

基于甘氨酸席夫碱的 Zn^{2+} 荧光探针的制备及性能研究

赖倪, 张胜婷, 邹菲, 李中燕, 袁霖*

(湖南科技学院化学与生物工程学院, 湖南永州 425199)

摘要:以甘氨酸与 5-氯水杨醛为原料, 构建了一种高效的席夫碱 Zn^{2+} 荧光探针分子 L, 结构由 ^1H-NMR 和 $^{13}C-NMR$ 进行了表征, 性能通过光谱实验进行了研究。光谱分析实验结果表明, 探针分子 L 对 Zn^{2+} 具有出色的选择性和灵敏度, 在 $0 \sim 14 \mu mol/L$ 浓度范围内, 体系荧光强度与 Zn^{2+} 浓度呈线性关系, 检出限为 $13.72 nmol/L$, 在 $365 nm$ 紫外灯下肉眼观察到明显的荧光颜色变化, 可实现 Zn^{2+} 可视化检测。通过 Job 曲线和 DFT 理论计算对识别机理进行了研究, 结果表明, 探针分子 L 与 Zn^{2+} 以摩尔比 $2:1$ 结合。此外, 水样检测实验表明探针分子 L 具有应用于检测实际水样中 Zn^{2+} 的潜力。

关键词:席夫碱; 荧光探针; 锌离子; 识别机理; 水样检测

中图分类号: O622.4

文献标志码: A

文章编号: 0253-4320(2023)12-0242-04

DOI: 10.16606/j.cnki.issn0253-4320.2023.12.044

Synthesis and properties of Zn^{2+} fluorescent probe based on glycine Schiff-base

LAI Ni, ZHANG Sheng-ting, ZOU Fei, LI Zhong-yan, YUAN Lin*

(School of Chemistry and Biological Engineering, Hunan University of Science and Engineering, Yongzhou 425199, China)

Abstract: A novel efficient Schiff-base fluorescent probe L is synthesized from glycine and 5-chlorosalicylaldehyde, and characterized by means of ^1H-NMR and $^{13}C-NMR$. Its performance is studied by means of spectral experiments. It is verified that the probe L shows excellent selective and sensitive to Zn^{2+} . There is a good linear relationship between the fluorescence intensity of probe L and the concentration of Zn^{2+} in a range of 0 to $14 \mu mol \cdot L^{-1}$. The detection limit is $13.72 nmol \cdot L^{-1}$. Visible color change can be observed with the naked eye under the ultraviolet lamp, which can realize the visual detection of Zn^{2+} . The recognition mechanism is explored through Job curve and DFT theoretical calculation, and the results show that the probe molecule L complexes with Zn^{2+} in a molar ratio of $2:1$. Moreover, it is verified through water sample tests that probe L can be used to detect Zn^{2+} in actual water samples.

Key words: Schiff-base; fluorescent probe; zinc ion; recognition mechanism; water samples detection

组成人体的元素有 60 多种, 而 Zn^{2+} 在人体内的含量约为 0.004% , 同时, Zn^{2+} 是人体内含量第二丰富的微量元素, 在神经信号传输、基因表达、免疫功能等多种生理过程中发挥重要作用^[1-3]。如果人体内 Zn^{2+} 代谢紊乱, 将会导致多种疾病, 如食欲不振、身材矮小、癫痫、帕金森氏病、家族性脊髓侧索硬化症等^[4-6]。此外, 由于锌的不当开采、冶炼加工及其在电镀、造纸等行业的广泛使用, Zn^{2+} 对水体和土壤已经造成了严重的污染^[7-8]。因此, Zn^{2+} 的识别检测对人体健康的监测与环境保护等均具有重大意义。

对锌离子进行识别检测的分析方法主要有分光光度法、原子吸收光谱法、质谱法、色谱法、电化学法、伏安法等, 其中荧光法由于高选择性、低检测限、

简便快捷、可原位分析等突出优点得到了越来越多的关注与研究^[9-10]。本文中以甘氨酸与 5-氯水杨醛为原料制备了一种氨基酸席夫碱荧光探针, 通过紫外光谱和荧光光谱研究了该探针分子对 Zn^{2+} 的特异性识别能力和识别机理, 并进一步探究了该荧光探针对实际水样中 Zn^{2+} 的检测性能。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

主要仪器: 核磁共振波谱仪 (AVANCE III HD 400 MHz, 德国 Bruker 公司), 紫外分光光度计 (UV-2401 PC, 日本岛津公司), 荧光分光光度计 (RF-6000, 日本岛津公司), 超纯水机 (UPH-III-10TN,

收稿日期: 2023-02-09; 修回日期: 2023-10-07

基金项目: 湖南省自然科学基金项目 (2021JJ30291); 湖南省教育厅项目 (21A0518, 21C0691); 国家级大学生创新创业训练计划项目 (202210551005X, 202210551011X); 湖南省大学生创新创业训练计划项目 (湘教通 [2022] 174 号 4207, 4213); 永州市指导性科技计划项目 (永科发 [2020] 19 号第 12 项)

作者简介: 赖倪 (2002-), 女, 本科生; 袁霖 (1984-), 男, 博士, 副教授, 研究方向为有机功能分子的设计合成及应用, 通讯联系人, tcyl431102@163.com。

四川优普超纯科技有限公司)。

主要试剂:甘氨酸(优级纯)、5-氯水杨醛(优级纯)、甲醇(分析纯),待测金属离子对应的盐为盐酸盐或硝酸盐(优级纯),实验所用试剂均购于上海泰坦科技股份有限公司。

1.2 探针 L 的合成及表征

如图 1 所示,称取 75 mg (1 mmol) 甘氨酸和 56 mg (1 mmol) 氢氧化钾溶于 15 mL 甲醇中,室温搅拌 15 min,然后向上述溶液加入对应的 156 mg (1 mmol) 5-氯水杨醛,反应体系在 45℃ 的水浴条件下反应 1 h,期间会有大量固体生成。反应完全后,将反应液冷却至室温,抽滤,并用少量甲醇洗涤,干燥,即可得到探针分子 L,淡黄色固体,产率 90%。 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6), δ : 14.48 (s, 1H), 8.27 (s, 1H), 7.36 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H), 7.21 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H), 6.67 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 3.90 (s, 2H)。 ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6), δ : 168.45, 166.84, 163.45, 134.90, 131.79, 122.89, 117.62, 58.59。

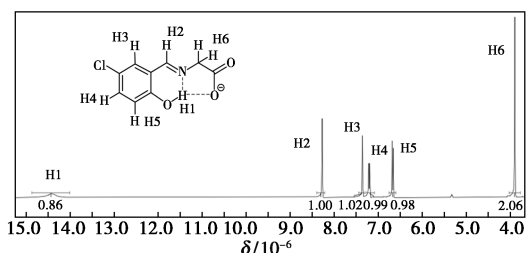


图 1 探针分子 L 的核磁氢谱图

1.3 光谱性质测试

探针及金属离子储备液的制备:将探针分子 L 溶于乙醇制得探针储备液 (2 mmol/L),使用盐酸盐或硝酸盐配制了 15 种常见金属离子储备液 (2 mmol/L)。配制 4-羟乙基哌嗪乙磺酸 (Hepes) 溶液 (0.1 mg/mL),并调节酸碱度至 pH = 7.43,作为缓冲溶液。检测体系为 EtOH-H₂O (9:1, v/v, pH = 7.43)。

紫外-可见吸收光谱的测定:移取 20 μ L 探针储备液,加入 Zn^{2+} 溶液和缓冲溶液,然后加入适量的乙醇定容至 2 mL,测定紫外-可见吸收光谱。

荧光光谱的测定:移取 20 μ L 探针储备液,加入 Zn^{2+} 溶液和缓冲溶液,然后加入适量的乙醇定容至 2 mL,测定条件为: $\lambda_{ex} = 369$ nm, $\lambda_{em} = 375 \sim 650$ nm,数据间隔 1.0 nm,扫描速度 6 000 nm/min,激发/发射狭缝宽度为 3 nm/3 nm。

2 结果与讨论

2.1 结构分析

如图 1 所示, δ 3.90 处的 H6 对应甘氨酸结构中的亚甲基氢 (CH_2), δ 7.0 左右的 H3、H4 和 H5 对应苯环上的氢, δ 8.29 处的 H2 对应亚胺结构中的氢 ($CH=N$), δ 14.35 处的宽峰 H1 对应酚羟基结构中的氢 ($Ar-OH$),值得注意的是这里的酚羟基较原料 5-氯水杨醛中的酚羟基的化学位移 (δ 11.0 左右) 显著向低场移动,并且峰明显变宽,这是由于酚羟基中的 H 与亚胺结构中的 N 和羧酸负离子中的 O⁻ 形成了较强的分子内氢键,从而导致化学位移显著向低场移动,同时伴随着峰型变宽。

2.2 紫外-可见吸收光谱

探针分子 L 分子中 C=N 基团中的 N 原子和 Ar-OH 中的 O 原子均易与 Zn^{2+} 配位,从而引起探针分子 L 的紫外-可见吸收光谱的变化。如图 2 所示,探针分子 L 本身在 332、423 nm 处有 2 个吸收带,探针分子的乙醇溶液呈淡黄色。随着 Zn^{2+} 的加入,探针分子原来的吸收带消失, L + Zn^{2+} 体系在 375 nm 处出现一个新的吸收带,同时溶液的淡黄色褪去。实验表明,探针分子 L 与 Zn^{2+} 形成了配合物。

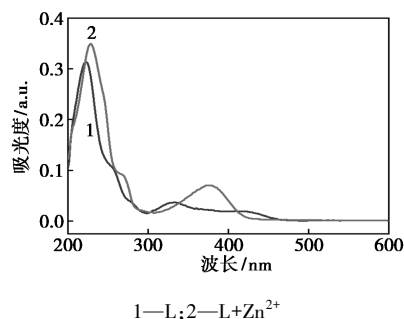


图 2 探针分子 L 与 L+ Zn^{2+} 的紫外-可见吸收光谱

2.3 荧光光谱

如图 3 所示,探针分子 L 的乙醇溶液在 481 nm 处具有一定的荧光强度,溶液能够发出微弱的淡绿

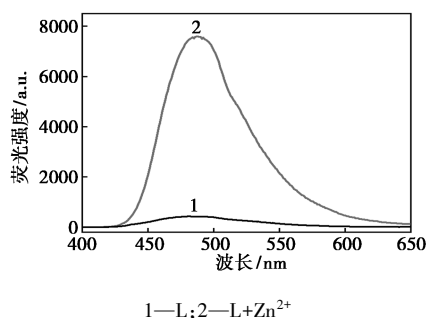


图 3 探针分子 L 与 L+ Zn^{2+} 的荧光光谱

色荧光。加入 Zn^{2+} 后,溶液体系在 488 nm 处的荧光强度显著增强,荧光强度增强近 18 倍,同时溶液发出明亮的蓝紫色荧光,据此可以实现 Zn^{2+} 的裸眼识别。

进一步开展了荧光滴定实验,当 Zn^{2+} 浓度 $< 14 \mu\text{mol/L}$ 时,随着 Zn^{2+} 浓度的增加,溶液的荧光强度不断增强,当 Zn^{2+} 浓度 $> 14 \mu\text{mol/L}$ 时,溶液的荧光强度增长缓慢并逐渐达到饱和(图 4)。如图 5 所示, $L+Zn^{2+}$ 体系的荧光强度与 Zn^{2+} 的浓度在 $0 \sim 14 \mu\text{mol/L}$ 范围内具有良好的线性关系,相关系数为 0.992 07,检出限为 13.72 nmol/L,远低于国标 GB 5749—2006《生活饮用水卫生标准》规定的饮水中 Zn^{2+} 含量的限量值 1.0 mg/L(约 $15 \mu\text{mol/L}$),表明该荧光探针可以对 Zn^{2+} 进行高效地识别检测^[11]。

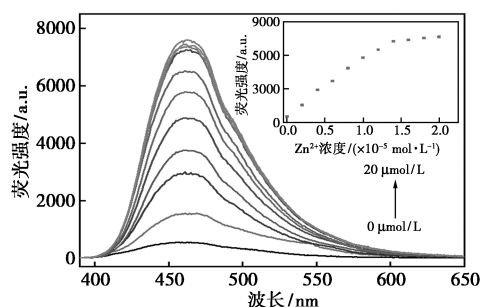


图 4 探针 L 的荧光滴定光谱

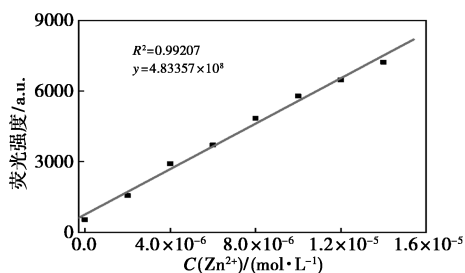


图 5 探针 L 荧光强度与 Zn^{2+} 浓度的关系

2.4 金属离子选择性和共存离子抗干扰性

进一步研究了探针分子 L 的金属离子选择性和共存离子抗干扰性。在含有 $10 \mu\text{mol/L}$ 探针分子 L 的 EtOH-H₂O(9:1, v/v, pH=7.43) 体系中分别加入 $20 \mu\text{mol/L}$ 的 15 种常见的金属离子,如表 1 所示,只有 Zn^{2+} 能使探针分子 L 的荧光强度显著增强,而其他离子对其荧光强度几乎没有影响,表明该探针对 Zn^{2+} 有特异性响应。在共存离子抗干扰性实验中,除了 Cu^{2+} 和 Co^{2+} ,其他金属离子对溶液体系的荧光强度影响不明显,表明探针分子 L 可以高效地选择性识别检测 Zn^{2+} ,具有较好的离子抗干扰性。在实际测试中可以加入 Cu^{2+} 和 Co^{2+} 掩蔽剂再进行

金属离子检测。

表 1 探针分子 L 的离子选择性和共存离子抗干扰性(I/I_0)

名称	Ag ⁺	K ⁺	Na ⁺	Ba ²⁺	Ca ²⁺	Ni ²⁺	Co ²⁺	Cu ²⁺
无 Zn^{2+}	0.9	0.9	0.7	0.6	0.9	0.6	0.1	0.1
有 Zn^{2+}	19.6	19.9	24.6	28.4	18.0	22.9	33.1	18.5
名称	Pb ²⁺	Sn ²⁺	Cd ²⁺	Cr ³⁺	Al ³⁺	Fe ³⁺	空白	
无 Zn^{2+}	0.7	1.0	0.9	0.8	0.8	0.8	1.0	
有 Zn^{2+}	21.6	14.6	16.8	14.9	15.3	16.8	16.9	

注: I 为探针 L+其他离子+ Zn^{2+} 的荧光强度; I_0 为探针 L+其他离子的荧光强度值。

2.5 结合模式

进一步通过等摩尔连续变换法研究了探针和金属离子的结合模式。探针分子 L 与 Zn^{2+} 的结合比曲线如图 6 所示,当探针分子 L 的浓度占比约为 0.67 时体系的荧光强度达到最大,表明探针分子 L 与 Zn^{2+} 的结合比为 2:1。

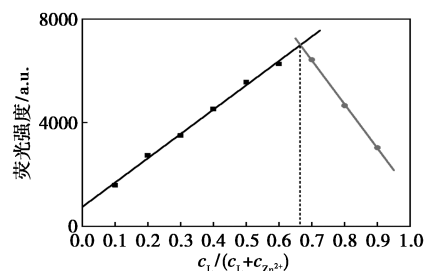


图 6 探针分子 L 与 Zn^{2+} 结合比测定曲线

探针分子 L 和 $L-Zn^{2+}$ 的能量优化轨道通过高斯 16 B3LYP/6-31G(d,p) 进行计算^[12]。如图 7 所示,探针 L 中酚羟基 O 原子、C=N 基团中的 N 原子和羧酸根中的 O 负离子均与 Zn^{2+} 配位。通过计算发现, $L-Zn^{2+}$ 配合物的 HOMO 和 LUMO 的轨道能量差为 3.73 eV,其值高于化合物 L 中 HOMO 和 LUMO 的能量差(3.00 eV)。数据表明,探针分子与 Zn^{2+} 形成了配位键。2 个探针 L 识别基团的空腔与 Zn^{2+} 可以较好地匹配,导致分子整合聚集性发光,从而实现 Zn^{2+} 选择性荧光响应。

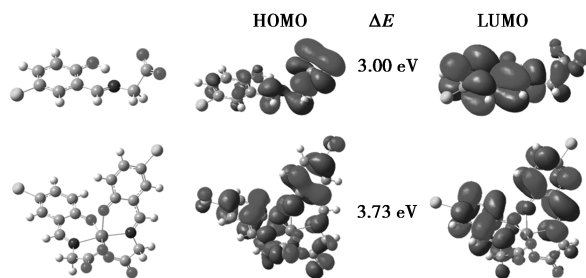


图 7 探针 L 和 $L-Zn^{2+}$ 的优化结构和 HOMO/LUMO 能量轨道

综上所述,推断探针分子 L 与 Zn^{2+} 可能的结合模式如图 8 所示,探针分子 L 中苯环和相邻的 $-CH=N-$ 组合在一起存在光诱导电子转移 (PET) 效应,引发了微弱的淡蓝色荧光。当 Zn^{2+} 存在时,探针分子 L 和 Zn^{2+} 之间存在螯合荧光增强 (CHEF) 效应,苯环和相邻的 $-CH=N-$ 组合在一起的 PET 效应受阻,同时,苯酚的 $-OH$ 基团和相邻的 $-CH=N-$ 组合在一起引发激发态分子内质子转移 (ESIPT) 过程, Zn^{2+} 配位后,ESIPT 过程被抑制,产生荧光响应。

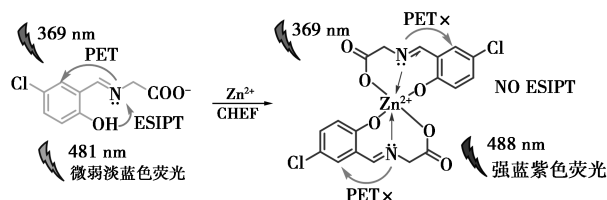


图 8 探针分子 L 识别 Zn^{2+} 的可能机理

2.6 实际水样检测

进一步研究了探针分子 L 对实际水样中 Zn^{2+} 的检测效果,以自来水(实验室)、饮用水(某品牌)和潇水河水(学校门前)为实际水样样本,3 种水样的加标回收率分别为 100.4%~102.7%、100.9%~103.5%和 101.0%~103.3%,相对标准偏差 (RSD) 均小于 5%,如表 2 所示,实际水样检测实验表明该荧光探针分子具有应用于实际水样检测的潜质。

表 2 自来水、饮用水和潇水河水中的 Zn^{2+} 的检测

水样	加标量/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	实测值/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	回收率/ %	相对标准 偏差 ^③ /%
自来水 ^①	0	—	—	—
	4.00	4.11	102.7	1.41
	8.00	8.13	101.6	1.20
	12.00	12.05	100.4	1.68
饮用水	0	2.67	—	2.03
	4.00	4.14	103.5	1.68
	8.00	8.09	101.1	2.01
	12.00	12.11	100.9	1.99
河水 ^②	0	—	—	—
	4.00	4.13	103.3	1.88
	8.00	8.14	101.7	1.56
	12.00	12.12	101.0	2.52

注:①水样取自实验室;②水样取自潇水河;③ $n=5$ 。

3 结论

以甘氨酸和 5-氯水杨醛为原料,通过简单的反

应合成了一种新型的席夫碱类 Zn^{2+} 荧光探针分子 L,该探针分子对 Zn^{2+} 具有高效选择性和灵敏度。在 365 nm 紫外灯下,探针分子 L 与 Zn^{2+} 的溶液体系能够发出明亮的蓝紫色荧光,因此探针分子 L 可以实现可视化检测 Zn^{2+} 。在 0~14 $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围内,体系荧光强度与 Zn^{2+} 浓度呈良好的线性关系,检出限为 13.72 nmol/L。探针分子 L 的荧光响应及其对 Zn^{2+} 的识别与 CHEF 效应、PET 效应和 ESIPT 效应相关。通过 Job 曲线和 DFT 理论计算研究发现,探针分子 L 与 Zn^{2+} 形成了 2:1 的配合物,探针分子 L 中的 $C=N$ 基团中的 N 原子、ArOH 中的 O 原子和 COO^- 中的 O 原子均参与了探针分子 L 与 Zn^{2+} 的配位。此外,水样中 Zn^{2+} 的检测实验表明,该探针具有应用于实际水样检测的潜力。

参考文献

- [1] Wang H P, Kang T T, Wang X J, *et al.* A facile strategy for achieving high selective Zn(II) fluorescence probe by regulating the solvent polarity[J]. *Talanta*, 2018, 184: 7-14.
- [2] Xu Y, Xiao G, Liu L, *et al.* Zinc transporters in Alzheimer's disease[J]. *Molecular Brain*, 2019, 12: 106-106.
- [3] 匡红波,王忠龙,张燕,等.新型喹啉类 Zn^{2+} 探针的合成及细胞成像研究[J]. *精细化工*, 2018, 35(6): 928-933.
- [4] Liu P, Han X F, Wu W N, *et al.* A water soluble hydrazone probe for subsequent fluorescent detection of Zn^{2+} and S^{2-} in neat aqueous solution and imaging in mitochondria of living cells[J]. *Journal of Molecular Structure*, 2022, 1249: 131629.
- [5] Inoue K, O'bryant Z, Xiong Z G. Zinc-permeable ion channels: Effects on intracellular zinc dynamics and potential physiological/pathophysiological significance[J]. *Current Medicinal Chemistry*, 2015, 22: 1248-1257.
- [6] 万丹丹,苏光余,许子华,等.基于 2-(2'-吡啶基)苯并咪唑的 Zn^{2+} 比例计量型荧光识别[J]. *无机化学学报*, 2008, 24(8): 1253-1260.
- [7] 喻艳超,陈心仪,巴新宇,等.连续识别 Zn^{2+} 和草甘膦荧光探针的合成与应用[J]. *精细化工*, 2023, 40(1): 56-62.
- [8] 陈速敏,张元勋,尚晶,等.基于青海弧菌 Q67 的镀锌废水土壤污染的生物毒性效应[J]. *法医学杂志*, 2020, 36(4): 445-452.
- [9] 杨文生,杨菀,马亚军.一种基于席夫碱的 Zn^{2+} 荧光探针的合成及应用[J]. *分析试验室*, 2020, 39(9): 1045-1048.
- [10] 李政,王晶,王树军,等.一种基于酰肼的铝离子荧光探针及细胞成像研究[J]. *分析试验室*, 2019, 38(6): 680-684.
- [11] 李中燕,覃海波,朱洪宇,等.三种水杨醛席夫碱荧光探针的合成及对 Zn^{2+} 的识别[J]. *无机化学学报*, 2022, 38(7): 1291-1298.
- [12] 王会镇,薛松松,周霞,等.一种高选择性苯甲酰肼铜离子探针合成及其在吸附中的应用[J]. *发光学报*, 2021, 42(9): 1427-1435. ■