

文章编号 1006-8147(2018)04-0294-04

论 著

# 一种用于细胞成像检测 $Al(III)$ 的高选择性开关型烟酰肼类荧光探针

张晓梅<sup>1</sup>, 王冠元<sup>2</sup>, 韩 静<sup>1</sup>, 孙予璇<sup>1</sup>, 李庆忠<sup>3</sup>, 谢承志<sup>1</sup>

(1. 天津医科大学药学院, 天津 300070; 2. 天津医科大学肿瘤医院药学部, 天津 300060; 3. 烟台大学化学化工学院, 烟台 264005)

**摘要** 目的: 基于烟酰肼席夫碱配体, 开发一种灵敏度高、选择性强的新型铝离子荧光探针。方法: 通过 2-羟基-1-萘甲醛和烟酰肼的缩合反应, 合成一个酰肼衍生物 2-羟基-1-萘甲醛烟酰肼(HL), 并通过红外和核磁氢谱验证其结构。HL 可通过荧光光谱检测样品中的铝离子及通过生物成像检测细胞中的铝离子。结果: HL 结合铝离子后形成 2:1 的化合物, 其荧光会发生显著的提高, 并具有良好的选择性。基于密度泛函理论, 通过计算验证其识别机制为激发态分子内质子转移(ESIPT)和分子内电荷转移(ICT)。HL 在低浓度下和铝离子具有很好的线性关系, 检测限为 2.3 nmol/L。结论: 基于具有良好的铝离子检测能力, 此烟酰肼席夫碱配体可作为荧光探针应用于医学检验领域。

**关键词** 铝离子; 烟酰肼; 荧光探针; 密度泛函理论

中图分类号 R9

文献标志码 A

## Synthesis of a highly selective and sensitive turn-on fluorescent sensor based on nicotinic hydrazone for detecting $Al^{3+}$ in cellular imaging

ZHANG Xiao-mei<sup>1</sup>, WANG Guan-yuan<sup>2</sup>, HAN Jing<sup>1</sup>, SUN Yu-xuan<sup>1</sup>, LI Qing-zhong<sup>3</sup>, XIE Cheng-zhi<sup>1</sup>

(1. School of Pharmacy, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 2. Department of Pharmacy, Cancer Institute and Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300060, China; 3. School of Chemistry and Chemical Engineering, Yantai University, Yantai 264005, China)

**Abstract** **Objective:** To develop a novel  $Al(III)$  fluorescent probes with high sensitivity and good selectivity based on acylhydrazone Schiff base ligand. **Methods:** An acylhydrazone derivative 2-hydroxy-1-naphthaldehyde nicotinoyl hydrazone (HL) was synthesized by combining 2-hydroxy-1-naphthaldehyde with nicotinic hydrazone, and its structure was characterized with IR and  $^1H$  NMR. It was confirmed that HL could be used to detect  $Al^{3+}$  ions in sample by fluorescence spectra and  $Al^{3+}$  ions in cells by bioimaging. **Results:** HL with  $Al^{3+}$  exhibited a significant enhancement in the fluorescence emission and was highly selective among different cations by forming a 2:1 complex, with a recognition mechanism based on excited-state intramolecular proton transfer (ESIPT) and intramolecular charge transfer (ICT) mechanism, which was proved by computational calculations using density functional theory (DFT). HL displayed good linear relationship with  $Al^{3+}$  at low concentration and the limit of detection was 2.3 nmol/L. **Conclusion:** Due to the outstanding features in  $Al^{3+}$  ion fluorescent detection, the novel acylhydrazone Schiff base ligand will lead to new discoveries in the fields of fluorescent sensors for medicine.

**Key words**  $Al^{3+}$  ion; acylhydrazone; fluorescence probe; density functional theory

铝是地球上含量最多的金属元素, 在生产生活领域中有着广泛的应用, 如水处理、食品添加剂、药品、电化学、轻合金的生产等<sup>[1-3]</sup>。然而, 过量的铝会引起人体特定组织和细胞的损害, 导致健康问题, 如低色小红细胞性贫血、铝相关性骨骼疾病(ARBD)、脑病、痴呆、肌肉病变、阿尔茨海默症和帕金森病等<sup>[4-6]</sup>。另外, 铝离子还会产生生物代谢性的危害, 如铝离子会影响体内的钙和硒的吸收代谢<sup>[7]</sup>。

此外, 人们认为, 世界上近 40% 的酸性土壤是由铝毒污染的, 这是妨碍植物(如农作物)在酸性土壤中生长的关键因素<sup>[8]</sup>。选择性识别和检测铝离子, 对生物学和临床医学等领域的相关研究具有十分重要的意义。荧光探针分析法具有选择性好、灵敏度高以及操作简单等优势, 因此设计合成特异性识别铝离子的荧光探针成为近年来的研究热点之一。虽然目前已有的铝离子荧光化学传感器无论是选择性、灵敏性, 还是检测限、响应速度, 普遍具有较好的理化特性, 但是, 该类化学传感器往往需要复杂的合成过程, 能够通过简单一步反应合成的报道较少。

基金项目 天津市自然科学基金重点项目基金资助(13JCZDJC28200)

作者简介 张晓梅(1965-), 女, 实验师, 研究方向: 药物分析; 通信作者: 谢承志, E-mail: xiechengzhi@tmu.edu.cn。

而且,大多数水溶性差,不易在水体系中进行荧光检测,故难以开发细胞成像,不能实现相应荧光探针在细胞层次或者组织层次上进行铝离子的生理、生化行为的研究<sup>[9-11]</sup>。基于上述发展状况,我们将烟酰胺和羟基萘醛通过缩合反应合成一个席夫碱配体,并研究其在溶液及细胞内的铝离子荧光检测能力。

## 1 材料与方法

**1.1 原料及试剂** 所用试剂均为分析纯,实验用水由 Labconco WaterPro 水系统制备,烟碱肼(阿拉丁试剂),2-羟基-1-萘甲醛(安耐吉化学),硝酸铝(天津市化学试剂六厂),甲醇(天津市化学试剂六厂),复方氢氧化铝片(山西云鹏制药有限公司),MCF-7 细胞(美国 ATCC 细胞库)

**1.2 仪器** RF-5301 型荧光分光光度计, Nicolet380 傅立叶变换红外光谱仪, Bruker AVANCE III 400 MHz 核磁共振波谱仪, LCQ 电喷雾质谱仪, 尼康 Nikon ECLIPSE Ti 全自动倒置显微镜。

### 1.3 实验方法

**1.3.1 探针化合物 L 的合成** 参考相关文献<sup>[12]</sup>, 化学反应如图 1 所示。称取 2-羟基-1-萘甲醛 1.72 g (10 mmol) 置于圆底烧瓶中, 用 20 mL 无水乙醇溶解, 称取烟碱肼 1.37 g (10 mmol), 用 20 mL 无水乙醇溶解, 置于恒压滴液漏斗中, 缓慢滴入圆底烧瓶。设定油浴温度为 100 °C, 加热搅拌回流 5 h, 反应过程中用 TLC 检测。反应结束后, 抽滤, 滤饼再用甲醇重结晶 1 次, 得黄色结晶 2.13 g, 产率 73.12 %。<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ (ppm) 12.60 (s, 1H, OH-Ar), 12.37 (s, 1H, -NH-), 9.47 (s, 1H, =CH), 7.24~9.15 (m, 10H, HAr)。IR (KBr cm<sup>-1</sup>): ν<sub>C=O</sub> 1 692.3, ν<sub>Schiff-base</sub> C=N 1 597.1。

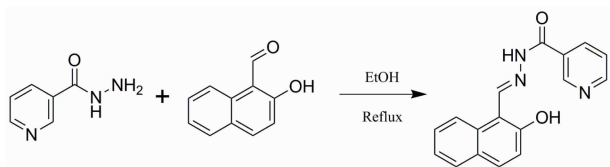


图 1 探针分子 L 的合成

Fig 1 Synthesis of probe L

### 1.3.2 探针化合物 L 的荧光性质研究

**1.3.2.1 灵敏性实验:** 将 5 μL 1.0×10<sup>-4</sup> mol/L 探针化合物 L 加入到 2 mL 甲醇, Tris-HCl 缓冲溶液为 9:1 混合溶剂的样品池中 (终浓度为 2.5×10<sup>-7</sup> mol/L), 然后逐渐加入 1.0×10<sup>-5</sup> mol/L 硝酸铝的甲醇溶液 (每次 5 μL), 测试荧光光谱。

**1.3.2.2 选择性实验:** 2.5×10<sup>-7</sup> mol/L 探针 L 溶液, 分别加入 K<sup>+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、Na<sup>+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、Fe<sup>3+</sup>、Co<sup>2+</sup>、Ni<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>、Cd<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>、Hg<sup>2+</sup>、Al<sup>3+</sup> 溶液 (K<sup>+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、Na<sup>+</sup>、Hg<sup>2+</sup> 的浓

度是 L 浓度的 50 倍, Cd<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup> 的浓度是 L 浓度的 10 倍, Mg<sup>2+</sup>、Fe<sup>3+</sup>、Co<sup>2+</sup>、Ni<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup> 的浓度是 L 浓度的 5 倍, Al<sup>3+</sup> 的浓度是 L 浓度的 1 倍), 待金属与 L 充分反应后, 测试荧光光谱。

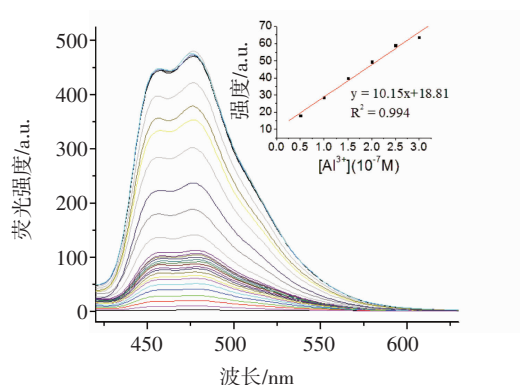
**1.3.2.3 Job's-Plot 方法确定 L 与 Al<sup>3+</sup> 结合的配位比:** 保持配体 L 与 Al<sup>3+</sup> 的总浓度不变 (终浓度为 5×10<sup>-7</sup> mol/L), 改变配体 L 与 Al<sup>3+</sup> 摩尔比测定其荧光强度值。

**1.3.3 细胞成像实验** 乳腺癌细胞 (MCF-7) 培养借鉴于美国标准菌库 ATCC HB-8065, 通过含体积分数 10% 胎牛血清 (FBS) 的完全培养基进行传代培养。使用倒置荧光显微镜拍摄加入铝离子前后的细胞荧光成像。

## 2 结果

### 2.1 探针 L 的荧光性能研究

**2.1.1 灵敏性** 在甲醇: Tris-HCl 缓冲溶液为 9:1 的混合溶剂中, 配体 L 与加入的不同浓度的硝酸铝溶液充分反应后, 在波长为 409 nm 的光激发下进行荧光光谱测试。从图 2 可以看出, 随着 Al<sup>3+</sup> 的加入, L 可产生显著的荧光增强趋势, 并随着铝离子的浓度增大而增强, 最大发射峰位于 458 nm 和 480 nm 处。此外, 铝离子浓度在 0~0.3 μmol/L 范围内与荧光强度保持了良好的线性关系。以 I/I<sub>0-1</sub> 对 [Al<sup>3+</sup>] 作图, 根据 IUPAC 对于检测限的定义, 根据公式 DL = K×Sb1/S (K 取 3, Sb1 为空白溶液的标准偏差, S 为校准曲线的斜率) 计算, 能得到配体检测金属离子的最低浓度, 即配体 L 对金属离子的检测限为 2.3×10<sup>-9</sup> mol/L。



右上角小图为 Al<sup>3+</sup> 0~0.3 μmol/L 范围内荧光滴定线性拟合图 (λ<sub>ex</sub> = 409 nm)

图 2 探针分子 L 在甲醇/Tris-HCl 混合溶剂中的 Al<sup>3+</sup> 荧光滴定谱图

Fig 2 Fluorescence emission changes of L in methanol/Tris-HCl solution upon the addition of increasing amount of Al<sup>3+</sup>

**2.1.2 选择性** 配体 L 与加入的不同金属离子充分反应后, 进行荧光性质考察。以波长 409 nm 光源

为激发光,测得荧光强度变化情况如图 3 所示。可以看出,配体探针 L 加入不同金属离子的荧光强度变化不同,虽然其它各种金属离子在溶液中浓度显著高于配体探针 L ( $K^+$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $Na^+$ 、 $Hg^{2+}$  的浓度是 L 浓度的 50 倍,  $Cd^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$  的浓度是 L 浓度的 10 倍,  $Mg^{2+}$ 、 $Fe^{3+}$ 、 $Co^{2+}$ 、 $Ni^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$  的浓度是 L 浓度的 5 倍,  $Al^{3+}$  的浓度是 L 浓度的 1 倍),加入其它常见金属离子充分反应后,配体 L 荧光强度没有较大改变;加入  $Al^{3+}$  时,配体 L 响应非常明显,由此确定荧光探针 L 对铝离子具有较好的选择性。

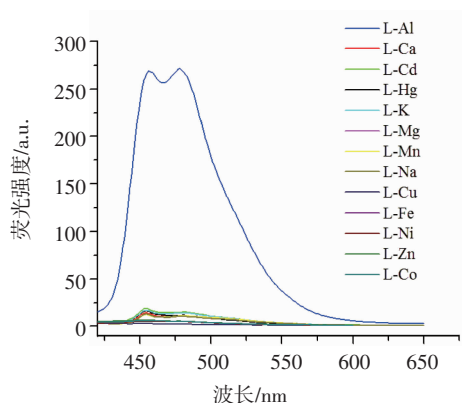


图 3 探针分子 L 在甲醇/Tris-HCl 混合溶剂中,加入不同金属离子的荧光光谱 ( $\lambda_{ex} = 409 \text{ nm}$ )

Fig 3 Fluorescence spectra of probe L in the presence of various metal ions in methanol/Tris-HCl solution ( $\lambda_{ex} = 409 \text{ nm}$ )

**2.2 L 与  $Al^{3+}$  结合配位比的确定** 了解金属离子与有机配体间的配位比例,可以为确定配合物的结构及阐明荧光增强的机理提供重要信息。保持配体 L 与  $Al^{3+}$  的总浓度不变 ( $5 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$ ),  $Al^{3+}$  的浓度占总浓度的比例在 0~1 之间变化,通过绘制荧光强度与相应  $Al^{3+}$  所占浓度比值的线性曲线,拟合得到 L 与  $Al^{3+}$  络合的配位比,得到如图 4 所示的结果。由 Job's plot 曲线可以看出,当  $[Al^{3+}]/[Al^{3+}+L]$  的比值在 0.33 左右,即  $Al^{3+}$  与 L 的配比为 1:2 时荧光强度达到最高点,因此可以推测出,铝离子结合两个配体形成配合物。为了进一步确定  $Al^{3+}$  与 L 的结合方式,采用 ESI-MS 谱对  $Al^{3+}$ -L 形成的复合物进行了表征。质谱中出现的强峰 ( $m/z$  607.2),其对应的结构为  $[Al(L)_2]^+$  (calcd  $m/z$  607.2)。

**2.3 细胞成像研究** 给药配体设置为  $10 \mu\text{mol/L}$ , 溶液为 PBS 缓冲溶液,给药 1 h 后显微镜下观察拍照。拍照完成后,再往配体组加入  $15 \mu\text{mol/L}$  的  $Al(NO_3)_3$ , 给药 1 h 后观察拍照。由图 5 可以看出,在细胞中外加  $Al(NO_3)_3$  后,可以观察到非常明显的荧光现象,表明探针分子可进入细胞检测过量的铝离子。

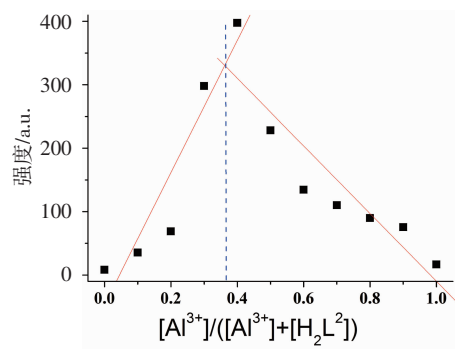
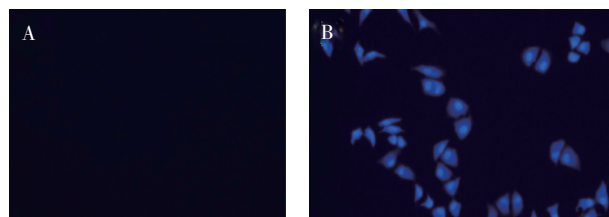


图 4 探针分子 L 与  $Al^{3+}$  的荧光 Job's plot 曲线 ( $\lambda_{ex} = 409 \text{ nm}$ )

Fig 4 Job plot of probe L with  $Al^{3+}$  based on fluorescence spectra



A.加入  $Al(NO_3)_3$  之前;B.加入  $Al(NO_3)_3$  之后

图 5 探针分子 L 在乳腺癌细胞(MCF-7)中的细胞成像图

Fig 5 Fluorescent imaging of probe L in MCF-7 cells

**2.4 量化计算** 用 Gaussian 09 程序包<sup>[13]</sup>,采用密度泛函理论(DFT),在 B3LYP 水平用 6-31+G(p,d) 基组,对探针分子 L 和形成的 2:1 配合物进行构型优化。优化的分子结构见图 6,可以看到萘环上羟基的氢原子和 C=N 双键上氮原子的距离为  $1.828 \text{ \AA}$ ,  $O-H \cdots N$  角度为  $142.5^\circ$ ,形成分子内氢键,符合激发态分子内质子转移(ESIPT)机制。L 及其铝配合物的前线分子轨道图见图 7,最高占据轨道 HOMO 的能量分别为  $-5.899 \text{ eV}$  和  $-7.719 \text{ eV}$ ,最低空轨道 LUMO 的能量分别为  $-2.372 \text{ eV}$  和  $-5.398 \text{ eV}$ ,说明配合物具有更好的热稳定性。L 和配合物的 HOMO 电子云主要集中在羟基取代的萘环上,而 LUMO 的电子云分布在整个分子,符合分子内电荷转移(ICT)机制。

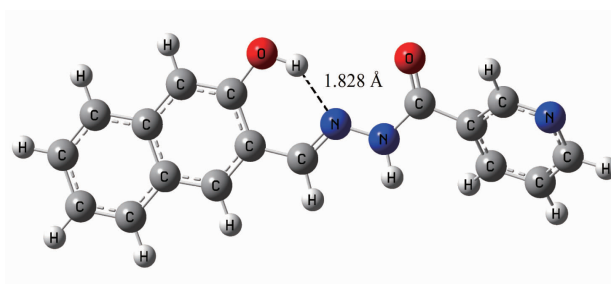


图 6 探针分子 L 的优化构型图

Fig 6 Optimized structures of probe L



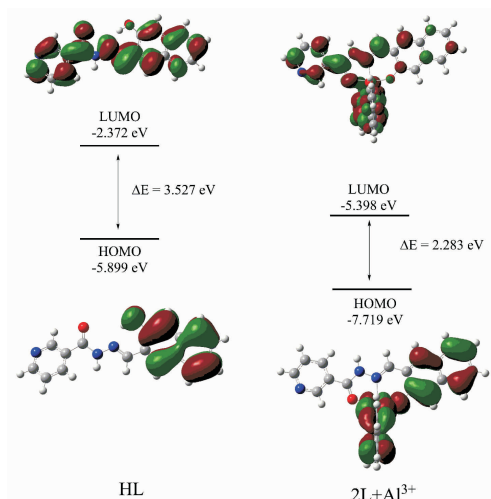


图7 探针分子 L 与  $AlL_2$  配合物的 HOMO 和 LUMO 轨道能级图

Fig 7 Views of HOMO and LUMO of probe L and  $AlL_2$

### 3 讨论

本文合成了一种烟酰胺席夫碱荧光探针,其合成原料便宜,制备简便,结构通过红外谱图和核磁谱图得以确认。光谱研究显示,探针 L 在甲醇-水缓冲溶液中对  $Al^{3+}$  具有良好的选择性,其检测限可达到纳摩尔级别,通过质谱和 Job's plot 曲线可确定探针分子 L 与  $Al^{3+}$  形成 2:1 的稳定络合物。该探针对于  $Al^{3+}$  的响应可以归于 ESIPT 机制<sup>[14]</sup>和 ICT 机制<sup>[15]</sup>,并通过量化计算证明。探针分子羟基的氢原子和 C=N 双键上氮原子形成分子内氢键,存在激发态分子内质子转移(ESIPT)现象,加入铝离子后,发生去质子化作用,抑制了探针分子的 ESIPT 进程,因而荧光增强。分子具有较大的极性和明显的分子内电荷转移(ICT)效应,与铝离子结合后对荧光团的推-拉电子作用产生影响,从而导致荧光光谱的变化。由于探针分子在水体系下也可以发射出很强的荧光,因此可用于检测药物及生命体系的铝离子含量。本实验制备的新型探针 L 是一种灵敏度极高并具有很强选择能力的  $Al^{3+}$  荧光探针,有望应用于生物医药领域。

#### 参考文献:

- [1] Li L, Wu Z X, Li Y X, et al. Synthesis of aluminum-substituted tobermorite and the application on the Phosphorus removal from

waste water[J]. Desalination Water Treat, 2014, 52 : 22

- [2] Wolf N, Stubhan T, Manara J, et al. Stabilization of Aluminum doped Zinc oxide nanoparticle suspensions and their application in organic solar cells[J]. Thin Solid Films, 2014, 564(8): 213
- [3] Crepeaux G, Heidi H, David M, et al. Assessment of the neurotoxic effects of Aluminum hydroxide vaccine adjuvant injections in mice[J]. Toxicol Lett, 2014, 229(S): S189
- [4] Berthon G. Aluminium speciation in relation to aluminium bioavailability, metabolism and toxicity[J]. Coord Chem Rev, 2002, 228(2): 319
- [5] Bhattacharjee S, Zhao Y, Hill J M, et al. Aluminum and its potential contribution to Alzheimer's disease (AD)[J]. Front Aging Neurosci, 2014, 6 : 62
- [6] Walton J R. Chronic Aluminum intake causes Alzheimer's disease: applying Sir Austin Bradford Hill's causality criteria[J]. J Alzheimers Dis, 2014, 40(4): 765
- [7] Spencer H, Kramer L, Norris C, et al. Effect of small doses of aluminum - containing antacids on Calcium and Phosphorus metabolism[J]. Am J Clin Nutr, 1982, 36(1): 32
- [8] Wang C, Zhao X Q, Chen R F, et al. Aluminum tolerance of wheat does not induce changes in dominant bacterial community composition or abundance in an acidic soil[J]. Plant Soil, 2013, 367 (1/2): 275
- [9] Kim S, Noh J Y, Kim K Y, et al. Salicylimine-based fluorescent chemosensor for Aluminum ions and application to bioimaging[J]. Inorg Chem, 2012, 51(6): 3597
- [10] Liu Y J, Tian F F, Fan X Y, et al. Fabrication of an acylhydrazone based fluorescence probe for  $Al^{3+}$ [J]. Sens Actuators B Chem, 2017, 240 : 916
- [11] 曾惜,龚福春,夏姣云,等.一种基于 ESIPT 传感平台的  $Al^{3+}$  荧光探针及其应用[J].分析实验室,2017,36(12):1380
- [12] Tayade K, Sahoo S K, Bondhopadhyay B, et al. Highly selective turn-on fluorescent sensor for nanomolar detection of biologically important  $Zn^{2+}$  based on isonicotinohydrazide derivative: application in cellular imaging[J]. Biosens Bioelectron, 2014, 61 : 429
- [13] Frisch M J, Trucks G W, Schlegel H B, et al. Gaussian 09, Revision A. 02, Gaussian[M]. Inc., Wallingford CT, 2009
- [14] Sahana S, Mishra G, Sivakumar S, et al. A 2-(2'-hydroxyphenyl) benzothiazole (HBT)-quinoline conjugate: a highly specific fluorescent probe for  $Hg^{2+}$  based on ESIPT and its application in bioimaging[J]. Dalton Trans, 2015, 44(46): 20139
- [15] De Cruz EHG, Carvalho PHPR, Corrêa J R, et al. Design, synthesis and application of fluorescent 2,1,3-benzothiadiazole-triazole-linked biologically active lapachone derivatives[J]. New J Chem, 2014, 38:2569

(2018-01-16 收稿)