

文章编号:1674-2869(2018)05-0524-06

一种新型罗丹明 B 类 Fe^{3+} 荧光探针的合成及性能

陈玉婷,汪苏平,程文翰,曾小平,郑华明,吴江渝*
武汉工程大学材料科学与工程学院,湖北 武汉 430205

摘要:以罗丹明 B (RhB)、水合肼、苯甲醛为原料,通过两步反应合成了一种新型罗丹明 B 类荧光探针 RhB-P,并利用傅里叶红外变换光谱与核磁共振氢谱对 RhB-P 的分子结构进行表征。紫外-可见光谱和荧光光谱表明:在 $V(\text{乙腈}):V(\text{水})=1:1$ 溶液中, RhB-P 对 Fe^{3+} 具有良好的选择性,溶液可从无色转变至粉色。荧光滴定实验以及 Job's 实验结果表明:络合物中 $n(\text{RhB-P}):n(\text{Fe}^{3+})=1:1$,且络合物的荧光强度在 $c(\text{Fe}^{3+})$ 为 $0.1\ \mu\text{mol/L}\sim 20\ \mu\text{mol/L}$ 区间范围内,与其呈正线性关系,检出限为 $0.193\ \mu\text{mol/L}$ 。

关键词:罗丹明 B;苯甲醛;铁离子;荧光探针;特异性识别

中图分类号: TB34 **文献标识码:** A **doi:** 10.3969/j.issn.1674-2869.2018.05.009

Synthesis and Properties of Novel Rhodamine B-Based Fe^{3+} Fluorescent Probe

CHEN Yuting, WANG Suping, CHENG Wenhan, ZENG Xiaoping, ZHENG Huaming, WU Jiangyu*

School of Materials Science and Engineering, Wuhan Institute of Technology, Wuhan 430205, China

Abstract: A novel Rhodamine B-derived fluorescent probe (RhB-P) was synthesized through two steps with Rhodamine B, hydrazine hydrate and benzaldehyde as the raw materials. Fourier-transform infrared spectroscopy and ^1H -nuclear magnetic resonance spectroscopy were utilized to investigate the chemical structure of RhB-P. UV-vis and fluorescence spectroscopy demonstrated that the probe RhB-P recognized Fe^{3+} with high selectivity in the $V(\text{acetonitrile}):V(\text{H}_2\text{O})=1:1$ solvent, and the colorless solution turned into the pink one. Meanwhile, the fluorescence titration and Job's plot revealed that RhB-P combined with Fe^{3+} into a stable chelate complex of $n(\text{RhB-P}):n(\text{Fe}^{3+})=1:1$, and the fluorescent intensity of the complex solution displayed a positive linear relationship with Fe^{3+} concentration in the range of $0.1\ \mu\text{mol/L}$ to $20\ \mu\text{mol/L}$ with $0.193\ \mu\text{mol/L}$ of detection limit.

Keywords: Rhodamine B; benzaldehyde; Fe^{3+} ; fluorescent probe; specific sensing

铁离子(Fe^{3+})是生物体中含量最多的过渡金属元素,在生物体的生命过程中起着至关重要的作用^[1],有极其重要的生理意义,在肌肉收缩、神经传导、酶催化、脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid, DNA)和核糖核酸(ribonucleic acid, RNA)的合成^[2]、细胞内渗透压调节以及酸碱平衡维持等方面,均有铁元素的参与。一旦生物体内铁元素缺乏,就会发生各种各样生理系统紊乱,引起疾

病^[3-7]。而人体内的 Fe^{3+} 含量一旦过高,心脏、肝脏、胰腺等器官将发生功能紊乱^[8-9]。而且人们赖以生存的自然环境中铁元素也无处不在,固态主要以氧化铁的形式存在,液态中以 Fe^{3+} 的形式存在。致使对 Fe^{3+} 的检测需求逐步上升,因此开发性能优异的 Fe^{3+} 检测工具是很有必要的,以便实时、在线动态检测生物体或环境中 Fe^{3+} 的含量和分布。在生物体诸多的生理活动中,常用检测 Fe^{3+}

收稿日期:2018-04-13

基金项目:武汉工程大学研究生教育创新基金(CX2015004)

作者简介:陈玉婷,硕士研究生。E-mail:cyuting@gmail.com

*通讯作者:吴江渝,博士,教授。E-mail:jiangy.wu@gmail.com

引文格式:陈玉婷,汪苏平,程文翰,等. 一种新型罗丹明 B 类 Fe^{3+} 荧光探针的合成及性能[J]. 武汉工程大学学报,2018,40(5):524-529.

的方法主要有原子吸收法^[10-11]、电感耦合等离子体发射光谱法^[12]、分光光度法^[13]、电感耦合等离子体质谱法^[14]、电化学法^[15]及荧光分析法^[16]等,但这些方法普遍存在流程复杂、检测设备贵重、检测成本高等缺点。而荧光探针由于其高选择性、高灵敏度和低成本在化学传感器研究领域越来越受到关注,并且利用罗丹明B(Rhodamine B, RhB)合成的探针分子在近些年受到极大重视^[17-23]。

本文以 RhB 和水合肼为原料合成 RhB 酰肼(Rhodamine B hydrazide, RhB-NH₂),再与苯甲醛一步反应制得一种新型罗丹明探针化合物 RhB-P。RhB-P 在 V(乙腈):V(水)=1:1 的混合溶液中,对 Fe³⁺有较高的选择性识别能力,并且灵敏度高、响

应快。

1 实验部分

1.1 主要试剂

RhB(国药集团化学试剂有限公司,化学纯),水合肼(国药集团化学试剂有限公司,分析纯),苯甲醛和盐酸(国药集团化学试剂有限公司,化学纯),氢氧化钠、冰醋酸、乙醇和乙腈(国药集团化学试剂有限公司,分析纯),二次蒸馏水。

1.2 合成方法

以乙醇做溶剂,将 RhB 和水合肼反应后制得 RhB-NH₂,再与过量的苯甲醛反应,合成 RhB-P。合成路线如图 1 所示。

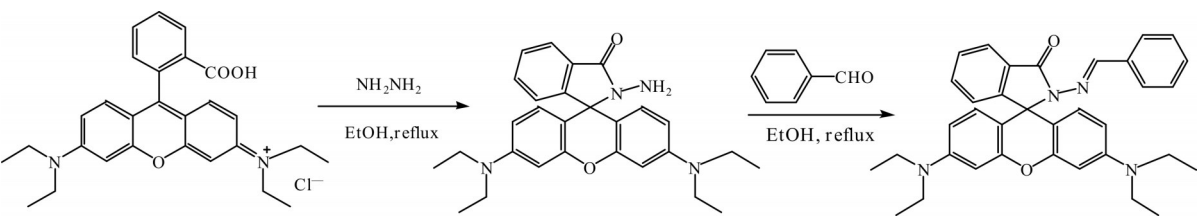


图 1 RhB-P 探针的合成路线图
Fig. 1 Synthesis route of RhB-P probe

1.2.1 RhB 酰肼的合成 采用文献^[24]合成方法,准确称取 1.0 g (2.07 mmol) 的 RhB,将其溶解于 40 mL 乙醇中,磁力搅拌缓慢升温至回流。加入过量的水合肼(1 mL),5 h 后直至粉红色消失。将冷却的反应混合物倒入蒸馏水中并用乙酸乙酯萃取,有机层用无水硫酸钠干燥,过滤并蒸发溶剂。产物在 V(甲醇):V(丙酮)=1:4 的溶液中重结晶,为白色固体,产率为 83.72%。

1.2.2 RhB-P 探针的合成 将 457 mg (1 mmol) RhB-NH₂溶于 10 mL 无水乙醇中,缓慢升温至回流,加入 0.5 mL 苯甲醛,滴加 3 滴冰醋酸作催化剂,4 h 后停止反应。待反应体系冷却至室温,将白色沉淀用无水乙醇洗涤 3 次,室温下真空干燥,得白色固体粉末,产率为 63.79%。

1.3 结构表征

在傅里叶变换红外光谱(Fourier transform infrared spectroscopy, FT-IR)仪(美国 Perkin Elmer 公司, Spectrum Two 型)上用 KBr 压片测定红外光谱,设定扫描范围为 4 000 cm⁻¹~500 cm⁻¹,以此检测 RhB-NH₂和 RhB-P 的特征峰。

采用核磁共振波谱(nuclear magnetic resonance spectroscopy, NMR)仪(美国 Agilent 公司, Agilent 400 MR 型),以氘仿作溶剂,对 RhB-NH₂作

结构分析;以 DMSO-d₆为溶剂,对探针 RhB-P 的结构做分析,前后对比进一步确定反应进程。

1.4 性能测试

1.4.1 探针分子 RhB-P 对 Fe³⁺的选择性 采用紫外可见分光光度(UV-visible spectrophotometer, UV-Vis)计(美国 Perkin Elmer 公司, Agilent 400MR 型),检测探针 RhB-P 分别与不同金属阳离子混合后的紫外吸收强度。以 V(乙腈):V(水)=1:1 的混合溶液为溶剂,配制不同种类金属阳离子(BaCl₂, CaCl₂, CuCl₂, FeCl₃, HgCl₂, KCl, FeCl₂, NaCl, MgCl₂)溶液,用于金属阳离子与荧光探针分子 RhB-P 络合紫外-可见光吸收的强度测定,确定探针 RhB-P 的选择性识别能力。采用荧光光谱(fluorescence spectrophotometers)仪(美国 SLM 公司, FL0910M014 型),设置扫描范围为 560 nm~680 nm,激发波长为 560 nm,激发光狭缝和发射光狭缝分别为 2.5 nm 和 5 nm。称取一定量的 FeCl₃和一种金属盐,共同溶于溶剂中得到浓度为 40 μmol/L 的混合溶液,称取一定量的探针 RhB-P,配制 40 μmol/L 的混合溶液。分别取 3 mL 上述两种溶液等体积混合,其最终浓度均为 20 μmol/L。混合均匀,室温下静置 30 min 后测试荧光强度,检测荧光强度是否会受其它共存金属离子的干扰。

1.4.2 探针分子 RhB-P 对 Fe^{3+} 的检测性能 配制 1 mmol/L 的 FeCl_3 溶液, 稀释得到 1 $\mu\text{mol/L}$ ~70 $\mu\text{mol/L}$ 的 FeCl_3 溶液体系。分别取 3 mL 的 FeCl_3 溶液与 3 mL 浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$ 的 RhB-P 探针溶液均匀混合后, 室温下静置 30 min。检测不同浓度 Fe^{3+} 与探针 RhB-P 络合后荧光强度的变化趋势。

1.4.3 RhB-P 探针分子与 Fe^{3+} 的络合机理 通过等摩尔连续变化法测定探针 RhB-P 与 Fe^{3+} 的络合比。固定 RhB-P 与 Fe^{3+} 在溶液体系中的总浓度为 40 $\mu\text{mol/L}$, 改变探针 RhB-P 与 Fe^{3+} 的组成比例, 测定荧光强度的变化。

2 结果与讨论

2.1 荧光探针的表征

2.1.1 探针分子的 FT-IR 表征 RhB-NH₂ 和探针 RhB-P 的 FT-IR 谱图如图 2 所示。2 970 cm^{-1} 和 2 987 cm^{-1} 处为 C—H 伸缩振动峰, 1 724 cm^{-1} 处出现的很强的峰为 C=O 伸缩振动吸收峰, 新出现的 1 587 cm^{-1} 处的吸收峰为 C=N 的伸缩振动吸收峰, 818 cm^{-1} 和 755 cm^{-1} 处为苯环上 C—H 弯曲振动吸收峰。说明胺和活性羰基缩合而成亚胺键, 苯甲醛与 RhB-NH₂ 反应完全。

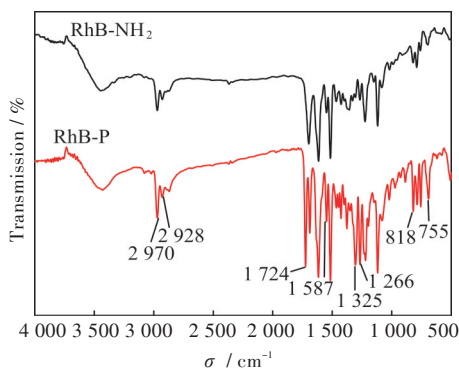


图2 RhB-NH₂和RhB-P的FT-IR谱图

Fig. 2 FT-IR spectra of RhB-NH₂ and RhB-P

2.1.2 探针分子的 $^1\text{H-NMR}$ 表征 对 RhB-NH₂ 进行 $^1\text{H-NMR}$ 表征, 核磁图谱如图 3(a) 所示。对于该化合物, 所用核磁溶剂为氘仿, 其测试数据如下: $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)\delta$: 7.77(q, 1H, Ar-H), 7.48(m, 2H, Ar-H), 7.00(q, 1H, Ar-H), 6.37(d, 2H, Xanthenen-H), 6.34(q, 4H, Xanthenen-H), 3.65(s, 2H, NH₂), 3.30(q, 8H, NCH₂CH₃), 1.12(t, 12H, NCH₂CH₃)。9 种氢原子的个数比为 1:2:1:2:2:2:2:8:12, 其对应的吸收峰的积分面积比为 1.00:2.02:1.03:1.83:1.90:1.99:2.02:7.95:11.97, 这与氢原子的个数比吻合, 证明所得产物为 RhB-NH₂。

为进一步证实探针 RhB-P 的分子结构, 对探针 RhB-P 的结构进行 $^1\text{H-NMR}$ 表征, 核磁图谱如图 3(b) 所示。对于该化合物, 所用核磁溶剂为 DMSO-d₆, 其测试数据如下, $^1\text{H-NMR}(\text{DMSO-d}_6)\delta$: 8.90(s, 1H, N=C—H), 7.88(d, 1H, Ar—H), 7.58(m, 2H, Ar—H), 7.41(m, 2H, Ar—H), 7.33(m, 3H, Ar—H), 7.09(d, 1H, Ar—H), 6.43(d, 2H, Xanthenen—H), 6.39(d, 2H, Xanthenen—H), 6.33(d, 2H, Xanthenen—H), 3.31(q, 8H, NCH₂CH₃), 1.05(t, 12H, NCH₂CH₃)。11 种氢原子的个数比为 1:1:2:2:3:1:2:2:2:8:12, 其对应的吸收峰的积分面积比为 1.00:0.98:1.98:2.03:3.04:1.04:2.00:1.99:2.01:8.04:11.98, 这与氢原子的个数比相符, 证明所得产物为目标化合物。

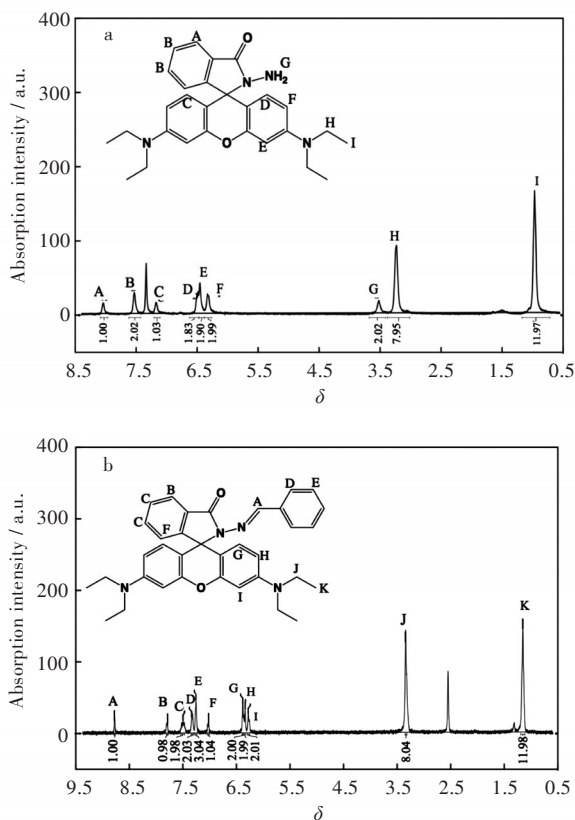


图3 $^1\text{H-NMR}$ 谱: (a) RhB-NH₂, (b) 探针分子 RhB-P

Fig. 3 $^1\text{H-NMR}$ spectra: (a) RhB-NH₂, (b) fluorescent probe RhB-P

2.2 RhB-P 探针分子对 Fe^{3+} 的检测

2.2.1 UV-Vis 检测 为了确定探针 RhB-P 对不同金属阳离子的选择性识别能力, 选择 Na⁺, K⁺, Mg²⁺, Ba²⁺, Ca²⁺, Cu²⁺, Hg²⁺, Fe²⁺, Fe³⁺ 为识别对象, 其盐溶液与 RhB-P 的溶液混合后检测其吸光度, 结果如图 4 所示。实验发现, Fe³⁺ 的组别在 560 nm 有明显的吸收峰, 溶液的颜色也由无色变为肉眼可识别

的枚红色,这是由于Fe³⁺诱导电子发生转移导致螺环结构打开;而其它组别中,溶液基本保持无色状态,此时RhB-P探针主要以螺环形式存在。所有测试条件下金属离子的浓度均为20 μmol/L。

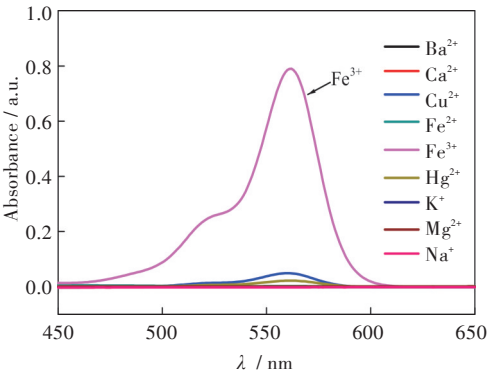


图4 探针RhB-P对不同金属离子UV-Vis谱
Fig. 4 UV-Vis absorption spectra of RhB-P for several metal ions

2.2.2 荧光检测 为进一步确认RhB-P探针对Fe³⁺的响应特性,将Na⁺,K⁺,Mg²⁺,Ba²⁺,Ca²⁺,Cu²⁺,Hg²⁺,Fe²⁺,Fe³⁺的金属盐溶液分别与RhB-P的溶液

混合后进行荧光测试,结果如图5(a)所示。实验发现,未加Fe³⁺的组别,经检测在586 nm的波长处未显示明显荧光增强,而加入Fe³⁺的组别,在586 nm处有明显的荧光强度出现。所有离子的浓度均为20 μmol/L。为考察探针分子的抗干扰性能,在其他离子共存的情况下,测定混合体系的荧光强度,实验结果如图5(b)所示。探针RhB-P作为检测Fe³⁺的荧光化学传感器具有良好的抗干扰能力,在检测过程中其他金属离子不会对检测结果带来明显的干扰。不同浓度的Fe³⁺对探针RhB-P的荧光光谱的影响如图5(c)所示,结果表明,随着Fe³⁺浓度的升高,溶液的荧光强度逐渐增大。在586 nm处,Fe³⁺浓度与荧光强度的关系如图5(d)所示,Fe³⁺浓度在0.1 μmol/L~20 μmol/L范围内与RhB-P探针的荧光强度呈良好的线性关系,表明RhB-P探针分子可以定量检测此范围内Fe³⁺的浓度。根据检出限公式: $LOD=3\delta/S$ (LOD 为检出限, δ 为空白样数据标准偏差, S 为标准曲线斜率),计算得该探针的检出限为0.058 μmol/L。

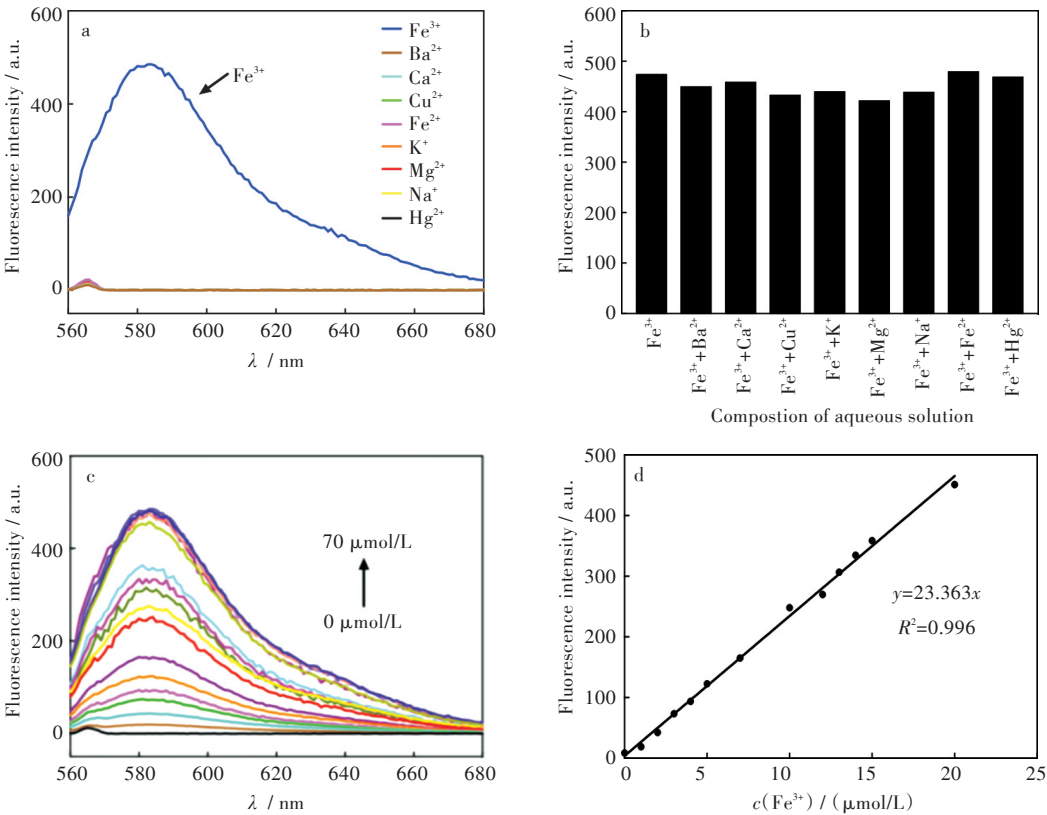


图5 (a)不同金属离子条件下探针RhB-P的荧光光谱图,(b)不同金属离子与Fe³⁺共存条件下探针RhB-P的荧光强度变化图,(c)不同Fe³⁺浓度条件下探针RhB-P的荧光光谱图,(d)Fe³⁺浓度与探针RhB-P的荧光强度的线性关系图
Fig. 5 (a) Fluorescence spectra of probe RhB-P with different metal ions, (b) fluorescence response of RhB-P probe to various metal ions with Fe³⁺, (c) fluorescence spectra of RhB-P upon various concentration of Fe³⁺, and (d) linear relationship between fluorescence intensity of RhB-P probe and Fe³⁺ concentration

2.3 RhB-P探针与Fe³⁺的络合方式

为了进一步确定Fe³⁺与RhB-P探针之间的络合比,采用等物质的量连续变化法,使探针RhB-P与Fe³⁺的总浓度保持40 μmol/L,随着Fe³⁺摩尔分数的不断改变,体系的荧光强度随之变化,如图6(a)所示。当Fe³⁺的摩尔分数为0.5时,探针RhB-P与Fe³⁺在586 nm处呈现荧光强度最大值,表明探针化合物与Fe³⁺的络合比是1:1,推测其络合方式可能如图6(b)所示。

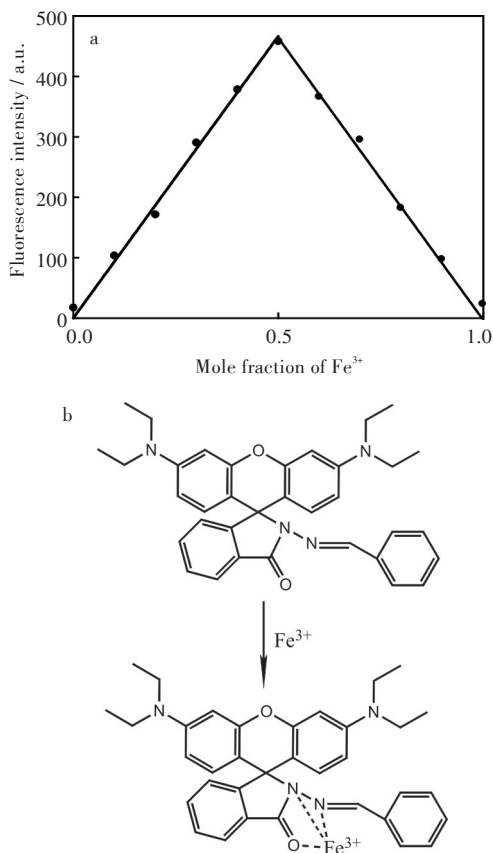


图6 (a)探针RhB-P与Fe³⁺的Job's Plot 曲线,
(b)探针RhB-P和Fe³⁺的配位反应机理

Fig. 6 (a) Job's plot of fluorescent RhB-P probe and Fe³⁺, (b) coordination reaction mechanism of RhB-P probe with Fe³⁺

3 结 语

本文以RhB、水合肼和苯甲醛为原料,经两步反应得到一种新型荧光探针分子RhB-P,其对Fe³⁺能进行选择识别,且灵敏度高。可肉眼观察其颜色变化,并在UV-Vis光谱中于560 nm处有明显的吸收峰;在荧光光谱中586 nm处,随着Fe³⁺浓度增大有明显的荧光增强。Fe³⁺浓度在0.1 μmol/L~20 μmol/L范围内与探针RhB-P的荧光强度呈良好的线性关系,其在V(乙腈):V(水)=1:1的溶液中

检出限为0.058 μmol/L。该探针分子有望用于河水、土壤样品中Fe³⁺浓度的测定,并有望在水质检测、食品安全等方面取得应用。

参考文献:

- [1] LI S, ZHANG D, WANG M, et al. Synthesis and properties of a novel FRET-based ratiometric fluorescent sensor for Cu²⁺[J]. Journal of Fluorescence, 2016, 26(3): 769-774.
- [2] NAIRZ M, THEURL I, SWIRSKI F K, et al. "Pumping iron"—how macrophages handle iron at the systemic, microenvironmental, and cellular levels [J]. Pflügers Archiv: European Journal of Physiology, 2017, 469 (3/4): 397-418.
- [3] WANG J, ZHANG D, LIU Y, et al. A N-stabilization rhodamine-based fluorescent chemosensor for Fe³⁺, in aqueous solution and its application in bioimaging [J]. Sensors & Actuators B Chemical, 2014, 191 (2): 344-350.
- [4] MA Y M, HIDER R C. The selective quantification of iron by hexadentate fluorescent probes [J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2009, 17(23): 8093-8101.
- [5] DORNELLES A S, GARCIA V A, LIMA M, et al. mRNA Expression of proteins involved in iron homeostasis in brain regions is altered by age and by iron overloading in the neonatal period [J]. Neurochemical Research, 2010, 35(4): 564-571.
- [6] CRICHTON R R, DEXTER D T, WARD R J. Metal based neurodegenerative diseases—from molecular mechanisms to therapeutic strategies [J]. Coordination Chemistry Reviews, 2008, 252(10): 1189-1199.
- [7] BENJAMIN S, CHARLES W M, SHAUN D F, et al. A reactivity-based probe of the intercellular labile ferrous iron pool [J]. Nature Chemical Biology, 2016 (12): 680-685.
- [8] SHI B, SU Y, ZHANG L L, et al. Nitrogen and phosphorus Co-doped carbon nanodots as a novel fluorescent probe for highly sensitive detection of Fe³⁺ in human serum and living cells [J]. Acs Applied Materials & Interfaces, 2016, 8(17): 10717-10725.
- [9] TRAORÉ D A, EL A G, JACQUAMET L, et al. Structural and functional characterization of 2-oxo-histidine in oxidized PerR protein [J]. Nature Chemical Biology, 2009, 5(1): 53-59.
- [10] CABON J Y, GIAMARCHI P, LE B A. Determination of iron in seawater by electrothermal atomic absorption spectrometry and atomic fluorescence spectrometry: a comparative study [J]. Analytica Chimica Acta, 2010, 664(2): 114-120.

[11] GOUDA A. A new coprecipitation method without carrier element for separation and preconcentration of some metal ions at trace levels in water and food samples[J]. *Talanta*,2016,146(45):435-441.

[12] COPAT C, ARENA G, FIORE M, et al. Heavy metals concentrations in fish and shellfish from eastern Mediterranean Sea: consumption advisories[J]. *Food and Chemical Toxicology*,2013,53(3):33-37.

[13] LUNVONGSA S, OSHIMA M, MOTOMIZU S. Determination of total and dissolved amount of iron in water samples using catalytic spectrophotometric flow injection analysis[J]. *Talanta*,2006,68(3):969-973.

[14] 朱燕,李晓林,李玉兰,等. 同位素稀释电感耦合等离子体质谱法分析降尘中铂族元素[J]. *分析化学*, 2011,39(5):695-699.

[15] HUANG K, YANG H, ZHOU Z, et al. Multisignal chemosensor for Cr³⁺ and its application in bioimaging[J]. *Organic Letters*,2008,10(12):2557-2560.

[16] DU P, LIPPARD S J. A highly selective turn-on colorimetric, red fluorescent sensor for detecting mobile zinc in living cells[J]. *Inorganic Chemistry*, 2010,49(23):10753-10755.

[17] HU Z Q, FENG Y C, HUANG H Q, et al. Fe³⁺-selective fluorescent probe based on Rhodamine B and its application in bioimaging[J]. *Sensors & Actuators B Chemical*,2011,156(1):428-432.

[18] 黎俊波,李楠楠,余响林,等. 高选择性铁离子荧光探针的合成及性质研究[J]. *武汉工程大学学报*, 2010,32(5):11-14.

[19] ZHANG Q, LIU X J, HE R C, et al. Development of a fluorescent-type sensor based on rhodamine B for Fe (III) determination [J]. *Chemistry Letters*, 2017, 47 (2):122-125.

[20] 王胜清,申世立,张延如,等. 小分子生物硫醇荧光探针研究进展浅析[J]. *有机化学*, 2014 (9): 1717-1729.

[21] XU H T, DING H C, LI G, et al. A highly selective fluorescent chemosensor for Fe³⁺ based on a new diarylethene with a rhodamine 6G unit [J]. *RSC Advances*,2017,7(47):29827-29834.

[22] MENG Q, SU W, HE C, et al. Novel chitosan-based fluorescent materials for the selective detection and adsorption of Fe³⁺ in water and consequent bio-imaging applications[J]. *Talanta*,2012,97(16):456-461.

[23] SHVARTSMAN M, KIKKERI R, SHANZER A, et al. Non-transferrin-bound iron reaches mitochondria by a chelator-inaccessible mechanism: biological and clinical implications [J]. *American Journal of Physiology Cell Physiology*,2007,293(4):1383-1394.

[24] YANG Y, GAO C Y, LI B, et al. A rhodamine-based colorimetric and reversible fluorescent chemosensor for selectively detection of Cu²⁺, and Hg²⁺ ions[J]. *Sensors and Actuators B Chemical*,2014,199:121-126.

本文编辑:苗 变