

一种连续识别 Cu^{2+} 和草甘膦荧光探针的合成及应用研究吴绵园^{a,b} 喻艳超^{*,a} 刘洋^a 由君^{*,a} 武文菊^a 刘波^a^(a) 哈尔滨理工大学材料科学与化学工程学院 绿色化工技术黑龙江省高校重点实验室 哈尔滨 150080^(b) 黑龙江省科学院石油化学研究院 哈尔滨 150040

摘要 以 7-(4-甲氧基苯基)乙炔基香豆素为荧光基团, 设计并合成了一种香豆素酰肼类荧光探针 **L**。在探针 **L** 的二甲基亚砜(DMSO)/H₂O [$V:V=7:3$, 4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES) 10 mmol/L, pH=7.4]溶液中加入 Cu^{2+} , 可以通过肉眼观察到颜色由黄色变为浅棕色和明显的荧光猝灭效应。该探针不受其他金属离子和阴离子的干扰, 检测限为 5.6×10^{-8} mol/L。同时, **L**- Cu^{2+} 体系通过配体置换的方式实现了对草甘膦的特异性检测, 具有良好的选择性和抗干扰性、较高的灵敏度、较宽的 pH 适用范围(5~9)和较低检测限(11.3 ng/mL)。此外, **L**- Cu^{2+} 体系可应用于实际水样中草甘膦的检测, 在环境监测等领域具有良好的应用前景。

关键词 香豆素酰肼; 荧光探针; 连续识别; 草甘膦

Synthesis and Application of a Novel Fluorescent Probe for Sequential Recognition Cu^{2+} and GlyphosateWu, Mianyuan^{a,b} Yu, Yanchao^{*,a} Liu, Yang^a You, Jun^{*,a} Wu, Wenju^a Liu, Bo^a^(a) Key Laboratory of Green Chemical Engineering and Technology of College of Heilongjiang Province, College of Materials Science and Chemical Engineering, Harbin University of Science and Technology, Harbin 150080^(b) Institute of Petrochemistry, Heilongjiang Academy of Sciences, Harbin 150040

Abstract A novel fluorescent probe **L** based on coumarin-derived acylhydrazone was designed and synthesized by using 7-(4-methoxyphenyl)ethynyl coumarin as report group. The probe **L** showed high selectivity and good anti-interference ability towards Cu^{2+} ion through the color of solution changed from light brown to yellow for naked-eye detection and significant fluorescence intensity quenched in the dimethyl sulfoxide (DMSO)/H₂O [$V:V=7:3$, 2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid (HEPES) 10 mmol/L, pH=7.4] solution, and the detection limit of probe **L** to Cu^{2+} could reach 5.6×10^{-8} mol/L. Meanwhile, the **L**- Cu^{2+} system has high selectivity, good sensitivity, wide pH range (5~9) and low detection limit (11.3 ng/mL) for the detection of glyphosate by ligand replacement method. In addition, glyphosate detection was assessed within the actual water samples for testing the **L**- Cu^{2+} actual application and the method was expected to the detection in environmental samples.

Keywords coumarin-derived acylhydrazone; fluorescent probe; sequential recognition; glyphosate

随着现代工业的快速发展, 铜被广泛应用于冶金、电子、电镀、印刷及生物医药等领域。铜金属及其盐的大量使用, 导致过量的铜排放, 对环境造成严重污染。虽然, 铜是生物体所必需的微量元素之一, 在细胞呼吸、生物合成、生物体代谢等生理过程中具有重要的调节作用^[1-3]; 但是, 过量的铜不仅会对植物造成损伤, 导致植物生长迟缓甚至死亡, 而且会引起人体中铜的代谢

平衡紊乱, 导致帕金森病、阿尔茨海默病和威尔逊氏病等多种与神经相关的氧化应激和障碍退行性疾病^[4-9]。因此, 对环境中铜离子的测定具有重要意义。

N-磷酸甲基甘氨酸(草甘膦, Glyphosate)是一种内吸传导型有机磷除草剂, 由于其具有除草活性高、非选择性及成本低的优点, 被广泛应用于农业和林业等领域。特别自 1996 年抗草甘膦转基因作物(大豆)获准商业化

* Corresponding authors. E-mail: yychao136@163.com; youjunjun@126.com

Received September 29, 2021; revised October 28, 2021; published online November 24, 2021.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 21908034) and the Natural Science Foundation of Heilongjiang Province (No. LH2021H001).

国家自然科学基金(No. 21908034)及黑龙江省自然科学基金(No. LH2021H001)资助项目。

种植以来, 抗草甘膦转基因技术在世界范围内发展迅速, 目前已商品化的抗草甘膦转基因作物主要有大豆、油菜、玉米、棉花、甜菜、水稻、苜蓿及小麦等^[10]. 正由于转基因作物中几乎全部含有草甘膦, 因此, 对草甘膦的识别检测技术已成为甄别转基因作物的一种最有效手段.

同时, 随着抗草甘膦转基因作物的广泛种植, 草甘膦用量逐年增加, 现已成为全世界应用最广、产量最大的农药品种^[11]. 长期大量使用草甘膦, 导致环境水体污染, 对人类健康和生态环境也构成严重威胁^[12-16]. 现有研究表明, 草甘膦可能会损害中枢神经系统, 导致呼吸、心肌及神经肌肉功能障碍等, 并且对生物的遗传、发育和生殖具有一定的毒副作用^[17-21]. 此外, 国际癌症研究机构(IARC)在 2015 年将草甘膦列为 2A 类致癌物^[22]. 因此, 为了加强水体和环境中草甘膦的监测, 降低草甘膦残留的风险, 也迫切需要实现草甘膦的快速定量检测.

检测草甘膦的传统分析方法包括气相色谱(GC)、高效液相色谱(HPLC)、液相色谱-质谱联用(LC-MS)、毛细管电泳(CE)及酶联免疫分析法(ELISA)等^[23-27]. 尽管这些方法在一定条件下能够满足草甘膦残留检测的要求, 但具有样品预处理复杂、耗时长、成本高及需要专业的操作人员等问题, 不能实现草甘膦的快速检测. 因此, 建立一个简便、快速、灵敏且经济的草甘膦检测方法已成为迫切需求.

近年来, 由于荧光探针检测技术具有灵敏度高、特异性强、响应时间短及实时检测等优点, 备受研究者的青睐. 草甘膦分子中含有氨基、磷酸基和羧基等官能团, 这些官能团与金属离子(尤其是 Cu^{2+})发生强烈的配位作用. 利用草甘膦对荧光探针中 Cu^{2+} 置换引起荧光变化, 可实现草甘膦的荧光检测^[28-29]. 目前, 利用具有荧光的

Cu^{2+} 配合物识别草甘膦或者利用荧光探针分子连续识别 Cu^{2+} 和草甘膦的研究鲜有报道^[30]. 本工作设计并合成了一种香豆素酰肼类荧光探针 **L**, 其能够与 Cu^{2+} 配位并发生显著的荧光猝灭和肉眼可见的颜色变化, 再通过草甘膦对配合物中 Cu^{2+} 的置换引起荧光恢复, 从而实现探针 **L** 对 Cu^{2+} 和草甘膦的荧光“On-Off-On”连续识别.

1 结果与讨论

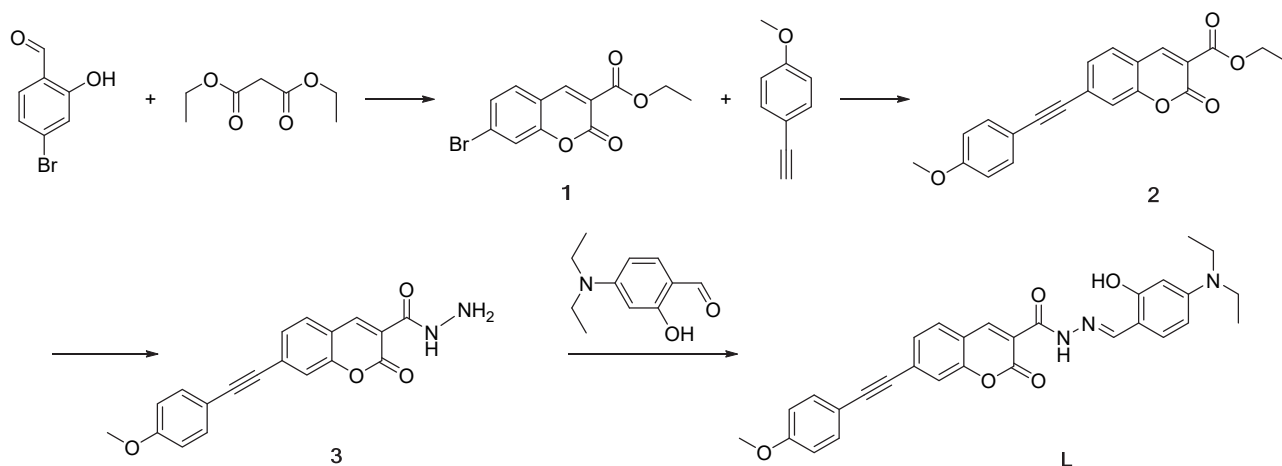
1.1 探针 **L** 的设计与合成

酰肼类化合物是由酰肼类衍生物与醛或酮缩合形成的一类特殊席夫碱, 其中含有亚氨基氮、羰基氧及其它可配位原子等, 配位能力强, 能够与金属离子配位形成具有荧光特征的“刚性平面和大共轭 π 键”配合物^[31], 导致荧光光谱发生变化, 从而实现金属离子的选择性识别. 因此, 本工作以 7-(4-甲氧基苯基)乙炔基香豆素为荧光基团, 酰肼为识别基团, 设计并合成了一种新型香豆素酰肼类荧光探针 **L** (Scheme 1).

1.2 探针 **L** 对 Cu^{2+} 的识别性能研究

1.2.1 探针 **L** 对金属离子的选择性

为研究探针 **L** 与金属离子之间的相互作用, 采用二甲基甲酰胺(DMSO)/ H_2O [$V:V=7:3$, 4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES) 10 mmol/L, pH=7.4]将探针 **L** 配制成 10 $\mu\text{mol/L}$ 溶液, 再分别加入 50 $\mu\text{mol/L}$ 的金属离子(Co^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ca^{2+} , Cr^{3+} , K^+ , Ni^{2+} , Al^{3+} , Fe^{3+} , Mg^{2+} , Pb^{2+} , Na^+ , Sr^{3+} , Ce^{3+} , Ag^+ , Li^+ , Cd^{2+} 和 Hg^{2+})溶液, 测试探针 **L** 的光谱变化(图 1a). 与其他金属离子相比, 加入 Cu^{2+} 后, 探针 **L** 的黄绿色荧光褪去, 发生显著的荧光猝灭现象, 并且通过肉眼观察到探针 **L** 溶液颜色由黄色变为浅棕色; 图 1b 显示最大紫外吸收峰明显红移. 进一步研究了常见阴离子(SO_4^{2-} , F^- , SCN^- , Br^- , HSO_4^- , H_2PO_4^- ,



图式 1 探针 **L** 的合成路线
Scheme 1 Synthetic route of probe **L**

HPO_4^{2-} , NO_2^- , I^- , HCO_3^- , CO_3^{2-} , Cl^- , CH_3COO^- , NO_3^-)对探针 **L** 荧光发射光谱和紫外-可见吸收光谱影响。结果显示, 与其他阴离子相比, 只有在加入 Cu^{2+} 时, 探针 **L** 的黄绿色荧光褪去, 最大紫外吸收峰红移, 探针 **L** 溶液颜色由黄色变为浅棕色。这些结果表明, 探针 **L** 对 Cu^{2+} 具有良好的选择性, 并且能够与 Cu^{2+} 配位形成 **L**- Cu^{2+} 配合物。此外, 探针 **L** 与 Cu^{2+} 配位后荧光猝灭, 这可能是由于 Cu^{2+} 的顺磁性以及探针 **L** 向 Cu^{2+} 电荷转移导致的^[32-34]。

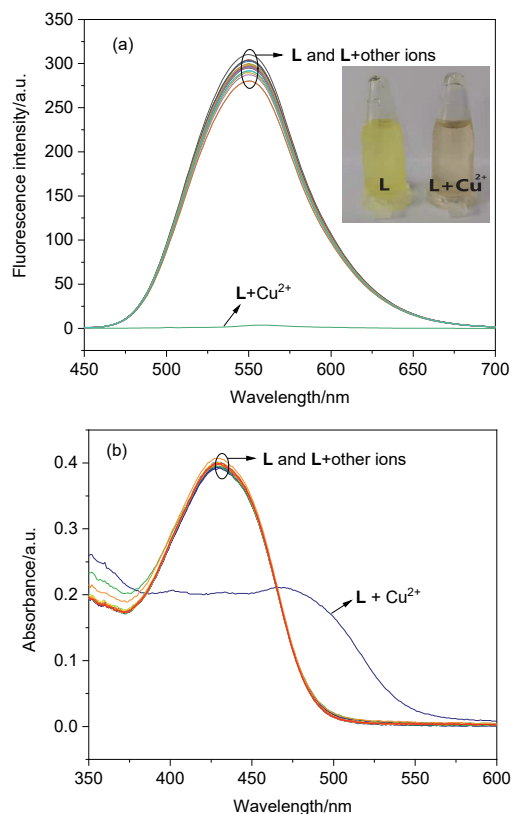


图1 不同金属阳离子(50 $\mu\text{mol/L}$)存在下探针 **L** (10 $\mu\text{mol/L}$) 的荧光发射光谱(a)和紫外-可见吸收光谱(b) ($\lambda_{\text{ex}}=435\text{ nm}$)

Figure 1 Fluorescence intensity (a) and UV-Vis absorption spectra (b) of probe **L** (10 $\mu\text{mol/L}$) in the presence of different metal ions (50 $\mu\text{mol/L}$) ($\lambda_{\text{ex}}=435\text{ nm}$)

Inset: visual color changes observed in solution of probe **L** (left) and **L** + Cu^{2+} (right) after addition of Cu^{2+} ion

1.2.2 探针 **L** 识别 Cu^{2+} 的灵敏性

为进一步研究探针 **L** 识别 Cu^{2+} 的灵敏性, 进行了荧光滴定实验。向探针 **L** (10 $\mu\text{mol/L}$) 溶液中加入不同浓度的 Cu^{2+} , 如图 2a 所示, 探针 **L** 荧光强度随 Cu^{2+} 浓度增大而逐渐减弱。在 0~15 $\mu\text{mol/L}$ 范围内, Cu^{2+} 浓度与荧光强度具有良好的线性关系, 如图 2b 所示, 线性回归方程为 $Y=288.3-18.7X$, 线性相关系数为 $R^2=0.9958$ 。根据检测限的计算公式: $\text{DL}=3\sigma/k$ (其中 σ 为探针 **L** 荧光强度的标准偏差, k 为荧光滴定过程中探针 **L** 荧光强度与

Cu^{2+} 浓度作直线图的斜率), 计算出探针 **L** 对 Cu^{2+} 的荧光检测限 DL 为 $5.6\times 10^{-8}\text{ mol/L}$ 。这些数据表明, 探针 **L** 能够实现 Cu^{2+} 的高灵敏度痕量检测。

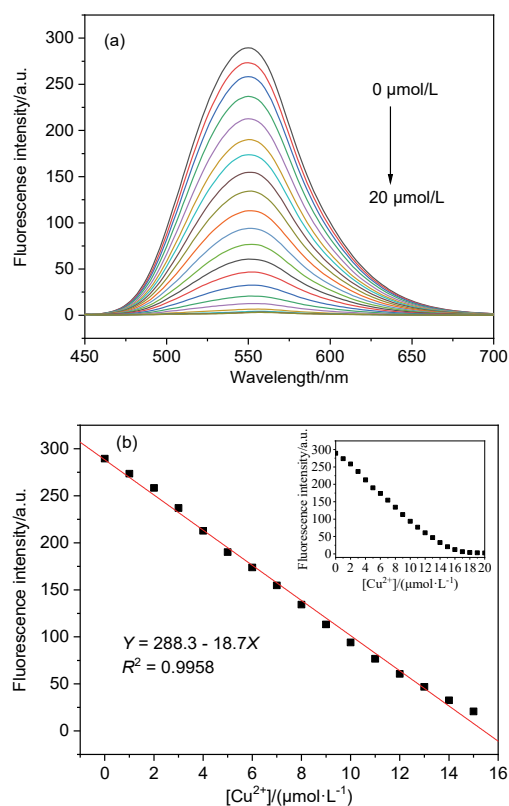


图2 (a)不同浓度的 Cu^{2+} (0~20 $\mu\text{mol/L}$) 加入到探针 **L** (10 $\mu\text{mol/L}$) 的荧光光谱和(b)探针 **L** 在 550 nm 处荧光强度与 Cu^{2+} 浓度的线性关系

Figure 2 (a) Fluorescence spectra of probe **L** (10 $\mu\text{mol/L}$) upon addition of different concentrations of Cu^{2+} (0~20 $\mu\text{mol/L}$) and (b) linear relationship between the fluorescence intensity at 550 nm and the concentration of Cu^{2+} (0~15 $\mu\text{mol/L}$)

Inset: fluorescence intensity at 550 nm of probe **L** (10 $\mu\text{mol/L}$) upon addition of different concentrations of Cu^{2+} (0~20 $\mu\text{mol/L}$)

1.2.3 探针 **L** 识别 Cu^{2+} 的抗干扰性能

为考察探针 **L** 对 Cu^{2+} 检测的专一性及抗干扰能力, 进行了不同金属离子和阴离子共存时探针 **L** 识别 Cu^{2+} 的抗干扰试验, 结果如图 3 所示。在探针溶液中加入其他金属离子和阴离子后, 探针 **L** 在 550 nm 处的荧光强度无明显变化; 随后再加入 Cu^{2+} , 均发生显著的荧光猝灭, 这说明探针 **L** 识别 Cu^{2+} 具有良好的抗干扰能力。

1.2.4 探针 **L** 与 Cu^{2+} 的结合模式

Job's plot 曲线是研究探针与离子配位比的常规方法, 检测过程中保持探针 **L** 和 Cu^{2+} 总浓度不变为 20 $\mu\text{mol/L}$, 取发射波长 550 nm 处荧光强度值与浓度比作直线图, 如图 4 所示, $[\text{Cu}^{2+}]/([\text{L}]+[\text{Cu}^{2+}])$ 在 0.64 处出现拐点, 表明探针 **L** 与 Cu^{2+} 以 1:2 的比例进行配位。利

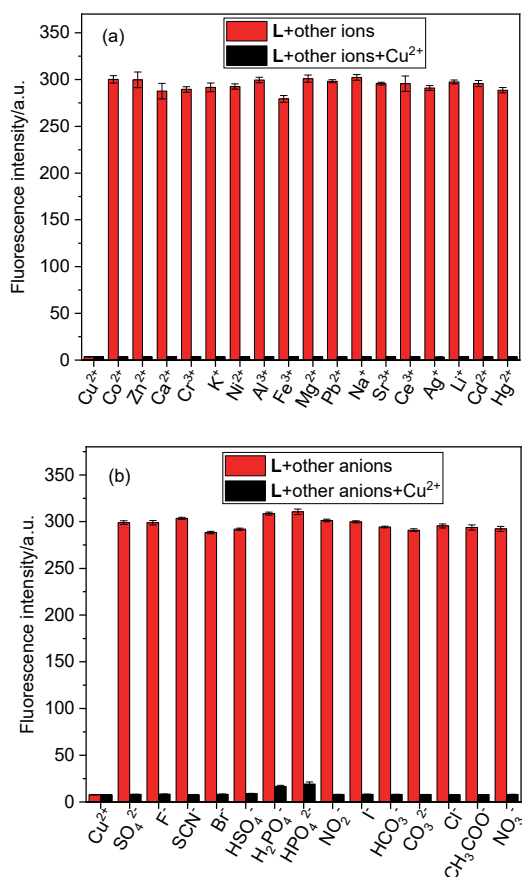


图3 在金属离子(a)或阴离子(b) (50 $\mu\text{mol/L}$)存在下探针 **L** (10 $\mu\text{mol/L}$)对 Cu^{2+} (50 $\mu\text{mol/L}$)识别的抗干扰能力

Figure 3 Anti-interference ability of probe **L** (10 $\mu\text{mol/L}$) recognition for Cu^{2+} (50 $\mu\text{mol/L}$) in the presence of various metal ions (a) or anions (b) (50 $\mu\text{mol/L}$)

用 1 : 2 的 Benesi-Hildebrand 方程^[35], 对 550 nm 处测得的荧光滴定曲线进行非线性拟合, 计算出探针 **L** 与 Cu^{2+} 的结合常数 $K_a = 2.08 \times 10^{10} \text{ L}^2/\text{mol}^2$. 同时, 质谱检测也显示探针 **L** 与 Cu^{2+} 是 1 : 2 配位, 质谱检测发现探针 **L** 与 Cu^{2+} 配位后的离子峰 m/z 为 634.0463, 与理论值 634.0386 基本一致.

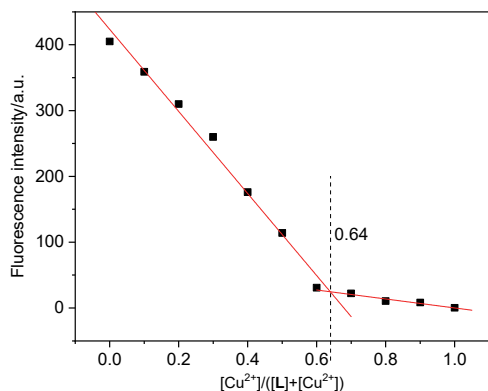


图4 探针 **L** 与 Cu^{2+} 的 Job's plot 图
Figure 4 Job's plot of probe **L** with Cu^{2+}

1.3 配合物 L-Cu^{2+} 对草甘膦的识别性能研究

1.3.1 L-Cu^{2+} 对有机磷农药的选择性

为验证 L-Cu^{2+} 对有机磷农药(OPs)是否具有识别作用, 向原位生成的含有探针 **L** (10 $\mu\text{mol/L}$)和 Cu^{2+} (15 $\mu\text{mol/L}$)的 L-Cu^{2+} 溶液中分别加入草甘膦、敌百虫、亚胺硫磷、敌敌畏、马拉硫磷、氧化乐果、乐果、灭线磷、杀螟硫磷、甲基对硫磷、对硫磷和草铵膦等有机磷农药, 测试其光谱变化(图5). 荧光光谱结果表明, 加入草甘膦能引起荧光的部分恢复; 加入草甘膦后, 550 nm 处的荧光发射峰强度明显增强, 与探针 **L** 的荧光强度基本相同, 这可能是由于草甘膦夺取配合物 L-Cu^{2+} 中的 Cu^{2+} , 配体 **L** 解离后进入溶液, 使得荧光恢复; 加入其他有机磷农药后荧光发射光谱无明显变化. 紫外-可见吸收光谱表明, L-Cu^{2+} 溶液加入草甘膦后, 最大紫外吸收峰蓝移, 与探针 **L** 的吸收光谱基本一致, 再次证实草甘膦能够夺取配合物 L-Cu^{2+} 中的 Cu^{2+} 并释放出配体 **L**. 此外, 可以通过肉眼观察到 L-Cu^{2+} 溶液颜色由浅棕色恢复至黄色. 进一步研究了常见阴离子(SO_4^{2-} , F^- , SCN^- , Br^- ,

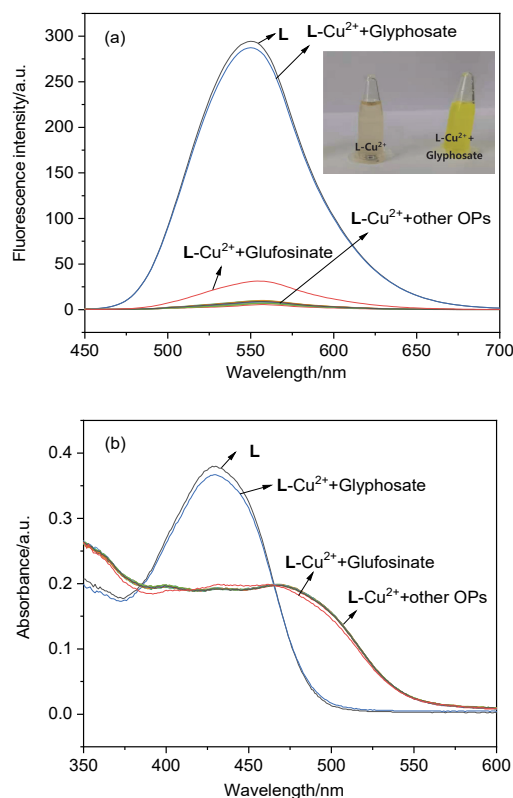


图5 不同有机磷农药(50 $\mu\text{mol/L}$)存在下 L-Cu^{2+} 的荧光发射光谱(a)和紫外-可见吸收光谱(b)

Figure 5 Fluorescence intensity (a) and UV-Vis absorption spectra (b) of L-Cu^{2+} in the presence of different organophosphorus pesticides (50 $\mu\text{mol/L}$)

Inset: visual color changes observed in solution of L-Cu^{2+} (left) and L-Cu^{2+} + Glyphosate (right) after addition of Glyphosate

HSO_4^- , H_2PO_4^- , HPO_4^{2-} , NO_2^- , I^- , HCO_3^- , CO_3^{2-} , Cl^- , CH_3COO^- , NO_3^-)对配合物 L-Cu^{2+} 荧光发射光谱和紫外-可见吸收光谱的影响. 结果显示, 与其他阴离子相比, 只有在加入草甘膦时, 配合物 L-Cu^{2+} 的黄绿色荧光恢复, 最大紫外吸收峰蓝移, 配合物 L-Cu^{2+} 溶液颜色由浅棕色变为黄色. 这些结果表明, L-Cu^{2+} 能够实现草甘膦的选择性识别.

1.3.2 L-Cu^{2+} 识别草甘膦的灵敏性

为探究 L-Cu^{2+} 检测草甘膦的灵敏性, 进行了荧光滴定实验, 如图 6a 所示. 随着草甘膦浓度的增加, L-Cu^{2+} 溶液(其中探针 L 10 $\mu\text{mol/L}$, Cu^{2+} 15 $\mu\text{mol/L}$)的荧光强度逐渐增强. 在 0~16 $\mu\text{mol/L}$ 范围内, 草甘膦浓度与荧光强度呈现良好的线性关系, 如图 7b 所示, 线性回归方程为 $Y=15.6X-2.05$, 线性相关系数为 $R^2=0.9980$. 根据检测限的计算公式: $\text{DL}=3\sigma/k$ (其中 σ 为 L-Cu^{2+} 荧光强度的标准偏差, k 为荧光滴定过程中 L-Cu^{2+} 荧光强度与草甘膦浓度作直线的斜率), 计算出 L-Cu^{2+} 对草甘

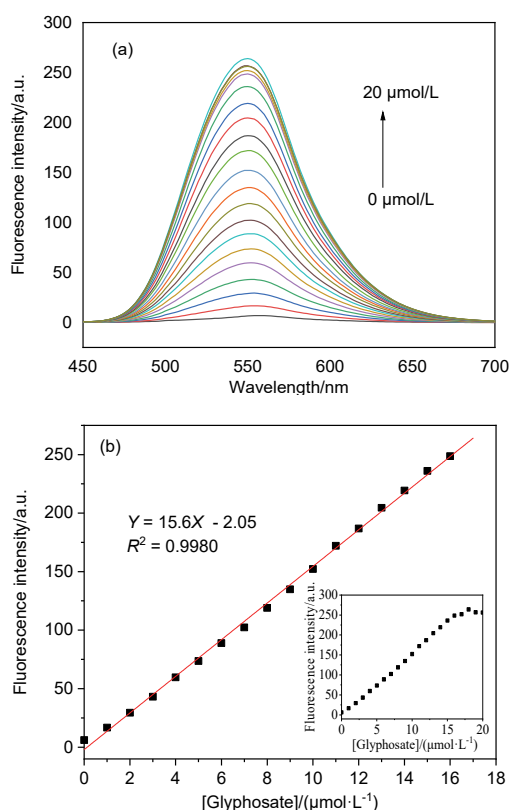


图 6 (a)不同浓度的草甘膦(0~20 $\mu\text{mol/L}$)加入到 L-Cu^{2+} 溶液的荧光光谱和(b) L-Cu^{2+} 溶液在 550 nm 处荧光强度与草甘膦浓度的线性关系

Figure 6 (a) Fluorescence spectra of L-Cu^{2+} upon addition of different concentrations of Glyphosate (0~20 $\mu\text{mol/L}$) and (b) linear relationship between the fluorescence intensity at 550 nm and the concentration of Glyphosate (0~16 $\mu\text{mol/L}$) Inset: fluorescence intensity at 550 nm of L-Cu^{2+} upon addition of different concentrations of Glyphosate (0~20 $\mu\text{mol/L}$)

膦的荧光检测限 DL 为 6.7×10^{-8} mol/L(即 11.3 ng/mL). 这些数据表明, L-Cu^{2+} 检测草甘膦具有较高的灵敏度.

1.3.3 L-Cu^{2+} 识别草甘膦的抗干扰性能

为考察 L-Cu^{2+} 对草甘膦检测的专一性及抗干扰能力, 向原位生成的含有探针 L (10 $\mu\text{mol/L}$)和 Cu^{2+} (15 $\mu\text{mol/L}$)的 L-Cu^{2+} 溶液中分别加入草甘膦、敌百虫、亚胺硫磷、敌敌畏、马拉硫磷、氧化乐果、乐果、灭线磷、杀螟硫磷、甲基对硫磷、对硫磷、草铵膦等有机磷农药和阴离子后, 再加入草甘膦, 测试其荧光光谱(图 7). 加入其他有机磷农药和阴离子后, L-Cu^{2+} 在 550 nm 处的荧光强度无明显变化; 随后加入草甘膦, 体系均发生显著的荧光增强, 说明 L-Cu^{2+} 对草甘膦的荧光识别不受共存有机磷农药和阴离子的干扰, 具有良好的特异性识别能力和抗干扰能力.

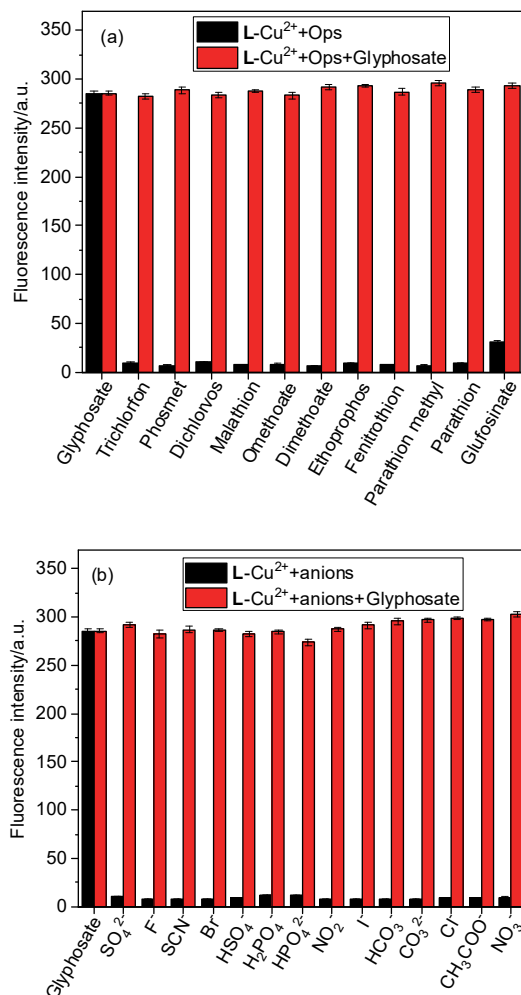


图 7 在其他有机磷农药(a)或阴离子(b) (50 $\mu\text{mol/L}$)存在下 L-Cu^{2+} 对草甘膦识别的抗干扰能力

Figure 7 Anti-interference ability of L-Cu^{2+} recognition for Glyphosate (50 $\mu\text{mol/L}$) in the presence of various OPs (a) or anions (b) (50 $\mu\text{mol/L}$)

1.3.4 L-Cu²⁺检测草甘膦的作用机理

通过 Job's plot 曲线研究 L-Cu²⁺与草甘膦的结合模式, 检测过程中保持 L-Cu²⁺溶液(其中探针 L 10 $\mu\text{mol/L}$, Cu²⁺ 20 $\mu\text{mol/L}$, 以探针 L 浓度计)和草甘膦总浓度不变, 为 20 $\mu\text{mol/L}$, 取发射波长 550 nm 处荧光强度值与浓度比作直线图(图 8), $[\text{草甘膦}]/([\text{L-Cu}^{2+}] + [\text{草甘膦}])$ 在 0.63 处出现拐点, 表明 L-Cu²⁺与草甘膦以 1:2 的比例进行配位. 由于草甘膦是通过夺取 L-Cu²⁺配合物中的 Cu²⁺释放配体 L 使得荧光恢复, 由此确定草甘膦与 Cu²⁺以 1:1 的比例进行配位. 此外, 通过交替添加 Cu²⁺和草甘膦的可逆性实验, 进一步验证了配合物 L-Cu²⁺中 Cu²⁺能够被草甘膦夺取出来. 由此推断探针 L 连续检测 Cu²⁺和草甘膦的识别机理, 如 Scheme 2 所示.

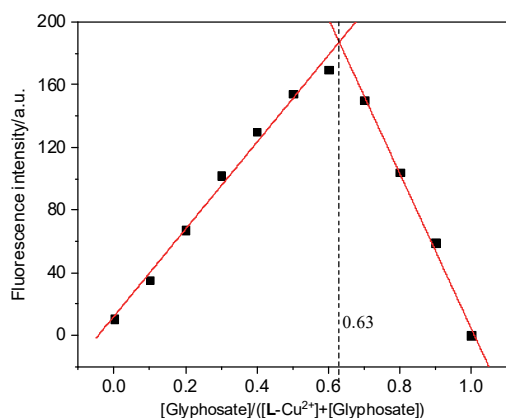


图 8 L-Cu²⁺与草甘膦的 Job's plot 图
Figure 8 Job's plot of L-Cu²⁺ with Glyphosate

1.3.5 pH 对探针 L 连续识别 Cu²⁺和草甘膦的影响

为了验证探针 L 的实用性, 测试了不同 pH 对探针 L 连续识别 Cu²⁺和草甘膦的影响(图 9). 在 pH < 3 的强酸性条件下, 探针 L 无明显荧光; pH 在 5~9 范围内, 探针 L 的荧光发射较强, 探针 L+Cu²⁺的荧光淬灭明显, 加入草甘膦后的荧光强度明显增强, 与探针 L 的荧光强度基本相同; 在 pH > 10 的强碱性条件下, 探针 L 的荧光强度明显增强, 这可能是由于探针 L 结构被破坏所导致的. 这些结果表明, 探针 L 在 pH 5~9 范围内可以连续检测 Cu²⁺和草甘膦, 可应用于生物体系中 Cu²⁺和草甘膦的检测.

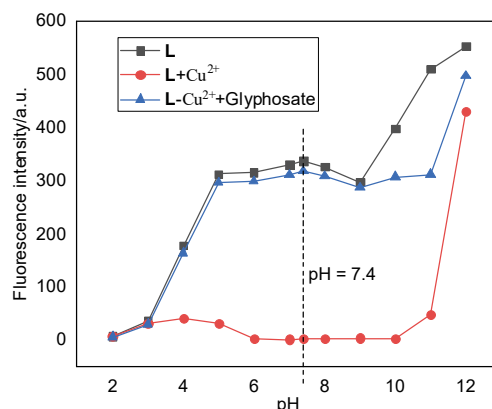
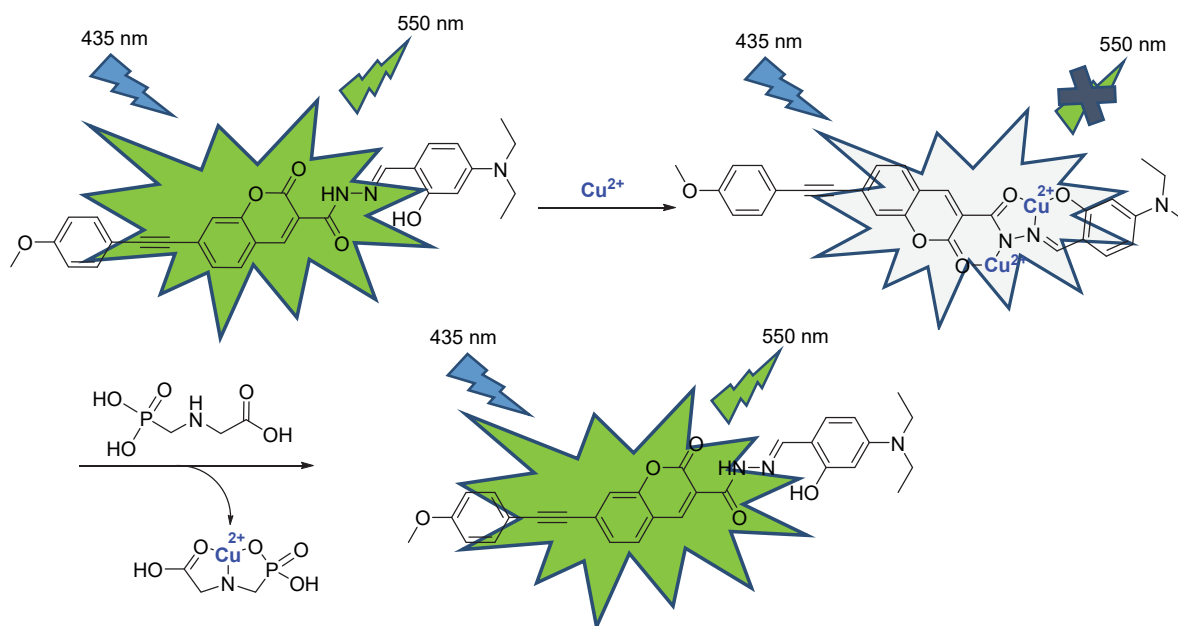


图 9 探针 L、探针 L+Cu²⁺和 L-Cu²⁺+草甘膦在不同 pH 时荧光强度的变化

Figure 9 Fluorescence intensity change of probe L, probe L + Cu²⁺ and L-Cu²⁺ + Glyphosate in different pH



图式 2 探针 L 连续识别 Cu²⁺和草甘膦的原理

Scheme 2 Proposed sequential recognition mechanism of probe L with Cu²⁺ and Glyphosate

1.4 探针 L 的应用

基于探针 L 对 Cu^{2+} 和草甘膦的连续检测性能, 将其设计成一种 INHIBIT(抑制)分子逻辑门, 其中两个化学输入信号(Input₁, Input₂)分别为 Cu^{2+} 和草甘膦, 输出信号(Output)为 550 nm 处的荧光发射. 图 10 给出了 4 种不同条件下的荧光发射光谱及 INHIBIT 逻辑门对应的真值表, 无任何输入时, 荧光发射(“1”状态 Turn ON);

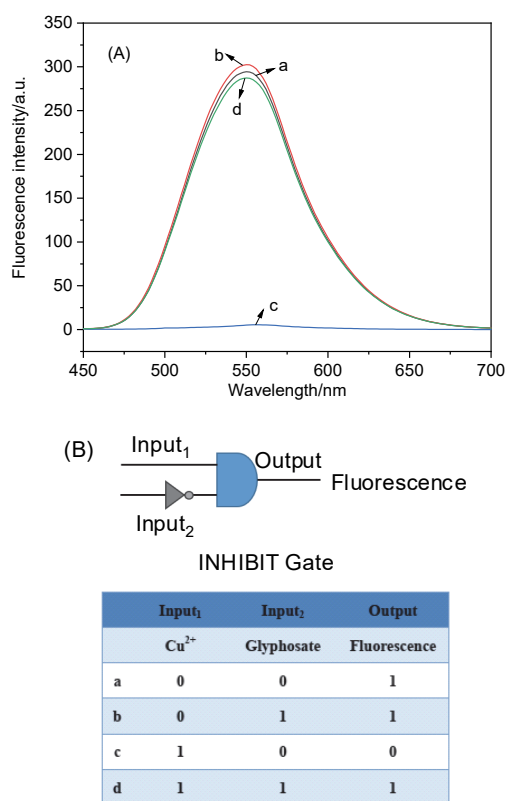


图 10 探针 L 及其在 Cu^{2+} 和/或草甘膦存在时的荧光发射光谱 (A) 及 INHIBIT 逻辑门的真值表及逻辑电路图 (B)

Figure 10 Fluorescence spectra of probe L without or with the addition of Cu^{2+} and/or Glyphosate (A) and the truth table and scheme for the INHIBIT logic gate (B)

仅存在 Cu^{2+} 为输入信号时, 荧光淬灭(“0”状态 Turn OFF); 当草甘膦为输入信号, 无论 Cu^{2+} 是否存在, 荧光发射(“1”状态); 同时存在 Cu^{2+} 和草甘膦为输入信号时, 荧光发射(“1”状态).

此外, 为进一步考察探针 L 在实际环境中的适用性, 选取实验室自来水和松花江水两种水样, 测定 L-Cu^{2+} 在实际水样中检测草甘膦的性能. 水样在转速 12000 r/min 条件下离心 10 min, 经 0.45 μm 过滤器处理过滤, 除去水样中的固体颗粒, 采用 $\text{DMSO}/\text{H}_2\text{O}$ ($V:V=7:3$, HEPES 10 mmol/L, pH=7.4) 配制 10 $\mu\text{mol/L}$ 的探针 L 溶液, 并加入 15 $\mu\text{mol/L}$ 的 Cu^{2+} 制成 L-Cu^{2+} 测试液. 利用加标法, 分别向测试液中加入 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 $\mu\text{g/mL}$ 的草甘膦, 测定 550 nm 处的荧光发射峰强度, 通过公式计算得到草甘膦的浓度, 如表 1 所示. 结果表明, 在实际水样中草甘膦的加标回收率 96.8%~103.6%, 相对标准偏差 0.49%~2.98%, 检出草甘膦浓度与相应加标浓度误差较小. 这说明 L-Cu^{2+} 在实际水样中检测草甘膦的准确度高, 具有良好的实用性能.

2 结论

设计并合成了一种新型香豆素酰肼类荧光探针 L, 在 $\text{DMSO}/\text{H}_2\text{O}$ ($V:V=7:3$, HEPES 10 mmol/L, pH=7.4) 溶液中能够特异性识别 Cu^{2+} , 且不受其他金属离子和阴离子的干扰, 具有较高的灵敏度, 同时探针 L 与 Cu^{2+} 以 1:2 的比例形成配合物. 此外, L-Cu^{2+} 配合物可以有效识别草甘膦, 不受其他有机磷农药和阴离子的干扰, 检测速度快, 灵敏度高, 检测限为 6.7×10^{-8} mol/L (即 11.3 ng/mL), pH 适用范围较宽. 基于探针 L 对 Cu^{2+} 和草甘膦的连续检测性能, 构建了以 Cu^{2+} 和草甘膦为化学输入信号的 INHIBIT 分子逻辑门. 应用研究表明, L-Cu^{2+} 能够准确检测实际水样中的草甘膦, 具有良好的应用前景.

表 1 实际水样中草甘膦的检测结果

Table 1 Detection results of Glyphosate in actual water samples

Sample	Added/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	Found/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	Recovery rate/%	RSD/% ($n=3$)
Tap water	—	—	—	0.49
	0.25	0.253	101.2	2.26
	0.5	0.492	98.4	2.51
	1.0	0.978	97.8	1.84
	2.0	2.072	103.6	2.30
Songhua River water	—	—	—	1.62
	0.25	0.242	96.8	2.11
	0.5	0.494	98.8	2.98
	1.0	1.025	102.5	1.34
	2.0	1.982	99.1	1.87

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

Bruker AV-300MHz 型核磁共振波谱仪(德国布鲁克公司); Nicolet IN10 型傅里叶变换显微红外光谱仪(美国赛默飞世尔科技公司); Bruker Solarix 70FT-MS 型高分辨质谱仪(德国布鲁克公司); Hitachi F-7000 型荧光光谱仪(日本日立公司); Shimadzu UV-2450 型紫外-可见光吸收光谱仪(日本岛津公司)。

4-溴水杨醛、丙二酸二乙酯、4-甲氧基苯乙炔、4-二乙氨基水杨醛、二苯基磷二氯化钼、三苯基膦和碘化亚铜等均来自安耐吉试剂公司, 无需纯化即可使用; 有机磷农药标准溶液均来自于上海安谱实验科技股份有限公司; 所用溶剂均为市售分析纯, 需干燥后使用。

3.2 实验方法

3.2.1 7-溴香豆素-3-甲酸乙酯(**1**)的合成

将4-溴水杨醛(6.03 g, 30 mmol)、丙二酸二乙酯(5.95 g, 33 mmol)、吡咯烷(0.5 mL)和乙醇(120 mL)加入到 250 mL 三口瓶中, 回流反应, HPLC 监测反应进程。反应结束后, 将反应液缓慢倒入 240 mL 水中, 有大量固体析出, 过滤, 水洗, 干燥得 7.21 g 白色固体 **1**, 产率 80.9%。m.p. 148.5~149.0 °C (Lit.^[36] 148~150 °C); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 8.49 (s, 1H), 7.54 (s, 1H), 7.48 (d, $J=1.0$ Hz, 2H), 4.42 (q, $J=7.1$ Hz, 2H), 1.41 (t, $J=7.1$ Hz, 3H)。

3.2.2 7-(4-甲氧基苯基乙炔基)香豆素-3-甲酸乙酯(**2**)的合成

氮气气氛下, 将 **1** (5.94 g, 20 mmol)、4-甲氧基苯乙炔(3.17 g, 24 mmol)、Pd(PPh₃)Cl₂ (0.28 g, 0.4 mmol)、CuI (0.38 g, 2 mmol)、三苯基膦(1.57 g, 6 mmol)、三乙胺(50 mL)和无水甲苯(100 mL)加入到 250 mL 三口瓶中, 回流反应, HPLC 监测反应进程。减压脱除溶剂后, 残余物用甲苯溶解, 2 mol/L 盐酸洗涤, 水洗, 无水硫酸钠干燥, 减压脱除大部分溶剂后结晶, 得 4.95 g 黄绿色固体 **2**^[37], 产率 71.0%。m.p. 184.1~184.9 °C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 8.77 (s, 1H), 7.94 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.55 (dd, $J=11.8, 7.9$ Hz, 4H), 7.03 (d, $J=8.6$ Hz, 2H), 4.31 (q, $J=7.0$ Hz, 2H), 3.81 (s, 3H), 1.32 (t, $J=7.1$ Hz, 3H)。

3.2.3 7-(4-甲氧基苯基乙炔基)香豆素-3-甲酰肼(**3**)的合成

将 **2** (3.48 g, 10 mmol)、质量分数为 80% 的水合肼(3.06 g, 50 mmol)和四氢呋喃(100 mL)加入到 250 mL 三口瓶中, 回流反应 6 h。待反应完全后, 减压浓缩至干, 乙醇重结晶得 2.87 g 黄色固体 **3**, 产率为 85.9%。m.p. 121.8~122.4 °C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ :

11.47 (s, 1H), 7.93 (s, 1H), 7.53~7.44 (m, 2H), 7.27 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.06 (s, 2H), 7.02~6.95 (m, 3H), 6.92 (d, $J=1.5$ Hz, 1H), 3.80 (s, 3H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 159.55, 156.07, 140.14, 132.96, 127.97, 122.15, 120.47, 117.84, 114.40, 114.19, 89.86, 88.18, 55.28; IR (KBr) ν : 3344, 2962, 2804, 2206, 1603, 1548, 1511, 1362, 1247, 1029, 836, 820 cm⁻¹; HRMS (ESI⁺) calcd for C₁₉H₁₅N₂O₄ [M + H]⁺ 335.1026, found 335.1786。

3.2.4 探针 **L** 的合成

在 250 mL 三口瓶中加入 **3** (1.67 g, 5 mmol)、4-二乙氨基水杨醛(1.06 g, 5.5 mmol)、冰乙酸 0.5 mL 和无水乙醇 100 mL, 回流反应 15 h; 冷却至室温后, 过滤干燥, *N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)重结晶, 得 1.75 g 黄色固体探针 **L**, 收率 68.6%。m.p. 187.2~187.8 °C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 11.40 (d, $J=4.9$ Hz, 2H), 8.85 (s, 1H), 8.77 (s, 1H), 7.66 (d, $J=7.9$ Hz, 1H), 7.57~7.48 (m, 2H), 7.35 (d, $J=9.0$ Hz, 1H), 7.12~7.06 (m, 2H), 7.05~6.95 (m, 2H), 6.35 (dd, $J=8.9, 2.3$ Hz, 1H), 6.14 (d, $J=2.3$ Hz, 1H), 3.81 (s, 3H), 3.40 (q, $J=7.0$ Hz, 4H), 1.12 (t, $J=7.0$ Hz, 6H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 164.14, 161.64, 160.27, 159.03, 158.43, 152.11, 133.96, 133.62, 131.01, 126.53, 122.91, 119.36, 118.87, 114.93, 114.28, 106.58, 104.87, 97.39, 92.12, 88.34, 55.78, 13.0; IR (KBr) ν : 2973, 2931, 2208, 1629, 1604, 1566, 1513, 1351, 1247, 1235, 1133, 831 cm⁻¹; HRMS (ESI⁺) calcd for C₃₀H₂₈N₃O₅ [M+H]⁺ 510.2023, found 510.2048。

3.3 荧光光谱测定方法

以二次蒸馏水为溶剂, 配制 Co²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺, Ca²⁺, Cr³⁺, K⁺, Ni²⁺, Al³⁺, Fe³⁺, Mg²⁺, Pb²⁺, Na⁺, Sr³⁺, Ce³⁺, Ag⁺, Li⁺, Cd²⁺, Hg²⁺ 的硝酸盐储备液(0.01 mol/L)。探针 **L** 以 DMSO 为溶剂配制成 1.0×10⁻⁴ mol/L 储备液, 在光谱测量前, 将其稀释至 1.0×10⁻⁵ mol/L (DMSO/H₂O, *V*:*V*=7:3, HEPES 10 mmol/L, pH=7.4)。荧光光谱测定均在室温下进行, 灵敏度为 1, 狭缝宽度均为 2.5 nm, 激发波长 λ_{ex} 为 435 nm。

辅助材料(Supporting Information) 实验中部分光谱图、中间体和探针 **L** 的结构表征等数据。这些材料可以免费从本刊网站(<http://sioc-journal.cn/>)上下载。

References

- [1] Elcin, S.; Deligoz, H.; Bhatti, A. A.; Oguz, M.; Karakurt, S.; Yilmaz, M. *Sens. Actuators, B* **2016**, 234, 345.
- [2] Sunnapu, O.; Kotla, N. G.; Maddiboyina, B.; Marepally, S.; Shanmugapriya, J.; Sekar, K.; Singaravadi, S.; Sivaraman, G.

- Anal. Chem.* **2017**, 2, 7654.
- [3] He, J. W.; Xie, Z. F.; Xue, S. S.; Liu, Y. C.; Shi, W.; Chen, X. *Chin. J. Org. Chem.* **2021**, 41, 2839 (in Chinese). (何佳伟, 解正峰, 薛松松, 刘宇程, 石伟, 陈鑫, 有机化学, **2021**, 41, 2839.)
- [4] Viles, J. H. *Coord. Chem. Rev.* **2012**, 256, 2271.
- [5] Fasea, K. D.; Abolaji, A. O.; Faloye, T. R.; Odunsi, A. Y.; Oyetayo, B. O.; Enya, J. I.; Rotimi, J. A.; Akinyemi, R. O.; Whitworth, A. J.; Aschner, M. J. *Trace Elem. Med. Biol.* **2021**, 67, 126779.
- [6] Mezzaroba, L.; Alfieri, D. F.; Simao, A. C.; Reiche, E. M. *Neurotoxicology* **2019**, 74, 230.
- [7] Keep, K. P.; Squitti, R. *Coord. Chem. Rev.* **2019**, 397, 168.
- [8] Lei, M. M.; Zhou, Q. H.; Yang, L.; Xu, Z. H.; Yang, F. L. *Chin. J. Org. Chem.* **2020**, 40, 2798 (in Chinese). (雷萌萌, 周起航, 杨莉, 许志红, 杨凤岭, 有机化学, **2020**, 40, 2798.)
- [9] Fang, R.; Ding, X.; Luo, W.; Hong, C. *Chin. J. Org. Chem.* **2020**, 40, 2949 (in Chinese). (房茹, 丁旭, 罗稳, 洪琛, 有机化学, **2020**, 40, 2949.)
- [10] Beckie, H. J.; Flower, K. C.; Ashworth, M. B. *Plants* **2020**, 9, 96.
- [11] Heymann, A. K.; Schnabel, K.; Billenkamp, F.; Bühler, S.; Frahm, J.; Kersten, S.; Hüther, L.; Meyer, U.; Soosten, D. V.; Trakooljul, N.; Teifke, J. P.; Dänicke, S. *Plos One* **2021**, 16, e0246679.
- [12] Tu, Q.; Yang, T. X.; Qu, Y. Q.; Gao, S. Y.; Zhang, Z. Y.; Zhang, Q. M.; Wang, Y. L.; Wang, J. Y.; He, L. L. *Analyst* **2019**, 144, 2017.
- [13] Cao, Y.; Wang, L. N.; Shen, C.; Wang, C. Y.; Hu, X. Y.; Wang, G. X. *Sens. Actuators, B* **2019**, 283, 487.
- [14] Aguirre, M. C.; Urreta, S. E.; Gomez, C. G. *Sens. Actuators, B* **2019**, 284, 675.
- [15] Gandhi, K.; Khan, S.; Patrikar, M.; Markad, A.; Kumar, N.; Choudhari, A.; Sagar, P.; Indurkar, S. *Environ. Challenges* **2021**, 4, 100149.
- [16] Mesnage, R.; Defarge, N.; Vendomis, J. S.; Seralini, G. E. *Food Chem. Toxicol.* **2015**, 84, 133.
- [17] Benedetti, A. L.; Vituri, C. L.; Trentin, A. G.; Dominues, M. A.; Silva, M. A. *Toxicol. Lett.* **2004**, 153, 227.
- [18] Jasper, R.; Locatelli, G. O.; Pilati, C.; Locatelli, C. *Interdiscip. Toxicol.* **2012**, 5, 133.
- [19] Mesnage, R.; Biserni, M.; Wozniak, E.; Xenakis, T.; Mein, C. A.; Antoniou, M. N. *Toxicol. Rep.* **2018**, 5, 819.
- [20] Topal, A.; Atamanalp, M.; Ucar, A.; Oruc, E.; Kocaman, E. M.; Sulukan, E.; Akdemir, F.; Beydemir, S.; Kilinc, N.; Erdogan, O.; Ceyhan, S. B. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2015**, 111, 206.
- [21] Schnabel, K.; Schmitz, R.; Frahm, J.; Meyer, U.; Breves, G.; Danicke, S. *Arch. Anim. Nutr.* **2020**, 74, 1.
- [22] Guyton, K. Z.; Loomis, D.; Grosse, Y.; Ghissassi, F. E.; Tallaa, L. B.; Guha, N.; Scoccianti, C.; Mattock, H.; Straif, K. *Lancet Oncol.* **2015**, 16, 490.
- [23] Tseng, S. H.; Lo, Y. W.; Chang, P. C.; Chou, S. S.; Chang, H. M. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 52, 4057.
- [24] Wang, S.; Liu, B. M.; Yuan, D. X.; Ma, J. *Talanta* **2016**, 161, 700.
- [25] Liao, Y.; Berthion, J. M.; Colet, I.; Merlo, M.; Nougadere, A.; Hu, R. *J. Chromatogr. A* **2018**, 1549, 31.
- [26] Wumbei, A.; Goeteyn, L.; Lopez, E.; Houbraken, M.; Spanoghe, P. *Food Addit. Contam., Part B* **2019**, 12, 231.
- [27] Gendy, K. E.; Mosallam, E.; Ahmed, N.; Aly, N. *Anal. Biochem.* **2018**, 557, 1.
- [28] Wang, L.; Bi, Y. D.; Li, Y. J.; Ding, H.; Ding, L. *RSC Adv.* **2016**, 6, 85820.
- [29] Gui, M. F.; Jiang, J.; Wang, X.; Yan, Y. X.; Li, S. Q.; Xiao, X. L.; Liu, T. B.; Liu, T. G.; Feng, Y. *Sens. Actuators, B* **2017**, 243, 696.
- [30] Wang, X. F.; Sakinati, M.; Yang, Y. X.; Ma, Y.; Yang, M.; Luo, H. B.; Hou, C. J. *Anal. Methods* **2020**, 12, 520.
- [31] Gou, Z. N.; Zhao, S. S.; Zhang, P. *Chin. J. Synth. Chem.* **2019**, 27, 673 (in Chinese). (苟珍妮, 赵顺省, 张盼, 合成化学, **2019**, 27, 673.)
- [32] Zhong, K. L.; Guo, B. F.; Sun, X. H.; Zhou, X.; Zhang, Q.; Tang, L. J.; Zhang, X. R. *Chin. J. Org. Chem.* **2017**, 37, 2002 (in Chinese). (钟克利, 郭宝峰, 孙笑寒, 周雪, 张强, 汤立军, 张行荣, 有机化学, **2017**, 37, 2002.)
- [33] Shi, F.; Gui, S. Q.; Liu, H. L.; Pu, S. Z. *Dyes Pigm.* **2020**, 173, 107914.
- [34] Tang, Y.; Li, Y. Y.; Han, J.; Mao, Y. L.; Ni, L.; Wang, Y. *Spectrochim. Acta, Part A* **2019**, 208, 299.
- [35] He, G. J.; Liu, X. L.; Xu, J. H.; Yang, L. L.; Fan, A. Y.; Wang, S. J.; Wang, Q. Z. *Spectrochim. Acta, Part A* **2018**, 190, 116.
- [36] Paul, K.; Bindal, S.; Luxami, V. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, 23, 3667.
- [37] Yin, H. J.; Zhang, B. C.; Yu, H. Z.; Zhu, L.; Feng, Y.; Zhu, M. Z.; Guo, Q. X.; Meng, X. M. *J. Org. Chem.* **2015**, 80, 4306.

(Zhao, C.)