DOI:10.16016/j.2097-0927.202307019

高分辨比色探针快速可视化检测水溶液中铜离子

唐 红[1],陈 默[1],韩松伶[1,2] 400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学):军事预防医学系复合伤研究所[1],创伤与化学中毒全国重点实验室[2]

[摘要] **目的** 构建特异性识别水中铜离子(Cu^{2+})并快速显色的化学比色探针。**方法** 基于BODIPY荧光染料设计合成Cu^{2+}比色探针BBSCP,紫外-可见光分光光度法评价探针对水中Cu^{2+}的显色能力,加入常见金属离子后评价比色探针的抗干扰能力。**结果** BBSCP在485~670 nm波长范围内表现出较宽的吸收带,加入Cu^{2+}后,在465~600 nm区间出现蓝移,波段变尖,而其他金属离子没有引起变化;同时在Cu^{2+}溶液中加入等当量的其他常见金属离子后仍然保持Cu^{2+}显色能力。**结论** 构建的比色探针BBSCP对水溶液中Cu^{2+}具有高度敏感性和选择稳定性,能作为快速检测水中Cu^{2+}的可视化探针广泛应用于生物诊断、食品等多个领域。

[关键词] 比色探针;铜离子;可视化检测

[中图法分类号] O614.121;R123.1;R446 [文献标志码] A

Rapid visualization and detection of Cu^{2+} in aqueous solution using high-resolution colorimetric probe

TANG Hong[1], CHEN Mo[1], HAN Songling[1,2] [1]Institute of Combined Injury, Faculty of Military Preventive Medicine; [2]State Key Laboratory of Trauma and Chemical Poisoning, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] **Objective** To develop a chemical colorimetric probe that specifically recognizes Cu^{2+} in water and then generates color rapidly. **Methods** Cu^{2+} colorimetric probe BBSCP was designed and synthesized based on BODIPY fluorescence dye, then its color rendering ability to Cu^{2+} in water was evaluated with UV visible spectrophotometry. After common metal ions were added into the Cu^{2+} solution, the anti-interference ability of the colorimetric probe were tested. **Results** Our developed BBSCP exhibits a wide absorption band in a range of 485 to 670 nm. After the addition of Cu^{2+}, a blue shift was observed in the range of 465~600 nm, with sharper band, but no changes were found after other metal ions were added. At the same time, the color rendering ability of Cu^{2+} was maintained even after the addition of equivalent amounts of other common metal ions. **Conclusion** Our developed colorimetric probe BBSCP has high sensitivity and selective stability to Cu^{2+} in aqueous solution, and can be widely used as a visual probe for rapid detection of Cu^{2+} in water in various fields such as biological diagnosis and food.

[**Key words**] colorimetric probe; copper ion; visualization and detection

Supported by the National Natural Science Foundation for Young Scholars of China (82003395). Corresponding author: HAN Songling, E-mail: hansonglingsc@126.com

[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金(82003395)

[通信作者] 韩松伶,E-mail: hansonglingsc@126.com

2097-0927/Copyright © 2023, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

铜是人体必需微量金属元素之一,是各种伴侣蛋白和酶的重要辅助因子,广泛存在于各组织和器官中,参与酶促反应、伤口愈合和血管生成等各种基本生理过程,对维持人体(如骨骼系统、脑神经系统)的完整性和稳态至关重要[1]。大量研究表明,铜离子(Cu^{2+})在阿尔茨海默病、帕金森病、普粒子疾病等脑部疾病进程中也发挥着重要作用[2]。近年来由于其在临床医学和环境化学中的潜在应用,用于检测 Cu^{2+} 的敏感性比色/荧光化学探针的开发受到了广泛的关注[3-7]。它们主要通过以下三种识别机制工作,包括电子转移、质子转移和能量转移,通常分别称为光诱导电子转移、激发态分子内质子转移和 Förster 共振能量转移。然而目前的探针检测大部分都要借助仪器且存在相关金属离子低灵敏度和高阶干扰等缺点[8-9]。因此,本研究基于氟硼二吡咯化合物(4,4-difluoro-boradiazaindacene,BODIPY)荧光染料构建制备了一种可用于肉眼检测水溶液中 Cu^{2+} 的高选择性、高灵敏度的比色探针 BBSCP(BODIPY based specific copper probe),在可见光区消光系数大,光稳定性好,具有较长的吸收和荧光光谱波长,为肉眼确定水溶液中 Cu^{2+} 含量提供更加简便高效的检测技术。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

对二甲氨基苯甲醛、2,4-二甲基吡咯、CH_2Cl_2、CF_3COOH、甲苯、2,3-二氯-5,6-二氰基苯醌、三乙胺、三氟化硼乙醚,以上试剂均为分析纯,购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司。$AgNO_3$、$CuCl_2$、$HgCl_2$、$Cd(NO_3)_2$、$NiCl_2\cdot 6H_2O$、$Pb(OAc)_2\cdot 3H_2O$、$Fe(NO_3)_3$、$ZnCl_2$,以上试剂均为化学纯,购于西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司。HEPES 缓冲液(1 mol/L,Free Acid,无菌)购于上海源叶生物有限公司。

1.2 中间产物 BMA 的合成

参照 LI 等[10]的方法,对二甲氨基苯甲醛 755.6 mg(5 mmol)和 2,4-二甲基吡咯 475.7 mg(5 mmol)溶解于干燥的 CH_2Cl_2(50 mL)中,室温。用 N_2 清洗溶液 30 min。加入几滴 CF_3COOH 以启动冷凝。2 h 后,TLC(二氧化硅,CH_2Cl_2)显示醛已被全部消耗。反应混合物用饱和 $NaHCO_3$ 水溶液和水洗涤,用 Na_2SO_4 干燥、过滤,旋转蒸发仪旋转蒸发。产品溶于干燥的甲苯(50 mL)中,加入 2,3-二氯-5,6-二氰基苯醌(DDQ,1.0 g)。20 min 后,加入三乙胺(6 mL),随后立即加入三氟化硼乙醚(BFE,6 mL)。室温搅拌 3 h 后,用水冲洗,Na_2SO_4 烘干,过滤后旋转蒸发。粗产物经硅胶柱层析纯化,得到中间产物 BMA。

1.3 比色探针 BBSCP 的合成

93 mg BMA 和 115 mg N,N-二甲基吡啶苯甲醛(DMPB)被溶解在 10 mL 干燥的甲苯中。然后在混合物中加入干燥的哌啶(0.1 mL)。反应混合物用适量分子筛加热回流 36 h。溶剂蒸发后,以丙酮/二氯甲烷(5∶1体积分数)为洗脱液,硅胶柱层析纯化混合物,得到 10 mg(收率 6%)的深紫色粉末即为化合物 BBSCP。

1.4 材料表征鉴定

中间产物以及最终比色探针材料的相关表征采用核磁与质谱联合鉴定,使用核磁共振光谱仪(600 MHz,DD2,Agilent)获得 ^{1}H NMR 与 ^{13}C NMR 光谱,利用高分辨质谱仪(LTQ Orbitrap Velos Pro,Thermo Scientific)得到材料质谱图谱。

中间产物 BMA:^{1}H NMR($CDCl_3$, 300 MHz) 1.49 (s, 6H), 2.55(s, 6H), 3.02(s, 6H) 5.97(s, 2H), 6.78(d, 2H, J = 9 Hz), 7.06(d, 2H, J = 9 Hz); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) 14.5, 14.7, 40.3, 112.2, 120.7, 121.9, 128.6, 143.2, 150.5, 154.6。

1.5 BBSCP 的化学比色效率检测

将 8 种待测金属离子[$AgNO_3$、$CuCl_2$、$HgCl_2$、$Cd(NO_3)_2$、$NiCl_2\cdot 6H_2O$、$Fe(NO_3)_3$、$Pb(OAc)_2\cdot 3H_2O$、$ZnCl_2$]分别溶解于 2 mL 混合溶剂中(乙醇∶水 = 1∶6,利用 HEPES 和 NaOH 调节其 pH 值为 7.0),终浓度均为 10 μmol/L。向以上各溶剂中加入 1 mL BBSCP 溶液(5 μmol/L)后通过紫外-可见分光光度计(TU-1901,北京普析)测定紫外吸收扫描光谱,扫描波长范围 450~750 nm。

探针 BBSCP 的检测限(limits of detection, LOD)采用滴定法进行计算。测量探针 BBSCP(5 μmol/L)的紫外吸收光谱强度 20 次,得到空白测量的标准偏差,而后通过以下方程计算得到 LOD。

$$LOD = 3\sigma/k$$

其中,σ 是空白测量的标准偏差,k 是 Cu^{2+} 探针滴定时吸光度 A_{560}/A_{612} 比率和浓度之间的线性斜率[11]。

1.6 Cu^{2+} 浓度对 BBSCP 的化学比色效率的影响

配制 5 μmol/L BBSCP 溶液(溶剂为乙醇∶水 = 1∶6 的混合溶剂,pH 值调节至 7.0),分别滴加不同浓度的 Cu^{2+},终浓度分别为 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 μmol/L,利用紫外-可见分光光度计测定其在 450~750 nm 波长范围内的吸收光谱。

1.7 常见金属离子对探针 BBSCP 检测的干扰

配制 5 μmol/L BBSCP 溶液(溶剂为乙醇∶水 = 1∶6

的混合溶剂,pH 值调节至 7.0),加入 10 μmol/L Cu^{2+} 后测定其在 450~750 nm 波长范围内的吸收光谱,而后再分别加入不同的金属离子[$AgNO_3$、$CuCl_2$、$HgCl_2$、$Cd(NO_3)_2$、$NiCl_2\cdot 6H_2O$、$Fe(NO_3)_3$、$Pb(OAc)_2\cdot 3H_2O$、$ZnCl_2$],终浓度均为 10 μmol/L,再次扫描检测吸收光谱。

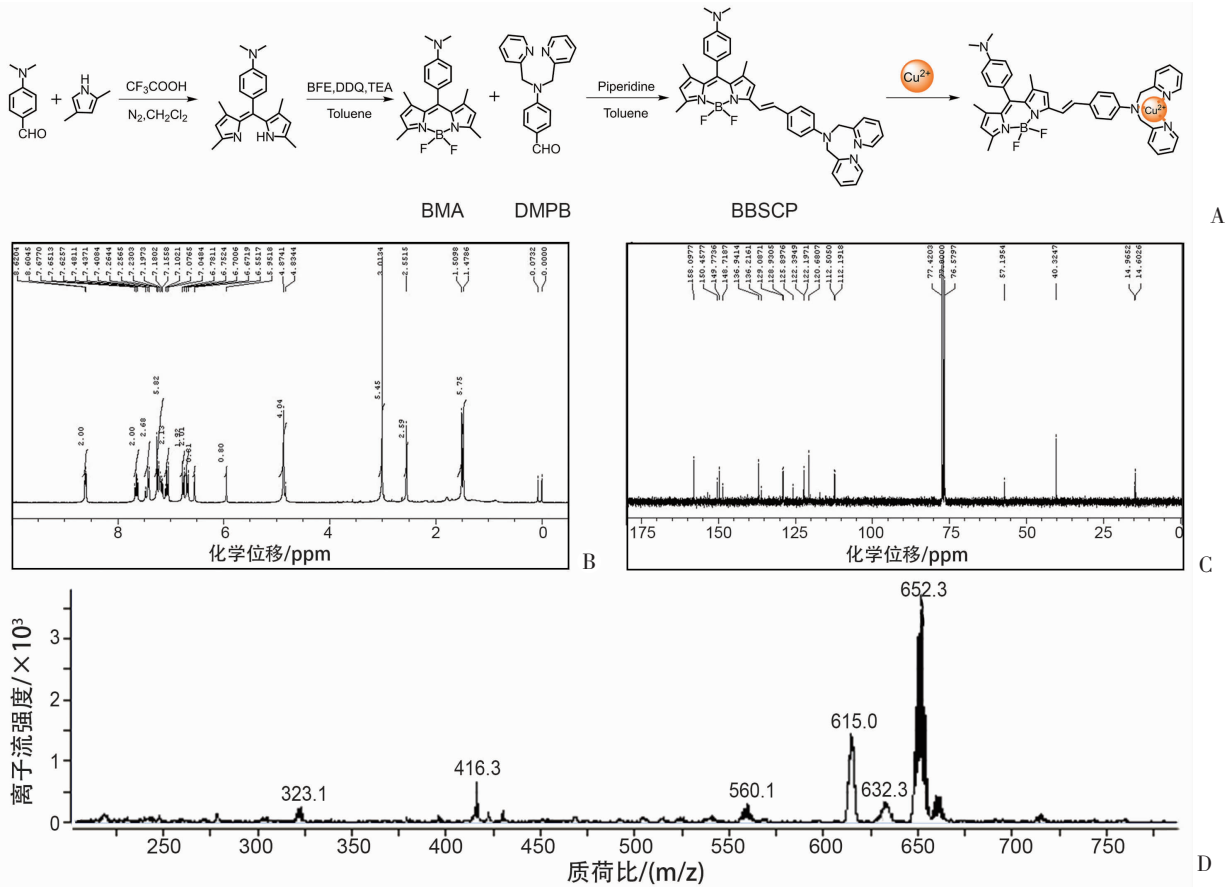
2 结果

2.1 特异性 Cu^{2+} 探针 BBSCP 的结构表征

根据合成路线(图 1A)成功合成了铜离子响应比色探针 BBSCP,并采用 ^{1}H NMR、^{13}C NMR 和 HRMS 对该探针的化学结构进行了确证,结果见图 1B~D。具体数据如下:^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) 1.48 (s, 3H), 1.50 (s, 3H), 2.55 (s, 3H), 3.01 (s, 6H) 4.87 (s, 4H) 5.95 (s, 1H), 6.55 (s, 1H), 6.68 (d, 2H, J=9 Hz), 6.76 (d, 2H, J=9 Hz), 7.05 (d, 2H, J=9 Hz), 7.15-7.25 (m, 5H), 7.42 (d, 3H, J=9 Hz), 7.65 (t, 2H, J=6 Hz), 8.61 (d, 2H, J=6 Hz); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) 14.6, 15.0, 40.3, 57.1, 112.2, 112.5, 120.7, 122.2, 122.4, 125.9, 128.9, 129.1, 136.9, 148.7, 149.8, 150.5, 158.1。高分辨质谱数据计算值为 $C_{40}H_{39}BF_2N_6$: 652.329 7 (m^+), 测试值为 652.330 4(正离子模式)。以上核磁氢谱、碳谱数据以及高分辨质谱数据均确证了该探针的化学结构。

2.2 探针 BBSCP 对 Cu^{2+} 的选择特异性

使用 HEPES 和 NaOH 调节水溶液的 pH 值为 7.0,用紫外-可见光谱法检测 BBSCP 在 EtOH:H_2O=1:6 (2 mL) 中的阳离子结合性能。如图 2 所示,BBSCP 在 485~670 nm 范围内表现出较宽的吸收带。加入 Cu^{2+} 后,在 465~600 nm 区间出现蓝移,波段变尖。而其他金属离子没有引起变化。在微摩尔水平 Cu^{2+} 的存在下,5 μmol/L 的溶液可以显示明显的紫色,而常见的其他重金属离子几乎没有干扰(图 3)。这些结果表明,BBSCP 可以作为中性缓冲水溶液中 Cu^{2+} 的“裸眼”特异性显色探针。



A:比色探针的合成及 Cu^{2+} 检测;B:比色探针的 ^{1}H NMR 表征;C:比色探针的 ^{13}C NMR 表征;D:比色探针的 HRMS 表征

图 1 比色探针 BBSCP 的合成及表征

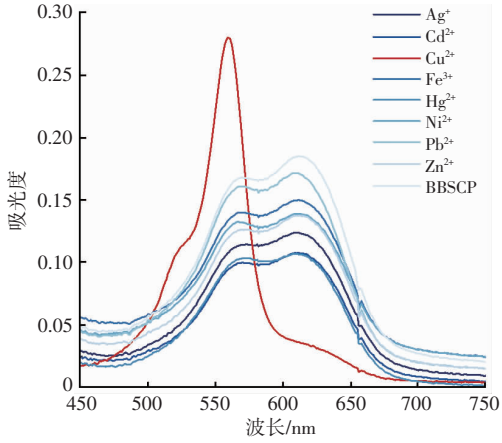


图 2 比色探针 BBSCP 在乙醇∶水=1∶6(2 mL),pH=7.0(HEPES)溶液中不同金属离子存在下的紫外光谱图

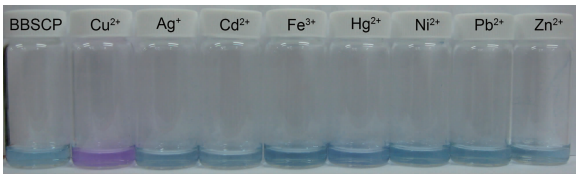
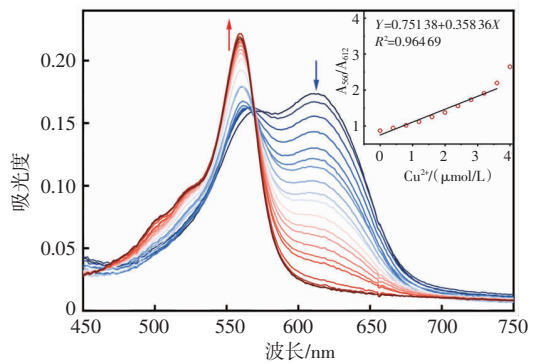


图 3 BBSCP 溶液(5 μmol/L)与不同金属离子的颜色变化

2.3 Cu^{2+}比色探针的浓度线性关系

此外,通过紫外-可见滴定法研究了 BBSCP 对 Cu^{2+}的结合能力。在 BBSCP 溶液中加入越来越多的 Cu^{2+}(0~10 μmol/L),在 612 nm 处的吸收峰减少,而在 560 nm 处出现蓝移峰(图 4)。在 BBSCP 溶液中加入 Cu^{2+}后,在 560 nm 处形成新的吸收带。这是由于加入 Cu^{2+}后,二吡啶胺上的电子密度发生了变化。因此,与 Cu^{2+}配位后,BBSCP 的紫外-可见光谱表现出比值行为,使用计算公式 3σ/K(图 4 内嵌图)得到 Cu^{2+}比色探针的 LOD 为 0.19 μmol/L。



蓝色到红色表示溶液中 Cu^{2+}浓度从 0 逐渐增加至 10 μmol/L

图 4 BBSCP(5 μmol/L)溶液加入不同浓度 Cu^{2+}的紫外光谱图

2.4 Cu^{2+}比色探针的抗干扰能力评价

为了评价 BBSCP 对铜离子的选择性,进行了竞争性实验。图 5 显示 5 μmol/L 的 BBSCP 溶液对各种重金属离子存在下吸收光谱行为的变化。结果表明混合金属离子存在时,吸光度差异不大。说明 BBSCP 在其他重金属离子存在的情况下对 Cu^{2+}仍然具有良好的选择性。

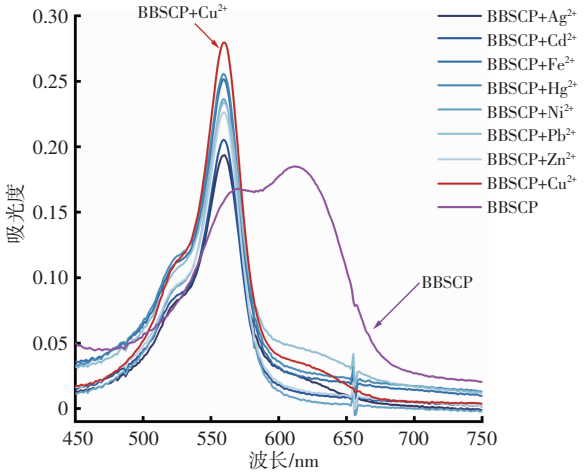


图 5 常见金属离子对 BBSCP(5 μmol/L)的 Cu^{2+}探测效率的影响

3 讨论

铜是生物系统中必需的微量元素,广泛分布于生物组织中,在肝脏中浓度最高。大多存在于有机化合物中,其中很多是金属蛋白。在氧化还原化学中起催化辅助因子的作用,参与调节各种酶的活性,例如细胞色素 C 氧化酶、抗氧化剂 SOD 等。因此,铜缺乏可导致生物系统功能障碍,导致人类疾病,如心血管疾病、贫血、骨质疏松症等。然而,铜离子浓度过高时同样能造成铜稳态紊乱,过载的铜离子通过诱导调节性细胞死亡(如凋亡、类凋亡、焦亡、铁死亡和铜死亡)表现出更高的毒性。自由铜离子参与 Fenton 反应,产生有害的自由基,如活性氧(reactive oxygen species,ROS),其确切性质仍在研究中。这些自由基的产生与许多疾病有关,被认为是铜超载疾病细胞损伤的主要来源[12]。

由于工业技术的发展,日益严重的铜污染给水生生物、土壤、农作物乃至人体带来了极大的危害[13]。因此,建立和发展环境样品和人体中 Cu^{2+}的定性定量检测新方法具有重要意义。

目前,利用有机比色/荧光化学探针进行新型检测技术的研究已成为热点。与新兴纳米材料相比,有机探针具有生物相容性好、结构可改性强、毒性相对较低等优点。与传统的高效液相色谱法、表面等离子体共振、电感耦合等离子体质谱法、气相色谱法和原子吸收光谱法相比,该探针具有制备简单、灵敏度高、成本低等优点[14-16]。虽然上述传统方法在有效性和精密度方面各有优势,但需要复杂的样品预处理以及昂贵的设备和训练有素的操作人员。

总之,本文设计并合成了一种基于分子内电荷转

移(intramolecular charge transfer, ICT)的新型铜离子探针 BBSCP,以荧光染料 BODIPY 为主体结构,具有较大的斯托克斯位移、较高的光稳定性和对 Cu^{2+} 良好的可逆传感能力。BODIPY 连接的配体中的氮与 Cu^{2+} 具有很强的亲和力,铜离子与配体络合后将电荷转移到另一端的吸电子基团,导致其吸收光谱发生蓝移(图 1A)。通过在其 α-位上修饰了 4-氨基苯乙烯基,促进了 ICT 效应。在许多过渡金属离子中,只有 Cu^{2+} 引起了从 612 nm 到 560 nm 的吸收光谱蓝移,颜色由蓝色变为紫色。在 EtOH /H_2O(1∶6体积分数,pH = 7.0)中随着加入 Cu^{2+} 的浓度不断增加至 2 倍当量,612 nm 波长处的吸光度从 0.174 不断降至 0.015。通过计算,本研究制备的 Cu^{2+} 比色探针的检测限为 0.19 μmol/L,这大约是世界卫生组织饮用水中指南(31.5 μmol/L)的 160 倍[17]。此外,考察了其他常见金属离子对 BBSCP 比色探针的干扰效应,证实了探针对 Cu^{2+} 的高度敏感性和选择稳定性,显示了其在生物诊断、食品、环境等多领域的应用前景。

参考文献:

[1] LIU Y M, ZHU J L, XU L L, *et al*. Copper regulation of immune response and potential implications for treating orthopedic disorders[J]. Front Mol Biosci, 2022, 9: 1065265. DOI: 10.3389/fmolb.2022.1065265.

[2] VERWILST P, SUNWOO K, KIM J S. The role of copper ions in pathophysiology and fluorescent sensors for the detection thereof[J]. Chem Commun, 2015, 51(26): 5556-5571. DOI: 10.1039/C4CC10366A.

[3] ALI M, MEMON N, MALLAH M A, *et al*. Recent development in fluorescent probes for copper ion detection[J]. Curr Top Med Chem, 2022, 22(10): 835-854. DOI: 10.2174/1568026622666220225153703.

[4] SHARMA S, GHOSH K S. Recent advances (2017-20) in the detection of copper ion by using fluorescence sensors working through transfer of photo-induced electron (PET), excited-state intramolecular proton (ESIPT) and Förster resonance energy (FRET)[J]. Spectrochimica Acta A Mol Biomol Spectrosc, 2021, 254: 119610. DOI: 10.1016/j.saa.2021.119610.

[5] TANG Y, LI Y Y, HAN J, *et al*. A coumarin based fluorescent probe for rapidly distinguishing of hypochlorite and copper (Ⅱ) ion in organisms[J]. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 2019, 208: 299-308. DOI: 10.1016/j.saa.2018.10.019.

[6] YIN J, WANG Z L, ZHAO F, *et al*. A novel dual functional pyrene-based turn-on fluorescent probe for hypochlorite and copper (Ⅱ) ion detection and bioimaging applications[J]. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 2020, 239: 118470. DOI: 10.1016/j.saa.2020.118470.

[7] MENG Z Y, ZHAO F, WANG Z L, *et al*. An efficient tetrahydroquinazolin-2-amine derivative-grafted cellulose fluorescent probe for detection of Cu^{2+} and Zn^{2}[J]. Carbohydr Polym, 2023, 303: 120445. DOI: 10.1016/j.carbpol.2022.120445.

[8] SUN H, XU Q Y, XU C, *et al*. Construction of a water-soluble fluorescent probe for copper (Ⅱ) ion detection in live cells and food products[J]. Food Chem, 2023, 418: 135994. DOI: 10.1016/j.foodchem.2023.135994.

[9] KIRAN S, KHATIK R, SCHIRHAGL R. Smart probe for simultaneous detection of copper ion, pyrophosphate, and alkaline phosphatase *in vitro* and in clinical samples[J]. Anal Bioanal Chem, 2019, 411(24): 6475-6485. DOI: 10.1007/s00216-019-02027-2.

[10] LI M L, WANG H, ZHANG X, *et al*. Development of a new fluorescent probe: 1, 3, 5, 7-tetramethyl-8-(4'-aminophenyl)-4, 4-difluoro-4-bora-3a, 4a-diaza-s-indacence for the determination of trace nitrite[J]. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 2004, 60(4): 987-993. DOI: 10.1016/S1386-1425(03)00329-9.

[11] LONG G L, WINEFORDNER J D. Limit of detection. A closer look at the IUPAC definition[J]. Anal Chem, 1983, 55(7): 712A-724A. DOI: 10.1021/ac00258a001.

[12] XUE Q, KANG R, KLIONSKY D J, *et al*. Copper metabolism in cell death and autophagy[J]. Autophagy, 2023, 19(8): 2175-2195. DOI: 10.1080/15548627.2023.2200554.

[13] AHMED N, ZAREEN W, YANG X P, *et al*. Development in fluorescent OFF-ON probes based on Cu^{2+} promoted hydrolysis reaction of the picolinate moiety[J]. J Fluoresc, 2023, 33(2): 401-411. DOI: 10.1007/s10895-022-03078-y.

[14] DUAN N, YANG S X, TIAN H Y, *et al*. The recent advance of organic fluorescent probe rapid detection for common substances in beverages[J]. Food Chem, 2021, 358: 129839. DOI: 10.1016/j.foodchem.2021.129839.

[15] PELIN J N B D, EDWARDS-GAYLE C J C, MARTINHO H, *et al*. Self-assembled gold nanoparticles and amphiphile peptides: a colorimetric probe for copper(Ⅱ) ion detection[J]. Dalton Trans, 2020, 49(45): 16226-16237. DOI: 10.1039/d0dt00844c.

[16] YIN C X, LI J W, HUO F J. Cu^{2+} biological imaging probes based on different sensing mechanisms[J]. Curr Med Chem, 2019, 26(21): 3958-4002. DOI: 10.2174/0929867324666170428110724.

[17] TONG S M, YANG L S, GONG H Q, *et al*. Association of selenium, arsenic, and other trace elements in drinking water and urine in residents of the plateau region in China[J]. Environ Sci Pollut Res Int, 2022, 29(18): 26498-26512. DOI: 10.1007/s11356-021-17418-1.

(收稿:2023-07-04;修回:2023-07-20)

(编辑 邓强庭)