

基于胆红素荧光增强效应的锌离子探针特性研究

郑名, 曹思敏, 刘阳依, 曹潇丹, 陈壮, 闫姝君, 李昊阳, 陈缙泉, 徐建华*

华东师范大学精密光谱科学与技术国家重点实验室, 上海 200062

摘要 锌离子 Zn^{2+} 对胆红素 BR 有着显著的荧光增强效应, 基于该荧光特性, 利用紫外可见光吸收和稳态荧光光谱技术提出了一种 BR 作为荧光探针用于 Zn^{2+} 浓度检测的新方法, 特别是首次采用在波长 663 和 600 nm 处的稳态荧光强度比值方法系统地研究了其与锌离子浓度在 $0\sim 90 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内变化的关系, 与常用的单波长荧光强度探测方法比较, 有效地避免了探针浓度变化及激发光强度变化等非目标因素的影响。实验研究结果发现 BR 荧光探针对于 Zn^{2+} 的识别行为在 $0\sim 20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内, 探针 BR 的荧光强度比值 $I_{663 \text{ nm}}/I_{600 \text{ nm}}$ 与 Zn^{2+} 的浓度之间具备线性增长关系, 尤其是 $0\sim 10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 有非常好的线性关系, 线性相关系数 $r=0.99987$, 同时 Zn^{2+} 检测限为 $0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。在 $20\sim 90 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内, 荧光强度比值 $I_{663 \text{ nm}}/I_{600 \text{ nm}}$ 趋于饱和。研究发现对实时检测人体内的 Zn^{2+} 具有很好的应用前景。

关键词 胆红素; 锌离子探针; 荧光光谱技术

中图分类号: O657.3 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2020)03-0813-04

引言

胆红素(Bilirubin, BR)是一种黄色的线性四吡咯, 是动物胆汁的主要色素^[1], 可以直接从动物胆汁中提取。研究表明, BR 能与金属离子形成络合物, 且其络合物的光谱性质与 BR 本身存在显著的差异。金属离子对 BR 荧光性质的影响可以分为三种不同的情况: 大多数金属离子, 如 Li^+ , Ba^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{3+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} , La^{3+} , Ce^{3+} 和 Zr^{4+} 等, 对 BR 的荧光性质无明显影响; 一些金属离子, 如 Cu^{2+} 和 Hg^{2+} , 对 BR 有着显著的荧光淬灭作用; 而锌离子 Zn^{2+} 和 Cd^{2+} 则对 BR 有着显著的荧光增强作用^[2], 并且 BR 对 Zn^{2+} 有着较好的选择性。

Zn^{2+} 在生命及生产活动中具有重要作用^[3-4], 因此对 Zn^{2+} 的检测目前已成为最受关注的研究之一。快速、高效、准确地检测存在于人体和生活环境中的 Zn^{2+} , 对保障人类健康, 以及医学和植物学应用上具有重要的应用价值。由于 Zn^{2+} 具有稳定的 $3d^{10}$ 电子构型^[5], 传统地检测方法例如: 原子吸收光谱法(AAS)^[6]、滴定法^[7]、电化学法^[8] 等并不适用于高效检测 Zn^{2+} 。随着科学技术的发展, 利用分子荧光探针技术检测 Zn^{2+} 已经获得大量成果。这些探针分子主要包括喹啉衍生物^[9]、荧光素^[10]、香豆素衍生物^[11] 等, 它们具有高

选择性和高灵敏度等优点^[12], 但是, 这些探针的分子量一般较大, 且合成步骤多。BR 作为荧光分子探针无需繁杂的合成步骤, 本文在 Zn^{2+} 对 BR 的荧光增强效应的基础上, 通过分析 Zn^{2+} 与 BR 混合后的紫外-可见光吸收和稳态荧光光谱特征, 结合双波长荧光比值法, 构建了 BR 作为 Zn^{2+} 荧光探针的检测方法。其中, 作者首次采用 BR 在波长 663 和 600 nm 处稳态荧光强度比值的方法系统地研究了 BR 与锌离子浓度在 $0\sim 90 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内变化的关系。该方法与常用的单波长荧光强度探测方法比较, 有效地避免了探针 BR 浓度变化及激发光强度变化等非目标因素的影响, 能够实现更准确地对 Zn^{2+} 进行检测。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

稳态吸收光谱数据的采集是使用紫外可见分光光度计(TU1901, 北京普析通用仪器有限责任公司)。仪器可在 $190\sim 900 \text{ nm}$ 波长范围内进行探测, 波长准确度 $\pm 0.3 \text{ nm}$ 。

稳态荧光光谱采用的是 Horiba 公司生产的 FluoroMax-4 型荧光光谱仪。因为不同的波长光源的发射功率不一样, 且探测器在不同波长下的探测效率也不一样, 所以在检测样品的稳态荧光光谱时选用 S1c/R1c。

收稿日期: 2019-02-20, 修订日期: 2019-05-06

基金项目: 国家自然科学基金面上项目基金(11674101, 21873030)资助

作者简介: 郑名, 1995年生, 华东师范大学精密光谱科学与技术国家重点实验室硕士研究生 e-mail: 864345429@qq.com

* 通讯联系人 e-mail: jhxu@phy.ecnu.edu.cn

本研究使用的所有化学试剂,均来源于商业购买,且未经过任何的提纯处理。二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO),光谱级, >99.9% GC, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; BR, B4126-1G, $\geq 98\%$ (EmM/453 = 60), powder, 西格玛奥德里奇中国; 无水乙酸锌, 99.5%, 国药集团化学试剂有限公司。

1.2 方法

用 BR 粉末和无水乙酸锌粉末分别配制 $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 BR 储备液与 $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Zn^{2+} 储备液, 溶剂均为 DMSO。准确量取 BR 溶液于不同的离心管中, 分别在每一个不同的离心管中依次滴加梯度浓度的 Zn^{2+} 溶液, 混合均匀后, 使得探针 BR 在离心管中的最终浓度为 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, Zn^{2+} 与探针 BR 的摩尔比为 $1 \sim 9$ 倍。

将每个离心管中的混合样品分别移取至各个石英比色皿中, 使用紫外可见分光光度计, 以空气为参比, 进行稳态吸收光谱数据的采集; 采用稳态荧光光谱仪, 分别测量样品的稳态荧光光谱, 激发波长为 355 nm , 狭缝宽度设为 $3 \text{ nm}/3 \text{ nm}$ 。

2 结果与讨论

2.1 Zn^{2+} 对 BR 的紫外-可见吸收光谱特性的影响

室温下, BR ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 在 DMSO 溶液中随着 Zn^{2+} 浓度增加的紫外-可见吸收变化曲线如图 1 所示。实验数据表明, 探针 BR 在 455 nm 处有一个吸收峰, 随着 Zn^{2+} 浓度的升高, 在 455 nm 处的吸收峰强度逐渐减弱, 而在 525 nm 出现新的吸收峰, 并且其强度逐渐增强, 证实探针 BR 与 Zn^{2+} 不断结合, 形成了新的金属配合物^[13]。在 355 nm 和 475 nm 处明显的等吸收点也充分证明了探针 BR 与 Zn^{2+} 已经形成稳定的配合物。

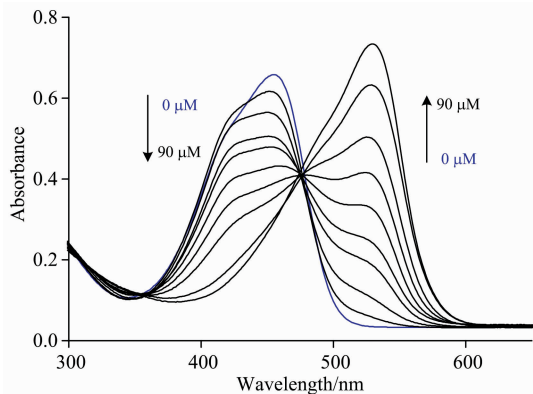


图 1 BR ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 随 Zn^{2+} ($0 \sim 90 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 浓度增加的紫外-可见吸收光谱变化图

Fig. 1 UV-Visible absorbance spectra of BR ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) in the presence of an increasing Zn^{2+} concentration ($0 \sim 90 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)

2.2 Zn^{2+} 对 BR 的稳态荧光光谱特性的影响

室温下, 将 BR 的浓度控制为 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 向其中逐渐加入 Zn^{2+} , 从 BR 的荧光发射光谱图(图 2)中可以看出,

当激发波长为 355 nm 时, 探针 BR 本身在 525 nm 处的荧光强度较弱。随着 Zn^{2+} 浓度的逐渐增加 ($0 \sim 90 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 525 nm 处荧光强度逐渐减弱。在 663 nm 处产生新的发射峰, 发射峰值波长红移了 138 nm , 并且其强度随着 Zn^{2+} 的加入逐渐增强。探针 BR 荧光增强的可能原因是在光诱导下, 探针 BR 与 Zn^{2+} 之间发生了电荷转移作用^[14]。

图 2 是探针 BR 的稳态荧光强度随着锌离子浓度的变化关系, 实验发现探针 BR 与 Zn^{2+} 的混合物在 600 nm 处没有吸收, 如图 1 所示, 而且在 600 nm 处的荧光基底强度随着加入的锌离子浓度增加只是有微小的变化。因此, 我们使用比率型荧光探测方法, 选择探针 BR 在发射波长 663 nm 和 600 nm 处稳态荧光强度比值 $I_{663 \text{ nm}}/I_{600 \text{ nm}}$, 其随 Zn^{2+} 浓度变化曲线如图 3 所示。从图中可以看出, 在 $0 \sim 20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内, $I_{663 \text{ nm}}/I_{600 \text{ nm}}$ 值随 Zn^{2+} 浓度变化逐渐增大, 其线性相关系数为 $r=0.94087$ 。进一步增加 Zn^{2+} 浓度, 其荧光强度比值趋于饱和不再有明显变化, 表明此时溶液中探针 BR 与 Zn^{2+} 的结合达到了平衡状态。另外, Zn^{2+} 的加入可以使探针

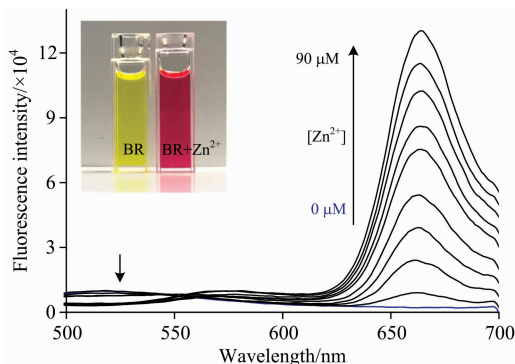


图 2 BR ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 随 Zn^{2+} ($0 \sim 90 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 浓度增加的荧光发射光谱变化图

Fig. 2 Fluorescence spectra of BR ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) in the presence of an increasing Zn^{2+} concentration ($0 \sim 90 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)

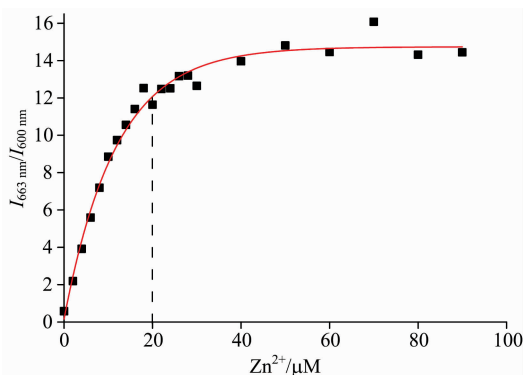


图 3 BR ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 在 663 nm 和 600 nm 处荧光强度比随 Zn^{2+} ($0 \sim 90 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 浓度变化图

Fig. 3 Ratio ($663 \text{ nm}/600 \text{ nm}$) in the fluorescence intensities of BR ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) at 663 nm and 600 nm in the presence of an increasing Zn^{2+} concentration ($0 \sim 90 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)

BR 的溶液颜色由黄色变为粉红色, 用肉眼即可直接观察识别过程, 这种明显的颜色和荧光强度的变化, 表明 BR 对 Zn^{2+} 有良好的识别作用, 可以实现对 Zn^{2+} 的可视化检测。

2.3 探针 BR 对 Zn^{2+} 的检测限

如图 4 和图 5 所示, Zn^{2+} 在 $0 \sim 10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度范围内, 探针 BR 在发射波长 663 和 600 nm 处发射荧光强度比值 $I_{663 \text{ nm}}/I_{600 \text{ nm}}$ 与 Zn^{2+} 的浓度之间存在非常好的线性相关。图 5 中的线性回归方程 $y=0.82923x+0.57379$, 相关系数 $r=0.99987$, 以 10 次空白样品的发射荧光强度比值 $I_{663 \text{ nm}}/I_{600 \text{ nm}}$ 作为标准差, 以 3 倍标准差计算^[15] 得到探针 BR 对 Zn^{2+} 的检测限为 $0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。这表明 BR 可以用来定量检测 Zn^{2+} 浓度。

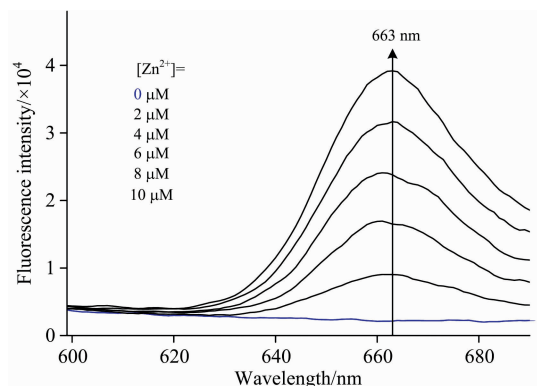


图 4 BR ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 荧光曲线对 Zn^{2+} 浓度的响应关系图

Fig. 4 Fluorescence spectra of BR ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) vs Zn^{2+} concentration

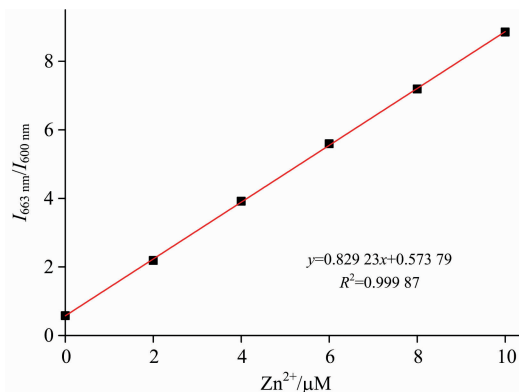


图 5 BR 在 663 和 600 nm 处的荧光强度与 Zn^{2+} 浓度线性拟合图

Fig. 5 Linear fit curve of ratio of BR ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) fluorescence intensities at 663 and 600 nm with respect to Zn^{2+} concentration

3 结 论

我们发现在探针 BR 的 DMSO 溶液中加入 Zn^{2+} 后荧光强度显著增强, 最大荧光发射波长红移了 138 nm, 从 525 nm 移动到 663 nm。探针 BR 对 Zn^{2+} 的检测范围 $0 \sim 10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 检测限达到 $0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 探针 BR 用双波长荧光比值法可以被用来检测环境中的 Zn^{2+} 浓度, 即已知 BR 浓度便可测定出 Zn^{2+} 浓度。同时, 探针 BR 是动物体中的一种胆汁色素, 没有复杂的合成步骤, 且其与 Zn^{2+} 结合后的荧光发射峰位于生物组织的透明窗口^[16], 因此其对生物活体成像也具有潜在的应用前景。

References

- [1] Ngashangva L, Bachu V, Goswami P. J. Pharm. Biomed. Anal., 2019, 162: 272.
- [2] ZHENG Wen-jie, YANG Fang, HU Xue-wang, et al (郑文杰, 杨芳, 胡学旺, 等). Chinese Journal of Analysis Laboratory (分析试验室), 2002, (2): 73.
- [3] Lee M C, Yu W C, Shih Y H, et al. Sci. Rep., 2018, 8(1): 4772.
- [4] Sturikova H, Krystofova O, Huska D, et al. J. Hazard. Mater., 2018, 349: 101.
- [5] Ramarao K, Rajesh Babu B, Kishore Babu B, et al. Journal of Electronic Materials, 2018, 47(5): 2997.
- [6] ZOU Feng, YUAN De-yi, GAO Chao, et al (邹锋, 袁德义, 高超, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis (光谱学与光谱分析), 2014, 34(4): 1095.
- [7] Wan Q, Ahmad M F, Fairman J, et al. Structure, 2011, 19(5): 700.
- [8] Ouyang R, Zhu Z, Tatum C E, et al. J. Electroanal Chem., 2011, 656(1-2): 78.
- [9] Ponnuel K, Kumar M, Padmini V. Sensors and Actuators, B, 2016, 227: 242.
- [10] Zhang D Y, Azrad M, Demark-Wahnefried W, et al. ACS Chemical Biology, 2015, 10(2): 385.
- [11] Xu Z, Liu X, Pan J, et al. Chem. Commun (Camb), 2012, 48(39): 4764.
- [12] Vidya B, Sivaraman G, Sumesh R V, et al. Chemistry Select, 2016, 1(13): 4024.
- [13] Wabaidur S M, Eldesoky G E, Alothman Z A. Luminescence, 2018, 33(3): 625.
- [14] Anjana R R, Anjali Devi J S, Jayasree M, et al. Mikrochim Acta, 2018, 185(1): 11.
- [15] Jayasree M, Aparna R S, Anjana R R, et al. Anal. Chim. Acta, 2018, 1031: 152.
- [16] Shcherbakova D M, Shemetov A A, Kaberniuk A A, et al. Annu. Rev. Biochem., 2015, 84: 519.

Study on Characteristics of Zinc Ion Probe Based on Fluorescence Enhancement of Bilirubin

ZHENG Ming, CAO Si-min, LIU Yang-yi, CAO Xiao-dan, CHEN Zhuang, YAN Shu-jun, LI Hao-yang, CHEN Jin-quan, XU Jian-hua*

State Key Laboratory of Precision Spectroscopy, East China Normal University, Shanghai 200062, China

Abstract Based on the fluorescence enhancement effect of Zn^{2+} on bilirubin (BR), this work proposes a new method for the detection of Zn^{2+} concentration, and a systematically investigation of BR as a Zn^{2+} probe by using ultraviolet-visible light absorption and steady-state fluorescence spectroscopy has been conducted. Compared with the general single-wavelength fluorescence intensity method, this new detection method eliminates the impacts of the non-target effects of factors such as concentration variation of BR and the excitation light intensity, etc., and achieves a more accurate measurement capability in Zn^{2+} detection. Especially, for the first time we adopt the BR fluorescence intensities ratio at the emission wavelengths 663 and 600 nm, and investigate the dependence between this ratio and the Zn^{2+} concentration in the range from 0 to $90 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. The recognition behavior of BR probe to Zn^{2+} indicates that the BR fluorescence intensity ratio $I_{663 \text{ nm}}/I_{600 \text{ nm}}$ increases linearly with the Zn^{2+} concentration in the range of $0 \sim 20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. In particular, in the range $0 \sim 10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ of Zn^{2+} concentration, the linear correlation coefficient r is 0.999 87, which demonstrates the linear dependence, and the detection limit is $0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. In the Zn^{2+} concentration range from 20 to $90 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, the probe BR fluorescence intensity ratio is saturated. Accordingly, there is a positive prospect of BR fluorescence in the real-time human body Zn^{2+} detection.

Keywords Bilirubin; Zinc probe; Fluorescence spectroscopy

(Received Feb. 20, 2019; accepted May 6, 2019)

* Corresponding author