

## 具有双重猝灭机制的高灵敏荧光探针对锌离子的检测

高巍<sup>1\*</sup>, 殷凯越<sup>1</sup>, 王泽晋<sup>1</sup>, 王清明<sup>2</sup>, 苏静<sup>1</sup>, 侯效佳<sup>1</sup>, 袁彩霞<sup>3\*</sup>

(1. 长治学院 化学系, 山西 长治 046011;  
2. 盐城师范学院 药学院, 江苏 盐城 224051;  
3. 山西大学 分子科学研究所, 山西 太原 030006)

**摘要:** 针对目前广泛采用的二-(2-吡啶基)胺(DPA)作为Zn<sup>2+</sup>识别基团的各类荧光探针背景荧光普遍偏高的问题, 我们提出基于荧光素开闭环和猝灭基团双猝灭机制的OFF-ON型Zn<sup>2+</sup>检测策略, 从而提高Zn<sup>2+</sup>荧光探针的灵敏度。本文合成一种含有荧光素前体分子、DPA为识别基团、二甲氨基偶氮苯甲酸(DABCYL)为猝灭基团的锌离子荧光探针(FL-ZJ), 通过荧光光谱研究了其与锌离子的荧光响应。研究表明, FL-ZJ在526 nm处表现出较低的荧光活性, 但是当体系中有锌离子存在时, FL-ZJ在526 nm处的荧光强度增强至原来的约17.4倍, 相应的体系颜色由无色变为黄色, 其他金属离子的加入不影响FL-ZJ的荧光强度, 说明FL-ZJ能够高效灵敏的检测Zn<sup>2+</sup>, 其对Zn<sup>2+</sup>的检出限仅为14.6 nmol/L。进一步通过Job's Plot实验及高效液相色谱推测出该探针检测锌离子的机理为: 锌离子的配位诱导了荧光素的开环及猝灭基团的分子内消除反应, 进而实现了探针对Zn<sup>2+</sup>的专一性检测。

**关键词:** 背景荧光; OFF-ON; 锌离子; 痕量

**中图分类号:** O436 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2395(2025)03-0617-09

## A Highly Sensitive Fluorescent Probe Utilizing a Dual Quenching Mechanism for Zn<sup>2+</sup> Detection

GAO Wei<sup>1\*</sup>, YIN Kaiyue<sup>1</sup>, WANG Zejin<sup>1</sup>, WANG Qingming<sup>2</sup>, SU Jing<sup>1</sup>, HOU Xiaojia<sup>1</sup>, YUAN Caixia<sup>3\*</sup>

(1. Department of Chemistry, Changzhi University, Changzhi 046011, China;  
2. School of Pharmacy, Yancheng Teachers' University, Yancheng 224051, China;  
3. Institute of Molecular Science, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

**Abstract:** To enhance the sensitivity of fluorescence probes for the detection of Zn<sup>2+</sup>, this study introduces an OFF-ON Zn<sup>2+</sup> detection strategy. This approach utilizes a dual quenching mechanism involving fluorescein ring closure-opening and (E)-4-((4-(dimethylamino) phenyl) diazenyl) benzoic acid (DABCYL) as a dual quencher. The primary objective is to address the issue of high background fluorescence associated with bis(pyridin-2-ylmethyl) amine (DPA) based Zn<sup>2+</sup> recognition groups in various fluorescence probes. The Zn<sup>2+</sup> fluorescence probe 4',5'-bis((bis(pyridin-2-ylmethyl)amino)methyl)-2',7'-dichloro-3'-hydroxy-3-oxo-3H-spiro [isobenzofuran-1,9'-xanthen]-6'-yl (E)-4-((4-(dimethylamino) phenyl) diazenyl) benzoate (FL-ZJ) was synthesized using a fluorescein precursor molecule, with DPA serving as the recognition group and DABCYL functioning as the dual quencher. The fluorescence response of FL-ZJ to Zn<sup>2+</sup> was investigated through fluorescence spectroscopy. Results indicated that FL-ZJ exhibited minimal fluorescence activity at 526 nm in the absence of Zn<sup>2+</sup>. Upon introduction of Zn<sup>2+</sup>, the fluorescence intensity at 526 nm increased to approximately 17.4-fold, ac-

**收稿日期:** 2024-12-16; **接受日期:** 2025-03-19

**基金项目:** 山西省基础研究计划资助项目(202303021211017); 山西省科技创新项目(2023L334); 长治学院校本应用教材建设项目(XN0329)

**作者简介:** 高巍(1984-), 男, 河南许昌人, 博士, 副教授, 研究方向为生物分析。E-mail: sxczygw@hotmail.com

\* **通信作者:** 袁彩霞(YUAN Caixia), E-mail: cxyuan@sxu.edu.cn; 高巍(GAO Wei), E-mail: sxczygw@hotmail.com

**引文格式:** 高巍, 殷凯越, 王泽晋, 等. 具有双重猝灭机制的高灵敏荧光探针对锌离子的检测[J]. 山西大学学报(自然科学版), 2025, 48(3): 617-625. DOI: 10.13451/j.sxu.ns.2025019.

accompanied by a color change from colorless to yellow. The detection limit for  $Zn^{2+}$  using this probe was determined to be 14.6 nmol/L. Further analysis via Job's Plot experiments and high-performance liquid chromatography revealed that coordination-induced ring opening of the fluorescein moiety and intramolecular elimination of the quenching group facilitated the selective detection of  $Zn^{2+}$ .

**Key words:** background fluorescence; OFF-ON; zinc ion; trace

## 0 引言

锌离子是人体必需微量元素、多种酶的活性中心和激活因子,参与生命系统中的各种生理和病理过程<sup>[1]</sup>。锌离子作为第二信使之一<sup>[2]</sup>,广泛参与动植物的细胞信号转导过程<sup>[3-4]</sup>,同时在免疫功能、细胞稳态、神经功能以及胰岛素分泌等中也发挥着至关重要的作用<sup>[5-8]</sup>。锌离子浓度需要维持在与之相应生理功能相匹配的水平,偏离正常浓度范围可引起多种病理结果。因此合理地摄入锌离子,对维持正常的生理活动,保持人体健康,增强免疫力,促进发育水平都至关重要<sup>[9]</sup>。牡蛎、虾等海产品中含有大量的锌蛋白等生物锌,作为第四代补锌剂逐渐成为补锌最安全有效的锌来源<sup>[10-13]</sup>,各类补锌制剂也被广泛用于成长期儿童以及女性孕期微量锌元素的补充。因此,快速、可靠且兼具高选择性和灵敏度的分析方法对于海产品和补锌制剂中  $Zn^{2+}$  的检测及其在食品安全方面的评价以及锌离子在生理、病理过程中的作用研究是至关重要的。

荧光探针由于其高灵敏度和简单操作在众多检测方法中脱颖而出。大多数  $Zn^{2+}$  荧光探针主要基于含氮氧供体的配体如二-(2-吡啶基)胺 [bis (pyridin-2-ylmethyl) amine, DPA]、N, N'-双(2-吡啶基甲基)-1,2-乙二胺 (N, N-Bis (2-pyridylmethyl) ethylenediamine, BPEA)、N, N, N'-三(吡啶-2-甲基)-1,2-二胺 (N, N-Tri (2-pyridylmethyl) ethylenediamine, TPEA) 等作为锌离子选择性探针的响应基团<sup>[14-16]</sup>。这类探针主要基于光诱导电子(Photo Induced Electron Transfer, PET)机制通过  $Zn^{2+}$  响应前后荧光的 OFF-ON 的转化实现锌离子的检测。这种方法通常由于 PET 的荧光猝灭并不十分完全,导致在锌离子检测或成像分析时不可避免地具有较强的背景荧光,从而降低探针的信噪比,其检出限也通常较高。然而,生命系统中的  $Zn^{2+}$  浓度很低且其浓度具有快速动态变化的特点,因

此目前准确的痕量检测锌离子浓度具有很大的挑战性。

本文基于荧光素母体,设计并合成了一种能够在水环境下特异性检测  $Zn^{2+}$  的低背景荧光探针分子 4,5-双-(2,2'联胺双吡啶)基-,7-二氯-3-(4(二甲氨基)苯基)偶氮苯甲酸酯基荧光素(FL-ZJ)。通过荧光素母体开闭环和荧光猝灭基团的双重猝灭设计,降低了 DPA 作为响应基团的  $Zn^{2+}$  探针的背景荧光,克服了现有方法信噪比低、灵敏度不足的缺点。该探针成功实现了对饮用水、黄海对虾以及雏菊中锌离子的检测及成像分析,具有较高的灵敏度和专一性。

## 1 实验部分

### 1.1 主要仪器与试剂

主要仪器: Bruker Advance-400 型核磁仪(美国,布鲁克·道尔顿公司);U-2910 紫外可见分光光度计(日本, HITACHI);F-4600 荧光光度计(日本, HITACHI);Primaide 高效液相色谱仪(日本, HITACHI)。

主要试剂:2,2'-二吡啶甲基胺购自安耐吉公司;2',7'-二氯荧光素、4-二甲氨基吡啶以及4-二甲胺偶氮苯-4-羧酸购自阿拉丁试剂公司;多聚甲醛以及N,N-二甲基甲酰胺等常规试剂购自国药集团化学试剂有限公司;分析测试试剂选用分析纯(A.R.),合成及分析实验如未特别注释,均在室温下进行。

### 1.2 探针合成

探针 4',5'-双((双(吡啶-2-亚甲基)氨基)甲基)-2',7'-二氯-3'-羟基荧光素缩 4-((4-二甲氨基)苯基)偶氮)苯甲酸(FL-ZJ)按照如图 1 所示路线合成:

#### 1.2.1 FL-DPA 的合成

FL-DPA 参考文献[17]合成。在 100 mL 圆底烧瓶中加入 1.590 0 g (7.99 mmol),2,2'-二吡啶甲基胺,将其溶解于 20 mL 乙腈中,搅拌下继续加入 0.224 0 g (7.47 mmol)多聚甲醛,该混

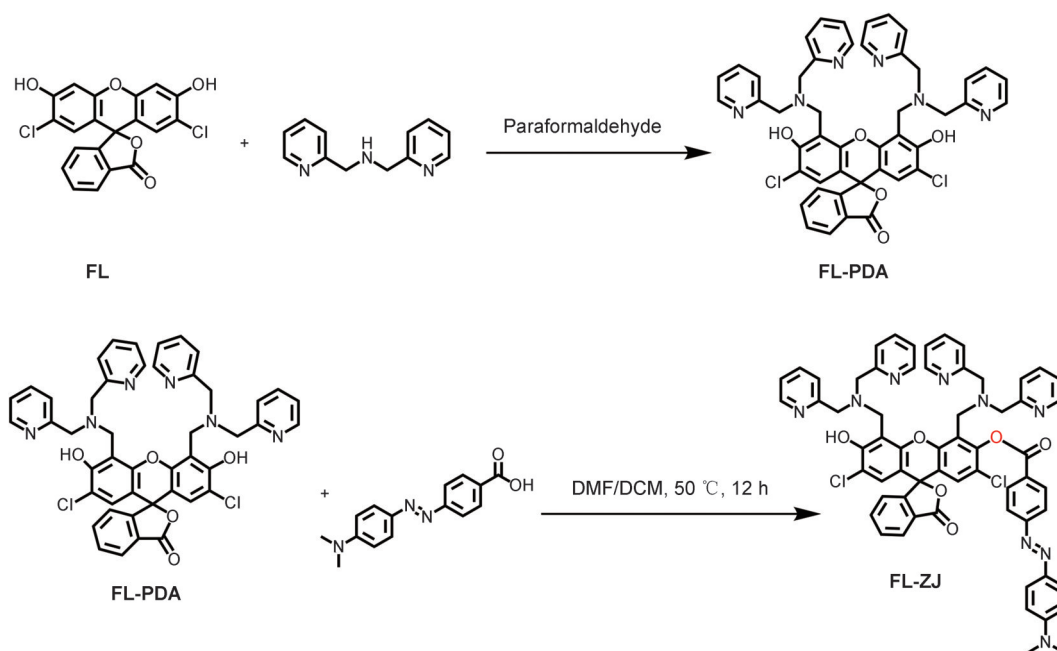


图1 探针FL-ZJ的合成路线

Fig. 1 The synthetic route of FL-ZJ

合溶液 80 °C 回流反应 30 min 后,将溶有起始原料 2',7'-二氯荧光素 (FL) (1.001 0 g, 2.49 mmol) 的 30 mL 乙腈和水的混合溶液 (V/V=1:1) 加入反应体系中,继续回流反应 24 h,薄层监测反应终点,反应结束后冷却至室温,减压浓缩除去乙腈,将剩余溶液加热至 75 °C,并加入 30 mL 的 75 °C 的乙醇,继续搅拌 1.5 h。随后,将溶液置于 -20 °C 的冰箱中静置 12 h,此时溶液底部将生成粉色沉淀。减压抽滤,冰水洗涤滤饼 3 次,烘干,得到粉色固体 1.500 0 g,产率为 38.46%。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, Chloroform-d)  $\delta$  8.60 (d,  $J = 4.8$  Hz, 4H), 8.04 (d,  $J = 7.3$  Hz, 1H), 7.75~7.60 (m, 6H), 7.36 (d,  $J = 7.8$  Hz, 4H), 7.24~7.14 (m, 5H), 6.64 (s, 2H), 4.20 (s, 4H), 4.09~3.92 (m, 8H)。<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, Chloroform-d)  $\delta$  168.98, 157.6, 155.89, 151.60, 148.80, 148.71, 137.22, 135.27, 130.15, 127.70, 127.06, 124.10, 122.52, 117.53, 111.79, 110.01, 83.30, 59.05, 49.15。

### 1.2.2 FL-ZJ 的合成

在 20 mL 圆底烧瓶中加入 0.190 0 g (0.99 mmol) 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐 (EDC)、0.024 5 g (0.20 mmol) 4-二甲氨基吡啶、0.250 0 g (0.93 mmol) 4-二甲胺偶氮苯-4-羧酸 (DABCYL),将这些反应物用 5 mL

二氯甲烷 (DCM) 和 N,N-二甲基甲酰胺 (DMF) 混合液 (DCM 3.4 mL, DMF 1.6 mL) 溶解,50 °C 反应约 12 h,反应完毕后,冷却至室温。再加入 0.336 4 g (0.41 mmol) 中间体 FL-PDA,继续 50 °C 反应 12 h 后,停止反应,冷却至室温。加 DCM 稀释反应体系,蒸馏水洗涤除去多余 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐、4-二甲氨基吡啶,减压蒸除反应溶剂,粗产品经柱色谱 (二氯甲烷:甲醇=15:1) 纯化,得到红色固体 0.076 0 g,产率为 14.26%。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  8.32 (dd,  $J = 15.2, 7.4$  Hz, 7H), 8.06 (d,  $J = 7.5$  Hz, 1H), 7.98 (dd,  $J = 8.6, 2.3$  Hz, 3H), 7.89 (d,  $J = 8.8$  Hz, 4H), 7.80 (t,  $J = 7.5$  Hz, 1H), 7.47 (td,  $J = 9.1, 7.7, 2.6$  Hz, 3H), 7.31 (d,  $J = 8.1$  Hz, 3H), 7.08 (d,  $J = 6.3$  Hz, 4H), 7.01~6.95 (m, 1H), 6.89 (d,  $J = 9.0$  Hz, 4H), 4.42~4.28 (m, 2H), 4.05 (d,  $J = 1.5$  Hz, 2H), 3.82 (s, 8H), 3.11 (s, 6H)。MS (ESI):  $m/z$  calc. for C<sub>61</sub>H<sub>49</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>9</sub>O<sub>6</sub>: 1 073.318 3; found: 1 074.330 4 [M+H]<sup>+</sup>。

### 1.3 探针 FL-ZJ 设计思路

基于 DPA 等配体的 Zn<sup>2+</sup> 荧光探针通常由于荧光猝灭不完全而有较强的背景荧光,难以获得高信噪比的探针分子。本文以,7-二氯荧光

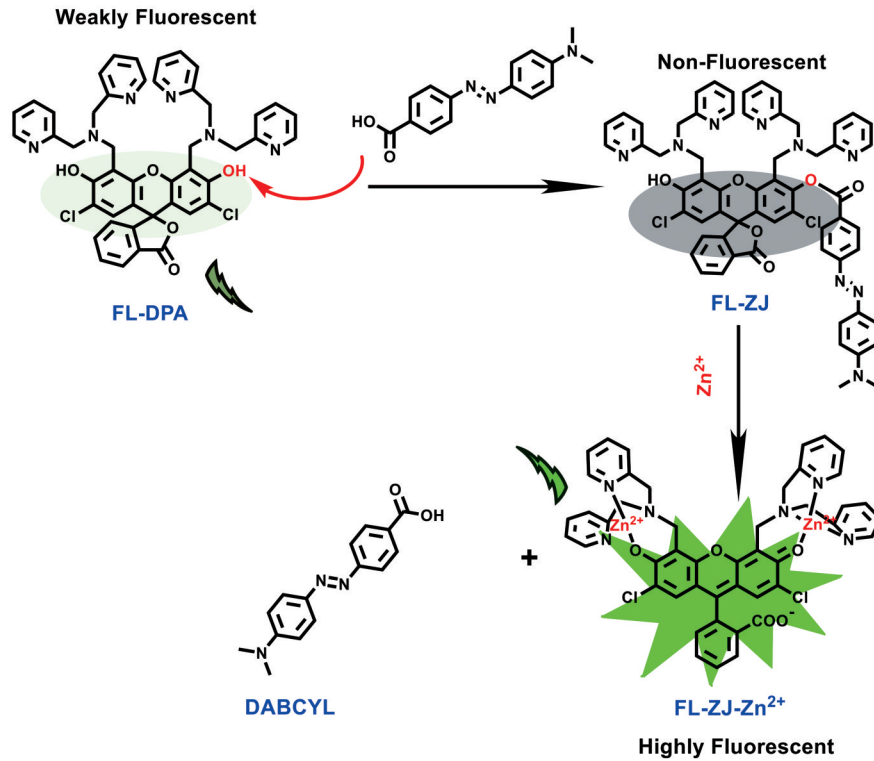


图2 探针FL-ZJ的结构及其对Zn<sup>2+</sup>响应机制

Fig. 2 The structure of FL-ZJ and its detection mechanism towards Zn<sup>2+</sup>

素作为荧光团,通过将荧光素的高效荧光猝灭基团 DABCYL 经酯键引入到探针母体,合成具有猝灭基团自消除-开闭环双重级联控制的 OFF-ON 型锌离子探针,待测离子与探针配位后诱导分子内消除反应,进一步诱导荧光素开环进而释放出荧光(图2)。由于猝灭基团的引入进一步降低背景荧光,使得该探针的检出限低于绝大多数已报道的 Zn<sup>2+</sup> 荧光探针。

#### 1.4 光谱性能测定

将探针 FL-ZJ 溶于二甲基亚砜(DMSO)中,配制成  $1.0 \times 10^{-2}$  mol/L 的储备液,放置于冰箱中储藏备用。选择性实验中,各种阴、阳离子及氨基酸均用去离子水配制成  $1.0 \times 10^{-2}$  mol/L 的储备液。除非特别说明,对 Zn<sup>2+</sup> 的检测均在含有 10% 甲醇的磷酸缓冲液(PB) ( $V_{\text{MeOH}}:V_{\text{PB}} = 1:9$ , 10 mmol/L, pH=8) 中进行。用  $\lambda_{\text{ex}} = 485$  nm 的激发光激发,并收集 500 nm~630 nm 波长的光谱数据。

## 2 结果与讨论

### 2.1 探针 FL-ZJ 对 Zn<sup>2+</sup> 的荧光滴定

将不同浓度的 Zn<sup>2+</sup> 加入含 0.5  $\mu\text{mol/L}$  探针

的缓冲溶液中,室温反应 2 h 后,在 485 nm 的激发波长下进行荧光滴定实验,并采集 500 nm~630 nm 的光谱数据。如图 3(a) 所示,探针在 PB 缓冲液中的几乎没有荧光。随着 Zn<sup>2+</sup> 的逐渐加入,在 526 nm 处的荧光逐渐增强。当 Zn<sup>2+</sup> 的浓度增加到 2.0  $\mu\text{mol/L}$  时,体系的荧光强度约增强了 17.4 倍,表现出了较高的灵敏度。这是因为溶液中的锌离子与探针 FL-ZJ 的 DPA 识别基团络合,并进一步与 3 位羧酸酯上的氧配位,进而诱导猝灭剂 DABCYL 离去,同时荧光素母体开环,荧光恢复。在 0 nmol/L~750 nmol/L 测试范围内,锌离子浓度与 526 nm 处的荧光强度表现出较好的线性关系(图 3(b),  $R^2=0.9944$ )。

### 2.2 探针 FL-ZJ 对 Zn<sup>2+</sup> 响应的选择性研究

为了评价探针分子对锌离子识别的专一性,接下来探究了不同离子对 FL-ZJ 的响应选择性。探针 FL-ZJ 的浓度均为  $5.0 \times 10^{-7}$  mol·L<sup>-1</sup>, Zn<sup>2+</sup> 浓度为  $2.0 \times 10^{-6}$  mol·L<sup>-1</sup>, 其他阴、阳离子及氨基酸的浓度均为  $5 \times 10^{-6}$  mol·L<sup>-1</sup>。配制一系列终浓度为  $5.0 \times 10^{-7}$  mol·L<sup>-1</sup> 的探针 PB-MeOH 溶液 ( $V_{\text{MeOH}}:V_{\text{PB}} = 1:9$ , 10 mmol/L, pH=8), 分别加入终浓度为  $2.0 \times 10^{-6}$  mol·L<sup>-1</sup> 的 Zn<sup>2+</sup>, 或浓度均为

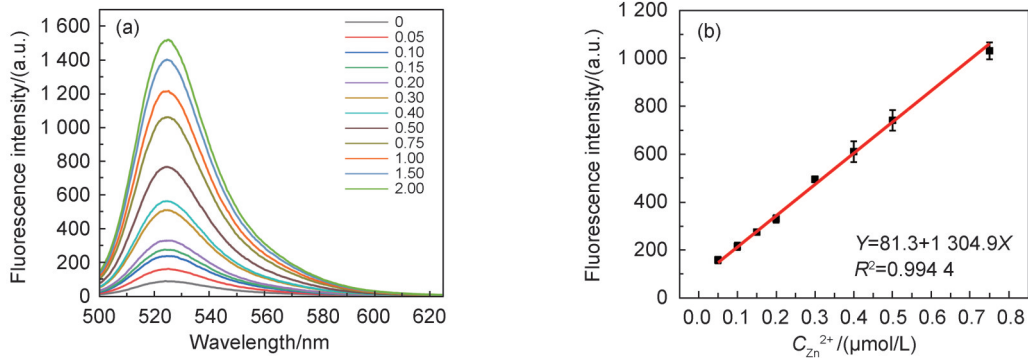


图3 探针FL-ZJ对Zn<sup>2+</sup>的荧光响应

(a)在PB-MeOH(MeOH:VPB = 1:9, 10 mmol/L, pH=8)溶液中不同浓度Zn<sup>2+</sup>(0.00 μmol/L~2.00 μmol/L)对探针FL-ZJ(500 nmol/L)的荧光滴定光谱曲线;(b)探针FL-ZJ(500 nmol/L)对PB-MeOH(MeOH:VPB = 1:9, 10 mmol/L, pH=8)溶液中Zn<sup>2+</sup>(0.00 μmol/L~0.75 μmol/L)的荧光强度(526 nm处)与Zn<sup>2+</sup>浓度的线性关系。

Fig. 3 The fluorescence response of probe FL-ZJ to Zn<sup>2+</sup> ions

(a) The fluorescence titration spectral of probe FL-ZJ (500 nmol/L) to different concentrations of Zn<sup>2+</sup> (0.00–2.00 μmol/L) in PB-MeOH (MeOH:VPB = 1:9, 10 mmol/L, pH=8) solution; (b) Linear relationship between the fluorescence intensities of FL-ZJ (0.50 μmol/L) and Zn<sup>2+</sup> concentrations (0.00 μmol/L–0.75 μmol/L) at 526 nm.

5×10<sup>-6</sup> mol·L<sup>-1</sup>的其他阴、阳离子及氨基酸,摇匀并在室温下反应2 h后,用λ<sub>ex</sub> = 485 nm的激发光激发,并收集在526 nm波长的光谱数据。结果如图4所示,FL-ZJ对Zn<sup>2+</sup>表现出较好的选择性,其他离子几乎对其不会产生干扰。

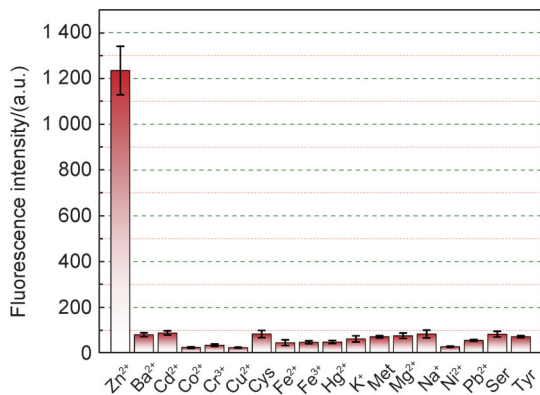


图4 探针FL-ZJ(0.50 μmol/L)对Zn<sup>2+</sup>(2.00 μmol/L)、各种金属离子和氨基酸的荧光响应(526 nm处,金属离子和氨基酸浓度均为5.00 μmol/L)

Fig. 4 Fluorescence response of FL-ZJ (0.50 μmol/L) to Zn<sup>2+</sup> (2.00 μmol/L), various ions and amino acids (5.00 μmol/L) at 526 nm

### 2.3 探针FL-ZJ对Zn<sup>2+</sup>响应的Job's Plot实验

分别移取探针FL-ZJ母液和Zn<sup>2+</sup>溶液于1 mL的PB缓冲液中,保持探针FL-ZJ和Zn<sup>2+</sup>的总浓度为5.00 μmol/L,且[FL-ZJ]/[FL-ZJ+Zn<sup>2+</sup>]比在0.0~1.0范围变化,记录体系在526 nm处的荧光强度,结果如图5所示。随着

探针FL-ZJ与Zn<sup>2+</sup>比例的逐渐变化,体系在526 nm处的荧光强度也随之发生变化。当探针[FL-ZJ]/[FL-ZJ+Zn<sup>2+</sup>]为0.5,即探针分子与锌离子的比例为1:1时,荧光强度达到最高值,这意味着Zn<sup>2+</sup>优先与含有DABCYL基团一侧的DPA基团结合并进一步与FL-ZJ中的酯键O配位,伴随着猝灭剂DABCYL离去,进而开启荧光。当探针FL-ZJ与Zn<sup>2+</sup>以1:1的比例结合时,DABCYL全部离去,使整个体系荧光恢复呈现最大值,则更多的Zn<sup>2+</sup>与探针配位,荧光不再恢复。

### 2.4 探针FL-ZJ对Zn<sup>2+</sup>的响应机制推测

进一步探索了探针FL-ZJ对Zn<sup>2+</sup>识别的荧光响应机制,分别将反应原料DABCYL、FLDPA、探

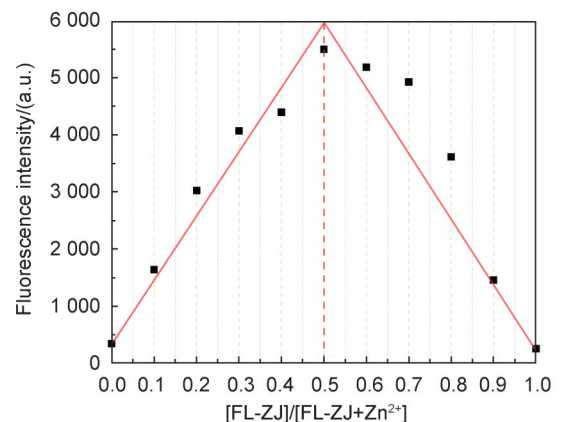
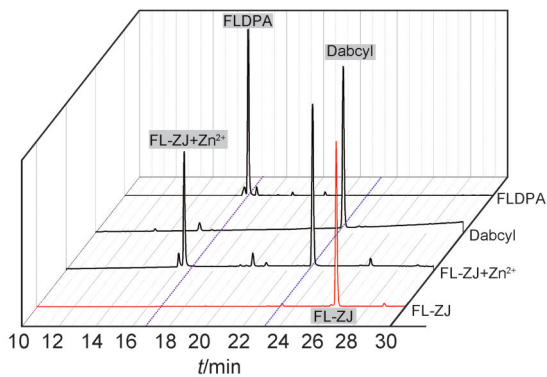


图5 探针FL-ZJ对Zn<sup>2+</sup>的Job's Plot工作曲线

Fig. 5 Job's plot of probe FL-ZJ and Zn<sup>2+</sup> in PB buffer solution

针 FL-ZJ 以及探针 FL-ZJ 与  $Zn^{2+}$  反应 2 h 后的反应体系,吸取 50  $\mu\text{L}$  进样到高效液相色谱仪中,监测 490 nm 通道的色谱流出曲线,结果如图 6 所示。FL-ZJ 与锌离子反应后能够监测到体系解离出的猝灭基团 DABCYL,结合 Job's plot 结果,可以推断探针对锌离子的响应经历了锌离子与猝灭基团一侧 DPA 结合所诱导的分子内消除反应,进而游离出原料 DABCYL 基团, $Zn^{2+}$  与探针形成 1:1 的配合物同时伴随着荧光素母体的开环,探针荧光得以开启。



注:probe FL-ZJ and  $Zn^{2+}$ 。

图 6 原料 DABCYL、FLDPA 和探针 FL-ZJ 及  $Zn^{2+}$  反应体系的色谱流出曲线

Fig. 6 Chromatographic efflux curves of raw materials DABCYL, FLDPA and the reaction systems between

## 2.5 探针 FL-ZJ 在锌离子检测中的应用

### 2.5.1 水样中锌离子的测定

用娃哈哈纯净水溶解  $Zn^{2+}$ , 配制母液为  $10^{-2}$  mol/L, 研究探针 FL-ZJ 检测  $Zn^{2+}$  的可行性。在 FL-ZJ ( $5.00 \mu\text{mol/L}$ ) 的 2 000  $\mu\text{L}$  PBS 缓冲液 ( $\text{pH}=9.0$ ) 体系中,依次加入  $1.00 \mu\text{mol/L}$ ,  $1.50 \mu\text{mol/L}$ ,  $2.00 \mu\text{mol/L}$ ,  $3.00 \mu\text{mol/L}$ ,  $4.00 \mu\text{mol/L}$   $Zn^{2+}$ , 测定 FL-ZJ 在 526 nm 处的荧光强度。测定结果如表 1 所示。实际水样中  $Zn^{2+}$  的加标回收率为  $99.4\% \sim 106.5\%$ , 表明本文所合成的锌离子荧光探针具有良好的准确度,可以用于环境水样中的  $Zn^{2+}$  检测。

### 2.5.2 黄海对虾中锌离子的测定

虾剥壳清洗,搅碎,蒸干,粉碎,称取 30 g 用纯净水溶解,离心取上清并定容至 500 mL 容量瓶,吸取 20  $\mu\text{L}$  加入探针溶液进行荧光测定,用荧光光度计读数。从表 2 中可以得出,黄海对虾中锌的含量为  $(1.87 \pm 0.09)$  mg/100 g,这一结果与张

表 1 水样中探针 FL-ZJ 对  $Zn^{2+}$  的测定

Table 1 Response data of probe FL-ZJ to  $Zn^{2+}$  in purified waters ( $n=3$ )

Sample	Added/ ( $\mu\text{mol/L}$ )	Detected/ ( $\mu\text{mol/L}$ )	Recovery /%
Purified water	0.0	$0.02 \pm 0.003$	107.4
	1.0	$1.06 \pm 0.02$	106.4
	1.5	$1.51 \pm 0.01$	100.5
	2.0	$2.06 \pm 0.02$	10.1
	3.0	$3.18 \pm 0.01$	105.8
	4.0	$3.98 \pm 0.01$	99.4

一华对哈氏仿对虾、南美白对虾和日本沼虾中锌离子的测试结果接近<sup>[18]</sup>。由此可见,探针 FL-ZJ 能够用于检测虾中锌的含量具有可行性。

表 2 探针 FL-ZJ 对黄海对虾中  $Zn^{2+}$  含量的测定 ( $n=3$ )

Table 2 Determination of  $Zn^{2+}$  content in Penaeus huanghaiensis by probe FL-ZJ

样品	荧光 强度值 /(a.u.)	荧光 强度值 /(a.u.)	荧光 强度值 /(a.u.)	荧光强度 平均值 /(a.u.)	荧光测定 浓度值
黄海 对虾	75.24	77.78	77.68	$75.23 \pm 1.45$	$(1.87 \pm 0.09)$ mg/100g

### 2.5.3 雏菊花瓣中锌离子成像

取三支同株缔结的白色小雏菊,分别浸泡在  $0 \text{ mol/L}$ ,  $5 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ ,  $1 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$  的  $Zn^{2+}$  溶液中 48 h,瓶底放入少量小米提供养分。将  $1 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$  探针溶液盛装到 30 mL 的喷壶中,在每朵花上均匀喷洒 2 mL  $100 \mu\text{mol/L}$  的探针,用 365 nm 的紫外灯进行照射,观察其荧光及明场情况。

随培养液中锌离子浓度的加大,小雏菊的白色花瓣颜色变深(图 7(a)),花瓣颜色与培养液浓度正相关。这意味着,在含高浓度  $Zn^{2+}$  的培养液中的雏菊有更多的锌离子被运输到花瓣中。同时,如图 7(b)所示,在 365 nm 紫外光照射下,浸泡在不同浓度  $Zn^{2+}$  的培养液中的雏菊花瓣荧光强度随着  $Zn^{2+}$  含量的增加也相应地增强。这些结果表明,本文开发出的探针 FL-ZJ 可以在植物样品中实现  $Zn^{2+}$  含量的原位检测。

### 2.6 探针 FL-ZJ 与已报道锌离子探针比较

DPA 基团作为锌离子特异性螯合基团,由于其优异的选择性被广泛用于锌离子荧光探针的开发。在表 3 中,我们将本工作与部分已报

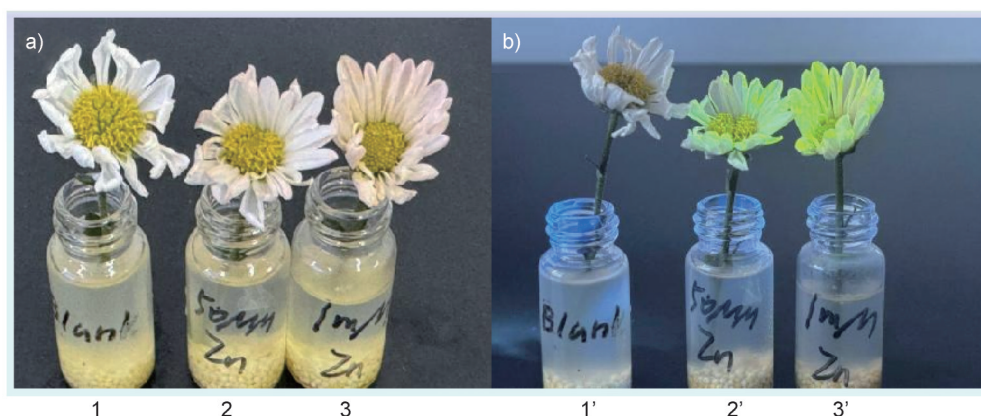


图7 雏菊花瓣中锌离子成像

(a) 探针 FL-ZJ (100.00  $\mu\text{mol/L}$ ) 处理后, 雏菊花瓣颜色随  $\text{Zn}^{2+}$  浓度的变化 (0.00  $\mu\text{mol/L}$  (1)、50.00  $\mu\text{mol/L}$  (2)、1 000.00  $\mu\text{mol/L}$  (3)); (b) 探针 FL-ZJ (100.00  $\mu\text{mol/L}$ ) 处理后, 254 nm 紫外光源照射下雏菊花瓣荧光随  $\text{Zn}^{2+}$  浓度的变化 (0.00  $\mu\text{mol/L}$  (1'), 50.00  $\mu\text{mol/L}$  (2'), 1 000.00  $\mu\text{mol/L}$  (3'))。

Fig. 7 Imaging of  $\text{Zn}^{2+}$  distribution in daisy petals

(a) Color changes in daisy petals following treatment with the probe FL-ZJ (100.00  $\mu\text{mol/L}$ ) at varying  $\text{Zn}^{2+}$  concentrations (0.00  $\mu\text{mol/L}$  (1), 50.00  $\mu\text{mol/L}$  (2), 1 000.00  $\mu\text{mol/L}$  (3)); (b) Fluorescence changes in daisy petals under 254 nm ultraviolet light after treatment with the probe FL-ZJ (100.00  $\mu\text{mol/L}$ ) at varying  $\text{Zn}^{2+}$  concentrations (0.00  $\mu\text{mol/L}$  (1'), 50.00  $\mu\text{mol/L}$  (2'), 1 000.00  $\mu\text{mol/L}$  (3')).

道的基于 DPA 的锌离子探针进行对比发现, 由于 FL-ZJ 探针中不仅存在 DPA 识别基团, 同时还引入了强荧光猝灭基团 DABCYL, 从而使其在锌离子检测中形成双猝灭机制, 所以相较于已报道的工作, FL-ZJ 对锌离子表现出更好的特异性和更低的检出限。

### 3 结论

综上所述, 本文合成了一种以荧光素为母体, DPA 基团为识别基团, 通过荧光素开闭环及猝灭剂 DABCYL 双重猝灭机制调控的 OFF-ON 型  $\text{Zn}^{2+}$  荧光探针 FL-ZJ。通过锌离子配位

表3 FL-ZJ 与已报道的基于 DPA 的锌离子探针性能比较

Table 3 The comparison of  $\text{Zn}^{2+}$  detection performance among FL-ZJ and other reported probes based on DPA in the literature

Probe	$\lambda_{\text{ex,max}}$ /nm	$\lambda_{\text{em,max}}$ /nm	LOD /(nmol·L <sup>-1</sup> )	Reaction media	Ref.	Probe	$\lambda_{\text{ex,max}}$ /nm	$\lambda_{\text{em,max}}$ /nm	LOD /(nmol·L <sup>-1</sup> )	Reaction media	Ref.
	400	542	600	HEPES buffer	[16]		488	561	320	Tris-HCl buffer	[22]
	450	451	2500	DMF:H <sub>2</sub> O (2:8, V/V)	[19]		450	540	54.5	EtOH:H <sub>2</sub> O (3:1, V/V) pH 6~8	[23]
	350	438	107	HEPES buffer	[20]		475	660	106	DMSO:H <sub>2</sub> O (1:1, V/V)	[24]
	532	710	170	ACN:H <sub>2</sub> O (1:9, V/V)	[21]		485	526	14.6	MeOH:H <sub>2</sub> O (1:9, V/V)	This work

所诱导的开环及猝灭剂 DABCYL 的分子内消除反应,在 485 nm 激发光的激发下该探针在 526 nm 处的荧光强度与锌离子浓度表现出强的正相关性,在 0.00  $\mu\text{mol/L}$ ~2.00  $\mu\text{mol/L}$  的浓度范围内线性相关。基于该探针,本文实现了饮用水及对虾中锌离子含量的定量测定,同时实现了植物花瓣对环境中的锌离子的吸收情况的成像和分析。该探针与已报道的基于 DPA 识别基团的荧光探针相比,在较低的检出限方面表现出一定的优势,可为在生命体系中痕量锌离子的检测和成像提供支持 and 依据。

### 参考文献:

- [1] VALLEE B L, FALCHUK K H. The Biochemical Basis of Zinc Physiology[J]. *Physiol Rev*, 1993, **73**(1): 79–118. DOI:10.1152/physrev.1993.73.1.79.
- [2] YAMASAKI S, SAKATA-SOGAWA K, HASEGAWA A, *et al.* Zinc Is a Novel Intracellular Second Messenger [J]. *J Cell Biol*, 2007, **177**(4): 637–645. DOI: 10.1083/jcb.200702081.
- [3] LIN J S, BJØRCK P K, KOLTE M V, *et al.* Zinc Mediates Control of Nitrogen Fixation *via* Transcription Factor Filamentation[J]. *Nature*, 2024, **631**(8019): 164–169. DOI:10.1038/s41586-024-07607-6.
- [4] QIAO L J, SUZAKI T, LIANG P B. Zinc Sensing in Nodules Regulates Symbiotic Nitrogen Fixation[J]. *Nat Plants*, 2024, **10**(8): 1153–1154. DOI: 10.1038/s41477-024-01758-0.
- [5] CHEN X, MA D Y, ZHANG D Y, *et al.* A Selective and Reversible Fluorescent Probe for  $\text{Zn}^{2+}$  Detection in Living Cells[J]. *ChemistrySelect*, 2020, **5**(13): 4017–4027. DOI:10.1002/slct.202000662.
- [6] SANTHAKUMAR H, NAIR R V, PHILIPS D S, *et al.* Real Time Imaging and Dynamics of Hippocampal  $\text{Zn}^{2+}$  under Epileptic Condition Using a Ratiometric Fluorescent Probe[J]. *Sci Rep*, 2018, **8**: 9069. DOI: 10.1038/s41598-018-27029-5.
- [7] DIVYA K P, SREEJITH S, ASHOKKUMAR P, *et al.* A Ratiometric Fluorescent Molecular Probe with Enhanced Two-photon Response Upon  $\text{Zn}^{2+}$  Binding for *in vitro* and *in vivo* Bioimaging[J]. *Chem Sci*, 2014, **5**(9): 3469–3474. DOI:10.1039/C4SC00736K.
- [8] FREDERICKSON C J, KOH J Y, BUSH A I. The Neurobiology of Zinc in Health and Disease[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2005, **6**(6): 449–462. DOI:10.1038/nrn1671.
- [9] BROWN KENNETH H, RIVERA JUAN A, ZULFIQAR B, *et al.* International Zinc Nutrition Consultative Group (IZiNCG) Technical Document #1. Assessment of the Risk of Zinc Deficiency in Populations and Options for Its Control[J]. *Food Nutr Bull*, 2004, **25** (1\_suppl2): S99–203.
- [10] LIU X Y, WANG Z X, ZHANG J, *et al.* Isolation and Identification of Zinc-chelating Peptides from Sea Cucumber (*Stichopus japonicus*) Protein Hydrolysate[J]. *J Sci Food Agric*, 2019, **99**(14): 6400–6407. DOI:10.1002/jsfa.9919.
- [11] ZHANG Z R, ZHOU F B, LIU X L, *et al.* Particulate Nanocomposite from Oyster (*Crassostrea rivularis*) Hydrolysates *via* Zinc Chelation Improves Zinc Solubility and Peptide Activity[J]. *Food Chem*, 2018, **258**: 269–277. DOI:10.1016/j.foodchem.2018.03.030.
- [12] WANG Z Y, CHENG S Z, WU D, *et al.* Hydrophobic Peptides from Oyster Protein Hydrolysates Show Better Zinc-chelating Ability[J]. *Food Biosci*, 2021, **41**: 100985. DOI:10.1016/j.fbio.2021.100985.
- [13] FREITAS E P S, CUNHA A T O, AQUINO S L S, *et al.* Zinc Status Biomarkers and Cardiometabolic Risk Factors in Metabolic Syndrome: a Case Control Study[J]. *Nutrients*, 2017, **9**(2): 175. DOI:10.3390/nu9020175.
- [14] LIU Q Y, YU Y C, WU M Y, *et al.* Synthesis and Application of a Dual-functional Fluorescent Probe for Sequential Recognition of  $\text{Zn}^{2+}$  and Glyphosate[J]. *Spectrochim Acta Part A Mol Biomol Spectrosc*, 2023, **303**: 123221. DOI:10.1016/j.saa.2023.123221.
- [15] YAN L Q, YANG H, LI J, *et al.* A near Infrared Fluorescent Probe for Detection and Bioimaging of Zinc Ions and Hypochlorous Acid[J]. *Anal Chim Acta*, 2022, **1206**: 339750. DOI:10.1016/j.aca.2022.339750.
- [16] THOMAS A, NAIR A, CHAKRABORTY S, *et al.* A Pyridinium Fluorophore for the Detection of Zinc Ions under Autophagy Conditions[J]. *J Photochem Photobiol B*, 2024, **259**: 113006. DOI: 10.1016/j.jphoto-biol.2024.113006.
- [17] BURDETTE S C, WALKUP G K, SPINGLER B, *et al.* Fluorescent Sensors for  $\text{Zn}^{2+}$  Based on a Fluorescein Platform: Synthesis, Properties and Intracellular Distribution[J]. *J Am Chem Soc*, 2001, **123**(32): 7831–7841. DOI:10.1021/ja010059l.
- [18] 张一华. 哈氏仿对虾、南美白对虾和日本沼虾营养与滋味的比较分析[D]. 上海: 上海海洋大学, 2014.
- [19] ZHANG Y H. Comparative Analysis of Nutrition and Taste of *Penaeus Harveyi*, *Penaeus Vannamei* and *Macrobrachium Nipponense*[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2014.
- [19] HAMZI I, TOUATI Y, MOSTEFA-KARA B. Benzil

- Bis-hydrazone Based Fluorescence 'Turn-on' Sensor for Highly Sensitive and Selective Detection of Zn(II) Ions [J]. *J Fluoresc*, 2023, **33**(5): 1683–1693. DOI:10.1007/s10895-023-03178-3.
- [20] AHMAD T, ABDEL-AZEIM S, KHAN S, *et al.* Turn-on Fluorescent Sensors for Nanomolar Detection of Zinc Ions: Synthesis, Properties and DFT Studies[J]. *J Taiwan Inst Chem Eng*, 2022, **139**: 104507. DOI:10.1016/j.jtice.2022.104507.
- [21] ZHANG C B, GAO R K, ZHANG L L, *et al.* Design and Synthesis of a Ratiometric Photoacoustic Probe for in Situ Imaging of Zinc Ions in Deep Tissue in Vivo[J]. *Anal Chem*, 2020, **92**(9): 6382–6390. DOI:10.1021/acs.analchem.9b05431.
- [22] WANG X, BAI X Y, SU D, *et al.* Simultaneous Fluorescence Imaging Reveals *N*-methyl-d-aspartic Acid Receptor Dependent Zn<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> Flux in the Brains of Mice with Depression[J]. *Anal Chem*, 2020, **92**(5): 4101–4107. DOI:10.1021/acs.analchem.9b05771.
- [23] FANG H B, GENG S S, HAO M G, *et al.* Simultaneous Zn<sup>2+</sup> Tracking in Multiple Organelles Using Super-resolution Morphology-correlated Organelle Identification in Living Cells[J]. *Nat Commun*, 2021, **12**(1): 109. DOI:10.1038/s41467-020-20309-7.
- [24] FENG J, LI J Z, MAO X M, *et al.* Real-time Detection and Imaging of Exogenous and Endogenous Zn<sup>2+</sup> in the PC12 Cell Model of Depression with a NIR Fluorescent Probe[J]. *Analyst*, 2021, **146**(12): 3971–3976. DOI:10.1039/d1an00508a.