

三唑基团功能化的三苯胺类 Cu^{2+} 荧光探针的合成及在检测和 HeLa 细胞中的应用

文乙评^{a,b} 解正峰^{*,a,b} 史天柱^{a,c} 褚义成^a 周荣贵^a
陶奕杉^a 梁焕敏^a 邱海燕^a 赵云辉^{*,d}

(^a 西南石油大学化学化工学院 油气田应用化学四川省重点实验室 成都 610500)

(^b 西南石油大学 工业危废处置与资源化利用研究院 成都 610500)

(^c 茅台学院酿酒工程系 贵州仁怀 564500)

(^d 湖南科技大学化学化工学院 湖南湘潭 411201)

摘要 以 2-(4-溴苯基)-2H-1,2,3-三唑-4-甲醛、(4-(二苯基氨基)苯基)硼酸和氨基硫脲为原料, 设计合成了一种新型的可高选择性快速识别 Cu^{2+} 的荧光探针分子 $N'-((2-(4'-(二苯胺基)-[1,1'-联苯]-4-基)-2H-1,2,3-三唑-4-基)亚甲基)肼-1-硫代酰胺(DBTMC)$ 。DBTMC 展示出优异的溶剂效应和聚集态效应, 对 Cu^{2+} 展现出高选择、高灵敏和快速响应性, 检测限为 $4.48 \times 10^{-8} \text{ mol/L}$ 。通过 job's 曲线、 ^1H NMR 滴定、HRMS 及密度泛函理论(DFT)计算对其可能的响应机理进行了探究。用探针 DBTMC 制备的测试条, 可用于快速检测 Cu^{2+} 。将 DBTMC 应用于检测 HeLa 细胞中的 Cu^{2+} , 也取得了良好的效果, 具有潜在的应用价值。

关键词 荧光探针; 铜离子; 溶剂效应; 聚集态效应; HeLa 细胞

Synthesis of Triazole Functionalized Triphenylamine Cu^{2+} Fluorescent Probe and Its Application in Detection and HeLa Cells

Wen, Yiping^{a,b} Xie, Zhengfeng^{*,a,b} Shi, Tianzhu^{a,c} Chu, Yicheng^a Zhou, Ronggui^a
Tao, Yishan^a Liang, Huanmin^a Qiu, Haiyan^a Zhao, Yunhui^{*,d}

(^a Oil & Gas Field Applied Chemistry Key Laboratory of Sichuan Province, College of Chemistry and Chemical Engineering, Southwest Petroleum University, Chengdu 610500)

(^b Research Institute of Industrial Hazardous Waste Disposal and Resource Utilization, Southwest Petroleum University, Chengdu 610500)

(^c Department of Brewing Engineering, Moutai Institute, Renhuai, Guizhou 564500)

(^d School of Chemistry and Chemical Engineering, Hunan University of Science and Technology, Xiangtan, Hunan 411201)

Abstract A novel fluorescence probe $N'-((2-(4'-(diphenyl)-[1,1'-biphenyl]-4-yl)-2H-1,2,3-triazole-4-yl)methylene) hydrazine-1-thioamide$ (DBTMC) was designed and synthesized from (4-(diphenylamino)-phenyl)boronic acid, (4-bromophenyl)-2H-[1,2,3]-triazole-4-carbaldehyde and thiosemicarbazide. DBTMC possessed excellent solvent effect and aggregation effect, and exhibited high selectivity, high sensitivity and rapid response to Cu^{2+} with detection limit of $4.48 \times 10^{-8} \text{ mol/L}$. The possible response mechanism was explored through job's curve, ^1H NMR titration, HRMS and density functional theory (DFT) calculations. The test strip prepared with the probe DBTMC solution could be used for quick recognition of Cu^{2+} . DBTMC was applied to HeLa cells to detect Cu^{2+} and excellent results were achieved, possessing potential application.

Keywords fluorescent probe; copper ion; solvent effect; aggregation effect; HeLa cells

* Corresponding authors. E-mail: xiezhf@swpu.edu.cn; zhao_yunhui@163.com

Received November 15, 2021; revised January 12, 2022; published online January 27, 2022.

Project supported by the Sichuan Youth Science and Technology Innovation Research Team Project (No. 2020JDTD0018), the Zunyi Science and Technology Bureau of Guizhou Province and the Maotai Institute Joint Science and Technology Cooperation Fund Project (Zunyi Kehe HZ [2021]333).

四川省青年科技创新研究团队(No. 2020JDTD0018)、贵州省遵义市科学技术局及茅台学院市校联合科技合作资金(遵市科合 HZ 字[2021]333 号)资助项目。

铜离子(Cu^{2+})是人体中除铁和锌离子之外第三重要的过渡元素,微量的 Cu^{2+} 在维持人体的器官组织、毛细血管组织及皮肤组织的强度中起着相当重要的作用^[1-5]. 然而当人体内 Cu^{2+} 过量时,会引发肝硬化、肝腹水、帕金森病及威尔森氏病等疾病^[6-9]. 为了更好地预防这些疾病,需要开发快速、准确的检测 Cu^{2+} 的方法^[10-12]. 荧光检测法由于具有操作简单、灵敏度高、响应迅速和选择性好等优点,被广泛应用于离子的检测中,备受研究者的关注^[13-19]. 尽管已报道了多种类型的 Cu^{2+} 探针,但这些探针在性能上存在响应时间长、选择性差或生物毒性高的缺陷. 因此,仍需进一步对 Cu^{2+} 荧光探针进行探索和研究,设计出对 Cu^{2+} 具有响应迅速、灵敏度高、选择性好及生物毒性低的荧光探针.

三苯胺荧光团因其独特的螺旋桨结构、高量子产率及较大的斯托克斯位移^[20-22],既能作为强的电子供体,又可作为潜在的聚集诱导发光骨架^[23-26],被广泛应用于聚集诱导发光材料、新能源电池材料和传感器材料的研发^[27-29]. 对带有硼酸基、氨基、卤素和醛基等的三苯胺进行偶联反应或缩合反应等,就能得到性能更加优越的三苯胺衍生物功能材料. 在荧光探针的研究中,功能化的三苯胺有着比较优异的光学性能,而 *N*-2-芳基-1,2,3-三唑具有优异的光学性质,是生物学和材料科学研究中具有巨大潜力的荧光骨架^[30-33]. 本实验室^[34-35]在前期研究中,以 2-(4-溴苯基)-1,2,3-三唑-4-甲醛为底物,通过 Suzuki 偶联反应在 *N*-2-芳基-1,2,3-三唑中引入蒽或三苯胺基团,得到具有聚集诱导发光(AIE)效应,并对半胱氨酸有很好选择性的荧光探针. 2-(4-溴苯基)-1,2,3-三唑-4-甲醛与 2-萘硼酸发生偶联反应,然后进一步与丙二腈缩合,得到具有 AIE 效应并能够高效选择性检测氰基的探针^[36]. 同时也制备了几种具有优异光学性能的含三苯胺基团的(磺)酰胺类荧光探针^[37-39],这些研究进一步验证了 *N*-2-芳基-1,2,3-三唑和三苯胺是很好的光学

基团. 在此基础上,本工作以 2-(4-溴苯基)-2*H*-1,2,3-三唑-4-甲醛、(4-(二苯基氨基)苯基)硼酸和氨基硫脲为原料,通过偶联反应以及缩合反应,制备出了对 Cu^{2+} 选择性好、灵敏度高、响应迅速并具有溶剂效应和聚集态效应的含三唑基团的功能化三苯胺类 Cu^{2+} 荧光探针分子 *N'*-((2-(4'-(二苯胺基)-[1,1'-联苯]-4-基)-2*H*-1,2,3-三唑-4-基)亚甲基)胍-1-硫代酰胺(DBTMC). 以探针 DBTMC 溶液制备的测试条,可用于 Cu^{2+} 的荧光检测. 此外,探针 DBTMC 还可以应用于活细胞中 Cu^{2+} 的检测,具有广泛的应用价值.

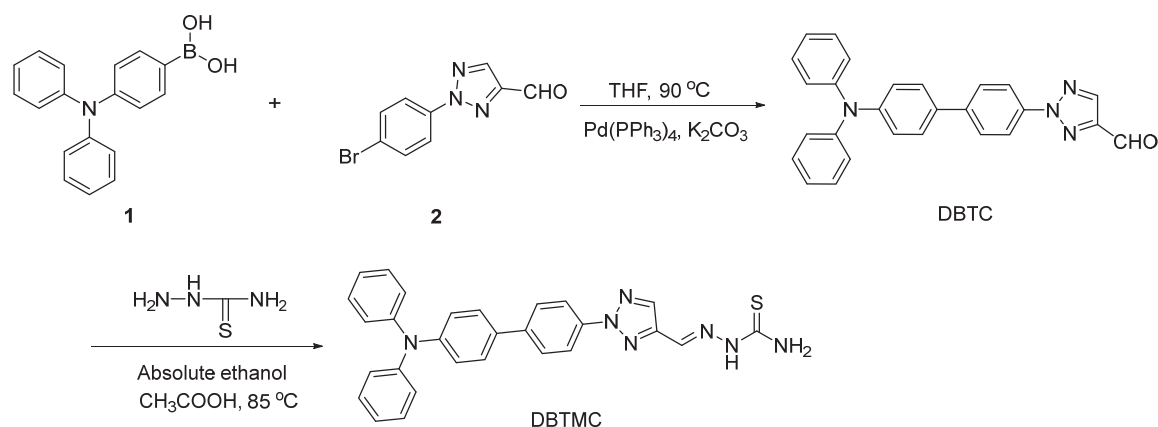
1 结果与讨论

1.1 探针 DBTMC 的合成

探针分子 DBTMC 的合成路线如 Scheme 1 所示. 以 2-(4-溴苯基)-2*H*-1,2,3-三唑-4-甲醛与(4-(二苯基氨基)苯基)硼酸为原料,通过 Suzuki 偶联反应制得 2-(4'-(二苯基氨基)-[1,1'-联苯]-4-基)-2*H*-1,2,3-三唑-4-甲醛(DBTC),然后再以中间体 DBTC 和氨基硫脲为原料,通过醛胺缩合反应得到探针分子 *N'*-((2-(4'-(二苯胺基)-[1,1'-联苯]-4-基)-2*H*-1,2,3-三唑-4-基)亚甲基)胍-1-硫代酰胺(DBTMC),其结构经过 FT-IR、¹H NMR、¹³C NMR 和 HRMS 得以确证.

1.2 探针 DBTMC 的溶剂效应

将 DBTMC 分别溶于乙酸乙酯、四氢呋喃(THF)、丙酮、*N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)及二甲基亚砜(DMSO)等不同溶剂中,测定其紫外吸收光谱和荧光发射光谱. 从图 1a 和表 1 可知,随着溶剂极性的增大,DBTMC 的紫外最大吸收波长由 355 nm 变化到 362 nm,有细微的变化,这可能是由 DBTMC 的分子内电荷(ICT)转移导致的^[34-35]. 另外,随着溶剂极性的增加,DBTMC 的最大发射波长从 450 nm 红移至 515 nm(图 1b),这主要是因



图式 1 探针分子 DBTMC 的合成路线
Scheme 1 Synthetic route of probe DBTMC

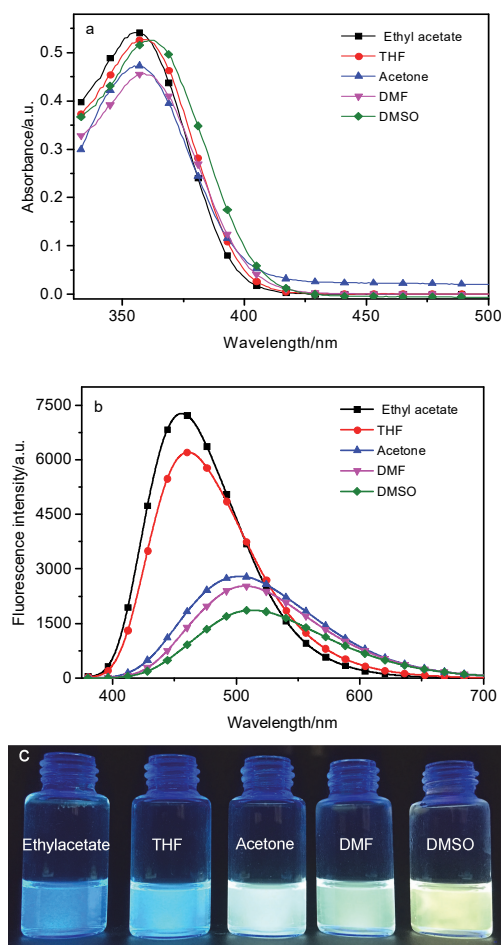


图1 DBTMC在乙酸乙酯、THF、丙酮、DMF和DMSO中的(a)紫外吸收光谱和(b)荧光发射光谱,以及(c)在365 nm紫外灯照射下拍摄的照片

Figure 1 (a) UV absorption spectrum and (b) fluorescence emission spectrum of DBTMC in ethylacetate, THF, acetone, DMF, DMSO, and (c) photos taken under the irradiation of a 365 nm UV lamp

DBTMC: 1.0×10^{-5} mol/L; excitation wavelength: 365 nm; slit: 5 nm $\times$ 5 nm

表1 探针 DBTMC 在不同溶剂中的光学性质(λ_{abs} , 最大吸收量; λ_{em} , 最大发射量)

Table 1 Optical characteristics of DBTMC in different solvents (λ_{abs} , absorption maximum; λ_{em} , emission maximum)

DBTMC	$\lambda_{\text{abs}}/\text{nm}$	$\lambda_{\text{em}}/\text{nm}$	Strength	Stokes shift/ cm^{-1}
Ethyl acetate	355	456	7268	6239.2
THF	358	460	6201	6193.8
Acetone	357	502	2795	8090.9
DMF	359	506	2529	8092.3
DMSO	362	513	1869	8131.1

为 DBTMC 受到激发时发生 π - π^* 跃迁, 激发态具有比基态更大的极性, 溶剂极性的增大对激发态的稳定作用越明显。所以, 随着溶剂极性的增大, 最大荧光发射波长发生红移。其次, 由于扭曲的分子内电荷转移(TICT)状态对各种非辐射猝灭过程的敏感性, 溶剂极性的增加会

导致 DBTMC 荧光强度显著降低。此外, 从图 1c 可知, 在 365 nm 紫外灯照射下, DBTMC 在不同极性的溶剂中, 光从青蓝光到黄光, 发生了明显的红移现象。

1.3 探针 DBTMC 的聚集态效应

通过测定 DBTMC 在 THF 和水的混合溶液中的紫外吸收和荧光发射光谱, 研究了其聚集态效应(图 2a, 2b)。如图 2b 所示, 当水体积分数低于 70% 时, DBTMC 溶液的荧光强度随着混合溶剂中含水量的升高而显著降低, 且最大发射波长从 450 nm 变为 415 nm, 发生了明显的蓝移, 这主要是由于随着混合溶剂中水含量的增加, 探针 DBTMC 在溶剂中逐渐分散所导致的。而当水体积分数为 80% 时, 探针 DBTMC 溶液的荧光强度突然增强, 并伴随最大发射波长从 415 nm 红移至 505 nm, 这可能是由于分子内电荷转移与分子内氢键一起作为非共价键构象, 限制了探针分子内旋转过程, 导致其荧

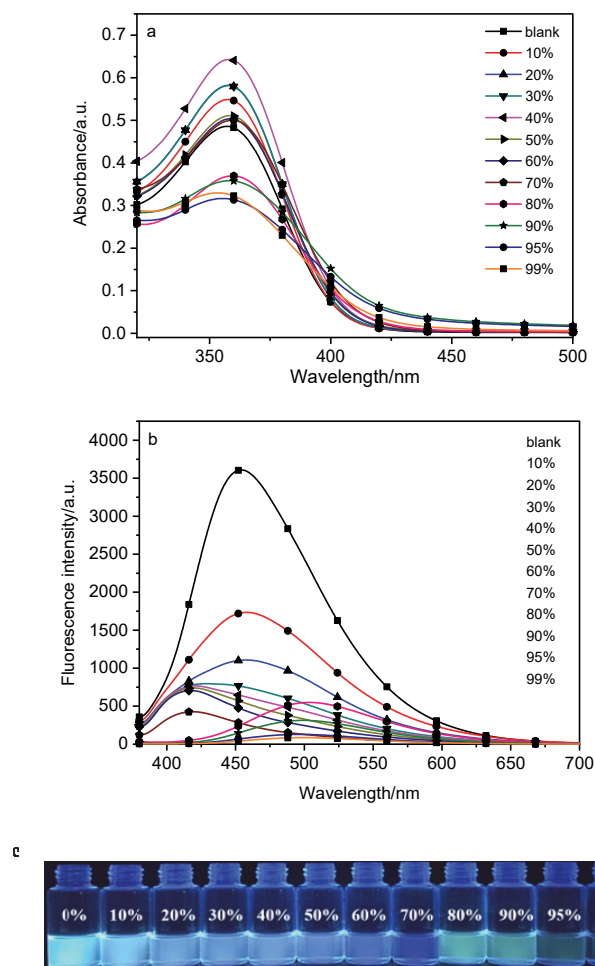


图2 DBTMC在不同比例 THF/H₂O 的混合液中的紫外光谱(a)和荧光光谱(b)及(c)在紫外灯 365 nm 下的照片

Figure 2 (a) Ultraviolet spectra and (b) fluorescence spectra of DBTMC in mixture of THF and water and (c) photos taken under UV lamp (365 nm)

DBTMC: 1.0×10^{-5} mol/L; excitation wavelength 365 nm; slit: 5 nm $\times$ 5 nm; blank indicates the fluorescence intensity of DBTMC in pure THF

光增强^[40]. 如果含水量继续增加, 则 DBTMC 溶液的荧光强度再一次逐渐下降, 这很可能是随着水含量的继续增多, DBTMC 的自猝灭效应逐渐凸显, 导致其荧光强度再次下降. 在 365 nm 紫外灯下也可看到上述荧光的变化情况(图 2c).

1.4 测量条件的选择

在检测 Cu^{2+} 时发现, Ag^+ 和 Hg^{2+} 的存在会对 Cu^{2+} 的检测产生干扰, 因此对测试条件进行了筛选. 首先是混合溶剂中 THF/ H_2O 比例, 如图 3a 所示, 当水与 THF 的体积比为 8:2 时, 分别加入 Ag^+ 和 Hg^{2+} 后, DBTMC 出现了最明显的荧光猝灭现象. 其次, 为了消除 Hg^{2+} 和 Ag^+ 的干扰, 选择半胱氨酸(Cys)作为掩蔽剂. 在混合溶剂中加入 DBTMC, 再加入掩蔽 Cys, 充分混合均匀后再加入 Hg^{2+} 和 Ag^+ , 其结果如图 3b 所示. 从图中可以看到, DBTMC 的荧光没有发生明显变化, 而加入 Cu^{2+} 后 DBTMC 的荧光急剧猝灭. 结果说明 Cys 对 Hg^{2+} 和 Ag^+ 具有良好的屏蔽效果.

随后考察了 DBTMC 检测 Cu^{2+} 时的响应时间, 结果

如图 3c 所示. 从图中可知, 当 Cu^{2+} 与 DBTMC 作用 5 s 时, 荧光猝灭现象特别明显, 而当作用时间延长到 45 s 时, 荧光强度变化并不显著. 由此可知, 在 5 s 时 DBTMC 与 Cu^{2+} 就已经作用完全, 从而证实 DBTMC 可以作为一种迅速检测 Cu^{2+} 的荧光探针.

最后, 考察了 pH 对 DBTMC 及其络合物荧光性能的影响, 结果如图 3d. 从图中可知, 在 pH 为 3~8 时, DBTMC 及其络合物的荧光都比较稳定, 而生物体系的 pH 在 7.4 左右. 为了能更好地将其应用于生物体系, 本实验选择 pH=7.4.

综上所述, 筛选的最佳检测条件是: THF/ H_2O ($V:V=2:8$, 5 mmol/L, PBS, pH=7.4, Cys: 3 mmol/L), DBTMC 与 Cu^{2+} 的作用时间为 5 s.

1.5 探针 DBTMC 对 Cu^{2+} 的选择性和竞争性

在 DBTMC (1×10^{-5} mol/L) 的 THF/ H_2O ($V:V=2:8$, 5 mmol/L, PBS, pH=7.4, Cys: 3 mmol/L) 体系中, 分别加入 1.0×10^{-4} mol/L 的 Cu^{2+} 及其它常见的金属离子(Ag^+ , Al^{3+} , Ba^{2+} , Ca^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Cr^{3+} , Fe^{3+} , Hg^{2+} ,

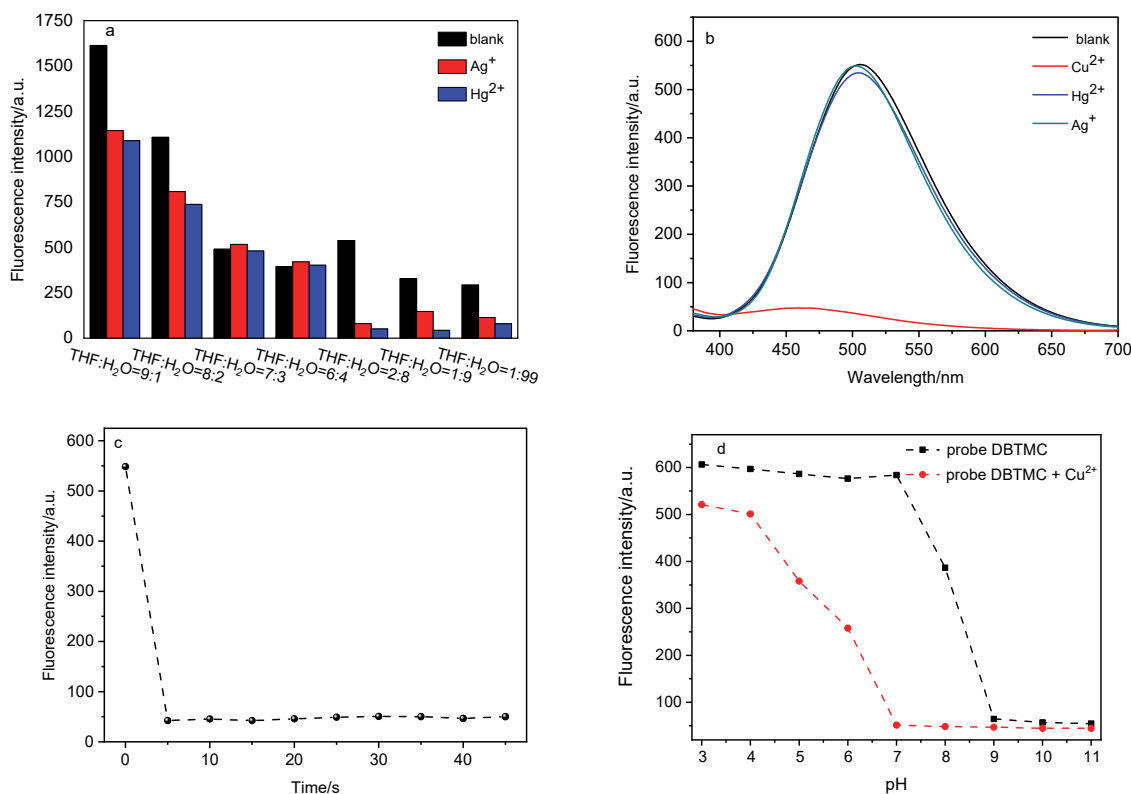


图 3 (a) DBTMC 在不同 THF/ H_2O 体积比下的 [DBTMC]、[DBTMC+ Ag^+] 和 [DBTMC+ Hg^{2+}] 的荧光强度柱状图、(b) 在 DBTMC 的 THF/ H_2O ($V:V=2:8$, 5 mmol/L, PBS, pH=7.4) 混合溶剂中加入 Cys 后对阳离子 Cu^{2+} 、 Hg^{2+} 和 Ag^+ 响应的荧光光谱图、(c) DBTMC 与 Cu^{2+} 的反应时间以及 (d) 在不同 pH 条件下 DBTMC 和 [DBTMC+ Cu^{2+}] 的荧光折线图

Figure 3 (a) Histogram of fluorescence intensity of [DBTMC], [DBTMC+ Ag^+], [DBTMC+ Hg^{2+}] of DBTMC at different THF/ H_2O ratios, (b) fluorescence spectrum of the response of DMTH to Cu^{2+} , Hg^{2+} and Ag^+ after adding Cys to a mixed THF/ H_2O ($V:V=2:8$, 5 mmol/L, PBS, pH=7.4) solvent of DBTMC, (c) reaction time of DBTMC and Cu^{2+} , and (d) fluorescence intensities of DBTMC, [DBTMC+ Cu^{2+}] under different pH conditions

Blank indicates the fluorescence intensity of DBTMC in different ratios of THF/ H_2O

K^+ , Mg^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+}), 阴离子(F^- , SCN^- , Cl^- , CO_3^{2-} , S^{2-} , $H_2PO_4^-$, HPO_4^{2-} , HCO_3^- , NO_3^- , SO_4^{2-} , HS^- , HSO_3^- , Ac^- , $S_2O_3^{2-}$, ClO^- , PO_4^{3-}), 并记录其紫外吸收光谱和荧光发射光谱, 以探究探针对目标离子的专一性识别性能, 结果如图 4 所示. 从图 4a 可知, 加入 Cu^{2+} 及其它金属离子、阴离子的紫外吸收光谱并没有太大差异, 而从图 4b 的荧光发射光谱可知, 只有加入 Cu^{2+} 时, 混合溶液在 502 nm 处出现了明显的荧光猝灭, 猝灭幅度约 15 倍, 而在加入其它金属离子、阴离子时, DBTMC 的荧光强度均未发生明显变化. 以上实验结果表明, 探针 DBTMC 对 Cu^{2+} 具有良好的专一选择识别性能.

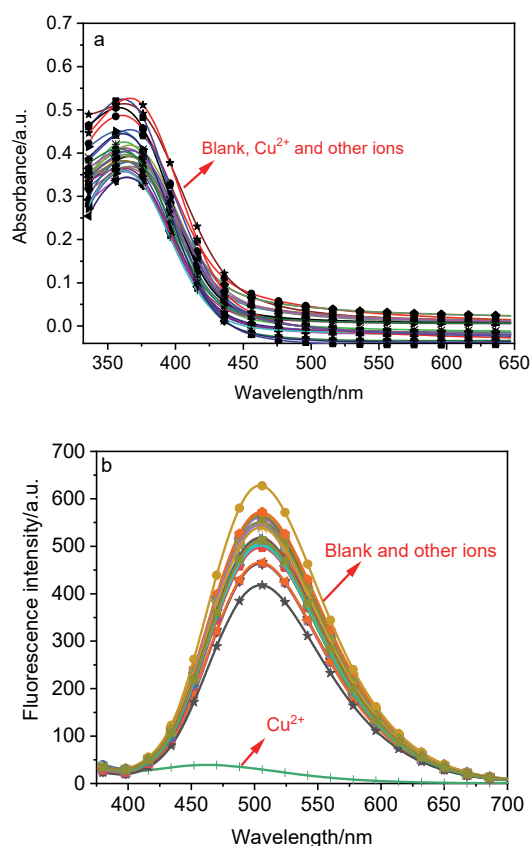


图 4 DBTMC (1×10^{-5} mol/L) 在 THF/H₂O ($V:V=2:8$, 5 mmol/L, PBS, pH=7.4, Cys: 3 mmol/L) 溶液中对不同离子 (1×10^{-4} mol/L) 的 (a) 紫外-可见吸收光谱和 (b) 荧光光谱

Figure 4 (a) UV absorption and (b) fluorescence spectrum of DBTMC response to different ions (1×10^{-4} mol/L) in a mixed solvent of THF/H₂O ($V:V=2:8$, 5 mmol/L, PBS, pH=7.4, Cys: 3 mmol/L)

在 DBTMC (1×10^{-5} mol/L) 的 THF/H₂O ($V:V=2:8$, 5 mmol/L, PBS, pH=7.4, Cys: 3 mmol/L) 溶液体系中先分别加入浓度为 1×10^{-4} mol/L 的常见金属离子 (Ag^+ , Al^{3+} , Ba^{2+} , Ca^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Cr^{3+} , Fe^{3+} , Hg^{2+} , K^+ , Mg^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+}), 阴离子(F^- , SCN^- , Cl^- , CO_3^{2-} ,

S^{2-} , $H_2PO_4^-$, HPO_4^{2-} , HCO_3^- , NO_3^- , SO_4^{2-} , HS^- , HSO_3^- , Ac^- , $S_2O_3^{2-}$, ClO^- , PO_4^{3-}), 测定其荧光光谱, 以探究 DBTMC 对 Cu^{2+} 与其它离子的竞争性, 结果如图 5 所示. 从图中可知, 加入其它离子时 DBTMC 均未发生荧光猝灭现象, 而加入 Cu^{2+} (1×10^{-4} mol/L) 时出现明显的荧光猝灭现象. 上述结果表明其它离子的存在 (包括 Hg^{2+} 和 Ag^+), 并不会对 Cu^{2+} 的检测产生干扰, 因此 DBTMC 检测 Cu^{2+} 具有优异的选择性和抗干扰能力.

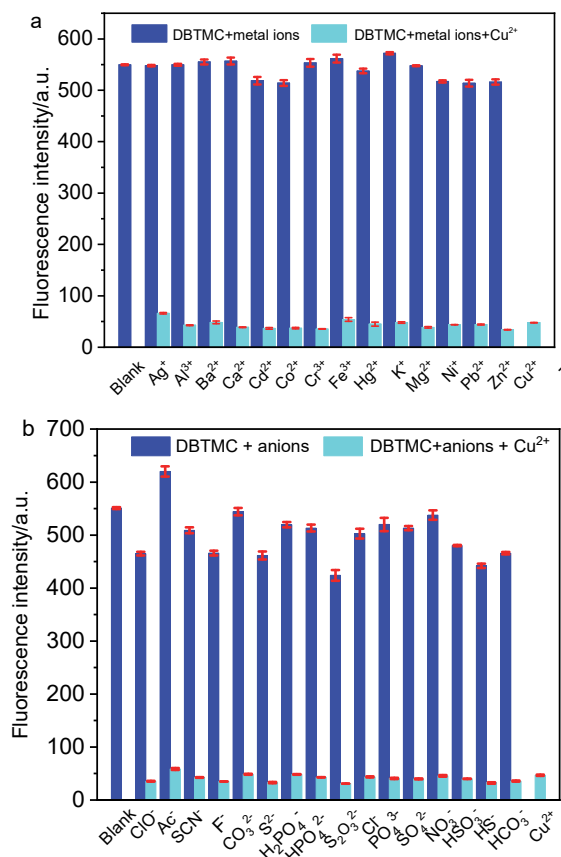


图 5 在混合溶剂 THF/H₂O ($V:V=2:8$, 5 mmol/L, PBS, pH=7.4, Cys: 3 mmol/L) 中存在各种离子时探针 DBTMC 对 Cu^{2+} 响应的荧光强度柱状图

Figure 5 Fluorescent bar graph of probe DBTMC responding to Cu^{2+} in the presence of various ions in THF/H₂O ($V:V=2:8$, 5 mmol/L, PBS, pH=7.4, Cys: 3 mmol/L)

1.6 探针 DBTMC 的荧光滴定实验

为了探究探针 DBTMC 对 Cu^{2+} 检测的灵敏性, 测定了不同浓度的 Cu^{2+} ($0 \sim 2 \times 10^{-6}$ mol/L) 的荧光光谱图. 如图 6a 所示, 在探针 DBTMC 溶液中加入浓度逐渐增大的 Cu^{2+} , DBTMC 在 502 nm 处的荧光强度逐渐降低. 从图 6b 中可以看到, 在 $1 \times 10^{-7} \sim 3 \times 10^{-7}$ mol/L 范围内, Cu^{2+} 的浓度与 DBTMC 的荧光强度有着良好的线性关系, 线性相关系数为 $R^2=0.9966$. 依据 3σ 法则^[38-39] 得出 DBTMC 对 Cu^{2+} 的检出下限 (LOD) 为 4.48×10^{-8} mol/L.

较低的检测限和良好的线性相关性表明探针 DBTMC 可以定性和定量检测 Cu^{2+} .

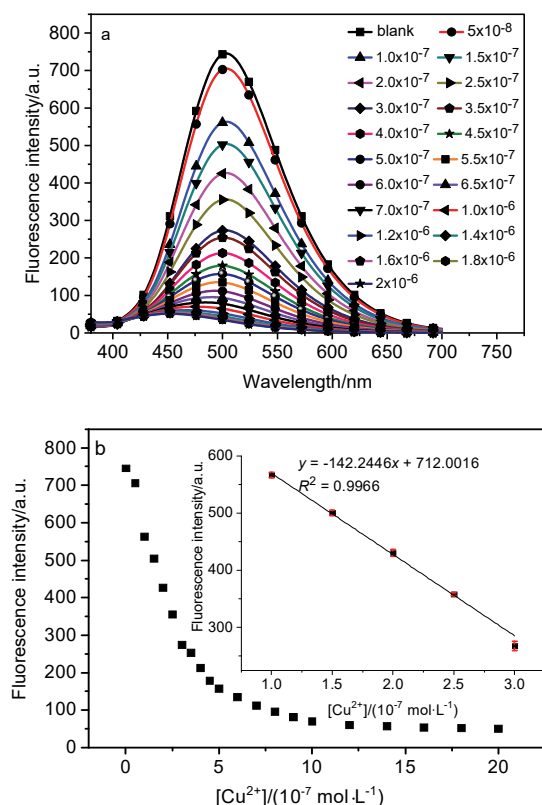


图6 (a) 在 502 nm 处 DBTMC (10 $\mu\text{mol/L}$) 在含有不同浓度的 Cu^{2+} (0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3, 0.35, 0.4, 0.45, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8, 2.0 $\mu\text{mol/L}$) 的 THF/ H_2O ($V:V=2:8$, 5 mmol/L, PBS, pH=7.4, Cys: 3 mmol/L) 中的荧光光谱图和 (b) DBTMC (10 $\mu\text{mol/L}$) 对 502 nm 处不同浓度的 Cu^{2+} 的荧光响应的点状图

Figure 6 (a) Fluorescence spectra of DBTMC (10 $\mu\text{mol/L}$) in THF/ H_2O ($V:V=2:8$, 5 mmol/L, PBS, pH=7.4, Cys: 3 mmol/L) toward varying concentrations of Cu^{2+} (0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3, 0.35, 0.4, 0.45, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8, 2.0 $\mu\text{mol/L}$) at 502 nm, and (b) dot diagram of the fluorescence responses of DBTMC (10 $\mu\text{mol/L}$) toward varying concentrations of Cu^{2+} at 502 nm

Inset: linear fitting curve between DBTMC fluorescence intensity and Cu^{2+} concentration between 0.1~0.3 $\mu\text{mol/L}$.

1.7 探针 DBTMC 对 Cu^{2+} 的识别机理探究

在 DBTMC 和 Cu^{2+} 之间相互作用机理的研究中, 先进行了 job's 曲线的测定, 保持 DBTMC 和 Cu^{2+} 在 THF/ H_2O ($V:V=2:8$, 5 mmol/L, PBS, pH=7.4, Cys: 3 mmol/L) 中的总浓度为 1.0×10^{-4} mol/L, 然后分别改变 DBTMC 和 Cu^{2+} 的浓度进行荧光光谱的测定, 拐点的位置对应的横坐标的值为 0.5, 因此推测探针 DBTMC 和 Cu^{2+} 之间的络合比为 1:1. 为了进一步探究 DBTMC 和 Cu^{2+} 之间相互作用的机理, 进行了核磁滴定实验, 如图 7 所示. 从 DBTMC 的氢谱中可知亚胺基上的 H_b 的化学

位移出现 δ 11.68 处, $\text{CH}=\text{N}$ 上的 H_a 的化学位移出现在 δ 8.66 处. 当 1 equiv. Cu^{2+} 加入到 DBTMC 的 DMSO- d_6 溶液中, 亚胺基上的 H_b 峰在 δ 11.68 处消失, $\text{CH}=\text{N}$ 上的 H_a 在 δ 8.66 (H_{a1}) 产生了裂分. 通过 job's 曲线、核磁滴定和相关文献^[39], 推测出 DBTMC 与 Cu^{2+} 最可能的作用机理如 Scheme 2 所示. 又通过高分辨质谱对以上机理进行了验证, 络合产物 $[\text{DBTMC} + \text{Cu}^{2+} + \text{CH}_3\text{OH}]^+$ 的分子离子峰位于 δ 584.1296 处.

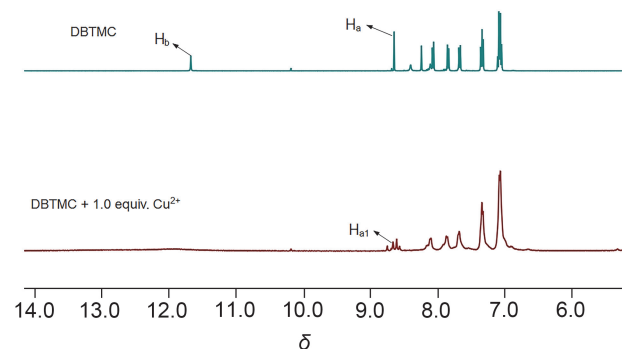
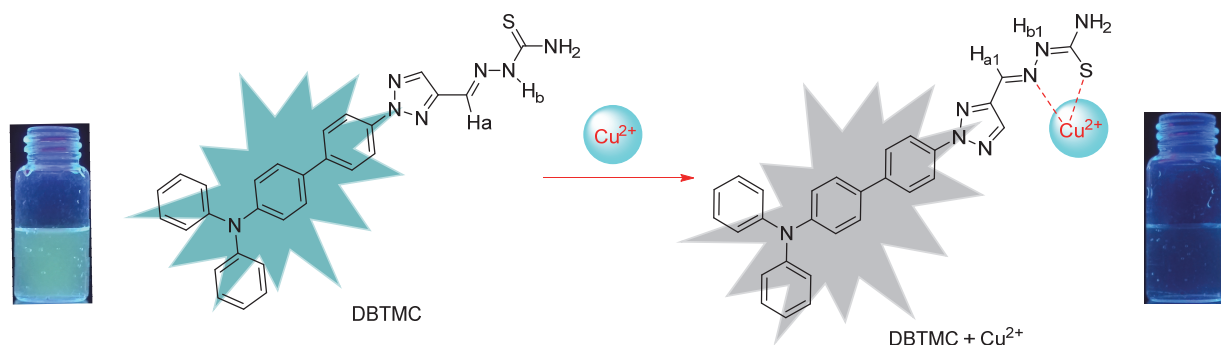
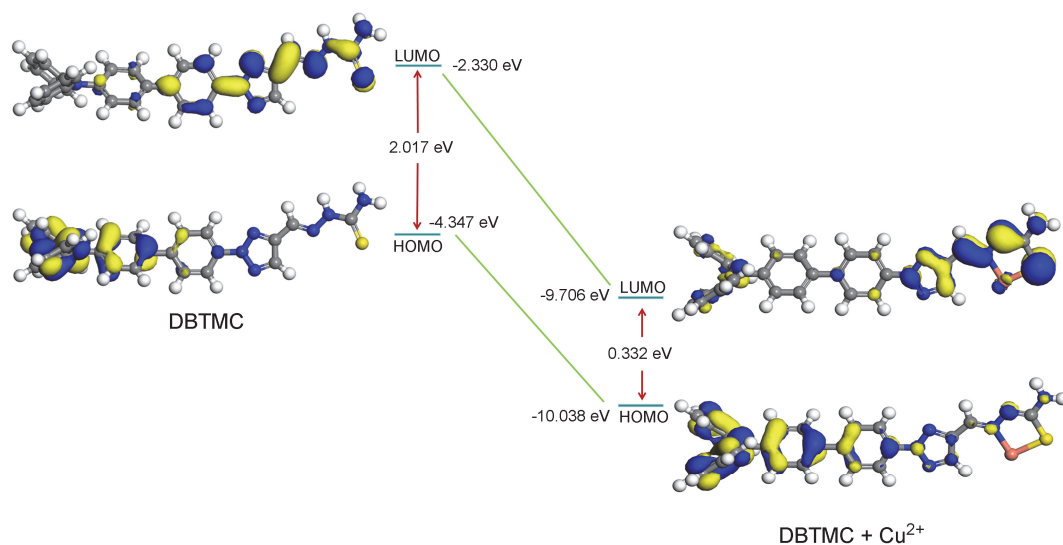


图7 探针 DBTMC 加入 Cu^{2+} 的核磁滴定图
Figure 7 ^1H NMR titration of DBTMC after adding Cu^{2+} in DMSO- d_6

为了更深入地了解探针 DBTMC 与 Cu^{2+} 产生荧光猝灭的响应机制, 通过密度泛函理论(DFT)计算优化了探针 DBTMC 及其与 Cu^{2+} 络合形成的络合物的结构(图 8). 由图 8 可知, DBTMC 及 DBTMC+ Cu^{2+} 的激发过程伴随着明显的由电子供体三苯胺向电子受体三唑及氨基硫脲的分子内电荷转移过程, HOMO 轨道与 LUMO 轨道的能差为 2.017 eV. 与 DBTMC 的激发过程类似, DBTMC+ Cu^{2+} 的激发过程也伴随着明显的由电子供体三苯胺向电子受体三唑及氨基硫脲的分子内电荷转移过程, 然而其最高占据分子轨道(HOMO)与最低未占分子轨道(LUMO)之间的能级差相对未配位 Cu^{2+} 之前明显降低, 为 0.332 eV. 根据实验结果可知, 与未与 Cu^{2+} 配位的 DBTMC 的 E_{gap} 相比, DBTMC+ Cu^{2+} 的 E_{gap} 值明显变小了, 说明 Cu^{2+} 的配位使得 DBTMC+ Cu^{2+} 的分子内电荷转移激发态相对探针 DBTMC 的分子内电荷转移激发态更加稳定^[38]. 而电荷转移激发态一般随着激发能减小表现出明显的猝灭效应, 因而 DBTMC 与 Cu^{2+} 配位形成的 DBTMC+ Cu^{2+} 表现出明显的荧光猝灭效果, 这与实验中所观察到的现象, 即当 Cu^{2+} 加入到 DBTMC 溶液中导致 DBTMC 表现出的荧光猝灭现象一致, 也是 DBTMC 能够对 Cu^{2+} 产生荧光猝灭响应的根本原因. DFT 计算结果进一步验证了图 8 中 DBTMC 和 Cu^{2+} 的作用机理.

图式 2 DBTMC 检测 Cu^{2+} 的可能的机理Scheme 2 Proposed plausible mechanisms for detection of Cu^{2+} by DBTMC图 8 DBTMC 和 $\text{DBTMC} + \text{Cu}^{2+}$ 的优化结构及前沿分子轨道结构和能带的电子密度图Figure 8 Optimized structures of DBTMC and $\text{DBTMC} + \text{Cu}^{2+}$ and electron density maps of frontier molecular orbital structures and band gap energies of probe

1.8 测试条应用

用 DBTMC 溶液制备测试条对 Cu^{2+} 进行检测来探究其潜在的实际应用价值. 首先, 将滤纸浸泡到 DBTMC (1.0×10^{-5} mol/L) 的 THF/ H_2O ($V:V=2:8$, 5 mmol/L, PBS, pH=7.4, Cys: 3 mmol/L) 溶液中, 在空气中自然干燥制备测试条. 然后, 将浓度均为 1.0×10^{-4} mol/L 的不同金属离子 (Hg^{2+} , Ag^+ , Ba^{2+} , Ca^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Cr^{3+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Al^{3+} , K^+ , Mg^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} 和 Zn^{2+}) 溶液滴加在干燥的 DBTMC 测试条上, 观察实验现象. 从图 9 可以看出, 自然光下, 不同金属离子滴加到测试条上, 基本没有变化. 然而在 365 nm 紫外灯下, 只有滴加 Cu^{2+} 的测试条发生了荧光猝灭现象, 滴加其它离子的测试条没有这种变化. 实验结果表明用探针 DBTMC 溶液制备的测试条可用于 Cu^{2+} 的快速检测.

1.9 探针 DBTMC 毒性测试和细胞成像

探针细胞的毒副作用是限制探针应用于生物细

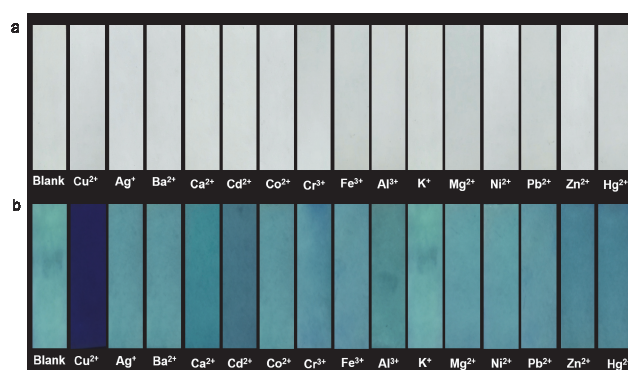


图 9 (a)日光和(b)紫外灯(365 nm)下添加不同金属离子后测试条的荧光变化

Figure 9 Change of the fluorescent of the test strip after adding different metal ions under (a) the sunlight and (b) UV lamp (365 nm)

胞的重要因素. 为此本实验通过噻唑蓝(MTT)法来确定 DBTMC 对细胞的毒性. 实验中将 HeLa 细胞分别用 0、

5、10、15、20 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的 DBTMC 处理 24 h. 在 20 $\mu\text{mol/L}$ DBTMC 浓度下, 细胞活力依然保持在 90% 以上, 这表明 DBTMC 对细胞的毒性较低, 适合用于细胞成像(图 10). 为了进一步研究探针 DBTMC 在活细胞中检测 Cu^{2+} 的可行性, 向 HeLa 细胞中加入探针 DBTMC (10 $\mu\text{mol/L}$), 然后用不同浓度的 Cu^{2+} 处理 HeLa 细胞 30 min. 从图 11 可以看出, 随着 Cu^{2+} 浓度的逐渐增加 HeLa 细胞的荧光逐渐减弱, 表现出明显的荧光猝灭现象. 实验结果表明, DBTMC 可应用于检测 HeLa 细胞中的 Cu^{2+} . 另外也进行了斑马鱼实验, 实验结果说明 DBTMC 也可用于检测斑马鱼中的 Cu^{2+} .

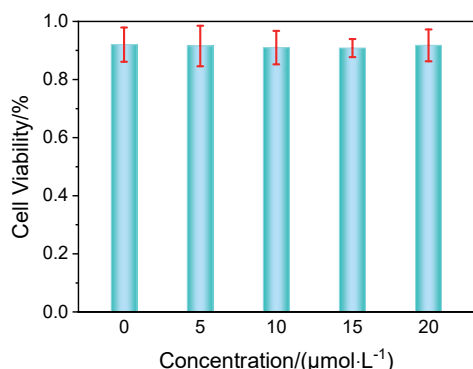


图 10 探针 DBTMC 对 HeLa 细胞在不同浓度下的细胞毒性测定

Figure 10 Cytotoxicity assay of probe DBTMC for HeLa cells at different concentrations

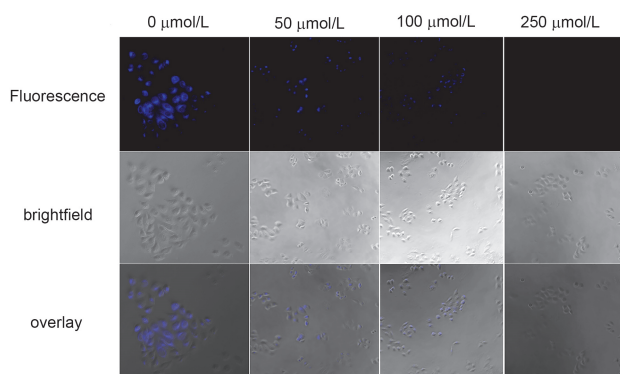


图 11 HeLa 细胞与 DBTMC (10 $\mu\text{mol/L}$) 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 30 min, 随后与 Cu^{2+} (0, 50, 100, 250 $\mu\text{mol/L}$) 培养 30 min 后的荧光图像(最上)、明场图像(中间)和叠加图像(最下) (激发波长 365 nm)

Figure 11 Fluorescence image (top), brightfield image (middle), and overlay image (bottom) of (excitation wavelength 365 nm) of HeLa cells after cultured with DBTMC (10 $\mu\text{mol/L}$) for 30 min, and then with Cu^{2+} (0, 50, 100, 250 $\mu\text{mol/L}$) for 30 min under 37 $^{\circ}\text{C}$

1.10 探针 DBTMC 的对比

在表 2 中, 将探针 DBTMC 和文献报道的探针做了

比较. 通过对比发现探针 DBTMC 有一定的优势, 不仅对 Cu^{2+} 有快的响应时间和较低的检测线, 而且具有良好的溶剂效应和聚集态效应, 还可应用于活体细胞中 Cu^{2+} 的检测. 说明探针 DBTMC 在分析、环境和生物领域具有潜在的应用价值.

2 结论

设计合成了一种新型的荧光探针 DBTMC, 并对其结构进行了确证. DBTMC 具有良好的溶剂效应和聚集态效应, 能在 THF/ H_2O ($V:V=1:4$, 5 mmol/L, PBS, pH=7.4, Cys: 3 mmol/L) 缓冲体系中高选择性地识别 Cu^{2+} , 具有快速响应和很好的抗干扰能力, 检测限为 4.48×10^{-8} mol/L. 通过核磁滴定、高分辨质谱及 DFT 计算对其络合机理进行了阐述. 实验表明, 探针 DBTMC 制备的测试条, 可快速用于 Cu^{2+} 的检测, 并且具有良好的生物相容性, 可应用于 HeLa 细胞中 Cu^{2+} 的检测, 在分析、环境和生物学上具有潜在的应用价值.

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

X-4 数字显微熔点测定仪(北京泰克仪器有限责任公司); Broker AV-400MHz 核磁共振仪(美国 Bruker 公司); UV-6000pc 紫外-可见分光光度计(上海元析仪器有限公司); F-320 荧光分光光度计(天津港东科技公司); Spark 10M 酶标仪(瑞士帝肯公司).

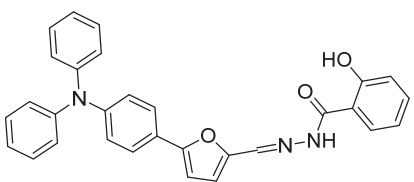
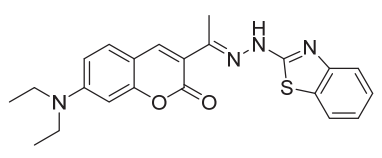
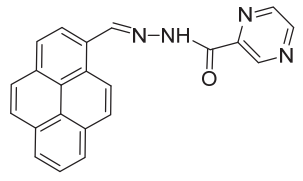
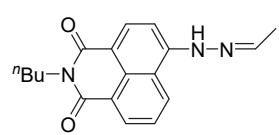
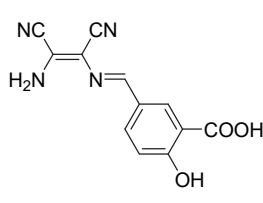
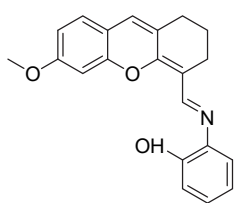
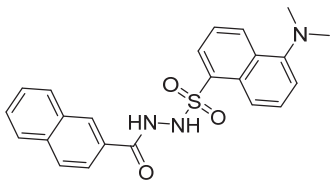
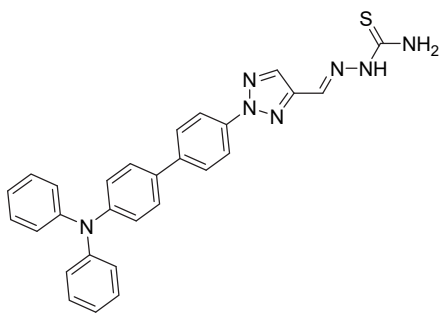
本实验中的药品和试剂无需进一步纯化. 2-(4-溴苯基)-2H-1,2,3-三唑-4-甲醛、(4-(二苯基氨基)苯基)硼酸、氨基硫脲和四三苯基磷钼均购自上海泰坦科技股份有限公司, 均为分析纯; 其它药品和试剂均购自成都科隆试剂有限公司, 均为分析纯. 实验用水均为去离子水.

3.2 实验方法

3.2.1 2-(4'-(二苯基氨基)-[1,1'-联苯]-4-基)-2H-1,2,3-三唑-4-甲醛(DBTC)的合成

将 252 mg (1.0 mmol) 2-(4-溴苯基)-2H-1,2,3-三唑-4-甲醛、10.0 mL 的 5 mol/L 无水碳酸钾水溶液和 35 mg (3.0 mmol) 四三苯基磷钼催化剂加入到盛有 18.0 mL THF 的圆底烧瓶中, 氮气保护, 在 75 $^{\circ}\text{C}$ 下, 搅拌回流 30 min. 再向上述反应体系中加入 258.0 mg (10.0 mL, 1.5 mmol) (4-(二苯基氨基)苯基)硼酸, 继续在 90 $^{\circ}\text{C}$ 下, 搅拌回流 8 h. 反应完全后, 先加入适量饱和食盐水破乳, 再以二氯甲烷萃取, 蒸除有机相溶剂得到粗产物. 以石油醚/乙酸乙酯($V:V=20:1$)为洗脱剂, 通过柱色谱对粗产物纯化得到 269 mg 黄色晶体 DBTC, 产率 65%. m.p. 196~198 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 10.23 (s, 1H), 8.28 (s, 1H), 8.18 (d, $J=8.9$ Hz, 2H),

表2 探针 DBTMC 与其它已报道的 Cu²⁺ 探针的比较
Table 2 Comparison of probe DBTMC with other Cu²⁺ probes reported

Probe	Solvent (<i>V</i> : <i>V</i>)	LOD/(mol·L ⁻¹)	ICT	AIE	pH	Time	Cell	Ref.
	C ₂ H ₅ OH/H ₂ O (2 : 3)	9.80 × 10 ⁻⁸	ICT	—	7	10 s	—	[38]
	CH ₃ CN/H ₂ O (1 : 1)	5.80 × 10 ⁻⁸	—	—	7.2	1 h	MCF-7 cells	[41]
	ACN/PBS (4 : 6)	1.57 × 10 ⁻⁷	—	—	7.4	—	Hela cells	[42]
	CH ₃ CN/HEPES (4 : 1)	3.20 × 10 ⁻⁷	—	—	7.4	20 min	293 T cells	[3]
	CH ₃ CN/HEPES (1 : 9)	2.19 × 10 ⁻⁷	—	—	7.0	11 min	HepG2 cells	[43]
	CH ₃ CN/HEPES (4 : 1)	3.30 × 10 ⁻⁵	—	—	7.3	—	HepG2 cells	[44]
	CH ₃ CN	1.80 × 10 ⁻⁷	—	—	—	—	—	[45]
	THF/H ₂ O (1 : 4)	4.48 × 10 ⁻⁸	ICT	AIE	7.4	5 s	Hela cells	This work

7.72 (d, $J=8.9$ Hz, 2H), 7.51 (d, $J=8.7$ Hz, 2H), 7.29 (dd, $J=8.5, 7.3$ Hz, 4H), 7.18~7.13 (m, 6H), 7.06 (t, $J=7.3$ Hz, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ : 119.88, 123.29, 123.56, 124.70, 127.48, 127.72, 129.39, 133.10, 135.53, 137.91, 141.35, 147.50, 147.84, 184.21; HRMS calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{19}\text{N}_4\text{O}$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ 415.1553, found 415.1548.

3.2.2 N' -(2-(4-(二苯氨基)-[1,1'-联苯]-4-基)-2H-1,2,3-三唑-4-基)亚甲基胍-1-硫代酰胺(DBTMC)的合成

称取 91 mg (1 mmol)氨基硫脲和 416 mg (1 mmol) DBTC, 并将其加入到装有 10 mL 无水乙醇的圆底烧瓶中, 再加入 0.5 mL 冰乙酸, 加热回流 3 h, 待冷却至室温后过滤, 将滤渣用无水乙醇重结晶得到淡黄色固体 DBTMC, 产率 75%. m.p. 183~184 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 11.68 (s, 1H), 8.65 (s, 1H), 8.25 (s, 1H), 8.09~8.05 (m, 2H), 7.88~7.82 (m, 2H), 7.71~7.65 (m, 2H), 7.38~7.30 (m, 5H), 7.08 (dddd, $J=8.7, 7.5, 6.1, 1.6$ Hz, 9H); ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 178.78, 147.61, 147.42, 146.45, 139.45, 138.13, 135.03, 132.92, 132.79, 130.09, 128.03, 127.69, 124.78, 123.87, 123.54, 119.30; HRMS calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{22}\text{N}_7\text{S}$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ 488.1657, found 488.1661.

3.2.3 细胞成像

将 HeLa 细胞在补充有体积分数为 10% 的胎牛血清的 DMEM(含各种氨基酸和葡萄糖的培养基)培养基中培养, 并在体积分数为 5% 的 CO_2 恒温培养箱中于 37 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 24 h. 然后用磷酸盐缓冲(PBS)溶液洗涤细胞 3 次. 将细胞分为两组, 分别进行如下处理: 第一组仅用探针 DBTMC (10 $\mu\text{mol/L}$)培养 10 min; 第二组用探针 DBTMC (10 $\mu\text{mol/L}$)培养 10 min, 再用 Cu^{2+} (0、50、100、250 $\mu\text{mol/L}$)培养 1 h. 在成像之前将两组中的这些细胞用 PBS 溶液洗涤 3 次. 其中, 细胞成像实验中激光共聚焦的入射波长是 365 nm, 收集的发射光谱范围是 450~550 nm.

辅助材料(Supporting Information) 实验中部分光谱图、中间体 DBTC 及探针 DBTMC 的结构表征以及斑马鱼实验等数据. 这些材料可以免费从本刊网站(<http://sioc-journal.cn/>)上下载.

References

- [1] Hanif, M.; Rafiq, M.; Saleem, M.; Mustaqeem, M.; Jamil, S.; Janjua, M. J. *Chin. Chem. Soc.* **2018**, *66*, 500.
- [2] Li, Y.; Gu, Z.-Y.; He, T.; Yuan, X.-C.; Zhang, Y.-Y.; Xu, Z.; Qiu, H.-Y.; Zhang, Q.; Yin, S.-C. *Dyes Pigm.* **2020**, *173*, 107969.
- [3] Fu, Y.; Pang, X.-X.; Wang, Z.-Q.; Chai, Q.; Ye, F. *Spectrochim. Acta, Part A* **2019**, *208*, 198.

- [4] Qu, Q.; Zhu, A.-W.; Shao, X.-L.; Shi, G.-Y.; Tian, Y. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 5473.
- [5] 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.)
- [6] Ghule, N. V.; Bhosale, R. S.; Puyad, A. L.; Bhosale, S. V.; Bhosale, S. V. *Sens. Actuators, B* **2021**, *338*, 129734.
- [7] Wang, X.-Y.; Li, Z.; Nie, J.-J.; Wu, L.-Q.; Chen, W.-H.; Qi, S. L.; Xu, H.; Du, J. S.; Shan, Y. M.; Yang, Q. B. *RSC Adv.* **2021**, *11*, 10264.
- [8] Murakami, T. N.; Koumura, N. *Adv. Energy Mater.* **2019**, *9*, 1802967.
- [9] Zhang, C.-C.; Fan, C.-B.; Pu, S.-Z.; Liu, G. *Chin. J. Chem.* **2015**, *33*, 1310.
- [10] Zhang, Y.-Q.; Li, Y.; Zhang, L. *Spectrochim. Acta, Part A* **2021**, *259*, 119892.
- [11] Shen, P.; Hua, J.-Y.; Jin, H.-D.; Du, J.-Y.; Liu, C.-L.; Yang, W.; Gao, Q.-Y.; Luo, H.-J.; Liu, Y.; Yang, C.-Y. *Sens. Actuators, B* **2017**, *247*, 587.
- [12] Lal, S.; Prakash, K.; Hooda, S.; Kumar, V.; Kumar, P. J. *Mol. Struct.* **2020**, *1199*, 127003.
- [13] Singh, N.; Paknikar, K. M.; Rajwade, J. *Environ. Res.* **2019**, *175*, 367.
- [14] Chen, F.; Hao, Y.-Q.; Zhang, X.-F.; Shao, M.-L.; Cao, G.-X.; Zhai, B.; Zhang, C. *Sens. Actuators, B* **2021**, *330*, 129327.
- [15] Yang, Q.; Deng, S.; Jin, L.-Y.; Jiang, Y.-L.; Jin, C.; Wang, B.-X.; Shen, J. J. *Photochem. Photobiol., A* **2021**, *409*, 113143.
- [16] Wei, M.-J.; Zhang, Y.-Y.; Li, H.-T.; Yao, S.-Z. *Anal. Methods* **2017**, *9*, 3956.
- [17] Rodriguez-Seco, C.; Mendez, M.; Roldan-Carmona, C.; Pudi, R.; Nazeeruddin, M. K.; Palomares, E. J. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2020**, *59*, 5303.
- [18] Zhang, X.; Chen, Y.-A.; Cai, X.-Y.; Liu, C.-Y.; Jia, P.; Li, Z.-L.; Zhu, H.-C.; Yu, Y.-M.; Wang, K.; Li, X.-W.; Sheng, W.-L.; Zhu, B.-C. *Dyes Pigm.* **2020**, *174*, 108065.
- [19] Park, S. H.; Kwon, N.; Lee, J. H.; Yoon, J.; Shin, I. *Chem. Soc. Rev.* **2020**, *49*, 143.
- [20] Jiao, X.-J.; Liu, C.; He, S.; Zhao, L.-C.; Zeng, X.-H. *Dyes Pigm.* **2019**, *160*, 86.
- [21] Chowdhury, S.; Rooj, B.; Dutta, A.; Mandal, U. J. *Fluoresc.* **2018**, *28*, 999.
- [22] Wang, S.-J.; Li, C.-W.; Li, J.; Chen, B.; Guo, Y. *Acta Chim. Sinica* **2017**, *75*, 383 (in Chinese). (王少静, 李长伟, 李锦, 陈邦, 郭媛, 化学学报, **2017**, *75*, 383.)
- [23] Mu, Y.-L.; Zhang, C.-J.; Gao, Z.-L.; Zhang, X.; Lu, Q.; Yao, J.-S.; Xing, S. *Synth. Met.* **2020**, *262*, 116334.
- [24] Shi, F.; Cui, S.-Q.; Liu, H.-L.; Pu, S.-Z. *Dyes Pigm.* **2020**, *173*, 107914.
- [25] Chen, H.; Yang, P.; Li, Y.-H.; Zhang, L.-L.; Ding, F.; He, X.-J.; Shen, J.-L. *Spectrochim. Acta, Part A* **2020**, *224*, 117384.
- [26] Zhang, Z.-X.; Li, F.; He, C.-Y.; Ma, H.-W.; Feng, Y.-T.; Zhang, Y.-N.; Zhang, M. *Sens. Actuators, B* **2018**, *255*, 1878.
- [27] Xiao, H.-B.; Zhang, Y.-Z.; Li, S.-Z.; Zhang, W.; Han, Z.-Y.; Tan, J.-J.; Zhang, S.-Y.; Du, J.-Y. *Sens. Actuators, B* **2016**, *236*, 233.
- [28] Abdurahman, A.; Wang, L.; Zhang, Z.-X.; Feng, Y.-T.; Zhao, Y.-H.; Zhang, M. *Dyes Pigm.* **2020**, *174*, 108050.
- [29] Cai, W.-N.; Xiao, T.-D.; Niu, H.-J.; Bai, X.-D.; Zhang, Y.-H.; Wang, C.; Wang, W.; Qi, H. *Sens. Actuators, B* **2017**, *252*, 330.
- [30] Liu, Y.-X.; Yan, W.-M.; Chen, Y.-F.; Petersen, J. L.; Shi, X.-D. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 5389.
- [31] Yan, W.-M.; Wang, Q.-Y.; Lin, Q.; Li, M.-Y.; Petersen, J. L.; Shi, X.-D. *Chem.-Eur. J.* **2011**, *17*, 5011.
- [32] Zhang, Y.-W.; Ye, X.-H.; Petersen, J. L.; Li, M.-Y.; Shi, X.-D. *J. Org. Chem.* **2015**, *80*, 3664.
- [33] Padalkar, V. S.; Chemate, S. B.; Lanke, S. K.; Sekar, N. J. *Lumin.* **2015**, *168*, 114.
- [34] Chu, Y.-C.; Xie, Z.-F.; Zhuang, D.-J.; Yue, Y.-S.; Yue, Y.-H.; Shi,

- W.; Feng, S. *Chin. J. Chem.* **2019**, *37*, 1216.
- [35] Chu, Y.-C.; Xie, Z.-F.; Yue, Y.-Y.; Yue, Y.-H.; Kong, X.-J.; Shi, W.; Feng, S. *ACS Omega* **2019**, *4*, 5367.
- [36] Xie, Z.-F.; Kong, X.-J.; Feng, L.; Ma, J.-C.; Li, Y.-Q.; Wang, X.; Bao, W.-R.; Shi, W.; Hui, Y.-H. *Sens. Actuators, B* **2018**, *257*, 154.
- [37] Xue, S.-S.; Xie, Z.-F.; Wen, Y.-P.; He, J.-W.; Liu, Y.-C.; Shi, W. *ChemistrySelect* **2021**, *6*, 7123.
- [38] 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.)
- [39] Xue, S.-S.; Xie, Z.-F.; Chu, Y.-C.; Yue, Y.-Y.; Shi, W.; Zhou, J.-B. *Chin. J. Org. Chem.* **2021**, *41*, 1138 (in Chinese).
(薛松松, 解正峰, 褚义成, 岳永双, 石伟, 周家斌, 有机化学, **2021**, *41*, 1138.)
- [40] Liu, C.-S.; Zou, G.-R.; Peng, S.; Wang, Y.-F.; Yang, W.; Wu, F.; Jiang, Z.-R.; Zhang, X.; Zhou, X. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2018**, *57*, 9689.
- [41] Zhang, Z.-Y.; Liu, Y.-P.; Wang, E.-J. *Dyes Pigm.* **2019**, *163*, 533.
- [42] Yin, J.; Wang, Z.-L.; Zhao, F.; Yang, H.-Y.; Li, M.-X.; Yang, Y.-Q. *Spectrochim. Acta, Part A* **2020**, *239*, 118470.
- [43] Jiang, N.; Gong, X.; Zhong, T.-Y.; Zheng Y.; Wang, G. *J. Mol. Struct.* **2020**, *1219*, 128573.
- [44] Li, B.; Kou, J.-J.; Mei, H.-H.; Gu, X.; Wang, M.-H.; Xie, X.-M.; Xu, K.-X. *Anal. Methods* **2020**, *12*, 4181.
- [45] Wang, Y.-S.; Zhu, Z.-F.; Fan, C.-B.; Liu, G.; Pu, S.-Z. *Tetrahedron Lett.* **2020**, *61*, 151427.

(Zhao, C.)