新型席夫碱高灵敏荧光探针用于 Al^{3+} 的测定

侯玲杰, 葛金印, 孔祥宇, 董川, 双少敏*, 王煜*

山西大学化学化工学院, 环境科学研究所, 太原 030006

*通讯作者: smshuang@sxu.edu.cn; wangyu1168@sxu.edu.cn

收稿日期: 2017-03-10; 接受日期: 2017-05-22; 网络版发表日期: 2017-07-18

国家自然科学基金(编号: 21475080)和山西省自然科学基金(编号: 2013011040-6)资助项目

摘要 本文报道了一种新型席夫碱8-羟基-久洛尼定-(2-吡啶)脒(L)的荧光探针, 并用于识别检测 Al^{3+} . 探针L与 Al^{3+} 络合使溶液颜色由淡黄色变为黄色, 同时在480 nm处荧光显著增强, 可实现 Al^{3+} 的选择性识别检测, 检测限为 8.22×10^{-8} M. 通过等摩尔连续变化法测定及质谱表征, L与 Al^{3+} 形成1:1的络合物, 核磁共振光谱进一步确定L与 Al^{3+} 的结合模式, 为探针L应用于离子传感器研制奠定了理论基础.

关键词 荧光探针, 席夫碱, 铝离子

1 引言

铝在地壳中的含量仅次于氧元素和硅元素, 是地壳中含量最多的金属元素, 被广泛应用于各种产品的制造中, 如食品包装、餐饮器具、制酸剂、除臭剂及汽车制造业等. 然而, 过量的铝会抑制植物的生长, 人体内铝含量过高可能会损伤人体神经系统, 引起阿尔兹海默症、帕金森、肌萎缩性脊髓侧索硬化症等疾病^[1]. 因此, 在自然环境及生物体中定量检测 Al^{3+} 是十分必要的. 相比于其他检测方法, 荧光法由于具有灵敏度高、选择性好等优点而受到广泛关注^[2]. 目前主要有4类荧光团被广泛应用于 Al^{3+} 荧光探针检测的研究: 蔡类^[3-7]、氟硼二吡咯(BODIPY)类^[8-10]、香豆素类^[11-14]及罗丹明类^[15-19], 其中蔡类荧光探针合成较为简单, 然而, 其通常荧光寿命短、发射波长较短^[20,21]; 罗丹明、香豆素、BODIPY类通常具有高的荧光量子产率与稳定的光物理性质, 但这些探针多存在合成方法冗长繁琐等问题^[8-19]. 因此, 研制合成简便、发光性

能优良的荧光探针用于 Al^{3+} 的检测仍是一项富有挑战性的工作.

本文通过8-羟基久洛尼定-9-甲醛与2-胍吡啶一步缩合反应, 合成了一个新型的席夫碱荧光探针8-羟基-久洛尼定-(2-吡啶)脒(L). 探针L上的N、O原子可以为 Al^{3+} 提供络合位点, Al^{3+} 与C=N双键上的N原子络合后会抑制分子异构化, 同时增加分子平面刚性^[22,23], 引起颜色及光谱变化, 实现对 Al^{3+} 的检测, 为拓展其在传感器研制方面的应用奠定基础.

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

8-羟基久洛尼定-9-甲醛(96%, 梯希爱, 中国); 2-胍吡啶(96%, 安耐吉, 中国); 其他试剂均为分析纯, 无需进一步纯化; 金属离子为相应的硝酸盐配制得到, 实验用水为二次水.

引用格式: 侯玲杰, 葛金印, 孔祥宇, 董川, 双少敏, 王煜. 新型席夫碱高灵敏荧光探针用于 Al^{3+} 的测定. 中国科学: 化学, 2017, 47: 1000-1006
Hou L, Ge J, Kong X, Dong C, Shuang S, Wang Y. A novel highly sensitive fluorescent probe based on Schiff base for Al^{3+} . *Sci Sin Chim*, 2017, 47: 1000-1006, doi: 10.1360/N032017-00046

紫外可见分光光度计(U-2910, 日立, 日本); 荧光光谱仪(LS-55, PerkinElmer, 美国), 激发波长为432 nm, 激发和发射狭缝分别为7和5 nm; 核磁共振仪(DRX-600, Fällenden, 瑞士); 高效液相质谱仪(Bruker micrOTOF-Q III, 德国); 奥林巴斯共聚焦显微镜(FV1000, Olympus, 日本).

2.2 探针L的合成

探针8-羟基-久洛尼定-(2-吡啶)脒(L)的合成路线如图1所示. 将0.11 g (0.5 mmol) 8-羟基久洛尼定-9-甲醛和0.082 g (0.75 mmol) 2-肼吡啶溶于6 mL甲醇中, 加热至65°C回流3 h后, 冷却至室温有固体析出, 抽滤, 用少量甲醇洗涤后得到橙色固体L (0.049 g, 产率为32%). 核磁共振氢谱(^1H NMR) (DMSO- d_6) δ : 11.21 (s, 1H, -OH), 10.59 (s, 1H, -NH), 8.12 (d, 1H, ArH), 8.01 (s, 1H, -HC=N), 7.63 (t, 1H, ArH), 6.78 (d, 1H, ArH), 6.73 (t, 1H, ArH), 6.66 (s, 1H, ArH), 3.15 (m, 4H, -CH₂), 2.62 (m, 4H, -CH₂), 1.86 (m, 4H, -CH₂). 核磁共振碳谱(^{13}C NMR) (DMSO- d_6): 156.49, 153.80, 148.53, 144.69, 144.63, 138.50, 127.68, 114.86, 112.84, 107.30, 106.98, 105.82, 49.79, 49.31, 26.99, 22.09, 21.33, 20.81. HRMS (ESI): calcd. for C₁₈H₂₁N₄O 309.17 (L+H), found: 309.20.

2.3 光谱性质的测定方法

将L溶于甲醇中, 制得 1×10^{-3} M的储备液, 配置 10^{-2} M的金属离子储备液用于金属离子选择性测定. 将储备液进一步稀释至合适的浓度, 用于荧光检测. 检测体系为CH₃OH:H₂O=49:1 (v/v). 荧光滴定实验过程为: 取25 μL 的L储备液于比色管中, 加入相应体积的 1.25×10^{-3} M的Al³⁺储备液, 并加入二次水, 使水的总体积为100 μL , 用CH₃OH定容至5 mL, 摇匀后用于荧光光谱的测定. 紫外吸收滴定实验: 移取50 μL 的L储备液于比色管中, 加入相应体积的 10^{-2} M的Al³⁺储备液, 并加入二次水, 使水的总体积为100 μL , 然后用CH₃OH定容至5 mL, 摇匀后用于紫外可见光谱的测定.

图1 L的合成路线

2.4 细胞实验

首先将肝癌细胞BEL-7402培养在含10%的胎牛血清1640培养基中, 置于37°C, 含5% CO₂的培养箱中. 然后将BEL-7402细胞接种在培养皿中使其贴壁24 h后, 除去未贴壁细胞. 在培养皿中加入10 μM 的探针培养20 min后, 用干净的培养基轻轻清洗细胞3次, 除去培养基中过量的未进入细胞的探针, 在共聚焦显微镜下成像(λ_{ex} =405 nm, 40倍目镜). 之后继续加入20 μM 的Al³⁺培养20 min后进行荧光成像.

3 结果与讨论

3.1 Al³⁺对L紫外可见光谱的影响

在CH₃OH:H₂O=49:1 (v/v)体系中测定了不同浓度Al³⁺对探针L的紫外吸收光谱的影响. 如图2所示, 探针L在370 nm处有一个明显的吸收峰. 随着Al³⁺的加入, 370 nm处的吸收峰强度逐渐降低, 而在426 nm处逐渐出现一个新的吸收峰, 同时在390 nm处出现一个明显的等吸收点, 初步推测探针L与Al³⁺形成了络合物. 伴随着吸收光谱的变化, 加入Al³⁺后, 溶液的颜色由淡黄色变为黄色, 从而可以实现对Al³⁺的裸眼识别. 紫外吸收光谱的红移可能是由于Al³⁺与L的N、O原子络合后, 增加了分子的平面刚性, 并增加了体系的共轭程度.

3.2 探针L对Al³⁺的荧光响应

如图3所示, 由于探针L本身存在C=N异构化, 造成能量损失, 所以在CH₃OH:H₂O=49:1 (v/v)体系中荧光

图2 Al³⁺浓度对探针L紫外吸收光谱的影响([L]= 1×10^{-5} M, [Al³⁺]=0~ 12×10^{-5} M) (网络版彩图)

图3 (a) Al^{3+} 浓度对探针L荧光光谱的影响; (b) Al^{3+} 浓度对体系480 nm处荧光强度的影响 ($[\text{L}]=5\times 10^{-6} \text{ M}$, $[\text{Al}^{3+}]=0\sim 25\times 10^{-6} \text{ M}$) (网络版彩图)

微弱. 但是随着 Al^{3+} 的加入, 探针在480 nm处的荧光强度显著增强. 这是由于加入 Al^{3+} 后, Al^{3+} 与探针分子中的Schiff碱N原子、酚-OH以及吡啶环上的N原子发生络合, 抑制了 $\text{C}=\text{N}$ 双键的异构化, 同时增加了分子的平面刚性, 从而使体系荧光显著增强, 即产生螯合荧光增强作用(CHEF)^[22,23].

如图4所示, 体系在480 nm处的荧光强度 $I_{480\text{nm}}$ 与 Al^{3+} 的浓度在 $1.25\times 10^{-6}\sim 10.00\times 10^{-6} \text{ M}$ 的范围内呈现良好的线性关系($R^2=0.9875$). 由此可以实现探针L对 Al^{3+} 的定量检测, 检测限为 $8.22\times 10^{-8} \text{ M}$ (信噪比为3:1)^[11,12]. 当体系中 $[\text{Al}^{3+}]$ 为 $5\times 10^{-6} \text{ M}$ 时, 5次重复测定的相对标准偏差为1.96%, 说明L对 Al^{3+} 的检测有较好的重复性.

3.3 探针L对 Al^{3+} 测定的选择性

实验考察了探针L对 Al^{3+} 测定的选择性, 结果如

图4 荧光强度与 Al^{3+} 浓度的线性关系图 ($[\text{L}]=5\times 10^{-6} \text{ M}$) (网络版彩图)

图5所示. 在含有 $5 \mu\text{M}$ 探针L的 $\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}=49:1$ (v/v)溶液中加入等量的 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Na^+ 、 Mg^{2+} 、 Al^{3+} 、 Zn^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Cd^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Cr^{3+} 、 Co^{2+} 、 In^{3+} 离子, 只有 Al^{3+} 使体系的荧光显著增强, 说明探针L对 Al^{3+} 具有很好的选择性.

3.4 探针L与 Al^{3+} 结合模式的探究

紫外吸收光谱与荧光光谱均显示L与 Al^{3+} 形成了络合物. 为了确定L与 Al^{3+} 的结合模式, 通过等摩尔连续变化法测定了 Al^{3+} 与L的结合比^[24]. 固定L与 Al^{3+} 的总浓度为 $2\times 10^{-5} \text{ M}$, 改变L与铝离子的组成比例, 检测体系在426 nm处紫外吸光度的变化. 结果如图6(a)所示, 当L和 Al^{3+} 的浓度比为1:1时, 体系的吸光度出现转折点, 说明L与 Al^{3+} 的结合比为1:1. 通过质谱进一步证明了此结论. 如图7所示, 峰值 m/z 372.10为 $\text{L}+\text{Al}^{3+}+2\text{H}_2\text{O}$ [calcd, m/z : 371.17], 说明L与 Al^{3+} 1:1络合. 如图6(b)所

图5 不同金属离子对L荧光光谱的影响 ($[\text{L}]=5\times 10^{-6} \text{ M}$, $[\text{Al}^{3+}]=[\text{M}^{n+}]=25\times 10^{-6} \text{ M}$) (网络版彩图)

图 6 (a) **L**与 Al^{3+} 结合比的测定($[\text{L}]+[\text{Al}^{3+}]=2\times 10^{-5}\text{ M}$); (b) **L**与 Al^{3+} 结合常数的测定(网络版彩图)

图 7 **L**+ Al^{3+} 质谱图(网络版彩图)

示为荧光强度与 Al^{3+} 浓度的双倒数曲线, 图中显示荧光强度的倒数与 Al^{3+} 浓度的倒数呈良好的线性关系, 进一步证明结合比为1:1. 利用Benesi-Hildebrand方程^[11,12], 计算出**L**与 Al^{3+} 的结合常数为 $1.07\times 10^5\text{ M}^{-1}$.

为了进一步探究**L**与 Al^{3+} 的结合模式, 以 $\text{DMSO}-d_6$ 为溶剂, 通过核磁实验进行了考察. 如图8所示, 随着 Al^{3+} 的加入, **L**中 H_1 与 H_2 的峰信号变宽, H_8 向高场移动了0.0032 ppm, H_3 向低场移动了0.0041 ppm. 此外, 吡啶环上的 H_5 - H_7 也都向低场移动, 从而可以推测, **L**分子中的羟基氧原子、亚氨基氮原子以及吡啶氮原子参与了与铝离子的络合配位. 根据以上实验结果, 推断**L**与 Al^{3+} 的结合模式如图9所示. Al^{3+} 与**L**络合后, 抑制了 $\text{C}=\text{N}$ 双键的异构化, 同时增加了分子的平面刚性, 从而使体系荧光显著增强.

3.5 细胞成像

以肝癌细胞BEL-7402为细胞模型, 通过荧光共聚

图 8 Al^{3+} 对探针**L**核磁的影响. (a) **L**; (b) **L**+1 equiv. Al^{3+} (网络版彩图)

图 9 **L**和 Al^{3+} 的结合模式图(网络版彩图)

焦成像技术考察了**L**与 Al^{3+} 在细胞环境中的相互作用, 结果如图10所示. 在细胞中加入**L** ($10\text{ }\mu\text{M}$)培养20 min后, 没有荧光产生. 继续加入 $20\text{ }\mu\text{M}$ Al^{3+} 培养20 min, 可以观察到绿色荧光. 同时, 整个实验过程中细胞形态较好, 说明探针**L**的细胞毒性较小. 因此, 探针**L**具有细胞内 Al^{3+} 荧光成像的潜在应用价值.

3.6 探针**L**与现有 Al^{3+} 荧光探针的比较

将提出的荧光探针**L**与现有的 Al^{3+} 荧光探针进行

图 10 L与L-Al³⁺在BEL-7402细胞中的荧光成像图(网络版彩图)

了比较(表1), 结果表明, 探针L不仅具有较高的灵敏

表 1 探针L与现有的Al³⁺荧光探针的比较

探针结构	合成步数	检测限	参考文献	探针结构	合成步数	检测限	参考文献
	1	$1.08 \times 10^{-7} \text{ M}$	[3]		1	$2.9 \times 10^{-7} \text{ M}$	[6]
	5	$7.4 \times 10^{-9} \text{ M}$	[7]		9	$2.71 \times 10^{-8} \text{ M}$	[8]
	3	$1.34 \times 10^{-6} \text{ M}$	[11]		3	$1.62 \times 10^{-6} \text{ M}$	[12]
	2	$2.4 \times 10^{-8} \text{ M}$	[13]		3	$3.0 \times 10^{-8} \text{ M}$	[15]
	2	$2.7 \times 10^{-3} \text{ M}$	[16]		7	$8.06 \times 10^{-8} \text{ M}$	[17]
	2	$3.16 \times 10^{-7} \text{ M}$	[18]		1	$8.22 \times 10^{-8} \text{ M}$	本研究

度, 而且合成方法简单, 为进一步拓展其在离子传感器方面的应用奠定了基础.

4 结论

本文报道了一种合成简便的新型席夫碱8-羟基-久洛尼定-(2-吡啶)脲(L)荧光探针, 并基于探针L建立了一种用于定量检测Al³⁺的分析方法. 随着Al³⁺浓度的增加, 体系在480 nm处荧光显著增强, 基于席夫碱与Al³⁺的络合作用, 可以实现对Al³⁺的高灵敏检测. 等摩尔连续变化法、荧光光谱、质谱等方法均表明Al³⁺与L的结合比为1:1. 结合核磁共振光谱研究表明, 络合位点为L中的酚羟基、吡啶氮及亚氨基氮原子. 所制

备的席夫碱探针 **L** 合成简单、对 Al^{3+} 选择性好、检测灵敏度高, 同时颜色从浅黄变为黄色, 可实现裸眼识

别检测, 并且能在细胞内实现 Al^{3+} 的荧光成像, 因此在传感器研制方面具有潜在的应用价值.

参考文献

- Chen CH, Liao DJ, Wan CF, Wu AT. *Analyst*, 2013, 138: 2527–2530
- Qin LY, Hou LJ, Feng J, Chao JB, Wang Y, Jin WJ. *Synth Met*, 2016, 221: 206–213
- Zhu J, Zhang Y, Wang L, Sun T, Wang M, Wang Y, Ma D, Yang Q, Tang Y. *Tetrahedron Lett*, 2016, 57: 3535–3539
- Mondal S, Bhanja AK, Ojha D, Mondal TK, Chattopadhyay D, Sinha C. *RSC Adv*, 2015, 5: 73626–73638
- Shweta S, Neeraj N, Asthana SK, Mishra RK, Upadhyay KK. *RSC Adv*, 2016, 6: 55430–55437
- Karak D, Lohar S, Sahana A, Guha S, Banerjee A, Das D. *Anal Methods*, 2012, 4: 1906–1908
- Kang L, Liu YT, Li NN, Dang QX, Xing ZY, Li JL, Zhang Y. *J Lumin*, 2017, 186: 48–52
- Cherreddy NR, Raju MVN, Reddy BM, Krishnaswamy VR, Korrapati PS, Reddy BJM, Rao VJ. *Sensors Actuat B-Chem*, 2016, 237: 605–612
- Wang YW, Yu MX, Yu YH, Bai ZP, Shen Z, Li FY, You XZ. *Tetrahedron Lett*, 2009, 50: 6169–6172
- Xie X, Qin Y. *Sensors Actuat B-Chem*, 2011, 156: 213–217
- Sen B, Sheet SK, Thounaojam R, Jamatia R, Pal AK, Aguan K, Khatua S. *Spectr Acta Part A-Mol Biomol Sp*, 2017, 173: 537–543
- Sheet SK, Sen B, Thounaojam R, Aguan K, Khatua S. *J Photochem Photobiol A-Chem*, 2017, 332: 101–111
- Zhu Q, Li L, Mu L, Zeng X, Redshaw C, Wei G. *J Photochem Photobiol A-Chem*, 2016, 328: 217–224
- Adhikari S, Mandal S, Ghosh A, Guria S, Das D. *Sensors Actuat B-Chem*, 2016, 234: 222–230
- Xie JY, Li CY, Li YF, Fu YJ, Nie SX, Tan HY. *Dyes Pigments*, 2017, 136: 817–824
- Hou S, Qu Z, Zhong K, Bian Y, Tang L. *Tetrahedron Lett*, 2016, 57: 2616–2619
- Qin JC, Yan J, Wang B, Yang Z. *Tetrahedron Lett*, 2016, 57: 1935–1939
- Chatterjee N, Maity SB, Samadder A, Mukherjee P, Khuda-Bukhsh AR, Bharadwaj PK. *RSC Adv*, 2016, 6: 17995–18001
- Mistri T, Alam R, Bhowmick R, Katarkar A, Chaudhuri K, Ali M. *New J Chem*, 2016, 40: 330–339
- Roek DP, Chateaneuf JE, Brennecke JF. *Ind Eng Chem Res*, 2000, 39: 3090–3096
- Das S, Dutta M, Das D. *Anal Methods*, 2013, 5: 6262–6285
- Li W, Tian X, Huang B, Li H, Zhao X, Gao S, Zheng J, Zhang X, Zhou H, Tian Y, Wu J. *Biosens Bioelectron*, 2016, 77: 530–536
- Oliveira E, Santos HM, Capelo JL, Lodeiro C. *Inorg Chim Acta*, 2012, 381: 203–211
- Zhang YM, Shi BB, Zhang P, Huo JQ, Chen P, Lin Q, Liu J, Wei TB. *Sci China Chem*, 2013, 56: 612–618

A novel highly sensitive fluorescent probe based on Schiff base for Al^{3+}

Lingjie Hou, Jinyin Ge, Xiangyu Kong, Chuan Dong, Shaomin Shuang^{*}, Yu Wang^{*}

College of Chemistry and Chemical Engineering, Institute of Environmental Science, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

**Corresponding authors, E-mail: sms Huang@sxu.edu.cn; wangyu1168@sxu.edu.cn*

Abstract: A facile Schiff-base ligand 8-hydroxyjulolidine-pyridyl hydrazone (**L**) as the fluorescent probe was synthesized and characterized. **L** was selective toward Al^{3+} ions with a visible color change from pale-to-yellow and fluorescence enhancement at 480 nm. **L** forms complex with Al^{3+} in 1:1 ratio as supported by Job's plot analysis and ESI-MS. The binding mode was further confirmed by ^1H NMR titrations. The detection limit was calculated to be 8.22×10^{-8} M for Al^{3+} . These merits of **L**, i.e., requiring facile one-step synthesis and displaying high sensitivity make **L** a promising candidate as a chemosensor for Al^{3+} ion.

Keywords: fluorescent probe, Schiff base, Al^{3+}

doi: [10.1360/N032017-00046](https://doi.org/10.1360/N032017-00046)