

一种检测环境样品和细胞中肼的香豆素类 比率型荧光探针

盛 筱, 沈亚龙, 张 晨, 张艺雯, 刘树玲, 王守信*

(济宁医学院 药学院, 山东 日照 276826)

摘要: 以香豆素为荧光团、4-溴丁酰基为识别基团, 设计合成了一种比率型肼荧光探针 3-(4-氯苯基)-2-氧代-2H-苯并吡喃-7-基-4-溴丁酸酯 (COCB)。通过 ^1H NMR、 ^{13}C NMR 和 HRMS 确证其结构。肼对探针 COCB 中溴代丁酰基的选择性脱保护使分子内电荷转移 (ICT) 过程恢复; 探针 COCB 在 420 nm 处蓝色荧光衰减, 而在 480 nm 处青色荧光增强, 实现了对肼的比率检测。探针 COCB 对肼表现出高选择性、高灵敏度和强抗干扰能力, 并能在较宽的线性范围 (0~250 $\mu\text{mol/L}$) 和 pH 范围 (6~11) 内检测肼, 检出限低至 0.15 $\mu\text{mol/L}$ 。此外, 探针 COCB 合成简便, 细胞毒性较低, 已成功用于实际水样、土壤以及活细胞中肼的检测。

关键词: 香豆素; 肼; 合成; 比率型荧光探针; 细胞成像; 功能材料

中图分类号: O657.3; X832 文献标识码: A 文章编号: 1003-5214 (2023) 12-2641-09

A coumarin-based ratiometric fluorescent probe for detection of hydrazine in environmental samples and living cells

SHENG Xiao, SHEN Yalong, ZHANG Chen, ZHANG Yiwen, LIU Shuling, WANG Shouxin*

(School of Pharmaceutical Sciences, Jining Medical University, Rizhao 276826, Shandong, China)

Abstract: A ratiometric fluorescent probe 3-(4-chlorophenyl)-2-oxo-2H-chromen-7-yl-4-bromobutanoate (COCB) for hydrazine was designed and synthesized from coumarin and 4-bromobutyryl, and characterized for structural analysis by ^1H NMR, ^{13}C NMR and HRMS. The selective deprotection of hydrazine for 4-bromobutyryl group in COCB led to the recovery of the intramolecular charge transfer (ICT) process. Probe COCB exhibited an attenuation of blue emission at 420 nm and an enhancement of cyan emission at 480 nm, achieving ratiometric detection for hydrazine. Probe COCB showed high selectivity, high sensitivity and strong anti-interference ability for hydrazine detection in a wide linear range (0~250 $\mu\text{mol/L}$) and pH range (6~11) with a detection limit as low as 0.15 $\mu\text{mol/L}$. Moreover, probe COCB, with easy synthesis and low cytotoxicity, was successfully used for the detection of hydrazine in actual water samples, soils and living cells.

Key words: coumarin; hydrazine; synthesis; ratiometric fluorescent probe; cell imaging; functional materials

肼 (N_2H_4) 是一种高活性的碱和还原剂, 被广泛用于医药、农药和化工等领域^[1-3]。此外, 肼作为一种高能燃料, 还常用作火箭、导弹等的推进剂^[4-5]。但肼也是一种高毒性的物质, 其泄漏会造成严重的环境污染。肼还能通过呼吸、皮肤接触等方式进入人体, 并会对肝、肾、肺和中枢神经系统造成严重

损害, 甚至会导致基因突变或癌症^[6-8]。美国环境保护署 (EPA) 已将肼列为潜在的致癌物, 并规定水中肼的浓度 $\leq 0.31 \mu\text{mol/L}$ ^[9]。因此, 亟需开发一种简便、可靠的方法来检测环境和生物体内痕量的肼。

肼的传统检测方法有色谱法^[10]、滴定法^[11]、电化学法^[12]、表面增强拉曼光谱法^[13]等, 但这些方法

收稿日期: 2023-01-13; 定用日期: 2023-03-28; DOI: 10.13550/j.jxhg.20230027

基金项目: 山东省自然科学基金项目 (ZR2020MB107); 山东省大学生创新创业训练计划项目 (S202210443009)

作者简介: 盛 筱 (1982—), 女, 高级实验师, E-mail: shengxiaol234@126.com。联系人: 王守信 (1981—), 男, 副教授, E-mail: shouxinwang@mail.jnmc.edu.cn。

存在耗时、样品处理过程复杂及会破坏组织或细胞等问题,不适合生物样品中胍的检测。近些年,小分子荧光探针因具有操作简便、灵敏度高、选择性好、非侵入性以及良好的生物相容性等优点,在分析检测领域中得到了广泛应用^[14-16]。迄今为止,已报道了多种反应机制的胍荧光探针^[17-18],例如:选择性脱保护^[19-20]、与芳醛的缩合反应^[21-22]、成环反应^[23-24]、开环反应^[25-26]、与二氰基乙烯反应成脎^[27-28]等,但许多胍荧光探针还存在合成步骤繁琐、检出限高、检测范围窄等缺点,一些胍荧光探针还会受到其他竞争性胺类化合物的干扰。此外,大多数胍荧光探针属于 Off-On 型,其测量基于荧光强度的单一信号变化,容易受到探针浓度、激发强度、环境因素等诸多因素的干扰,导致检测误差增大。而比率型荧光探针凭借两个发射波长的自校准,消除了可能的外部干扰,具有更高的灵敏度和准确性^[29]。目前,用于检测胍的比率型荧光探针还相对较少。因此,开发一种合成简便、性能优异的比率型荧光探针来检测胍具有重要的意义。

香豆素类化合物因具有量子产率高、斯托克斯位移大、易于修饰以及细胞毒性低等优点,被广泛用于荧光探针的设计与开发^[30]。本文拟以香豆素为荧光团、4-溴丁酰基为识别基团,通过 2 步反应来合成一种比率型胍荧光探针 3-(4-氯苯基)-2-氧代-2H-苯并吡喃-7-基-4-溴丁酸酯(COCB),分别在香豆素的 3-位和 7-位引入电子受体 4-氯苯基和电子给体羟基得到荧光母体 3-(4-氯苯基)-7-羟基-2H-苯并吡喃-2-酮(CHCO),形成的推拉电子共轭体系将有效增强分子内电荷转移(ICT)效应^[31]。4-溴丁酰基作为胍的识别基团,一方面,其作为吸电子基能够很好地抑制探针分子中的 ICT 过程,在探针 COCB 与胍反应后又能选择性地脱去 4-溴丁酰基,并释放出荧光母体 CHCO,使 ICT 过程恢复,探针溶液的荧光发射峰发生明显红移,实现对胍的比率检测;另一方面,4-溴丁酰基与胍的取代-环化-消除反应机制能够很好地排除其他胺类化合物的干扰^[32-33],提高探针的选择性。本研究有望为环境和生物体内痕量胍的识别与检测提供一种简单、有效且实用的方法。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

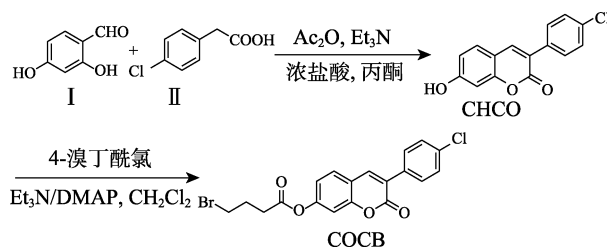
2,4-二羟基苯甲醛(I)、4-氯苯乙酸(II)、4-溴丁酰氯、4-二甲氨基吡啶(DMAP)、三乙胺(Et₃N)、半胱氨酸(Cys)、高半胱氨酸(Hcy)、3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基溴化四唑(MTT),AR,上海麦克林生化科技股份有限公司;水合胍、乙酸酐

(Ac₂O)、苯胺、尿素、硫脲、羟胺、各种金属盐,AR,国药集团化学试剂有限公司;柱层析硅胶(200~300目),青岛海洋化工有限公司;成骨细胞(MC3T3-E1),国家实验细胞资源共享平台;所用其他试剂和溶剂均为分析纯,实验中用水均为二次蒸馏水,自制。

Bruker Avance NEO 400 MHz 核磁共振波谱仪,瑞士 Bruker 公司;Agilent 6540 Q-TOF 型质谱仪,美国 Agilent 公司;PHSJ-4A 型 pH 计,上海仪电科学仪器股份有限公司;Leica STELLARIS 5 激光共聚焦显微镜,德国 Leica 公司;F-4600 荧光分光光度计,日本 Hitachi 公司;UV-2450 紫外分光光度计、Prominence LC-20A 高效液相色谱仪,日本 Shimadzu 公司;DNM-9602G 酶标分析仪,北京普朗新技术有限公司。

1.2 探针 COCB 的合成

探针 COCB 与荧光母体 CHCO 的合成路线如下所示:



荧光母体 CHCO 的合成:将 2,4-二羟基苯甲醛(0.50 g, 3.6 mmol)、4-氯苯乙酸(0.93 g, 5.4 mmol)以及三乙胺(1.10 g, 10.8 mmol)置于 50 mL 圆底烧瓶中,加入醋酸酐(10 mL),120 °C 油浴加热,反应 7 h 后,停止反应,冷却后加水 20 mL,析出固体,抽滤、水洗后 60 °C 真空干燥 6 h。将所得固体置于 50 mL 圆底烧瓶中,加入 8 mL 浓盐酸和 4 mL 丙酮,于 80 °C 油浴中加热搅拌,6 h 后停止反应,冷却后抽滤、水洗,60 °C 真空干燥 6 h,得固体粗品。经硅胶柱纯化〔展开剂为 *V*(乙酸乙酯):*V*(石油醚)=1:2 的混合液〕得白色固体 0.60 g,产率为 61%。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ : 10.65 (s, 1H), 8.19 (s, 1H), 7.73 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H), 7.68 (d, *J* = 5.7 Hz, 1H), 7.49 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H), 6.83 (dd, *J* = 5.6、1.0 Hz, 1H), 6.76 (s, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ : 161.45, 159.90, 154.99, 141.41, 133.91, 132.64, 130.11, 129.99, 128.16, 120.81, 113.48, 111.88, 101.73。HRMS(ESI), C₁₅H₉ClNaO₃, *m/z*: [M+Na]⁺ 理论值 295.0132;测定值 295.0137。

探针 COCB 的合成:将 CHCO (0.10 g, 0.37 mmol), 三乙胺(0.11 g, 1.10 mmol)、DMAP (4.5 mg, 0.037 mmol)置于 50 mL 圆底烧瓶中,加入 20 mL 二氯甲烷,室温下搅拌。将 4-溴丁酰氯(0.10 g, 0.56 mmol)溶于 5 mL 二氯甲烷中,缓慢

滴至反应液中; 室温下搅拌反应 7 h, 除去溶剂, 过硅胶柱纯化〔展开剂为 $V(\text{乙酸乙酯}):V(\text{石油醚})=1:3$ 的混合液〕得产物 0.13 g, 产率 83%。

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$), δ : 8.31 (s, 1H), 7.82 (d, $J=5.6$ Hz, 1H), 7.76 (d, $J=5.5$ Hz, 2H), 7.54 (d, $J=5.5$ Hz, 2H), 7.36 (s, 1H), 7.22 (d, $J=5.6$ Hz, 1H), 3.65 (t, $J=4.3$ Hz, 2H), 2.79 (t, $J=4.8$ Hz, 2H), 2.18~2.22 (m, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$), δ : 170.61, 159.35, 153.48, 152.73, 140.42, 133.40, 133.31, 130.27, 129.58, 128.27, 124.96, 118.85, 117.32, 109.74, 33.86, 32.15, 27.43; HRMS(ESI), $\text{C}_{19}\text{H}_{15}\text{BrClO}_4$, m/Z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ 理论值 420.9837; 测定值 420.9838。

1.3 表征和性能测试

1.3.1 荧光光谱测试

以二甲基亚砜 (DMSO) 为溶剂配制浓度为 5 mmol/L 探针 COCB 的储备液; 将胍、阳离子、阴离子、胍类似物等分析物用二次蒸馏水配制成 10 mmol/L 的储备液。测定体系: 将 3 μL 探针 COCB 的储备液与适当浓度被测物质的储备液混合, 用磷酸盐缓冲溶液 (PBS 溶液, $\text{pH}=7.4$) /DMSO (体积比为 1:1) 混合液定容至 3 mL, 置于比色皿中。测试均在室温下进行, 反应时间设为 70 min, 激发波长为 350 nm, 激发和发射狭缝宽度分别为 2.5 和 2.5 nm, 电压为 700 V。

1.3.2 HPLC 测试

化合物 COCB 和 CHCO 的测试浓度均为 5 $\mu\text{mol/L}$, 进样量为 10 μL 。流动相为 $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ 混合液 (体积比为 85:15), 流速为 1 mL/min。检测波长为 350 nm。色谱柱为 Diamonsil C18(2)柱 (150 mm $\times$ 4.6 mm $\times$ 5 μm)。

1.4 实际水样中胍的检测

按照文献[34]采用标准加入法测定实际水样中胍的含量。自来水取自实验室, 湖水取自济宁医学院日照校区鉴湖, 测试前先用微孔滤膜过滤水样除去杂质。以实际水样代替 PBS 溶液进行荧光光谱测定, 测定体系中添加胍的浓度分别为 5、10 和 25 $\mu\text{mol/L}$, 其他和上述荧光光谱测定方法相同。

1.5 细胞毒性测试

将 MC3T3-E1 细胞接种到 96 孔板, 用体积分数 10% 的胎牛血清的杜尔贝科改良伊格尔培养基 (DMEM) 于 37 $^{\circ}\text{C}$, 体积分数 5% 的 CO_2 条件下培养 24 h 至细胞贴壁。然后分别加入不同浓度 (10、20、30、40、50 $\mu\text{mol/L}$) 探针 COCB 的培养基溶液, 并在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数 5% 的 CO_2 环境下继续培养 24 h。吸去孔中培养液, 每孔加入 20 μL MTT 溶液 (质量浓度为 5 g/L) 并补充培养液, 在相同条件下再培养 4 h 后, 吸去孔中液体, 并加入 DMSO (150 μL /孔), 振荡 10 min。然后用酶标分析仪测

量溶液在 490 nm 时的吸光度 (OD)。根据式 (1) 计算细胞存活率:

$$\text{CV}/\% = \frac{\text{OD}_s - \text{OD}_b}{\text{OD}_c - \text{OD}_b} \times 100 \quad (1)$$

式中: CV 为细胞存活率, %; OD_s 为样品组的吸光度; OD_c 为不加样品对照组的吸光度; OD_b 为不加样品也不加细胞空白组的吸光度。

1.6 细胞成像实验

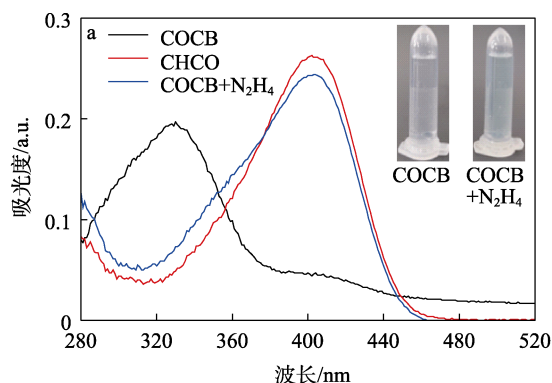
将探针 COCB (10 $\mu\text{mol/L}$) 和 MC3T3-E1 细胞在 37 $^{\circ}\text{C}$ 共培养 30 min, 用 PBS 溶液清洗 3 次后分成两份; 一份直接在激光共聚焦显微镜下成像; 另一份细胞中再加入浓度为 500 $\mu\text{mol/L}$ 的胍, 共培养 60 min 后用 PBS 溶液清洗 3 次, 在激光共聚焦显微镜下成像。此外, 将未添加 COCB 和胍的 MC3T3-E1 细胞进行细胞成像, 作为空白对照。荧光成像的激发波长为 405 nm, 发射波长范围: 蓝色通道 420~460 nm; 绿色通道 480~520 nm。

2 结果与讨论

2.1 探针光谱性质分析

首先, 在 PBS 溶液/DMSO (体积比为 1:1) 体系中测试了探针 COCB (5 $\mu\text{mol/L}$) 对胍 (500 $\mu\text{mol/L}$, 是指在体系中的终浓度, 下同) 的光谱响应, 结果如图 1 所示。

由图 1a 可知, 探针 COCB 在 330 nm 处有明显的吸收峰; 当加入胍后, 在 402 nm 处出现一个新的吸收峰, 溶液颜色由无色变为浅绿色 (图 1a 插图), 与荧光母体 CHCO (5 $\mu\text{mol/L}$) 的紫外-可见吸收谱图一致。在荧光发射谱图中 (图 1b), 选择 350 nm 作为激发波长, 探针 COCB 的最大荧光发射峰在 420 nm, 加入胍后, 其最大荧光发射峰红移至 480 nm, 荧光颜色由蓝色变为青色 (图 1b 插图), 得到的荧光发射光谱与荧光母体 CHCO 也相吻合。以上结果表明, 探针 COCB 可用于胍的荧光比率检测。



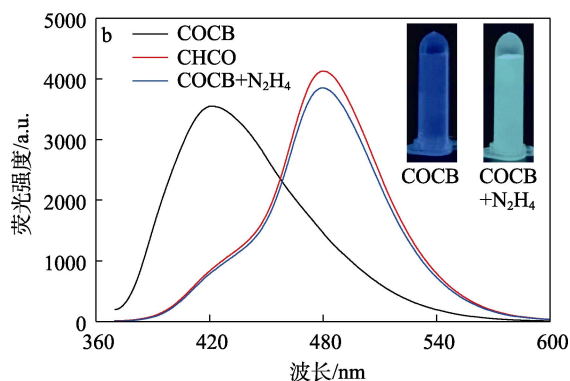


图 1 COCB 与胍反应前后以及 CHCO 的 UV-Vis 吸收光谱 (a) 和荧光发射光谱 (b), 激发波长 (λ_{ex}) 为 350 nm [插图: COCB 与胍反应前后在可见光 (a) 和 365 nm 紫外光 (b) 下的照片]

Fig. 1 UV-Vis absorption (a) and fluorescence emission (b) spectra of COCB before and after reacting with hydrazine, and CHCO, excitation wavelength (λ_{ex}) 350 nm [Inset photographs are COCB with or without hydrazine in visible light (a) and 365 nm UV light (b)]

2.2 反应时间和 pH 的影响

在 PBS 溶液/DMSO (体积比为 1 : 1) 体系中, 考察了探针 COCB (5 $\mu\text{mol/L}$) 与胍 (同 2.1 节) 的最佳反应时间及其在测试体系中的稳定性, 结果见图 2a。

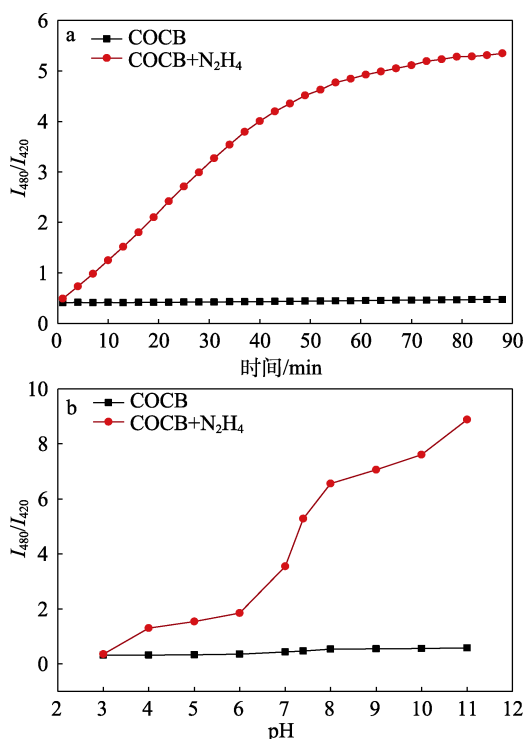


图 2 在有、无胍存在时, 反应时间 (a) 和 pH (b) 对探针 COCB 荧光强度比值的影响

Fig. 2 Effect of time (a) and pH (b) on fluorescence intensity ratio of probe COCB in the absence and presence of hydrazine

由图 2a 可知, 反应时间对探针 COCB 荧光发

射光谱中 480 和 420 nm 处荧光强度比值 (I_{480}/I_{420}) 有一定的影响。不加胍时, 探针 COCB 的 I_{480}/I_{420} 随时间的增加基本保持不变, 说明探针 COCB 在溶液中非常稳定。当加入胍后, 探针 COCB 的 I_{480}/I_{420} 随反应时间的增加而逐渐增大, 并在 70 min 后基本趋于稳定。所以后续实验中, 将反应时间设定为 70 min。

在 PBS 溶液/DMSO (体积比为 1 : 1) 体系中, 考察了不同 pH 对探针 COCB 识别胍的影响, 结果如图 2b 所示。由图 2b 可知, 不加胍时, 探针 COCB 在 pH 3~11 范围内的 I_{480}/I_{420} 变化很小, 说明探针自身在酸碱条件下都较为稳定。当加入胍后, 在 pH 3~11 范围内的 I_{480}/I_{420} 随着 pH 的增加而增大, 且在 pH 6~11 范围内增大尤为显著, 表明探针 COCB 更适合在中性和碱性条件下检测胍。故选用 pH=7.4 作为检测条件。

2.3 探针 COCB 检出限的测定

在 PBS 溶液/DMSO (体积比为 1 : 1) 体系中, 通过对胍的荧光滴定实验测定了探针 COCB (5 $\mu\text{mol/L}$) 的线性范围和检出限, 结果如图 3 所示。

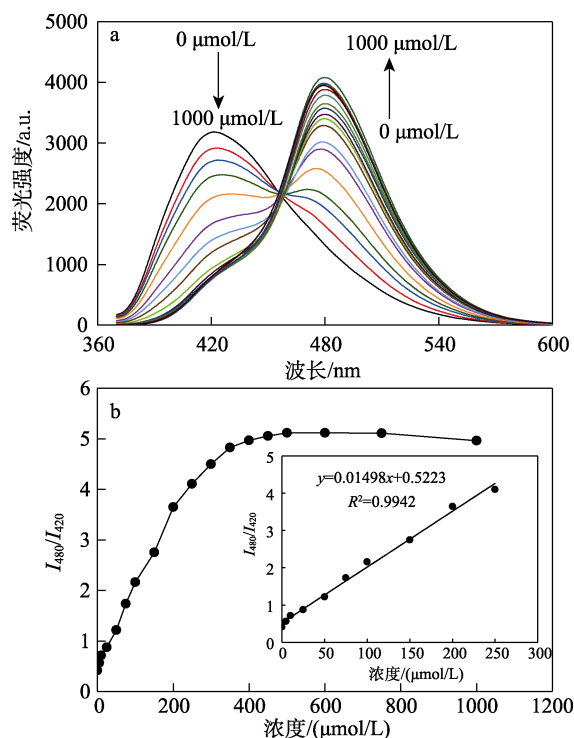


图 3 不同浓度的胍对探针 COCB 荧光强度的影响 (a); I_{480}/I_{420} 与胍浓度的关系 [插图: I_{480}/I_{420} 与胍浓度 (0~250 $\mu\text{mol/L}$) 的线性相关曲线] (b)

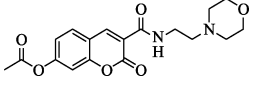
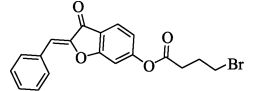
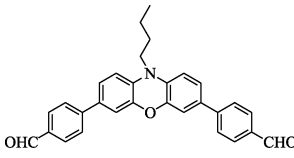
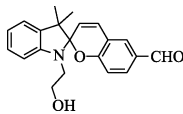
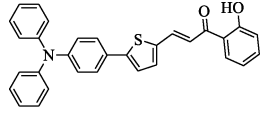
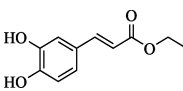
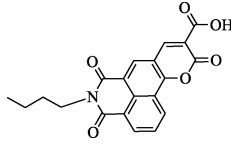
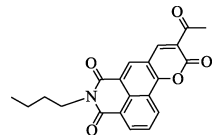
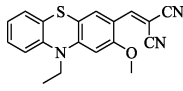
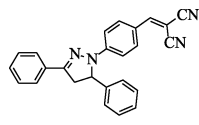
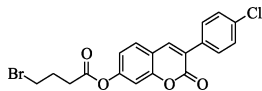
Fig. 3 Effect of various concentrations of hydrazine on fluorescence intensity of probe COCB (a); Relationship between I_{480}/I_{420} and hydrazine concentration [The inset shows the correlation curve between I_{480}/I_{420} and hydrazine concentration (0~250 $\mu\text{mol/L}$)] (b)

胍浓度在 0~1000 $\mu\text{mol/L}$ 范围内, 随着胍浓度的增大, 探针荧光发射峰从 420 nm 逐渐红移到 480 nm (图 3a); 同时 I_{480}/I_{420} 不断增大, 并在胍浓度 500 $\mu\text{mol/L}$ 时达到最大值 (图 3b)。由图 3b 插图可知, 探针 COCB 的 I_{480}/I_{420} 与胍浓度在 0~250 $\mu\text{mol/L}$ 范围内具有良好的线性关系, 回归方程为 $y = 0.01498x + 0.5223$ ($R^2 = 0.9942$)。其检出限 (LOD) 由公式 $\text{LOD} = 3\sigma/K$ (其中, σ 为空白样测量值的标准

偏差, K 为直线斜率) 计算得出, 结果为 0.15 $\mu\text{mol/L}$, 低于 EPA 限定的阈值 0.31 $\mu\text{mol/L}$ 。以上结果表明, 探针 COCB 具有较高的灵敏度, 可用于胍的定量检测。

将探针 COCB 与文献报道的其他胍荧光探针进行了比较, 结果见表 1。由表 1 可知, 探针 COCB 在检测胍时具有更宽的线性范围、较低的检测限以及较宽的 pH 适用范围等优势。

表 1 探针 COCB 与其他胍荧光探针的比较
Table 1 Comparison of the probe COCB with other fluorescent probes for hydrazine

探针结构式	类型	检出限/ $(\mu\text{mol/L})$	线性范围/ $(\mu\text{mol/L})$	pH 适用范围	参考文献
	Off-On	3.93	20~70	5.5~10.5	[19]
	Off-On	0.75	10~100	6~9	[20]
	比率	0.17	1.0~5.5	—	[21]
	On-Off	1.26	5~100	4~10	[22]
	比率	0.23	0~80	6~9	[23]
	Off-On	0.31	20~50	3~8	[24]
	比率	0.036	0~50	8~10	[25]
	比率	0.20	60~160	6~9	[26]
	Off-On	2.60	0~5	6~10	[27]
	Off-On	6.16	15~35	5~8	[28]
	比率	0.15	0~250	6~11	本文

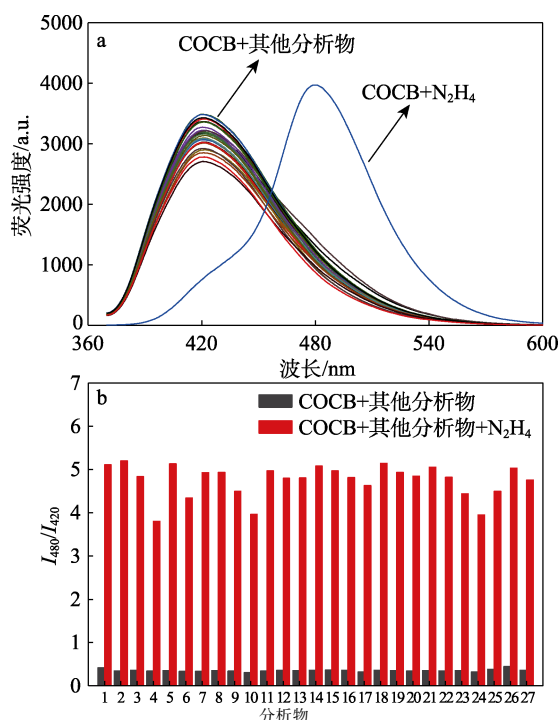
注: “—” 为未提供数据。

2.4 选择性和抗干扰性实验

为了考察探针 COCB 对胍的选择性, 在 PBS 溶

液/DMSO (体积比为 1 : 1) 体系中, 测试了 Al^{3+} 、 Ca^{2+} 、 Fe^{2+} 、 K^{+} 、 Fe^{3+} 、 Mg^{2+} 、 Na^{+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Br^{-} 、

Γ^- 、 HSO_3^- 、 CH_3COO^- 、 N_3^- 、 H_2PO_4^- 、 F^- 、 Cl^- 、 NO_3^- 、 SO_4^{2-} 、尿素、硫脲、氨水、Cys、Hcy、羟胺和苯胺分析物对探针的荧光响应,结果见图 4。



1—空白; 2— Al^{3+} ; 3— Ca^{2+} ; 4— Fe^{2+} ; 5— K^+ ; 6— Fe^{3+} ; 7— Mg^{2+} ; 8— Na^+ ; 9— Zn^{2+} ; 10— Cu^{2+} ; 11— Br^- ; 12— Γ^- ; 13— HSO_3^- ; 14— CH_3COO^- ; 15— N_3^- ; 16— H_2PO_4^- ; 17— F^- ; 18— Cl^- ; 19— NO_3^- ; 20— SO_4^{2-} ; 21—尿素; 22—硫脲; 23—氨水; 24—Cys; 25—Hcy; 26—羟胺; 27—苯胺

图 4 在其他分析物存在下,探针 COCB 与肼反应后体系的荧光光谱 (a); 探针 COCB 与其他分析物反应后再加入肼的 I_{480}/I_{420} (b)

Fig. 4 Fluorescence spectra of the systems after reaction of probe COCB with hydrazine in the presence of other analytes (a); I_{480}/I_{420} of the systems after reaction of probe COCB with other analytes and then addition of hydrazine (b)

由图 4a 可知,在 5 $\mu\text{mol/L}$ 的探针 COCB 溶液中分别加入肼 (500 $\mu\text{mol/L}$) 和其他各种分析物 (500 $\mu\text{mol/L}$) 后,只有加肼时会使探针的最大荧光发射峰从 420 nm 处红移至 480 nm 处,其他分析物并未引起探针 COCB 荧光光谱发生明显变化。由此可知,探针 COCB 对肼有很好的选择性,可以用于肼的识别与检测。

为进一步考察探针 COCB 在有其他干扰物存在时检测肼的能力,在 PBS 溶液/DMSO (体积比为 1:1) 体系中,对其进行了抗干扰性实验。在 5 $\mu\text{mol/L}$ 探针 COCB 溶液中,先分别加入其他分析物 (500 $\mu\text{mol/L}$),随后再加入肼 (500 $\mu\text{mol/L}$)。不同体系的 I_{480}/I_{420} 如图 4b 所示。由图 4b 可知,在肼和干扰物同时存在的条件下,探针 COCB 的 I_{480}/I_{420} 与仅存在肼时变化不大。以上结果表明,探针 COCB 具有较强的抗干扰能力,可用于复杂环境中肼的检测。

2.5 探针 COCB 对肼的识别机制

参考文献[32],推测探针 COCB 与肼反应的机制如图 5 所示。由于 4-溴丁酰基的吸电子作用,COCB 中 ICT 过程被抑制而使其自身呈现蓝色荧光;当加入肼后,肼中的一个 N 原子首先与 4-溴丁酰基中的溴发生亲核取代反应,随后另一个 N 原子进攻酯羰基发生环化-消除反应,释放出荧光母体 CHCO,使 ICT 过程恢复,发出强的青色荧光。此机制已得到 UV-Vis 吸收和荧光发射光谱结果(图 1)的初步证实。为进一步验证以上机制,对探针与肼反应后的溶液进行了 HPLC 和高分辨质谱分析,结果见图 6、7。由图 6 可知,探针 COCB 在保留时间为 4.17 min 时出现一个主峰。当探针 COCB (5 $\mu\text{mol/L}$) 与低浓度肼 (50 $\mu\text{mol/L}$) 反应后,在保留时间为 2.79 min 处出现一个新峰,与荧光母体 CHCO 对应。在 COCB (5 $\mu\text{mol/L}$) 与高浓度肼 (500 $\mu\text{mol/L}$) 反应后,得到与 CHCO 相同的谱图,表明此时 COCB 完全转化为 CHCO。在高分辨质谱图中,COCB 与足量肼反应后在 $m/z = 271.0167$ 出现一个分子离子峰(图 7),这与 CHCO 去质子化后 $[\text{C}_{15}\text{H}_9\text{O}_4-\text{H}]^-$ 的相对分子质量 271.0167 吻合。以上结果证明,探针 COCB 通过与肼反应转化为荧光母体 CHCO。

2.6 探针 COCB 在环境样品中的应用

首先,考察了探针 COCB 在实际水样中的应用。取自来水 (pH=7.8) 或湖水 (pH=8.1) 代替 PBS 溶液,并分别加入一定量的肼,配成 5、10 和 25 $\mu\text{mol/L}$ 溶液,用 5 $\mu\text{mol/L}$ 探针 COCB 检测肼的浓度,结果如表 2 所示。

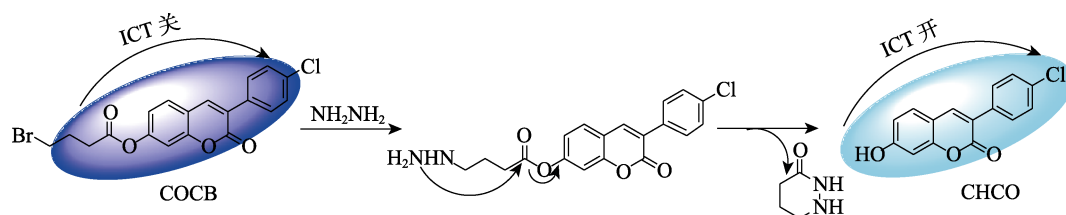


图 5 COCB 识别肼可能的机制

Fig. 5 Proposed sensing mechanism of probe COCB for hydrazine

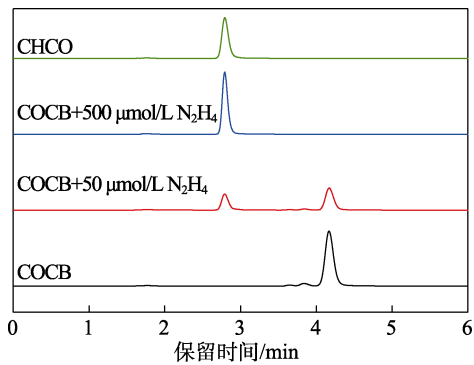


图 6 CHCO、探针 COCB 及探针 COCB 与不同浓度胂反应后溶液的 HPLC 谱图

Fig. 6 HPLC spectra of CHCO, probe COCB and solutions of probe COCB reacting with hydrazine of different concentrations

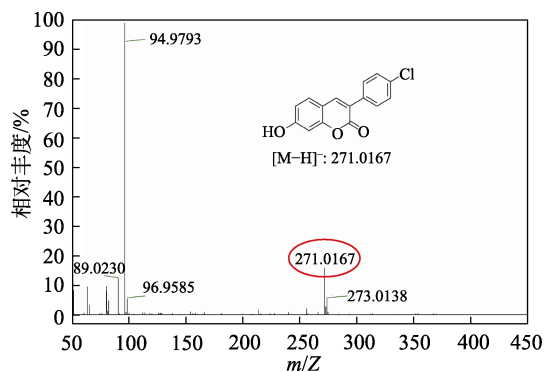


图 7 探针 COCB 与胂反应后溶液的高分辨质谱图

Fig. 7 High resolution mass spectrum of solution of probe COCB reacting with hydrazine

表 2 实际水样中胂含量的测定				
Table 2 Determination of hydrazine in actual water samples				
水样	加标值/ (μmol/L)	实测值/ (μmol/L)	回收率/%	RSD/% (n=3)
自来水	5.00	5.24	104.8	1.4
	10.00	10.70	107.0	1.1
	25.00	24.04	96.2	0.7
湖水	5.00	5.21	104.2	0.8
	10.00	10.17	101.7	1.6
	25.00	26.24	105.0	1.8

由表 2 可知,在两种实际水样中胂的回收率为 96.2%~107.0%,相对标准偏差 (RSD) <1.8%,表明探针 COCB 可用于实际水样中胂的检测,并具有较高的精密度和准确度。

从周边地区采集沙土和田土作为实验用样品,参考文献[35]的方法,考察了探针 COCB 在实际土壤样品中的应用,结果见图 8。首先,取 1 g 沙土或田土加入到 3 mL 探针 COCB 溶液 (5 μmol/L) 中,在 365 nm 紫外灯下观察其荧光情况,结果见图 8a。由图 8a 可见,样品呈强蓝色荧光,表明土壤中的物质对 COCB 的荧光性质不会造成影响。另取 1 g 田土或沙土,先用 2 mmol/L 胂溶液处理,然后将土壤

样品转移到 3 mL COCB (5 μmol/L) 溶液中,70 min 后在 365 nm 紫外灯照射下,溶液呈现较强的青色荧光。将溶液的上清液进行荧光光谱测定,结果见图 8b。由图 8b 可知,加胂处理后土壤溶液的 I_{480}/I_{420} 较未加胂时显著增大。以上结果说明,探针 COCB 可用于土壤中胂的检测。

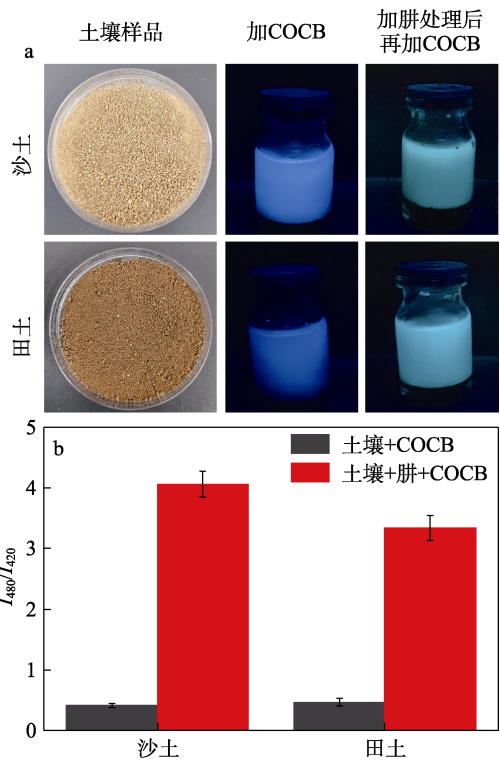


图 8 探针 COCB 与胂预处理和未预处理土壤溶液作用后样品在 365 nm 紫外灯下的照片 (a) 及其对应 I_{480}/I_{420} (b)

Fig. 8 Photographs of the samples under UV light at 365 nm after interaction of probe COCB with hydrazine pretreated and unpretreated soil solutions (a) and their corresponding I_{480}/I_{420} (b)

2.7 细胞毒性和细胞成像

在细胞成像之前,先用 MTT 法测试了不同浓度的探针 COCB 对 MC3T3-E1 细胞的细胞毒性,结果如图 9 所示。

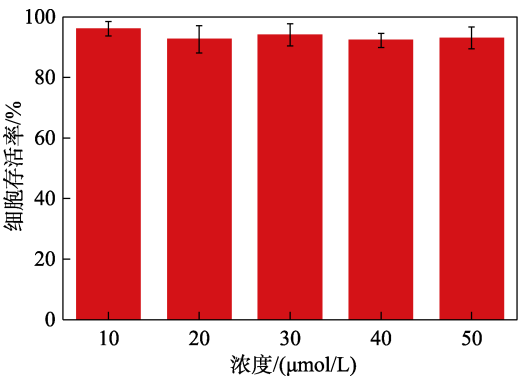


图 9 探针 COCB 的细胞存活率

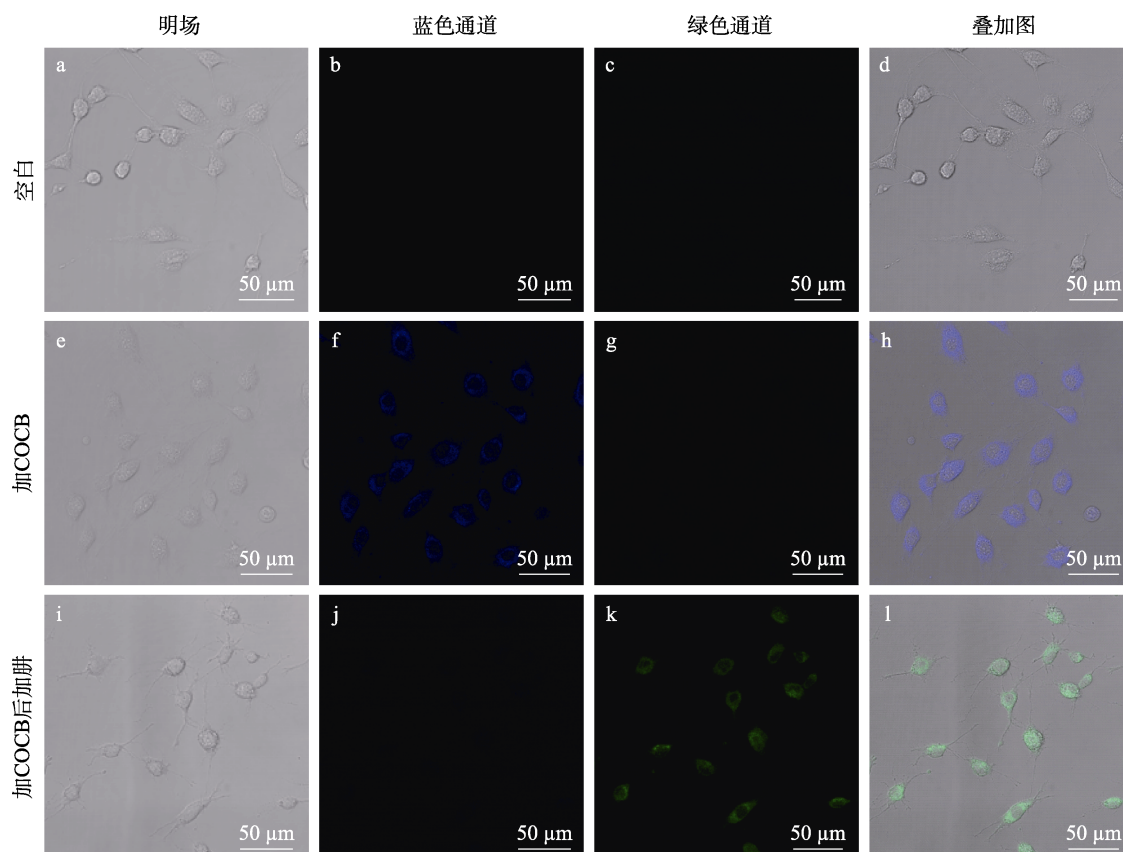
Fig. 9 Cell viability of probe COCB

由图 9 可知, 探针 COCB 浓度在 10~50 $\mu\text{mol/L}$ 范围内, MC3T3-E1 细胞的细胞存活率均>90%, 表明探针 COCB 具有很低的细胞毒性, 可用于细胞检测。

探针 COCB 在 MC3T3-E1 细胞中的成像结果如图 10 所示。

由图 10 可知, 在 405 nm 激发波长下, 细胞自身在蓝色通道和绿色通道均没有荧光(图 10b 和 c)。

当细胞中只加入 COCB 时, 蓝色通道出现较强的荧光, 而绿色通道基本观察不到荧光(图 10f 和 g)。而当先把细胞与 COCB 共培养 30 min, 再加胍继续培养 60 min 后, 蓝色通道中荧光消失, 在绿色通道中出现较强的荧光(图 10j 和 k)。以上结果表明, 探针 COCB 具有很好的细胞膜渗透性, 能用于活细胞中胍的比率荧光检测。



a~d 为空白 MC3T3-E1 细胞的图像; e~h 为 MC3T3-E1 细胞与 10 $\mu\text{mol/L}$ COCB 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 30 min 的图像; i~l 为先用 10 $\mu\text{mol/L}$ 探针 COCB 预处理细胞 30 min, 然后用 500 $\mu\text{mol/L}$ 胍在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 60 min 的图像

图 10 探针 COCB 在 MC3T3-E1 细胞中的共聚焦成像图

Fig. 10 Confocal fluorescence images of probe COCB in MC3T3-E1 cells

3 结论

通过 2 步反应设计合成了一种香豆素类比率型胍荧光探针 COCB。该探针对胍具有明显的荧光比率响应, 与胍反应后其溶液由蓝色荧光变为青色荧光。通过 HPLC 和高分辨质谱探讨了探针对胍的识别机制, 识别机制与胍对 4-溴丁酰基的选择性脱保护而引起探针中 ICT 效应的强弱变化有关。性能测试结果表明, COCB 对胍具有选择性好、抗干扰能力强、检出限低 (0.15 $\mu\text{mol/L}$)、检测范围宽 (0~250 $\mu\text{mol/L}$) 及 pH 适用范围宽 (6~11) 等优点。此外, 该探针不仅能用于实际水样、土壤环境样品中胍的检测, 还能用于活细胞中胍的成像, 具有较好的实际应用前景。

参考文献:

- [1] RAGNARSSON U. Synthetic methodology for alkyl substituted hydrazines[J]. Chemical Society Reviews, 2001, 30(4): 205-213.
- [2] KHALED K F. Experimental and theoretical study for corrosion inhibition of mild steel in hydrochloric acid solution by some new hydrazine carbodithioic acid derivatives[J]. Applied Surface Science, 2006, 252(12): 4120-4128.
- [3] ROSCA V, KOPER M T M. Electrocatalytic oxidation of hydrazine on platinum electrodes in alkaline solutions[J]. Electrochimica Acta, 2008, 53(16): 5199-5205.
- [4] LAN R, IRVINE J T S, TAO S W. Ammonia and related chemicals as potential indirect hydrogen storage materials[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2012, 37(2): 1482-1494.
- [5] SEROV A, KWAK C. Direct hydrazine fuel cells: A review[J]. Applied Catalysis B: Environmental, 2010, 98(1/2): 1-9.
- [6] NGUYEN H N, CHENOWETH J A, BEBARTA V S, *et al.* The toxicity, pathophysiology, and treatment of acute hydrazine propellant exposure: A systematic review[J]. Military Medicine, 2021, 186(3/4):

- 319-326.
- [7] GARROD S, BOLLARD M E, NICHOLLS A W, *et al.* Integrated metabonomic analysis of the multiorgan effects of hydrazine toxicity in the rat[J]. *Chemical Research in Toxicology*, 2005, 18(2): 115-122.
- [8] REILLY C A, AUST S D. Peroxidase substrates stimulate the oxidation of hydrazine to metabolites which cause single-strand breaks in DNA[J]. *Chemical Research in Toxicology*, 1997, 10(3): 328-334.
- [9] YI Q Y, HE J H, FU X X, *et al.* Carbazole-based chemosensor for highly sensitive and selective bioimaging identification of hydrazine in multiple model systems *via* ratiometric and colorimetric[J]. *Dyes and Pigments*, 2021, 196: 109816.
- [10] OH J A, SHIN H S. Simple and sensitive determination of hydrazine in drinking water by ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry after derivatization with naphthalene-2,3-dialdehyde[J]. *Journal of Chromatography A*, 2015, 1395: 73-78.
- [11] SAHOO P, MALATHI N, ANANTHANARAYANAN R, *et al.* A novel approach for high precision rapid potentiometric titrations: Application to hydrazine assay[J]. *Review of Scientific Instruments*, 2011, 82(11): 114102.
- [12] SHARMA S, GANESHAN S K, PATTNAIK P K, *et al.* Laser induced flexible graphene electrodes for electrochemical sensing of hydrazine[J]. *Materials Letters*, 2020, 262: 127150.
- [13] GU X, CAMDEN J P. Surface-enhanced Raman spectroscopy-based approach for ultrasensitive and selective detection of hydrazine[J]. *Analytical Chemistry*, 2015, 87(13): 6460-6464.
- [14] LIU X Y, YU B, SHEN Y Q, *et al.* Design of NIR- II high performance organic small molecule fluorescent probes and summary of their biomedical applications[J]. *Coordination Chemistry Reviews*, 2022, 468: 214609.
- [15] ABHIJNAKRISHNA R, VELMATHI S. A review on fluorimetric and colorimetric detection of metal ions by chemodosimetric approach 2013-2021[J]. *Coordination Chemistry Reviews*, 2022, 459: 214401.
- [16] DOU W T, HAN H H, SEDGWICK A C, *et al.* Fluorescent probes for the detection of disease-associated biomarkers[J]. *Science Bulletin*, 2022, 67(8): 853-878.
- [17] YAN L Q, ZHANG S Q, XIE Y, *et al.* Recent progress in the development of fluorescent probes for the detection of hydrazine (N₂H₄)[J]. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 2022, 52(1): 210-229.
- [18] ZHANG X Y, YANG Y S, WANG W, *et al.* Fluorescent sensors for the detection of hydrazine in environmental and biological systems: Recent advances and future prospects[J]. *Coordination Chemistry Reviews*, 2020, 417: 213367.
- [19] JIANG J H, ZHANG Z H, QU J B, *et al.* A lysosomal targeted fluorescent probe based on coumarin for monitoring hydrazine in living cells with high performance[J]. *Analytical Methods*, 2022, 14(1): 17-21.
- [20] WANG K, YE Y X, JIANG C Y, *et al.* Design and synthesis of a novel “turn-on” fluorescent probe based on benzofuran-3(2H)-one for detection of hydrazine in water samples and biological systems [J]. *Dyes and Pigments*, 2021, 194: 109587.
- [21] ZHANG F, LI D, LIANG X Z, *et al.* Forming luminescent oligomer nanoparticles *via* condensation polymerization: A strategy for real-time visualized detection of hydrazine in solution and gas phase[J]. *Dyes and Pigments*, 2021, 185: 108931.
- [22] HUANG X Z, ZHOU Z Q, XIAO X H, *et al.* Aldehyde spiropyran fluorescent probe for rapid determination of hydrazine in environmental water[J]. *Luminescence*, 2022, 37(11): 1891-1898.
- [23] LIU Z D, YANG Z H, CHEN S Z, *et al.* A smart reaction-based fluorescence probe for ratio detection of hydrazine and its application in living cells[J]. *Microchemical Journal*, 2020, 156: 104809.
- [24] SONG J (宋健), YANG X Q (杨晓琴), ZHANG Y J (张颖君), *et al.* Synthesis and application of caffeic acid based fluorescent probe for detection of hydrazine hydrate[J]. *Fine Chemicals (精细化工)*, 2023, 40(1): 50-55, 62.
- [25] ZHANG W J, HUO F J, LIU T, *et al.* Ratiometric fluorescence probe for hydrazine vapor detection and biological imaging[J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2018, 6(48): 8085-8089.
- [26] SHI X R, YIN C X, ZHANG Y B, *et al.* A novel ratiometric and colorimetric fluorescent probe for hydrazine based on ring-opening reaction and its applications[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2019, 285: 368-374.
- [27] HOU J T, WANG B Y, WANG S, *et al.* Detection of hydrazine *via* a highly selective fluorescent probe: A case study on the reactivity of cyano-substituted C=C bond[J]. *Dyes and Pigments*, 2020, 178: 108366.
- [28] ZHENG X X, WANG S Q, WANG H Y, *et al.* Novel pyrazoline-based selective fluorescent probe for the detection of hydrazine[J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2015, 138: 247-251.
- [29] PARK S H, KWON N, LEE J H, *et al.* Synthetic ratiometric fluorescent probes for detection of ions[J]. *Chemical Society Reviews*, 2020, 49(1): 143-179.
- [30] TIAN G, ZHANG Z X, LI H D, *et al.* Design, synthesis and application in analytical chemistry of photo-sensitive probes based on coumarin[J]. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 2021, 51(6): 565-581.
- [31] SIGNORE G, NIFOSÌ R, ALBERTAZZI L, *et al.* Polarity-sensitive coumarins tailored to live cell imaging[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2010, 132(4): 1276-1288.
- [32] GOSWAMI S, DAS S, AICH K, *et al.* A chemodosimeter for the ratiometric detection of hydrazine based on return of ESIPT and its application in live-cell imaging[J]. *Organic Letters*, 2013, 15(21): 5412-5415.
- [33] ZHU J H, ZHANG H, LIAO Y, *et al.* A multifunctional fluorescent probe for highly selective detection of hydrazine and discovering the interplay between AIE and ICT[J]. *Dyes and Pigments*, 2020, 175, 108111.
- [34] WU C Y, XIE R H, PANG X, *et al.* A colorimetric and near-infrared ratiometric fluorescent probe for hydrazine detection and bioimaging[J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2020, 243: 118764.
- [35] JUNG Y, JU I G, CHOE Y H, *et al.* Hydrazine exposé: The next-generation fluorescent probe[J]. *ACS Sensors*, 2019, 4(2) 441-449.