

## 一种比率型荧光探针用于活性硫化物的检测

马玲<sup>1\*</sup>, 赵坤仪<sup>2</sup>, 赵安琪<sup>1</sup>, 张保柱<sup>1</sup>, 张雯佳<sup>3</sup>, 樊丽<sup>2\*</sup>

(1. 晋中学院 化学化工系, 山西 晋中 030619;

2. 山西大学 环境科学研究所, 山西 太原 030006;

3. 山西大学 国有资产与实验室管理处, 山西 太原 030006)

**摘要:** 谷胱甘肽(GSH)、同型半胱氨酸(Hcy)、半胱氨酸(Cys)和硫化氢(H<sub>2</sub>S)是生物体内一类重要的活性硫化物(RSS),参与细胞的氧化还原平衡,其异常变化被证实与多种生理病理过程密切相关。本文以N,N-二苯基胺基为电子供体(D),噻吩为 $\pi$ 桥,吡啶为电子受体(A),2,4-二硝基苯基为识别位点,设计合成了一个用于检测RSS的比率型荧光探针1-(4-(2,4-二硝基苯氧基)苄基)-4-(2-(5-(二苯基胺基)噻吩-2-基)乙烯基)溴化吡啶鎓盐(DTP)。通过紫外-可见吸收光谱和荧光光谱实验研究了探针DTP与RSS的相互作用。结果表明,探针DTP本身在642 nm处有荧光发射,当加入RSS后,荧光发射峰从642 nm蓝移至536 nm,溶液的荧光颜色也由桃红色变为黄绿色。通过荧光强度比值( $F_{536\text{ nm}}/F_{642\text{ nm}}$ )可实现对RSS(GSH/Hcy/Cys/H<sub>2</sub>S)的同时定量检测。高分辨质谱(HR-MS)数据证实探针DTP与RSS的作用机制主要是基于RSS对2,4-二硝基苯基醚的裂解作用。

**关键词:** 鎓盐; 荧光光谱; 作用机制; 定量检测

中图分类号: O436

文献标志码: A

文章编号: 0253-2395(2024)04-0823-10

## A Ratiometric Fluorescence Probe for Reactive Sulfur Species (RSS) Detection

MA Ling<sup>1\*</sup>, ZHAO Kunyi<sup>2</sup>, ZHAO Anqi<sup>1</sup>, ZHANG Baozhu<sup>1</sup>, ZHANG Wenjia<sup>3</sup>, FAN Li<sup>2\*</sup>

(1. Department of Chemistry and Chemical Engineering, Jinzhong University, Jinzhong 030619, China;

2. Institute of Environmental Science, Shanxi University, Taiyuan 030006, China;

3. State-owned Assets and Laboratory Management Office, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

**Abstract:** Glutathione (GSH), cysteine (Cys), homocysteine (Hcy) and hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) are important reactive sulfur species (RSS) in living organisms, which play important roles in physiological and pathological processes due to their antioxidant capacity. Herein, using N, N-diphenylamino as the electron donor group (D), thiophene as the  $\pi$  bridge, pyridine cation as the acceptor (A), and 2,4-dinitrophenyl (DNP) ether moiety as the recognition group, a ratiometric fluorescent probe, 1-(4-(2,4-dinitrophenoxy)benzyl)-4-(2-(5-(diphenylamino)thiophen-2-yl)vinyl)pyridin-1-ium bromide (DTP) was designed and synthesized for detecting RSS. The interaction between DTP and RSS was studied by UV-Vis absorption spectrometry and fluorescence spectrometry. The results found that probe DTP itself showed a fluorescence emission at 642 nm; when RSS were added, the fluorescence peak blue shifted from 642 nm to 536 nm; and the fluorescence color of the solution changed from peach to yellow green under a 365 nm UV lamp. The simultaneous quantitative detection of RSS could be achieved through fluorescence intensity ratio ( $F_{536\text{ nm}}/F_{642\text{ nm}}$ ). The high-resolution mass spectrometry (HR-MS) data confirmed that the reaction mechanism between DTP and RSS was mainly based on the cleavage of 2,4-dinitrophenylether by RSS.

**Key words:** onium salt; fluorescence spectrometry; reaction mechanism; quantitative detection

收稿日期: 2024-01-29; 接受日期: 2024-04-08

基金项目: 山西省基础研究计划资助项目(202303021221066); 山西省科技合作交流专项项目(202204041101040)

作者简介: 马玲(1979-), 女, 山西临汾人, 博士, 副教授, 研究方向为荧光探针与生物传感。E-mail: maling\_onlyone@163.com

\* 通信作者: 樊丽(FAN Li), E-mail: fanli128@sxu.edu.cn; 马玲(MA Ling)E-mail: maling\_onlyone@163.com

引文格式: 马玲, 赵坤仪, 赵安琪, 等. 一种比率型荧光探针用于活性硫化物的检测[J]. 山西大学学报(自然科学版), 2024, 47(4): 823-832. DOI: 10.13451/j.sxu.ns.2024068

## 0 引言

生物体内的谷胱甘肽(GSH)、同型半胱氨酸(Hcy)、半胱氨酸(Cys)和硫化氢( $H_2S$ )被称为活性硫化合物(RSS),它们参与生物体内的代谢过程,在氧化还原稳态、信号传导和代谢中起到重要作用<sup>[1-2]</sup>。RSS主要来源于食物中摄取的蛋氨酸,蛋氨酸经蛋氨酸腺苷转移酶等一系列酶促反应之后,代谢生成RSS以及其他物质,这是维持体内RSS正常生理浓度的一条重要代谢途径<sup>[3-4]</sup>。健康的生命是一种动态平衡的状态,当生命活动所需物质的代谢失调时,会导致生命活动异常,进而引发各种疾病的发生和发展,甚至死亡。研究表明,RSS的浓度异常与许多疾病的病理过程密切相关<sup>[5-8]</sup>。线粒体是细胞能量的主要来源,也是各种RSS的主要代谢场所<sup>[9-10]</sup>,同时,线粒体还是很多活性氧化物(ROS)的来源场所,通过检测抗氧化剂RSS的含量,可侧面反映ROS的水平。所以,研究开发快速同时检测RSS的工具,揭示RSS的生物合成途径与其在生物体内的浓度之间的关系是一个重要的研究方向<sup>[11-14]</sup>。

目前利用荧光探针进行识别和检测生物分子是一种重要的研究方法。与高效液相色谱法、电化学方法、质谱法等方法相比较<sup>[15-17]</sup>,荧光探针检测具有高灵敏度、低检测限、操作简便、实时监控等独特优势,并且在生物分子检测中得到广泛应用<sup>[18-21]</sup>。近年来,利用荧光探针检测RSS的报道中,大多数的探针是“关-开”型的荧光探针<sup>[19-28]</sup>,即荧光分子中识别基团与被测物相互作用后,通过探针分子的荧光发射强度的增强或者猝灭等现象,实现对被测物的检测。Zhang等<sup>[24]</sup>以硝基苯并恶二唑(NBD)为识别位点构建了一个基于噻唑衍生物的双光子“关-开”型荧光探针,由于光诱导电子转移(PET)使得探针本身几乎没有荧光( $\Phi=0.026$ )。当与RSS反应后,荧光信号增强( $\Phi=0.45$ ),实现了对RSS的同时检测,随后将其应用于生物成像检测RSS的浓度变化,并且从另一个角度反映了生物体系中ROS的水平<sup>[29]</sup>。但是,检测过程中荧光信号容易受到环境的干扰,如光漂白、探针分子局部环境和浓度、检测效率、细胞自发荧光等因素影响;而比

率型荧光探针通过同时调节两个发射通道信号而具有的自校准功能可以减少上述干扰,提高检测的准确度,有利于定量分析。目前,已报道的比率型荧光探针大多是分别检测GSH、Hcy、Cys、 $H_2S$ 或者其中两种的浓度变化,通过研究它们的生物学功能及代谢路径,加深对与其相关疾病的认识<sup>[5,30-37]</sup>。例如,Wei等<sup>[35]</sup>以丙烯酰氧基作为识别基团构建了比率型Cys荧光探针,利用荧光信号强度比值( $F_{595\text{ nm}}/F_{525\text{ nm}}$ )实现了对Cys的定量检测(线性范围 $0.1\ \mu\text{mol/L}\sim 9\ \mu\text{mol/L}$ ),检测限(LOD)为 $74\ \text{nmol/L}$ 。此外,Wang<sup>[37]</sup>等报道了基于荧光共振能量转移(FRET)发光机理的比率荧光探针,当与生物硫醇(GSH/Hcy/Cys)发生反应时,探针表现出明显的比率荧光探针特性,其荧光强度比率 $F_{512\text{ nm}}/F_{656\text{ nm}}$ 仅与GSH( $10\ \mu\text{mol/L}\sim 100\ \mu\text{mol/L}$ )呈线性关系。目前用于同时检测RSS的比率荧光探针未见报道,故此,发展具有选择性好、灵敏度高的比率荧光探针,且能实现对GSH/Hcy/Cys/ $H_2S$ 同时检测的比率型荧光探针具有重要意义和实际应用价值。

本文设计合成了一种比率型荧光探针1-(4-(2,4-二硝基苯氧基)苄基)-4-(2-(5-(二苯基氨基)噻吩-2-基)乙烯基)溴化吡啶鎓盐(DTP)用于GSH/Hcy/Cys/ $H_2S$ 的同时检测(图1)。DTP以N,N-二苯基胺基为电子给体(D),吡啶盐作为电子受体(A),通过噻吩连接构成D- $\pi$ -A的共轭体系。DTP本身在 $642\ \text{nm}$ 处具有红色发射;当加入RSS后,RSS与2,4-二硝基苯基发生亲核取代反应离去,释放出酚羟基中间体,继而发生分子内重排、消除反应使得烯酮(4-亚甲基二环己基-2,5-二烯-1-酮)离去,最后得到前体化合物6,同时发射波长由 $642\ \text{nm}$ 蓝移至 $536\ \text{nm}$ ,发射峰位移高达 $106\ \text{nm}$ 。荧光强度比值( $F_{536\text{ nm}}/F_{642\text{ nm}}$ )增强6倍。此外,在 $365\ \text{nm}$ 紫外灯的照射下,溶液的颜色由粉红色变为黄绿色,呈现出明显的比率荧光发射特性,见图1。

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

原料4-羟基苯甲醛、1-氟-2,4-二硝基苯、硼氢化钠( $\text{NaBH}_4$ )、三溴化硼( $\text{PBr}_3$ )、三(二亚

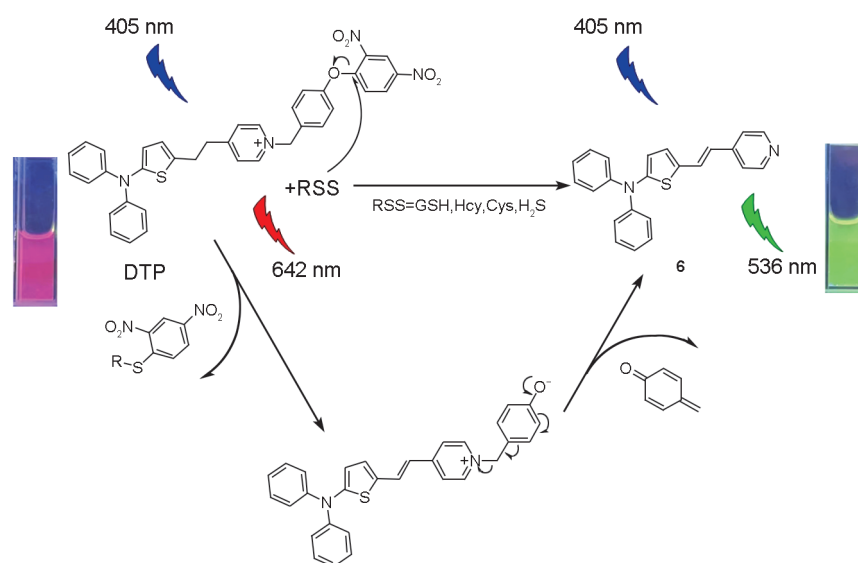


图1 探针DTP的结构及其对RSS的检测机理

Fig. 1 The structure of DTP and its detection mechanisms towards RSS

苊基丙酮)二钯( $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ )、三叔丁基膦四氟硼酸盐、三氯氧磷、4-吡啶乙酸盐酸盐等试剂均购自安耐吉化学试剂有限公司;所用试剂均为分析纯,使用前未进一步纯化;实验用水均为去离子水。

使用Bruker Avance III 600 MHz核磁共振仪进行化合物的 $^1\text{H}$  NMR和 $^{13}\text{C}$  NMR表征(瑞士布鲁克);利用Agilent 6520 Accurate-Mass-Q-TOF质谱仪进行质谱分析(美国安捷伦);使用TU-1901双光束紫外可见光谱仪(中国普析)和FLS-920爱丁堡荧光光谱仪(英国爱丁堡)进行紫外和荧光光谱测定实验。

## 1.2 探针的合成与表征

探针DTP的合成路线见图2。

化合物1的合成:50 mL圆底烧瓶中加入4-羟基苯甲醛(300 mg, 2.45 mmol),无水碳酸钾(680 mg, 4.92 mmol)和干燥的DMF(5 mL),室温搅拌5 min后,加入1-氟-2,4-二硝基苯(668 mg, 2.70 mmol)室温搅拌2 h。二氯甲烷萃取得到有机相,经过无水硫酸钠干燥,过滤,减压旋蒸除去溶剂,得到黄色粗产品,硅胶柱层析分离纯化(洗脱剂为石油醚/乙酸乙酯,8:1, V/V),得黄色固体(650 mg,产率92.1%)。

化合物2的合成:将化合物1(650 mg, 2.26 mmol)溶解在无水甲醇(10 mL)中,0 °C搅拌5 min。随后向上述溶液中加入 $\text{NaBH}_4$ (86 mg, 2.66 mmol),保持0 °C,  $\text{N}_2$ 保护条件下搅拌,4 h

后向其中加入蒸馏水(5 mL)淬灭反应,二氯甲烷萃取得到有机相,无水硫酸钠干燥,过滤,减压旋除溶剂,得到粗产品,硅胶柱层析分离纯化(洗脱剂为石油醚/乙酸乙酯,4:1, V/V),得黄色固体(590 mg,产率90.3%)。

化合物3的合成:0 °C条件下,取 $\text{PBr}_3$ (159  $\mu\text{L}$ , 1.68 mmol)逐滴加到化合物2(150 mg, 0.56 mmol)的干燥的二氯甲烷溶液中,搅拌6 h后,向其中加入蒸馏水,淬灭反应,乙酸乙酯萃取有机相,饱和 $\text{NaHCO}_3$ 水溶液洗涤,无水硫酸钠干燥,过滤,减压旋除溶剂,得到粗产品,硅胶柱层析分离纯化(洗脱剂为石油醚/乙酸乙酯,3:1, V/V),得黄色固体<sup>[38]</sup>(95 mg,产率48.2%)。 $^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 8.85 (d, 1H), 8.34 (dd,  $J_1 = 2.4$  Hz,  $J_2 = 9.6$  Hz, 1H), 7.52 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 7.12 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 7.08 (d,  $J = 9.6$  Hz, 1H), 4.53 (s, 2H)。  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 155.69, 153.55, 141.72, 139.75, 136.28, 131.45, 128.84, 122.13, 120.73, 118.84, 32.11。

化合物4的合成:Ar气保护下,100 mL干燥的三口瓶中,加入 $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ (91.6 mg, 0.1 mmol),三叔丁基膦四氟硼酸盐(58 mg, 0.2 mmol)以及干燥的甲苯(25 mL),搅拌,将混合物加热至30 °C脱气30 min,然后再加入二苯胺(846.2 mg, 5 mmol),2-溴噻吩(1.630 3 g, 10 mmol)以及叔丁醇钠(961 mg, 10 mmol),将混合物加热至回

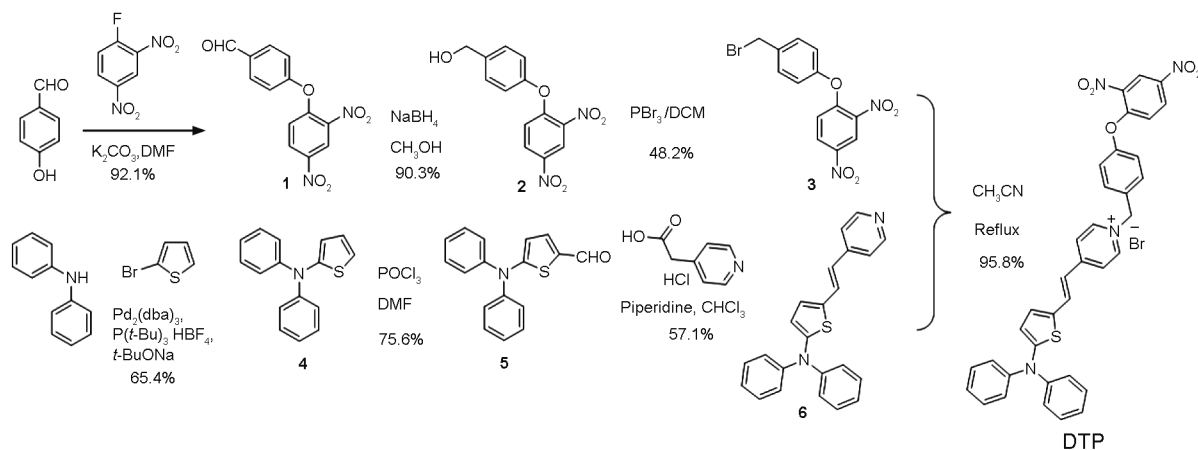


图2 探针DTP的合成路线

Fig. 2 The synthetic route of DTP

流,反应过夜,待原料完全反应完成后(薄层色谱法监控反应进程),冷却至室温。将反应液减压旋蒸除去溶剂,残留物溶解  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (100 mL) 中,依次用水,饱和食盐水洗涤,无水  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  干燥,过滤,将滤液减压旋蒸除去溶剂后得到粗产品,用硅胶柱层析色谱分离纯化(洗脱剂为石油醚),得黄色粉末固体(821.7 mg,产率 65.4%)。 $^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7.246 (dt,  $J_1 = 15.6$  Hz,  $J_2 = 2.4$  Hz, 4H), 7.116 (dt,  $J_1 = 8.4$  Hz,  $J_2 = 1.2$  Hz, 4H), 7.002 (m, 3H), 6.878 (dd,  $J_1 = 5.4$  Hz,  $J_2 = 3.6$  Hz, 1H), 6.716 (dd,  $J_1 = 3.6$  Hz,  $J_2 = 1.2$  Hz, 1H)。 $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 151.476, 148.026, 129.141, 125.908, 122.787, 122.340, 121.573, 120.863。

化合物 5 的合成: Ar 气保护下, 100 mL 干燥的三口瓶中, 将的化合物 4 (1.508 1 g, 6 mmol) 溶于干燥的 DMF (30 mL), 冰浴冷却至  $0^\circ\text{C}$ , 缓慢滴加三氯氧磷 (1.4 mL), 撤去冰水浴, 将反应体系缓慢加热至  $90^\circ\text{C}$  反应 2 h (薄层色谱法监控反应进程), 然后冷却至室温。将生成的红色反应液缓慢倒入冰水中,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  萃取有机相, 合并有机相, 饱和食盐水洗, 无水  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  干燥, 过滤, 将滤液减压旋蒸除去溶剂, 残留物用硅胶柱层析色谱分离纯化(洗脱剂为 PE/EA, 5:1, V/V), 得黄色固体 (1.266 8 g, 产率 75.6%)。 $^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 9.608 (s, 1H), 7.458 (d,  $J = 4.2$  Hz, 1H), 7.363 (dt,  $J_1 = 15.6$  Hz,  $J_2 = 2.4$  Hz, 4H),

7.282 (dt,  $J_1 = 8.4$  Hz,  $J_2 = 1.2$  Hz, 4H), 7.220 (m, 2H), 6.385 (d,  $J = 4.2$  Hz, 1H)。 $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 181.457, 164.271, 146.038, 138.323, 130.531, 129.847, 126.182, 125.526, 112.220。

化合物 6 的合成: 50 mL 圆底烧瓶中, 加入化合物 5 (279.4 mg, 1 mmol), 4-吡啶乙酸盐盐酸盐 (347.2 mg, 2 mmol), 干燥的  $\text{CHCl}_3$  (10 mL) 以及哌啶 (0.8 mL), 搅拌, 加热至回流反应 20 h (薄层色谱法监控反应进程), 冷却至室温。随后, 反应液中加  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 依次用水, 饱和食盐水洗涤, 有机相经过无水  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  干燥, 过滤, 减压旋蒸除去溶剂, 残留物用硅胶柱层析色谱分离纯化(洗脱剂为  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ , 80:1, V/V), 得黄棕色固体 (202.5 mg, 产率 57.1%)。 $^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 8.501 (dd,  $J_1 = 4.8$  Hz,  $J_2 = 1.8$  Hz, 2H), 7.298 (m, 5H), 7.221 (dd,  $J_1 = 4.8$  Hz,  $J_2 = 1.2$  Hz, 2H), 7.194 (dt,  $J_1 = 7.8$  Hz,  $J_2 = 1.2$  Hz, 4H), 7.092 (m, 2H), 6.889 (d,  $J = 3.6$  Hz, 1H), 6.515 (m, 2H)。 $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 153.048, 150.099, 147.336, 144.637, 133.878, 129.380, 128.067, 126.708, 123.958, 123.543, 122.856, 120.295, 118.553。HR-MS for  $\text{C}_{23}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{S}^+$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ): calcd. 355.126 4; found 355.125 4。

探针 DTP 的合成: 50 mL 圆底烧瓶中, 先后加入化合物 3 (282.5 mg, 0.8 mmol), 化合物 6 (141.8 mg, 0.4 mmol), 以及干燥的乙腈 (8 mL),

搅拌,将混合物加热至回流,继续反应 8 h,待原料完全反应完成后(薄层色谱法监控反应进程),冷却至室温。将反应液减压旋蒸除去溶剂,残留物用硅胶柱层析色谱分离纯化(洗脱剂为  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ , 15:1, V/V),得黑紫色固体(271.2 mg, 产率 95.8%)。 $^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 9.121 (d,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 8.810 (d,  $J = 2.4$  Hz, 1H), 8.342 (dd,  $J_1 = 9.0$  Hz,  $J_2 = 2.4$  Hz, 1H), 7.852 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 7.763 (d,  $J = 15.6$  Hz, 1H), 7.630 (d,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 7.360 (td,  $J_1 = 7.8$  Hz,  $J_2 = 1.8$  Hz, 4H), 7.227 (m, 7H), 7.099 (dd,  $J_1 = 9.6$  Hz,  $J_2 = 3.0$  Hz, 3H), 6.372 (d,  $J = 3.0$  Hz, 1H), 6.272 (d,  $J = 15.6$  Hz, 1H), 6.151 (s, 2H)。 $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 160.042, 155.158, 154.591, 153.649, 146.056, 143.227, 141.873, 139.720, 136.327, 135.924, 132.037, 131.991, 129.760, 129.075, 128.566, 125.935, 125.108, 122.022, 121.008, 119.481, 115.503, 114.200. HR-MS for  $\text{C}_{36}\text{H}_{27}\text{N}_4\text{O}_5\text{S}^+$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ): calcd. 627.169 7; found 627.169 1。

### 1.3 光谱性能的测定

以二甲亚砜(DMSO)为溶剂,配制浓度为  $2.0 \times 10^{-2}$  mol/L 的探针 DTP 储备液,配制不同 pH 值的磷酸缓冲溶液(PBS),待用。

以 DMSO/PBS (V/V = 1:1, pH 7.4) 为溶剂配制终浓度为  $10 \mu\text{mol/L}$  的 DTP 测试溶液,

测试溶液的体积为 2 mL。选择性实验中,用去离子水配制其它各种阴、阳离子和其他氨基酸浓度均为 10 mmol/L 的储备液。pH 影响的荧光光谱实验中缓冲液(DMSO/PBS, V/V=1:1)所选 pH 范围为 pH 3.0~10.0。所有光谱实验均在 37 °C 条件下进行。荧光光谱测试中所用激发光波长为 405 nm,激发和发射狭缝宽度均为 2 nm。

## 2 结果与讨论

### 2.1 探针 DTP 对 RSS 的光谱响应

首先初步探究了 DTP 在 DMSO/PBS (V/V=1:1, pH 7.4) 测试体系中与 RSS 反应前后的紫外吸收和荧光发射光谱图。如图 3(a) 所示, DTP 在 522 nm 处有最大吸收峰,加入 RSS 后,吸收峰蓝移至 404 nm,此处的吸收峰位置与化合物 6 保持一致。DTP 与 RSS 反应前后的荧光光谱的变化如图 3(b) 所示,当加入 RSS 后,探针 DTP 在 642 nm 处的荧光强度降低,并伴随着 536 nm 处的荧光强度明显增强,此处的发射峰峰位与化合物 6 一致。这一现象说明探针 DTP 与 RSS 反应生成的产物为前体化合物 6,并且可以通过荧光发射光谱的荧光强度比率值 ( $F_{536 \text{ nm}}/F_{642 \text{ nm}}$ ) 测定 RSS。

### 2.2 探针 DTP 对 RSS 的荧光滴定实验

随后,我们进行了 DTP 对 RSS 的荧光滴定实验。如图 4 所示,随着 RSS 浓度增大,探针在 642 nm 处的荧光强度逐渐降低,并伴随着

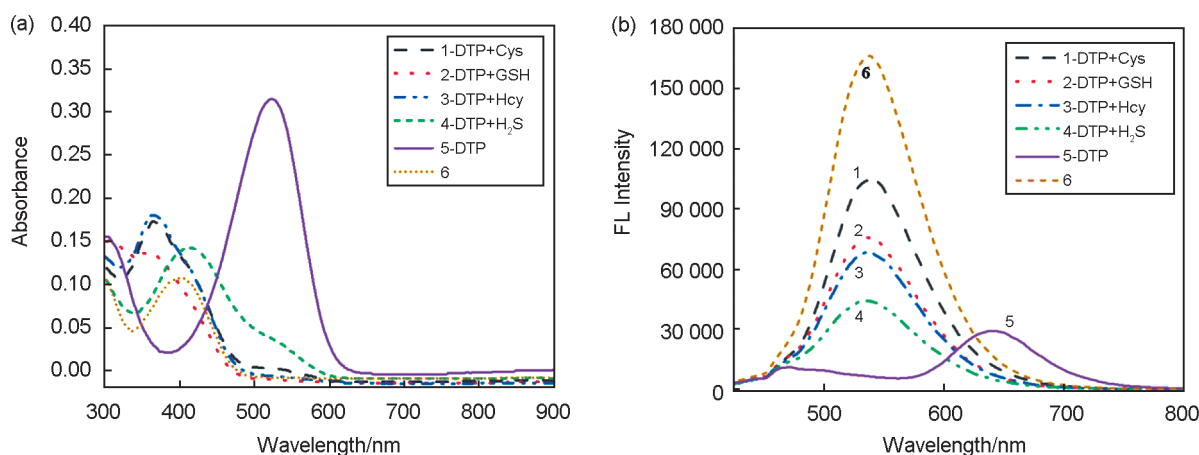


图3 DTP( $10 \mu\text{mol/L}$ )在DMSO/PBS(V/V = 1:1, pH 7.4)中与RSS( $500 \mu\text{mol/L}$ )反应前后的紫外吸收光谱图(a)及荧光光谱图(b)

Fig. 3 (a) Absorption spectra and (b) fluorescence spectra of DTP ( $10 \mu\text{mol/L}$ ) in the absence and presence of RSS ( $500 \mu\text{mol/L}$ ) in DMSO/PBS (V/V = 1:1, pH 7.4)

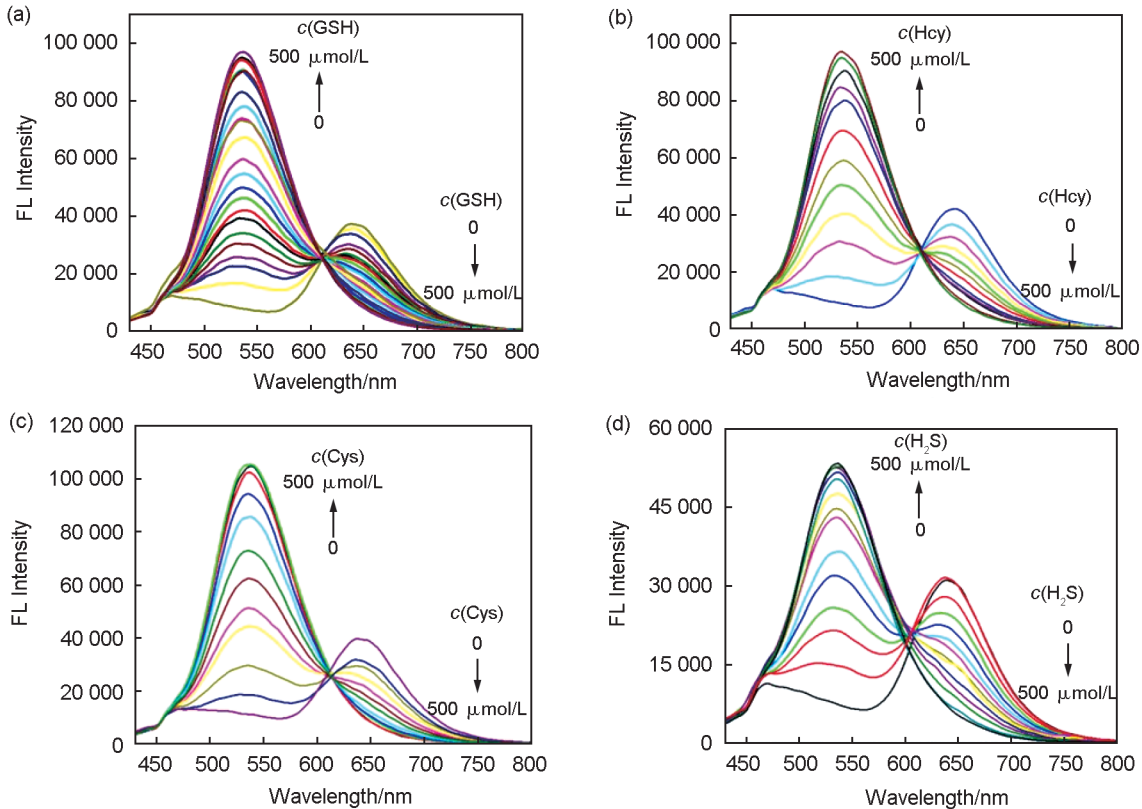


图4 DTP (10  $\mu\text{mol/L}$ )在DMSO/PBS( $V/V=1:1$ , pH 7.4)中与不同浓度RSS反应的荧光光谱图  
(a) GSH; (b) Hcy; (c) Cys; (d)  $\text{H}_2\text{S}$

Fig. 4 Fluorescence spectra of DTP (10  $\mu\text{mol/L}$ ) in the presence of various concentrations of RSS in DMSO/PBS ( $V/V=1:1$ , pH 7.4)

(a) GSH; (b) Hcy; (c) Cys; (d)  $\text{H}_2\text{S}$

536 nm 的荧光强度逐渐增强,在相应的测试范围内, RSS 的浓度与探针荧光强度比  $F_{536\text{ nm}}/F_{642\text{ nm}}$  之间具有较好的线性关系(图5),根据线性方程可以得出探针 DTP 对 GSH/Hcy/Cys/ $\text{H}_2\text{S}$  的检出限分别为 0.179 01  $\mu\text{mol/L}$  (0  $\mu\text{mol/L}$ ~100  $\mu\text{mol/L}$ ), 1.078 82  $\mu\text{mol/L}$  (0  $\mu\text{mol/L}$ ~400  $\mu\text{mol/L}$ ), 0.366 70  $\mu\text{mol/L}$  (25  $\mu\text{mol/L}$ ~300  $\mu\text{mol/L}$ ), 0.792 68  $\mu\text{mol/L}$  (0  $\mu\text{mol/L}$ ~500  $\mu\text{mol/L}$ ) ( $\text{LOD}=3\sigma/k$ ), 结果表明,利用探针 DTP 可实现对 RSS 的定量检测。与已报道的文献相比<sup>[31-37]</sup>,探针 DTP 对 RSS (GSH/Hcy/Cys/ $\text{H}_2\text{S}$ ) 的荧光响应是同一固定激发波长条件下进行的,这样更有利于 RSS (GSH/Hcy/Cys/ $\text{H}_2\text{S}$ ) 的同时定量检测。此外,我们还进行了 DTP 对 RSS 响应时间的测定,如图 6 所示。当 DTP 中加入 RSS 后, DTP 的荧光强度比  $F_{536\text{ nm}}/F_{642\text{ nm}}$  随着与 RSS 反应时间的增加迅速增加,随后达到一个平台,相比较而言探针 DTP 与  $\text{H}_2\text{S}$  的反应时间较为缓慢。

### 2.3 pH 对探针 DTP 与 RSS 作用的影响

进一步记录了不同 pH 值条件下 DTP 与 RSS 反应荧光的信号变化。如图 7 所示,在 pH 为 3.0~10.0 的范围内, DTP 在测试体系中本身的荧光强度比值  $F_{536\text{ nm}}/F_{642\text{ nm}}$  几乎不变,说明探针 DTP 在该 pH 范围内稳定性较好;当加入 RSS 后,在 pH 值在 6.0~10.0 范围内荧光强度比值  $F_{536\text{ nm}}/F_{642\text{ nm}}$  明显升高。这些结果说明该探针 DTP 非常适用于生理环境下 RSS 的检测。

### 2.4 探针 DTP 对 RSS 的选择性研究

我们探究了 DTP 对 RSS 的选择性识别能力。在 DTP 溶液中分别加入相同浓度的 RSS (GSH, Hcy, Cys,  $\text{H}_2\text{S}$ )、金属阳离子 ( $\text{Sn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ )、阴离子 ( $\text{ClO}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ;  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ ) 和一些氨基酸分子 ( $L$ -酪氨酸 (Tyr),  $L$ -色氨酸 (Try),  $L$ -亮氨酸 (Leu),  $L$ -谷氨酸 (Glu),  $L$ -天冬氨酸 (Asp),  $L$ -组氨酸 (His),  $L$ -精氨酸 (Arg)), 测定其荧光发射光谱。结果发

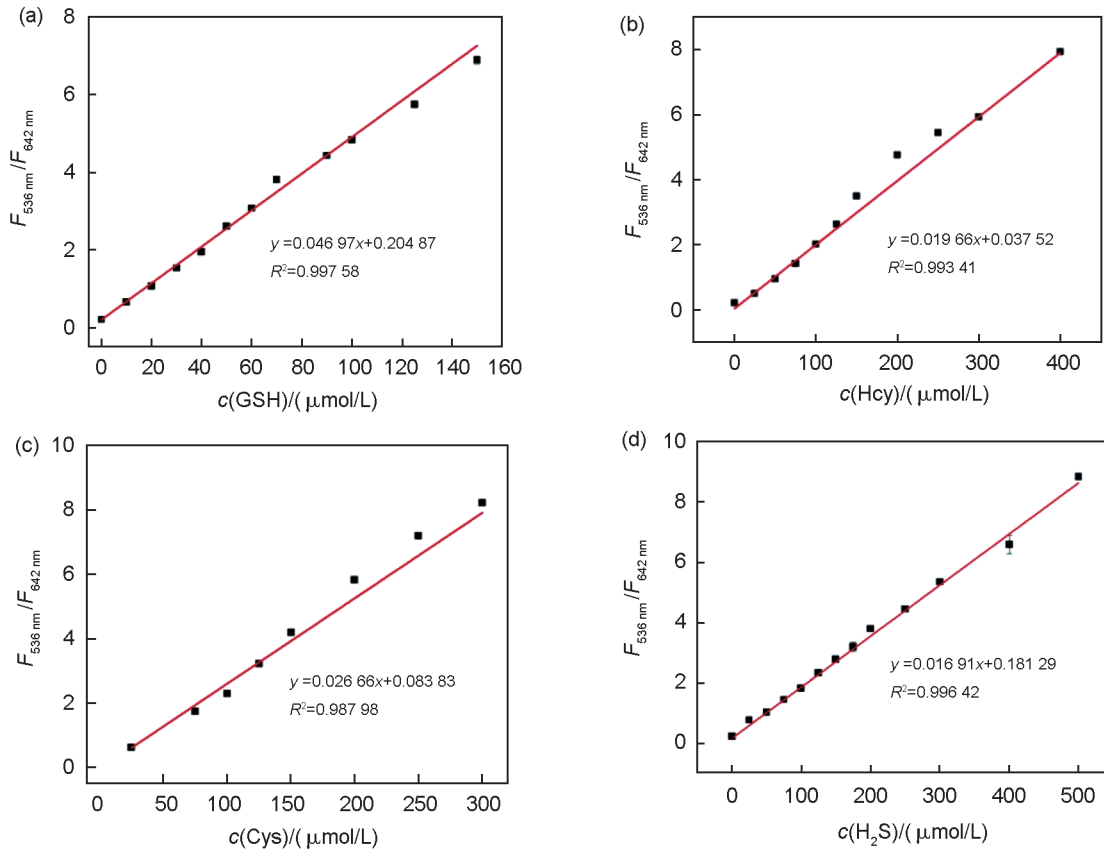


图5 DTP(10 μmol/L)在DMSO/PBS(V/V=1:1,pH 7.4)中与不同浓度RSS反应的荧光强度比( $F_{536\text{ nm}}/F_{642\text{ nm}}$ )与RSS浓度(0~500 μmol/L)的线性关系图

(a) GSH; (b) Hcy; (c) Cys; (d) H<sub>2</sub>S

Fig. 5 The linear relationship between fluorescence intensity ratio ( $F_{536\text{ nm}}/F_{642\text{ nm}}$ ) of DTP (10 μmol/L) in the presence of RSS (0~500 μmol/L) and RSS concentration in DMSO/PBS (V/V=1 : 1, pH 7.4)

(a) GSH; (b) Hcy; (c) Cys; (d) H<sub>2</sub>S

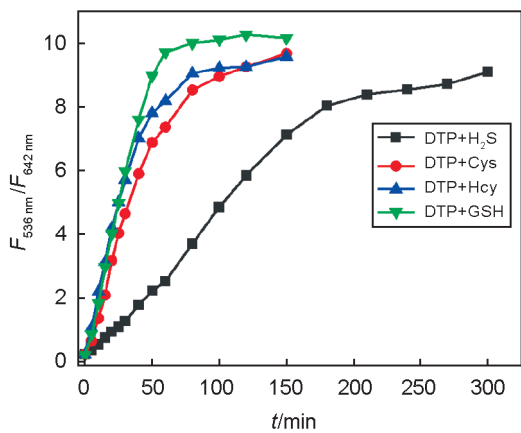


图6 DTP(10 μmol/L)在DMSO/PBS(V/V=1:1, pH 7.4)中与RSS反应的荧光强度比( $F_{536\text{ nm}}/F_{642\text{ nm}}$ )与反应时间关系图

Fig. 6 The relationship between fluorescence intensity ratio ( $F_{536\text{ nm}}/F_{642\text{ nm}}$ ) of DTP (10 μmol/L) with time in the presence of RSS in DMSO/PBS (V/V=1 : 1, pH 7.4)

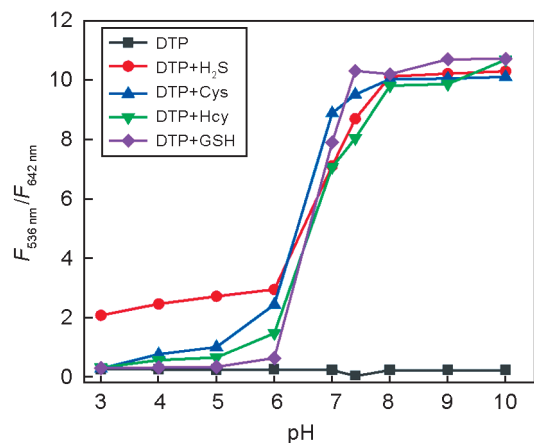


图7 DTP(10 μmol/L)在DMSO/PBS(V/V=1:1, pH 7.4)中与RSS在不同pH条件下反应的荧光强度比( $F_{536\text{ nm}}/F_{642\text{ nm}}$ )与pH的关系图

Fig. 7 The relationship between fluorescence intensity ratio ( $F_{536\text{ nm}}/F_{642\text{ nm}}$ ) of DTP (10 μmol/L) with pH in the presence of RSS in DMSO/PBS (V/V=1 : 1, pH 7.4)

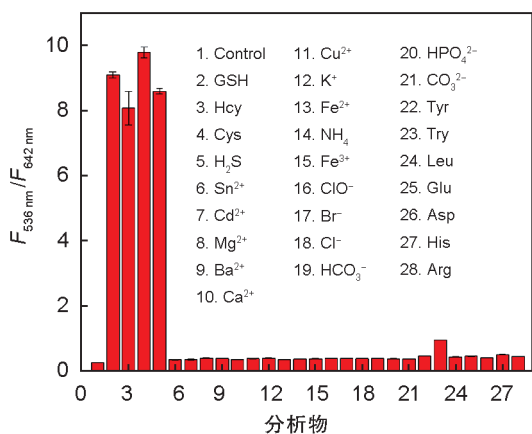


图8 DTP (10  $\mu\text{mol/L}$ )在DMSO/PBS( $V/V=1:1$ , pH 7.4)中与RSS以及其它分析物反应的荧光强度比( $F_{536\text{nm}}/F_{642\text{nm}}$ )与分析物的关系图

Fig. 8 The relationship between fluorescence intensity ratio ( $F_{536\text{nm}}/F_{642\text{nm}}$ ) of DTP (10  $\mu\text{mol/L}$ ) towards RSS and other different analytes in DMSO/PBS ( $V/V=1:1$ , pH 7.4)

现只有DTP在与RSS反应时,探针的荧光强度比( $F_{536\text{nm}}/F_{642\text{nm}}$ )出现显著变化,而加入其他物质后,探针的荧光强度比值没有明显变化。这表明探针DTP对RSS具有良好的选择性(图8)。

### 2.5 探针DTP与RSS的作用机理

探针DTP以2,4-二硝基苯基为识别基团,根据相关的文献[19],推测了探针DTP与RSS的反应机理。由于硫原子的高亲核性,RSS与2,4-二硝基苯基发生亲核取代反应离去,释放出的酚羟基中间体发生分子内重排、消除反应,使得烯酮离去,生成前体化合物6(图1)。为证实这一推测,我们进行了高分辨质谱实验,如图9(a)和(b)所示, $m/z=627.1291$ 和 $m/z=355.1264$ 分别为DTP的分子离子峰和化合物6的质子离子峰( $[6+H]^+$ 理论值为 $m/z=355.1264$ )。向DTP中加入RSS(GSH/Hcy/Cys/H<sub>2</sub>S)反应一段时间后, $m/z=627.1291$ 处的峰丰度降低,同时 $m/z=355.1254$ 附近出现了新的质谱峰,该峰值与化合物6的质子离子峰相吻合(图9(c))。结合探针DTP与RSS反应前后的光谱图变化以及高分辨质谱实验结果,可以证实DTP与RSS作用后确实生成了化合物6。

### 2.6 探针DTP的结构新颖性

与已报道的荧光探针相比<sup>[12,19-37]</sup>,探针DTP的新颖性表现在以下几个方面:首先,探

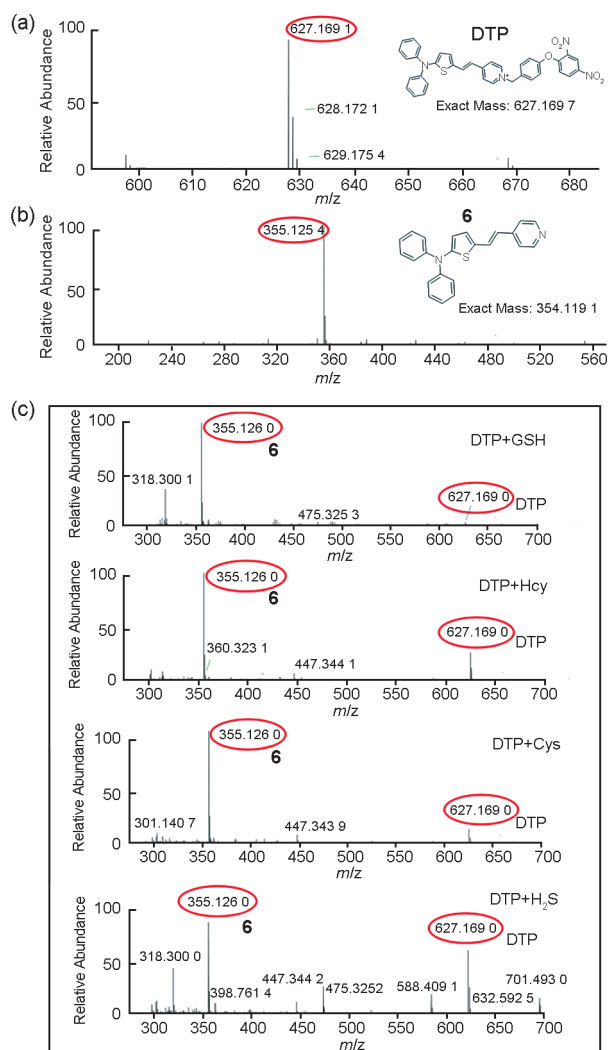


图9 DTP(a),化合物6(b)以及探针DTP与RSS反应后(c)的高分辨质谱图

Fig. 9 The HR-MS of DTP (a), compound 6 (b) and DTP reacted with RSS (c)

针DTP是基于二苯基-噻吩单元的新型荧光探针;其次,探针DTP在固定的激发波长( $\lambda_{\text{ex}}=405\text{nm}$ )条件下,实现对RSS(GSH/Hcy/Cys/H<sub>2</sub>S)的同时检测;此外,探针DTP是一种比率型荧光探针,通过其荧光发射强度比值( $F_{536\text{nm}}/F_{642\text{nm}}$ )可反映RSS的浓度变化,具有较高的准确度。目前的比率型荧光探针未见可以在同一激发波长下,同时检测RSS的报道,这些特性为DTP的实际应用奠定了很好的基础。

## 3 结论

综上所述,我们设计合成了一种以2,4-二硝基苯基为识别基团,N,N-二苯基氨基-噻吩-吡啶(D- $\pi$ -A)为主体,用于同时检测RSS

(GSH/Hcy/Cys/H<sub>2</sub>S)的比率型荧光探针 DTP。通过核磁共振和高分辨质谱对 DTP 进行了结构表征,并对 DTP 与 RSS 反应的光谱行为进行深入研究。结果表明,探针 DTP 在 DMSO/PBS (V/V=1:1, pH 7.4) 体系中可以同时识别 RSS (GSH/Hcy/Cys/H<sub>2</sub>S),其荧光光谱呈现比率荧光响应特性,发射峰位移达到 106 nm,溶液的荧光颜色发生由粉红色变为黄绿色,检测限低,灵敏度高。探针 DTP 与 RSS 的作用机理结果显示经过硫解反应,释放烯酮,得到前体化合物 6。该探针与 RSS 的作用为比率型荧光探针的设计提供一种新思路,通过探针 DTP 可实现对 RSS 的同时检测,可为间接研究 ROS 的变化提供依据。

#### 参考文献:

- [1] BOUILLAUD F, BLACHIER F. Mitochondria and Sulfide: A Very Old Story of Poisoning, Feeding, and Signaling? [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2011, **15**(2): 379-391. DOI: 10.1089/ars.2010.3678.
- [2] SZABÓ C. Hydrogen Sulphide and Its Therapeutic Potential[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2007, **6**: 917-935. DOI: 10.1038/nrd2425.
- [3] STEIN A, BAILEY S M. Redox Biology of Hydrogen Sulfide: Implications for Physiology, Pathophysiology, and Pharmacology[J]. *Redox Biol*, 2013, **1**(1): 32-39. DOI: 10.1016/j.redox.2012.11.006.
- [4] STIPANUK M H. Sulfur Amino Acid Metabolism: Pathways for Production and Removal of Homocysteine and Cysteine[J]. *Annu Rev Nutr*, 2004, **24**: 539-577. DOI: 10.1146/annurev.nutr.24.012003.132418.
- [5] LAN J S, LIU L, LI Z, *et al.* A Multi-signal Mitochondria-targeted Fluorescent Probe for Simultaneously Distinguishing Biothiols and Realtime Visualizing Its Metabolism in Cancer Cells and Tumor Models[J]. *Talanta*, 2024, **267**: 125104. DOI: 10.1016/j.talanta.2023.125104.
- [6] YU X, HUANG Y N, TAO Y Q, *et al.* Mitochondria-targetable Small Molecule Fluorescent Probes for the Detection of Cancer-associated Biomarkers: A Review[J]. *Anal Chim Acta*, 2024, **1289**: 342060. DOI: 10.1016/j.aca.2023.342060.
- [7] WANG K, LIU C Y, ZHU H C, *et al.* Recent Advances in Small-molecule Fluorescent Probes for Diagnosis of Cancer Cells/Tissues[J]. *Coord Chem Rev*, 2023, **477**: 214946. DOI: 10.1016/j.ccr.2022.214946.
- [8] NAIR R R, AN J M, KIM J, *et al.* Review: Recent Progress in Fluorescent Molecular Systems for the Detection of Disease-related Biomarkers in Biofluids[J]. *Coord Chem Rev*, 2023, **494**: 215336. DOI: 10.1016/j.ccr.2023.215336.
- [9] 姚惠文,郭小峰,王红. 细胞器靶向型气体信号分子荧光探针的研究进展[J]. *分析科学学报*, 2022, **38**(2): 251-259. DOI:10.13526/j.issn.1006-6144.2022.02.021.
- YAO H W, GUO X F, WANG H. Recent Advances of Organelle-Targetable Fluorescent Probes for Gaseous Signaling Molecules[J]. *J Anal Sci*, 2022, **38**(2): 251-259. DOI: 10.13526/j.issn.1006-6144.2022.02.021.
- [10] LIU F R, JING J, ZHANG X L. Research Progress of Fluorescent Probes for Cysteine Targeting Cellular Organelles[J]. *Chin J Org Chem*, 2023, **43**(6): 2053. DOI: 10.6023/cjoc202209005.
- [11] DONG J N, LU G W, TU Y Y, *et al.* Recent Research Progress of Red-emitting/Near-infrared Fluorescent Probes for Biothiols[J]. *New J Chem*, 2022, **46**(23): 10995-11020. DOI: 10.1039/D1NJ06244A.
- [12] ZHU H C, LIU C Y, ZHANG H M, *et al.* A Simple Long-wavelength Fluorescent Probe for Simultaneous Discrimination of Cysteine/Homocysteine and Glutathione/Hydrogen Sulfide with Two Separated Fluorescence Emission Channels by Single Wavelength Excitation[J]. *Anal Sci*, 2020, **36**(2): 255-259. DOI: 10.2116/analsci.19P214.
- [13] YUE Y K, HUO F J, CHENG F Q, *et al.* Functional Synthetic Probes for Selective Targeting and Multi-analyte Detection and Imaging[J]. *Chem Soc Rev*, 2019, **48**(15): 4155-4177. DOI: 10.1039/c8cs01006d.
- [14] XU Z Y, QIN T Y, ZHOU X F, *et al.* Fluorescent Probes with Multiple Channels for Simultaneous Detection of Cys, Hcy, GSH, and H<sub>2</sub>S[J]. *Trac Trends Anal Chem*, 2019, **121**: 115672. DOI: 10.1016/j.trac.2019.115672.
- [15] CHEN W, ZHAO Y, SEEFELDT T, *et al.* Determination of Thiols and Disulfides via HPLC Quantification of 5-thio-2-nitrobenzoic Acid[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2008, **48**(5): 1375-1380. DOI: 10.1016/j.jpba.2008.08.033.
- [16] WEN M, LIU H Q, ZHANG F, *et al.* Amorphous FeNiPt Nanoparticles with Tunable Length for Electrocatalysis and Electrochemical Determination of Thiols[J]. *Chem Commun*, 2009(30): 4530-4532. DOI: 10.1039/b907379e.
- [17] ELWAER A R, MCLEOD C W, THOMPSON K C. Online Separation and Determination of Bromate in Drinking Waters Using Flow Injection ICP Mass Spectrometry[J]. *Anal Chem*, 2000, **72**(22): 5725-5730. DOI: 10.1021/ac0007433.
- [18] DAI J N, MA C G, ZHANG P, *et al.* Recent Progress in the Development of Fluorescent Probes for Detection of Biothiols[J]. *Dyes Pigm*, 2020, **177**: 108321. DOI: 10.1016/

- j.dyepig.2020.108321.
- [19] CHEN X D, HE D, YANG X R, *et al.* Construction of Bifunctional Fluorescent Probe for Two-step Cascade Recognition of Hydrogen Sulfide and Biothiols in Biological System[J]. *Sens Actuat B Chem*, 2023, **381**: 133440. DOI: 10.1016/j.snb.2023.133440.
- [20] LIU T T, LI S J, ZHANG X S, *et al.* A Facile Probe for Fluorescence Turn-on and Simultaneous Naked-eyes Discrimination of H<sub>2</sub>S and Biothiols (Cys and GSH) and Its Application[J]. *J Fluoresc*, 2022, **32**(1): 175–188. DOI: 10.1007/s10895-021-02838-6.
- [21] ZHENG Y L, CHAI Z H, TANG W, *et al.* A Multi-signal Mitochondria-targetable Fluorescent Probe for Simultaneously Discriminating Cys/Hcy/H<sub>2</sub>S, GSH, and SO<sub>2</sub> and Visualizing the Endogenous Generation of SO<sub>2</sub> in Living Cells[J]. *Sens Actuat B Chem*, 2021, **330**: 129343. DOI: 10.1016/j.snb.2020.129343.
- [22] ZHANG X Q, JIN X D, ZHANG C T, *et al.* A Fluorescence Turn-on Probe for Hydrogen Sulfide and Biothiols Based on PET & TICT and Its Imaging in HeLa Cells[J]. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 2021, **244**: 118839. DOI: 10.1016/j.saa.2020.118839.
- [23] ZHANG H, XU L Z, CHEN W Q, *et al.* Simultaneous Discrimination of Cysteine, Homocysteine, Glutathione, and H<sub>2</sub>S in Living Cells Through a Multisignal Combination Strategy[J]. *Anal Chem*, 2019, **91**(3): 1904–1911. DOI: 10.1021/acs.analchem.8b03869.
- [24] ZHANG D T, DU W, PENG B, *et al.* Two-photon Small Molecular Fluorogenic Probe Visualizing Biothiols and Sulfides in Living Cells, Mice Brain Slices and Zebrafish[J]. *Sens Actuat B Chem*, 2020, **323**: 128673. DOI: 10.1016/j.snb.2020.128673.
- [25] LAN J S, ZENG R F, LIU Y, *et al.* A Near-infrared Nile Red Fluorescent Probe for the Discrimination of Biothiols by Dual-channel Response and Its Bioimaging Applications in Living Cells and Animals[J]. *Analyst*, 2019, **144** (11): 3676–3684. DOI: 10.1039/C9AN00280D.
- [26] ZHANG J, JI X, ZHOU J L, *et al.* Pyridinium Substituted BODIPY as NIR Fluorescent Probe for Simultaneous Sensing of Hydrogen Sulphide/Glutathione and Cysteine/Homocysteine[J]. *Sens Actuat B Chem*, 2018, **257**: 1076–1082. DOI: 10.1016/j.snb.2017.10.133.
- [27] ZHANG H, XU L Z, CHEN W Q, *et al.* A Lysosome-targetable Fluorescent Probe for Simultaneously Sensing Cys/Hcy, GSH, and H<sub>2</sub>S from Different Signal Patterns[J]. *ACS Sens*, 2018, **3**(12): 2513–2517. DOI: 10.1021/acssensors.8b01101.
- [28] YAN H M, HUO F J, YUE Y K, *et al.* Rapid Reaction, Slow Dissociation Aggregation, and Synergetic Multicolor Emission for Imaging the Restriction and Regulation of Biosynthesis of Cys and GSH[J]. *J Am Chem Soc*, 2021, **143**(1): 318–325. DOI: 10.1021/jacs.0c10840.
- [29] HARRIS C, HANSEN J M. Oxidative Stress, Thiols, and Redox Profiles[J]. *Methods Mol Biol*, 2012, **889**: 325–346. DOI: 10.1007/978-1-61779-867-2\_21.
- [30] ZHAO Y X, LI L Y, YE Q Z, *et al.* Reaction-activated Disassembly of the NIR-II Probe Enables Fast Detection and Ratiometric Photoacoustic Imaging of Glutathione in Vivo[J]. *Anal Chem*, 2023, **95**(37): 14043–14051. DOI: 10.1021/acs.analchem.3c02664.
- [31] GONG S, QIN A H, ZHANG Y, *et al.* A New Ratiometric AIE Fluorescent Probe for Detecting Cysteine in Food Samples and Imaging in the Biological System[J]. *Food Chem*, 2023, **400**: 134108. DOI: 10.1016/j.foodchem.2022.134108.
- [32] HAN Y J, LI X S, LI D, *et al.* Selective, Rapid, and Ratiometric Fluorescence Sensing of Homocysteine in Live Neurons via a Reaction-kinetics/Sequence-differentiation Strategy Based on a Small Molecular Probe[J]. *ACS Sens*, 2022, **7**(4): 1036–1044. DOI: 10.1021/acssensors.1c02684.
- [33] QIN X, LIU X Y, WANG J, *et al.* A NIR Ratiometric Fluorescent Probe for the Rapid Detection of Hydrogen Sulfide in Living Cells and Zebrafish[J]. *Talanta*, 2024, **266**(Pt 1): 125043. DOI: 10.1016/j.talanta.2023.125043.
- [34] SHI Y, HUO F J, YUE Y K, *et al.* N-positive Ion Activated Rapid Addition and Mitochondrial Targeting Ratiometric Fluorescent Probes for in Vivo Cell H<sub>2</sub>S Imaging[J]. *Front Chem Sci Eng*, 2022, **16**(1): 64–71. DOI: 10.1007/s11705-021-2048-8.
- [35] WEI Y N, LIN B, SHU Y, *et al.* Mitochondria-targeted Ratiometric Fluorescent Imaging of Cysteine[J]. *Analyst*, 2021, **146**(14): 4642–4648. DOI: 10.1039/d1an00758k.
- [36] YUE P, YANG X L, NING P, *et al.* A Mitochondria-targeted Ratiometric Two-photon Fluorescent Probe for Detecting Intracellular Cysteine and Homocysteine[J]. *Talanta*, 2018, **178**: 24–30. DOI: 10.1016/j.talanta.2017.08.085.
- [37] WANG L, WANG J B, XIA S, *et al.* A FRET-based Near-infrared Ratiometric Fluorescent Probe for Detection of Mitochondria Biothiol[J]. *Talanta*, 2020, **219**: 121296. DOI: 10.1016/j.talanta.2020.121296.
- [38] FENG S M, GONG S Y, ZHENG Z P, *et al.* Smart Dual-response Probe Reveals an Increase of GSH Level and Viscosity in Cisplatin-induced Apoptosis and Provides Dual-channel Imaging for Tumor[J]. *Sens Actuat B Chem*, 2022, **351**: 130940. DOI: 10.1016/j.snb.2021.130940.