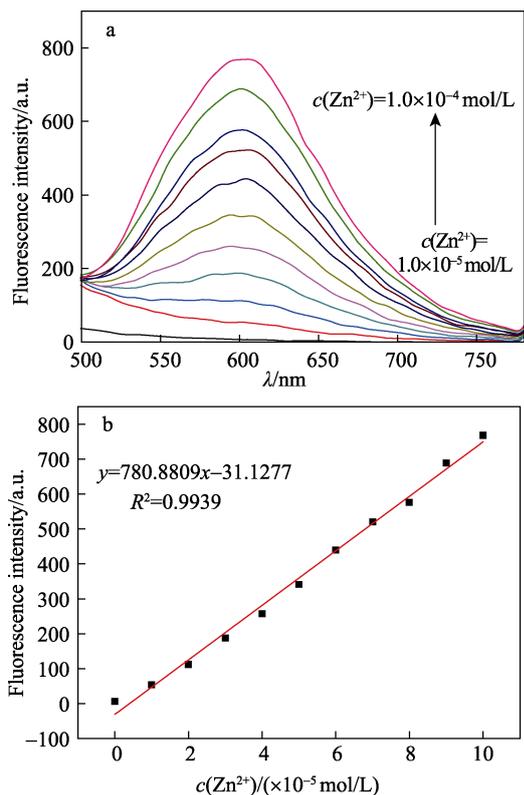


图 4 (a) 不同 Zn<sup>2+</sup>离子浓度下 HSZn 的荧光光谱; (b) 线性关系  
Fig. 4 (a) Fluorescence emission spectra of HSZn at various concentrations of Zn<sup>2+</sup>; (b) Linear relationship between Zn<sup>2+</sup> concentrations and fluorescence intensity

### 2.4 其他金属离子对 HSZn 检测 Zn<sup>2+</sup>的干扰

为了进一步考察 HSZn 和 Zn<sup>2+</sup>的荧光体系受其他金属离子的影响, 保持 HSZn、Zn<sup>2+</sup>和其他金属离子物质的量之比为 1 : 5 : 10, 按先加 Zn<sup>2+</sup>和 HSZn, 后加其他金属离子的顺序, 测定其荧光强度, c(HSZn) = 1.0 × 10<sup>-5</sup> mol/L, c(Zn<sup>2+</sup>) = 5.0 × 10<sup>-5</sup> mol/L, c(M) = 1.0 × 10<sup>-4</sup> mol/L, 激发波长 400 nm, 结果见图 6。

由图 6 可以看出, Cu<sup>2+</sup>的加入对体系的荧光强度影响最大, 荧光发生较大的猝灭, 其次 Pb<sup>2+</sup>和 Cr<sup>3+</sup>也对体系荧光产生较大影响, 原因可能是 HSZn 对这 3 种金属离子的络合能力要比 Zn<sup>2+</sup>强, 使部分已经和 HSZn 络合的 Zn<sup>2+</sup>从体系中游离出来, 从而导致体系的荧光发生较大变化。当向荧光体系中分别加入 Ag<sup>+</sup>、Al<sup>3+</sup>、Cd<sup>2+</sup>、Co<sup>2+</sup>、Fe<sup>2+</sup>、Fe<sup>3+</sup>、Hg<sup>2+</sup>和

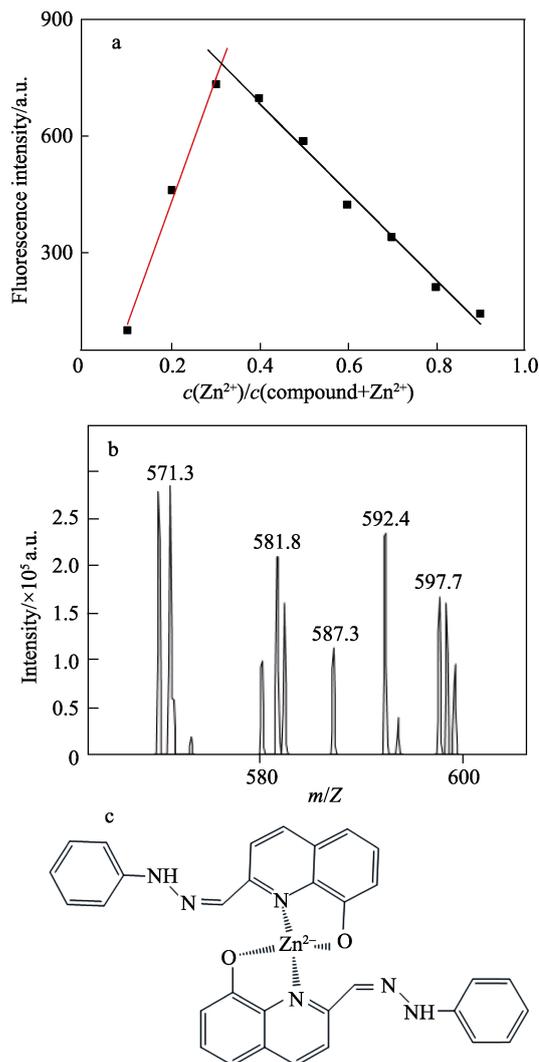


图 5 (a) HSZn 与 Zn<sup>2+</sup>的 Job's 曲线图; (b) HSZn 加 Zn<sup>2+</sup>后的质谱图; (c) 络合物的可能结构式  
Fig. 5 (a) Job's plot of HSZn and Zn<sup>2+</sup>, the total concentration of HSZn and Zn<sup>2+</sup> is 10 μmol/L (λ = 400 nm); (b) Mass spectrum of HSZn with addition of Zn<sup>2+</sup>; (c) Possible structure of HSZn-Zn<sup>2+</sup>

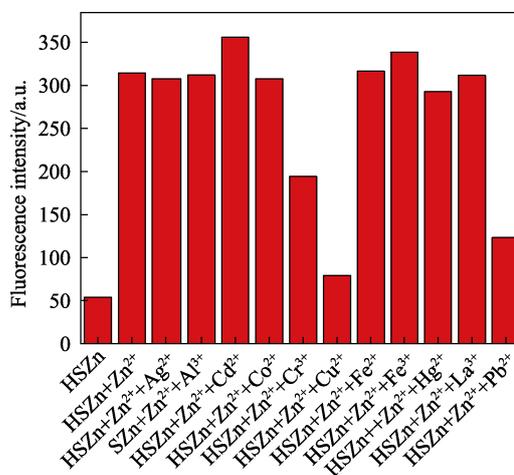


图 6 其他金属离子对 HSZn 检测 Zn<sup>2+</sup>的干扰  
Fig. 6 Fluorescence responses of HSZn toward Zn<sup>2+</sup> in the presence of other metal ions

La<sup>3+</sup>时,体系的荧光强度并没有发生较大的变化。以上结果表明:Cu<sup>2+</sup>、Pb<sup>2+</sup>和Cr<sup>3+</sup>会导致体系荧光发生一定的猝灭,但由于生物体中这3种金属离子的含量远低于Zn<sup>2+</sup>,所以该探针对于检测生物体内的Zn<sup>2+</sup>不易受到其他金属离子的干扰。

### 2.5 不同 pH 对体系荧光强度的影响

因HSZn分子结构中含有—C=N和—OH活性基团,所以溶剂的pH对体系的荧光强度会有一定的影响。在不同pH的乙醇溶液中考察了体系荧光强度随pH的变化,荧光体系中HSZn和Zn<sup>2+</sup>浓度分别为1×10<sup>-5</sup>和1×10<sup>-4</sup> mol/L,激发波长为400 nm,结果见图7。

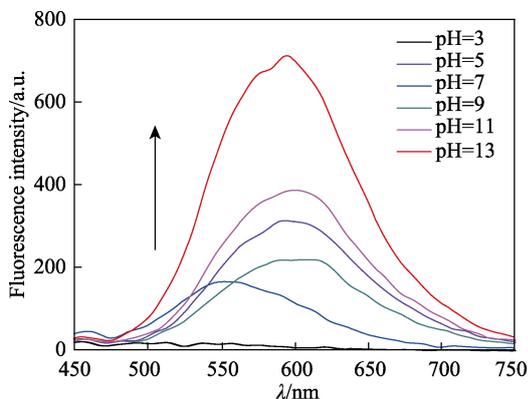


图 7 不同 pH 的乙醇溶液对 HSZn 和 Zn<sup>2+</sup> 荧光体系的影响  
Fig. 7 Fluorescence intensity of HSZn in the presence of Zn<sup>2+</sup> in ethanol solution with different pH values

由图7可以看出,当溶液pH=3时,体系的荧光发生完全猝灭,原因是HSZn中的一C=N在酸性较强的条件下发生分解,使HSZn丧失了络合Zn<sup>2+</sup>的能力;当溶液pH=5时,相对于中性条件,荧光曲线发生蓝移;而当溶液pH=9时,荧光曲线却发生红移;随着pH的继续增大,体系荧光强度也继续增大。结果表明:HSZn与Zn<sup>2+</sup>络合体系的荧光强度与体系的pH有关,酸性较强时HSZn会发生分解,使HSZn丧失络合Zn<sup>2+</sup>的能力;pH较低时,化合物中的氮原子发生质子化,导致它不易同金属离子络合,其荧光强度降低;而在碱性条件下,HSZn中氮原子上的孤对电子比较活泼,更易给出电子,所

以,体系中的pH越大,荧光强度越强。综上所述,探针在pH=5~13内对Zn<sup>2+</sup>都有较灵敏的荧光响应。

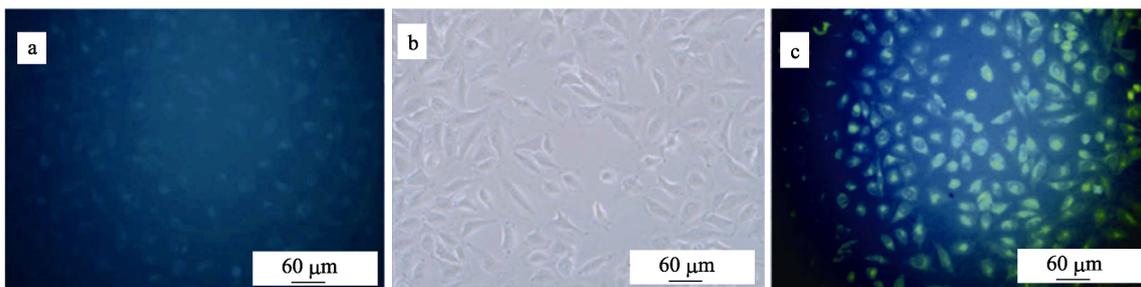
### 2.6 细胞毒性和荧光显微成像实验

细胞毒性是探针HSZn能否应用于生物标记的重要指标之一。采用MTT法对人体正常肝细胞(LO2)进行细胞毒性测试,结果见表1。由表1可知,LO2细胞经过不同浓度的HSZn处理24 h后,在6.25~200 μmol/L内,HSZn对LO2都表现出无毒和低毒的性能。因此,HSZn能够进一步用于对Zn<sup>2+</sup>的荧光成像实验。

表 1 不同浓度 HSZn 对人体正常肝细胞存活率的影响  
Table 1 Effect of different concentrations of HSZn on cell viability

| HSZn 浓度 / (μmol/L) | OD 值 (吸光度)  | 细胞存活率 / % |
|--------------------|-------------|-----------|
| 6.25               | 0.580±0.003 | 95.60     |
| 12.50              | 0.584±0.034 | 95.60     |
| 25                 | 0.612±0.017 | 99.00     |
| 50                 | 0.607±0.017 | 99.84     |
| 100                | 0.586±0.012 | 99.27     |
| 200                | 0.586±0.015 | 94.62     |
| 对照组                | 0.613±0.011 | 100.00    |

取对数生长期的细胞,经胰酶消化后,用培养液调整细胞浓度,按每孔5×10<sup>5</sup>个细胞的量接种于六孔板中,37℃,体积分数5%CO<sub>2</sub>及饱和湿度条件下孵育12 h;待细胞贴壁生长后,移去培养液,用PBS清洗两次。每孔加入用培养基稀释的HSZn(最终作用浓度5×10<sup>-5</sup> mol/L),继续孵育30 min后;将六孔板置于荧光显微镜的载物台上,确定观察区域及层面后,分别采集荧光图像(图8a)和明场下图像(图8b)。由图8b可以看出,经过HSZn处理后并不影响Hela细胞的正常生长;在六孔板中加入配好的Zn<sup>2+</sup>(最终作用浓度5×10<sup>-4</sup> mol/L),作用15 min后,再将六孔板置于荧光显微镜的载物台上,确定同一观察区域及层面后,采集荧光图像(图8c),从上述3张图片可以看出,HSZn和Zn<sup>2+</sup>处理后的Hela细胞清晰可见。实验结果表明,该探针具有良好的细胞渗透性,可成功实现对Hela细胞内Zn<sup>2+</sup>的荧光成像。



a—Fluorescence image of HeLa cells treated with HSZn; b—Bright-field image of cells; c—Fluorescence image in the presence of Zn<sup>2+</sup> (λ=400 nm)

图 8 HSZn 在 HeLa 细胞中对 Zn<sup>2+</sup> 的成像分析  
Fig. 8 Fluorescence images of Zn<sup>2+</sup> in HeLa cells with HSZn

### 3 结论

以 2-甲酰基-8-羟基喹啉为原料, 与苯肼进行缩合反应合成了荧光增强型探针 HSZn, 该探针在水相对  $Zn^{2+}$  具有良好的选择性且不易受其他常见金属离子干扰; 在  $1.0 \times 10^{-5} \sim 1.0 \times 10^{-4}$  mol/L 内可实现对  $Zn^{2+}$  的定量检测; Job's 曲线和 LC-MS 分析证明,  $Zn^{2+}$  与 HSZn 的络合比为 1 : 2, 且探针 HSZn 在 pH=5~13 内对  $Zn^{2+}$  都有较灵敏的荧光响应; 细胞毒性和细胞荧光成像实验结果表明, 该探针可用于 Hela 活细胞中  $Zn^{2+}$  荧光标记, 因此, 有望将其应用于生物体内锌离子的检测。

### 参考文献:

- [1] Yang Pin (杨频), Gao Fei (高飞). Principles of biological inorganic chemistry(生物无机化学原理) [M]. Beijing: Science Press, 2002: 259-263.
- [2] Jeremy M B, Shi Y G. The galvanization of biology: a growing appreciation for the roles of zinc[J]. Science, 1996, 271(5252): 1081-1085.
- [3] Chen Shaoyu (陈绍瑜), Li Xiaomei (李晓梅), Wang Yuguo (王玉国), *et al.* The correlation of hair zinc and children monophagia anorexia[J]. Chinese Journal of Public Health Engineering (中国卫生工程学), 2015, 14(1): 77-78.
- [4] Toshiyuki F, Yamasaki S, Nishida K, *et al.* Zinc homeostasis and signaling in health and diseases[J]. Journal of Biological Inorganic Chemistry, 2011, 16(7): 1123-1134.
- [5] Myers S A, Bonnefond A. Zinc transporters and zinc signaling: new insights into their role in type 2 diabetes[J]. International Journal of Endocrinology, 2015, 2015: 167503-167509.
- [6] Zheng Wei (郑玮), Wang Zhanyou (王占友). Brain metabolism of zinc and alzheimer's disease[J]. Bioscience (生命科学), 2012, 24(8): 833-846.
- [7] Zhao Haiwen (赵海文). Analysis of plasma selenium, copper, iron and zinc in patients with Parkinson's disease[D]. Wenzhou: Wenzhou Medical University(温州医科大学), 2014.
- [8] Kandasamy P, VEDIAPPEN P. Turn-on fluorescence chemosensor for fluoride ions and its applicability in imaging of living cells[J]. Journal of Luminescence, 2016, 169: 289-294.
- [9] Liu Min (刘敏), Tan Huilong (谭慧龙), Liu Zhiguo (刘治国), *et al.* Research progress of zinc ion fluorescence molecular probes based on small molecules[J]. Organic Chemistry(有机化学), 2013, 33(8): 1655-1667.
- [10] Chen X Q, Tian X Z, Shin I J, *et al.* Fluorescent and luminescent probes for detection of reactive oxygen and nitrogen species[J]. Chemical Society Reviews, 2011, 40(9): 4783-4804.
- [11] Zhang J F, Zhou Y, Yoon J Y, *et al.* Recent progress in fluorescent and colorimetric chemosensors for detection of precious metal ions (silver, gold and platinum ions)[J]. Chemical Society Reviews, 2011, 40(7): 3416-3429.
- [12] Huang C B, Qu J L, Qi J, *et al.* Dicyanostilbene-derived two-photon fluorescence probe for free zinc ions in live cells and tissues with a large two-photon action cross section[J]. Organic Letters, 2011, 13(6): 1462-1465.
- [13] Huang Chibao(黄池宝), Liang Xing(梁兴), Zeng Qihuang(曾启华), *et al.* Derived from dicyano diphenylethylene for two-photon fluorescent zinc ion probe for in vivo imaging[J]. Chemical Journal of Chinese University(高等学校化学学报), 2015, 36(4): 646-653.
- [14] Roy N, Pramanik H A R, Paul P C. A highly sensitive and selective fluorescent chemosensor for detection of  $Zn^{2+}$  based on a Schiff base[J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2015, 140: 150-155.
- [15] Sun Ce (孙策), Zhao Shaodan (赵少丹), Wang Peng (王鹏), *et al.* Synthesis and Properties of fluorescent probe for detecting of  $Zn^{2+}$  based on quinoline Schiff base[J]. Fine Chemicals(精细化工), 2016, 33(11): 1207-1211.
- [16] Qin J, Wang B, Yang Z. A ratiometric fluorescent chemosensor for  $Zn^{2+}$  in aqueous solution through an ESIPT coupled AIE process[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2016, 224: 892-898.
- [17] Yuan C, Liu X, Wu Y. A triazole Schiff base-based selective and sensitive fluorescent probe for  $Zn^{2+}$ : A combined experimental and theoretical study[J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2016, 154: 215-219.
- [18] Bronson R T, Montalti M, Prodi L. Origins of 'on-off' fluorescent behavior of 8-hydroxyquinoline containing chemosensors[J]. Tetrahedron Letter, 2004, 60(49): 11139-11144.
- [19] Chen L, Yan C, Du B B, *et al.* Linear and nonlinear optical properties of Ln-Zn heteronuclear complexes from a Schiff base ligand containing 8-hydroxyquinoline moiety[J]. Inorganic Chemistry Communications, 2014, 47: 13-16.
- [20] Sakiat H, Sourav D, Amit C, *et al.* S-shaped decanuclear heterometallic [Ni(8)Ln(2)] complexes [Ln(III)] = Gd, Tb, Dy and Ho]: theoretical modeling of the magnetic properties of the gadolinium analogue[J]. The Royal Society of Chemistry, 2014, 43: 10164-10174.
- [21] Choi Y W, Park G J, Na Y J. A single Schiff base molecule for recognizing multiple metal ions: a fluorescence sensor for Zn(II) and Al(III) and colorimetric sensor for Fe(II) and Fe(III)[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2014, 194: 343-352.