一种新型连续检测镉离子和焦磷酸阴离子的逻辑门 荧光传感器及其细胞成像研究

常永新^a 李 白^a 郭 淼^b 蔡永红^{*,a} 徐括喜^{*,a}

(^a 河南大学化学化工学院 功能有机分子研究中心 河南省阻燃与功能材料工程实验室 开封 475004)

(^b 河南大学纳米材料工程研究中心 开封 475004)

摘要 设计并合成了一种基于 8-羟基喹啉(8-HQ)的连续检测 Cd^{2+} 和焦磷酸阴离子(PPi)的荧光传感器 **L**. 在传感器 **L** 的 DMSO/H₂O (V/V=1/1, 0.01 mol/L, Hepes-HCl buffer, pH=7.20)溶液中加入 Cd^{2+} 后导致荧光发射峰($\text{Em}=537\text{ nm}$)猝灭, 检测限低至 $5.87 \times 10^{-8}\text{ mol/L}$. 通过 Job's 曲线图和质谱验证传感器 **L** 和 Cd^{2+} 离子之间以 1:1 化学计量比结合, 结合常数为 $4.38 \times 10^4\text{ L/mol}$. 复合传感器 **L**- Cd^{2+} 体系具有通过配体置换法对 PPi 高度选择性检测性能. **L** 可以作为一种逻辑门荧光传感器检测 Cd^{2+} 和 PPi. 传感器 **L** 可以用于对活细胞中的 Cd^{2+} 和 PPi 的荧光成像.

关键词 8-羟基喹啉; 荧光传感器; 连续检测; 活细胞成像

A Novel Logic Gate Fluorescent Sensor for the Sequential Detection of Cd^{2+} and Pyrophosphate Anion and Application in Cell Imaging

Chang, Yongxin^a Li, Bai^a Guo, Miao^b Cai, Yonghong^{*,a} Xu, Kuoxi^{*,a}

(^a Engineering Laboratory for Flame Retardant and Functional Materials of Henan Province, Institute of Functional Organic Molecular Engineering, College of Chemistry and Chemical Engineering, Henan University, Kaifeng 475004)

(^b Institute of Nanomaterials Engineering Research Center, Henan University, Kaifeng 475004)

Abstract A novel fluorescent sensor **L** based on 8-hydroxyquinoline (8-HQ) has been designed and synthesized. The sensor **L** displayed excellent sensitivity specific toward Cd^{2+} and pyrophosphate anion (PPi), respectively. The fluorescence emission peak at 537 nm was quenched when Cd^{2+} was added to the DMSO/H₂O (V/V=1/1, 0.01 mol/L, Hepes-HCl buffer, pH=7.20) solution of sensor **L** and the detection limit was as low as $5.87 \times 10^{-8}\text{ mol/L}$. The 1:1 stoichiometry was verified by Job's plot and mass spectrum, and the association constant was obtained to be $4.37 \times 10^4\text{ L/mol}$. The further study found that the **L**- Cd^{2+} system has high selectivity for detection of PPi by ligand replacement method and **L** could be used as a logic gate fluorescence sensor. In addition, the sensor **L** was employed for imaging the Cd^{2+} and PPi in living cells.

Keywords 8-hydroxyquinoline; fluorescent sensor; sequential detection; cell imaging

在过去十年中, 重金属和过渡金属对人类健康的危害和环境的污染已被广泛报道. 在各种重金属离子中, Cd^{2+} 引起了人们的极大关注, 因为镉广泛用于工业、农业和军事等领域. 而且, Cd^{2+} 被认为是一种人类致癌物质, 因为它可以通过食物链在生物组织中累积超过 10 年. 此外, 长期接触 Cd^{2+} 也对人类健康产生严重影响, 如肾功能不全、肺活量减少、心血管疾病、钙代谢紊乱、

白血病和前列腺癌等^[1]. 焦磷酸($\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$, PPi)是腺嘌呤核苷三磷酸(ATP)与核苷酸三磷酸酯水解的产物, 在 DNA/RNA 聚合等生化反应中起着重要作用^[2]. 此外, PPi 浓度的差异也被用来监测或诊断一些疾病. 例如, 焦磷酸二氢钙(CPPD)晶体沉积病主要由滑液中异常高水平的 PPi 引起^[3]. 鉴于 PPi 的重要生理作用, 迫切需要通过 PPi 的定量测定. 相对于传统的检测方法[原子吸收

* Corresponding authors. E-mail: caiyonghong@henu.edu.cn; xukx@henu.edu.cn

Received March 5, 2019; revised March 18, 2019; published online April 11, 2019.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. U1404207).

国家自然科学基金(No. U1404207)资助项目.

光谱法(AAS)、原子荧光光谱法(AFS)、电感耦合等离子体原子发射光谱法(ICP-AES)、电感耦合等离子体质谱法(ICP-MS)], 显色和荧光化学传感器因其高灵敏度、简单性、低成本、快速响应和实时检测而备受关注, 在环境、生物和工业领域都具有广泛的应用价值^[4].

能够识别多个目标的传感器在检测分析物时将比一对一的分析过程更有效和便捷, 并且可以节省成本. 其中, 基于席夫碱的传感器, 由于它具有优异的荧光性能、明亮的光致变色性能、极好的热稳定性和快的响应时间等优点而被用于各种离子的检测^[5~7]. 然而, 大多数荧光传感器只用于单一检测特定金属离子, 而用于连续检测的逻辑门荧光化学传感器的报道相对较少. 尤其是在其他常见干扰阳离子/阴离子存在的情况下在含水介质中实现高选择性和高灵敏度的检测尤为重要. 光致电子转移(PET)荧光传感器通常由两个结构单元组成: 受体单元和荧光载体单元. 受体单元用于特定识别目标离子, 其通常包含作为离子螯合剂的 N、O 和 S 原子; 荧光载体单元, 用于将主体与客体的识别转化为荧光信号, 通常包含有罗丹明、香豆素、喹诺酮和喹啉基团^[8]. 主体分子在无束缚状态下, 受体单元可以自由旋转, PET 受阻荧光团单元产生强烈荧光. 通常, 受体单元与特定离子结合时其孤对电子与荧光团的 π 轨道之间发生电子转移产生 PET 效应, 强烈地淬灭荧光团的荧光^[9]. 因此, 我们基于 PET 机理设计并合成了一种新型 8-羟基喹啉席夫碱的荧光传感器, 因为其能形成独特的刚性共轭结构, 使得该传感器具有非常优异的荧光连续传感 Cd^{2+} 和 PPI 性能. 通过 B3LYP/6-31G(d, p) 的量子化学计算验证了 **L** 和 Cd^{2+} 之间的可能的络合模式.

1 结果与讨论

1.1 新型传感器 **L** 的设计与合成

我们的设计是通过将化合物 **c** 和 2-氨基吡啶结合得到共轭结构更大的分子来构建传感器 **L** (Scheme 1). 化合物 **L** 的化学结构通过 FT-IR, ^1H 和 ^{13}C NMR 和 HRMS 技术进行了表征.

1.2 荧光和吸收光谱研究

首先使用荧光光谱研究了传感器 **L** 与不同阳离子之间的相互作用. 如图 1 所示. 传感器 **L** 在 DMSO/ H_2O ($V/V=1/1$, 0.01 mol/L, Hepes-HCl buffer, pH=7.20) 溶液中在 537 nm 处显示出较强的荧光发射峰(λ_{ex} : 320 nm). 加入常见的碱金属离子、碱土金属离子和其他过渡金属离子(如 Na^+ , K^+ , Ag^+ , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Ba^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Pb^{2+} , Hg^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Cr^{3+} , Fe^{3+} , Al^{3+} 等)均没有产生明显的光谱变化. 然而 Cd^{2+} 的加入迅速猝灭了传感器 **L** 的荧光. 并且, 在紫外灯照射下, 观察到从蓝色到无色的颜

图式 1 化合物 **L** 的合成
Scheme 1 Synthesis of compound **L**

图 1 在 DMSO/ H_2O ($V/V=1/1$, 0.01 mol/L, Hepes-HCl buffer, pH=7.20) 缓冲溶液中加入 5.0 equiv. 不同金属离子(Na^+ , K^+ , Ag^+ , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Ba^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Pb^{2+} , Hg^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Cr^{3+} , Fe^{3+} 和 Al^{3+}) 后传感器 **L** 的荧光发射峰($\lambda_{\text{ex}}=320$ nm)

Figure 1 Fluorescent intensity ($\lambda_{\text{ex}}=320$ nm) of sensor **L** upon the addition of 5 equiv. different metal ions Na^+ , K^+ , Ag^+ , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Ba^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Pb^{2+} , Hg^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Cr^{3+} , Fe^{3+} and Al^{3+} in DMSO/ H_2O solution ($V/V=1/1$, 0.01 mol/L, Hepes-HCl buffer, pH=7.20)

色变化, 表明形成了 **L**- Cd^{2+} 络合物. 然而, Cu^{2+} 的加入使得传感器 **L** 的荧光强度也有一定程度的降低, 这可能是由于 Cu^{2+} 的顺磁性特征导致的荧光猝灭现象^[10,11].

Cu^{2+} 的存在对传感器 **L** 检测 Cd^{2+} 会产生一定程度干扰, 但是其他常见金属离子的存在并不会使传感器 **L** 对 Cd^{2+} 的检测产生影响. Cd^{2+} 的加入导致传感器 **L** 的荧光猝灭可能是由于传感器 **L** 的酚羟基与 Cd^{2+} 配位后电子云密度减小, 促使分子内的光致电子转移(PET)过程变得容易, 从而观测到荧光猝灭现象^[12].

为了进一步研究 Cd^{2+} 与传感器 **L** 之间的相互作用, 进行了荧光滴定实验(图2a). 传感器 **L** 在 537 nm 处的荧光强度随着 Cd^{2+} 浓度的增加逐渐减弱, 在增加到 1.35 equiv. 后其荧光几乎完全淬灭. Job's 曲线图(图3a)表明在 $\text{DMSO}/\text{H}_2\text{O}$ ($V/V=1/1$, 0.01 mol/L, Hepes-HCl buffer, $\text{pH}=7.20$) 溶液中, **L** 与 Cd^{2+} 的配位比为 1:1^[13]. 同时质谱检测也验证了 **L** 与 Cd^{2+} 形成 1:1 配合物. 对 537 nm 处测得的荧光滴定曲线进行非线性拟合确定了 **L** 与 Cd^{2+} 的结合常数 $K_a=4.37\times 10^4$ L/mol. 此外, 通过公式 $\text{LOD}=3\sigma/k$ 计算出对 Cd^{2+} 的检出限为 5.87×10^{-8} mol/L

图2 (a)在传感器 **L** (3.33×10^{-5} mol/L)的 $\text{DMSO}/\text{H}_2\text{O}$ ($V/V=1/1$, 0.01 mol/L, Hepes-HCl 缓冲液, $\text{pH}=7.20$) 溶液中加入不同浓度的 Cd^{2+} (0~1.35 equiv.) 的荧光光谱和(b)传感器 **L** 荧光强度与 Cd^{2+} 浓度的线性关系图

Figure 2 (a) Fluorescent spectra of sensor **L** (3.33×10^{-5} mol/L) with the addition of various concentration of Cd^{2+} (0~1.35 equiv.) in $\text{DMSO}/\text{H}_2\text{O}$ solution ($V/V=1/1$, 0.01 mol/L, Hepes-HCl buffer, $\text{pH}=7.20$) and (b) linear relationship of fluorescence intensity of sensor **L** as a function of Cd^{2+}

Inset: Visual color changes observed in solution of **L** (left) and **L**- Cd^{2+} (right) after addition of 3.0 equiv. of Cd^{2+} ion

(图2b), 并且具有良好的线性关系, 相关系数(R^2)为 0.9900.

图3 (a)在 $\text{DMSO}/\text{H}_2\text{O}$ ($V/V=1/1$, 0.01 mol/L, Hepes-HCl buffer, $\text{pH}=7.20$) 溶液中传感器 **L** 对于 Cd^{2+} 的 Job's 曲线和(b)溶液 pH 对传感器 **L** 检测能力的影响

Figure 3 (a) Job's plot for the sensor **L** with Cd^{2+} in $\text{DMSO}/\text{H}_2\text{O}$ solution ($V/V=1/1$, 0.01 mol/L, Hepes-HCl buffer, $\text{pH}=7.20$), and (b) pH's impact of recognition ability of sensor **L**

金属离子的竞争实验表明(图4), 除铜离子外, Cd^{2+} (3.33×10^{-5} mol/L)与其它金属离子(1.65×10^{-4} mol/L)混合引起的荧光猝灭与单纯 Cd^{2+} 引起的荧光猝灭相似. 由此可知, 大多数干扰离子的存在不会影响传感器 **L** 对 Cd^{2+} 的检测. 为了更好地验证传感器 **L** 在生理环境中的适用性, 研究了溶液 pH 对传感器 **L** 的荧光性能的影响实验(图3b). **L** 在较宽的 pH 范围内保持较强的荧光. 在 **L** 的溶液中加入 Cd^{2+} 后, 其荧光迅速降低, 而在 6~8 的 pH 范围内其荧光猝灭最完全. 因此, 该传感器在生物系统中具有潜在的应用前景^[14].

UV-Vis 滴定实验表明, 在增加 Cd^{2+} 离子(0~1.15 equiv.)后在上述溶液中, $\lambda=264$ 和 306 nm 处的吸收带随着 Cd^{2+} 离子浓度的增加吸光度逐渐减小. $\lambda=350$ nm 处的吸光度逐渐增大. 当添加 1.15 equiv. Cd^{2+} 后, 其峰值达平衡, 吸光度不再发生变化. 在 $\lambda=326$ nm 和 284 nm 处出现的等吸收点说明 **L** 与 Cd^{2+} 离子结合后形

图4 不同金属离子的双离子混合溶液对传感器 **L** 的干扰
Figure 4 Interference of other metal ions in a binary mixture solution of sensor **L**

成了稳定的配合物。为了探究 Cd^{2+} 对 **L** 荧光猝灭的机理, 测定了 $\text{L}-\text{Cd}^{2+}$ 的 ^1H NMR。如图 5 所示, ^1H NMR 分析显示羟基(OH)上的质子峰消失, 表明络合过程中羟基参与了配位。猜测 Cd^{2+} 离子可能通过羟基、噁唑, 喹啉和席夫碱的 N 原子形成配位作用。这种配位作用导致了 **L** 的荧光猝灭。由于与 Cd^{2+} 离子配位, 发射光谱没有明显的位移, 而且表现出明显的荧光猝灭响应。我们推测 **L** 是基于 PET 机理实现荧光的猝灭^[15]。

图5 加入 1.0 equiv. $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ 后传感器 **L** 的氢谱($\text{DMSO}-d_6$)
Figure 5 ^1H NMR spectra of sensor **L** with $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ in $\text{DMSO}-d_6$

考虑到 **L** 对 Cd^{2+} 的键合性能, 配合物 $\text{L}-\text{Cd}^{2+}$ 可能是一种离子置换法探测阴离子的传感器。为了验证这一猜想, 进一步研究了配合物 $\text{L}-\text{Cd}^{2+}$ 对各种阴离子的检测性能。如图 6 所示, 在过量加入 Cl^- , Br^- , I^- , SO_4^{2-} , SO_3^{2-} , $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$, PO_4^{3-} , NO_3^- , CO_3^{2-} , AC^- , HCO_3^- , HSO_4^- , HPO_4^{2-} , $\text{C}_6\text{H}_5\text{COO}^-$, ATP , ADP , O_2^{2-} , $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$, HSO_3^- , H_2PO_4^- 等阴离子后, 荧光光谱并无明显变化, 而加入 $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ 后, 537 nm 处的荧光发射强度明显增强, 可能是由于 $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ 阴离子导致 $\text{L}-\text{Cd}^{2+}$ 解离后配体 **L** 进入

溶液。我们用荧光滴定法测定了 $\text{L}-\text{Cd}^{2+}$ 对 $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ 的检测能力。如图 7a 所示。当加入 9.40 equiv. $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ 时, $\text{L}-\text{Cd}^{2+}$ 体系的发射强度恢复到接近未加入 Cd^{2+} 时的荧光强度。在此之后, 较高的 $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ 浓度并没有导致荧光强度的进一步增强。荧光滴定法测定配合物 $\text{L}-\text{Cd}^{2+}$ 与 $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ 的络合常数为: $K_a = 1.08 \times 10^4 \text{ L/mol}$ 。

图6 $\text{L}-\text{Cd}^{2+}$ ($3.33 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$)在 $\text{DMSO}/\text{H}_2\text{O}$ ($V/V=1/1$, 0.01 mol/L , Hepes-HCl buffer, $\text{pH}=7.20$)溶液中加入不同阴离子荧光光谱

Figure 6 Fluorescence spectra of $\text{L}-\text{Cd}^{2+}$ ($3.33 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$) upon addition of various anions in $\text{DMSO}/\text{H}_2\text{O}$ solution ($V/V=1/1$, 0.01 mol/L , Hepes-HCl buffer, $\text{pH}=7.20$)

为了进一步探究 $\text{L}-\text{Cd}^{2+}$ 体系作为 $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ 阴离子选择性传感器的实际应用性能, 在 5.0 equiv. 其他阴离子存在下进行了干扰实验。结果表明: 所有测试的阴离子都没有干扰 $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ 的荧光检测。紫外-可见光谱恢复和荧光光谱恢复(图 7a)的结果表明, 配合物 $\text{L}-\text{Cd}^{2+}$ 中 Cd^{2+} 离子能够被 $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ 从其配合物中夺取出来。我们进一步通过可逆性试验验证了这一推断。通过交替添加 Cd^{2+} 和 $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ 到测试溶液中, $C_L = 3.33 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$, $C_{\text{Cd}^{2+}} = 4.50 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$, $C_{\text{PPi}} = 3.33 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$, 荧光光谱出现猝灭-增强交替循环的现象^[16,17]。

考虑到 **L** 对 Cd^{2+} 和 $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ 连续检测性能, 传感器 **L** 可以开发作为一种模拟 INHIBIT 逻辑门^[18], 使用 Cd^{2+} 离子和 $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ 作为两个逻辑输入命令, 传感器 **L** 显示荧光发射('1'状态 turn-ON)或荧光猝灭('0'状态 turn-OFF)。同时存在 Cd^{2+} 离子和 $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ 作为输入命令时 **L** 表现出强荧光发射('1'状态), 仅存在 Cd^{2+} 作为输入命令时, **L** 表现出荧光猝灭('0'状态), 图 8 给出了 INHIBIT 功能的相应表格和逻辑电路图。

为了更深入地理解传感器 **L** 结合 Cd^{2+} 离子的整合机制, 以 B3LYP/6-31+G (d,p)作为基组函数, 通过 Gaussian 09 程序进行密度泛函理论(DFT)计算^[19]。通过优化后的结构, 发现 Cd^{2+} 离子与 **L** 分子上 N、O 原子

图7 在 DMSO/H₂O (V/V=1/1, 0.01 mol/L, Hepes-HCl 缓冲液, pH=7.20) 溶液中 (a) L-Cd²⁺ (3.33×10^{-5} mol/L) 复合物在添加不同浓度 P₂O₇⁴⁻ (0~9.40 equiv.) 的荧光光谱和 (b) L-Cd²⁺ 络合物 (3.33×10^{-5} mol/L) 对于 P₂O₇⁴⁻ 的检出限 (LOD) (计算为 8.56×10^{-7} mol/L)

Figure 7 (a) Fluorescence spectra of L-Cd²⁺ (3.33×10^{-5} mol/L) complex with increasing concentration P₂O₇⁴⁻ (0~9.40 equiv.) and (b) The limit of detection (LOD) of L-Cd²⁺ complex (3.33×10^{-5} mol/L) for P₂O₇⁴⁻ (calculated as 8.56×10^{-7} mol/L) in DMSO/H₂O (V/V=1 : 1, 0.01 mol/L Hepes buffer, pH=7.2)

及羟基 O 原子的距离分别为 2.33、2.51、2.25 和 2.20 Å, 表明 L 在结合 Cd²⁺ 时其本身的刚性结构发生一定程度的扭曲, 同时噻唑环翻转 180° 形成一个闭合空腔恰好可以提供一个适当的螯合中心来络合 Cd²⁺. 计算结果也表明从最低未占分子轨道(LUMO)到最高占据分子轨道(HOMO)转变时电子密度分布发生明显变化(图9). 在自由受体状态下, L 的 HOMO 轨道 π 电子主要分布在噻啉和噻唑环上, 当分子受到激发光照射时, HOMO 轨道向 LUMO 轨道跃迁, 此时 π 电子向吡啶环流动, 在与 Cd²⁺ 络合后 L-Cd²⁺ 的 HOMO 轨道 π 电子主要分布在苯基噻唑环上, LUMO 轨道 π 电子分布在噻啉及吡啶环上. 由此表明, 从 HOMO 轨道向 LUMO 轨道跃迁时分子内的 π 电子分布发生一定程度变化, 进而导致了荧光光谱的变化, 对比其能隙的差异我们发现 L-Cd²⁺ 的能隙值 ($\Delta E = 1.76$ eV) 相比 L 的能隙值 ($\Delta E = 3.59$ eV), 降低

图8 传感器 L 的络合模式以及模拟 INHIBIT 功能的相应表格和逻辑电路图

Figure 8 Complex mode of sensor L and the corresponding table and logic diagrams that simulate the INHIBIT function

图9 传感器 L 或 L-Cd²⁺ 的 HOMO 和 LUMO 轨道 π 电子密度电子分布以及能隙 ΔE ($E_{\text{HOMO}} - E_{\text{LUMO}}$) 通过 B3LYP/6-31G* 基组计算

Figure 9 HOMO, LUMO Electron distribution and band gap energies ΔE ($E_{\text{HOMO}} - E_{\text{LUMO}}$) orbitals for sensor L or L-Cd²⁺ and calculated through the B3LYP/6-31G* set

了 1.83 eV, 这说明 Cd²⁺ 配位后轨道间相互作用使得配体整个分子体系的能量降低.

最后, 为了进一步拓展传感器 L 在生物系统中的应用, 进行了 PC-12 细胞成像实验. 首先用 MTT 法检测 L 对活 PC-12 细胞的细胞毒性^[20]. 结果表明, 在 L 存在的情况下, 当浓度为 4.0×10^{-5} mol/L 时, 培养 2 h 后 PC-12 细胞存活率为 80%. 如图 10b 所示, 用 L 处理 PC-12 细

胞,在显微镜下可以观察到明亮的绿色荧光.然而,加入 Cd^{2+} 的细胞失去了它们的荧光,这表明 Cd^{2+} 离子可以进入细胞以淬灭细胞中 **L** 的荧光(图 10e).此外,用 **L** 处理过的 PC-12 细胞在含 Cd^{2+} 的培养基中加入 $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ 后孵育 30 min 又观察到了绿色荧光(图 10h),表明 $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ 也可以进入 PC-12 细胞.从明场视野中,观察到细胞的形态是完整的(图 10a, 10d 和 10g),这表明传感器 **L** 可用于检测活细胞中的 Cd^{2+} 离子和 $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$.

图 10 传感器 **L** 在 PC-12 活细胞中的荧光成像

Figure 10 Live cell fluorescence imaging of sensor **L** in living PC-12 cells

(a) Bright-field image of living PC-12 cells incubation with **L** (1.0×10^{-5} mol/L) for 30 min, (b) fluorescence images of a, (d) bright-field image with **L** (1.0×10^{-5} mol/L) and Cd^{2+} (1.0×10^{-5} mol/L) ion for 30 min, (e) fluorescence images of d, (g) bright-field image of **L** (1.0×10^{-5} mol/L) for 30 min again incubated with Cd^{2+} (1.0×10^{-5} mol/L) and $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ (1.0×10^{-5} mol/L), (h) fluorescence images of g, (c), (f), (i) are overlay of its corresponding image, respectively

2 结论

成功地合成了化合物 **L**, 并通过 FT-IR、 ^1H NMR、 ^{13}C NMR 和 ESI-MS 进行了表征. 紫外-可见光谱和荧光光谱证明这是一种能够快速、准确检测水溶液中痕量 Cd^{2+} 的新方法. 在 **L** 中加入 Cd^{2+} 时, 其荧光强度显著降低, 且颜色从蓝色到无色快速变化. 在 **L**- Cd^{2+} 的体系中加入 $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ 可以观察到荧光恢复. 由此, 我们设计了一种模拟 INHIBIT 逻辑门的荧光化学传感器. 传感器 **L** 对 Cd^{2+} 的选择性识别是通过 PET 机制实现的. 对传感器 **L** 的 HOMO 和 LUMO 轨道也进行了分析研究, 验证了其 与 Cd^{2+} 可能的络合机制. 细胞成像实验进一步拓展了传感器 **L** 在生理环境中对 Cd^{2+} 和 $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ 检测.

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

在 Bruker AV 光谱仪上记录 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 光

谱; 用 MEL-TEMP II 熔点仪测定熔点; IR 光谱在 Nicolet 670 FT-IR 分光光度计上进行; 在 Esquire 3000 LC-MS 质量仪器上记录 ESI 质谱; 在 Agilent Cary-100UV-Vis 分光光度计和 F-7000FL 荧光分光光度计上记录 UV-Vis 和荧光光谱; 用 $20\times$ 物镜的倒置荧光显微镜进行细胞成像; 用 FE28 pH 计和 LE438 pH 电极进行 pH 测量. 化合物 **a**, **b** 和 **c** 通过文献报道的方法合成^[21]. 所有试剂和化学药品均购自商业供应商, 无需进一步纯化即可使用.

3.2 实验方法

3.2.1 化合物 **L** 的合成

在 50 mL 圆底烧瓶中加入 2-氨基吡啶(0.10 g, 1.00 mmol), 用 20 mL 甲醇使其完全溶解, 然后加入化合物 **c** (0.35 g, 1.00 mmol), 反应混合物在 45°C 下搅拌 6 h 后析出白色沉淀. 抽滤, 并通过甲醇反复洗涤, 真空干燥得到化合物 **L** 0.27 g, 产率 63%. m.p. $186.2\sim 188.5^\circ\text{C}$; ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ : 10.87 (s, 1H), 10.12 (s, 1H), 8.55 (d, $J=12$ Hz, 1H), 8.50 (s, 1H), 8.02 (d, $J=12$ Hz, 1H), 7.88 (dd, $J=16, 4$ Hz, 2H), 7.77~7.67 (m, 3H), 7.59 (d, $J=8$ Hz, 1H), 7.45 (t, $J=10$ Hz, 2H), 7.05 (dd, $J=18, 6$ Hz, 2H), 6.77~6.68 (m, 1H), 5.45 (s, 2H); ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ : 161.17, 156.72, 156.70, 154.82, 151.62, 149.59, 147.94, 139.80, 138.55, 138.39, 138.22, 137.50, 136.23, 133.29, 131.44, 130.37, 127.02, 123.55, 120.73, 120.35, 118.02, 117.45, 111.84, 111.35; IR (KBr) ν : 2760, 1710, 1845, 1254 cm^{-1} ; HRMS calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{19}\text{N}_4\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 423.14517, found 423.14529.

3.2.2 荧光光谱的测定

在水溶液中制备 Ba^{2+} , Al^{3+} , Co^{2+} , Cr^{3+} , Mn^{2+} , Fe^{3+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ag^+ , Cd^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} 的硝酸盐储备液 (0.1 mol/L). K^+ , Ca^{2+} , Na^+ 和 Mg^{2+} 的储备液是将金属盐 $\text{CaCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{KCl}\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{NaCl}\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 分别在 10 mL 容量瓶中配制成浓度为 0.1 mol/L 的水溶液. 化合物 **L** 溶解在 DMSO 中配制成 0.01 mol/L 的溶液. 在光谱测量之前, 将高浓度储备溶液稀释至 $3.33 \times 10^{-5}\text{ mol/L}$ ($\text{DMSO}/\text{H}_2\text{O}$, Hepes buffer, $\text{pH}=7.2$, $\text{V}/\text{V}=1/1$). 每次取 3 mL 的 **L** 溶液放在长度为 1 cm 的比色皿中, 用微型注射器将不同的金属离子 ($10\text{ }\mu\text{L}$) 加入到比色皿. 然后在室温下记录 UV-Vis 和荧光光谱. 激发波长为 320 nm, 狭缝宽度均为 $5.0/5.0\text{ nm}$.

3.2.3 理论计算

使用 Gaussian-09 程序对传感器 **L** 及其复合物进行了理论计算^[22]. 通过执行谐振频率分析(未发现虚频)确认 DFT 优化结构在势能面(PES)上是最小值, 并且在几

何优化期间仅使用默认收敛条件.

3.2.4 细胞成像测试

PC-12 细胞保存在包含 10 wt% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素的 Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM) 培养基中, 细胞在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下含体积分数为 5% CO_2 的加湿大气中生长^[23]. 细胞接种在一个 12 孔板上每 100 μL 培养 15000 个细胞, 然后在 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 16 h. 实验前, 细胞与主体 **L** 在 0.1 mol/L 无菌 PBS 缓冲液中共同孵育 30 min. 培养后, 用 PBS 缓冲液清洗细胞用溶于水的 $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ 处理 30 min. 用 PBS 缓冲液洗涤细胞 3 次. 通过倒置荧光显微镜将接种到培养皿上的细胞进行荧光成像.

辅助材料(Supporting Information) 化合物 **L** 的 ^1H NMR, ^{13}C NMR, HRMS (ESI) 谱, 结构优化, MTT 分析, 恢复性实验, 阴离子竞争实验, 紫外光谱, **L**- Cd^{2+} 质谱, Cd^{2+} 非线性拟合曲线和 $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ 非线性拟合曲线. 这些材料可以免费从本刊网站(<http://sioc-journal.cn/>)上下载.

References

- [1] Duan, F.; Liu, G.; Liu, P.; Fan, C.; Pu, S. *Tetrahedron* **2016**, 72, 3213.
- [2] Meng, X.; Cao, D.; Hu, Z.; Han, X.; Li, Z.; Liang, D.; Ma, W. *Tetrahedron Lett.* **2018**, 59, 4299.
- [3] Arumugaperumal, R.; Srinivasadesikan, V.; Lin, M.-C.; Shellaiah, M.; Shukla, T.; Lin, H.-C. *RSC Adv.* **2016**, 6, 106631.
- [4] Lv, Y.; Wu, L.; Shen, W.; Wang, J.; Xuan, G.; Sun, X. *J. Porphyrins Phthalocyanines* **2015**, 19, 769.
- [5] Wang, C. Y.; Fu, J. X.; Yao, K.; Chang, Y. X.; Yang, L.; Xu, K. X. *ChemistrySelect* **2018**, 3, 2805.
- [6] Wang, P.; Liu, X. Y.; Fu, J. X.; Chang, Y. X.; Yan, L.; Xu, K. X. *Can. J. Chem.* **2018**, 96, 835.
- [7] Zhang, L.; Hu, W.; Yu, L.; Wang, Y. *Chem. Commun.* **2015**, 51, 4298.
- [8] Sandra, A.; Rutledge, P.; Todd, M. J. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2012**, 34, 5611.
- [9] Liu, H. Y.; Tan, Y.; Dai, Q. Z.; Liang, H. D.; Song, J.; Qu, J. L.; Wong, W. Y. *Dyes Pigm.* **2018**, 158, 312.
- [10] Liu, S.; Wang, Y. M.; Han, J. J. *Photochem. Photobiol. C* **2017**, 32, 78.
- [11] Guo, Y. X.; Wang, L.; Zhuo, J. Z.; Xu, B.; Li, X.; Zhang, J. Y.; Zhang, Z. Q.; Chi, H. J.; Dong, Y.; Lu, G. H. *Tetrahedron Lett.* **2017**, 58, 3951.
- [12] Joseph, W. N.; Hyunjung, L.; Lee, H. S.; Reibenspies, G. H.; Hancock, R. D. *Inorg. Chem.* **2014**, 53, 9014.
- [13] Wang, W.; Wei, J.; Liu, H.; Liu, Q.; Gao, Y. *Tetrahedron Lett.* **2017**, 58, 1025.
- [14] Luo, Y.; Tang, D.; Zhu, W.; Xu, Y.; Qian, X. *J. Mater. Chem. C* **2015**, 3, 8485.
- [15] Silva, A. P.; Nimal, G. H. Q.; Gunnlaugsson, T.; Allen, J. M.; Huxley, C. P. *Chem. Rev.* **1997**, 97, 1515.
- [16] Dong, Z. M.; Wang, W.; Qin, L. Y.; Feng, J.; Wang, J. N.; Wang, Y. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **2017**, 335, 1.
- [17] Gogoi, A.; Samanta, S.; Das, G. *Sens. Actuators, B* **2014**, 202, 788.
- [18] Li, P.; Wang, Y. *New J. Chem.* **2017**, 41, 4234.
- [19] Hao, J. N.; Yan, B. *Chem. Commun.* **2015**, 51, 7737.
- [20] Yao, K.; Fu, J. X.; Chang, Y. X.; Li, B.; Yang, L.; Xu, K. X. *Spectrochim. Acta A* **2018**, 205, 410.
- [21] Chang, Y. X.; Fu, J. X.; Yao, K.; Li, B.; Xu, K. X.; Pang, X. B. *Dyes Pigm.* **2019**, 161, 331.
- [22] Wang, P.; Fu, J. X.; Yao, K.; Chang, Y. X.; Xu, K. X. *Sens. Actuators, B* **2018**, 273, 1070.
- [23] Dai, Y. P.; Liu, X. Y.; Wang, P.; Fu, J. X.; Yao, K.; Xu, K. X. *RSC Adv.* **2016**, 6, 99933.

(Zhao, X.)