一种基于协同效应的肼荧光探针及其在细胞成像中的应用

胥稳智* 李 雪 韩孟楠 周婷婷
杨瑜涛 李 玮*

(河北大学化学与环境科学学院 药物化学与分子诊断教育部重点实验室
河北省化学生物学重点实验室 河北保定 071002)

摘要 开发了一种基于协同效应的新型肼荧光探针. 通过在发色团上引入两种不同的识别位点, 双识别位点的协同效应使得该探针对于肼具有良好的专一性和灵敏度, 检测限可达 $0.05 \sim 10.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. 此外, 该探针还可用于细胞(BT-474)中肼的检测.

关键词 水合肼; 协同效应; 细胞成像; 荧光探针

A Fluorescent Probe for Hydrazine Based on Synergistic Effect and Its Utilization in Cell Imaging

Xu, Wenzhi* Li, Xue Han, Mengnan Zhou, Tingting Yang, Yutao Li, Wei*

(Key Laboratory of Medicinal Chemistry and Molecular Diagnosis of the Ministry of Education, Key Laboratory of Chemical Biology of Hebei Province, College of Chemistry & Environmental Science, Hebei University, Baoding, Hebei 071002)

Abstract Hydrazine is an important raw material and catalyst in chemical industry. However, hydrazine is very harmful to human organs. A new type of probe was developed based on the synergistic effect. Two recognition sites were introduced into the probe to improve performance to hydrazine, which has good specificity to hydrazine. The limit of detection (LOD) for N_2H_4 was $0.05 \sim 10.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Moreover, the probe could detect N_2H_4 in BT-474 cells.

Keywords hydrazine; synergistic effect; cell imaging; fluorescent probe

肼的高还原性使其在医药、化工等领域得到了广泛的应用^[1]. 肼有较高的燃烧热, 是一种有用的航空航天推进剂^[2]. 然而, 肼对人体内脏有严重损伤作用, 对人体神经系统产生损伤^[3]. 动物实验证明, 肼还具有遗传毒性. 美国环境保护署(EPA)规定饮用水中肼的含量应低于 $0.312 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[4]. 因此, 开发一种有效可靠的检测肼的方法是十分必要的.

许多经典的方法已用于肼的检测, 如气相色谱法、电化学方法和紫外光谱法等. 然而, 这些方法存在操作复杂及耗时等缺点^[5~7]. 与之相比, 荧光法具有灵敏度高和操作简单等优点. 根据识别点, 我们可以将肼探针分为乙酸酯类^[8~10]、醛类^[11~13]、氰基乙烯类^[14~16]、邻苯二甲酰亚胺类^[17,18]、4-溴丁酸酯类^[19~21]、乙酰丙酮酯类^[22~23]、 β -二酮类^[24,25]、 α,β -不饱和羰基几类^[26~28]等^[29~32].

虽然文献已经报道多种反应型肼探针, 这些探针仍有一定的局限性, 如选择性差(尤其是胺类化合物容易对肼检测产生干扰)和对肼的灵敏度低等. 我们提出将双位点协同效应引入到肼探针的设计中, 在发色团上引入两种不同的识别位点. 只有两种识别位点均与探针反应, 才能引起相应的荧光变化, 提高探针对于肼的选择性. 另外, 利用两种不同的响应机制, 可以产生两种效应的协同, 从而提高探针对肼的灵敏性. 近年来, 我们^[33,34]报道了两种基于协同效应的肼荧光探针, 该探针对肼均具有较高的选择性和敏感性. 作为这一策略的进一步研究, 我们以 1,8-萘酰亚胺为荧光团, 设计合成了一种新型肼探针(Scheme 1). 该探针的设计思想在于, 同时采用乙酸酯基和邻苯二甲酰亚胺作为识别位点, 近似“双锁原理”, 可以提高探针对肼的选择性; 对探针两种不

* Corresponding authors. E-mail: wzxu2008@sinano.ac.cn; liweihebeilab@163.com

Received July 26, 2019; revised August 28, 2019; published online September 25, 2019.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 21702043, 21807021).

国家自然科学基金(Nos. 21702043, 21807021)资助项目.

同分子内电荷转移(ICT)过程进行调控,两种效应的叠加使得探针对胍的灵敏度得到了提高.

图式 1 探针的合成路线
Scheme 1 Synthetic procedure of the probe

1 结果与讨论

1.1 紫外光谱和荧光光谱研究

研究了在胍存在下探针的吸收光谱和发射光谱变化. 实验结果显示, 游离探针在 310 nm 处有最大吸收. 随着胍的加入, 310 nm 处的吸收峰逐渐减弱. 同时, 在 454 nm 处出现新的吸收峰, 并在 360 nm 处出现等吸收点. 溶液的颜色由无色逐渐变为橙色, 显示该探针可用于胍的比色检测.

通过荧光滴定实验对探针与胍的相互作用进行了研究. 如图 1 所示, 在 365 nm 激发波长下, 探针在 398 nm 处显示最大发射峰. 随着胍的添加, 探针在 398 nm 处的荧光强度逐渐减弱, 而 510 nm 处的荧光强度逐渐增强. 当胍的浓度达到探针的 150 倍时, 510 nm 处的荧光强度达到平衡. 随着胍的加入, 探针溶液的荧光颜色逐渐由蓝色变为绿色. 在 510 nm 处探针的荧光强度与 N_2H_4 浓度 ($0.05 \sim 10.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 呈线性关系 ($R^2 = 0.997$). 根据 $\text{LOD} = 3\sigma/k$, 计算出探针对胍的检测限为 $0.014 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 低于美国环境保护署规定的 $0.312 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

1.2 滴定体系 pH 筛选

为了获得更好的检测灵敏度, 分别对溶液的酸碱度和反应时间进行了优化. 研究了不同 pH 值 ($3.0 \sim 12.0$) 溶液中探针对胍的荧光响应. 实验结果显示, 在没有胍的情况下, 在 pH $3.0 \sim 7.0$ 的范围内探针没有明显的荧光变化, 这说明探针本身在 $3.0 \sim 7.0$ 范围内是稳定的. 探针与胍作用后, 在 pH $4.0 \sim 7.0$ 之间荧光强度变化较大, 并且在 pH 值为 6 时荧光强度变化最大.

1.3 选择性识别研究

实际样品的复杂性要求该探针对胍的选择性必须高于其它干扰物. 因此考察了多种可能的干扰物, 包括各种阳离子 (Mg^{2+} , Hg^{2+} , Ca^{2+} , K^+ , Na^+ , NH_4^+)、阴离子 (F^- , Br^- , NO_2^- , OAc^-)、氨基酸 (GSH, Pro, Hcy) 和胺类

图 1 探针的荧光滴定曲线
Figure 1 Fluorescence titration curve of the probe

[semicarbazide hydrochloride (SEM), urea, isoniazid (Inh)]. 如图 2 所示, 除胍以外, 所有这些干扰物均未产生显著的荧光变化. 随后, 利用该探针对实际水样(自来水)中的胍进行了检测. 分别在自来水和蒸馏水中加入一定量的胍, 调节 pH 至 6.0, 测试荧光变化. 实验表明, 在一定浓度范围 ($2.5 \sim 7.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 内, 两种溶剂体系的荧光强度基本一致. 在自来水和蒸馏水中胍的回收率分别为 $97.20\% \sim 99.60\%$ 和 $99.20\% \sim 102.60\%$. 结果

图 2 胍及各种干扰物对探针荧光强度的影响
Figure 2 Fluorescence response of hydrazine and various interfering substances to the probe

表明, 该探针具有较强的抗干扰能力, 可用于实际水样中胂的检测。

1.4 识别机理研究

为了阐明识别机理, 对识别产物进行了分离和表征, 并与探针的谱图进行了对比。对探针与产物的氢谱进行比较发现, 探针在 δ 2.53 处的质子峰消失, 说明乙酰基发生了胂解。与此同时, 识别产物的芳香氢由 δ 8.62 向高场移至 δ 8.26, 表明醛基转化为亚胺结构。对比探针与识别产物的红外光谱发现, 探针在 1767 和 1704 cm^{-1} 处有红外吸收, 分别归属于酯羰基和醛羰基。随着胂的加入, 1767 和 1704 cm^{-1} 处的红外吸收消失, 而在 3400 和 1694 cm^{-1} 处出现红外吸收, 这两个吸收峰归属于胺。实验结果证明, 酯基发生胂解, 同时醛基与胂反应生成胺(Scheme 1)。利用高分辨质谱对识别产物进行了确认(calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 312.1348, found 312.1341)。并且分别测定了识别产物的紫外光谱和荧光光谱, 并与探针的紫外滴定和荧光滴定图相比较, 发现二者基本吻合。

图式 2 可能的识别机理

Scheme 2 Proposed mechanisms for the detection of N_2H_4

1.5 理论计算

为了进一步将探针的结构变化与光学响应相关联, 利用高斯软件(Gaussian 09 program), 通过密度函数理论(hf/3-21g method)进行了计算。结果表明, 在探针中基态的电子云主要分布在萘环部分, 而激发态的电子云移至醛基部分, 这表明在萘环与醛基之间存在着分子内电荷转移(ICT)。与胂反应后, 基态电子主要分布在萘酚部分, 在激发下电子会转移至萘环部分, 说明酚羟基与萘环间同样存在着 ICT。此外, 探针和产物最低空轨道与最高已占轨道之间的能级差分别为 9.73 和 9.48 eV, 该计算结果与紫外光谱的红移相一致。

1.6 细胞成像研究

鉴于该探针对胂具有良好的识别性能, 将该探针应用于细胞中胂的检测。首先, 用噻唑蓝(MTT)法测定了探针的细胞毒性。MTT 实验表明, 该探针对活细胞具有

较低的细胞毒性。随后, 使用 BT-474 细胞来研究探针在细胞成像中的实际应用。当 BT-474 细胞与探针($5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)共孵育 24 h 后, 细胞呈蓝色荧光, 绿色通道内未见荧光(图 3)。当 BT-474 细胞与探针($5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)共孵育 24 h 后, 再与不同浓度的 N_2H_4 (15, 30 和 45 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)孵育 1 h, 绿色通道的荧光强度逐渐增强, 蓝色通道的荧光强度逐渐减弱并消失。细胞成像实验证明, 该探针可以用于细胞中胂的检测。虽然胂不是细胞的内源性物质, 但当人体服用某些药物如异烟肼后, 会在细胞新陈代谢过程中释放出胂, 这是异烟肼产生毒副作用的重要原因。通过该探针对细胞中胂的检测, 可以个体化地限定服药剂量, 防止药物中毒的发生, 同时该探针还有可能作为异烟肼毒副作用的保护剂。

2 结论

基于双位点协同效应, 我们设计合成出一种新型胂荧光探针。该探针对胂具有良好的选择性, 各种可能的干扰物如阳离子、阴离子、氨基酸和胺类均未其识别作用产生影响。该探针对胂的检测限为 0.05~10.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 低于 EPA 规定的 0.312 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。细胞成像实验表明, 该探针可用于细胞中胂的检测。

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

Bruker 核磁共振仪(400 MHz); Apex Ultra 7.0T Bruker 质谱仪; Agilent G9800A 型荧光光谱仪(美国 Agilent 公司); UV-3600 型分光光度计(美国 Agilent 公司); Thermo Nicolet iS10 红外光谱仪(美国 Thermo 公司); ZEISS LSM 880 激光共聚焦显微镜(德国 ZEISS 公司)。柱层析用硅胶(200~300 目), 实验室所用试剂均为市售分析纯试剂。

3.2 实验方法

3.2.1 化合物 HO-NPT-CHO 的合成

将化合物 HO-NPT (1.000 g, 3.71 mmol)溶解于 5 mL 三氟乙酸中, 加入六次甲基四胺(1.041 g, 7.42 mmol), 加热至 80 $^{\circ}\text{C}$ 回流反应 12 h。冷却至室温, 将反应物倒入冰水中, 有大量黄色固体析出。抽滤, 并用冷的乙醇洗涤, 干燥。粗产物经柱层析分离 [$V(\text{DCM})$: $V(\text{MeOH})=100:1$], 得 750 mg 黄色固体 HO-NPT-CHO, 产率 60%。m.p. 203.5~204.5 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 13.21 (s, 1H), 10.16 (s, 1H), 8.75 (dd, $J=8.0, 4.0$ Hz, 3H), 7.84 (t, $J=8.0$ Hz, 1H), 4.21 (t, $J=8.0$ Hz, 2H), 1.80~1.72 (m, 2H), 1.55~1.45 (m, 2H), 1.02 (t, $J=8.0$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 196.42, 165.65,

图3 BT-474 细胞与探针和胍孵育的共聚焦图像

Figure 3 Confocal images of BT-474 cells incubated with the probe and further incubated with hydrazine

163.64, 162.98, 134.84, 134.07, 131.74, 130.29, 127.01, 122.84, 122.81, 115.14, 114.87, 40.29, 30.18, 20.35, 13.83; HRMS (ESI) calcd for $C_{17}H_{14}NO_4$ $[M-H]^-$ 296.0928, found 296.0933.

3.2.2 探针 AcO-NPT-CHO 的合成

将化合物 HO-NPT-CHO (500 mg, 1.68 mmol) 溶于 2 mL 乙酸酐中, 加热至 140 °C 回流反应 12 h. 冷却至室温, 将反应液倒至冰水中, 加二氯甲烷萃取. 有机相加无水硫酸钠干燥, 过滤, 蒸除溶剂, 柱层析分离 [$V(DCM):V(MeOH)=100:1$], 得 400 mg 的黄色黄色固体化合物 AcO-NPT-CHO, 产率 70%. m.p. 193.8~194.8 °C; 1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ : 8.62 (s, 1H), 8.55 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 8.40 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 8.01 (s, 1H), 7.94 (t, $J=8.0$ Hz, 1H), 4.04 (t, $J=8.0$ Hz, 2H), 2.57 (s, 3H), 1.59~1.67 (m, 2H), 1.34~1.40 (m, 2H), 0.94 (t, $J=8.0$ Hz, 3H); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ : 168.91,

168.45, 163.70, 163.15, 149.34, 132.30, 130.04, 129.46, 128.37, 127.91, 126.59, 125.66, 123.06, 121.50, 84.24, 40.35, 30.17, 20.72, 13.83; HRMS (ESI) calcd for $C_{19}H_{18}NO_5$ $[M+H]^+$ 340.1179, found 340.1176.

3.2.3 光谱测试

探针 AcO-NPT-CHO 用 N,N -二甲基甲酰胺(DMF)配制溶液, 测试浓度为 $10 \mu mol \cdot L^{-1}$. 测试溶液均为 DMF-PBS 溶液($V:V=1:1$, $10 mmol \cdot L^{-1}$ PBS 缓冲液, pH 8.0), 选择性测试所用各种干扰离子均为钠盐或钾盐, 测试浓度均为 $15.0 mmol \cdot L^{-1}$. 紫外光谱和荧光光谱均在室温下测试, 样品池为 $1 cm \times 1 cm \times 4 cm$ 石英比色皿, 激发波长为 365 nm, 激发和发射狭缝宽度均为 5 nm.

3.2.4 细胞实验

Bt-474 细胞接种于成像专用的细胞培养皿, 密度为 2×10^5 个/孔. 探针组加入探针 AcO-NPT-CHO (5

$\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 孵育 24 h. 外源脒(N_2H_4)成像组分别加入 15, 30, 45 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 继续孵育 1 h. 共聚焦荧光成像激发波长为 365 nm, 收集范围 450~500 nm.

辅助材料(Supporting Information) 所合成化合物 HO-NPT-CHO, AcO-NPT-CHO 及识别产物的核磁、质谱、红外谱图. 这些材料可以免费从本刊网站(<http://sioc-journal.cn/>)上下载.

References

- [1] Ragnarsson, U. *Chem. Soc. Rev.* **2001**, 30, 205.
- [2] Mo, J. W.; Ogorevc, B.; Zhang, X.; Pihlar, B. *Electroanalysis* **2000**, 12, 48.
- [3] Reilly, C. A.; Aust, S. D. *Chem. Res. Toxicol.* **1997**, 10, 328.
- [4] U. S. Environmental Protection Agency (EPA) *Integrated Risk Information System (IRIS) on Hydrazine/Hydrazine Sulfate*, National Center for Environmental Assessment, Office of Research and Development, Washington, DC, **1999**.
- [5] McAuley, C. B.; Banks, C. E.; Simm, A. O.; Jones, T. G.; Compton, R. G. *Analyst* **2006**, 131, 106.
- [6] Sun, M.; Bai, L.; Liu, D. Q. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2009**, 49, 529.
- [7] Kawasaki, T.; Maeda, M.; Tsuji, A. *J. Chromatogr., Biomed. Appl.* **1979**, 163, 143.
- [8] Qu, P.; Ma, X.; Chen, W. S.; Zhu, D. D.; Bai, H. F.; Wei, X. H.; Shu, C.; Xu, M. T. *Spectrochim. Acta, A* **2019**, 210, 381.
- [9] Liu, C.; Liu, K. Y.; Tian, M. G.; Lin, W. Y. *Spectrochim. Acta, A* **2019**, 212, 42.
- [10] Song, Y. Q.; Chen, G.; Han, X. Y.; You, J. M.; Yu, F. B. *Sens. Actuators, B* **2019**, 286, 69.
- [11] Purohit, D.; Sharma, C. P.; Raghuvanshi, A.; Jain, A.; Rawat, K. S.; Gupta, N. M.; Singh, J.; Sachdev, M.; Goel, A. *Chem.-Eur. J.* **2019**, 25, 4660.
- [12] Jung, Y.; Ju, I. G.; Choe, Y. H.; Kim, Y.; Park, S.; Hyun, Y.; Oh, M. S.; Kim, D. *ACS Sens.* **2019**, 4, 441.
- [13] Meher, N.; Panda, S.; Kumar, S.; Iyer, P. K. *Chem. Sci.* **2018**, 9, 3978.
- [14] Liu, Y.; Ren, D. D.; Zhang, J. J.; Xi, H. Li.; Yang, F. *Dyes Pigm.* **2019**, 162, 112.
- [15] Paul, S.; Nandi, R.; Ghoshal, K.; Bhattacharyya, M.; Maiti, D. K. *New J. Chem.* **2019**, 43, 3303.
- [16] Wu, J. J.; Pan, J.; Ye, Z.; Zeng, L. T.; Su, D. D. *Sens. Actuators, B* **2018**, 274, 274.
- [17] Wang, W. D.; Hu, Y.; Li, Q.; Hu, S. L. *Inorg. Chim. Acta* **2018**, 477, 206.
- [18] Maji, R.; Mahapatra, A. K.; Maiti, K.; Mondal, S.; Ali, S. S.; Sahoo, P.; Mandal, S. H.; Uddin, M. R.; Goswami, S.; Quah, C. K.; Fun, H. K. *RSC Adv.* **2016**, 6, 70855.
- [19] Wu, Q. Q.; Zheng, J. L.; Zhang, W. C.; Wang, J. B.; Liang, W. L.; Stadler, F. J. *Talanta* **2019**, 195, 857.
- [20] Lu, Z. L.; Shi, X. M.; Ma, Y. F.; Fan, W. L.; Lu, Y. N.; Wang, Z.; Fan, C. H. *Sens. Actuators, B* **2018**, 258, 42.
- [21] Lv, H. S.; Sun, H. Y.; Wang, S. J.; Kong, F. G. *Spectrochim. Acta, A* **2018**, 196, 160.
- [22] Tiensomjit, K.; Noorat, R.; Chomngam, S.; Wechakorn, K.; Prabpai, S.; Kanjanasirirat, P.; Pewkliang, Y.; Borwornpinyo, S.; Kongsaree, P. *Spectrochim. Acta, A* **2018**, 195, 136.
- [23] Ju, Z. Y.; Li, D. P.; Zhang, D.; Li, D. D.; Wu, C. Z.; Xu, Z. H. *J. Fluoresc.* **2017**, 27, 1.
- [24] Wu, W. N.; Wu, H.; Wang, Y.; Mao, X. J.; Zhao, X. L.; Qing, Z.; Xu, Q.; Fan, Y. C.; Xu, Z. H. *Spectrochim. Acta, A* **2018**, 188, 80.
- [25] Roy, B.; Halder, S.; Guha, A.; Bandyopadhyay, S. *Anal. Chem.* **2017**, 89, 10625.
- [26] Luo, Z. J.; Liu, B.; Qin, T. Y.; Zhu, K. N.; Zhao, C.; Pan, C. J.; Wang, L. *Sens. Actuators, B* **2018**, 263, 229.
- [27] Xu, H.; Gu, B.; Li, Y. Q.; Huang, Z.; Su, W.; Duan, X. L.; Yin, P.; Li, H. T.; Yao, S. Z. *Talanta* **2018**, 180, 199.
- [28] Liu, L.; Le, Y.; Teng, M. G.; Zhou, Z. X.; Zhang, D.; Zhao, C. S.; Cao, J. X. *Dyes Pigm.* **2018**, 151, 1.
- [29] Yang, Z. Q.; Liu, X. K.; Jiang, L. N.; Wang, M. *Chin. J. Org. Chem.* **2019**, 39, 1483 (in Chinese).
(杨滋琦, 刘兴坤, 姜鲁南, 王美, 有机化学, **2019**, 39, 1483.)
- [30] Ju, Z. Y.; Shu, P. H.; Xie, Z. Y.; Jiang, Y. Q.; Tao, W. W.; Xu, Z. H. *Chin. J. Org. Chem.* **2019**, 39, 697 (in Chinese).
(鞠志宇, 舒朋华, 谢智宇, 蒋雨晴, 陶伟杰, 许志红, 有机化学, **2019**, 39, 697.)
- [31] Zhang, Y.; Liu, J. F.; Yi, R. H.; Ai, S. F.; Jia, W. Z. *Chin. J. Anal. Chem.* **2018**, 46, 511 (in Chinese).
(张勇, 刘劲风, 易润豪, 艾思凡, 贾文志, 分析化学, **2018**, 46, 511.)
- [32] Wang, R. X.; Lai, X. J.; Qiu, G. Y. S.; Liu, J. B. *Chin. J. Org. Chem.* **2019**, 39, 952 (in Chinese).
(王瑞祥, 赖晓静, 邱观音生, 刘晋彪, 有机化学, **2019**, 39, 952.)
- [33] Xu, W. Z.; Liu, W. Y.; Zhou, T. T.; Yang, Y. T.; Li, W. *Spectrochim. Acta, A* **2018**, 193, 324.
- [34] Xu, W. Z.; Liu, W. Y.; Zhou, T. T.; Yang, Y. T.; Li, W. *J. Photochem. Photobiol. A* **2018**, 356, 610.

(Zhao, C.)