

文章编号: 1000-7032(2019)07-0941-06

## 基于 Schiff 碱结构的香豆素类荧光探针的合成及对 $Mg^{2+}$ 的识别

杨文生\*, 杨 菀, 马亚军

(榆林学院 化学与化工学院, 陕西 榆林 719000)

**摘要:** 以 2-氨基苯并咪唑和 7-羟基香豆素为基本原料制备了  $Mg^{2+}$  荧光探针, 采用核磁共振谱与质谱等手段对产物的构成进行了详尽的表征。然后通过荧光发射光谱的测试分析, 了解了探针的各项性能。结果显示, 在 MeOH:  $H_2O = 1:1$  (V: V) 混合溶液中探针对  $Mg^{2+}$  具有良好的选择性而不受其他金属离子 ( $Ca^{2+}$ 、 $Na^+$ 、 $Li^+$ 、 $K^+$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Fe^{3+}$ 、 $Zn^{2+}$ 、 $Ni^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$ 、 $Ba^{2+}$ 、 $Cd^{2+}$ 、 $Cr^{3+}$ 、 $Ag^+$ 、 $Al^{3+}$ 、 $Hg^{2+}$ 、 $Co^{2+}$ 、 $Pb^{2+}$ ) 的干扰。探针对  $Mg^{2+}$  具有可逆性, 其检测限为  $7.3 \times 10^{-8}$  mol/L。通过对探针的性能研究可知该探针能够完成对  $Mg^{2+}$  的检测, 在生命医学、环境科学及分析化学等领域具有潜在的应用价值。

**关键词:** 香豆素; 荧光探针; 金属离子; 检测限

中图分类号: O657.39 文献标识码: A DOI: 10.3788/fgxb20194007.0941

## Synthesis of Coumarin Fluorescent Probe Based on Schiff Base Structure and Identification to $Mg^{2+}$

YANG Wen-sheng\*, YANG Wan, MA Ya-jun

(School of Chemistry and Chemical Engineering, Yulin University, Yulin 719000, China)

\* Corresponding Author, E-mail: ywsdzxy@yeah.net

**Abstract:** The fluorescence probe for  $Mg^{2+}$  was prepared with 2-amino benzene and imidazole and 7-hydroxyl coumarin as the basic raw material. The product composition was characterized in detail by means of nuclear magnetic resonance spectrum and mass spectrum, and then through the test and analysis by fluorescence emission spectrum, the various properties of the probe were understood. The results showed that the probe has good selectivity to  $Mg^{2+}$  in the mixed solution of MeOH:  $H_2O = 1:1$  (V: V) and there are no other metal ions ( $Ca^{2+}$ ,  $Na^+$ ,  $Li^+$ ,  $K^+$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Ba^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Cr^{3+}$ ,  $Ag^+$ ,  $Al^{3+}$ ,  $Hg^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ) interference. The probe is reversible to  $Mg^{2+}$ , the detection limit is  $7.3 \times 10^{-8}$  mol/L. Through the study on performance of the probe, the probe can complete the detection of  $Mg^{2+}$ . The probe has potential application value in the fields of biomedical, environmental science and analytical chemistry, etc.

**Key words:** coumarin; fluorescent probe; metal ions; detection limit

收稿日期: 2018-07-09; 修订日期: 2018-10-24

基金项目: 国家自然科学基金(21763030); 榆林学院博士科研启动基金项目(16GK14)资助

Supported by National Natural Science Foundation of China(21763030); The Dr Scientific Research Start-up Foundation of Yulin University(16GK14)

## 1 引 言

镁元素是生命过程中必不可少的生物离子<sup>[1-2]</sup>,在生命体中以二价离子的形式存在,广泛分布在人体的各种细胞及身体器官中。镁离子参与了人体的多种生理活动<sup>[3]</sup>,比如细胞的增殖、生物酶反应、构建转运蛋白、信号传导及 DNA 结构的稳定<sup>[4]</sup>等。镁离子在细胞功能中起着关键作用,它的缺失将会导致细胞的死亡。成年人每日摄入镁的量应达到 300 mg,其来源主要为海鲜、蔬菜、奶制品及全谷类<sup>[5]</sup>。镁离子摄入量过多或缺乏均会导致各种疾病<sup>[6-7]</sup>。当镁离子在人体内含量超标时,会导致代谢紊乱并对骨骼、胃肠道、神经元及肾脏造成危害<sup>[8]</sup>。而镁离子在人体内长期以低浓度存在时,往往导致糖尿病、心脏病、低钙血症、骨质疏松症等疾病<sup>[9-10]</sup>。此外,镁离子还是植物体内叶绿素的重要组成部分,参与了植物所需的光合作用,因而对于维持生物的正常生长具有非常重要的作用。因此,我们很有必要寻找一种快速有效地检测生物系统和环境中的镁离子的方法。

检测镁离子常用的手段主要有 EDTA 滴定法、同位素质谱法、原子吸收分光光度法、离子层析法及镁试剂比色法等<sup>[11]</sup>。与这些传统的检测方法相比较,荧光探针法具有选择性和灵敏度高、可实时检测、操作简单、测试速度快及成本比较低等优势,因而引起了研究人员的广泛关注<sup>[12-13]</sup>。近年来,镁离子荧光探针已有大量报道,然而大多数报道的镁离子荧光探针难以区分镁离子和钙离

子,主要是由于镁离子与钙离子化学性质很相似,造成不能高选择性地识别镁离子。

本文所合成的新型荧光探针具有能够高选择性识别镁离子而不受钙离子影响的特点,采用常规手段核磁谱及质谱表征了产物的结构和组成,通过一系列分析测试方法研究了该探针的光谱性质及反应机理。

## 2 实 验

### 2.1 仪器与试剂

Hitachi F-7000 荧光光谱仪,日本日立公司; Bruker 400 MHz 核磁共振仪,瑞士布鲁克公司; Bruker Esquire 6000 质谱仪,德国布鲁克公司; XT4-100X 显微熔点测定仪,北京电光仪器厂。

7-羟基香豆素、2-氨基苯并咪唑、冰乙酸、六次甲基四胺、无水甲醇(AR,国药集团化学试剂有限公司);  $\text{NaNO}_3$ 、 $\text{KNO}_3$ 、 $\text{LiNO}_3$ 、 $\text{AgNO}_3$ 、 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 、 $\text{Ba}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (AR,上海阿拉丁试剂有限公司)。

实验中所用其他试剂均为 AR。实验所用蒸馏水为二次蒸馏制得。金属离子储备液均由金属硝酸盐和水合金属硝酸盐制备得到。

### 2.2 探针的合成

图 1 为探针 L 的合成路线。

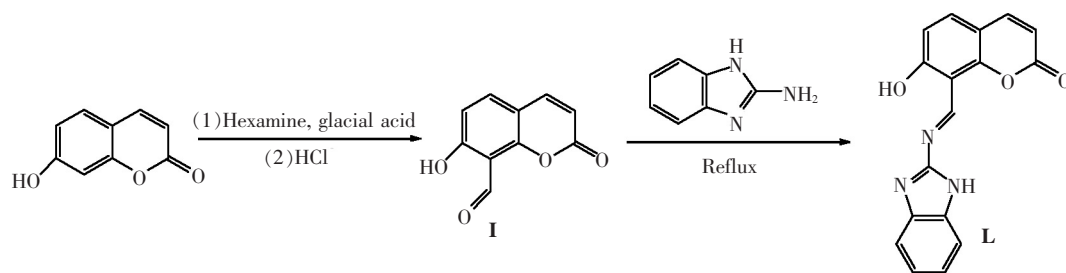


图 1 探针 L 的合成路线

Fig. 1 Synthesis routes of probe L

#### 2.2.1 中间体 I 的合成

准备好 250 mL 的单口圆底烧瓶,加入 5 g 7-羟基香豆素和 50 mL 冰乙酸,随后加入 10 g 六次甲基四胺,放入磁子并搅拌均匀,设置加热温度为 95 °C,开始加热回流约 6 h,将反应物稍微冷却后

加入 75 mL 的 20% 盐酸,重新调节温度为 60 °C,在该温度下加热回流 30 min。将反应产物自然冷却后用乙醚进行萃取,将萃取后的澄清有机溶液合并到锥形瓶中,加入适量的无水  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,用玻璃棒充分搅拌进行干燥,然后过滤,将滤液浓缩后

得到黄色的固体产物,再进行重结晶操作,真空干燥后得到 1.56 g 淡黄色固体,即为中间体 **I**,产率 27%,熔点 188.3 ~ 189.4 °C。

### 2.2.2 探针 **L** 的合成

在干净的 250 mL 的单口圆底烧瓶中,加入 0.27 g 2-氨基苯并咪唑与 35 mL 无水甲醇,在 80 °C 加热回流,充分搅拌使其溶解。取干净的小烧杯,加入 0.38 g 中间体 **I** 与 50 mL 无水甲醇,用玻璃棒搅拌使其溶解完全。然后用滴管逐滴将小烧杯中的溶液移入圆底烧瓶中。加热回流不久,析出大量沉淀。继续回流 24 h,将反应物自然冷却后减压浓缩至最初的 20%,然后过滤,用冷的无水甲醇淋洗两次,真空干燥后得到 0.27 g 棕红色固体粉末,即为探针 **L**,产率 44%,熔点 291.3 ~ 292.5 °C。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 13.02 (s, 1H), 10.39 (s, 1H), 9.93 (s, 8H), 8.05 ~ 7.91 (m, 9H), 7.80 (d, *J* = 8.7 Hz, 9H), 7.57 (s, 11H), 7.27 ~ 7.10 (m, 19H), 7.02 ~ 6.88 (m, 10H), 6.55 (s, 1H), 6.37 (d, *J* = 9.5 Hz, 8H), 3.46 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H)。<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 164.74, 160.02, 155.50, 152.92, 145.03, 134.92, 122.96, 120.15, 114.53, 112.83, 111.92, 111.48, 106.88。ESI-MS: *m/z* 306.5 [M + H]<sup>+</sup>。

### 2.3 光谱测试

称取适量探针移入容量瓶中,用溶剂 DMF 溶解并定容,配制成浓度为 1.0 × 10<sup>-3</sup> mol/L 的探针储备液待用。称取适量金属硝酸盐或水合金属硝酸盐移入容量瓶中用蒸馏水定容,配制浓度为 1.0 × 10<sup>-3</sup> mol/L 金属离子储备液待用。在荧光发射光谱测试中,向石英比色皿中加入 2 mL 的 MeOH:H<sub>2</sub>O = 1:1 (V:V) 的混合溶液 (pH = 7.2),接着用微量进样器加入 20 μL 的待用的探针储备液(测定检测限加入 5 μL 待用的探针储备液),最后加入待用的金属离子储备液,进行光谱测试。其中荧光发射光谱的激发波长为 395 nm,狭缝均为 10 nm。

## 3 结果与讨论

### 3.1 探针对金属离子的识别性能

研究了探针对常见金属离子的识别能力,结果如图 2 所示。发现大多数金属离子加入后的荧光强度比较低,表明对探针没有响应或只有微弱

的响应。而当加入 Mg<sup>2+</sup> 时,在 498 nm 处出现一个很强的荧光发射峰,测试溶液在 365 nm 紫外光下发出明亮的蓝绿色荧光,结果显示在图 2 中。表明 Mg<sup>2+</sup> 对探针有积极的响应,即探针对 Mg<sup>2+</sup> 有很好的选择性。其原因主要是在加入 Mg<sup>2+</sup> 之前,探针分子中的 N 原子上的孤对电子向香豆素基团转移电子,此时探针分子的荧光非常微弱;当加入 Mg<sup>2+</sup> 之后,N 原子上的孤对电子与 Mg<sup>2+</sup> 形成配位键,限制了孤对电子转移,使得光诱导电子转移受阻,从而造成探针出现很强的荧光发射。

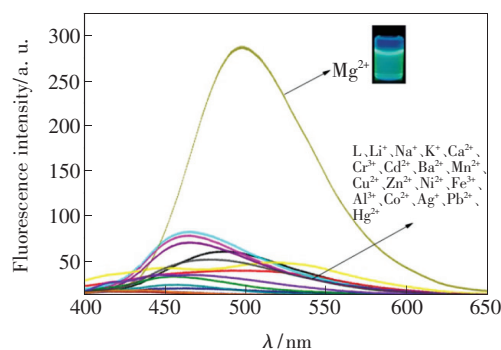


图 2 不同金属离子存在下探针 (1.0 × 10<sup>-5</sup> mol/L) 的荧光发射光谱

Fig. 2 Fluorescence emission spectra of probe (1.0 × 10<sup>-5</sup> mol/L) in the presence of different metal ions

### 3.2 探针对 Mg<sup>2+</sup> 的荧光发射光谱

在 MeOH:H<sub>2</sub>O = 1:1 (V:V) 的混合溶液中,加入浓度为 1.0 × 10<sup>-5</sup> mol/L 探针溶液,然后逐渐滴加 Mg<sup>2+</sup> 溶液,观察荧光发射光谱的荧光强度不再增加为止。如图 3 所示,可以发现随着 Mg<sup>2+</sup> 浓度的增加荧光发射光谱逐渐增强,其荧光发射峰出现在 498 nm 处。从起始到滴定终点的荧光强度增加了约 7 倍,变化十分显著。在图 3 的右上

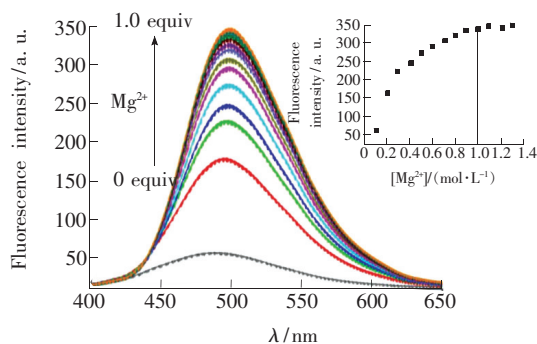


图 3 探针 (1.0 × 10<sup>-5</sup> mol/L) 随着 Mg<sup>2+</sup> 浓度增加的荧光发射光谱

Fig. 3 Fluorescence emission spectra of probe (1.0 × 10<sup>-5</sup> mol/L) with the increase of concentration of Mg<sup>2+</sup>

角小插图是滴定曲线图,可见随着  $Mg^{2+}$  浓度的增加,曲线缓慢增加,当  $Mg^{2+}$  的加入量为 1.0 当量时,荧光强度达到最大值。所以可以判断探针与  $Mg^{2+}$  是按 1:1 进行配位的。

### 3.3 共存金属离子的影响

设  $F_0$  为探针本身的荧光强度,  $F$  为不同金属离子加入时的荧光强度。如图 4 所示,可知在所有共存金属离子中,  $Mg^{2+}$  比其他金属离子具有更强的竞争能力,通常对  $Mg^{2+}$  形成严重干扰的  $Ca^{2+}$  在这里并没有对  $Mg^{2+}$  构成影响。虽然  $Cd^{2+}$  对荧光有一定的猝灭,但并不影响竞争结果。因此,探针在选择性识别  $Mg^{2+}$  的同时,并不受到其他共存离子的影响,具有很好的抗干扰能力。

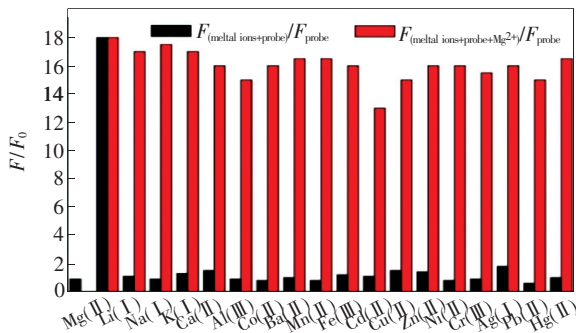


图 4 共存金属离子的竞争实验

Fig. 4 Competition experiments of coexisting metal ions

### 3.4 可逆性实验

可逆性是具有实用价值的荧光探针应具备的性质。图 5(a) 表示浓度为  $1.0 \times 10^{-5}$  mol/L 的探针溶液的荧光强度;图 5(b) 表示向浓度为  $1.0 \times 10^{-5}$  mol/L 的探针溶液中加入 1.0 当量的  $Mg^{2+}$  溶液后的荧光强度;图 5(c) 表示再向上述溶液中加入 1.0 当量的 EDTA 后的荧光强度。可见最初探针的荧光很微弱,当加入  $Mg^{2+}$  后,探针与  $Mg^{2+}$

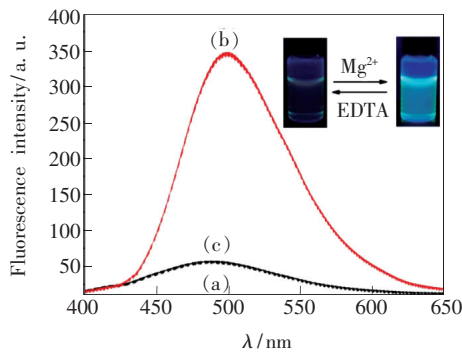


图 5 探针识别  $Mg^{2+}$  的可逆性实验

Fig. 5 Reversible experiment of probe to identify  $Mg^{2+}$

相互配位,从而发出强烈的蓝绿色荧光。接着再加入 EDTA 后溶液的强荧光重新恢复到微弱的状态,这是由于具有更强配位能力的 EDTA 与  $Mg^{2+}$  结合形成新的配合物,并释放出探针,其变化过程见图 5 的右上角示意图。因此探针识别  $Mg^{2+}$  的过程是可逆的。

### 3.5 探针与 $Mg^{2+}$ 的配位比的确定

采用荧光光谱法确定探针与  $Mg^{2+}$  的配位比。具体在 Job's plot 实验中,改变探针与  $Mg^{2+}$  的浓度,但维持两者的总浓度恒定,通过 Job's plot 曲线分析配位比。结果如图 6 所示,发现荧光强度最高点所对应的  $[Mg^{2+}]/([Mg^{2+}] + [L])$  的量为 0.5,这充分证明了探针与  $Mg^{2+}$  的配位比为 1:1。这一结论与滴定曲线的结果是一致的。

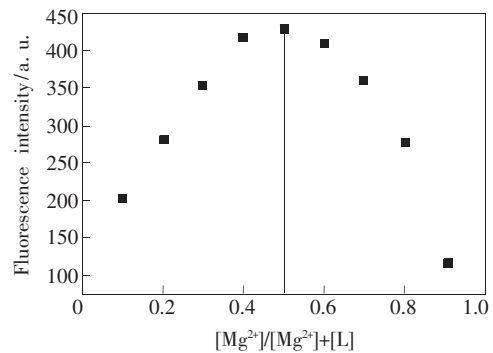


图 6 探针与  $Mg^{2+}$  的 Job's plot 曲线

Fig. 6 Job's plot of probe and  $Mg^{2+}$

### 3.6 检测限的测定

检测限反映了探针识别金属离子的灵敏度,是考察探针优劣的重要指标。在实验中,先向石英比色皿中加入 2 mL 的  $MeOH:H_2O = 1:1 (V:V)$  溶液,再加入  $5 \mu L$  探针储备液,然后每次加入  $0.4 \mu L$  的浓度为  $1.0 \times 10^{-3}$  mol/L 的  $Mg^{2+}$  储备液,记录下每次测试的荧光强度,并拟合曲线。如图 7

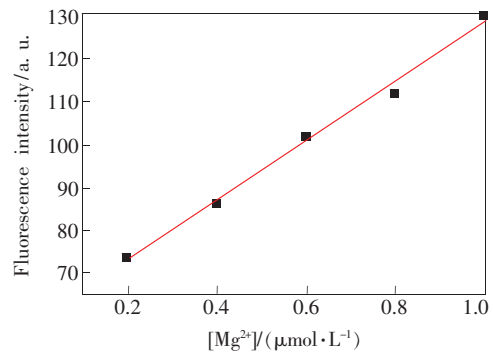


图 7 探针对  $Mg^{2+}$  的检测限

Fig. 7 Detection limit of probe to  $Mg^{2+}$

所示,拟合线性方程为  $y = 69.5786x + 59.4125$ , 线性相关系数为  $R^2 = 0.9967$ 。检测限可由公式  $D = 3\sigma/k$  得到,其中  $\sigma$  表示经几次测量的探针空白溶液的荧光强度的标准偏差, $k$  则为拟合线性曲线的斜率。经计算得出检测限为  $7.3 \times 10^{-8}$  mol/L,即探针检测到  $Mg^{2+}$  的最低浓度为  $7.3 \times 10^{-8}$  mol/L。

### 3.7 反应机理的探讨

该探针以香豆素为荧光团,探针分子中的杂

原子 N、O 参与了与  $Mg^{2+}$  的配位作用,Job's plot 和荧光滴定实验证明了探针与  $Mg^{2+}$  是按 1:1 配位的。反应机理如图 8 所示,在未加入  $Mg^{2+}$  之前,探针分子中 Schiff 碱的 N 原子上的孤对电子向香豆素基团转移电子,因而在激发态的探针分子只有微弱的荧光;当探针与  $Mg^{2+}$  结合以后,由于 N 原子参与了配位作用,N 原子上的孤对电子不再发生转移,此时激发态的探针分子与  $Mg^{2+}$  配位后就会发出很强的荧光。

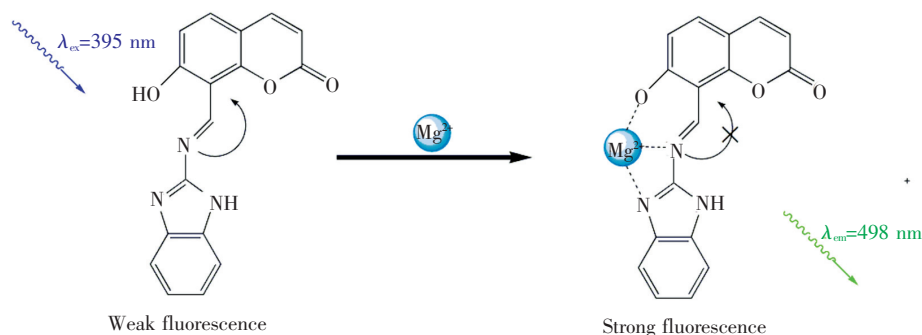


图8 探针与  $Mg^{2+}$  的反应机理

Fig. 8 Reaction mechanism of probe and  $Mg^{2+}$

## 4 结 论

本文设计合成了一种新型的基于 Schiff 碱结构的香豆素类  $Mg^{2+}$  荧光探针,该探针经光谱实验表明在识别  $Mg^{2+}$  的过程中,具有很好的离子选择性和抗干扰性,探针与  $Mg^{2+}$  是依据 1:1 的比例配位而形成配合物的,探针检测  $Mg^{2+}$  的检测限为

$7.3 \times 10^{-8}$  mol/L,因而具有良好的灵敏度。探针识别  $Mg^{2+}$  的过程是具有可逆性的。反应机理反映了探针与  $Mg^{2+}$  配位后发出强荧光是由于 N 原子配位后不能够向香豆素基团转移电子造成的。以上实验结果说明合成的新型  $Mg^{2+}$  荧光探针性能良好,为生命科学等领域实时监测  $Mg^{2+}$  的情况提供了可靠的实验保证。

## 参 考 文 献:

- [1] JIN L, GUO Z J, SUN Z Y, *et al.*. Assembly of 8-aminonaphthalene-1,3,6-trisulfonate intercalated layered double hydroxide film for the selective detection of  $Mg^{2+}$  [J]. *Sens. Actuators B*, 2012, 161(1):714-720.
- [2] RAY D, NAG A, JANA A, *et al.*. Coumarin derived chromophores in the donor-acceptor-donor format that gives fluorescence enhancement and large two-photon activity in presence of specific metal ions [J]. *Inorg. Chim. Acta*, 2010, 363(12):2824-2832.
- [3] O'ROURKE B, BACKX P H, MARBAN E. Phosphorylation-independent modulation of L-type calcium channels by magnesium-nucleotide complexes [J]. *Science*, 1992, 257(5067):245-248.
- [4] SCHMITZ C, PERRAUD A L, JOHNSON C O, *et al.*. Regulation of vertebrate cellular  $Mg^{2+}$  homeostasis by TRPM7 [J]. *Cell*, 2003, 114(2):191-200.
- [5] GUPTA V K, PRASAD R, KUMAR A. Magnesium-tetrazaporphyrin incorporated PVC matrix as a new material for fabrication of  $Mg^{2+}$  selective potentiometric sensor [J]. *Talanta*, 2004, 63(4):1027-1033.
- [6] SUZUKI Y, KOMATSU H, IKEDA T, *et al.*. Design and synthesis of  $Mg^{2+}$ -selective fluoroionophores based on a coumarin derivative and application for  $Mg^{2+}$  measurement in a living cell [J]. *Anal. Chem.*, 2002, 74(6):1423-1428.
- [7] SHODA T, KIKUCHI K, KOJIMA H, *et al.*. Development of selective, visible light-excitable, fluorescent magnesium ion

- probes with a novel fluorescence switching mechanism [J]. *Analyst*, 2003,128(6):719-723.
- [ 8 ] MONCAYO R, MONCAYO H. The WOMED model of benign thyroid disease; acquired magnesium deficiency due to physical and psychological stressors relates to dysfunction of oxidative phosphorylation [J]. *BBA Clin.*, 2015,3:44-64.
- [ 9 ] SONTIA B, TOUYZ R M. Role of magnesium in hypertension [J]. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2007,458(1):33-39.
- [10] JAHNEN-DECHENT W, KETTELER M. Magnesium basics [J]. *Clin. Kidney J.*, 2012,5(Suppl 1):i3-i14.
- [11] 陈顺志, 毛国春. 镁检测的方法及其临床意义 [J]. *临床检验杂志*, 1984,2(3):38-39.  
CHEN S Z, MAO G C. Magnesium detection methods and clinical significance [J]. *J. Clin. Examinat.*, 1984,2(3):38-39. (in Chinese)
- [12] LIU Z, PENG C N, LU Z X, *et al.*. A novel fluorescent sensor derived from Benzimidazo[2,1-a]benz[de]isoquinoline-7-one-12-carboxylic acid for  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  and PPI [J]. *Dyes Pigments*, 2015,123:85-91.
- [13] WENG L C, LEE N J, YEH W T, *et al.*. Lower intake of magnesium and dietary fiber increases the incidence of type 2 diabetes in Taiwanese [J]. *J. Formos. Med. Assoc.*, 2012,111(11):651-659.



杨文生(1974-),男,河北行唐人,博士,讲师,2013年于兰州大学获得博士学位,主要从事荧光染料及荧光探针的合成及应用的研究。

E-mail: ywsdzyx@yeah.net