一种新颖的苯并香豆素衍生物荧光探针的制备及其对汞离子的高选择性检测

刁学文[1],杨 迪[1],刘 寄[1],王兆刚[2],蔡小华[1*]
(1.贵州民族大学化学工程学院,贵州 贵阳 550025;
2.济南百惠凯希汽车零部件有限公司,山东 济南 250200)

摘要:从价廉易得的 2-羟基-1-萘甲醛和氰乙酰胺原料出发,通过一锅法缩合反应得到苯并香豆素衍生物新型荧光探针 L,其化学结构经过 IR、^{1}HNMR、^{13}CNMR、ESI-MS 确证。根据 Job 曲线、荧光滴定等确定探针 L 与 Hg^{2+} 形成 2∶1的配合物。该方法对 Hg^{2+} 测定的线性范围为 1.6×10^{-8} ~ 0.8×10^{-6} mol/L,络合常数为 1.45×10^{4} L/mol,检测限为 4.13×10^{-7} mol/L。探针 L 具有稳定性好、操作简单、灵敏度和选择性高等优点,可以通过荧光增强信号方便地检测出贵州中药材天麻、太子参和贵州固体废渣磷石膏中是否含有 Hg^{2+}。

关键词:苯并香豆素衍生物;Hg^{2+} 检测;荧光探针;荧光增强;高选择性
中图分类号:TS207.3 **文献标志码**:A **文章编号**:0253-4320(2022)09-0245-05
DOI:10.16606/j.cnki.issn0253-4320.2022.09.049

Preparation of a novel fluorescent probe based on benzocoumarin derivative and its highly selective detection for Hg^{2+}

DIAO Xue-wen[1], *YANG Di*[1], *LIU Ji*[1], *WANG Zhao-gang*[2], *CAI Xiao-hua*[1*]
(1.School of Chemical Engineering, Guizhou Minzu University, Guiyang 550025, China;
2.BHKS Automobile Parts Co., Ltd., Jinan 250200, China)

Abstract: A novel benzocoumarin derivative fluorescent probe L is obtained through one pot condensation reaction with cheap and easily available 2-hydroxy-1-naphthalene formaldehyde and cyanoacetamide as raw materials. Its chemical structure is confirmed by IR, ^{1}HNMR, ^{13}CNMR and ESI-MS. In a solution of DMSO/EtOH (v/v = 1∶1) and at 365 nm wavelength, the combination of probe L and Hg^{2+} show blue color light, and the fluorescence intensity is enhanced. The selective, sensitive and anti-interference experiments demonstrate that probe L exhibits high selectivity and sensitivity recognition ability to Hg^{2+}. According to job curve and fluorescence titration, probe L forms a 2∶1 ratio of complex with Hg^{2+}, their complex constant and detection limit is 1.45×10^{4} L·mol^{-1} and 4.13×10^{-8} mol·L^{-1}, respectively. The linear range of this method for the determination of Hg2 + is from 1.6×10^{-8} mol·L^{-1} to 0.8×10^{-6} mol·L^{-1}. Probe L also exhibits significant advantages such as good stability, simple operation, high sensitivity and selectivity. It can easily be used to detect whether there is Hg^{2+} in traditional Chinese medicines such as Gastrodiaelata and Radix Pseudostellariae, and solid waste phosphogypsum.

Key words: benzocoumarin derivative; Hg^{2+} detection; fluorescence probe; fluorescence enhancement; high sensitivity

金属的广泛使用对科技发展、工业生产、人类生活和环境保护起着重要的作用,由此也带来了许多重金属污染问题。目前,重金属污染对自然环境和人类健康构成巨大威胁,发展简单有效的分析方法检测重金属离子显得尤为迫切[1]。汞(Hg)是地球上毒性较强的重金属元素,因在自然生态系统中的积累而受到越来越多的关注。汞离子被排放到环境中,可通过生物富集进入生物体内,会对肾脏、皮肤和 DNA 造成严重损害。考虑到 Hg^{2+} 对生态环境和人类健康的危害,开发低成本、操作简便和选择性好的 Hg^{2+} 检测手段仍然是非常重要的。

基于超分子概念设计的荧光探针分析具有操作简单、成本廉价、实时监测、灵敏度高等优点而受到重视,荧光探针检测金属离子已经成为研究热点领域之一[2-3]。近年来,许多简单和低成本的化学传感器已经被开发出来并用于阳离子受体的检测,如基于吩噻嗪[4]、磺酰脲[5]、香豆素[6]、吡唑[7]和纳米粒子[8-9]等开发出了多种 Hg^{2+} 荧光探针,但这些探针还存在一些缺陷,如化学结构比较复杂,不易合成得到;多数探针是荧光猝灭型,选择性和灵敏度不高;大部分汞离子探针为反应型,存在响应慢、稳定性差、实际应用有限等。因此,寻求高灵敏度和选择

收稿日期:2021-11-10;**修回日期**:2022-07-05
基金项目:国家自然科学基金项目(51863004);贵州省科技计划基础研究项目([2018]1077)
作者简介:刁学文(1994-),女,硕士生;蔡小华(1966-),男,博士,教授,研究方向为有机合成反应及分子设计,通讯联系人,caixh1111@163.com。

性、结构简单、制备方便的新颖 Hg^{2+} 荧光探针仍然具有很大的吸引力。香豆素结构作为一种重要的荧光基团，具有生物毒性低和荧光性能稳定等优点[9-10]。本文中以 2-羟基-1-萘甲醛和氰乙酰胺为原料，经过一锅法缩合反应合成 2-亚氨基苯并[f]香豆素-3-羧酸酰胺作为一种新型荧光探针 L，分子结构包含香豆素结构作为荧光基团，亚胺和酰胺基团作为识别位点，用于选择性荧光识别与检测 Hg^{2+}。

天麻和太子参是贵州地道的稀有药用植物，天麻在治疗小儿惊风、癫痫抽搐、破伤风、头痛眩晕、风湿痹痛等方面效果显著[11-13]，太子参具有益气健脾的功效，在心肌保护、降血糖、免疫调节等方面具有显著作用[14-15]。随着我国磷肥产能的不断增加，固体废渣磷石膏随意大量堆积，造成水体、土地和大气环境污染[16]，快速检测磷石膏中是否含有汞离子非常必要。本文中希望通过应用探针 L 的荧光分析方法，简单、快速地检测天麻、太子参和磷石膏中是否含有微量汞离子，从而进一步验证荧光探针 L 的实际应用价值。

1 实验部分

1.1 实验材料和分析仪器及试剂

荧光光谱用 F-30 荧光分光光度计测定；核磁共振谱用 Bruker Avance NEO-400M 核磁共振仪测定，TMS 为内标，DMSO-d_6 为溶剂；质谱用 Waters Xevo G2-SQTOF 质谱仪记录；红外光谱用 Nicolet 6700 型傅里叶红外光谱仪记录，所用样品采用 KBr 压片。所有试剂和溶剂均为商用分析级，使用时无需进一步纯化。所用的金属阳离子 Na^+、K^+、Fe^{3+}、Al^{3+}、Hg^{2+}、Ag^+、Ca^{2+}、Cu^{2+}、Zn^{2+}、Pb^{2+}、Cd^{2+}、Mg^{2+}、Mn^{2+}、Ni^{2+}、Co^{2+}均为高氯酸盐，配制的溶液依次编号为 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15。

1.2 荧光探针 L 的合成

通过 2-羟基-1-萘甲醛和氰乙酰胺的一锅法缩合反应制得荧光探针 L(图 1)。在盛有 25 mL 异丙醇的圆底烧瓶中，分别加入 2-羟基-1-萘甲醛(0.861 g,5 mmol)、氰乙酰胺(0.420 g,5 mmol)和 5 滴哌啶，在不断搅拌下回流反应 1 h，薄层色谱(TCL)检测反应进程，反应完成，有大量沉淀产生，冷却至室温，抽滤固体产物，用 DMF 重结晶，得到 0.896 g 黄绿色结晶产物 L，收率 75%。IR：(KBr，ν，cm^{-1})：1 675(C═O)、1 631(C═NH)、3 432(NH_2)；^{1}HNMR(400 MHz，DMSO-d_6)，δ：9.63(s,1H)，9.06(s,1H)，8.91(s,1H)，8.42(d，J = 8.5 Hz,1H)，8.16(d，J = 8.8 Hz,1H)，8.03(d，J = 8.0 Hz,1H)，7.87(s,1H)，7.77～7.68(m,1H)，7.59(t，J = 7.6 Hz,1H)，7.42(d，J = 9.2 Hz,1H)；^{13}CNMR(101 MHz，DMSO-d_6)，δ：163.1，155.5，153.5，136.3，134.1，129.5，129.3，128.9，125.8，121.8，120.0，115.8，111.8。ESI-MS，m/z：[M+H]$^+$ = 239。

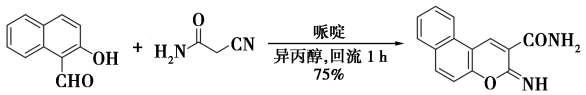


图 1 探针 L 的合成

1.3 荧光光谱实验的一般步骤

将探针 L 溶于 DMSO 中，配制成浓度为 2.0×10^{-4} mol/L 的溶液备用。15 种金属阳离子溶于 DMSO 溶液中，配制成 4.0×10^{-3} mol/L(主体浓度的 20 倍)的溶液备用，备用溶液适当稀释后用于所有光谱实验。在 370 nm 处激发得到荧光发射光谱，激发狭缝宽度为 20 nm，发射狭缝宽度为 10 nm。所有实验保持探针 L 的浓度(2.0×10^{-5} mol/L)不变，添加各种阳离子后，记录探针 L 荧光光谱的变化。

2 结果与讨论

2.1 探针 L 对金属离子的识别性能

在 DMSO/EtOH(v/v = 1∶1)溶液中，研究 L 对 15 种金属离子识别性能(图 2)，结果表明，在荧光激发波长 λ_{ex} = 370 nm 处，探针 L 本身在 464 nm 处出现较弱的荧光发射峰，随着 Hg^{2+} 加入，溶液荧光发射峰强度迅速增强，而其他金属离子的荧光强度没有明显的变化，说明 L 对其他阳离子没有识别。在紫外线灯波长 365 nm 下，探针 L 对 Hg^{2+} 具有肉眼可见的比色识别能力，溶液从淡蓝色变为亮蓝色，表明 L 对 Hg^{2+} 的识别具有高度的专一性。

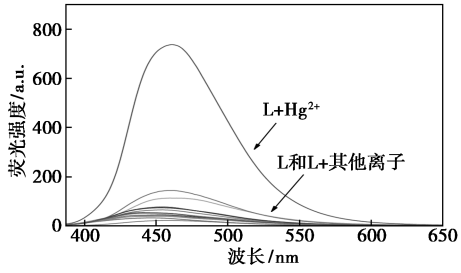
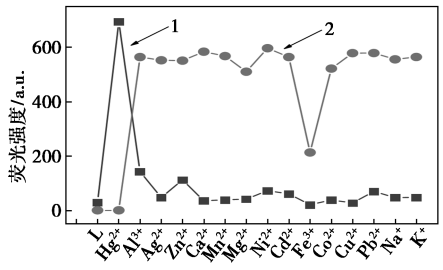


图 2 探针 L 加入金属离子的荧光识别谱图

2.2 探针 L 的抗干扰实验

通过抗干扰实验，进一步考察共存离子可能对探针 L 识别 Hg^{2+} 的影响。在 DMSO/EtOH(v/v =

1∶1)、浓度 2.0×10^{-4} mol/L 探针 L 溶液中,加入 4.0×10^{-3} mol/L 的 Hg^{2+},再分别加入相同浓度和体积的其他 14 种金属阳离子,考察探针溶液的荧光强度变化(图 3),从图 3 可以看出,由于 Fe^{3+}是过渡金属,本身存在一定磁性而引起荧光淬灭现象外[15],其他金属阳离子存在均不会导致荧光光谱发生显著变化,表明探针 L 对 Hg^{2+}识别具有很强的抗干扰能力,而不受其他共存离子的干扰。



1—L 和 L+其他离子;2—L+Hg^{2+}+其他离子

图 3　共存离子对探针 L 识别 Hg^{2+}的荧光吸收光谱

2.3　荧光滴定光谱实验

不同浓度 Hg^{2+}对 L 的滴定实验如图 4 所示,随着 Hg^{2+}浓度的增加,L 在 464.2 nm 处的荧光发射强度急剧增强,表明探针 L 对 Hg^{2+}具有很高的灵敏度。从荧光强度随 Hg^{2+}浓度变化曲线图 5 和线性拟合图 6 可知,当 Hg^{2+}的浓度是 L 浓度的 1.95 倍时,L 与 Hg^{2+}的结合已经达到平衡,当 Hg^{2+}浓度在 1.6×10^{-8}~0.8×10^{-6} mol/L 体系的荧光强度与 Hg^{2+}浓度呈现出良好的线性关系,回归方程 $Y=532.595\ 18X+54.747\ 75$,线性相关系数($R^2$)为 0.990 1,根据

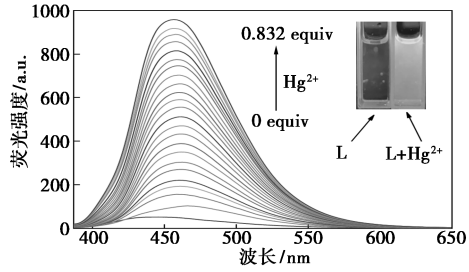


图 4　不同浓度 Hg^{2+}存在下 L 的荧光光谱

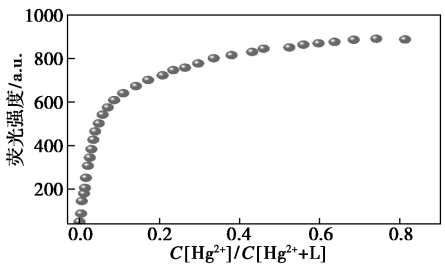


图 5　荧光强度随 Hg^{2+}浓度变化的曲线图

$3\sigma/S$ 法可计算最低检测限为 4.13×10^{-7} mol/L,说明 L 对 Hg^{2+}具有较高的检测灵敏度,同时,低浓度的 Hg^{2+}具有非常好的线性响应,说明探针 L 对 Hg^{2+}具有灵敏且高效的荧光识别能力。

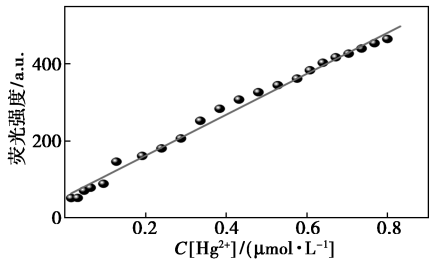


图 6　荧光强度随 Hg^{2+}浓度变化的曲线拟合图

基于 Hg^{2+}对 L 的荧光滴定实验,可以得出 L 能够与 Hg^{2+}选择性结合,通过考察 464.2 nm 处荧光强度随[Hg^{2+}]与[Hg^{2+}+L]之比变化的工作曲线图 7,可以得出荧光探针 L 与 Hg^{2+}的结合比为 2∶1,即 2 分子 L 与 1 个 Hg^{2+}形成稳定的配合物。

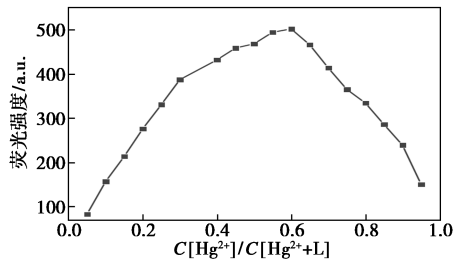
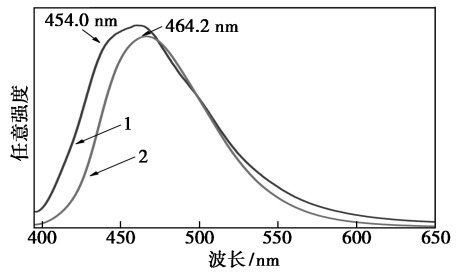


图 7　荧光强度随[Hg^{2+}]/[Hg^{2+}+L]变化的工作曲线

2.4　L 与 Hg^{2+}的机理探讨

2.4.1　荧光光谱图分析

通过比较探针 L 及其与 Hg^{2+}形成配合物的荧光发射光谱(图 8),发现探针 L 与 Hg^{2+}配合物荧光发射光谱从 464.2 nm 移至 454.0 nm,产生 10.2 nm 蓝移。由荧光发射峰位的变化情况,可以确定 L 与 Hg^{2+}已经形成了稳定的配合物,导致荧光发色团的电子云密度变小,产生蓝移现象,推断出 L 与 Hg^{2+}结合而发生识别[16]。

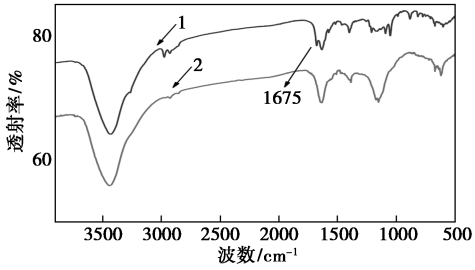


1—L;2—L+Hg^{2+}

图 8　L 和 L 与 Hg^{2+}配合物的固体荧光发射光谱

2.4.2 红外光谱图分析

通过对比探针 L 及 L 与 Hg^{2+} 所形成的配合物红外吸收光谱,考察荧光主体形成配合物前后官能团吸收峰的变化,初步推测 L 与 Hg^{2+} 的结合方式[17]。从 IR 光谱图发现,主要官能团的红外光谱吸收峰有所变化(图 9)。L 分子中 1 675 cm^{-1} 处的羰基(C═O)的特征吸收峰消失,表明 L 的羰基基团可能与 Hg^{2+} 直接结合,L 分子中氨基特征吸收峰在 3 430~442 cm^{-1} 没有明显变化,说明酰胺基中氨基没有直接与汞离子结合,不是结合点;亚胺基团在 1 630 cm^{-1} 处吸收峰有所蓝移,且吸收强度增加,说明亚胺基可能是结合位点。因此,由红外光谱推断,L 分子与 Hg^{2+} 结合主要位点可能是亚胺基和酰胺中的羰基。



1—L;2—L+Hg^{2+}

图 9 荧光探针 L 及 L 与 Hg^{2+} 配合物的红外光谱图

2.4.3 质谱分析

根据工作曲线图得知,2 分子 L 与 1 分子 Hg^{2+} 结合,机理示意图如图 10。通过比较探针 L 及其与 Hg^{2+} 形成配合物的质谱图可知,m/z=239 为化合物 L 的分子离子峰[$M+H^+$](图 11),m/z=677 为化合物 L 与 Hg^{2+} 形成的配合物的分子离子峰[$M+H^+$](图 12),结果与工作曲线测定的结合比一致,进一步验证了推测。

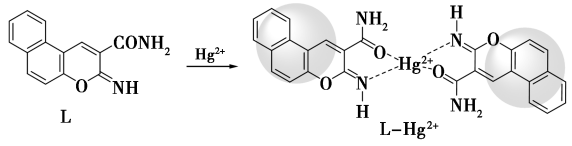


图 10 L 与 Hg^{2+} 的响应机理示意图

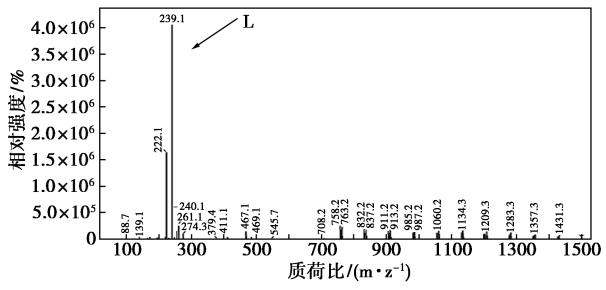


图 11 化合物 L 的质谱图

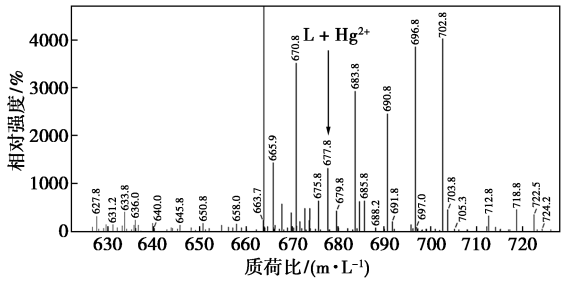


图 12 L 与 Hg^{2+} 配合物的质谱图

2.4.4 ^{1}HNMR 滴定分析

比较荧光主体 L 及用 Hg^{2+} 滴定后形成配合物的 ^{1}HNMR,可以进一步验证荧光主体 L 和客体 Hg^{2+} 的结合方式(图 13)。从 L 及其配合物 ^{1}HNMR 可以看出,亚氨上的氢从 9.63×10^{-6} 移至 11.0×10^{-6},酰胺上氨基氢分别从 9.06×10^{-6} 和 8.91×10^{-6} 移至 9.06×10^{-6} 和 9.63×10^{-6},芳香环上的氢均向低场有所移动,说明体系电子密度增大,与配合物荧光增强是一致的,但是,形成配合物会导致双键碳氢的去屏蔽效应增强,使得双键碳氢 ^{1}H 化学位移向高场移动而有所降低,因此,可以验证 L 与 Hg^{2+} 的结合方式及可能荧光变化。

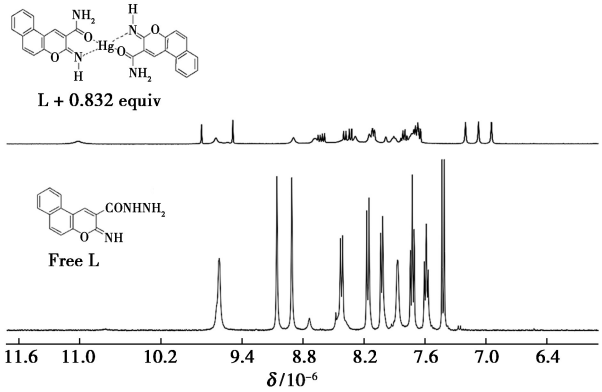


图 13 L 及其 Hg^{2+} 配合物的 ^{1}HNMR

2.5 L 与 Hg^{2+} 识别的时间响应性

为了考察 L 与 Hg^{2+} 识别快慢,进行了时间响应性实验。在探针 L 浓度为 2.0×10^{-4} mol/L 的 DMSO/EtOH(v/v=1∶1)混合物溶液中,加入 20 当量 Hg^{2+}(c=4.0×10^{-3} mol/L),考察在 464.2 nm 处荧光强度随时间的变化情况(图 14)。从图 14 可得出,加入金属阳离子 Hg^{2+} 后,L 在 464.2 nm 处的荧光发射强度增加,在 100 s 左右达到平衡状态,说明整个识别过程完成迅速,荧光探针 L 对 Hg^{2+} 具有快速响应能力。

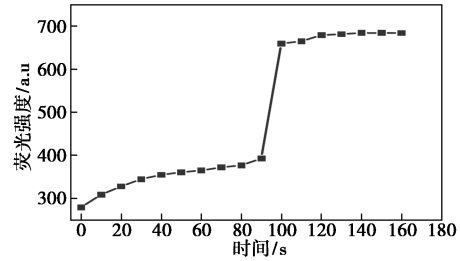


图 14　L 与 Hg^{2+}识别中荧光强度随时间变化

3　探针 L 检测 Hg^{2+}的实际应用

为了考察探针 L 的实际应用,制备了天麻、太子参、磷石膏的 DMSO 溶液作为识别客体。天麻、太子参来自贵州省黔东南三穗县,磷石膏来自贵州省黔南州。将天麻、太子参、磷石膏放至烘箱中 50℃烘干至恒重,粉碎研磨,过 100 目筛,称样品 2 g 置于 50 mL 烧瓶中,加入 20 mL 的 5%高氯酸,于 50℃下加热 20 min,过滤不溶物,取滤液 2 mL 转入 50 mL 容量瓶中,加水稀释至刻度,作为客体溶液。取适量客体溶液加入至浓度为 2.0×10^{-4} mol/L 的主体 L(DMSO/EtOH 体积比 1∶1),加入稀释至 5 mL 的待测溶液用于荧光测试。天麻、太子参、磷石膏溶液的荧光强度较低,将 3 种溶液作为客体加入到 L 中,如表 1 所示,发现加入天麻、太子参溶液后体系荧光强度没有明显变化,而加入磷石膏溶液体系后荧光强度显著增加,说明天麻、太子参溶液中没有检测到微量 Hg^{2+},磷石膏溶液含有一定量的 Hg^{2+},因此,实验结果说明探针 L 可以快速检测样品中是否含有 Hg^{2+}。

表 1　探针 L 检测天麻、太子参、磷石膏中的 Hg^{2+} a. u.

	L 和客体的荧光强度	L+客体的荧光强度
L	29	
天麻	107	110
太子参	102	95
磷石膏	4	175

4　结论

从价廉易得的 2-羟基-1-萘甲醛和氰乙酰胺原料出发,通过一锅法缩合反应得到 2-亚氨基苯并[f]香豆素-3-羧酸酰胺荧光探针 L,其化学结构经过 IR、^{1}HNMR、^{13}CNMR、ESI-MS 确证。在 DMSO/EtOH(v/v=1∶1)溶液中,探针 L 与 Hg^{2+}结合显亮蓝色且荧光强度明显增强。灵敏度实验和抗干扰实验表明其对 Hg^{2+}识别具有较高灵敏度和选择性。Job 曲线、荧光滴定等确定探针 L 与 Hg^{2+}形成 2∶1的配合物,络合常数为 1.45×10^{4} $(mol/L)^{-1}$,检测限为 4.13×10^{-8} mol/L。探针 L 能够方便快速地检测中药材天麻、太子参和固体废渣磷石膏中是否含有 Hg^{2+},因此,探针 L 是一种稳定性好、操作简单、灵敏度和选择性高,具有实际应用价值的新颖荧光探针。

参考文献

[1] Moragues M E, Martinez-Manez R, Sancenon F. Chromogenic and fluorogenic chemosensors and reagents for anions. A comprehensive review of the year 2009[J]. Chem Soc Rev, 2011, 40(5): 2593-2643.

[2] Mandal A, Maity A, Bag S, *et al*. Design and synthesis of dual probes for detection of metal ions by LALDI MS and fluorescence: application in Zn(Ⅱ) imaging in cells[J]. RSC Adv, 2017, 7(12): 7163-7169.

[3] Chen W J, Ma X X, Chen H J, *et al*. Fluorescent probes for pH and alkali metal ions[J]. Coord Chem Rev, 2021, 427: 213584.

[4] He G J, Liu C X, Liu X B, *et al*. Design and synthesis of a fluorescent probe based on naphthalene anhydride and its detection of copper ions[J]. PLoS One, 2017, 12(10): 0186994.

[5] Ronaldo O, Carvalho F, Paula H, *et al*. On the fluorescent, steric and electronic factors affecting the detection of metallic ions using an imidazolyl-phenolic derived fluorescent probe[J]. J Braz Chem Soc, 2017, 28(10): 1896-1904.

[6] Park S H, Kwon N, Lee J H, *et al*. Synthetic ratiometric fluorescent probes for detection of ions[J]. Chem Soc Rev, 2020, 49(1): 143-179.

[7] Wang C E, Wang L Z, Fang S M, *et al*. Two novel fluorescent probes based on phenothiazine: synthesis and "naked-eye" colorimetric recognition of Hg^{2+}[J]. Res Chem Intermediat, 2019, 45(4): 2045-2063.

[8] Yılmaz D D, Demirezen D A, Mıhçıokur H. Colorimetric detection of mercury ion using chlorophyll functionalized green silver nanoparticles in aqueous medium[J]. Surf Interfaces, 2021, 22: 1945-1949.

[9] Yang G, Meng X, Fang S M, *et al*. A highly selective colorimetric fluorescent probe for detection of Hg^{2+} and its application on test strips[J]. RSC Adv, 2019, 9(15): 8529-8536.

[10] 罗金尚,王莹莹,谭克俊.基于银纳米粒子色度法检测 Hg^{2+}[J].化学学报,2012,70(18):1945-1949.

[11] 左方涛,徐威,赵爱武.基于功能化 Fe_3O_4@Ag 纳米粒子快速检测 Hg^{2+}的 SERS 方法[J].化学学报,2019,77(4):379-386.

[12] Ukhov S V, Syropyatov B Y, Novikova V V, *et al*. Synthesis and biological activity of substituents 2-iminobenzo[f] coumarin-3-carboxylic acid amide[J]. Pharm Chem J, 2011, 45(4): 32-34.

[13] Meng X J, Zhao J Z, Zhang Y P, *et al*. A fluorescent chemosensor based on coumarin for squential recognition of Al and pyrophosphate (PPi) in aqueous solution[J]. Chinese J Org Chem, 2021, 3: 1161-1167.

[14] 刘云霞,狄永国,仇全雷,等.基于转录组测序初步揭示天麻生长代谢的分子机制[J].中草药,2021,52(3):827-837.

[15] 贾林川,胡晓峰,邵露,太子参内生真菌草酸青霉中 1 个新的香豆酮类化合物太子参内生真菌草酸青霉中 1 个新的香豆酮类化合物[J].中草药,2020,50(22):5681-5686.

[16] 王雨田,何玉成,闫桂权,我国中药材产地市场整合研究一以金银花、枸杞子、板蓝根和太子参为例[J].中草药,2020,51(6):1669-1676.■