

## 基于曼尼希反应的聚集诱导发光效应用于灵敏检测甲醛

吴金丹<sup>#</sup> 曹莹姿<sup>#</sup> 陈凯欣 查勇超 刘鸿燊 周平 李楠<sup>\*</sup>

(暨南大学生命科学技术学院生物医学工程系, 生物材料广东高校重点实验室, 广州 510632)

**摘 要** 甲醛是一类无色无味的致癌物, 严重危害人类健康, 对甲醛的灵敏检测在环境监测、毒物评估、临床诊断和医疗保健等领域均具有非常重要的意义。本研究合成了具有聚集诱导发光(Aggregation-induced emission, AIE)效应的荧光探针四羟基四苯基乙烯(Tetra(4-hydroxyphenyl)ethylene, TPE-4OH), 在 1,2,4,5-苯四胺四盐酸盐(1,2,4,5-Benzenetetramine tetrahydrochloride, BTA)存在条件下, TPE-4OH 与溶液中的甲醛分子发生曼尼希反应, 从而发生 AIE, 引起荧光增强, 荧光强度变化与体系中的甲醛水平密切相关, 通过测定 TPE-4OH 的 AIE 强度可检测水溶液中甲醛浓度。优化了反应物浓度、溶液 pH 值以及反应时间等条件。在最优条件下, 本方法检测甲醛的线性范围为 1.0~2000  $\mu\text{mol/L}$ , 检出限为 1.0  $\mu\text{mol/L}$ 。将本方法应用于血清样品中甲醛浓度的检测, 回收率为 93.7%~106.4%, 显示了良好的实际应用价值, 为水溶液中甲醛浓度检测提供了一种新方法。

**关键词** 甲醛; 荧光检测; 聚集诱导发光; 曼尼希反应; 分子探针

甲醛作为一种典型的活性羰基物质, 可通过形成稳定的亚甲基桥而使 DNA 和蛋白质交联, 进而使其失去活性和功能, 因此被认为是一种慢性毒素, 可破坏人体神经系统、免疫系统和心血管系统等, 甚至致畸、致癌, 严重危害人类健康<sup>[1]</sup>。长期摄入甲醛可引起支气管哮喘, 甚至鼻咽癌和白血病, 也可导致新生儿畸形, 甚至死亡<sup>[2]</sup>。甲醛易溶于水, 35.0%~40.0%甲醛溶液(俗称为福尔马林)具有很强的防腐蚀性, 在医学上常用作防腐剂和组织标本固定剂, 在农业上用于土壤和种子的消毒杀菌, 以及在食品加工方面被非法用于蔬菜水果保鲜、泡发各种水产品及添加于酒水饮料中<sup>[3-4]</sup>。水溶液中的甲醛可通过食物摄取等方式进入人体。在细胞色素 P450 酶催化下, 内源性甲醛通过脱烷基反应、阿斯巴甜水解和甲醇氧化生成<sup>[5]</sup>, 也可通过去甲基化酶(如赖氨酸特异性去甲基化酶)和氧化酶(如氨基脲敏感胺氧化酶)反应产生<sup>[6]</sup>。甲醛在体内有多种代谢途径, 如通过细胞质乙醇脱氢酶还原为甲醇, 或通过线粒体醛脱氢酶及细胞质谷胱甘肽依赖型甲醛脱氢酶氧化为甲酸<sup>[7]</sup>。内源性甲醛水平异常可导致蛋白质和 DNA 损伤, 引起神经退行性疾病, 如阿尔茨海默氏症, 其患者大脑中内源性甲醛水平升高<sup>[8]</sup>。因此, 外源性环境污染与内源性代谢异常过程中微量甲醛检测已引起广泛关注。

溶液中甲醛的检测方法主要包括分光光度法<sup>[9]</sup>、高效液相色谱法<sup>[10]</sup>、气相色谱法<sup>[11]</sup>、电化学伏安法<sup>[12-13]</sup>、生物传感器法<sup>[14]</sup>、荧光探针法<sup>[15]</sup>和质谱法<sup>[11, 16]</sup>等。尽管这些方法能够有效检测甲醛, 但仍存在诸如检测过程耗时、样品制备复杂、信号干扰、二次污染、选择性低、灵敏度低以及成本高等问题。因此, 开发用于灵敏准确检测溶液中甲醛的新方法具有重要的研究意义和应用价值。

聚集诱导发光(Aggregation-induced emission, AIE)现象是指荧光团在单分子状态下几乎没有荧光, 在聚集状态下发光效率显著提高, 其增强机理归因于受限的分子内旋转或受限的分子内振动现象<sup>[17-18]</sup>。AIE 材料具有优良的生物相容性和光稳定性, 能够克服传统荧光分子的局限, 在化学/生物传感、荧光成像、疾病诊疗等领域展现出良好的应用潜力<sup>[19]</sup>。常见的 AIE 分子包括六苯基硅氧烷(Hexaphenylsilole, HPS)、四苯基乙烯(Tetraphenylethene, TPE)、四苯基硅氧烷(Tetraphenylsilole, TPS)衍生物及四苯基吡

2022-09-28 收稿; 2022-11-23 接受

广东省基础与应用基础研究基金项目(No. 2020A1515010957)资助。

<sup>#</sup> 共同第一作者

<sup>\*</sup> E-mail: linanbie@jnu.edu.cn

嗪(Tetraphenylpyrazine, TPP)等<sup>[20]</sup>。Pan 等<sup>[21]</sup>制备了一种基于 *N*-苯基咪唑荧光基团的探针(PCBI),此探针在二甲基甲酰胺-水(1:9, *V/V*)混合体系中表现出优异的 AIE 效应,对肼( $N_2H_4$ )具有良好的荧光响应,可用于检测水溶液中的  $N_2H_4$ 。Liow 等<sup>[22]</sup>开发了一种基于四苯基乙烯共轭聚乙二醇(TPE-PEG<sub>2</sub>)和 $\alpha$ -环糊精的主客体复合物,由于 PEG 侧链嵌入环糊精纳米腔中,使得 TPE 分子内旋转受到限制,显示出 AIE 特性,可用作生物成像探针。Li 等<sup>[23]</sup>报道了一种含有 TPE 的人造肽荧光探针(TPE-Trp-Pro-Gln-His-Glu-NH<sub>2</sub>),其细胞渗透性高、生物毒性低、AIE 效应良好,可用于活细胞中  $Hg^{2+}$  的成像检测。目前,已有一些基于 AIE 原理检测甲醛的研究报道。Wen 等<sup>[24]</sup>设计了一种基于二氨基马来睛的 AIE 探针,利用探针中氨基与甲醛发生反应检测气态甲醛。Zhao 等<sup>[25]</sup>开发了一种基于四苯基乙烯的 AIE 探针,通过 2-aza-cope 重排反应实现对气态甲醛的灵敏检测。Li 等<sup>[26]</sup>报道了一种基于亲水性胍基-萘酰亚胺官能化壳聚糖的聚合物探针,利用甲醛和接枝的胍基-萘酰亚胺基团之间的反应产生 AIE 效应,实现水溶液中的甲醛检测。然而,采用分子结构简单的 AIE 分子探针检测水溶液中甲醛的报道目前还较少。

曼尼希反应(Mannich reaction)也称胺(或氨)甲基化反应,是在形成 C—C 键的同时可形成 C—N 键的有机化学反应。该反应作为合成含氮化合物的重要方法,通常由甲醛和伯胺(或仲胺、氨)与位于羰基官能团旁的酸性质子进行氨基烷基化反应,生成  $\beta$ -氨基化合物(也称为曼尼希碱),已广泛用于药物和生物碱的合成<sup>[27]</sup>。随着对曼尼希反应条件的研究不断深入,其起始物逐渐多样化,富电子的芳香化合物(如苯酚)作为含活化 CH—的化合物也可参与反应<sup>[28]</sup>。本研究设计并合成了富含苯酚基团的 AIE 材料四羟基四苯基乙烯(Tetra(4-hydroxyphenyl)ethylene, TPE-4OH),其分子结构简单,但以乙烯键为核心通过单键连接了 4 个含有羟基的苯环,具备了 AIE 分子典型的“螺旋桨”式构型,可有效避免聚集态下的面-面紧密堆积。TPE-4OH 具有多个酚羟基邻位活性位点,可利用富电子苯胺化合物 BTA 含有 4 个苯胺基团的特点,采用 TPE-4OH、甲醛和 BTA 三组分“一锅法”,由溶液中的甲醛与 BTA 的 4 个苯胺基团反应生成亚胺正离子,然后再与 TPE-4OH 的苯酚基团反应形成 C—C 键,通过曼尼希反应生成多个曼尼希碱。此外,在甲醛存在条件下,修饰在 TPE-4OH 分子的酚羟基邻位的 BTA 的多个苯胺基团可继续与溶液中相近的其它 TPE-4OH 分子中的苯酚基团发生曼尼希反应,使 TPE-4OH 分子由分散态转变成聚集态,其苯环分子内运动受到限制,从而发生 AIE 效应,使发光强度得到很大提升。当体系中 TPE-4OH 和 BTA 浓度一定时, AIE 荧光强度与溶液中甲醛浓度相关,因此,通过测量 AIE 发光强度可实现水溶液中甲醛的定量检测。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

Nicolet iS50 型傅里叶变换红外光谱仪(美国赛默飞世尔科技公司); Avance III HD 600M 型核磁共振波谱仪(德国布鲁克公司); F-7000 型荧光分光光度计(日本日立高新技术公司)。

1,2,4,5-苯四胺四盐酸盐(BTA)、四氢呋喃(THF)、4,4'-二羟基二苯甲酮、乙酸乙酯、硫酸奎宁、锌粉(Zn)、 $K_2CO_3$ 、 $TiCl_4$ 、 $MgSO_4$ 、 $H_2SO_4$ (北京中科科技股份有限公司); 二甲基亚砜(DMSO,北京鼎国昌盛生物科技有限公司); 二甲亚砜- $d_6$ (DMSO- $d_6$ ,美国剑桥同位素实验室公司); 甲醛、柠檬酸、二水柠檬酸三钠、 $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ (天津大茂化学试剂厂);  $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 、 $NaHCO_3$ 、 $Na_2CO_3$ (广州化学试剂厂); 胎牛血清(上海麦克林生化有限公司)。所用试剂均为分析纯; 实验用水为超纯水(18.2  $M\Omega \cdot cm$ )。

### 1.2 TPE-4OH的合成

参考文献<sup>[29]</sup>的方法合成 TPE-4OH。将  $TiCl_4$ (0.8 mL, 7.0 mmol)和 Zn 粉(0.9 g, 14.0 mmol)加入到 35.0 mL 无水 THF 中,在氮气保护下回流 2.0 h,再加入 15.0 mL 含有 4,4'-二羟基二苯甲酮(1.5 g, 7.0 mmol)的无水 THF,混合溶液在氮气保护下继续回流 4.0 h。所得混合物冷却至 25.0  $^{\circ}C$ , 倒入 10.0%  $K_2CO_3$  溶液(50.0 mL)中,剧烈搅拌 5.0 min 后,利用硅藻土垫真空过滤除去分散的不溶性物质。收集有机层,用乙酸乙酯(25.0 mL)萃取水层 3 次。收集有机相,并用盐水萃取洗涤 3 次,收集的有机相用无水  $MgSO_4$  干燥。经旋转蒸发除去有机相,以正己烷-乙酸乙酯(1:1, *V/V*)为洗脱液,利用硅胶柱对粗品进行纯化。

收集最终的白色产物为 TPE-4OH,产率为 85.0%。

### 1.3 探针 TPE-4OH 检测水溶液中的甲醛

取 10.0 mmol/L TPE-4OH 溶液(DMSO 为溶剂)2.0  $\mu\text{L}$  和 100.0  $\mu\text{mol/L}$  BTA 溶液 500.0  $\mu\text{L}$ , 混匀后,加入 100.0  $\mu\text{L}$  不同浓度(1.0、5.0、10.0、20.0、25.0、50.0、100.0、150.0、200.0、250.0、300.0、350.0、400.0、500.0、1000.0、1500.0 和 2000.0  $\mu\text{mol/L}$ )的甲醛溶液,用 pH 6.0 的磷酸缓冲溶液(PBS, 1.0 mmol/L)稀释至 1.0 mL,混匀,于室温下孵育 1.5 h。测量相应样品的荧光光谱,平行 3 次实验。激发波长为 290.0 nm,入射及发射狭缝宽度分别为 5.0 和 10.0 nm。

## 2 结果与讨论

### 2.1 AIE 探针的结构表征

采用红外光谱、核磁共振波谱(NMR)对合成的 TPE-4OH 分子进行表征。红外图谱如 1A 所示,1608.8 和 1510.6  $\text{cm}^{-1}$  处的谱峰归于芳香环的 C=C 伸缩振动,829.9  $\text{cm}^{-1}$  处的谱峰归于苯环的 C—H 面外变形振动,而另一个峰出现在 3390.7  $\text{cm}^{-1}$  处,来自酚羟基的伸缩振动。 $^1\text{H}$  NMR 谱(图 1B)中 6.73~6.68(m, 2H)和 6.50~6.46(m, 2H)处的峰归因于芳香族质子,而 9.21(s, 1H)处的峰为酚羟基的特征峰。 $^{13}\text{C}$  NMR 谱(图 1C)表明芳香族碳的特征信号在 155.33、137.66、135.04、131.92 和 114.47 ppm 处<sup>[30]</sup>。这些结果表明成功合成了 TPE-4OH。

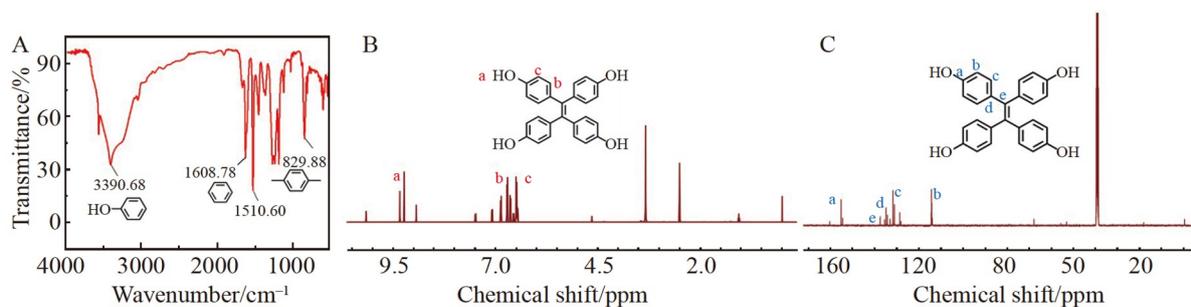


图1 TPE-4OH 分子结构表征: (A) 傅里叶变换红外光谱; (B)  $^1\text{H}$  核磁共振谱图; (C)  $^{13}\text{C}$  核磁共振谱图  
Fig.1 Structural analysis of tetra(4-hydroxyphenyl) ethylene (TPE-4OH): (A) Fourier transform infrared (FT-IR) spectrum; (B)  $^1\text{H}$  nuclear magnetic resonance (NMR) spectrum; (C)  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum

### 2.2 TPE-4OH 分子的荧光特性

TPE-4OH 分子的荧光性质如图 2A 显示。在 220~260 nm 范围内,100.0  $\mu\text{mol/L}$  TPE-4OH 在 pH 6.0 的 PBS 缓冲液中的荧光发射光谱强度随激发波长增加而增大,当激发波长为 260 nm 时呈现最大的荧光强度(图 2A 曲线 c); 在 280~320 nm 范围内,随着激发波长增加,TPE-4OH 的荧光发射强度呈大幅下降趋势。因此,TPE-4OH 的最佳激发波长为 260 nm,在该波长激发下,最佳发射波长为 400 nm。如图 2B 所示,TPE-4OH 的最佳激发和发射光谱呈对称分布,符合荧光分子的光致激发特征。

### 2.3 TPE-4OH 对甲醛的荧光响应

当 BTA 存在时,考察了 TPE-4OH 的荧光对于甲醛的响应。当溶液中仅存 BTA(图 3A 曲线 a),或 BTA 与 TPE-4OH(图 3A 曲线 c)混合物时,体系在 320 nm 处的荧光信号非常微弱。与 2.2 节中较高浓度(100.0  $\mu\text{mol/L}$ )时呈现出明显的光致发光性质相比,TPE-4OH 在低浓度(20.0  $\mu\text{mol/L}$ )时发光较弱(图 3A 曲线 b)。当将甲醛分子加入到 BTA 与 TPE-4OH 共存体系中,反应 1.5 h 后,在波长 320 nm 处观察到一个明显的荧光发射峰(图 3A 曲线 d)。相较于单独的 TPE-4OH 分子,体系的最佳激发波长移至 290 nm(图 3B 曲线 a),相应的最佳发射波长移至 320 nm(图 3B 曲线 b)。采用硫酸奎宁(量子产率为 0.55,溶剂为 0.05 mol/L  $\text{H}_2\text{SO}_4$ )为参照测定荧光量子产率<sup>[31]</sup>,反应前后荧光量子产率由 0.21 增至 0.55。

产生此现象的原因可能是 TPE-4OH 内 4 个苯环通过单键连接在乙烯基上形成“螺旋桨”构型,在水溶液中,低浓度的单分子具有高自由度,有利于苯环的自由旋转,该过程可以非辐射的形式消耗激发态的能量<sup>[32]</sup>,导致 TPE-4OH 荧光减弱,甚至不发光;加入甲醛后,与 BTA 分子内 4 个苯胺基团形成的亚胺

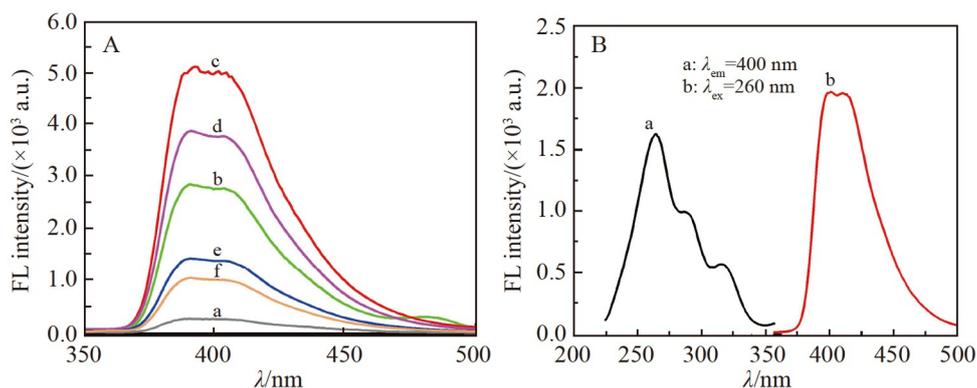


图2 (A)不同激发波长(a-f分别为220.0、240.0、260.0、280.0、300.0和320.0 nm)下 TPE-4OH 的荧光光谱; (B) TPE-4OH 的激发光谱(a)和发射光谱(b)

Fig.2 (A) Fluorescence spectra of TPE-4OH with different excitation wavelengths (a-f correspond to 220.0, 240.0, 260.0, 280.0, 300.0 and 320.0 nm, respectively); (B) Fluorescence excitation spectrum (a) and emission spectrum (b) of TPE-4OH

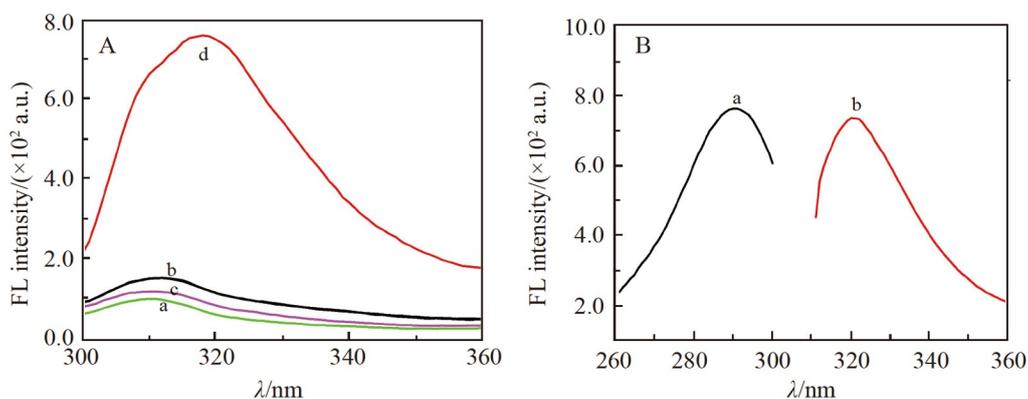


图3 (A)不同反应体系(a, 1,2,4,5-苯四胺四盐酸盐(BTA); b, TPE-4OH; c, BTA+TPE-4OH; d, BTA+TPE-4OH+甲醛)的荧光光谱, BTA、TPE-4OH 和甲醛的浓度分别为 50.0、20.0 和 100.0  $\mu\text{mol/L}$ ; (B)曼尼希反应产物的最佳荧光激发光谱(a)和发射光谱(b)

Fig.3 (A) Fluorescence spectra of different systems including (a) 1,2,4,5-Benzenetetramine tetrahydrochloride (BTA), (b) TPE-4OH, (c) BTA+TPE-4OH and (d) BTA+TPE-4OH+formaldehyde, and the concentrations of BTA, TPE-4OH and formaldehyde are 50.0, 20.0 and 100.0  $\mu\text{mol/L}$ , respectively; (B) Optimal fluorescence excitation spectrum (a) and emission spectrum (b) of the product

可通过曼尼希反应修饰到 TPE-4OH 酚羟基的邻位,生成曼尼希碱<sup>[33]</sup>; 在甲醛诱导下,修饰在 TPE-4OH 分子的酚羟基邻位的 BTA 的多个苯胺基团又可与溶液中相近的 TPE-4OH 分子中的苯酚基团发生曼尼希反应,促使 TPE-4OH 分子由高分散状态转变成聚集态。这种情况下, TPE-4OH 分子的苯环振动和内旋受限,抑制了非辐射能量转移,促进了 TPE-4OH 聚集态下的发光增强。限制共轭发光基团的分子内旋转(RIR)是产生 AIE 现象的主要原因<sup>[32]</sup>。采用 TPE-4OH、甲醛和 BTA “一锅法”产生 AIE 现象的机理如图 4 所示。

#### 2.4 检测条件的优化

考察了 BTA 浓度、溶液体系 pH 值和反应时间对甲醛检测的影响。在 2.0  $\mu\text{L}$  TPE-4OH 溶液 (10.0 mmol/L) 及 100.0  $\mu\text{L}$  甲醛溶液 (1.0 mmol/L) 的混合溶液中加入 100.0  $\mu\text{L}$  不同浓度的 BTA 溶液,混匀后稀释至 1.0 mL,考察 BTA 浓度的影响。如图 5A 所示,在 0~200.0  $\mu\text{mol/L}$  浓度范围内,随着 BTA 浓度逐渐增加,体系在 320 nm 处的荧光强度先逐渐增加,当其浓度大于 80.0  $\mu\text{mol/L}$  后,荧光强度反而逐渐减小。因此,选择 80.0  $\mu\text{mol/L}$  BTA 进行后续实验。溶液中的盐和质子会影响曼尼希反应,适宜的酸性条件有利于曼尼希反应顺利进行<sup>[34]</sup>。实验结果(图 5B)表明,曼尼希反应产物的荧光光谱随着体系 pH 值

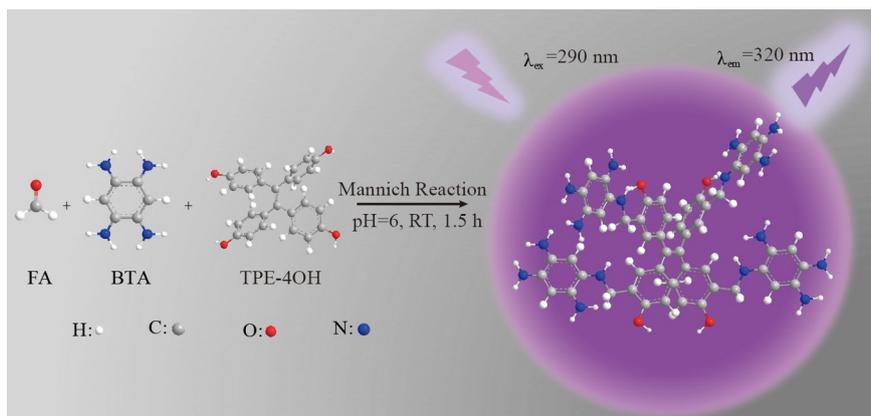


图4 TPE-4OH 探针基于聚集诱导发光(AIE)效应检测水溶液中甲醛的原理示意图

Fig.4 Schematic of detection of formaldehyde in aqueous solution using fluorescent probe TPE-4OH based on aggregation-induced emission (AIE)

不同而变化,在 320 nm 处的荧光强度变化明显,最佳 pH=6.0。反应时间的影响如图 5C 所示,甲醛 (100.0  $\mu\text{mol/L}$ ) 诱导 BTA (80.0  $\mu\text{mol/L}$ ) 与 TPE-4OH (20.0  $\mu\text{mol/L}$ ) 发生曼尼希反应,其产物在 320 nm 处的荧光强度随反应时间延长而逐渐增强,说明此反应受动力学控制。当反应进行 290 min 后,反应活性仍维持在较高水平。考虑到甲醛检测的合理响应时间,将 BTA 的浓度减少至 50.0  $\mu\text{mol/L}$  时,320 nm 处的荧光强度随反应时间延长而明显增加,在 90.0 min 后趋于平缓(图 5D),但是荧光强度变化均小于 0.02%。综合考虑检测的灵敏度和检测时间,后续实验的反应时间选择 90 min。

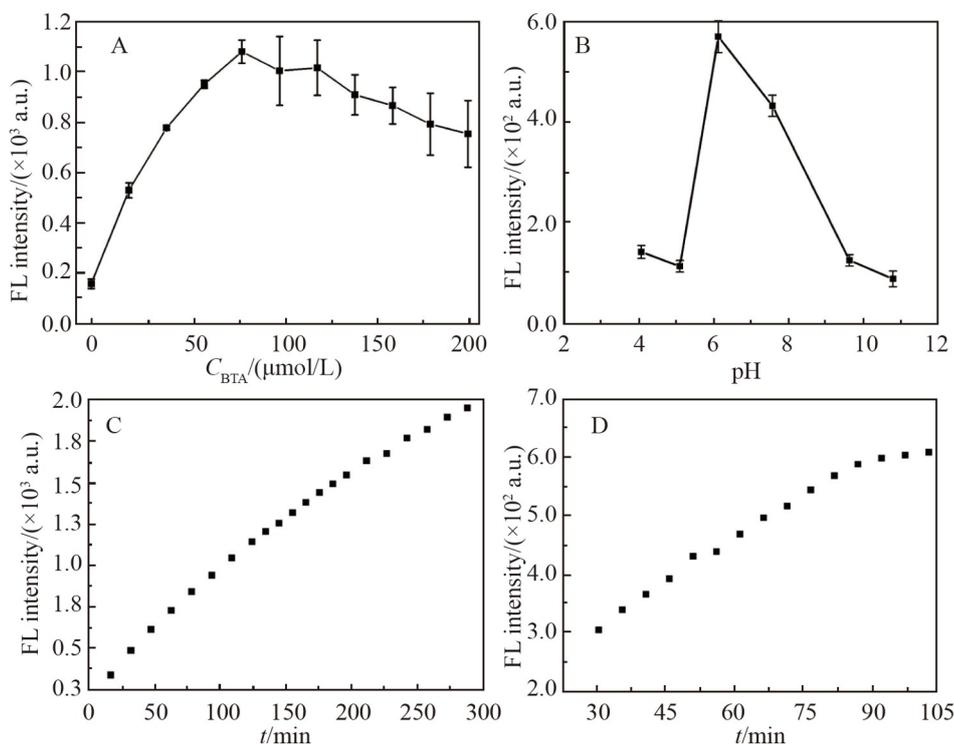


图5 检测体系在 320 nm 处荧光强度与(A) BTA 浓度、(B) 溶液 pH 值、反应时间((C) 25.0~290.0 min 和(D) 30.0~100 min)的关系, TPE-4OH 和甲醛的浓度分别为 20.0 和 100.0  $\mu\text{mol/L}$

Fig.5 Relationship between fluorescence intensity of detection system at 320 nm and (A) the concentration of BTA, (B) different pH values of the solution, different reaction time (C) from 25.0 min to 290.0 min and (D) from 30.0 min to 100.0 min. The concentration of TPE-4OH is 20.0  $\mu\text{mol/L}$  and that of formaldehyde is 100.0  $\mu\text{mol/L}$

## 2.5 甲醛的定量检测

在最佳实验条件下,即 TPE-4OH 浓度 20.0  $\mu\text{mol/L}$ 、BTA 浓度 50.0  $\mu\text{mol/L}$ 、pH 6.0 和室温反应时间为 1.5 h,采用本方法检测不同浓度的甲醛,检测体系在 320 nm 处的荧光强度随着甲醛浓度的增加而逐渐增强(图 6A),甲醛浓度分别在 1.0~100  $\mu\text{mol/L}$  和 100~2000  $\mu\text{mol/L}$  范围内,与荧光强度呈线性关系(图 6B 和 6C),线性方程分别为  $y=85.329 + 0.426x$  和  $y=54.830 + 0.739x$ ,相关系数分别为 0.999 和 0.998,检出限( $3\sigma$ )为 1.0  $\mu\text{mol/L}$ 。正常情况下,人体血液中的甲醛浓度为 50~75  $\mu\text{mol/L}$ <sup>[35]</sup>,当血样经过样品前处理稀释 10 倍后,其甲醛浓度仍高于本方法的检出限,因此本方法具有检测生物样品中甲醛浓度的应用潜力。

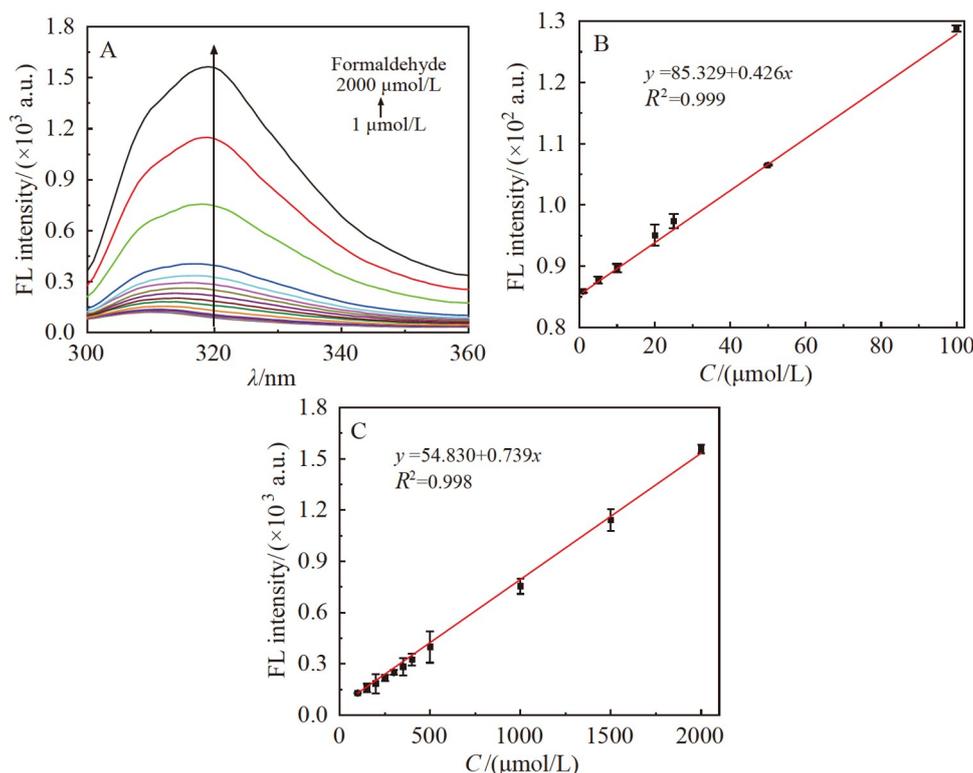


图6 (A)体系检测不同浓度甲醛的荧光光谱;(B、C) 320 nm 处荧光强度与甲醛浓度的关系曲线

Fig.6 (A) Fluorescence emission spectra of the detection system in the presence of different concentrations of formaldehyde; (B, C) Relationship between the fluorescence intensity at 320 nm and concentration of formaldehyde

目前,基于荧光法 AIE 原理检测水溶液中的甲醛浓度的报道较少,本方法利用结构简单的 AIE 分子探针,通过“一锅法”反应直接检测溶液中的甲醛浓度,简单便捷,易于操作。与已报道的检测溶液中甲醛的方法相比,本方法的分析性能与之相当或更优(表 1),可灵敏地检测溶液中的甲醛浓度。

## 2.6 方法的选择性

考察了本方法对甲醛的选择性。利用胺和活性羰基的缩合反应检测甲醛的研究<sup>[24]</sup>已证实,1,4-苯二甲醛、4-(二乙氨基)水杨醛和丙酮等对甲醛检测的影响可忽略不计。与文献<sup>[24]</sup>的检测原理类似,本方法首先利用甲醛与 BTA 的苯胺基团在溶液中反应,生成亚胺正离子,再与 TPE-4OH 反应,引起 AIE 效应,以此实现对甲醛的检测。因此,本研究选择水溶液中检测甲醛常见干扰物质(如乙醛、丙二醛、癸醛、苯甲醛、葡萄糖及丙酮酸)进行选择性实验。

在含有 TPE-4OH(20.0  $\mu\text{mol/L}$ )和 BTA(50.0  $\mu\text{mol/L}$ )的反应体系中,分别加入 100.0  $\mu\text{mol/L}$  的甲醛、乙醛、丙二醛、癸醛、苯甲醛、葡萄糖或丙酮酸,检测其荧光响应。如图 7 所示,甲醛使得 AIE 探针产生最强的荧光信号,随着醛类分子结构复杂度增加,AIE 荧光强度逐渐降低。加入丙二醛、癸醛、苯甲醛、葡萄糖或丙酮酸时,AIE 荧光强度很低。一方面受限于水溶液中较低的溶解度;另一方面可能

表1 水溶液中甲醛检测方法比较

Table 1 Comparison of different methods for detection of aqueous formaldehyde

方法 Method	传感材料 Sensing material	检出限 Detection limit/ (mol/L)	检测范围 Detection range/ (mol/L)	文献 Ref.
高效液相色谱 High-performance liquid chromatography	2,4-二硝基苯肼 2,4-Dinitrophenylhydrazine	$3.3 \times 10^{-6}$	$1.1 \times 10^{-5} \sim 1.1 \times 10^{-2}$	[10]
电化学 Electrochemistry	镍薄膜电极 Nickel thin film electrodes	$8.3 \times 10^{-6}$	$0 \sim 6.5 \times 10^{-3}$	[13]
电化学 Electrochemistry	CuO/Cu/TiO <sub>2</sub> 修饰电极 CuO/Cu/TiO <sub>2</sub> modified electrode	$2.5 \times 10^{-6}$	$6.5 \times 10^{-5} \sim 7.8 \times 10^{-3}$	[36]
比色法 Colorimetry	4-氨基-3-肼基-5-巯基-1,2,4-苯三唑 4-Amino-3-hydrazino-5-mercapto-1,2,4-triazole	$4.3 \times 10^{-6}$	$6.6 \times 10^{-6} \sim 4.0 \times 10^{-5}$	[37]
紫外-可见光谱法 UV-visible spectroscopy	邻氨基芳香偶氮染料 Ortho-Amino aromatic azo dye	$4.1 \times 10^{-6}$	—	[9]
表面增强拉曼散射光谱 Surface-enhanced Raman spectroscopy	银纳米团簇 Silver nanoclusters	$2.5 \times 10^{-6}$	$5.0 \times 10^{-6} \sim 1.6 \times 10^{-4}$	[38]
化学发光法 Chemiluminescence	过氧化氢 Hydrogen peroxide	$3.3 \times 10^{-10}$	$2.0 \times 10^{-9} \sim 1.0 \times 10^{-7}$	[39]
荧光法 Fluorescence	半花青-氨基衍生物 Hemicyanine derivative	$1.9 \times 10^{-6}$	$0 \sim 3.0 \times 10^{-4}$	[40]
荧光法 Fluorescence	1,8-萘酰亚胺-肼衍生物 1,8-Naphthalimide-hydrazine	$1.6 \times 10^{-6}$	$0 \sim 1.0 \times 10^{-5}$	[41]
荧光法 Fluorescence	肼基-萘酰亚胺官能化壳聚糖聚合物 Hydrazino-naphthalimide/chitosan	$1.7 \times 10^{-6}$	$3.3 \times 10^{-5} \sim 3.3 \times 10^{-3}$	[26]
荧光法 Fluorescence	四羟基四苯基乙烯 Tetra(4-hydroxyphenyl)ethylene	$1.0 \times 10^{-6}$	$1.0 \times 10^{-6} \sim 2.0 \times 10^{-3}$	本工作 This work

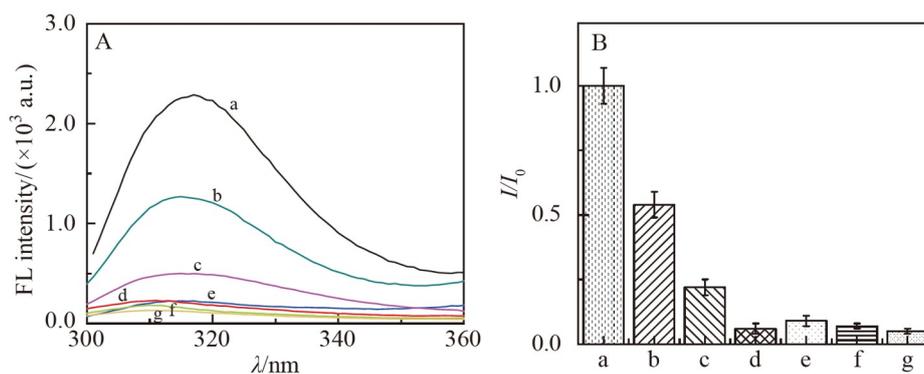


图7 (A)体系中含有 BTA 和 TPE-4OH 及不同醛类物质的荧光光谱(a~g 分别为甲醛、乙醛、丙二醛、癸醛、苯甲醛、葡萄糖和丙酮酸); (B)在 320 nm 处  $I/I_0$  与不同醛的关系图,  $I$  为其它醛类的荧光强度;  $I_0$  为甲醛的荧光强度, 甲醛、乙醛、丙二醛、癸醛、苯甲醛、葡萄糖及丙酮酸的浓度均为  $100.0 \mu\text{mol/L}$ ; BTA、TPE-4OH 的浓度分别为  $50.0$  和  $20.0 \mu\text{mol/L}$

Fig.7 (A) Fluorescence spectra in the presence of BTA, TPE-4OH and different aldehydes (a~g: formaldehyde, acetaldehyde, malondialdehyde, decanal, benzaldehyde, glucose and pyruvic acid, respectively); (B) Plot of  $I/I_0$  vs different aldehydes at 320 nm.  $I$  is the fluorescence intensity of different aldehydes;  $I_0$  is the fluorescence intensity of formaldehyde. Concentrations of formaldehyde, acetaldehyde, malondialdehyde, decanal, benzaldehyde, glucose and pyruvic acid are  $100.0 \mu\text{mol/L}$ , respectively. The measurements are performed in PBS (pH=6.0) containing  $50.0 \mu\text{mol/L}$  BTA and  $20.0 \mu\text{mol/L}$  TPE-4OH for reaction of 1.5 h with  $\lambda_{\text{ex}}=290.0 \text{ nm}$

由于醛类分子结构越复杂,其参与 BTA 和 TPE-OH 发生曼尼希反应时受空间位阻影响越大。上述因素均影响了 AIE 荧光强度。乙醛存在一定的反应活性<sup>[24]</sup>,但乙醛对实际生物样品中甲醛测定不会造成明显干扰,这是由于在代谢过程中,乙醛虽是乙醇经乙醇脱氢酶氧化的主要产物,但其作为反应中间体能够被乙醛脱氢酶进一步氧化成为乙酸<sup>[42]</sup>,在生物体液(如血液、尿液)中所含的代谢物中的乙醛含量可忽略不计,采用本方法进行实际样品中甲醛浓度检测时可忽略乙醛的影响。因此,本方法检测甲醛具有良好的选择性。

## 2.7 实际样品分析

用超纯水将胎牛血清样品稀释 10 倍,添加 250、500 和 1000  $\mu\text{mol/L}$  甲醛,采用本方法进行检测,结果见表 2。3 个浓度水平的加标回收率在 93.7%~106.4%之间,相对标准偏差(RSD)小于 10.0%,表明本方法用于检测血液样品中甲醛浓度具有较高的准确性和较好的重现性,具有临床检测血清中甲醛浓度的应用潜力。

表2 基于TPE-4OH探针的荧光方法检测血清样品中的甲醛浓度

Table 2 Detection results of formaldehyde spiked in serum samples by TPE-4OH probe

样品 Sample	加入浓度 Spiked/ ( $\mu\text{mol/L}$ )	检测浓度 Found/ ( $\mu\text{mol/L}$ )	回收率 Recovery/ %	相对标准偏差 RSD/ (%, $n=3$ )
1	250	266	106.4	8.6
2	500	470	93.9	7.5
3	1000	937	93.7	4.7

## 3 结论

基于“螺旋桨”式的分子设计,本研究合成了一种结构简单的 AIE 探针 TPE-4OH。利用 TPE-4OH 具有多个酚羟基邻位活性位点、富电子苯胺化合物 BTA 含有 4 个苯胺基团的特点,采用 TPE-4OH、甲醛和 BTA “一锅法”,通过曼尼希反应引起 TPE-4OH 聚集,导致其苯环分子内运动受限,在聚集态下荧光增强,产生 AIE 效应。在最佳实验条件下, AIE 荧光强度随甲醛浓度增加而增大,二者在较宽的浓度范围(1.0~2000.0  $\mu\text{mol/L}$ )内呈良好的线性关系,检出限为 1.0  $\mu\text{mol/L}$ 。实验结果表明,本方法检测甲醛具有良好的选择性,常见的羰基化合物不干扰检测,对血清样品中甲醛浓度的测定具有较好的重现性和准确度,方法简单灵敏、生物相容性好,可用于生物分析和临床诊断,在环境监测和生产评估领域中具有良好的应用潜能。

## References

- [1] TONG Z, LUO W, WANG Y, YANG F, HAN Y, LI H, LUO H, DUAN B, XU T, MAOYING Q, TAN H, WANG J, ZHAO H, LIU F, WAN Y. *PLoS One*, 2010, 5(4): e10234.
- [2] ZHANG Y, YANG Y, HE X, YANG P, ZONG T, SUN P, SUN R C, YU T, JIANG Z. *J. Cell Mol. Med.*, 2021, 25(12): 5358-5371.
- [3] YUAN G, DING H, PENG L, ZHOU L, LIN Q. *Food Chem.*, 2020, 331: 127221.
- [4] ZHAO Y X, ZHU W W, WU Y Y, CHEN Y Y, DU F K, YAN J, TAN X C, WANG Q. *Microchem. J.*, 2021, 160: 105727.
- [5] TENG S, BEARD K, POURAHMAD J, MORIDANI M, EASSON E, POON R, O'BRIEN P J. *Chem. Biol. Interact.*, 2001, 130-132: 285-296.
- [6] MICHEL B W, LIPPERT A R, CHANG C J. *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, 134(38): 15668-15671.
- [7] REINGRUBER H, PONTEL L B. *Curr. Opin. Toxicol.*, 2018, 9: 28-34.
- [8] TULPUL K, DRINGEN R. *J. Neurochem.*, 2013, 127(1): 7-21.
- [9] GAO P, JIANG H, CHEN W, CUI Z. *Dyes Pigm.*, 2020, 179: 108376.
- [10] SOMAN A, QIU Y, CHAN LI Q. *J. Chromatogr. Sci.*, 2008, 46(6): 461-465.
- [11] YE H T S, LIN T C, CHEN C C, WEN H M. *J. Food Drug Anal.*, 2013, 21(2): 190-197.
- [12] GANIE A S, BANO S, SULTANA S, SABIR S, KHAN M Z. *Electroanalysis*, 2021, 33(1): 233-248.
- [13] EHSAN M A, REHMAN A. *Anal. Methods*, 2020, 12(32): 4028-4036.

- [14] SUN X, ZHANG H, HAO S, ZHAI J, DONG S. *ACS Sens.*, 2019, 4(10): 2631-2637.
- [15] LI M W, SHEN A, LIANG Y Q, ZHEN H, HAO X H, LIU X L, SUN X C, YANG Y X. *Anal. Methods*, 2020, 12(29): 3748-3755.
- [16] SHIN H S, LIM H H. *Int. J. Food Sci. Tech.*, 2012, 47(2): 350-356.
- [17] MEI J, LEUNG N L C, KWOK R T K, LAM J W Y, TANG B Z. *Chem. Rev.*, 2015, 115(21): 11718-11940.
- [18] FENG G, KWOK R T K, TANG B Z, LIU B. *Appl. Phys. Rev.*, 2017, 4(2): 021307.
- [19] LI Hai-Yin, CHANG Jia-Fu, LYU Wen-Xin, LI Feng. *Chin. J. Anal. Chem.*, 2020, 48(10): 1325-1333.  
李海银, 常加富, 吕文欣, 李峰. 分析化学, 2020, 48(10): 1325-1333.
- [20] LIANG J, TANG B Z, LIU B. *Chem. Soc. Rev.*, 2015, 44(10): 2798-2811.
- [21] PAN J, MA J, LIU H, ZHANG Y, LU L. *New J. Chem.*, 2021, 45(45): 21151-21159.
- [22] LIOW S S, ZHOU H, SUGIARTO S, GUO S, CHALASANI M L S, VERMA N K, XU J, LOH X J. *Biomacromolecules*, 2017, 18(3): 886-897.
- [23] LI Y, ZHANG Y, WANG M, WANG D, CHEN K, LIN P, GE Y, LIU W, WU J. *J. Hazard. Mater.*, 2021, 415: 125712.
- [24] WEN X, YAN L, FAN Z. *New J. Chem.*, 2021, 45(18): 8155-8165.
- [25] ZHAO X, JI C, MA L, WU Z, CHENG W, YIN M. *ACS Sens.*, 2018, 3(10): 2112-2117.
- [26] LI P, ZHANG D, ZHANG Y, LU W, WANG W, CHEN T. *ACS Sens.*, 2018, 3(11): 2394-2401.
- [27] YU Zhi-Mei, LIAO Xing-Long, YU Jian-Yong, YANG Da-Cheng. *J. Org. Chem. Res.*, 2016, 4(3): 61-68.  
于治梅, 廖兴龙, 蔚建勇, 杨大成. 有机化学研究, 2016, 4(3): 61-68.
- [28] KLEINMAN E. *Comp. Org. Synth.*, 1991, 2: 893-951.
- [29] ZHAO W, LI C, LIU B, WANG X, LI P, WANG Y, WU C, YAO C, TANG T, LIU X, CUI D. *Macromolecules*, 2014, 47(16): 5586-5594.
- [30] ZHANG X, MOHAMED M G, XIN Z, KUO S W. *Polymer*, 2020, 201: 122552.
- [31] WU Hong-Mei, GUO Yu, CAO Jian-Fang, CHEN Qiang-Qiang. *Chin. J. Anal. Chem.*, 2018, 46(3): 379-385.  
吴红梅, 郭宇, 曹建芳, 陈强强. 分析化学, 2018, 46(3): 379-385.
- [32] HONG Y, LAM J W Y, TANG B Z. *Chem. Commun.*, 2009, (29): 4332-4353.
- [33] JOSHI N S, WHITAKER L R, FRANCIS M B. *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, 126(49): 15942-15943.
- [34] FILHO J F A, LEMOS B C, DE SOUZA A S, PINHEIRO S, GRECO S J. *Tetrahedron*, 2017, 73(50): 6977-7004.
- [35] LIN Q, FAN Y Q, GONG G F, MAO P P, WANG J, GUAN X W, LIU J, ZHANG Y M, YAO H, WEI T B. *ACS Sustainable Chem. Eng.*, 2018, 6(7): 8775-8781.
- [36] ZHANG S, WEN X, LONG M, XI J, HU J, TANG A. *J. Alloys Compd.*, 2020, 829: 154568.
- [37] ARSAWISSET S, TEEPOO S. *Anal. Chim. Acta*, 2020, 1118: 63-72.
- [38] LIU Q, ZENG X, TIAN Y, HOU X, WU L. *Talanta*, 2019, 202: 274-278.
- [39] HAN S, WANG J, JIA S. *Microchim. Acta*, 2014, 181(1-2): 147-153.
- [40] DING N, LI Z, HAO Y, YANG X. *Food Chem.*, 2022, 384: 132426.
- [41] XIN F, TIAN Y, JING J, ZHANG X. *Anal. Methods*, 2019, 11(23): 2969-2975.
- [42] ZACHUT M, SHAPIRO F, SILANIKOVE N. *Food Chem.*, 2016, 201: 270-274.

## Mannich Reaction Based Aggregation-induced Emission for Fluorescent Sensitive Detection of Formaldehyde

WU Jin-Dan<sup>#</sup>, CAO Ying-Zi<sup>#</sup>, CHEN Kai-Xin, ZHA Yong-Chao, LIU Hong-Shen,  
ZHOU Ping, LI Nan<sup>\*</sup>

(Key Laboratory of Biomaterials of College of Guangdong Province, Department of Biomedical Engineering,  
College of Life Science and Technology, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

**Abstract** Formaldehyde is a kind of colorless and odorless carcinogen that can cause many diseases. It is very necessary to develop a simple and sensitive detection method for formaldehyde in environmental monitoring, toxicological assessment, clinical diagnosis and medical care. Herein, a new fluorescence detection method was developed based on the aggregation-induced emission (AIE) effect for aqueous formaldehyde. An AIE probe of tetra(4-hydroxyphenyl) ethylene (TPE-4OH) was synthesized, which could react with formaldehyde by Mannich reaction in the presence of 1,2,4,5-benzenetetramine tetrahydrochloride (BTA), causing an obvious enhancement of

fluorescence of TPE-4OH. Due to the fluorescence enhancement of TPE-4OH related to the Mannich reaction and the concentration of formaldehyde, the detection of formaldehyde in the aqueous solution could be realized by measuring the fluorescence intensity of TPE-4OH. By optimizing the conditions of reactant concentration, solution pH value and reaction time, the linear range of detection of formaldehyde was from 1.0  $\mu\text{mol/L}$  to 2000  $\mu\text{mol/L}$ , and the detection limit was 1.0  $\mu\text{mol/L}$ . The results showed that this method had the potential in sensing/diagnosis applications of formaldehyde.

**Keywords** Formaldehyde; Fluorescent detection; Aggregation-induced emission; Mannich reaction; Molecular probe

(Received 2022-09-28; accepted 2022-11-23)

Supported by the Guangdong Basic and Applied Basic Research Foundation (No. 2020A1515010957).