中国科学: 化学 2017 年 第 47 卷 第 8 期: 1000 ~ 1006
SCIENTIA SINICA Chimica chemcn.scichina.com
《中国科学》杂志社 SCIENCE CHINA PRESS
论 文 分子荧光探针专刊

# 新型席夫碱高灵敏荧光探针用于$Al^{3+}$的测定

侯玲杰, 葛金印, 孔祥宇, 董川, 双少敏*, 王煜*

山西大学化学化工学院, 环境科学研究所, 太原 030006
*通讯作者: smshuang@sxu.edu.cn; wangyu1168@sxu.edu.cn

收稿日期: 2017-03-10; 接受日期: 2017-05-22; 网络版发表日期: 2017-07-18
国家自然科学基金(编号: 21475080)和山西省自然科学基金(编号: 2013011040-6)资助项目

**摘要** 本文报道了一种新型席夫碱8-羟基-久洛尼定-(2-吡啶)腙(**L**)的荧光探针, 并用于识别检测$Al^{3+}$. 探针**L**与$Al^{3+}$络合使溶液颜色由淡黄色变为黄色, 同时在480 nm处荧光显著增强, 可实现$Al^{3+}$的选择性识别检测, 检测限为$8.22\times10^{-8}$ M. 通过等摩尔连续变化法测定及质谱表征, **L**与$Al^{3+}$形成1:1的络合物, 核磁共振光谱进一步确定**L**与$Al^{3+}$的结合模式, 为探针**L**应用于离子传感器研制奠定了理论基础.

**关键词** 荧光探针, 席夫碱, 铝离子

## 1 引言

铝在地壳中的含量仅次于氧元素和硅元素, 是地壳中含量最多的金属元素, 被广泛应用于各种产品的制造中, 如食品包装、餐饮器具、制酸剂、除臭剂及汽车制造业等. 然而, 过量的铝会抑制植物的生长, 人体内铝含量过高可能会损伤人体神经系统, 引起阿尔兹海默症、帕金森、肌萎缩性脊髓侧索硬化症等疾病[1]. 因此, 在自然环境及生物体中定量检测$Al^{3+}$是十分必要的. 相比于其他检测方法, 荧光法由于具有灵敏度高、选择性好等优点而受到广泛关注[2]. 目前主要有4类荧光团被广泛应用于$Al^{3+}$荧光探针检测的研究: 萘类[3~7]、氟硼二吡咯(BODIPY)类[8~10]、香豆素类[11~14]及罗丹明类[15~19], 其中萘类荧光探针合成较为简单, 然而, 其通常荧光寿命短、发射波长较短[20,21]; 罗丹明、香豆素、BODIPY类通常具有高的荧光量子产率与稳定的光物理性质, 但这些探针多存在合成方法冗长繁琐等问题[8~19]. 因此, 研制合成简便、发光性能优良的荧光探针用于$Al^{3+}$的检测仍是一项富有挑战性的工作.

本文通过8-羟基久洛尼定-9-甲醛与2-肼吡啶一步缩合反应, 合成了一个新的席夫碱荧光探针8-羟基-久洛尼定-(2-吡啶)腙(**L**). 探针**L**上的N、O原子可以为$Al^{3+}$提供络合位点, $Al^{3+}$与C=N双键上的N原子络合后会抑制分子异构化, 同时增加分子平面刚性[22,23], 引起颜色及光谱变化, 实现对$Al^{3+}$的检测, 为拓展其在传感器研制方面的应用奠定基础.

## 2 实验部分

### 2.1 仪器与试剂

8-羟基久洛尼定-9-甲醛(96%, 梯希爱, 中国); 2-肼吡啶(96%, 安耐吉, 中国); 其他试剂均为分析纯, 无需进一步纯化; 金属离子为相应的硝酸盐配制得到, 实验用水为二次水.

**引用格式:** 侯玲杰, 葛金印, 孔祥宇, 董川, 双少敏, 王煜. 新型席夫碱高灵敏荧光探针用于$Al^{3+}$的测定. 中国科学: 化学, 2017, 47: 1000–1006
Hou L, Ge J, Kong X, Dong C, Shuang S, Wang Y. A novel highly sensitive fluorescent probe based on Schiff base for $Al^{3+}$. *Sci Sin Chim*, 2017, 47: 1000–1006, doi: 10.1360/N032017-00046

© 2017 《中国科学》杂志社 www.scichina.com

紫外可见分光光度计(U-2910, 日立, 日本); 荧光光谱仪(LS-55, PerkinElmer, 美国), 激发波长为432 nm, 激发和发射狭缝分别为7和5 nm; 核磁共振仪(DRX-600, Fällenden, 瑞士); 高效液相质谱仪(Bruker micrOTOF-Q III, 德国); 奥林巴斯共聚焦显微镜(FV1000, Olympus, 日本).

### 2.2　探针L的合成

探针8-羟基-久洛尼定-(2-吡啶)腙(**L**)的合成路线如图1所示. 将0.11 g (0.5 mmol) 8-羟基久洛尼定-9-甲醛和0.082 g (0.75 mmol) 2-肼吡啶溶于6 mL甲醇中, 加热至65℃回流3 h后, 冷却至室温有固体析出, 抽滤, 用少量甲醇洗涤后得到橙色固体**L** (0.049 g, 产率为32%). 核磁共振氢谱($^1$H NMR) (DMSO-$d_6$) $\delta$: 11.21 (s, 1H, –OH), 10.59 (s, 1H, –NH), 8.12 (d, 1H, ArH), 8.01 (s, 1H, –HC=N), 7.63 (t, 1H, ArH), 6.78 (d, 1H, ArH), 6.73 (t, 1H, ArH), 6.66 (s, 1H, ArH), 3.15 (m, 4H, –$CH_2$), 2.62 (m, 4H, –$CH_2$), 1.86 (m, 4H, –$CH_2$). 核磁共振碳谱($^{13}$C NMR) (DMSO-$d_6$): 156.49, 153.80, 148.53, 144.69, 144.63, 138.50, 127.68, 114.86, 112.84, 107.30, 106.98, 105.82, 49.79, 49.31, 26.99, 22.09, 21.33, 20.81. HRMS (ESI): calcd. for $C_{18}H_{21}N_4O$ 309.17 (L+H), found: 309.20.

### 2.3　光谱性质的测定方法

将**L**溶于甲醇中, 制得1×10$^{-3}$ M的储备液, 配置10$^{-2}$ M的金属离子储备液用于金属离子选择性测定. 将储备液进一步稀释至合适的浓度, 用于荧光检测. 检测体系为$CH_3OH$:$H_2O$=49:1 (*v*/*v*). 荧光滴定实验过程为: 取25 μL的**L**储备液于比色管中, 加入相应体积的1.25×10$^{-3}$ M的$Al^{3+}$储备液, 并加入二次水, 使水的总体积为100 μL, 用$CH_3OH$定容至5 mL, 摇匀后用于荧光光谱的测定. 紫外吸收滴定实验: 移取50 μL的**L**储备液于比色管中, 加入相应体积的10$^{-2}$ M的$Al^{3+}$储备液, 并加入二次水, 使水的总体积为100 μL, 然后用$CH_3OH$定容至5 mL, 摇匀后用于紫外可见光谱的测定.

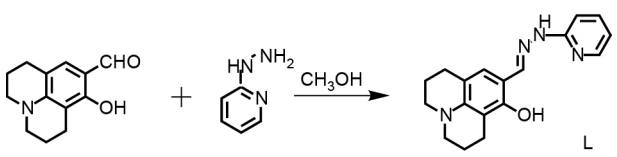



图 1　**L**的合成路线

### 2.4　细胞实验

首先将肝癌细胞BEL-7402培养在含10%的胎牛血清1640培养基中, 置于37℃, 含5% $CO_2$的培养箱中. 然后将BEL-7402细胞接种在培养皿中使其贴壁24 h后, 除去未贴壁细胞. 在培养皿中加入10 μM的探针培养20 min后, 用干净的培养基轻轻清洗细胞3次, 除去培养基中过量的未进入细胞的探针, 在共聚焦显微镜下成像($\lambda_{ex}$=405 nm, 40倍目镜). 之后继续加入20 μM的$Al^{3+}$培养20 min后进行荧光成像.

## 3　结果与讨论

### 3.1　$Al^{3+}$对L紫外可见光谱的影响

在$CH_3OH$:$H_2O$=49:1 (*v*/*v*)体系中测定了不同浓度$Al^{3+}$对探针**L**的紫外吸收光谱的影响. 如图2所示, 探针**L**在370 nm处有一个明显的吸收峰. 随着$Al^{3+}$的加入, 370 nm处的吸收峰强度逐渐降低, 而在426 nm处逐渐出现一个新的吸收峰, 同时在390 nm处出现一个明显的等吸收点, 初步推测探针**L**与$Al^{3+}$形成了络合物. 伴随着吸收光谱的变化, 加入$Al^{3+}$后, 溶液的颜色由淡黄色变为黄色, 从而可以实现对$Al^{3+}$的裸眼识别. 紫外吸收光谱的红移可能是由于$Al^{3+}$与**L**的N、O原子络合后, 增加了分子的平面刚性, 并增加了体系的共轭程度.

### 3.2　探针L对$Al^{3+}$的荧光响应

如图3所示, 由于探针**L**本身存在C=N异构化, 造成能量损失, 所以在$CH_3OH$:$H_2O$=49:1 (*v*/*v*)体系中荧光

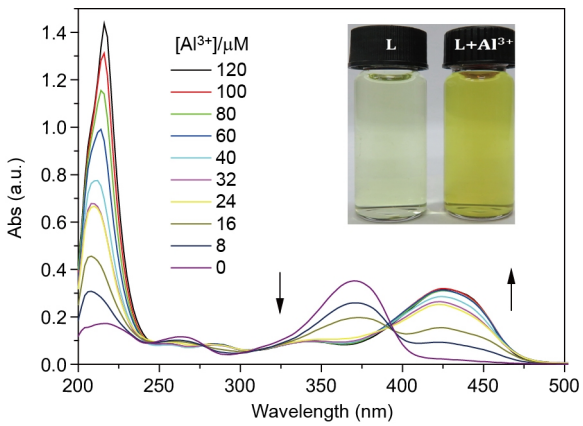



图 2　$Al^{3+}$浓度对探针**L**紫外吸收光谱的影响([**L**]=1×10$^{-5}$ M, [$Al^{3+}$]=0~12×10$^{-5}$ M) (网络版彩图)

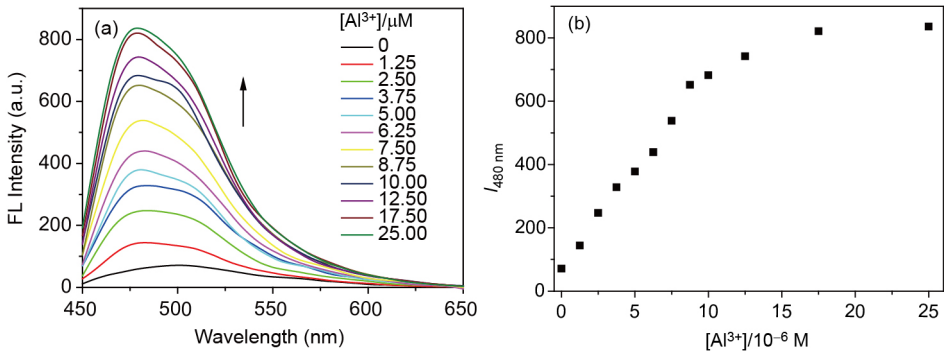



**图 3** (a) $Al^{3+}$浓度对探针**L**荧光光谱的影响; (b) $Al^{3+}$浓度对体系480 nm处荧光强度的影响([**L**]=5×10$^{-6}$ M, [$Al^{3+}$]=0~25×10$^{-6}$ M) (网络版彩图)

微弱. 但是随着$Al^{3+}$的加入, 探针在480 nm处的荧光强度显著增强. 这是由于加入$Al^{3+}$后, $Al^{3+}$与探针分子中的Schiff碱N原子、酚-OH以及吡啶环上的N原子发生络合, 抑制了C=N双键的异构化, 同时增加了分子的平面刚性, 从而使体系荧光显著增强, 即产生螯合荧光增强作用(CHEF)[22,23].

如图4所示, 体系在480 nm处的荧光强度$I_{480nm}$与$Al^{3+}$的浓度在1.25×10$^{-6}$~10.00×10$^{-6}$ M的范围内呈现良好的线性关系($R^2$=0.9875). 由此可以实现探针**L**对$Al^{3+}$的定量检测, 检测限为8.22×10$^{-8}$ M (信噪比为3:1)[11,12]. 当体系中[$Al^{3+}$]为5×10$^{-6}$ M时, 5次重复测定的相对标准偏差为1.96%, 说明**L**对$Al^{3+}$的检测有较好的重复性.

### 3.3 探针L对$Al^{3+}$测定的选择性

实验考察了探针**L**对$Al^{3+}$测定的选择性, 结果如图5所示. 在含有5 μM探针**L**的$CH_3OH$:$H_2O$=49:1 (*v*/*v*)溶液中加入等量的$K^+$、$Ca^{2+}$、$Na^+$、$Mg^{2+}$、$Al^{3+}$、$Zn^{2+}$、$Hg^{2+}$、$Pb^{2+}$、$Cu^{2+}$、$Fe^{3+}$、$Cd^{2+}$、$Ni^{2+}$、$Cr^{3+}$、$Co^{2+}$、$In^{3+}$离子, 只有$Al^{3+}$使体系的荧光显著增强, 说明探针**L**对$Al^{3+}$具有很好的选择性.

### 3.4 探针L与$Al^{3+}$结合模式的探究

紫外吸收光谱与荧光光谱均显示**L**与$Al^{3+}$形成了络合物. 为了确定**L**与$Al^{3+}$的结合模式, 通过等摩尔连续变化法测定了$Al^{3+}$与**L**的结合比[24]. 固定**L**与$Al^{3+}$的总浓度为2×10$^{-5}$ M, 改变**L**与铝离子的组成比例, 检测体系在426 nm处紫外吸光度的变化. 结果如图6(a)所示, 当**L**和$Al^{3+}$的浓度比为1:1时, 体系的吸光度出现转折点, 说明**L**与$Al^{3+}$的结合比为1:1. 通过质谱进一步证明了此结论. 如图7所示, 峰值*m*/*z* 372.10为**L**+$Al^{3+}$+2$H_2O$ [calcd, *m*/*z*: 371.17], 说明**L**与$Al^{3+}$ 1:1络合. 如图6(b)所

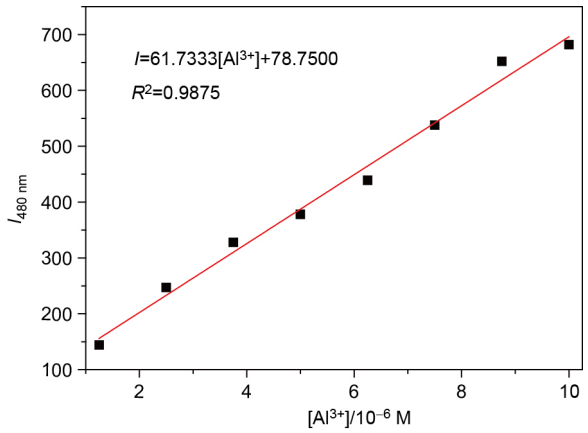



**图 4** 荧光强度与$Al^{3+}$浓度的线性关系图([**L**]=5×10$^{-6}$ M) (网络版彩图)

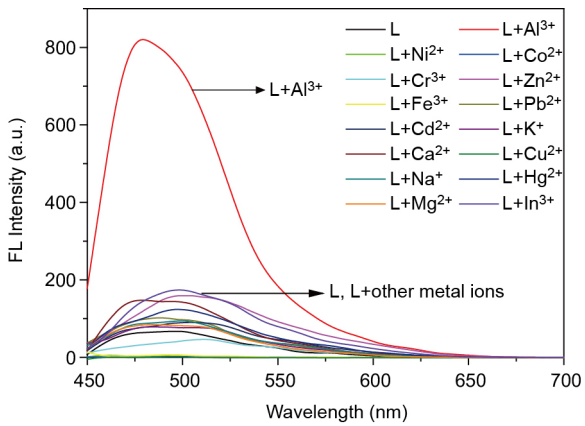



**图 5** 不同金属离子对**L**荧光光谱的影响([**L**]=5×10$^{-6}$ M, [$Al^{3+}$]=[$M^{n+}$]=25×10$^{-6}$ M) (网络版彩图)

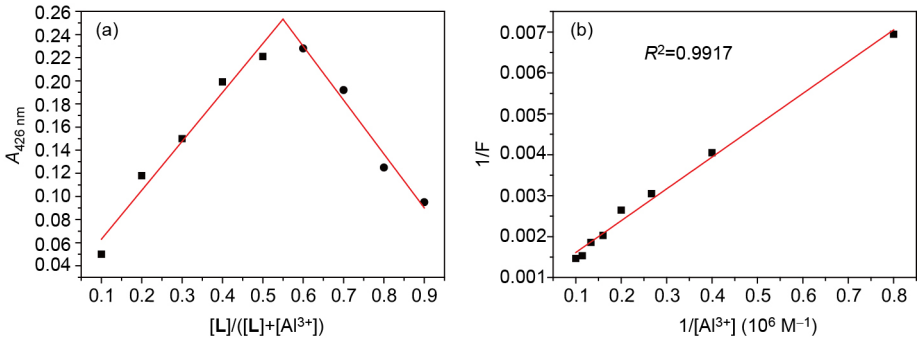



**图 6**　(a) **L**与$Al^{3+}$结合比的测定([**L**]+[$Al^{3+}$]=$2\times10^{-5}$ M); (b) **L**与$Al^{3+}$结合常数的测定(网络版彩图)

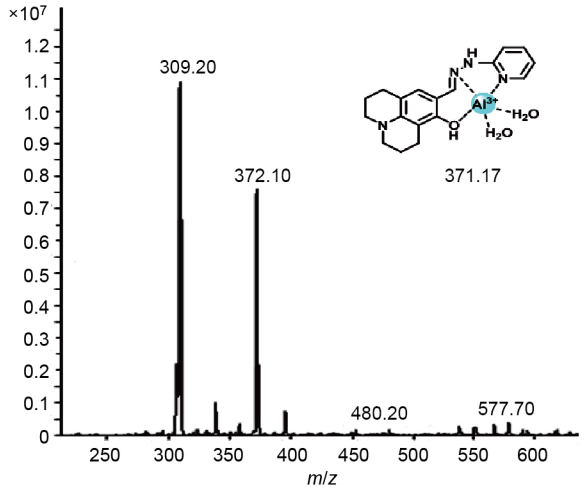



**图 7**　**L**+$Al^{3+}$质谱图(网络版彩图)

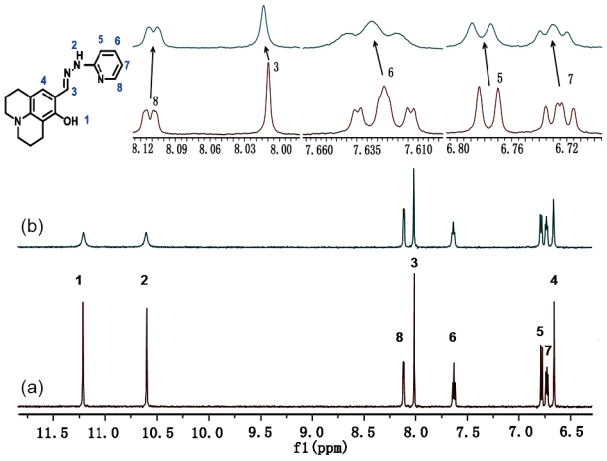



**图 8**　$Al^{3+}$对探针**L**核磁的影响. (a) **L**; (b) **L**+1 equiv. $Al^{3+}$ (网络版彩图)

示为荧光强度与$Al^{3+}$浓度的双倒数曲线, 图中显示荧光强度的倒数与$Al^{3+}$浓度的倒数呈良好的线性关系, 进一步证明结合比为1:1. 利用Benesi-Hildebrand方程[11,12], 计算出**L**与$Al^{3+}$的结合常数为$1.07\times10^5$ $M^{-1}$.

为了进一步探究**L**与$Al^{3+}$的结合模式, 以DMSO-$d_6$为溶剂, 通过核磁实验进行了考察. 如图8所示, 随着$Al^{3+}$的加入, **L**中$H_1$与$H_2$的峰信号变宽, $H_8$向高场移动了0.0032 ppm, $H_3$向低场移动了0.0041 ppm. 此外, 吡啶环上的$H_5$-$H_7$也都向低场移动, 从而可以推测, **L**分子中的羟基氧原子、亚氨基氮原子以及吡啶氮原子参与了与铝离子的络合配位. 根据以上实验结果, 推断**L**与$Al^{3+}$的结合模式如图9所示. $Al^{3+}$与**L**络合后, 抑制了C=N双键的异构化, 同时增加了分子的平面刚性, 从而使体系荧光显著增强.

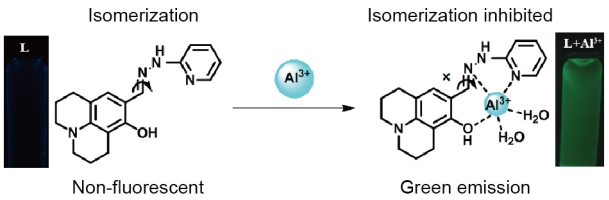



**图 9**　**L**和$Al^{3+}$的结合模式图(网络版彩图)

## 3.5　细胞成像

以肝癌细胞BEL-7402为细胞模型, 通过荧光共聚焦成像技术考察了**L**与$Al^{3+}$在细胞环境中的相互作用, 结果如图10所示. 在细胞中加入**L** (10 μM)培养20 min后, 没有荧光产生. 继续加入20 μM $Al^{3+}$培养20 min, 可以观察到绿色荧光. 同时, 整个实验过程中细胞形态较好, 说明探针**L**的细胞毒性较小. 因此, 探针**L**具有细胞内$Al^{3+}$荧光成像的潜在应用价值.

## 3.6　探针L与现有$Al^{3+}$荧光探针的比较

将提出的荧光探针**L**与现有的$Al^{3+}$荧光探针进行

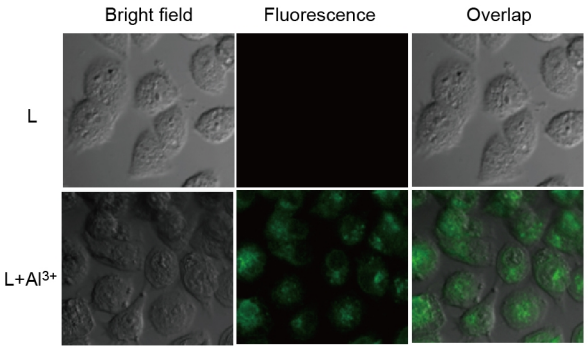


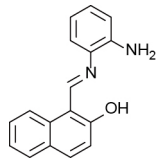
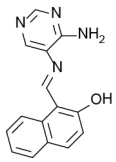
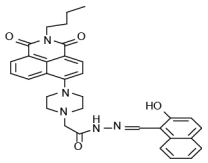
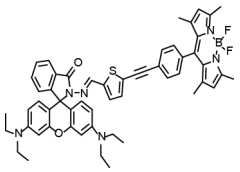
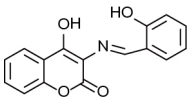
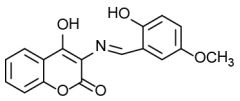
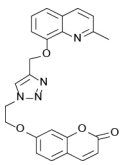
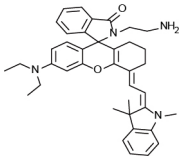
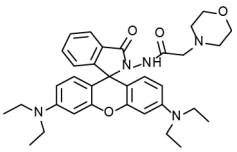
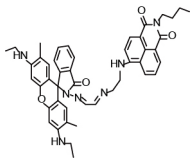
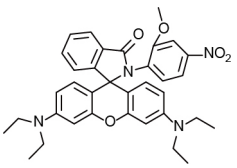
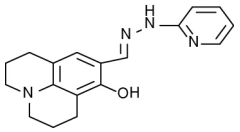

**图 10** **L**与**L**-$Al^{3+}$在BEL-7402细胞中的荧光成像图(网络版彩图)

了比较(表1), 结果表明, 探针**L**不仅具有较高的灵敏度, 而且合成方法简单, 为进一步拓展其在离子传感器方面的应用奠定了基础.

## 4 结论

本文报道了一种合成简便的新型席夫碱8-羟基-久洛尼定-(2-吡啶)腙(**L**)荧光探针, 并基于探针**L**建立了一种用于定量检测$Al^{3+}$的分析方法. 随着$Al^{3+}$浓度的增加, 体系在480 nm处荧光显著增强, 基于席夫碱与$Al^{3+}$的络合作用, 可以实现对$Al^{3+}$的高灵敏检测. 等摩尔连续变化法、荧光光谱、质谱等方法均表明$Al^{3+}$与**L**的结合比为1:1. 结合核磁共振光谱研究表明, 络合位点为**L**中的酚羟基、吡啶氮及亚氨基氮原子. 所制

**表 1** 探针**L**与现有的$Al^{3+}$荧光探针的比较

| 探针结构 | 合成步数 | 检测限 | 参考文献 | 探针结构 | 合成步数 | 检测限 | 参考文献 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
|  | 1 | $1.08\times10^{-7}$ M | [3] |  | 1 | $2.9\times10^{-7}$ M | [6] |
|  | 5 | $7.4\times10^{-9}$ M | [7] |  | 9 | $2.71\times10^{-8}$ M | [8] |
|  | 3 | $1.34\times10^{-6}$ M | [11] |  | 3 | $1.62\times10^{-6}$ M | [12] |
|  | 2 | $2.4\times10^{-8}$ M | [13] |  | 3 | $3.0\times10^{-8}$ M | [15] |
|  | 2 | $2.7\times10^{-3}$ M | [16] |  | 7 | $8.06\times10^{-8}$ M | [17] |
|  | 2 | $3.16\times10^{-7}$ M | [18] |  | 1 | $8.22\times10^{-8}$ M | 本研究 |

备的席夫碱探针**L**合成简单、对$Al^{3+}$选择性好、检测灵敏度高, 同时颜色从浅黄变为黄色, 可实现裸眼识别检测, 并且能在细胞内实现$Al^{3+}$的荧光成像, 因此在传感器研制方面具有潜在的应用价值.

## 参考文献


1 Chen CH, Liao DJ, Wan CF, Wu AT. *Analyst*, 2013, 138: 2527–2530
2 Qin LY, Hou LJ, Feng J, Chao JB, Wang Y, Jin WJ. *Synth Met*, 2016, 221: 206–213
3 Zhu J, Zhang Y, Wang L, Sun T, Wang M, Wang Y, Ma D, Yang Q, Tang Y. *Tetrahedron Lett*, 2016, 57: 3535–3539
4 Mondal S, Bhanja AK, Ojha D, Mondal TK, Chattopadhyay D, Sinha C. *RSC Adv*, 2015, 5: 73626–73638
5 Shweta S, Neeraj N, Asthana SK, Mishra RK, Upadhyay KK. *RSC Adv*, 2016, 6: 55430–55437
6 Karak D, Lohar S, Sahana A, Guha S, Banerjee A, Das D. *Anal Methods*, 2012, 4: 1906–1908
7 Kang L, Liu YT, Li NN, Dang QX, Xing ZY, Li JL, Zhang Y. *J Lumin*, 2017, 186: 48–52
8 Chereddy NR, Raju MVN, Reddy BM, Krishnaswamy VR, Korrapati PS, Reddy BJM, Rao VJ. *Sensors Actuat B-Chem*, 2016, 237: 605–612
9 Wang YW, Yu MX, Yu YH, Bai ZP, Shen Z, Li FY, You XZ. *Tetrahedron Lett*, 2009, 50: 6169–6172
10 Xie X, Qin Y. *Sensors Actuat B-Chem*, 2011, 156: 213–217
11 Sen B, Sheet SK, Thounaojam R, Jamatia R, Pal AK, Aguan K, Khatua S. *Spectr Acta Part A-Mol Biomol Sp*, 2017, 173: 537–543
12 Sheet SK, Sen B, Thounaojam R, Aguan K, Khatua S. *J Photochem Photobiol A-Chem*, 2017, 332: 101–111
13 Zhu Q, Li L, Mu L, Zeng X, Redshaw C, Wei G. *J Photochem Photobiol A-Chem*, 2016, 328: 217–224
14 Adhikari S, Mandal S, Ghosh A, Guria S, Das D. *Sensors Actuat B-Chem*, 2016, 234: 222–230
15 Xie JY, Li CY, Li YF, Fu YJ, Nie SX, Tan HY. *Dyes Pigments*, 2017, 136: 817–824
16 Hou S, Qu Z, Zhong K, Bian Y, Tang L. *Tetrahedron Lett*, 2016, 57: 2616–2619
17 Qin JC, Yan J, Wang B, Yang Z. *Tetrahedron Lett*, 2016, 57: 1935–1939
18 Chatterjee N, Maity SB, Samadder A, Mukherjee P, Khuda-Bukhsh AR, Bharadwaj PK. *RSC Adv*, 2016, 6: 17995–18001
19 Mistri T, Alam R, Bhowmick R, Katarkar A, Chaudhuri K, Ali M. *New J Chem*, 2016, 40: 330–339
20 Roek DP, Chateauneuf JE, Brennecke JF. *Ind Eng Chem Res*, 2000, 39: 3090–3096
21 Das S, Dutta M, Das D. *Anal Methods*, 2013, 5: 6262–6285
22 Li W, Tian X, Huang B, Li H, Zhao X, Gao S, Zheng J, Zhang X, Zhou H, Tian Y, Wu J. *Biosens Bioelectron*, 2016, 77: 530–536
23 Oliveira E, Santos HM, Capelo JL, Lodeiro C. *Inorg Chim Acta*, 2012, 381: 203–211
24 Zhang YM, Shi BB, Zhang P, Huo JQ, Chen P, Lin Q, Liu J, Wei TB. *Sci China Chem*, 2013, 56: 612–618

# A novel highly sensitive fluorescent probe based on Schiff base for $Al^{3+}$

Lingjie Hou, Jinyin Ge, Xiangyu Kong, Chuan Dong, Shaomin Shuang*, Yu Wang*

*College of Chemistry and Chemical Engineering, Institute of Environmental Science, Shanxi University, Taiyuan 030006, China*
**Corresponding authors, E-mail: smshuang@sxu.edu.cn; wangyu1168@sxu.edu.cn*

**Abstract:** A facile Schiff-base ligand 8-hydroxyjulolidine-pyridyl hydrazone (**L**) as the fluorescent probe was synthesized and characterized. **L** was selective toward $Al^{3+}$ ions with a visible color change from pale-to-yellow and fluorescence enhancement at 480 nm.**L** forms complex with $Al^{3+}$ in 1:1 ratio as supported by Job's plot analysis and ESI-MS. The binding mode was further confirmed by $^1H$ NMR titrations. The detection limit was calculated to be $8.22\times10^{-8}$ M for $Al^{3+}$. These merits of **L**, i.e., requiring facile one-step synthesis and displaying high sensitivity make **L** a promising candidate as a chemosensor for $Al^{3+}$ion.

**Keywords:** fluorescent probe, Schiff base, $Al^{3+}$

**doi:** 10.1360/N032017-00046