

分析测试

应用于水基体系的罗丹明铜离子探针的合成

杨志强^{1,2}, 胡明明^{1,3*}, 尹建华^{1,2}

- (1. 上海海洋大学海洋生态与环境学院, 上海 201306;
2. 自然资源部天津海水淡化与综合利用研究所, 天津 300192;
3. 天津市中海水处理科技有限公司, 天津 300452)

摘要:设计合成了一种罗丹明 B 类衍生物 RhA, 并用荧光和紫外分析法检测其特性。RhA 探针对于 Cu^{2+} 的识别具有唯一性, 在 $2 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ HEPES- CH_3CN (体积比 1:1, 含 0.1 mol/L NaNO_3 , $\text{pH}=7.4$) 溶液中, RhA 单独存在下是无颜色的, 荧光强度较低; 滴入 Cu^{2+} 后, 溶液渐变为粉红色, 而且荧光显著加强, 却对其他常见金属离子基本无响应。荧光光谱显示 RhA 对较低浓度 Cu^{2+} 的检测仍然呈良好的线性关系。本探针对于真实水体环境中 Cu^{2+} 的快速即时检测具有一定实用价值。

关键词:罗丹明 B; 铜离子; 荧光传感器; 水相检测

中图分类号: O621.3

文献标志码: A

文章编号: 0253-4320(2022)01-0238-04

DOI: 10.16606/j.cnki.issn.0253-4320.2022.01.048

Synthesis of rhodamine copper ion probe for water-based system

YANG Zhi-qiang^{1,2}, HU Ming-ming^{1,3*}, YIN Jian-hua^{1,2}

- (1. College of Marine Ecology and Environment, Shanghai Maritime University, Shanghai 201306, China;
2. The Institute of Seawater Desalination and Multi-purpose Utilization, MNR (Tianjin), Tianjin 300192, China;
3. Tianjin Zhonghai Water Treatment Technology Co., Ltd., Tianjin 300452, China)

Abstract: RhA, a kind of rhodamine B derivative, is designed and synthesized, and its characteristics is detected by means of fluorescence and ultraviolet analysis methods. RhA probe is a chemo-sensor for Cu^{2+} . RhA alone has no color and low fluorescence intensity in a $2 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HEPES- CH_3CN (a volumetric ratio of 1:1, containing $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ of NaNO_3 , $\text{pH}=7.4$) solution. After adding Cu^{2+} , the solution gradually turns pink, and the fluorescence is significantly enhanced, but there is hardly response to other common metal ions. The fluorescence spectrum show that RhA still shows a good linear relationship for the detection at a lower concentration of Cu^{2+} at $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. This method has potential application value for the rapid and real-time detection of Cu^{2+} in actual water environment.

Key words: rhodamine B; copper ion; fluorescence sensor; water phase detection

铜是一种广泛用于冶金、地质、化学行业、材料学等科研生产的重要元素,也是人体参与生理和病理事件的重要微量元素之一^[1-2]。人体中铜的缺乏会影响酶的活性并抑制细胞的代谢,从而导致动脉疾病,高胆固醇和冠心病。此外,过量摄入铜会加重肝脏负担,导致肝腹水、肝硬化和其他疾病。基于目前重金属的水污染问题逐渐成为一个全球性的问题,不仅影响人体的代谢机能以及健康,甚至妨害自然环境,造成巨额财产和物种多样性亏损^[3]。因此,设计并研发一种具有高灵敏、高选择性检测 Cu^{2+} 的方法具有重要的现实意义。鉴于荧光探针技术具有高灵敏低消耗、操作简单、高选择等诸多优良性能,逐渐得到广泛的应用^[4-6]。近年来,国内外陆续报告了一系列可用于 Cu^{2+} 检测的探针^[7-8]。但设计

并合成一种适合复杂水体环境的 Cu^{2+} 检测探针仍面临严峻的挑战。鉴于罗丹明类荧光染料独特的荧光特性,比如摩尔吸光系数相对其他荧光染料而言要大很多,波长也较长,而且荧光的量子产量也很高,此外特殊的内酯环结构,会根据开闭而发出荧光,让它成为合成荧光分子探针的明智选择。本实验根据其结构和过往经验,设计并合成了一个新型荧光探针 RhA, 归属于罗丹明 B 类衍生物,在 $2 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ HEPES- CH_3CN (体积比 1:1, 含 0.1 mol/L NaNO_3 , $\text{pH}=7.4$) 溶液中可以专一性地识别 Cu^{2+} , 并且颜色变化和荧光变化明显。对于 $1 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ Cu^{2+} 仍有明显的光谱变化,检测速度快,体现其对 Cu^{2+} 实时原位检测具有潜在的实用价值。

收稿日期: 2021-02-19; 修回日期: 2021-11-17

基金项目: 国家重点研发计划资助项目 (2017YFC0404100); 天津市重点研发计划科技支撑重点项目 (19YFZCSF01070); 国家自然科学基金项目 (51805158)

作者简介: 杨志强 (1994-), 男, 硕士生; 胡明明 (1984-), 女, 博士, 高级工程师, 研究方向为水环境科学, 通讯联系人, mmhu-sdmu@126.com。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

平行合成仪(Radleys, carousel 6 plus), 精度 pH 计(上海雷磁, PHS-3C 型); 荧光分光光度计(日立公司, F-7000); 旋转蒸发仪(上海亚荣, RE-2000B); 核磁共振仪(Varian, INOVA 400 MHz); 真空干燥箱(泰斯特, 3BCII); 紫外-可见分光光度计(Thermo, Evolution 201)。罗丹明 B(上海源叶公司); 水合肼(凯米瑞公司); 4-羟基苯甲醛(天津大茂试剂); 乙醇(天津富余公司)。

测试光谱过程用到的金属盐有 KCl、CaCl₂、CdCl₂、HgCl₂、FeCl₂、FeCl₃、ZnCl₂、MgCl₂、CrCl₃、PbSO₄、CuSO₄。

1.2 目标探针 RhA 合成过程及表征

中间体 1 参照文献[9]的方法制备, 再将中间体 1 与对羟基苯甲醛反应即得目标产物。制备反应如图 1。

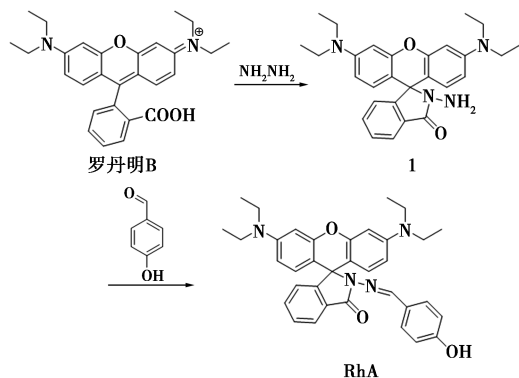


图 1 探针 A 的合成路线

中间体 1 的合成: 称取 1.2 g 罗丹明 B, 量取 30 mL 乙醇、3 mL 水合肼。将它们移至 250 mL 单口圆底烧瓶中, 内置一颗洁净的磁石, 然后将烧瓶安装到平行合成仪上, 常温混合旋转 10 min, 使药剂混合均匀。将平行合成仪温度设置为 80℃, 转速为 250 r/min, 回流搅拌反应 2 h 后取出圆底烧瓶静置冷却至室温。将 50 mL 1 mol/L 的盐酸溶液加入烧瓶内冲洗, 完成后内液移置烧杯中, 边搅拌边加入 1 mol/L 的氢氧化钠溶液, 使液体 pH 到达 9~12。抽滤液体, 放于真空干燥箱过夜, 得到粉红色粉末中间体 1 (收率 55%)。

探针 RhA 的合成: 将 1.6 g (3.3 mmol) 中间体 1 和 0.6 g (4.95 mmol) 4-羟基苯甲醛加入到盛有 60 mL 乙醇的 250 mL 单口圆底烧瓶中, 内置一颗洁净的磁石, 然后将烧瓶安装在平行合成仪上, 常温混

合旋转 10 min, 使药剂混合均匀。将平行合成仪温度设置为 90℃, 转速为 250 r/min, 室温下搅拌反应 4 h, 旋转蒸发除去溶剂后, 用二氯甲烷和甲醇按照一定比例混合, 作为洗脱液, 进行过柱分离, 得到粉红色粉末 RhA (收率 49%)。

¹H-NMR (CDCl₃), (10⁻⁶): 1.08 (t, 12H, CH₃, J=7.1 Hz), 3.31 (q, 8H, CH, J=7.1 Hz), 6.30 (d, 2H, Xanthene-H, J=8.9 Hz), 6.38 (s, 1H, C₆H₄, J=8 Hz), 6.40 (d, 2H, Xanthene-H, J=8.9 Hz), 6.70 (d, 2H, Xanthene-H, J=8.9 Hz), 7.06 (s, 1H, C₆H₄), 7.25 (d, 2H, C₆H₄), 7.57 (m, 3H, C₆H₄), 7.88 (d, 1H, C₆H₄), 8.80 (s, 1H, N=C-H), 9.89 (s, 1H, OH) (图 2)。

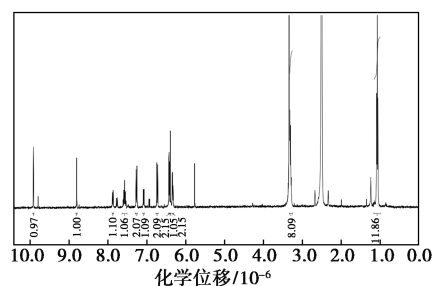


图 2 探针 A 氢核磁共振图谱

1.3 探针光谱测试方法

使用去离子水配制浓度为 1×10^{-5} mol/L 的各种离子溶液和浓度 1×10^{-3} mol/L 探针 RhA 二甲基亚砷(DMSO)母液, 再制备 2×10^{-5} mol/L HEPES-CH₃CN (体积比 1:1, 含 0.1 mol/L NaNO₃, pH=7.4) 测试溶液体系。首先移取 30 μL 探针母液, 移取前后都需要适度清理微量注射器的针头, 保证无其他金属离子的污染。针头置于液面下后缓慢推挤针尾, 使探针母液加入到含有 3 mL 测试溶液的待测体系内, 体系可保存在荧光或紫外样品池。待探针加入完毕, 使用针管匀速搅拌, 即可配制成 RhA 的测试溶液, 探针浓度为 1×10^{-5} mol/L。RhA 测试体系溶液通过测试分析, 可以得出探针的特有光谱图, 从而对其性质进行分析。根据 RhA 探针对各个金属阳离子的响应效果, 通过微量注射器加以控制金属阳离子的量, 从而控制阳离子在探针体系的浓度, 保证每滴加一次金属阳离子, 观测一次 RhA 探针的光谱图。滴加过程中, 如果发现光谱数据变动过高时, 应降低金属阳离子的移入量, 直至光谱显示饱和, 另外也要确保金属阳离子溶液加入的总体积不高于整个测试体系体积的 3%。

2 结果与讨论

2.1 分子设计与合成

罗丹明类染料不仅具有摩尔吸光系数相对较大、荧光量子的产率很高、波长较长的特点,而且特殊的内酯环开闭结构可用于控制荧光特性,是设计分子探针的极佳选择。RhA 以工业品罗丹明 B 为原料,通过两步简便的有机合成反应即可得到有效产物。分子的合成相对简便,收率也相对较好,光稳定性佳。

2.2 pH 的影响

罗丹明是一种对 pH 较为敏感的探针,经过有机改性合成试验后,最初开始研究 pH 变化对探针 RhA 所产生的影响。在 2×10^{-5} mol/L 浓度的 HEPES-CH₃CN (体积比 1:1, 含 0.1 mol/L NaNO₃, pH=7.4) 溶液中,探针自身的吸收与荧光强度都很低。使用 1 mol/L HCl 或 NaOH 溶液调节探针溶液的 pH,根据荧光测试结果,探针 RhA 的荧光强度随 pH 改变,得到滴定变化图(图 3)。由图可知,RhA 在较宽的 pH 范围(5.0~9.5)内都不会受到 pH 的影响,说明该探针可以常规复杂水体环境中实现对离子检测而不受 pH 干扰。

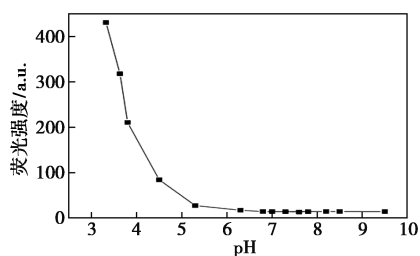
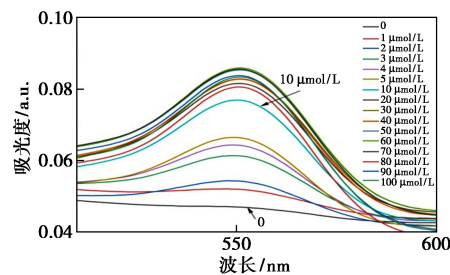


图 3 荧光波长为 570 nm 时探针 A 的 pH 滴定曲线

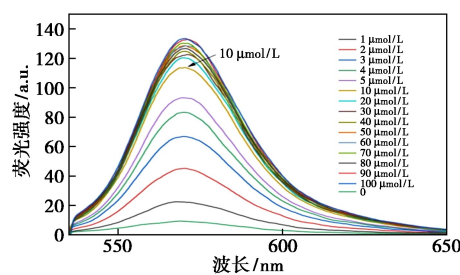
2.3 RhA 的 Cu²⁺ 滴定

为探究探针针对目标 Cu²⁺ 的响应,首先对 RhA 进行铜离子滴定实验。保持测试体系探针 RhA 浓度为 1×10^{-5} mol/L, Cu²⁺ 浓度变化范围为 1×10^{-6} ~ 1×10^{-4} mol/L,测定各个 Cu²⁺ 浓度下探针的荧光和吸收变化,拟合出工作曲线(图 4)。由图 4(b)可知,随着不同浓度的 Cu²⁺ 加入,570 nm 处的荧光强度逐渐增强,至 Cu²⁺ 加入一当量时,荧光强度可从 9.2 a. u. 增强至 113.6 a. u., 增强 12.28 倍。从图 4(a)中可以看出,随着 Cu²⁺ 的加入,552 nm 处的紫外吸收也逐渐增强,呈现肉眼可见的颜色变化。同时从滴定结果可知,无论是荧光还是紫外,在铜离子加入量为 10 μmol/L 后,强度起伏就没那么大了,甚至不

变,原因可能是 RhA 与 Cu²⁺ 按照 1:1 比例进行络合。RhA 在相对较低浓度范围内,和 Cu²⁺ 依然保持较稳定的线性关系。



(a) 吸收曲线光谱



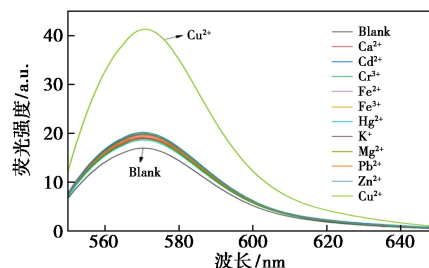
(b) 荧光光谱

2×10^{-5} mol/L HEPES-CH₃CN (体积比 1:1, 0.1 mol/L NaNO₃, pH=7.4), $\lambda_{ex} = 525$ nm, 25°C

图 4 测试体系溶液中 RhA (1×10^{-5} mol/L) 对 Cu²⁺ (1~100 μmol/L) 滴定的吸收曲线光谱和荧光光谱

2.4 选择性和干扰性

用去离子水分别配制 Cu²⁺、Ca²⁺、K⁺、Mg²⁺、Zn²⁺、Fe²⁺、Fe³⁺、Hg²⁺、Cr³⁺、Cd²⁺ 及 Pb²⁺ 的阳离子水溶液。在 2×10^{-5} mol/L HEPES-CH₃CN (体积比 1:1, 含 0.1 mol/L NaNO₃, pH=7.4) 测试溶液体系中,考察探针 RhA (1×10^{-5} mol/L) 对 Cu²⁺ 的选择性并作图(图 5)。



$C(M^+) = 1 \times 10^{-6}$ mol/L 的 2×10^{-6} mol/L HEPES-CH₃CN (体积比 1:1, 0.1 mol/L NaNO₃, pH=7.4), $\lambda_{ex} = 525$ nm, 25°C

图 5 含有不同金属离子测试体系溶液中 RhA (1×10^{-5} mol/L) 对各个金属离子的荧光光谱

根据罗丹明衍生物的开闭环机理,通过图 6 可

看出,未加入金属离子时探针本身几乎没有荧光。在加入 1×10^{-6} mol/L Cu^{2+} 后, Cu^{2+} 与探针分子 RhA 由于络合作用,而使 RhA 内部螺环打开,结果让整个测试体系荧光强度发生改变,颜色从无色转变为粉红色,在波长为 570 nm 处,产生了一个全新的峰。可是在测试体系中,加入当量的其他离子,没有产生颜色和荧光变化,同时通过后续检测可知,即便与其他金属阳离子共存,探针 RhA 仍然能专一地鉴别 Cu^{2+} 而不受其他离子的影响。

2.5 机理研究

探针 RhA 在水-乙腈体系中是没有荧光的,利用高斯计算的前线轨道模型,进一步验证了上述的结论。对探针分子中所有原子选取 B3lyp 方法,使用 6-311+g(2d,p) 基组进行了密度泛函/含时密度泛函的高斯计算。有关探针分子的前线轨道 (HOMO, LUMO) 可视化计算结果及相关热力学参数和过程如图 6 所示。分子激发态和基态之间存在一个扭曲的电荷迁移跃迁 (TICT), 通常情况下, TICT 是跃迁禁阻的,所以分子呈现无荧光状态。而与铜离子络合后,螺环打开,罗丹明共轭体系恢复,因此又发射出荧光。

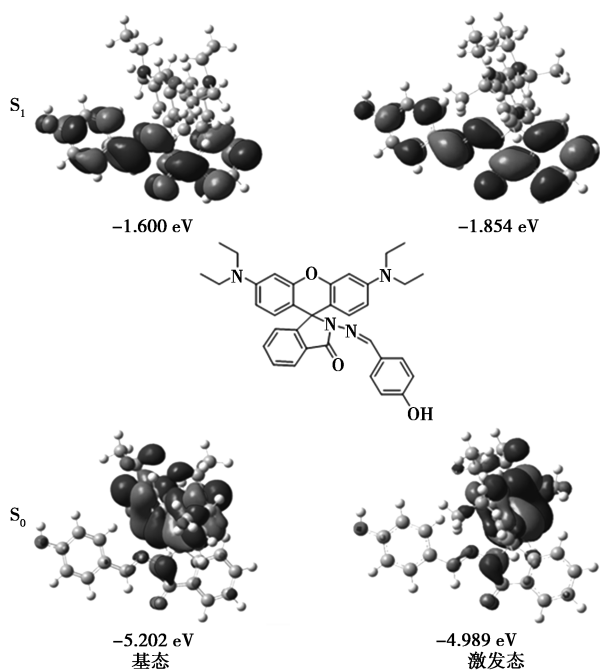


图 6 探针 A 分子的基态(左)与激发态(右)

为了进一步研究探针分子与金属离子的络合机理,运用 Gaussian09 优化了荧光探针的结构。对于分子 RhA 来说,配体芳环与罗丹明母体呈现互相垂直的构型。其中 O_2 原子处的电子云密度是最大的,

这可能是由于 O_1 带来的供电子效应。参与金属络合的几个原子的密力肯电荷 (Mulliken charge) 分布数值分别为: $\text{N}_1, -0.320$; $\text{N}_1, -0.345$; $\text{O}_2, -0.571$ 。

3 结论

设计并通过有机合成实验,有效合成了一种基于罗丹明结构的金属阳离子荧光探针 RhA,通过光谱分析得知, RhA 对 Cu^{2+} 不仅具有较佳的选择性,能够专一性识别,而且其高度的灵敏性得以实现迅速检测。在 RhA 的水相测试体系中,加入极少量 Cu^{2+} ,溶液就可以在短时间内由无色转为粉红色,荧光强度同时也增强很多倍。RhA 可实现在测试体系中,即便 Cu^{2+} 含量较低,也能够迅速检测 (1×10^{-6} mol/L),同时探针可在较宽的环境 pH 范围内应用而不受干扰,这也就使 RhA 在复杂的水环境下对 Cu^{2+} 即时检测成为可能,具有潜在的实际使用价值。

参考文献

- [1] Niu X F, Zhong Y B, Chen R, *et al.* A "turn-on" fluorescence sensor for Pb^{2+} detection based on graphene quantum dots and gold nanoparticles. *Sens Actuators B Chem*, 2017, 1: 1577-1581.
- [2] Liu X, Yang Y, Li Q, *et al.* Portably colorimetric paper sensor based on ZnS quantum dots for semi-quantitative detection of Co^{2+} through the measurement of grey level. *Sens Actuators B Chem*, 2018, 260: 1068-1075.
- [3] Zong J, Yang X L, Trinchì A, *et al.* Biosens [J]. *Bioelectron*, 2014, 51: 330-335.
- [4] Bailey B W, Dagnall R M, West T S. Analytical applications of ternary complexes, 3, a spectrophotometric method for determination of submicrogram amounts of copper. *Talanta* [J]. *Talanta*, 1966, 13: 1661-1665.
- [5] Kawakubo S, Kato H, Iwatsuki M. Catalytic spectrofluorimetric determination of copper using aerial oxidation of ascorbic-acid in the presence of o-phenylenediamine [J]. *Analyst*, 1994, 119: 2119-2122.
- [6] Mayr T, Wencel D, Werner T. Fluorimetric determination of copper (II) in aqueous solution using lucifer yellow CH as selective metal reagent. *Fresenius J Anal Chem*, 2001, 371: 44-48.
- [7] Cao Q E, Wang K T, Hu Z D, *et al.* Syntheses of three new derivatives of 8-aminoquinoline and its applications for fluorimetric determination of copper (II) [J]. *Talanta*, 1998, 47: 921-927.
- [8] Wang L, Wu B, Li Z, *et al.* Facile synthesis of fluorescent graphene quantum dots from coffee grounds for bioimaging and sensing [J]. *Chem Eng J*, 2016, 300: 75-82.
- [9] Yu C, Wang T, Xu K, *et al.* Characterization of a highly Cu^{2+} selective fluorescent probe derived from rhodamine B [J]. *Dyes and Pigments*, 2013, 96(1): 38-44. ■