

时统昊,赵龙,张泽强,等.基于香豆素的高选择性铜离子“Turn-On”型荧光探针[J].湖南科技大学学报(自然科学版),2021,36(2):107-112. doi:10.13582/j.cnki.1672-9102.2021.02.016

SHI T H, ZHAO L, ZHANG Z Q, et al. “Turn-On” Fluorescent Probe of Copper Ion Based on High Selectivity of Coumarin[J]. Journal of Hunan University of Science and Technology (Natural Science Edition), 2021,36(2): 107-112. doi:10.13582/j.cnki.1672-9102.2021.02.016

基于香豆素的高选择性铜离子 “Turn-On”型荧光探针

时统昊,赵龙,张泽强,刘万强,陈冠凡*

(湖南科技大学 化学化工学院, 湖南 湘潭 411201)

摘要:以香豆素为母体和 2-胍基-3-氯吡啶合成荧光探针 TM 1,其结构经过核磁共振、氢谱以及质谱测定.在激发波长为 318 nm 时对探针 TM 1 进行铜离子荧光测定,结果表明,该探针对铜离子的选择性高、响应速度快、检出限较低.并且在铜离子浓度为 0~45 $\mu\text{mol/L}$ 范围内,其荧光强度与铜离子浓度呈现出良好的线性关系($y = 18.97x + 166.09$, 相关系数 $R^2 = 0.9899$, 检出限 LOD 为 39 nmol/L).该方法简便快速、准确度高、灵敏度高,探针 TM 1 可用于检测铜离子的含量.

关键词:香豆素;铜离子;荧光强度;灵敏度;检出限

中图分类号:O625 文献标志码:A 文章编号:1672-9102(2021)02-0107-06

“Turn-On” Fluorescent Probe of Copper Ion Based on High Selectivity of Coumarin

SHI Tonghao, ZHAO Long, ZHANG Zeqiang, LIU Wanqiang, CHEN Guanfan

(School of Chemistry and Chemical Engineering, Hunan University of Science and Technology, Xiangtan 411201, China)

Abstract: Coumarin and 2-hydrazino-3-chloropyridine were used to react to a fluorescence probe TM 1. Its structure was determined by ^1H NMR, ^{13}C NMR and Mass spectra, etc. The probe was used for the fluorescence determination of copper ion at the excitation wavelength of 318 nm, and it was showed satisfactory sensitivity and rapidly response to copper ion. The results showed that the linear equation $y = 18.97x + 166.09$, the correlation coefficient $R^2 = 0.9899$ in the range of 0~45 $\mu\text{mol/L}$, and the detection limit of copper ion of 39 nmol/L. The method was very simple, rapid, accurate and sensitive fluorescence probe, and the fluorescence probe TM 1 could be employed for copper ion detection.

Keywords: coumarin; copper ion; fluorescence intensity; sensitivity; LOD

铜离子是酶的重要组成部分,它在人体新陈代谢和生命活动中起着非常重要的作用^[1-3].铜离子是构成生物的金属离子,然而,大量的铜离子会对动植物的生长产生不利影响,也会威胁人类健康,如过量的铜离子会将氧分子催化成活性氧^[4],继而对蛋白质^[5]和核酸造成氧化损伤^[6],导致神经系统紊乱^[7]、阿尔茨海默病^[8]、帕金森病^[9]和 Wilson 病^[10]等.因此,对铜离子含量的检测具有非常重要的意义.

收稿日期:2019-11-26

基金项目:国家自然科学基金资助项目(21672058);湖南省教育厅创新平台项目资助(19K031A);湖南省教育厅项目资助(16B087)

*通信作者,E-mail:chenguanfan@126.com

常见的检测铜离子的方法有吸收分光光度法^[11]、电感耦合等离子体-质谱法^[12]等,然而,这些方法都需要大型仪器和专业的操作人员,存在仪器昂贵、过程复杂、成本较高等缺点.荧光法检测铜离子的时间短、操作简单,具有很大的优势^[13-14].目前,大多数检测铜离子的荧光探针的检测范围小^[15-16]、检出限(Limit of Detection, LOD)高^[17],因此,本文合成了一种新型的基于香豆素为母体的荧光探针 TM 1,实现对铜离子的检测,且该探针具有较大的检测范围和较低检出限的优点.

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

仪器:核磁共振波谱仪 Bruker AV-II 500 MHz;质谱仪 MALDITOF-MS;荧光光谱仪 F-7000 型,日本株式会社日立高新技术科学.

试剂:3-乙酰基香豆素和 3-氯-2-胍基吡啶,上海阿拉丁生化科技股份有限公司,分析纯,使用之前不做处理;CuCl₂, LiNO₃, Zn(NO₃)₂·6H₂O, NaCl, Cd(NO₃)₂, Fe(NO₃)₃·9H₂O, KCl, Al(NO₃)₃·9H₂O, AgNO₃, Sr(NO₃)₂, HgCl₂, Ni(NO₃)₂·6H₂O, Co(NO₃)₂·6H₂O, Ca(NO₃)₂·4H₂O 和 Mg(NO₃)₂·6H₂O, 天津市科密欧化学试剂有限公司,分析纯,使用之前不做处理.

1.2 测试条件

在 4 mL 的比色皿中加入 3 mL 的探针溶液及一定量的铜离子溶液或其他金属离子溶液,反应一定时间,在激发波长 $\lambda_{ex} = 318$ nm 的条件下(激发狭缝宽度为 2.5 nm,发射狭缝宽度为 2.5 nm),测定发射波长在 330~560 nm 范围内的荧光强度.保持 TM 1 的主体浓度 10 μ mol/L 不变,改变探针溶液中铜离子的浓度,进行荧光强度的测定,且所有的荧光强度测试均在室温条件下进行.

1.3 TM 1 的合成

3-乙酰基香豆素(0.188 7 g, 1 mmol)溶于 10 mL 的乙醇溶液中,加入 2-胍基-3-氯吡啶(0.144 2 g, 1 mmol)缓慢加热至 78 $^{\circ}$ C 回流.回流 5 h 后冷却至室温.减压蒸出溶剂后,硅胶柱色谱分离($V_{乙酸乙酯} : V_{石油醚} = 2 : 1$),得到黄色固体 0.134 6 g,产率 43%,探针 TM 1 的合成路线如图 1 所示,其结构通过核磁共振氢谱、共振碳谱及质谱测定,结果如图 2~图 4 所示.¹H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ : 8.48 (s, 1H), 8.28 (dd, $J = 4.9, 1.6$ Hz, 1H), 8.20 (s, 1H), 7.61 (dd, $J = 7.8, 1.6$ Hz, 1H), 7.56 (dd, $J = 7.7, 1.6$ Hz, 1H), 7.55~7.50 (m, 1H), 7.34 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.30~7.26 (m, 1H), 6.81 (dd, $J = 7.8, 4.9$ Hz, 1H), 2.39 (s, 3H) (如图 2).¹³C NMR (126 MHz, Chloroform-*d*) δ : 160.27, 153.88, 149.99, 147.06, 145.64, 141.45, 137.24, 131.87, 128.71, 126.96, 124.62, 119.26, 116.58, 116.39, 115.15, 14.57 (如图 3).质谱 (MALDITOF-MS): 314.1 (理论值: 313.06, 如图 4).

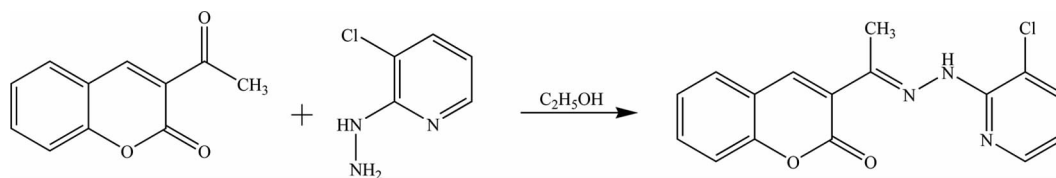


图 1 探针 TM 1 的合成路线

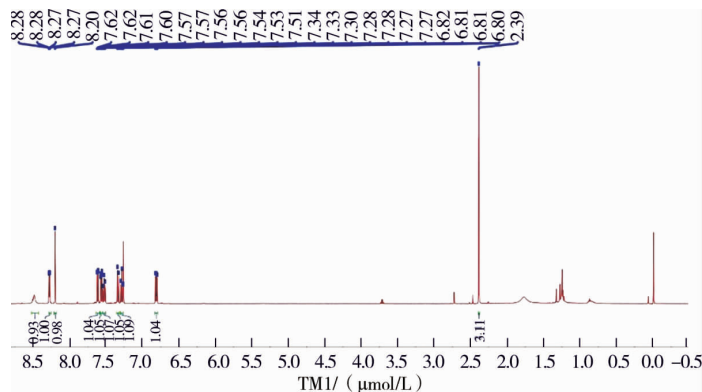


图 2 探针 TM 1 核磁共振氢谱

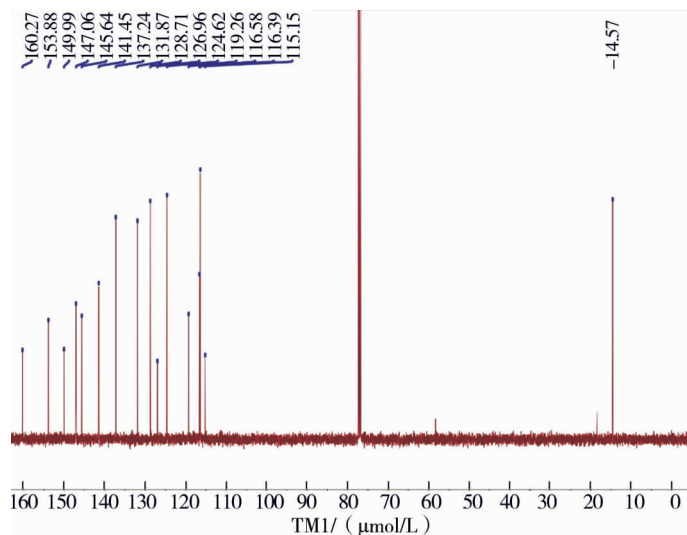


图 3 探针 TM 1 核磁共振碳谱

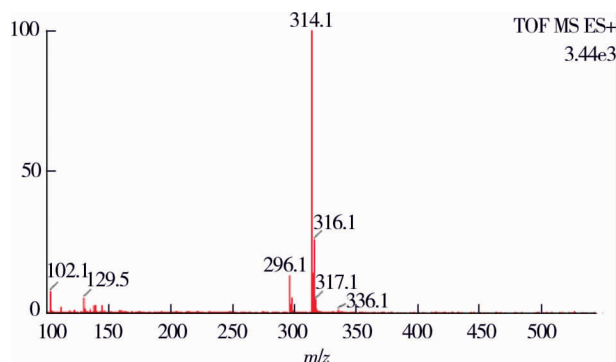


图 4 探针 TM 1 质谱

1.4 测试方法

TM 1 (10 $\mu\text{mol/L}$) 在四氢呋喃-磷酸缓冲盐溶液 ($V_{\text{THF}} : V_{\text{PBS}} = 9 : 1$, $\text{pH} = 7.4$, $\lambda_{\text{ex}} = 318 \text{ nm}$) 中测试各种金属离子的含量. 蒸馏水中制备不同的金属离子溶液 (Cu^{2+} , Li^+ , Zn^{2+} , Na^+ , Fe^{3+} , Al^{3+} , Ag^+ , Sr^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} , K^+ , Co^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} 和 Hg^{2+}) 0.02 mol/L. 在室温下, 石英皿中记录了测定所用光在 330 ~ 560 nm 范围内的荧光曲线 (激发狭缝的宽度为 2.5 nm, 发射狭缝的宽度为 2.5 nm). 所有测试均在室温条件下进行 3 次.

1.5 探针的检出限计算

采用荧光滴定法测定 LOD. 测定空白样品 (TM 1, 10 $\mu\text{mol/L}$; $V_{\text{THF}} : V_{\text{PBS}} = 9 : 1$, $\text{pH} = 7.4$) 的荧光强度 20 次, 计算得到空白样品的标准偏差.

检出限的计算:

$$L = 3 \frac{\sigma}{k}$$

式中: L 为 LOD 检出限数值; σ 为空白测量的标准偏差; k 为加入 TM 1 的铜离子浓度和荧光强度曲线的斜率.

2 结果与讨论

2.1 溶剂的选择

为了研究探针 TM 1 在不同有机-缓冲溶液中对金属离子的响应强度, 实验测试了 7 种溶液对铜离子荧光强度的变化曲线, 如图 5 所示, 这 7 种溶液分别为甲醇-PBS 缓冲溶液、DMSO-PBS 缓冲溶液、丙酮-

PBS 缓冲溶液、乙醇-PBS 缓冲溶液、DMF-PBS 缓冲溶液、乙腈-PBS 缓冲溶液和 THF-PBS 缓冲溶液.图 5 中 F_0 为有铜离子存在的情况下激发波长为 394 nm 处的荧光强度, F 为没有铜离子存在的情况下激发波长为 394 nm 处的荧光强度.由图 5 可知:当铜离子中加入 TM 1 的 THF-PBS 缓冲溶液($V_{\text{THF}} : V_{\text{PBS}} = 9 : 1$, $\text{pH}=7.4$)时,激发波长为 394 nm 处的荧光强度的数值最高.因此,本文所有的 TM 1 测试实验都是在 THF-PBS 缓冲溶液($V_{\text{THF}} : V_{\text{PBS}} = 9 : 1$, $\text{pH}=7.4$)中进行的.

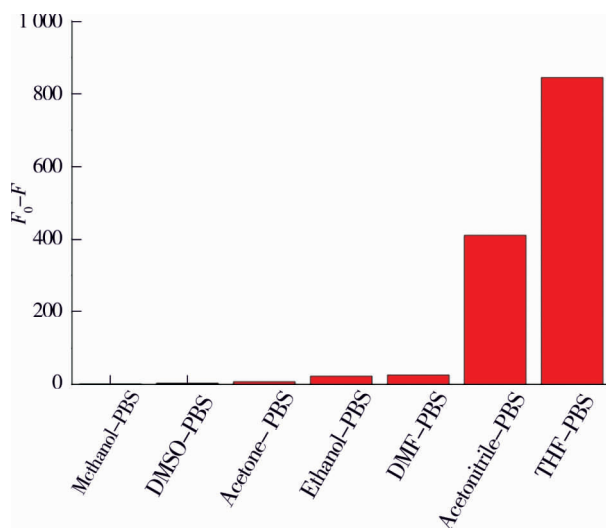


图 5 不同溶剂中 TM 1 铜离子荧光强度差值

2.2 TM 1 对铜离子的选择性和竞争性

当激发波长为 318 nm 时, TM 1 探针空白溶液在发射波长为 394 nm 处的荧光强度不高.加入铜离子 ($100 \mu\text{mol/L}$) 时能显著地观察到荧光光谱的变化, TM 1 产生强烈的荧光响应(图 6), 从无色到紫红色的剧烈变化.在其他金属离子 (Li^+ , Zn^{2+} , Na^+ , Fe^{3+} , Al^{3+} , Ag^+ , Sr^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} , K^+ , Co^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} 和 Hg^{2+}) 浓度为 $100 \mu\text{mol/L}$ 的情况下, TM 1 的荧光光谱没有发生明显变化, 表明这些金属离子与 TM 1 之间的相互作用非常弱.当铜离子加入 TM 1 探针溶液时, 探针溶液的荧光被激活.研究结果表明, 其他金属离子共存对铜离子的检测影响不大.因此, TM 1 能有效地检测混合溶液中的铜离子含量.

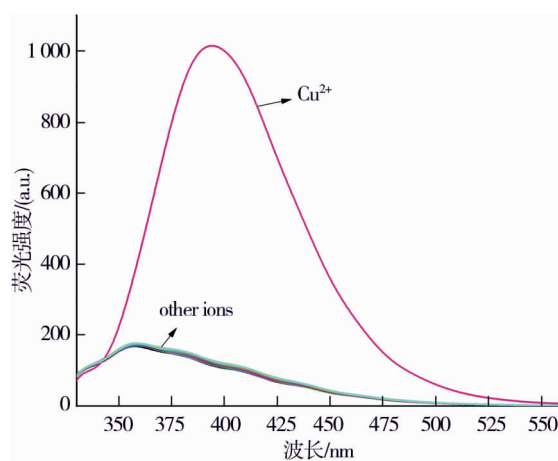


图 6 TM 1 在不同的金属离子溶液中的荧光强度变化

采用荧光滴定法定量检测 TM 1 荧光探针对铜离子的检测能力, TM 1 在不同浓度铜离子条件下的荧光变化曲线如图 7 所示.在 THF-PBS 缓冲液体积比为 $V_{\text{THF}} : V_{\text{PBS}} = 9 : 1$, $\text{pH}=7.4$, $\lambda_{\text{ex}} = 318 \text{ nm}$ 处激发时, TM 1 空白溶液在发射波长为 394 nm 处显示出微弱的荧光发射带.不含铜离子的 TM 1 空白溶液产生微弱荧光,随着铜离子的逐渐加入,在发射波长为 394 nm 处 TM 1 探针溶液的荧光强度 I_f (Fluorescence intensity) 显著增加,荧光强度 I_f 的数值比没有铜离子存在的条件下的数值提高了 7 倍.图 8 为不同浓度的

铜离子(0~110 $\mu\text{mol/L}$)与 TM 1 探针溶液的滴定实验数据.由图 8 可知:TM 1 探针溶液(10 μmol)的荧光强度 I_F 和铜离子浓度(0~45 $\mu\text{mol/L}$)呈较好的线性关系,相关系数为 $R^2 = 0.9899$.根据荧光滴定实验确定的检出限为 39 nmol/L,远低于以往报道的荧光探针的检出限^[18-19].

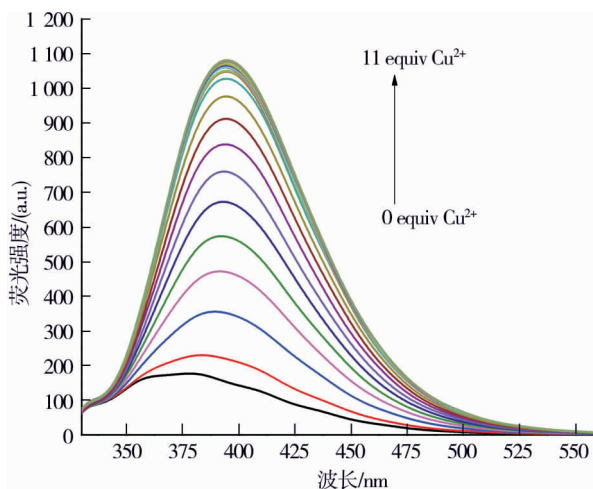


图 7 TM 1 在不同浓度铜离子条件下的荧光变化曲线

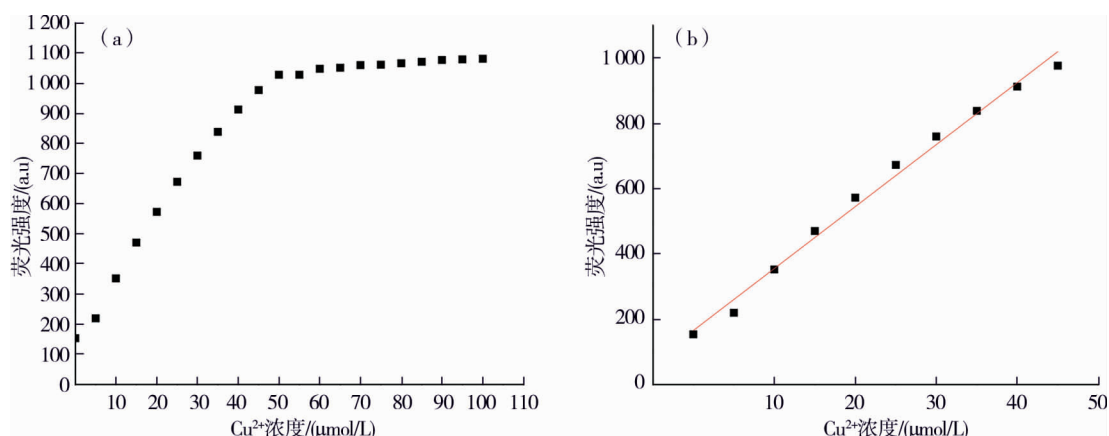


图 8 TM 1 于 394 nm 处的荧光强度

3 结论

1) 荧光探针 TM 1 以香豆素为母体和 2-胍基-3-氯吡啶合成,其结构通过核磁共振、氢谱以及质谱测定.

2) 当激发波长为 318 nm 时,对荧光探针 TM 1 进行铜离子荧光测定,结果表明,铜离子浓度在 0~45 $\mu\text{mol/L}$ 范围内,荧光强度与铜离子浓度呈现出良好的线性关系($y = 18.97x + 166.09$, 相关系数 $R^2 = 0.9899$).

参考文献:

- [1] Frag E Y, Mohamed M E, Fahim E M. Application of carbon sensors for potentiometric determination of copper (II) in water and biological fluids of Wilson disease patients. Studying the surface reaction using SEM, EDX, IR and DFT[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2018, 118: 122-128.
- [2] Squitti R, Ghidoni R, Simonelli I, et al. Copper dyshomeostasis in Wilson disease and Alzheimer's disease as shown by serum and urine copper indicators[J]. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 2018, 45: 181-188.
- [3] Wang K, Feng W, Wang Y, et al. A coumarin derivative with benzothiazole Schiff's base structure as chemosensor for cyanide and copper ions[J]. Inorganic Chemistry Communications, 2016, 71: 102-104.

- [4] Zhou Z, Li X, Li Q, et al. Copper-based materials as highly active electrocatalysts for the oxygen evolution reaction[J]. *Materials Today Chemistry*, 2019, 11: 169–196.
- [5] Karlsson H L, Cronholm P, Hedberg Y, et al. Cell membrane damage and protein interaction induced by copper containing nanoparticles—Importance of the metal release process[J]. *Toxicology*, 2013, 313(1): 59–69.
- [6] Xu W, Zhu L, Shao X, et al. An electrochemical biosensor based on nucleic acids enzyme and nanochannels for detecting copper (II) ion[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2018, 120: 168–174.
- [7] Kumar A, Gupta S, Sharma P, et al. In silico method for identification of novel copper and iron metabolism proteins in various neurodegenerative disorders[J]. *NeuroToxicology*, 2019, 73: 50–57.
- [8] Kepp K P, Squitti R. Copper imbalance in Alzheimer's disease: Convergence of the chemistry and the clinic[J]. *Coordination Chemistry Reviews*, 2019, 397: 168–187.
- [9] Ajsuvakova O P, Tinkov A A, Willkommen D, et al. Assessment of copper, iron, zinc and manganese status and speciation in patients with Parkinson's disease: A pilot study[J]. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 2019: 126423.
- [10] Zischka H, Einer C. Mitochondrial copper homeostasis and its derailment in Wilson disease[J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2018, 102: 71–75.
- [11] Santos I C, Mesquita R B R, Rangel A O S S. Micro solid phase spectrophotometry in a sequential injection lab-on-valve platform for cadmium, zinc, and copper determination in freshwaters[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2015, 891: 171–178.
- [12] Luo Y, Ronk M, Joubert M K, et al. Determination of interactions between antibody biotherapeutics and copper by size exclusion chromatography (SEC) coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP/MS) [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2019, 1079: 252–259.
- [13] Wan X, Ke H, Tang J, et al. Acid Environment-improved fluorescence sensing performance: A quinoline Schiff base-containing sensor for Cd^{2+} with high sensitivity and selectivity[J]. *Talanta*, 2019, 199: 8–13.
- [14] Ksenofontov A A, Stupikova S A, Guseva G B, et al. Zinc (II) bis(dipyrromethenate)-doped ethyl cellulose sensors for ethanol vapor fluorescence detection[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2018, 277: 462–466.
- [15] Razi S S, Srivastava P, Ali R, et al. A coumarin-derived useful scaffold exhibiting Cu^{2+} induced fluorescence quenching and fluoride sensing (On-Off-On) via copper displacement approach[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2015, 209: 162–171.
- [16] Chen H, Yang P, Li Y, et al. Insight into triphenylamine and coumarin serving as copper (II) sensors with “OFF” strategy and for bio-imaging in living cells [J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2020, 224: 117384.
- [17] He G, Hua X, Yang N, et al. Synthesis and application of a “turn on” fluorescent probe for glutathione based on a copper complex of coumarin hydrazide Schiff base derivative[J]. *Bioorganic Chemistry*, 2019, 91: 103176.
- [18] Wang J, Liang J, Liu X, et al. Thiazoline-pyrene selective and sensitive fluorescence “turn-on” sensor for detection of Cu^{2+} [J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2019, 215: 260–265.
- [19] Bayindir S. A simple rhodanine-based fluorescent sensor for mercury and copper: The recognition of Hg^{2+} in aqueous solution, and $\text{Hg}^{2+}/\text{Cu}^{2+}$ in organic solvent[J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 2019, 372: 235–244.