

基于 2-(2'-吡啶基)苯并咪唑的 Zn^{2+} 比例计量型荧光识别

万丹丹¹ 苏光余¹ 许子华¹ 张玉明^{1,2} 吴正轶¹ 何卫江^{*,1} 郭子建^{*,1}

(¹ 南京大学化学化工学院配位化学国家重点实验室, 南京 210093)

(² 南通大学杏林学院, 南通 226009)

摘要: 本文以荧光分子 2-(2'-吡啶基)苯并咪唑(2-PBI)作为 1,1'-联(2-芳杂环)类化合物模型, 研究利用其 2,2'-N 原子螯合 Zn^{2+} 诱导芳环共面化和荧光发射红移实现 Zn^{2+} 比例计量检测的可行性。2-PBI 在不同体系中的 Zn^{2+} 荧光响应行为表明 Zn^{2+} 结合将导致最大发射波长明显红移 (乙腈 36 nm; HEPES 缓冲液 39 nm), 具有比例计量型 Zn^{2+} 荧光探针的基本特点。2-PBI 还具有显著的 Zn^{2+} 荧光响应选择性, 可以同时作为构建比例计量型探针的信号团和受体的基本骨架。通过对 2-PBI 的荧光机制和 Zn^{2+} 识别行为的分析, 提出了以 2-PBI 为基本骨架构建实用化比例计量型探针的途径。

关键词: 锌离子; 荧光; 比例计量型探针

中图分类号: O614.24^{†1}; O644.14

文献标识码: A

文章编号: 1001-4861(2008)08-1253-08

Ratiometric Sensing of Zn^{2+} by 2-(Pyridin-2'-yl)-1H-benzo[d]imidazole

WAN Dan-Dan¹ SU Guang-Yu¹ XU Zi-Hua¹ ZHANG Yu-Ming^{1,2}

WU Zheng-Yi¹ HE Wei-Jiang^{*,1} GUO Zi-Jian^{*,1}

(¹ State Key Laboratory of Coordination Chemistry, School of Chemistry and Chemical Engineering,
Nanjing University, Nanjing 210093)

(² School of Xinglin, Nantong University, Nantong, Jiangsu 226009)

Abstract: 2-(Pyridin-2'-yl)-1H-benzo[d]imidazole (2-PBI) was used as a fluorophore/ionophore model of 1,1'-bi(2-heteroaromatic) compounds to explore the possibility for ratiometric Zn^{2+} determination by the co-planation of the two heteroaromatic rings via Zn^{2+} -chelation with 2,2'-N atoms. Investigation in different media shows the evident Zn^{2+} -triggered red-shifted emission (36 nm in acetonitrile and 39 nm in neutral buffer), meeting the essential requirement of ratiometric sensors. Moreover, 2-PBI still displays distinct selectivity for Zn^{2+} without introducing special fluorophore. All these make 2-PBI a potential candidate for being both fluorophore and ionophore to construct Zn^{2+} ratiometric sensors through a mechanism of Zn^{2+} -chelation induced co-planation of biheteroaromatic rings. Moreover, analysis of its emission mechanism and Zn^{2+} -sensing behavior give further clues that 2-PBI could become a practical fluorescent sensors for ratiometric detection of Zn^{2+} .

Key words: zinc; fluorescence; ratiometric fluorescent sensor

锌是人体中含量仅次于铁的过渡金属元素, 在细胞的生长中起着关键作用。生物体内锌离子的检测分析对研究蛋白质结构和功能、DNA 和 RNA 合成、基因表达、新陈代谢和某些神经退行性疾病的

产生都有着重要的意义^[1]。锌离子(Zn^{2+})荧光探针技术由于具有方便快捷、灵敏度高和选择性好等特点, 近年来得到了迅速发展, 各种新型小分子 Zn^{2+} 荧光探针层出不穷^[1c,2]。然而由于 Zn^{2+} 生物无机化学的

收稿日期: 2008-05-07。收修改稿日期: 2008-06-04。

国家自然科学基金资助项目(No.20571043)。

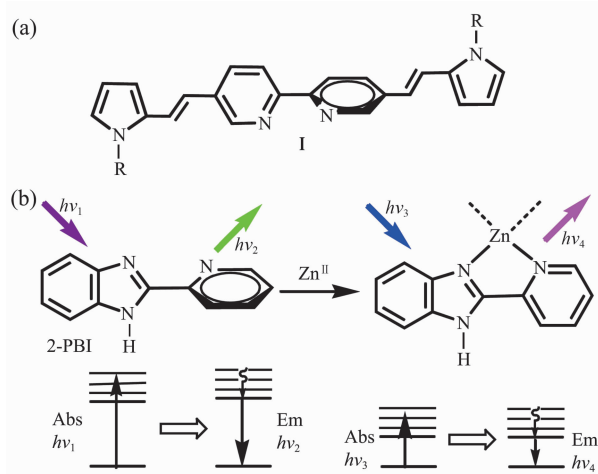
*通讯联系人。E-mail: hewei69@nju.edu.cn; zgao@nju.edu.cn

第一作者: 万丹丹, 女, 26 岁, 硕士研究生; 研究方向: 生物无机化学。

发展,人们需要各种不同性能的探针来满足不同研究的需要。目前报道的小分子化学探针按照不同的工作机制可分为金属螯合荧光增强型(Metal Chelation-Enhanced Fluorescence, MCHEF)探针和比例计量型(Ratiometric)探针。前者结合 Zn^{2+} 后荧光强度将大幅增强;后者与 Zn^{2+} 结合后荧光激发或发射波长将发生明显改变,通过测定 Zn^{2+} 诱导的双发射(或激发)峰的比例变化可实现对 Zn^{2+} 的定量检测^[2h,2i]。由于探针分子的量子产率易受环境影响,荧光增强型探针难以实现体内锌离子浓度的定量测定。一般自由探针和 Zn^{2+} 结合探针受环境影响相似,因此比例计量型探针可以避免检测环境的影响,可实现对 Zn^{2+} 动态变化过程的定量检测。正是由于比例计量型探针的这一优点,寻找这类探针的研究工作已成为目前 Zn^{2+} 荧光探针研究的热点。目前真正可用于细胞比例计量造影的探针仅有数例报道,无法满足 Zn^{2+} 生物无机化学研究发展的需要。目前的比例计量型 Zn^{2+} 探针主要利用两种机制来实现对 Zn^{2+} 的比例计量检测。一种是利用 Zn^{2+} 配位对具有互变异构的探针分子的某一特定异构体的稳定作用诱导最大发射波长的移动;另一种利用 Zn^{2+} 配位对磺酰胺去质子化作用阻断探针原有的激发态分子内质子转移(ESPT, Excited State Proton Transfer)效应诱导发射带的改变^[3]。Ajayaghosh 等报道的化合物 **I** (图示 1a)则利用了 Zn^{2+} 与 2,2'-联吡啶配位诱导芳环共面化导致发射波长红移的机制^[4]。这种设计不仅可实现比例计量的目的,还可能增大激发波长以减小对细胞的损伤,因此具有独特的优势。利用类似的策略,直接以具有可与 Zn^{2+} 协同配位的 1,1'-联(2-芳杂环)荧光分子构建 Zn^{2+} 比例计量型荧光探针,不仅保持原策略实现比例计量的目的,而且分子兼具荧光信号团和 Zn^{2+} 受体的特征,可以明显简化合成步骤。显然,寻找这类特殊荧光母体结构是实现这一策略的关键,本文利用 2-(2'-吡啶基)苯并咪唑(2-PBI)作了有益的尝试。

2-芳基苯并咪唑是常见的荧光分子,本文利用 2'-吡啶基作为其 2-取代基,一方面保持了该类荧光分子的基本结构维持其荧光性能,另一方面处于 1,4-位置关系的咪唑 N 和吡啶 N 原子可与 Zn^{2+} 协同配位。由于存在立体位阻,苯并咪唑基与吡啶基通常难以共面。若咪唑 N 和吡啶 N 协同与 Zn^{2+} 配位,2 个芳基可被强制共面化而提高分子的共轭程度,从而产生 Zn^{2+} -触发的发射或激发波长的红移,

获得比例计量 Zn^{2+} 的能力(图示 1b)。2-PBI 本身的荧光性质已有一些研究报道,对探讨其荧光行为和 Zn^{2+} 响应性能非常有利^[5]。



图示 1 (a) 化合物 **I**, (b) 设想的 2-PBI 对 Zn^{2+} 的比例计量识别机制

Scheme 1 (a) Compound **I**, (b) Possible ratiometric Zn^{2+} sensing mechanism of 2-PBI

1 实验部分

1.1 试剂和仪器

合成所用试剂均为国产分析纯试剂,使用前未作进一步处理。性质表征中使用二次蒸馏水和 TEDIA 公司光谱纯溶剂。分析纯 KNO_3 、 $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ 和 HEPES(*N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N*-ethane-sulphonic acid)均为 Alfa-Aesar 或 Sigma-Aldrich 产品。其他分析纯无机盐为上海试剂公司分析纯试剂。核磁共振氢谱在 Bruker DRX-500 核磁共振仪上测定, CD_3Cl 为溶剂。吸收光谱和荧光光谱分别利用 Perkin Elmer Instruments Lambda 35UV/VIS Spectrometer 和 AMINCO Bowman series 2 荧光光谱仪测定。

1.2 2-PBI 的合成

在 0 °C 下将 2-吡啶甲酰氯(1.80 g, 11.4 mmol)溶于 15 mL 无水二氧六环,搅拌下加入邻苯二胺(1.23 g, 11.4 mmol)并转移到 25 °C 水浴中继续搅拌反应 60 min。将 3 mL $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ 与无水二氧六环混合后加入反应体系,然后 130 °C 下回流 3 h 后继续加入过量 $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (约 10 mL),加热回流过夜。减压蒸馏抽出溶剂和多余的 $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$,溶液逐渐变稠。停止蒸馏后加入水和氯仿进行萃取。有机层减压蒸馏后得 2-吡啶基苯并咪唑 0.12 g。产率:5.3%。¹H NMR (500 MHz, CDCl_3 , ppm) δ : 7.24(s, 2H), 7.53(t, 1H), 7.63

(s, 2H), 8.01(t, 1H), 8.33(d, 1H), 8.85(s, 1H)。

1.3 2-PBI 荧光性质研究

2-PBI 及其锌配合物溶液 (乙腈和 HEPES 缓冲溶液) 的荧光激发和发射光谱按常规方法测定。

1.4 2-PBI 溶液的 Zn^{2+} 荧光滴定

向样品池中加入 3 mL 2-PBI 的乙腈溶液 ($5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 每次滴加 $2.5 \mu\text{L}$ 的 $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ 水溶液 ($1.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 充分混匀后在 326 nm 激发光激发下扫描。滴加 10 次后, 最后 2 次每次加入 $12.5 \mu\text{L}$ Zn^{2+} 水溶液, 保证配体完全转化为配合物。在 HEPES 溶液 ($50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ HEPES, $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KNO_3 , 0.2% DMSO, pH=7.20) 中的滴定依类似方法完成。每次加入 $12.5 \mu\text{L}$ $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ 水溶液 ($1.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 充分混匀后记录发射光谱 (激发波长 330 nm), 共滴加 28 次。紫外照射下的荧光照片利用 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 2-PBI 乙腈溶液以及加入等物质的量的 Zn^{2+} 的 2-PBI 溶液在 365 nm 紫外光照射下获得。

1.5 2-PBI 溶液对不同金属离子的荧光响应性能

向 3 mL 的 2-PBI 乙腈溶液 ($5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 中加入 $12.5 \mu\text{L}$ 金属离子水溶液 ($1.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 使配体与金属离子比例为 1:1, 充分混匀后在 326 nm 激发光激发下记录发射谱。通过计算 395 和 359 nm 处发射峰强度比值的变化来考察对不同金属离子的荧光响应性能。为考察细胞内高含量的 Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} 对其 Zn^{2+} 响应能力的影响, 在 3 mL 的 2-PBI 乙腈溶液 ($5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 中分别加入 $7.5 \mu\text{L}$ Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} 水溶液 ($2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和 $12.5 \mu\text{L}$ Zn^{2+} 水溶液 ($1.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 充分混匀 5 min 后扫描。在 HEPES 溶液 ($50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ HEPES, $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KNO_3 , 0.2% DMSO, pH=7.20) 中的金属离子选择性以类似方法测定, 激发波长 330 nm。在 HEPES 溶液中荧光响

应性能分别以 1:1 和 1:10 ($c_{2\text{-PBI}}/c_{\text{Zn}}$) 2 个比例测定。金属离子溶液分别利用分析纯 $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, KCl , NaCl , CaCl_2 和二次水配制。

1.6 2-PBI 溶液的 Zn^{2+} 紫外滴定

向样品池中加入 3 mL 2-PBI 的乙腈溶液 ($50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 每次加入 $12.5 \mu\text{L}$ Zn^{2+} 的水溶液 ($1.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 充分混匀后测定吸收光谱, 滴加直至平衡为止。参比池中每次加入等体积的二次水以消除引入水的影响。HEPES 缓冲溶液中的紫外滴定按类似的步骤完成。

2 结果与讨论

2.1 2-PBI 在水中的 Zn^{2+} 荧光响应

实用化的 Zn^{2+} 荧光探针应具有一定的水溶性, 并在水性溶剂中体现明显的 Zn^{2+} 荧光响应能力。为此我们首先在 0.2% DMSO 的水溶液和 pH/离子强度均接近生理条件的 HEPES 缓冲溶液 ($5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KNO_3 , 0.2% DMSO, pH=7.20) 中对 2-PBI 的荧光性质进行了研究。文献中报道, 中性和碱性条件下, 2-PBI 仅有 380 nm 处的中性 2-PBI 分子的荧光 ($\lambda_{\text{ex}}=330 \text{ nm}$)。在偏酸性条件下, 由于质子化的 2-PBI 发生激发态分子内质子转移 (ESPT) 降低了激发态能量, 发射峰红移到 450 nm^[5a]。2-PBI 在中性 HEPES 缓冲溶液中荧光最大激发波长同样为 330 nm, 而最大发射波长却为 355 nm, 380 nm 处仅为 1 个肩峰。这可能与缓冲溶液中较高的离子强度有关。

HEPES 溶液中进行 Zn^{2+} 滴定获得的发射光谱 (图 1) 表明, Zn^{2+} 滴加开始时只能使得荧光有较小的

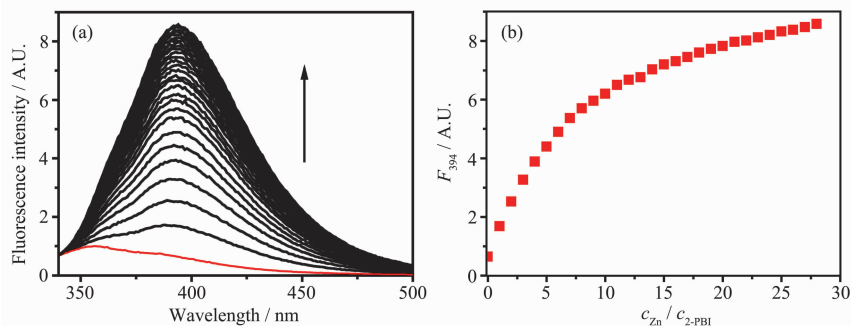


图 1 (a) HEPES 缓冲溶液中 2-PBI 在滴加 $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ 过程中的荧光光谱 ($\lambda_{\text{ex}}=330 \text{ nm}$), (b) 根据 394 nm 处荧光强度变化给出的滴定曲线

Fig.1 (a) Emission spectra of 2-PBI in HEPES buffer obtained in Zn^{2+} titration process ($\lambda_{\text{ex}}=330 \text{ nm}$), (b) Corresponding titration profile according to the emission at 394 nm

增强,只有当 $c_{\text{Zn}}/c_{2\text{-PBI}}$ 达到 1:1 时,这种增强才变得比较明显,其中 394 nm 处出现的新发射峰增长较快,已成为最大发射波长。该峰不同于质子化后出现的 450 nm 处的激发态分子内质子转移峰,应源于 2-PBI 与 Zn^{2+} 的配位结合。进一步滴加 Zn^{2+} 将导致荧光的进一步增强,但难以达到平衡。即使 Zn^{2+} 在 20 倍浓度以上,荧光仍不断随 Zn^{2+} 的滴加而增强。对 Zn^{2+} 较低的响应灵敏度也反映了 2-PBI 在水溶液中较低的 Zn^{2+} 配位能力。荧光的持续增强与 $c_{\text{Zn}(\text{total})}$ 的提高导致锌配合物不断生成有关。另一方面, Zn^{2+} 加入过程中 2-PBI 原 355 nm 发射峰同样增强,增幅很小,已经不是最大发射峰。 Zn^{2+} 滴定虽然导致荧光最大发射峰的红移,符合比例计量探针的基本特点,但原发射峰未发生同比减弱,难以实现真正意义的比例计量测定。

Zn^{2+} 紫外滴定(图 2)发现 2-PBI 位于 308 nm 的吸收峰逐渐降低,而 330 nm 的吸收强度逐渐增高。同时最大吸收峰也红移到了 318 nm 处。这与 Zn^{2+}

配位诱导芳环共平面化增大了共轭程度降低了 HOMO 和 LUMO 轨道间的能级差有关。滴定过程未出现完全固定的等色点,而滴定曲线也表明 Zn^{2+} 可能与 2-PBI 形成多个配位物种,这也反映了 2-PBI 较弱的配位能力。

由于等量金属离子对 HEPES 溶液中 2-PBI 荧光影响不够显著,对 2-PBI 的 Zn^{2+} 选择性响应能力的考察是通过比较 10 倍不同金属离子引起的 394 nm 处发射增强倍数来实现。从图 3 可以看出 10 倍的过渡金属离子除了 Zn^{2+} 和 Cd^{2+} 外, Co^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Ni^{2+} 都不同程度地对荧光具有猝灭作用。10 倍 Zn^{2+} 的加入使 394 nm 处荧光增强倍数最大,达到 11 倍,而 10 倍 Cd^{2+} 的加入可以使荧光增强近 6 倍(人体内的 Cd^{2+} 含量非常低,一般不干扰 Zn^{2+} 的检测)。 Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} 对 2-PBI 荧光影响不明显,而且在 1000 倍浓度的 Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} 的存在下, Zn^{2+} 的检出不会受到任何影响,说明在水溶液中, Zn^{2+} 的配位能力远强于 Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , 并有利于探针在细

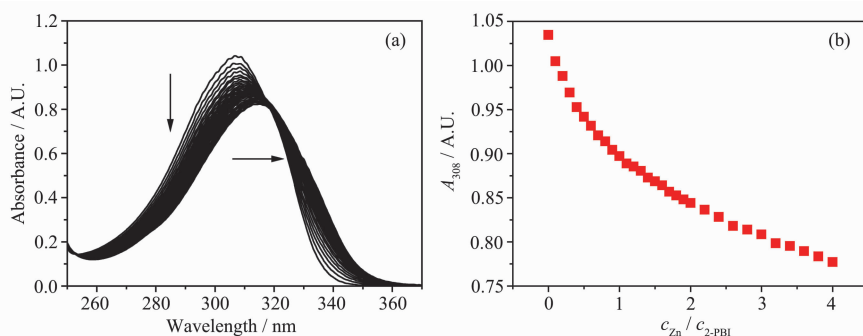
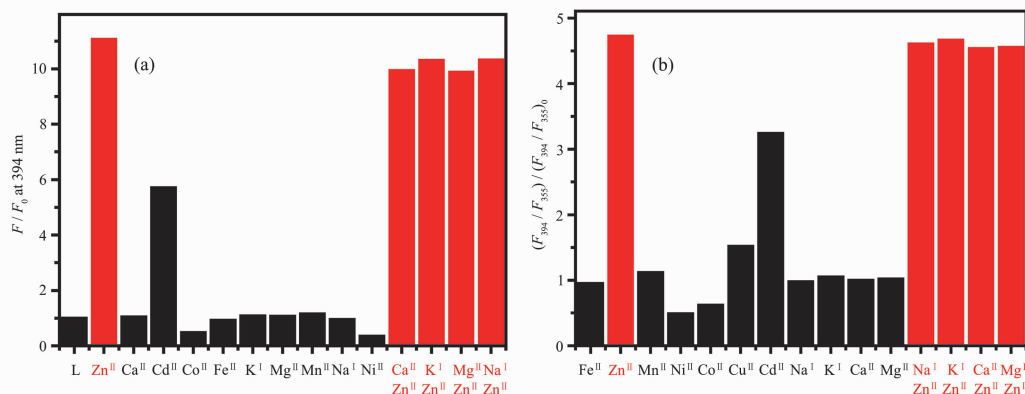


图 2 (a) HEPES 缓冲溶液中 2-PBI 在滴加 $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ 过程中的吸收光谱(b) 根据 308 nm 处吸收变化给出的紫外滴定曲线
Fig.2 (a) Absorption spectra of 2-PBI in HEPES buffer obtained in Zn^{2+} titration process, (b) the corresponding titration profile according to the absorbance at 308 nm



$\lambda_{\text{ex}}=330 \text{ nm}$; $c_{\text{M}}/c_{2\text{-PBI}}=10$; The concentration of Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} is 1000 times as higher as that of Zn^{2+} in the coexistence experiments

图 3 不同金属离子对 2-PBI 的 HEPES 溶液荧光的影响(a) 394 nm 处的荧光增强, (b) 394 和 355 nm 处荧光强度比变化

Fig.3 Influence on the emission of 2-PBI in HEPES buffer ($5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) caused by different metal cations (a) emission enhancement at 394 nm, (b) change of F_{394}/F_{355}

胞等生物体中的应用。所有这些都表明 2-PBI 可作为基本结构来构建有效的 Zn^{2+} 荧光探针。394 和 355 nm 处荧光强度比 F_{394}/F_{355} 的变化同样反应了 2-PBI 对 Zn^{2+} 的荧光选择性响应能力,然而该强度比并不与 $c_{\text{Zn}(\text{total})}$ 成比例计量关系。

2-PBI 在甲醇溶液中的荧光性质与 HEPES 缓冲溶液中的性质非常相似。我们推测在质子极性溶剂如水溶液和甲醇溶液中, Zn^{2+} 的溶剂化使其与本身配位能力不强的 2-PBI 结合较弱,导致响应灵敏度低,并可能出现不同的 Zn^{2+} 结合比例,干扰了比例计量行为。另一方面,分子内氢键可能在基态和激发态中存在,使得配体本身的发射出现多峰,也会影响比例计量行为。由于乙腈对 Zn^{2+} 的溶剂化能力较弱,可能会有利于 2-PBI 与 Zn^{2+} 的结合,而且乙腈中 2-PBI 形成分子内氢键的倾向比较明确,有利于分析其荧光行为,因此我们进一步研究了非质子极性溶剂乙腈溶液中 2-PBI 的荧光行为。

2.2 2-PBI 在乙腈中的 Zn^{2+} 荧光响应

乙腈溶液中 2-PBI 的荧光光谱测定表明其荧光最大激发和发射波长分别为 326 和 359 nm。发射谱还显示了 380 nm 处的肩峰。使用 Zn^{2+} 水溶液对 2-PBI 乙腈溶液进行荧光滴定时,随着体系中 $c_{\text{Zn}(\text{total})}$ 的提高,359 nm 处发射逐渐减弱,395 nm 处出现的新发射峰荧光强度线性增强。这显然与 Zn^{2+} 与 2-PBI 的结合有关。这种荧光变化在 $c_{2\text{-PBI}}/c_{\text{Zn}(\text{total})}$ 达到 1:1 以后趋于平衡(图 4a)。根据 395 nm 处荧光强度在滴定过程中的变化趋势可以推测 Zn^{2+} 与 2-PBI 的结合比例为 1:1,而且过高的 c_{Zn} 不会导致新物种的产生。

这里,2-PBI 表现出了明显的对 Zn^{2+} 的比例计量响应能力。滴定过程发现这种荧光变化几乎是瞬间产生,表明 2-PBI 与 Zn^{2+} 结合具有较快的动力学过程。空白对照实验中加入等体积水未观察到对荧光的明显影响。在紫外灯照射下(365 nm),2-PBI 乙腈溶液对 Zn^{2+} 的荧光响应非常明显,即使肉眼也能观察到(图 4b)。

2-PBI 乙腈溶液的紫外吸收光谱在 308 nm 处存在最大吸收峰,同时在 318 nm 处存在 1 个肩峰。利用 Zn^{2+} 溶液进行紫外滴定时,发现 308 nm 吸收峰逐渐下降(图 5),使得 318 nm 处吸收峰逐渐成为主吸收峰,并在其 329 nm 处出现新肩峰。308 nm 处吸收强度变化曲线显示吸收强度的下降与加入 Zn^{2+} 的量成正比,而且在 $c_{\text{Zn}(\text{total})}/c_{2\text{-PBI}}$ 达到 0.5 以后吸收峰趋于平衡,这表明 2-PBI 与 Zn^{2+} 的结合比例应为 2:1。这完全不同于荧光滴定时的结合比例。这两种不同结合方式中,乙腈分子以及阴离子硝酸根可能是辅助配体(图 6)。不同的结合方式可能与溶液中的配体浓度有关,这也与 2-PBI 本身对 Zn^{2+} 的螯合原子较少,而 Zn^{2+} 配位数较高有关。不管是何种结合比例, Zn^{2+} 配位均导致吡啶环和苯并咪唑环共面化,扩大了共轭体系,减小了分子基态和激发态间的能量差,导致发射波长的红移。与设想相一致,在非质子溶剂乙腈, Zn^{2+} 溶剂化较弱,2-PBI 与 Zn^{2+} 的结合较强,在一定浓度下具有固定的结合比例和物种,但不同浓度仍可使 2-PBI 的 Zn^{2+} 结合方式产生多样性。

2-PBI 乙腈溶液对金属离子的荧光选择性响应

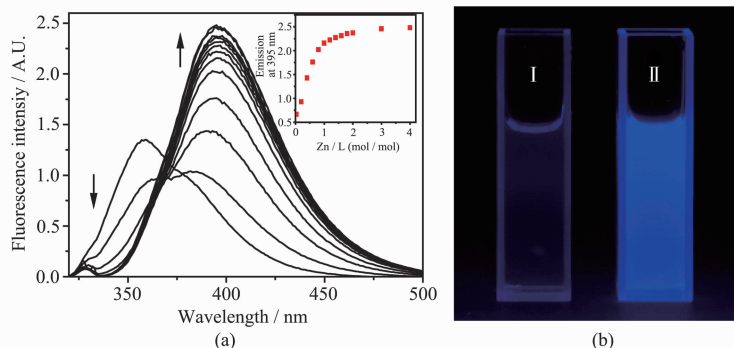


图 4 (a) 2-PBI 乙腈溶液($5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)在 Zn^{2+} 滴定过程中的荧光光谱,插图为根据 395 nm 处荧光强度变化给出的 Zn^{2+} 荧光滴定曲线, $\lambda_{\text{ex}}=326 \text{ nm}$; (b) 365 nm 紫外灯照射下, 2-PBI 乙腈溶液($50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, I)和加入等量 Zn^{2+} 后(II)的照片

Fig.4 (a) Emission spectra of 2-PBI in acetonitrile ($5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) obtained in Zn^{2+} titration process, The inset is the corresponding titration profile according the emission intensity at 395 nm, $\lambda_{\text{ex}}=326 \text{ nm}$; (b) Photograph of 2-PBI acetonitrile solution ($5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, I) and in the presence of one equivalent of Zn^{2+} (II) under the irradiation at 365 nm

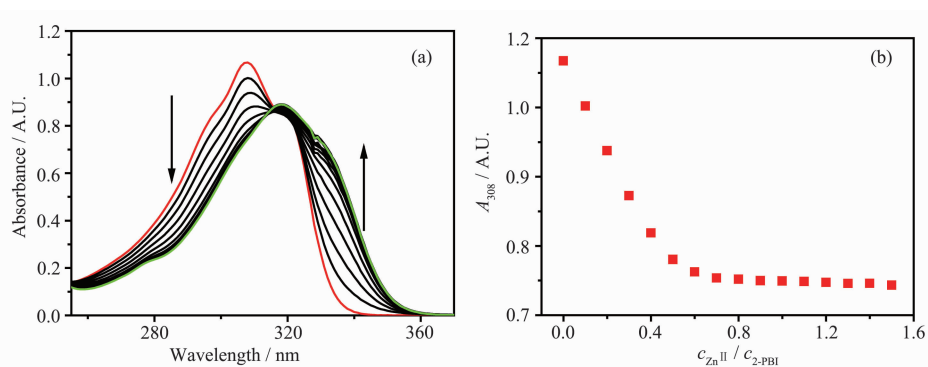


图 5 (a) 2-PBI 乙腈溶液($50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)在 Zn^{2+} 滴定过程中的吸收光谱;(b) 由 308 nm 处吸收强度变化给出的滴定曲线

Fig.5 (a) Absorption spectra of 2-PBI acetonitrile solution ($50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) obtained in Zn^{2+} titration process,

(b) Corresponding titration profile according to the absorbance at 308 nm

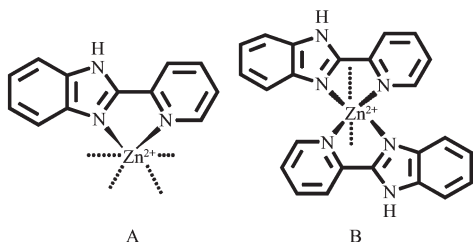


图 6 Zn^{2+} 与 $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (A) 和 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (B) 2-PBI 在乙腈中的可能配位方式

Fig.6 Possible Zn^{2+} -coordination form of $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ of 2-PBI in acetonitrile (A) and $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ in acetonitrile (B)

研究发现仅有 Zn^{2+} 和 Cd^{2+} 的加入导致了发射红峰的

红移,其中 Zn^{2+} 导致 395 和 359 nm 处发射强度之比上升了 8 倍以上,而 Cd^{2+} 导致的增强倍数小于 4。其他金属离子(Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+})的加入均导致荧光的减弱或猝灭 (图 7)。而即使加入 20 μL 水在乙腈溶液中并未导致荧光的下降。研究还发现 1 000 倍 Na^+ , K^+ , Ca^{2+} 或 Mg^{2+} 与 Zn^{2+} 共存时,2-PBI 的荧光减弱,主要体现了 Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} 的响应性能。很可能乙腈溶液中,高浓度的 Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} 优先与 2-PBI 配位,阻碍了 2-PBI 与 Zn^{2+} 的配位。显然, Zn^{2+} 配位诱导荧光发射波长移动使得乙腈溶液中的 2-PBI 具有一定的 Zn^{2+} 选择性比例计量响应能力,然而这种响应容易受到共存离子的干扰。

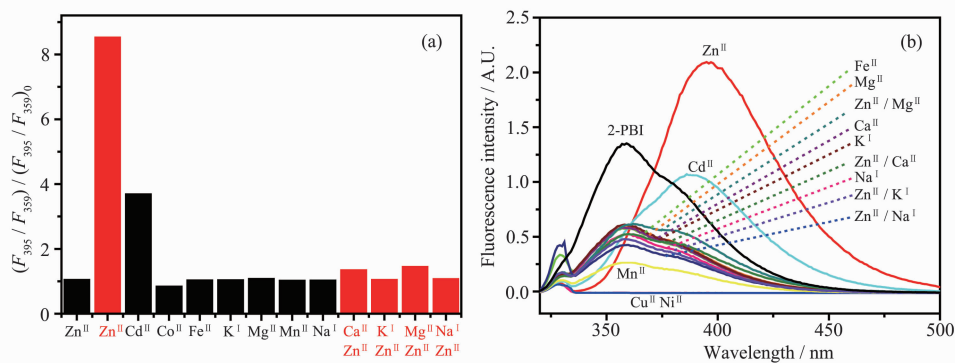


图 7 不同金属离子对 2-PBI 乙腈溶液($5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)荧光的影响(a)395 和 359 nm 处荧光强度比变化;(b) 荧光光谱变化

Fig.7 Influence on 2-PBI ($5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) emission in acetonitrile caused by different metal cations

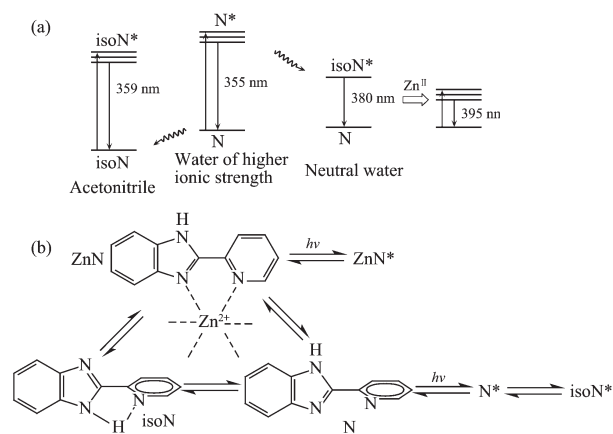
(a) Change of F_{395}/F_{359} ; (b) Change of the emission spectrum

2.3 2-PBI 的荧光机制与探针设计策略

前述研究表明,2-PBI 在乙腈和含 $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KNO_3 的 HEPES 缓冲溶液中的最大发射波长分别为 355 和 359 nm,同时都具有一个 380 nm 处的肩峰。根据文献报道,这一肩峰应为中性 2-PBI 的荧光发射峰。Datta 等发现在含 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AOT 乙腈反

胶束的正庚烷溶液中的最大发射波长为 360 nm^[5c],非常接近于乙腈中最大发射波长 359 nm。我们推测 2-PBI 分子在非质子溶剂或类似环境中可通过形成分子内氢键的形式(isoN)降低基态能量,使得蓝移至 359 nm 的发射波长成为最大发射波长。在中性水溶液中 380 nm 处的最大发射波长则可能源于激发态

中性分子(N^*)通过非辐射形式形成含有分子内氢键的 isoN^* 降低了激发态能量。当水溶液中有一定的离子强度后,通过诱导极化可稳定激发态中性分子(N^*)而不利于稳定激发态 isoN^* ,因此在含 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ KNO}_3$ 的 HEPES 缓冲溶液中最大发射波长为 355 nm 。当 Zn^{2+} 与 2-PBI 配位时,通过 C-C 键连接的苯并咪唑环和吡啶环将会最大程度地共面化,提高 2-PBI 分子共轭程度,减小 HOMO 和 LUMO 轨道间的能级差,使得发射波长红移至 395 nm 左右 (Scheme 2)。该红移明显小于文献报道的酸性条件下通过激发态质子转移产生的发射红移(450 nm)。



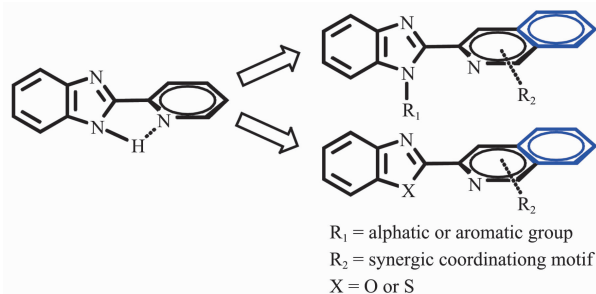
图示 2 (a) 简化的 2-PBI 在不同介质中及 Zn^{2+} 配位后的发射能级 Jablonski 图; (b) 2-PBI 的不同发射方式

Scheme 2 (a) Simplified Jablonski diagram of 2-PBI illustrating the emission energy in different media and upon Zn^{2+} binding; (b) Different emission forms of 2-PBI

目前的结果表明,不管在 HEPES 缓冲液中还是在乙腈中,2-PBI 确实可以通过 Zn^{2+} 配位结合使得发射波长红移,并且在模拟生理条件也具有明显的 Zn^{2+} 选择性,但在 HEPES 缓冲液中没有严格意义的比例计量能力,灵敏度也非常低。原因首先是由于 2-PBI 对 Zn^{2+} 配位能力不强,存在多种可能配位方式,难以形成单一的锌配合物物种。这可能与分子中咪唑 N 与周围大量水分子形成氢键导致 2-PBI 分子的强烈溶剂化降低了其 Zn^{2+} 配位能力有关^[6]。同时溶液中的自由 Zn^{2+} 对自由 2-PBI 的弱配位或极化作用,也可能有利于 N^* 荧光产生,导致 355 nm 处荧光有小幅增强。其次由于 2-PBI 分子在基态和激发态都可形成分子内氢键,因此 2-PBI 分子本身具有 2 个相近发射波长,加上 Zn^{2+} 配位触发的发射红移太小,新发射峰靠得近,当本身 2 个发射波长

对 Zn^{2+} 的敏感程度不同时也会对比例计量造成干扰。实际上即使在乙腈中的 Zn^{2+} 荧光滴定并没有完全固定的等色点。

虽然存在上述不足,但 Zn^{2+} 触发的发射波长红移还是非常明显,符合比例计量探针的基本要求,同时有较好的 Zn^{2+} 选择性响应能力,完全可以利用 2-PBI 为荧光团和配位团基本骨架构建 Zn^{2+} 比例计量探针。为克服前述的不足,设计时可以采取适当的策略,例如引入协同配位的基团,尽量满足 Zn^{2+} 高配位数的需要,提高探针的配位能力。同时可以将咪唑环上 N 质子适当取代,一方面避免分子内氢键的干扰;另一方面,使得配位前苯并咪唑环和吡啶环共面性更差,扩大 Zn^{2+} 配位前后的差异,使得红移变化更为明显。为避免分子内氢键的干扰,还可以利用苯并噻唑和噻唑代替苯并咪唑。进一步扩大 C-C 单键两端的芳杂环共轭体系,这同样有利于获得较大的 Zn^{2+} 触发发射红移,而且也有利于增大激发波长,减小对生物体的损伤。



图示 3 利用 2-PBI 构建 Zn^{2+} 比例计量型探针的可能途径

Scheme 3 Possible modification of 2-PBI to construction Zn^{2+} ratiometric sensors

3 结 论

通过对 2-PBI 在 HEPES 缓冲溶液和乙腈溶液的锌离子荧光响应行为研究,发现 Zn^{2+} 配位可以引起荧光最大发射波长的红移,并且体现出较好的 Zn^{2+} 选择性响应能力,体现了比例计量探针的特点。但由于配位能力弱、分子内氢键干扰以及芳环较小等因素的影响,2-PBI 在 HEPES 缓冲溶液中 Zn^{2+} 响应灵敏度低,而且难以实现真正比例计量测定。然而本研究对杂环 N 原子与 Zn^{2+} 协同配位触发荧光发射波长红移效应的证实,使得 2-PBI 荧光分子可同时作为探针的信号团和受体的基本骨架,通过引入协同配位团、咪唑 N 质子取代、扩大端基芳香结构等修饰来构建 Zn^{2+} 比例计量型荧光探针,进一步的研究正在进行中。

参考文献:

- [1] (a) Berg J M, Shi Y. *Science*, **1996**, **271**:1081~1085
(b) O'Halloran T V. *Science*, **1993**, **261**:715~724
(c) Burdette A C, Lippard S J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2003**, **100**:3605~3610
- [2] (a) Frederickson C J, Kasarskis E J, Ringo D et al. *J. Neurosci. Methods*, **1987**, **20**:91~103
(b) Lim N C, Freake H C, Brückner C. *Chem. Eur. J.*, **2005**, **11**:38~49
(c) Jiang P J, Guo Z J. *Coord. Chem. Rev.*, **2004**, **248**:205~229
(d) Carol P, Sreejith S, Ajayaghosh A. *Chem. Asian J.*, **2007**, **2**:338~348
- [3] (a) Chang C J, Jaworski J, Nolan E M et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2004**, **101**:1129~1134
(b) Lim N C, Brückner C. *Chem. Commun.*, **2004**:1094~1095
(c) Taki M, Wolford J L, O'Halloran T V. *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, **126**:712~713
(d) Maruyama S, Kikuchi K, Hirano T, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, **124**:10650~10651
(e) Henary M M, Wu Y, Fahrni C J. *Chem. Eur. J.*, **2004**, **10**:3015~
- [4] Ajayaghosh A, Carol P, Sreejith S. *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, **127**:14962~14963
- [5] (a) Rodríguez-Prieto F, Mosquera M, Novo M. *J. Phys. Chem.*, **1990**, **94**:8536~8542
(b) Kanti T K, Datta A. *J. Phys. Chem. B*, **2006**, **110**:2611~2617
(c) Mukherjee T K, Panda D, Datta A. *J. Phys. Chem. B*, **2005**, **109**:18895~18901
(d) Novo M, Mosquera M, Rodríguez-Prieto F. *J. Phys. Chem.*, **1995**, **99**:14726~14732
- [6] Chen C L, Tan H Y, Yao J H, et al. *Inorg. Chem.*, **2005**, **44**:8510~8520