

杨贇山,吴振威,成奋民,等.一种卟啉近红外荧光探针用于亚硝酸盐的检测应用[J].湖南科技大学学报(自然科学版),2019,34(3):84-89. doi:10.13582/j.cnki.1672-9102.2019.03.012

Yang Y S, Wu Z W, Cheng F M, et al. Near-infrared Fluorescent Probe of a Kind of Porphyrin for Detection and Application of Nitrite [J]. Journal of Hunan University of Science and Technology (Natural Science Edition), 2019, 34(3): 84-89. doi:10.13582/j.cnki.1672-9102.2019.03.012

# 一种卟啉近红外荧光探针用于 亚硝酸盐的检测应用

杨贇山,吴振威,成奋民,张培盛,曾荣今\*

(湖南科技大学 化学化工学院,理论有机化学与功能分子教育部重点实验室,湖南 湘潭 411201)

**摘要:**以卟啉为原料合成了一种检测亚硝酸盐的近红外荧光探针,利用核磁共振氢谱和质谱对化合物结构进行了表征.研究了亚硝酸盐的浓度对探针荧光的影响,结果表明,随着亚硝酸盐浓度的增加,探针的荧光强度逐渐增强,且在0.011 5~0.300 0  $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围内,相对荧光强度与亚硝酸盐浓度之间具有良好的线性关系,线性方程为 $F/F_0 = 5.915 4c + 1.080 2$ ,  $R^2 = 0.991 9$ ,有很高的灵敏度,检测限为11.5 nmol/L ( $S/N=3$ ).选择性测试结果可知,探针与硝酸根离子反应后的相对荧光强度值为1.91,而与其他17种干扰物质反应后的相对荧光强度值均低于1.91,探针与亚硝酸盐反应后的相对荧光强度值为6.36,是探针与硝酸根离子反应后相对荧光强度值的3.3倍.抗干扰性测试结果可知,探针与亚硝酸盐反应后的相对荧光强度值为6.29,亚硝酸盐分别与其他18种干扰物质共同存在于溶液中时与探针反应后的相对荧光强度值在5.91~6.48变化,结果表明,探针对亚硝酸盐的检测具有良好的选择性和抗干扰能力.探针能成功地应用于不同规格的火腿肠和酱菜中亚硝酸盐的含量的测定,具有应用于实际样品中亚硝酸盐检测的潜力.

**关键词:**卟啉;近红外;荧光探针;亚硝酸盐

**中图分类号:** O621      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1672-9102(2019)03-0084-06

## Near-infrared Fluorescent Probe of a Kind of Porphyrin for Detection and Application of Nitrite

Yang Yunshan, Wu Zhenwei, Cheng Fenmin, Zhang Peisheng, Zeng Rongjin

(Key Laboratory of Theoretical Organic Chemistry and Function Molecule, Ministry of Education, School of Chemistry and Chemical Engineering, Hunan University of Science and Technology, Xiangtan 411201, China)

**Abstract:** A near-infrared fluorescence probe was synthesized from porphyrins to detect nitrite, characterized by  $^1\text{H}$  NMR and MS spectra. The effect on probe of the concentrations of nitrite was studied, which showed that the fluorescence intensity of probe gradually increase by the increase of nitrite concentration, and the concentrations of nitrite range from 0.011 5 to 0.300 0 mol/L, it has a good linear relationship of the relative fluorescence intensity and nitrite concentration, the linear equation for the  $F/F_0 = 5.915 4 + 1.080 2c$ ,  $R^2 = 0.991 9$ , has a high sensitivity, the limit of detection is 11.5 nmol/L ( $S/N=3$ ). Selective test result shows that the probe react with nitrate ion of the relative fluorescence intensity is 1.91, compared with other interfering substances, the

收稿日期:2019-01-07

基金项目:国家自然科学基金资助项目(51873058)

\*通信作者, E-mail: zrxh2@126.com

relative fluorescence intensity of the reaction after less than 1.91, the relative fluorescence intensity value is 6.36 after the probe reacted with nitrite, is 3.3 times of the relative fluorescence intensity after the probe reacted with nitrate ion. Anti-interference experiment show that the probe and nitrite reaction after the relative fluorescence intensity value is 6.29, when nitrite and 18 other interfering substances coexist in solution, the relative fluorescence intensity varies between 5.91 and 6.48, the results show that the probe about the detection of nitrite with good selectivity and anti-jamming capacity. The probe can be successfully applied to the determination of nitrite content in different specifications of Ham sausage and Chinese pickles.

**Keywords:** porphyrins; near-infrared; fluorescence probe; nitrite

亚硝酸盐,广泛存在于土壤、水和食品中<sup>[1]</sup>,是经常使用的颜色固定剂和食品防腐剂,已经被证明对人体健康具有很大的威胁<sup>[2]</sup>.过量摄入亚硝酸盐会导致许多严重的疾病,包括癌症<sup>[3]</sup>、婴儿高铁血红蛋白血症<sup>[4]</sup>、中枢神经系统系统出生缺陷<sup>[5]</sup>等.因此,对于亚硝酸盐的检测具有重要的意义.常见的检测方法有色谱法、电化学分析、毛细管电泳法以及荧光探针法<sup>[6-8]</sup>等.荧光探针法由于其方法简单,选择性好,灵敏度高而备受关注<sup>[9]</sup>.但大多数检测亚硝酸盐的荧光探针的荧光发射波长较短,容易受到实际样品中短波长背景荧光的干扰<sup>[10-14]</sup>.基于此,我们合成了一种含邻二氨基苯基结构单元的卟啉荧光探针,该探针具有近红外发射波长,可实现对亚硝酸盐的检测,且具有良好的选择性和抗干扰能力.探针能应用于食品中亚硝酸盐含量的检测,具有潜在的应用前景.

## 1 工作准备

### 1.1 探针的合成

目标产物 5-(3,4-二氨基苯基)-10,15,20-三苯基卟啉 ( $H_2N-TPP-NH_2$ ) 的合成,参考文献[15]的部分合成方法,具体的合成步骤如下:第一步,参考已报道的文献[16]合成 5-(4-硝基苯基)-10,15,20-三苯基卟啉 ( $TPP-NO_2$ ).将称取的 2 g 原料  $TPP-NO_2$  用 50 mL 浓盐酸溶解,搅拌几分钟后将称取的 12 g 氯化亚锡加入上述溶液中,在 75 °C 下继续搅拌反应 9 h.反应之后,用氨水溶液(市售的分析纯溶液)调节 pH 至 7~8,二氯甲烷萃取得到有机层并旋干,真空干燥 24 h.通过柱层析法将粗产物进一步纯化,得到产物 5-(4-氨基苯基)-10,15,20-三苯基卟啉 ( $TPP-NH_2$ ) (产量为 1.1 g,产率为 55 %).第二步,将 1 g 的  $TPP-NH_2$  加入 20 mL 冰醋酸中搅拌溶解,然后将 0.243 g 醋酸酐溶液加入上述溶液中,室温下继续搅拌反应 5 h.反应之后,用氨水溶液(市售的分析纯溶液)调节 pH 至 7~8,用二氯甲烷萃取得到有机层并旋干,真空干燥 24 h,得到亮紫色的产物 5-对乙酰氨基苯基-10,15,20-三苯基卟啉 ( $TPP-NHCOCH_3$ ) (产量为 0.84 g,产率为 84 %).第三步,将 0.6 g 的  $TPP-NHCOCH_3$  在冰浴条件下溶解于 15 mL 二氯甲烷中,温度控制在 0~5 °C,加入 0.714 mL 硝酸溶液,继续搅拌反应 30 min.反应之后,用氨水溶液(市售的分析纯溶液)调节 pH 至 7~8,二氯甲烷萃取得到有机层并旋干,得到硝化的粗产物,真空干燥 24 h.用柱层析法进一步纯化粗产物,得到第一个色带并旋干,得到产物 5-(3-硝基-4-对乙酰氨基苯基)-10,15,20-三苯基卟啉 ( $O_2N-TPP-NHCOCH_3$ ) (产量为 0.12 g,产率为 20%).第四步,移取 30 mL 盐酸溶液(浓盐酸:水=1:1.5 v/v)将 0.12 g 上述产物  $O_2N-TPP-NHCOCH_3$  溶解,120 °C 下搅拌回流 16 h,然后将 8 g 氯化亚锡加入上述反应液中,在 75 °C 下继续搅拌反应 12 h.反应之后,将上述反应液冷却至室温,用氨水溶液(市售的分析纯溶液)调节 pH 至 7~8,二氯甲烷萃取得有机层并旋干,真空干燥过夜,进一步纯化得到目标产物 5-(3,4-二氨基苯基)-10,15,20-三苯基卟啉 ( $H_2N-TPP-NH_2$ ) (产量为 0.05 g,产率为 41.7%).具体的合成路线如图 1 所示.原料及中间产物的结构通过质谱和核磁共振氢谱进行了确认,目标产物的结构表征如图 2 所示.

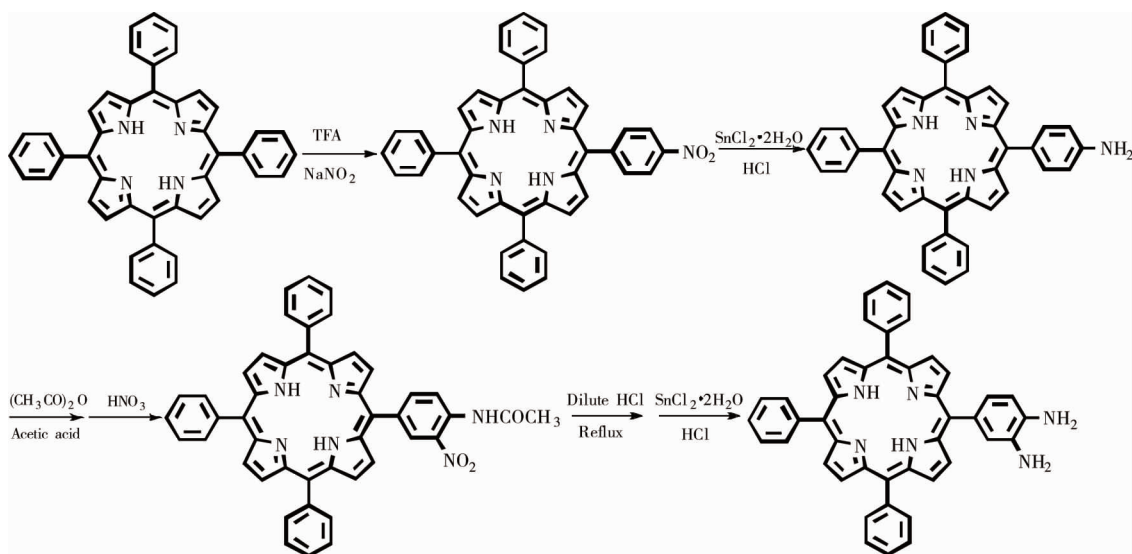
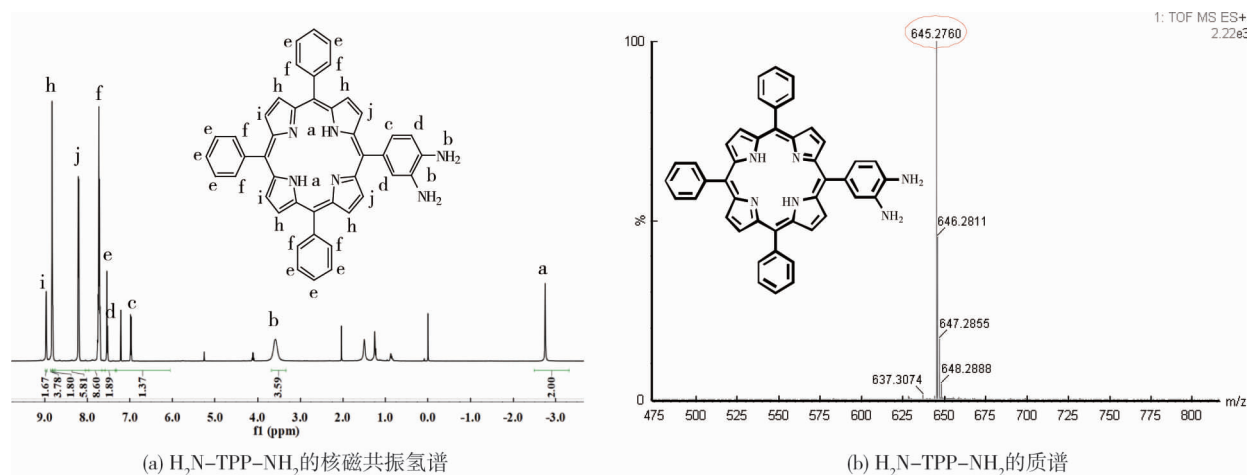


图1 探针的合成路线

图2  $H_2N-TPP-NH_2$  的结构表征

## 1.2 $H_2N-TPP-NH_2$ 的结构表征

### 1.3 测试方法及样品的前处理

**测试方法:**移取 100  $\mu\text{L}$  1.0 mmol/L 的探针母液于 5 mL 容量瓶中,加入 1.0 mL 浓度为 2.0 mol/L 的 HCl 溶液,加入不同浓度的亚硝酸钠溶液,用二次蒸馏水稀释至 5 mL,混合均匀,在 37  $^{\circ}\text{C}$  下反应 40 min.然后,加入 520  $\mu\text{L}$  浓度为 2 mol/L 的氢氧化钠溶液,用乙腈溶液稀释至 10 mL.移取 3 mL 于比色皿中,测试其荧光光谱图,选择激发波长为 436 nm,激发和发射波长的狭缝宽度分别为 5 nm 和 10 nm.

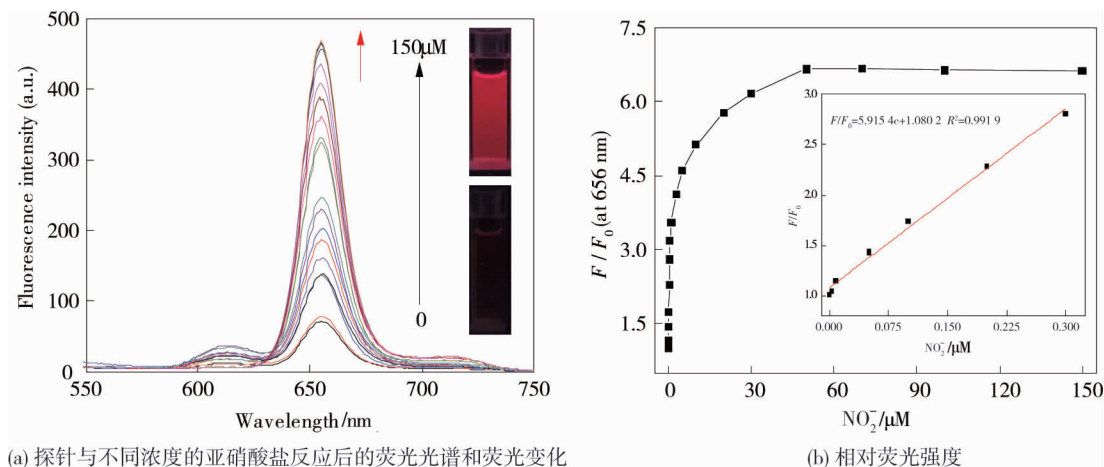
**样品前处理:**称量 5 g 火腿肠和酱菜,加入 50 mL 50  $^{\circ}\text{C}$  的二次蒸馏水,捣碎,浸泡 20 min,用氯仿萃取除去油脂,过滤水层,移入 100 mL 容量瓶中定容.准确移取 1.0 mL 上述溶液于容量瓶中,稀释至 10 mL 备用.

## 2 结果与讨论

### 2.1 探针对亚硝酸盐的检测

为了考察探针对亚硝酸盐的响应性能,实验中,采用不同浓度的亚硝酸盐与探针反应,测试其荧光光谱,结果如图 3a 所示.由图 3 可知:在未加入亚硝酸盐之前,探针自身的荧光因 PET 效应被淬灭而显示很弱的荧光,当加入亚硝酸盐之后,探针与亚硝酸盐反应形成苯并三氮唑单元,PET 效应被抑制,荧光恢复而发出红色

荧光.随着亚硝酸盐浓度的增加,荧光强度不断增强.进一步考察了最大发射波长为 656 nm 处相对荧光强度 ( $F/F_0$ (注: $F$ 表示在最大发射波长为 656 nm 处的荧光强度值, $F_0$ 表示与  $F$  值相对应的空白溶液在最大发射波长为 656 nm 处的荧光强度值))随亚硝酸盐浓度变化的关系,如图 3b 所示.由图 3 可知:硝酸盐的浓度在 0.011 5~0.300 0  $\mu\text{mol/L}$  的范围内,相对荧光强度与硝酸盐浓度之间具有很好的线性关系,线性方程为  $F/F_0=5.915 4c+1.080 2$ , $R^2=0.991 9$ ,具有很高的灵敏度,检测限为 11.5 nmol/L( $S/N=3$ ).



注:(b)中插入图为相对荧光强度 ( $F/F_0$ )与亚硝酸盐浓度的线性关系

图3 探针对亚硝酸盐的响应性能

## 2.2 探针对亚硝酸盐的选择性和抗干扰性检测

良好的选择性和竞争性是探针具备的必要条件.考虑到实际样品中其他离子和氨基酸等的干扰,将不同的可能干扰物种分别与探针反应,考察其对荧光强度的影响,结果如图 4a 所示.由图可知,探针与亚硝酸盐反应有显著的荧光增强响应,而当加入 10 倍当量的其他氨基酸或阴离子等相关干扰物,荧光强度几乎没有发生变化.由此可见,探针对亚硝酸盐的检测具有良好的选择性.将不同的可能干扰物种和亚硝酸盐一起与探针反应,考察其对荧光强度的影响,结果如图 4b 所示.由图 4 可知,在干扰物种共存的情况下,不会显著影响探针与亚硝酸盐反应后的荧光强度的变化,说明探针对亚硝酸盐的检测具有良好的抗干扰能力.

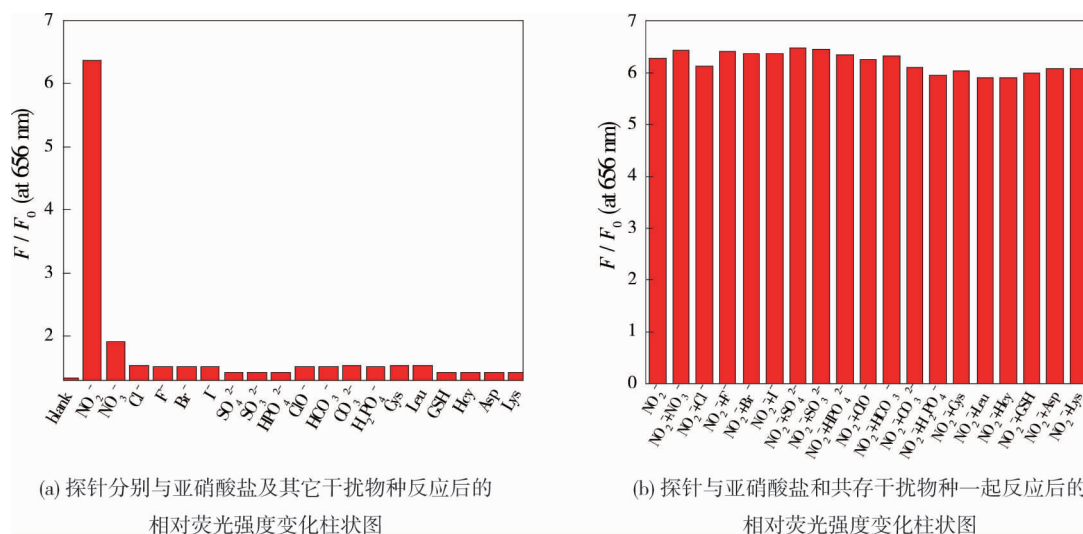


图4 探针对亚硝酸盐的选择性和抗干扰性

## 2.3 实际样品中亚硝酸盐的检测

鉴于探针有良好的实验室检测性能,进一步考察了探针对实际样品的检测能力,我们检测了 2 种不同

规格火腿肠中亚硝酸盐的含量.所有的样品均按相同的方法和条件平行测定3次,测定结果如表1所示.样品分析的加标回收率在98.9%~101.4%以及99.6%~100.7%,RSD在2.2%~2.9%及2.1%~2.8%.同理,我们检测了2种不同规格酱菜中亚硝酸盐的含量,测定结果如表2所示,样品分析的加标回收率在98.6%~103.6%以及98.6%~104%,RSD在1.1%~2.8%及1.0%~2.6%之间,方法具有较好的重现性.

表1 2种不同规格火腿肠中亚硝酸盐的检测

样品编号/火腿肠	添加量/(mg/kg)	测得量/(mg/kg)	RSD/(n=3, %)	回收率/%
1	0.0	74.5	2.2	-
	6.9	81.5	2.3	101.4
	13.8	88.4	2.6	100.7
	27.6	101.8	2.9	98.9
2	0.0	72.5	2.1	-
	6.9	79.2	2.3	97.1
	13.8	86.4	2.6	100.7
	27.6	100.0	2.8	99.7

表2 2种不同规格酱菜中亚硝酸盐的检测

样品编号/火腿肠	添加量/(mg/kg)	测得量/(mg/kg)	RSD/(n=3, %)	回收率/%
1	0.0	53.4	1.1	-
	6.9	60.5	1.8	102.9
	13.8	67.0	2.4	98.6
	27.6	82.0	2.8	103.6
2	0.0	51.0	1.0	-
	6.9	58.0	1.4	101.4
	13.8	64.6	1.9	98.6
	27.6	79.7	2.6	104.0

### 3 结论

1) 以卟啉为原料,合成了一种在近红外区检测亚硝酸盐的荧光探针.由于光诱导电子转移(PET)机理,探针自身的荧光被淬灭,亚硝酸盐在酸性介质中与探针发生反应,生成苯并三氮唑类卟啉化合物,使得荧光恢复,实现对亚硝酸盐的检测.

2) 探针对亚硝酸盐的检测具有良好的选择性,荧光性能稳定,抗干扰能力强,在选定的测试条件下,具有良好的线性关系,检测限为11.5 nmol/L.探针成功应用于不同规格火腿肠和酱菜中亚硝酸盐含量的测定.

#### 参考文献:

- [1] Cross A J, Ferrucci L M, Risch A, et al. A large prospective study of meat consumption and colorectal cancer risk: an investigation of potential mechanisms underlying this association [J]. *Cancer Research*, 2010, 70 (6): 2406.
- [2] Lin Z, Xue Z, Chen H, et al. Peroxynitrous-acid-induced chemiluminescence of fluorescent carbon dots for nitrite sensing [J]. *Anal Chem*, 2011, 83: 8245-8251.
- [3] Mishra B B, Rathinam V A, Martens G W, et al. Nitric oxide controls the immunopathology of tuberculosis by inhibiting NLRP3 inflammasome-dependent processing of IL-1 $\beta$  [J]. *Nature Immunology*, 2013, 14 (1): 52-60.
- [4] Dai N, Mitch W A. Relative importance of N-Nitrosodimethylamine compared to total N-Nitrosamines in drinking waters [J]. *Environmental Science & Technology*, 2013, 47 (8): 3648-3656.

- [5] Yang M, Fan J, Zhang J, et al. Visualization of methylglyoxal in living cells and diabetic mice model with a 1,8-naphthalimide-based two-photon fluorescent probe [J]. *Chemical Science*, 2018, 9(33): 6758-6764.
- [6] 汤志勇, 邱海鸥, 郑洪涛. 原子发射光谱分析 [J]. *分析试验室*, 2011, 30 (12): 109-122.
- [7] Xie Y F, Cai X L, Liu W L, et al. Effects of lanthanum nitrate on growth and chlorophyll fluorescence characteristics of *alternanthera philoxeroides* under perchlorate stress [J]. *Journal of Rare Earths*, 2013, 31 (8): 823-829.
- [8] Zou C, Gao L, Liu T, et al. A fluorescent probe based on N-butylbenzene-1,2-diamine for Cu (II) and its imaging in living cells [J]. *Journal of Inclusion Phenomena & Macrocyclic Chemistry*, 2014, 80 (3/4): 383-390.
- [9] 潘红, 许亚红. 荧光分析法在环境有机污染物分析中的运用 [J]. *科技创新与应用*, 2015, 10 (31): 167-172.
- [10] Cheng D, Pan Y, Wang L, et al. Selective visualization of the endogenous peroxynitrite in an inflamed mouse model by a mitochondria-targetable two-photon ratiometric fluorescent probe [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2017, 139 (1): 285-292.
- [11] Kim D, Moon H, Baik S H, et al. Two-photon absorbing dyes with minimal autofluorescence in tissue imaging: Application to in vivo imaging of amyloid- $\beta$  plaques with a negligible background signal [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2015, 137 (21): 6781.
- [12] Gu X, Huang Z, Ren Z, et al. Potent inhibition of nitric oxide-releasing bifendate derivatives against drug-resistant K562/A02 cells in vitro and in vivo [J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2017, 60 (3): 928-940.
- [13] Muthuraj B, Deshmukh R, Trivedi V, et al. Highly selective probe detects Cu<sup>2+</sup> and endogenous NO gas in living cell [J]. *Acs Appl Mater Interfaces*, 2014, 6 (9): 6562-6569.
- [14] Kawai K, Ieda N, Aizawa K, et al. A reductant-resistant and metal-free fluorescent probe for nitroxyl applicable to living cells [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2013, 135 (34): 12690-12696.
- [15] 石伟民. meso-四芳基卟啉芳环的定位硝化及其衍生物合成研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2005.
- [16] Wang H, Zhou G, Gai H, et al. A fluorescein-based probe with high selectivity to cysteine over homocysteine and glutathione [J]. *Chemical Communications*, 2012, 48 (67): 8341-8343.