

新型比色荧光双通道探针用于硫化氢的检测

王肖莉¹ 姚 猛^{1,2} 李 引¹ 魏 超¹ 王 美^{*1,2}

¹(河北大学化学与环境科学学院, 保定 071002)

²(河北省阻燃材料与加工技术工程技术研究中心, 保定 071002)

摘 要 以 7-硝基苯并呋喃(NBD)为荧光团,经一步有机合成,高产率制备比色荧光双通道探针,用于检测环境和体内硫化氢(H₂S)的含量。以无水 Na₂S 为 H₂S 供体,考察了探针的选择性、灵敏性等性能。结果表明,探针荧光强度与 H₂S 浓度在 5 ~ 50 μmol/L 浓度范围内呈良好的线性关系,检出限为 0.125 μmol/L,同时反应溶液由无色变为紫色。采用 MTT 法测试探针的细胞毒性,结果表明,在探针浓度低于 50 μmol/L 条件下,细胞存活率高于 90%。激光扫描共聚焦显微成像结果表明,探针可靶向细胞溶酶体,可对溶酶体内 H₂S 进行成像研究。

关键词 硫化氢; 比色检测; 荧光探针; 细胞成像

1 引言

硫化氢(H₂S)是一种无色且具有臭鸡蛋气味的气体,一般由工业中含硫物质非完全燃烧产生,被认为是一种有毒环境污染物质。近年研究发现,H₂S 是生命体内一种重要的内源性气体信号分子,参与多种重要的生理过程^[1~4],H₂S 浓度异常与许多疾病有关,如阿尔茨海默氏症、唐氏综合症、糖尿病和肝硬化等^[5,6]。但是,其在体内的潜在分子机制尚不明确^[7,8]。因此,基于 H₂S 在环境和生命体内的重要作用,开发灵敏有效的分析方法具有重要的意义^[9]。

传统的 H₂S 检测方法包括吸收光谱法、电化学法、气相色谱法和硫沉淀法等^[10~13],而光学探针法发展迅速。其中,比色法可不借助昂贵的仪器设备,直接对目标物裸眼分析;荧光探针法选择性好、灵敏度高,可对生物样本(细胞、组织和活体等)内目标物进行实时荧光成像研究。基于 H₂S 的化学性质(还原性、亲核性等),研究者发展了多种反应型 H₂S 荧光探针^[14~16],包括还原型(芳香叠氮/硝基/羟胺还原为胺基)^[17~20]、亲核型(亲核取代^[21,22]、亲核加成/双亲核加成^[23,24])、形成 CuS 沉淀型^[25]等。近年来,虽然已报道了大量 H₂S 荧光探针,但是开发兼具制备简便、选择性好、灵敏度高等优点,并能够实现比色和荧光双通道检测 H₂S 的优良的探针分子,用于检测环境和生物样品中的 H₂S,仍然是当前的研究热点。

2013 年,本研究组^[26]和 Pluth 研究组^[27]分别发现 7-硝基苯并呋喃(NBD)胺可与 H₂S 发生亲核取代反应,其产物 NBD-SH 可用于比色检测 H₂S。基于此,利用多种光物理扰动原理,构建了系列选择性检测 H₂S 的比色荧光双通道探针^[28~30]。进一步利用 NBD 优秀的荧光性质,本研究组^[31]和易龙研究组^[32]分别构建了以 7-羟基香豆素连 NBD 为骨架结构的比例计量型 H₂S 荧光探针,实现了细胞线粒体和溶酶体内 H₂S 的比例成像研究。

考虑到上述探针分子需要多步有机合成进行制备,本研究以 NBD 为荧光团,吗啉为溶酶体靶向基团,经一步有机反应,设计合成了新型比色荧光双通道 H₂S 探针 NBD-M。此探针本身具有荧光,与 H₂S 反应后的产物 NBD-SH 在水溶液中荧光较弱,因此,可产生由开到关的荧光变化;同时,利用产物 NBD-SH 的颜色变化可比色检测溶液中 H₂S。考察了探针的溶酶体靶向的功能,并测试了探针检测细胞溶酶体内 H₂S 的能力。

2019-07-28 收稿; 2019-11-04 接受

本文系河北省自然科学基金项目(Nos. B2019201418, B2018201234)、河北省高等学校科学技术研究项目(No. QN2017015)和保定市科学研究与发展计划(No. 18ZF315)资助

* E-mail: wangmariam@163.com

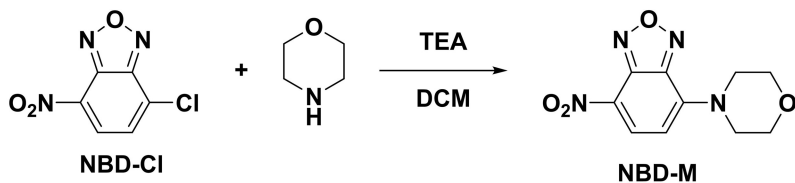
2 实验部分

2.1 仪器与试剂

Brucker 600 核磁共振仪(美国 Brucker 公司,TMS 为内标); Varian 7.0 T FTICR-MS 质谱仪、UV-3600 型分光光度计(美国 Agilent 公司); F-7000 型荧光光谱仪(日本日立公司); PHS-3C 型精密 pH 计(上海雷磁仪器厂); ZF-7 型三用紫外分析仪、X-4 显微熔点仪(上海精密仪器仪表有限公司)。4-氯-7-硝基苯并呋咱和吗啉(阿拉丁试剂有限公司); 其它试剂均购于天津光复试剂公司。所用试剂均为市售分析纯,实验用水为二次蒸馏水。

2.2 探针 NBD-M 的合成

将 200 mg (1.00 mmol) NBD-Cl 和 91 mg (1.05 mmol) 吗啉溶解于 10 mL 二氯甲烷,向其中加入 209 μ L (1.50 mmol) 三乙胺,室温反应 1 h 后,加入 10 mL 水,萃取,有机相加入无水 Na_2SO_4 干燥,蒸除溶剂,所得粗品用硅胶柱分离(二氯甲烷-甲醇, 100:1, V/V) 得淡红色固体,产率 90%。熔点: 147.2 ~ 148.5 $^{\circ}\text{C}$ 。 ^1H NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz), δ (ppm): 8.51 (d, $J=9.0$ Hz, 1H), 6.68 (d, $J=9.0$ Hz, 1H), 4.13 ~ 4.12 (m, 4H), 3.85 ~ 3.83 (m, 4H)。 ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 151 MHz), δ (ppm): 145.39, 144.75, 144.73, 136.21, 121.36, 103.42, 65.67, 49.47。MS (ESI $^{+}$) calcd for $[\text{M}+\text{H}^{+}]$ 341.1, found 341.2。探针 NBD-M 的合成路线见下式。



2.3 光谱测试

配制 2 mmol/L 探针的 DMSO 溶液,在室温下、磷酸盐缓冲溶液(PBS, pH 7.4, 0.02 mol/L)中进行光谱测试,探针浓度为 10 μ mol/L,激发波长为 490 nm,激发和发射狭缝宽度均为 5 nm。选择性测试所需各种潜在干扰物质均溶于纯 PBS,测试浓度为 200 μ mol/L。

2.4 细胞成像

细胞培养实验方法和条件参见电子版文后支持信息。HeLa 细胞接种于 35 mm 细胞成像专用玻底培养皿,成像细胞密度为 2×10^4 。加入 NBD-M (10 μ mol/L) 和商品化溶酶体定位探针 Lyso-Tracker Red (20 nmol/L) 共孵育 30 min,用 PBS 洗涤 3 次后,进行共定位成像研究。探针 NBD-M 荧光通道激发波长为 488 nm,发射波长范围 500 ~ 550 nm; Lyso-Tracker Red 荧光通道激发波长为 546 nm,波长采集范围 590 ~ 640 nm。

3 结果与讨论

3.1 探针的光谱性质

探针的荧光性质是探针荧光检测和成像的基础。考察了不同溶剂对探针紫外吸收和荧光发射光谱的影响。随着溶剂极性增加,探针的最大紫外和荧光发射均发生红移(电子版文后支持信息表 S1)。如图 1 所示,在 PBS 中,探针的最大紫外吸收和荧光发射分别为 496 和 576 nm,斯托克斯位移高达 80 nm,在实际应用中可有效避免激发光对检测光谱信号的干扰。

3.2 探针对 H_2S 的识别性能研究

在 PBS (0.02 mol/L, pH 7.4) 溶液中,探针的最大紫外吸收峰强度在探针浓度 $0 \sim 4.0 \times 10^{-4}$ mol/L 范围内线性关系良好 ($r = 0.9993$),表明探针具有良好的水溶性(电子版文后支持信息图 S2)。如图 2 所示,将探针溶液(10 μ mol/L)和新配 H_2S 溶液(200 μ mol/L)混合,30 min 后反应体系的荧光信号基本稳定。计算所得探针与 H_2S 反应的假一级反应动力学常数(k_{obs})约为 $2.1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$,二级反应动力学常数(k_2)为 10.5 L/(mol $\cdot$ s),与其它 NBD 基亲核取代型 H_2S 荧光探针的常数的数量级

相当^[18,26],表明探针可作为一种快速检测 H_2S 的荧光关闭型探针。

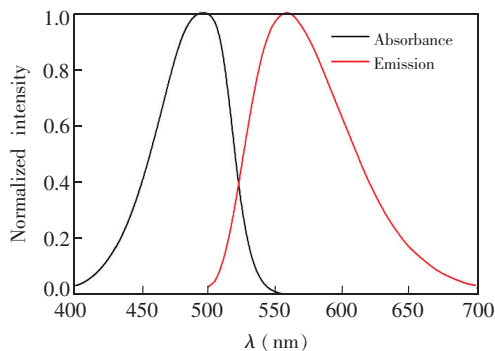


图 1 探针 NBD-M 在 PBS 溶液中的紫外吸收和荧光发射归一化光谱

Fig. 1 Normalized ultraviolet-visible and fluorescence spectra of probe NBD-M in phosphate buffer solution (PBS)

为了测试探针对 H_2S 的选择性,向探针 ($10\ \mu\text{mol/L}$) 的 PBS 溶液 ($0.02\ \text{mol/L}$, $\text{pH}\ 7.4$) 中,加入 $200\ \mu\text{mol/L}$ 的各种潜在干扰物质 (K^+ 、 Na^+ 、 Ca^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Cu^{2+} 、 F^- 、 Cl^- 、 Br^- 、 I^- 、 NO_3^- 、 SO_4^{2-} 、 NO_2^- 、 HClO 、 Vc 、 KO_2 、 SO_3^{2-} 、 H_2O_2 、 Hcy 、 Cys 、 GSH 、 H_2S),测试其荧光发射光谱($\lambda_{\text{ex}}=490\ \text{nm}$)。如图 3 所示, H_2S 可使探针的荧光显著降低,而其它物质不会明显改变探针的荧光强度,表明探针 NBD-M 对 H_2S 的荧光响应具有较高的选择性。

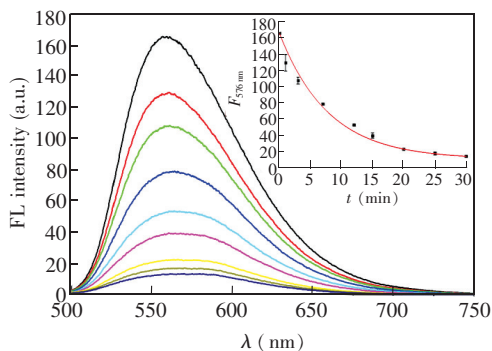


图 2 在 PBS 溶液中,探针 NBD-M ($10\ \mu\text{mol/L}$) 与 H_2S ($200\ \mu\text{mol/L}$) 的荧光响应曲线,插图为探针在 $576\ \text{nm}$ 波长处荧光强度随时间的拟合曲线

Fig. 2 Time-dependent fluorescence spectra of probe NBD-M ($10\ \mu\text{mol/L}$) upon reaction with H_2S ($200\ \mu\text{mol/L}$) in PBS solution. Inset is emission intensity at $576\ \text{nm}$ versus reaction time

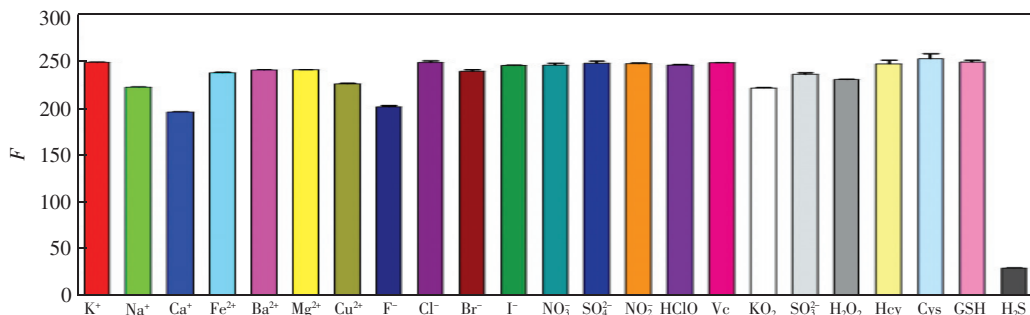


图 3 在 PBS 溶液中,不同物质 ($200\ \mu\text{mol/L}$) 存在下探针 NBD-M ($10\ \mu\text{mol/L}$) 在 $576\ \text{nm}$ 波长处的荧光响应

Fig. 3 Fluorescent response of probe NBD-M ($10\ \mu\text{mol/L}$) at $576\ \text{nm}$ in the presence of various species ($200\ \mu\text{mol/L}$) in PBS solution

为了评估探针对 H_2S 的检测灵敏性,进行了荧光滴定实验。向探针溶液 ($10\ \mu\text{mol/L}$) 中依次加入不同浓度 ($0\sim 100\ \mu\text{mol/L}$) 的新配 H_2S 溶液,孵育 $15\ \text{min}$,探针与 $576\ \text{nm}$ 处的最大发射峰荧光强度逐渐增强(图 4A)。如图 4B 所示,在 $5\sim 50\ \mu\text{mol/L}$ 浓度范围内, H_2S 的浓度与探针的荧光强度呈现良好的线性关系,其线性方程为 $y=266.13-3.43x$ ($r=0.9942$),检出限为 $0.125\ \mu\text{mol/L}$ ($S/N=3$),与已报道文献相当^[26]。上述结果表明,探针 NBD-M 可定量检测 H_2S 的浓度,具有较高的灵敏度。

探针与 H_2S 反应后,探针最大紫外吸收峰发生明显红移(电子版文后支持信息图 S3)。文献报道,探针与 H_2S 反应后,产物 NBD-SH 具有明显的颜色^[26,27]。向探针溶液 ($10\ \mu\text{mol/L}$) 中加入 0 、 10 、 20 、 30 、 40 、 50 、 75 和 $100\ \mu\text{mol/L}$ 的新配 H_2S 溶液,室温孵育 $5\ \text{min}$ 后,可明显观察到溶液由淡黄色变为紫色,并且随着 H_2S 加入量的增加,溶液紫色逐渐加深(图 5)。基于探针溶液的颜色变化与不同 H_2S 浓度之间的相关性,可简便地半定量检测水样中 $20\ \mu\text{mol/L}$ H_2S 。因此,探针 NBD-M 可实现对 H_2S 的比色和荧光双通道检测。

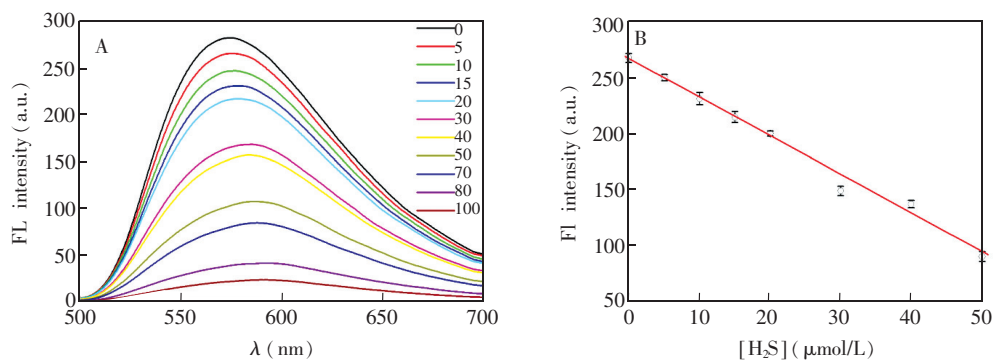


图 4 (A) 探针 NBD-M (10 $\mu\text{mol/L}$) 与 H_2S 的荧光滴定曲线; (B) 荧光强度与 H_2S 的浓度的线性关系曲线

Fig. 4 (A) Fluorescence titration curve of probe NBD-M (10 $\mu\text{mol/L}$) in the presence of different concentrations of H_2S in PBS solution; (B) Linear relationship between the fluorescence intensity of probe and the concentrations of H_2S

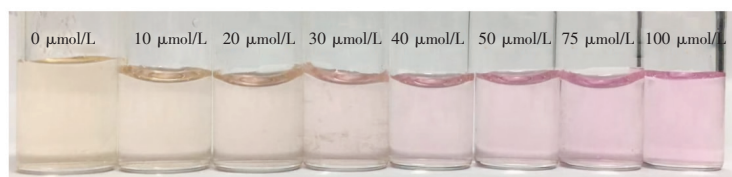


图 5 探针 NBD-M (10 $\mu\text{mol/L}$) 溶液加入不同浓度 H_2S (0 ~ 100 $\mu\text{mol/L}$) 后孵育 5 min 后的颜色变化

Fig. 5 Photographs of probe NBD-M in the presence of different concentrations of H_2S after incubation for 5 min

3.3 探针对 H_2S 的识别机制研究

为了研究探针与 H_2S 的识别机制,向探针溶液中加入等摩尔数的 H_2S ,测试了探针与 H_2S 反应前后的核磁共振氢谱。探针 1 位和 2 位芳香氢的化学位移分别为 6.67 和 8.51 ppm,与 H_2S 反应后,此位置芳香氢的化学位移分别 7.00 ppm 和 8.07 ppm 移动到 7.42 ppm。结合探针与 H_2S 反应的紫外吸收光谱和溶液颜色变化,推测探针与 H_2S 发生如图 6 所示的亲核取代反应。

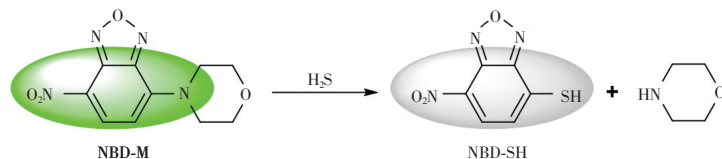


图 6 探针 NBD-M 探针对 H_2S 的识别机制

Fig. 6 Recognition mechanism of probe NBD-M to H_2S

3.4 探针对细胞内 H_2S 荧光成像研究

荧光关闭型荧光探针已被报道用于内源性 H_2S 的成像研究^[33~35]。利用四唑盐 (MTT) 比色法,对探针的细胞毒性进行评价,发现探针在浓度低于 50 $\mu\text{mol/L}$ 时,细胞存活率高于 90%,可用于细胞实验研究 (电子版文后支持信息图 S4)。

一些小分子胺类基团 (如吗啉、*N,N*-二甲基胺等) 本身具有碱性,含有此类结构的荧光探针能够选择性地积累在弱酸性细胞器,实现溶酶体定位功能。利用商品化溶酶体定位探针 (Lyso-Tracker Red) 进行细胞器共定位成像研究。如图 7 所示,向 HeLa 细胞加入含有 20 nmol/L 共定位探针 Lyso-Tracker Red 和 10 $\mu\text{mol/L}$ 探针 NBD-M 的培养基,共孵育 15 min,可观察到两个探针光谱重叠良好,共定位皮尔森相关系数为 0.93^[36],表明探针具有良好的溶酶体定位能力。

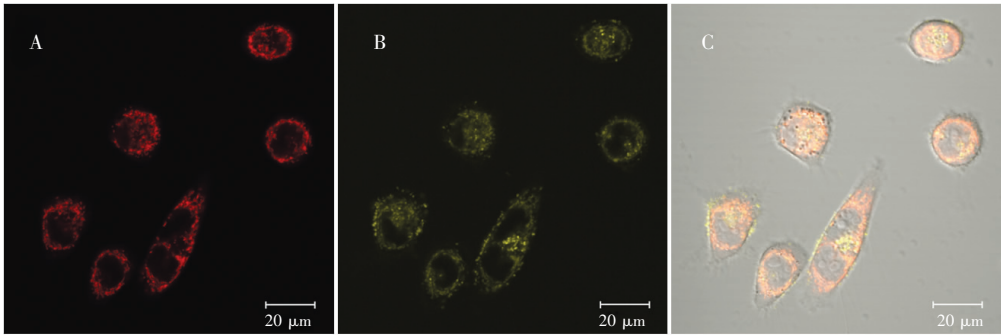


图 7 探针 NBD-M 的溶酶体共定位成像: (A) 商品化溶酶体共定位探针 Lyso-Tracker Red 的荧光场图; (B) 探针 NBD-M 荧光场图; (C) A 和 B 的叠加图

Fig. 7 Colocalization imaging of lysosomes in HeLa cells using probe NBD-M: (A) Fluorescence image of Lyso-Tracker Red; (B) Fluorescence image of NBD-M; (C) Merged images of A and B

利用探针对细胞内 H_2S 进行荧光成像研究。如图 8 所示, HeLa 细胞在含有 $10\text{ }\mu\text{mol/L}$ 探针的培养基中孵育 15 min , 可观察到明显的黄色荧光 (图 8A); 先孵育 $100\text{ }\mu\text{mol/L}$ H_2S 30 min , 再孵育探针 15 min , 黄色荧光明显降低 (图 8B); 先孵育 $200\text{ }\mu\text{mol/L}$ H_2S 30 min , 再孵育探针 15 min , 黄色荧光基本完全消失 (图 8C)。荧光成像实验表明, 探针 NBD-M 能够用于 HeLa 细胞溶酶体内 H_2S 的成像研究。

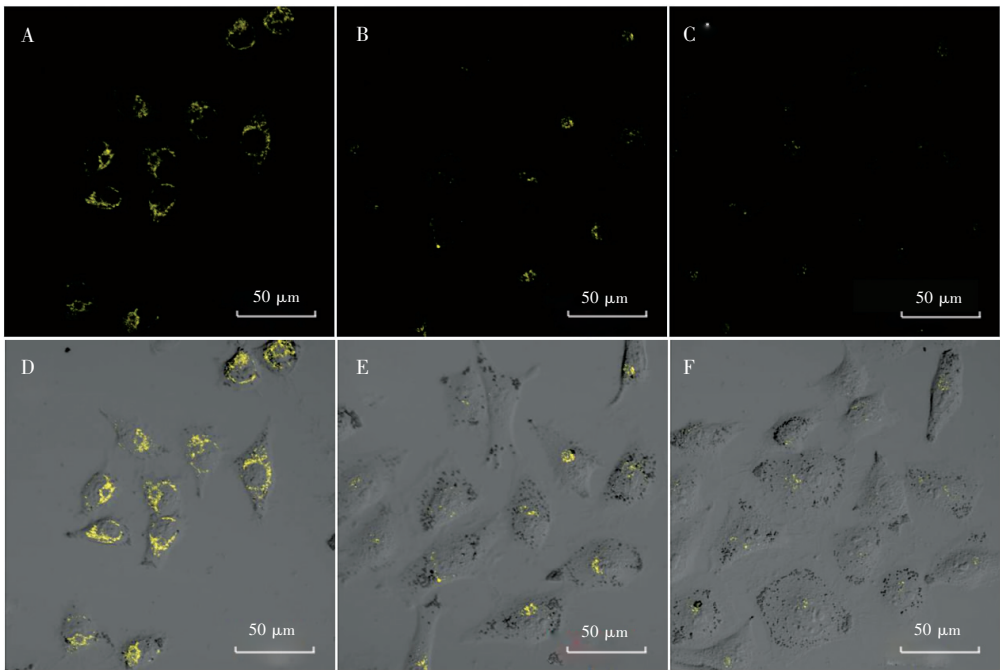


图 8 探针 NBD-M 培养的 HeLa 细胞荧光共聚焦成像, A ~ C 为荧光场图, D ~ F 为叠加图: (A, D) $10\text{ }\mu\text{mol/L}$ 探针; (B, E) 先加入 $100\text{ }\mu\text{mol/L}$ H_2S 孵育, 再加入 $10\text{ }\mu\text{mol/L}$ 探针; (C, F) 先加入 $200\text{ }\mu\text{mol/L}$ H_2S 孵育, 再加入 $10\text{ }\mu\text{mol/L}$ 探针

Fig. 8 Confocal fluorescence imaging of H_2S in HeLa cells using probe NBD-M (A–C: fluorescence images, D–F: merged images) : (A, D) Incubation by $10\text{ }\mu\text{mol/L}$ probe; (B, E) Incubation by $100\text{ }\mu\text{mol/L}$ H_2S firstly, then by $10\text{ }\mu\text{mol/L}$ probe; (C, F) Incubation by $200\text{ }\mu\text{mol/L}$ H_2S firstly, then by $10\text{ }\mu\text{mol/L}$ probe

4 结 论

合成了一种新型比色-荧光双通道探针 NBD-M, 能够高选择性和高灵敏识别 H_2S 。探针与 H_2S 反应

后,溶液颜色由无色逐渐变为紫色,能够裸眼检测含 20 $\mu\text{mol/L}$ H_2S 的水样,具有一定的应用前景。此探针能够靶向 HeLa 细胞溶酶体,可用于细胞内 H_2S 的成像研究。

References

- 1 Szabo C. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2007**, 6(11): 917–935
- 2 Li L, Rose P, Moore P K. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **2011**, 51: 169–187
- 3 Wallace J L, Wang R. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2015**, 14(5): 329–345
- 4 Kimura H, Shibuya N, Kimura Y. *Antioxid. Redox Sign.*, **2012**, 17(1): 45–47
- 5 Kamoun P, Belardinelli M C, Chabli A, Lallouchi K, Chadefaux-Vekemans B. *Am. J. Med. Genet. A*, **2003**, 116A(3): 310–311
- 6 Fiorucci S, Antonelli E, Mencarelli A, Orlandi S, Renga B, Rizzo G, Distrutti E, Shah V, Morelli A. *Hepatology*, **2005**, 42(3): 539–548
- 7 Paul B D, Snyder S H. *Antioxid. Redox Sign.*, **2015**, 22(5): 411–423
- 8 Furne J, Saeed A, Levitt M D. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **2008**, 295(5): R1479–R1485
- 9 Kolluru G K, Shen X, Bir S C, Kevil C G. *Nitric Oxide*, **2013**, 35: 5–20
- 10 Radford-Knaery J, Wang J. *Anal. Chem.*, **1993**, 65(8): 976–982
- 11 Lawrence N S, Deo R P, Wang J. *Anal. Chim. Acta*, **2004**, 517(1-2): 131–137
- 12 Gu X, Liu C, Zhu Y C, Zhu Y Z. *Tetrahedron Lett.*, **2011**, 52(39): 5000–5003
- 13 Ishigami M, Hiraki K, Umemura K, Ogasawara Y, Ishii K, Kimura H. *Antioxid. Redox Sign.*, **2009**, 11(2): 205–214
- 14 GAO Min, YU Fa-Biao, CHEN Ling-Xin. *Prog. Chem.*, **2014**, 26(6): 1065–1078
高敏, 于法标, 陈令新. *化学进展*, **2014**, 26(6): 1065–1078
- 15 Lin V S, Chen W, Xian M, Chang C J. *Chem. Soc. Rev.*, **2015**, 44(14): 4596–4618
- 16 Bruemmer K J, Brewer T F, Chang C J. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2017**, 39: 17–23
- 17 Lippert A R, New E J, Chang C J. *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, 133(26): 10078–10080
- 18 Zhou G D, Wang H L, Ma Y, Chen X Q. *Tetrahedron*, **2013**, 69(2): 867–870
- 19 Montoya L A, Pluth M D. *Chem. Commun.*, **2012**, 48(39): 4767–4769
- 20 Xuan W, Pan R, Cao Y, Liu K, Wang W. *Chem. Commun.*, **2012**, 48(86): 10669–10671
- 21 Zhao C C, Zhang X L, Li K B, Zhu S J, Guo Z Q, Zhang L L, Wang F Y, Fei Q, Luo S H, Shi P, Tian H, Zhu W H. *J. Am. Chem. Soc.*, **2015**, 137(26): 8490–8498
- 22 Lv J, Wang F, Qiang J, Ren X T, Chen Y H, Zhang Z J, Wang Y, Zhang W, Chen X Q. *Biosens. Bioelectron.*, **2017**, 87: 96–100
- 23 Qian Y, Karpus J, Kabil O, Zhang S Y, Zhu H L, Banerjee R, Zhao J, He C. *Nat. Commun.*, **2011**, 2: 495
- 24 Chen Y C, Zhu C C, Yang Z H, Chen J J, He Y F, Jiao Y, He W J, Qiu L, Cen J J, Guo Z J. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2013**, 52(6): 1688–1691
- 25 ZHONG Ke-Li, ZHAO Jie, LI Qiu-Ying, HOU Shu-Hua, TANG Yi-Wei, BIAN Yan-Jiang, TANG Li-Jun. *Chin. J. Org. Chem.*, **2018**, 38(7): 1786–1791
钟克利, 赵杰, 李秋莹, 侯淑华, 汤轶伟, 边延江, 汤立军. *有机化学*, **2018**, 38(7): 1786–1791
- 26 Wei C, Wei L, Yi L, Xi Z. *Tetrahedron Lett.*, **2013**, 54(50): 6937–6939
- 27 Hammers M D, Pluth M D. *Anal. Chem.*, **2013**, 86(14): 7135–7140
- 28 Zhang C Y, Wei L, Wei C, Zhang J, Wang R Y, Xi Z, Yi L. *Chem. Commun.*, **2015**, 51(35): 7505–7508
- 29 Ma C, Wei C, Li X Y, Zheng X Y, Chen B, Wang M, Zhang P Z, Li X L. *Dyes Pigments*, **2019**, 162: 624–631
- 30 Wei C, Wang R Y, Zhang C Y, Xu G C, Li Y Y, Zhang Q Z, Li L Y, Yi L, Xi Z. *Chem. Asian J.*, **2016**, 11(9): 1376–1381
- 31 Jia X, Li W, Guo Z H, Guo Z B, Li Y, Zhang P Z, Wei C, Li X L. *Chemistryselect*, **2019**, 4(29): 8671–8675
- 32 Zhang J, Wang R Y, Zhu Z T, Yi L, Xi Z. *Tetrahedron*, **2015**, 71(45): 8572–8576
- 33 Ozdemir T, Sozmen F, Mamur S, Tekinay T, Akkaya E U. *Chem. Commun.*, **2014**, 50(41): 5455–5457
- 34 Xu Z Y, Wu Z Y, Tan H Y, Yan J W, Liu X L, Li J Y, Xu Z Y, Dong C Z, Zhang L. *Anal. Methods*, **2018**, 10(27): 3375–3379

