

新型四苯乙烯衍生物的设计合成及其在羧酸酯酶活性分析中的应用

杨阳^{a,b} 黄嫣嫣^{a,b} 张关心^{*,a} 赵睿^{a,b} 张德清^{*,a,b}

(^a 中国科学院化学研究所 有机固体院重点实验室 活体分析院重点实验室 北京 100190)

(^b 中国科学院大学 北京 100049)

摘要 设计合成了一个含有 *p*-乙酰氧基苄基单元的四苯乙烯吡啶盐衍生物, 利用羧酸酯酶选择性地切除乙酰基以及所致的连锁反应将其从水溶性吡啶盐结构转为中性吡啶结构, 使其聚集, 实现荧光“点亮”, 从而发展了新型的羧酸酯酶活性分析和抑制剂筛选的荧光探针。

关键词 聚集诱导发光; 四苯乙烯; 荧光传感器; 羧酸酯酶

A New Fluorometric Turn-on Assay for Carboxylesterase and Inhibitor Screening Based on Aggregation Induced Emission Behavior of Tetraphenylethylene Molecules

Yang, Yang^{a,b} Huang, Yanyan^{a,b} Zhang, Guanxin^{*,a} Zhao, Rui^{a,b} Zhang, Deqing^{*,a,b}

(^a CAS Key Laboratories of Organic Solids and Analytical Chemistry for Living Biosystems, Institute of Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100190)

(^b University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049)

Abstract It is known that carboxylesterase (CaE) are a group of isoenzymes commonly distributed in mammalian organs, and they can catalyze the hydrolysis of carboxyl ester. As a result, they play an important role in detoxification of narcotics or chemical toxin clearance. Moreover, they serve as important drug candidates for protein-based therapeutics or drug targets for chemotherapeutic prodrug activation. It is reported recently that human plasma carboxylesterase can be a novel biomarker candidate for hepatocellular carcinoma. Therefore, establishing a reliable fluorescent system for detecting carboxylesterase is of great importance in terms of biochemical studies as well as clinical applications. Herein, we report a new fluorometric turn-on assay for carboxylesterase activity and inhibitor screening with compound **1** by utilizing the aggregation-induced emission (AIE) feature of tetraphenylethylene (TPE) molecules. The sensing mechanism is illustrated in Figure 1 and explains as follows: (i) the pyridinium moiety may render compound **1** water-soluble. As a result it is anticipated that compound **1** is weakly emissive in aqueous solutions according to previous studies; (ii) the incubation of carboxylesterase with compound **1** can result in cleaving the carboxylic ester bond, followed by hydrolysis and 1,6-elimination of *p*-quinonemethide to yield the *p*-pyridine substituted TPE (TPE-Py). TPE-Py is not soluble in aqueous solutions, thus aggregation will occur and turn on the fluorescence of TPE moiety based on the AIE feature of TPE compounds. In this way, compound **1** can be employed for the fluorescence turn-on assay for carboxylesterase activity. The results reveal that the buffer solution of compound **1** emitted very weakly. However, the green fluorescence emission was switched on after addition of carboxylesterase. Carboxylesterase at concentrations as low as 5.67×10^{-5} U/mL can be assayed with compound **1**. Further results clearly indicate that compound **1** can be utilized not only for carboxylesterase activity assay but also for the corresponding inhibitor screening. More importantly, this probe can be applied for detection of carboxylesterases in living cells.

Keywords aggregation induced emission; tetraphenylethylene; fluorescence sensor; carboxylesterase

1 引言

羧酸酯酶(Carboxylesterase, CaE)是水解酶的一种, 能有效地催化酯类和酰胺类化合物水解, 主要存在于多种组织的内质网和胞质中, 参与许多药物、环境毒物和前致癌物的代谢激活或发挥解毒作用, 同时羧酸酯酶还参与人体内胆固醇酯和游离脂肪酸的运输和代谢过

程^[1]。近年来, 大量研究表明, 羧酸酯酶在体内浓度的异常会引起各种疾病, 如肝癌及抗结核药物肝毒性, 乳腺癌, 子宫癌, 前列腺癌等^[2]。因此, 发展羧酸酯酶活性分析方法不仅对于癌症的早期诊断而且对生物医药的研究都具有非常重要的价值。

目前羧酸酯酶常用的检测方法有高效液相色谱法^[3]、气质联用法^[4]、化学发光法^[5]以及荧光光度法^[6]

* E-mail: dqzhang@iccas.ac.cn

Received August 15, 2016; published October 8, 2016.

Supporting information for this article is available free of charge via the Internet at <http://sioc-journal.cn>.

Project supported by the 973 Program (Nos. 2013CB733700, 2013CB834700) and Beijing Natural Science Foundation (No. 2162048).

项目受科技部国家重点基础研究发展计划(Nos. 2013CB733700, 2013CB834700)和北京市自然科学基金(No. 2162048)资助。

等. 其中, 荧光光度法因其高灵敏度、简单、快速以及高通量筛选的特点而尤其受到关注^[7]. 至目前, 有关羧酸酯酶检测的荧光探针已经有了不少报道, 主要是通过酯酶的水解作用调控苯酰亚胺、试卤灵等衍生物的结构和荧光, 实现检测^[6]. 例如, 马会民研究员课题组^[6a]利用羧酸酯酶选择性的切断试卤灵 7 位的乙酰氧基苄基单元来激活试卤灵的荧光, 发展了羧酸酯酶的荧光探针. 尽管羧酸酯酶荧光分析方法发展迅速, 但现有方法大多数仍然存在不足, 例如荧光探针分子的合成复杂、信噪比低, 灵敏度低等问题. 因此, 发展简单而高效的羧酸酯酶检测方法仍然是十分必要的.

2001 年唐本忠院士等^[8]报道了一类具有特殊荧光性质的分子材料(硅杂环戊二烯), 该分子在良溶剂中几乎不发光, 而在不良溶剂中聚集产生很强的荧光. 他们通过理论计算和实验分析明确了其机理, 并提出了聚集诱导发光(AIE)的概念^[9]. 由于具有 AIE 性质的化合物从根本上解决了聚集导致荧光猝灭的难题, 因此引起了研究人员的极大关注. 至目前, AIE 的研究在众多领域都取得了很大的发展^[9-12], 已成为近年来化学领域的研究热点, 尤其是在荧光传感领域. 因为 AIE 分子可以克服传统的荧光分子在生物体内因为各种憎水性和静电相互作用等因素导致的聚集诱导荧光猝灭的不足, 提高分析检测的灵敏性, 为高效荧光传感器的制备提供了很好的平台.

四苯乙烯由于合成简单、易于修饰等特点是目前研究最为深入的 AIE 分子^[9,10]. 我们课题组围绕四苯乙烯衍生物的设计、合成及其传感应用开展了系列工作, 如通过调控四苯乙烯分子的聚集和解聚, 调控体系荧光, 构筑了系列高效的金属离子、阴离子、中性分子、生物大分子以及酶活性检测的荧光探针^[13-17]. 在此基础上, 我们设计了一个基于 AIE 性质的新型羧酸酯酶活性分析和抑制剂筛选的新方法. 其设计原理如图 1 所示: (1) 探针分子(1)结构如图 1 所示, 由于吡啶盐单元的存在使该探针易溶于水, 因此体系几乎没有荧光; (2) 羧酸酯酶可以选择性的切除乙酰基, 并迅速发生 1,6 位消除反应得到含有吡啶基团的四苯乙烯衍生物 TPE-Py; 该分子水溶性差, 会在水相中聚集从而产生强的绿色荧光. 利用这种荧光变化, 可实现对羧酸酯酶的活性分析.

2 结果与讨论

化合物 1 的合成路线如图 2 所示, 首先 TPE-Py 与 4-乙酰氧基苄溴反应得到化合物 2, 进一步通过阴离子交换即得到化合物 1. 其结构和纯度分别通过核磁共振、质谱和元素分析确认.

如图 S1 所示, 化合物 1 具有聚集诱导发光性质: 其在二氯甲烷中几乎没有荧光($\Phi=1.2\%$), 而随着不良溶剂正己烷的加入, 体系的荧光逐渐增强. 当正己烷的比例达到 99.8%时, 其荧光强度达到最大($\Phi=31.5\%$). 通

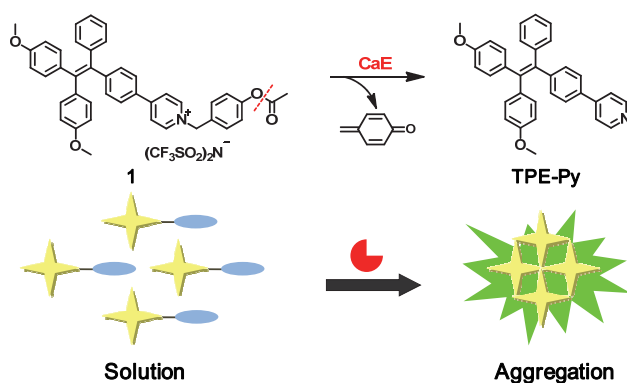


图 1 探针分子的化学结构和检测原理

Figure 1 The chemical structure of probe 1 and the detection rationale for CaE

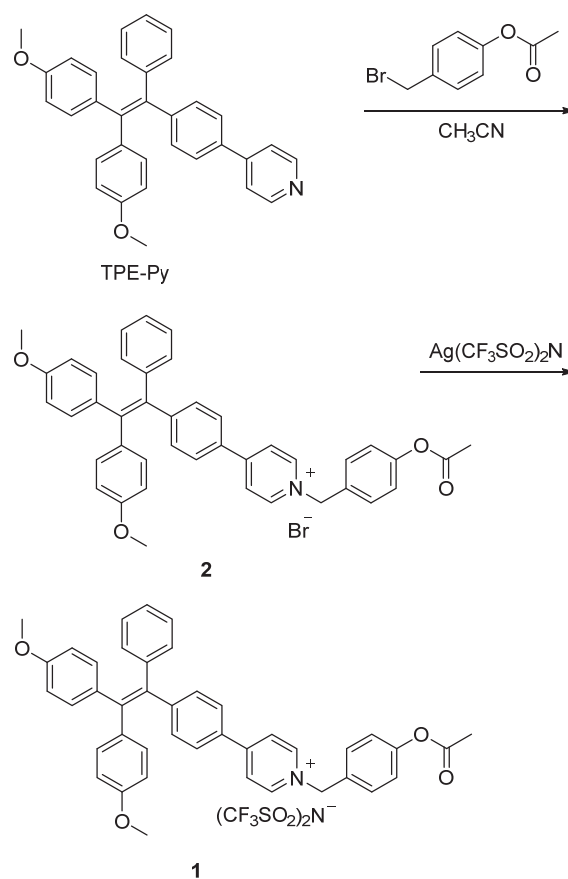


图 2 探针分子的合成路线

Figure 2 The synthetic route for compound 1

过对测试条件的优化(见支持材料), 我们选择检测实验在含 20% DMSO 的 PBS 缓冲液(pH=7.4, 10.0 mmol/L)中进行. 如图 3 所示, 化合物 1 在 PBS 缓冲液(pH=7.4, 10.0 mmol/L)中的荧光发射很微弱. 然而, 当加入羧酸酯酶(CaE)之后荧光迅速增强, 并且体系荧光随着加入 CaE 后孵化时间的增长而逐渐增强. 例如, 当加入 CaE (0.1 U/mL)孵化 90 min 后, 体系在 505 nm 处的荧光强度

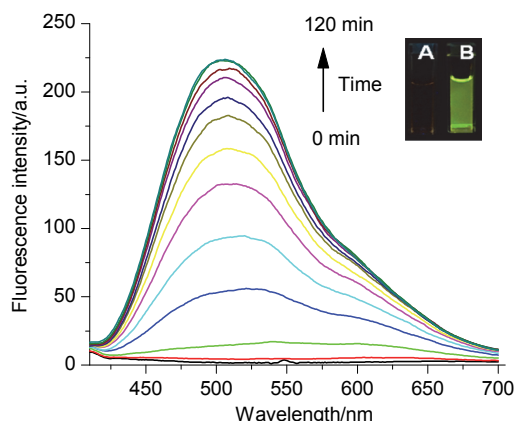


图 3 加入 0.1 U/mL CaE 后, 化合物 **1** (5 $\mu\text{mol/L}$) 在含 20% DMSO 的 PBS 缓冲液 (10 mmol/L) 中孵化不同时间的荧光光谱; 插图为 365 nm 紫外灯照射下化合物 **1** (5 $\mu\text{mol/L}$) 溶液在加入 CaE (0.1 U/mL) 前 (A) 以及加入 CaE 反应 120 min 后 (B) 的荧光照片

Figure 3 The fluorescence spectra of **1** [5 $\mu\text{mol/L}$ in PBS (10 mmol/L) buffer solution (pH=7.4), containing 20% DMSO] in the presence of CaE (0.1 U/mL) after incubation at 37 $^{\circ}\text{C}$ for different times; inset shows the photo of the corresponding solutions of **1** without (A) and with (B) CaE (0.1 U/mL) after incubation at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 120 min under UV light (365 nm) illumination

增加了 200 倍. 并且加入 CaE 前后体系荧光的变化肉眼可见 (图 3 的插图).

如图 1 所示的设计原理, 上述体系的荧光增强应由于化合物 **1** 的酶解产物 TPE-Py 的聚集所致. 为此, 首先我们通过质谱确认了化合物 **1** 与羧酸酯酶作用后体系中有 TPE-Py 生成 (图 S4). 此外我们也通过荧光显微镜成像和动态光散射实验确认了这种聚集现象的发生. 由荧光显微镜照片 (图 4) 可知, 加入羧酸酯酶之前并没有观测到荧光聚集体, 而在加入羧酸酯酶与探针孵化后, 体系中有明显的绿色荧光聚集体的生成. 同时, 如图 S5 所示动态光散射分析显示, 粒径从反应前平均 80 nm 增大

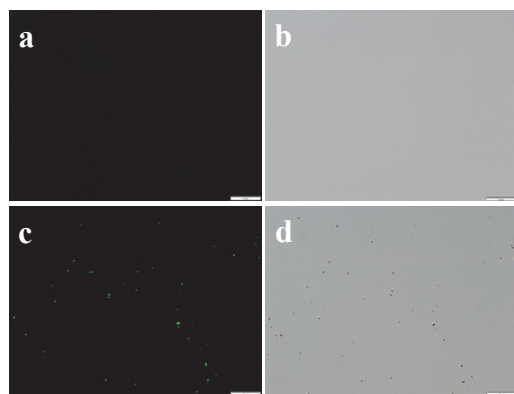


图 4 化合物 **1** (5 $\mu\text{mol/L}$) 与 CaE (0.1 U/mL) 孵化前 (a 和 b) 和孵化后 (c 和 d) 的荧光显微镜照片. 孵化条件: 在含 20% DMSO 的 pH=7.4 PBS (10 mmol/L) 缓冲液中 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵化 120 min

Figure 4 Microscope image of **1** [5 $\mu\text{mol/L}$ in PBS (10 mmol/L) buffer solution (pH=7.4), containing 20% DMSO] in the absence (a and b) and presence (c and d) of CaE (0.1 U/mL) after incubation at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 120 min. Scale bar = 10 μm

至反应后平均 500 nm, 证实了明显的聚集发生. 因此, 通过以上研究表明化合物 **1** 在羧酸酯酶的作用下, 生成 TPE-Py, 进而发生聚集, 导致荧光增强.

进一步为了确认化合物 **1** 作为羧酸酯酶探针是否具有特异性, 我们选择了 8 种可能存在干扰的物质在相同的实验条件下进行了选择性实验, 分别为: 无机盐 (氯化钙、氯化镁)、活性氧物质 (过氧化氢、次氯酸根离子)、半胱氨酸、维生素 C、人血清白蛋白和牛血清白蛋白. 如图 5 所示, 只有化合物 **1** 与羧酸酯酶作用后体系才有显著的荧光变化, 其它物质几乎没有响应. 因此, 该探针对于羧酸酯酶具有特异性的响应.

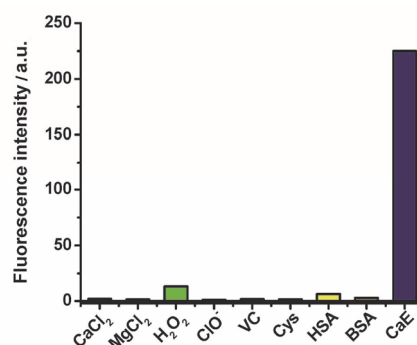


图 5 化合物 **1** (5 $\mu\text{mol/L}$) 与不同物质作用后 505 nm 处的荧光强度对比: 氯化钙 (50 mmol/L), 氯化镁 (50 mmol/L), 过氧化氢 (50 mmol/L), 次氯酸根离子 (50 mmol/L), 半胱氨酸 (50 mmol/L), 维生素 C (50 mmol/L), 人血清白蛋白 (100 mmol/L), 牛血清白蛋白 (100 mmol/L) 和羧酸酯酶 (0.1 U/mL). 测试条件: 含 20% DMSO 的 pH=7.4 PBS (10 mmol/L) 缓冲液中 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵化 120 min

Figure 5 Fluorescence responses of **1** (5 $\mu\text{mol/L}$) at 505 nm to various species: CaCl_2 (50 mmol/L), MgCl_2 (50 mmol/L), H_2O_2 (50 mmol/L), ClO^- (50 mmol/L), vitamin C (VC, 50 mmol/L), cysteine (Cys., 50 mmol/L), human serum albumin (HSA, 100 mmol/L), bovine serum albumin (BSA, 100 mmol/L) and carboxylesterase (CaE, 0.1 U/mL). The measurements were performed in PBS (10 mmol/L) buffer solution (pH=7.4) containing 20% DMSO and the data were collected after incubation at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 120 min

接下来我们考察了不同浓度的羧酸酯酶与探针孵化后荧光光谱的变化. 图 6a 显示的是加入不同浓度 (0~0.1 U/mL) 羧酸酯酶时体系在 505 nm 处的荧光强度随时间的变化曲线. 从图中可以很明显的看出, 加入羧酸酯酶后孵化一段时间, 体系的荧光强度值逐渐增加. 而且当羧酸酯酶的浓度较高时, 荧光强度增加得更为迅速. 这是由于当酶的浓度较高时, 化合物 **1** 被水解的速率较快. 另外, 通过线性拟合 (图 6b) 可以看出, 在羧酸酯酶浓度范围为 0.005~0.05 U/mL 时, 体系在 505 nm 处的荧光强度值与羧酸酯酶的浓度成很好的线性关系, 通过计算得到检测限为 5.67×10^{-5} U/mL, 因此该分子是目前已报道的几个高灵敏度羧酸酯酶探针之一.^[6a,6d]

在羧酸酯酶的活性分析中, 我们发现在相同的时间内高浓度的酶水解更多的化合物 **1**, 使得体系荧光强度更强. 因此, 我们进一步尝试将化合物 **1** 应用于羧酸酯酶的抑制剂筛选. 我们选择了一种商品化的羧酸酯酶抑

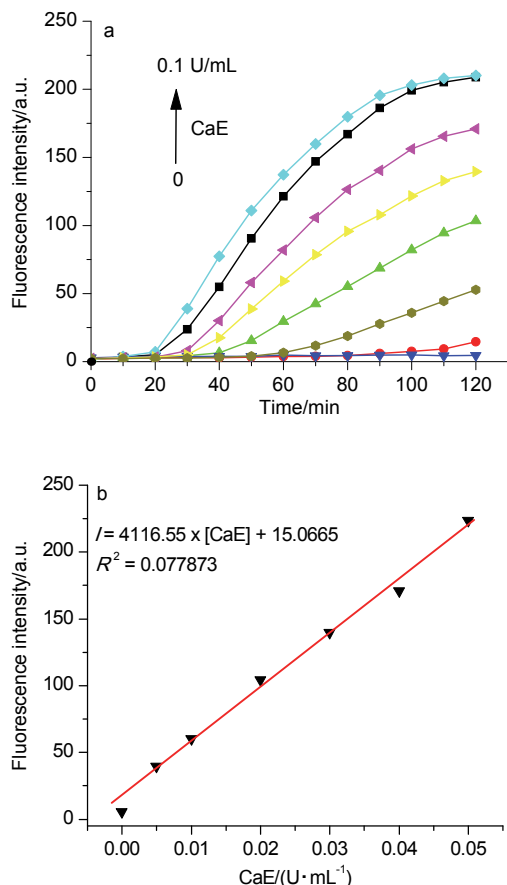


图6 (a) 加入不同浓度CaE (0, 0.005, 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05和0.1 U/mL)与化合物1 (5 $\mu\text{mol/L}$)作用后在505 nm处的荧光强度随时间的变化曲线;(b) CaE浓度在0~0.05 U/mL区间与505 nm处荧光强度的线性关系。测试条件: 含20% DMSO的pH=7.4 PBS缓冲液中37 $^{\circ}\text{C}$ 孵化

Figure 6 (a) Variation of the fluorescence intensity at 505 nm vs. the reaction time at CaE concentrations (from bottom to top): 0 (control), 0.005, 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05 and 0.1 U/mL; (b) the plot of the fluorescence intensity against the CaE concentration in the range of 0~0.05 U/mL. The measurements were performed in PBS (10 mmol/L) buffer solution (pH=7.4) containing 20% DMSO and the data were collected after incubation at 37 $^{\circ}\text{C}$ for different time

制剂 4-(2-氨基乙基)苯磺酰氟盐酸盐(AEBSF)开展如下研究。图7显示了由化合物1 (5 $\mu\text{mol/L}$)和CaE (0.1 U/mL)组成的混合溶液在不同浓度AEBSF存在时505 nm处的荧光强度随反应时间的变化。当加入AEBSF的量逐渐增加时(0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8和2.0 mmol/L), 溶液的荧光强度增加速度逐渐变小, 在相同的反应时间内, 含高浓度抑制剂的溶液荧光比含低浓度抑制剂的溶液荧光弱, 表明化合物1的水解受到抑制, 因此利用这种荧光强度的变化可以很方便地实现CaE酶的抑制剂筛选。另外, 通过图S6可以计算得到该体系中AEBSF的 IC_{50} 为0.8 mmol/L, 该数值与文献报道的数值接近^[6]。

为了评估该探针在生物体系中的实际应用价值, 我们开展了HeLa细胞中羧酸酯酶的活性检测实验。将

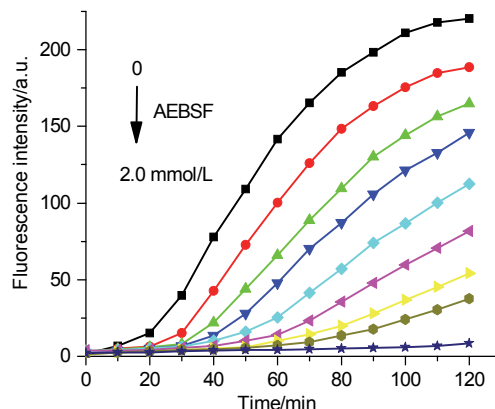


图7 不同浓度AEBSF (0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8, 2.0 mmol/L)加入后, 体系在505 nm处荧光随时间的变化。测试条件: 探针1 (5 $\mu\text{mol/L}$)和CaE (0.1 U/mL), 在含20% DMSO的pH=7.4 PBS缓冲液中37 $^{\circ}\text{C}$ 孵化

Figure 7 Fluorescence response of 1 (5 $\mu\text{mol/L}$) and CaE (0.1 U/mL) in the presence of different concentrations of AEBSF (0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8 and 2.0 mmol/L). The measurements were performed in PBS (10 mmol/L) buffer solution (pH=7.4) containing 20% DMSO and the data were collected after incubation at 37 $^{\circ}\text{C}$ for different time

HeLa细胞用5 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的化合物1处理60 min后, 通过荧光共聚焦显微镜可以清晰地看到细胞内的绿色荧光(图8b), 而没有经过化合物1处理的细胞中没有观察到荧光(图8a)。细胞实验结果表明化合物1可以渗透到细胞内并被细胞内的CaE水解为TPE-Py。由于低溶解性, TPE-Py发生聚集诱发出绿色荧光。因此该探针分子适用于细胞内羧酸酯酶检测并进行实时成像。

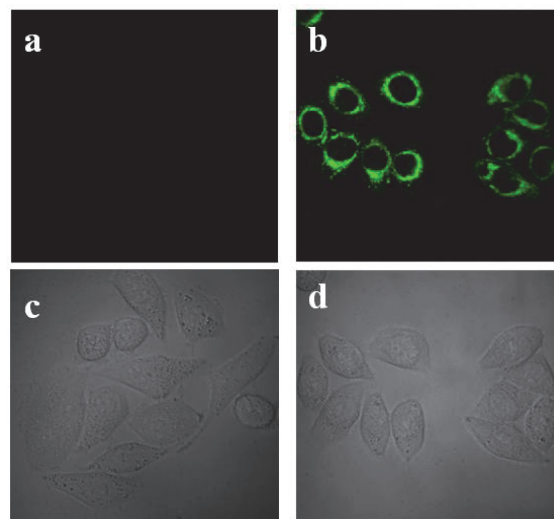


图8 不加(a)和加(b)探针1孵化120 min后的HeLa细胞荧光照片,(c)和(d)为相应明场对比图

Figure 8 Confocal fluorescence images of HeLa cells. (a) HeLa cells only; (b) HeLa cells were incubated with 1 (5 $\mu\text{mol/L}$) for 120 min; the differential interference contrast (DIC) images of the corresponding samples are shown below (c and d)

3 结论

本文设计合成了一个含有 *p*-乙酰氧基苄基单元的四苯乙烯吡啶盐衍生物, 利用四苯乙烯的聚集诱导发光性质和酶促的连锁反应调控四苯乙烯单元的聚集态, 从而调控其荧光, 构建了一个新型荧光点亮的羧酸酯酶检测探针, 最低检测浓度可以达到 5.67×10^{-5} U/mL. 而且进一步研究表明该探针可以应用于抑制剂筛选和细胞内羧酸酯酶检测.

4 实验部分

4.1 探针分子的合成

化合物 **2**: 在 50 mL 单口瓶中加入 TPE-Py (100 mg, 0.21 mmol)、4-溴甲基乙酸苯酯(243.9 mg, 1.06 mmol)和 30 mL 无水乙腈, 氮气氛围下加热回流 5 h. 待反应体系冷却至室温, 旋蒸除去溶剂后柱层析纯化产品, 淋洗剂为二氯甲烷/甲醇(20 : 1, *V/V*), 得到亮黄色固体(化合物 **2**), 产率为 84%. m.p. 65.1~65.9 °C. ^1H NMR (400 MHz, methanol-*d*₄) δ : 8.93 (d, *J*=6.4 Hz, 2H), 8.32 (d, *J*=6.4 Hz, 2H), 7.78 (d, *J*=8.4 Hz, 2H), 7.56 (d, *J*=8.4 Hz, 2H), 7.25~7.21 (m, 4H), 7.13 (d, *J*=6.4 Hz, 3H), 7.03~7.01 (m, 2H), 6.97~6.91 (m, 4H), 6.69~6.65 (m, 4H), 5.79 (s, 2H), 3.71 (d, *J*=4 Hz, 6H), 2.28 (s, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, methanol-*d*₄) δ : 170.9, 160.4, 160.2, 157.8, 153.5, 151.0, 145.6, 145.0, 144.1, 139.2, 137.1, 137.0, 134.0, 133.8, 133.7, 132.5, 132.34, 132.31, 131.5, 129.1, 128.7, 127.7, 125.8, 124.2, 114.4, 114.2, 64.0, 55.7, 20.9. ESI-MS: calcd for $\text{C}_{42}\text{H}_{36}\text{NO}_4^+$ (M^+): 618.74; found 618.4. Anal. calcd for $\text{C}_{42}\text{H}_{36}\text{BrNO}_4 \cdot (\text{H}_2\text{O})_{1.5}$: C 69.52, H 5.42, N 1.93; found C 69.33, H 5.50, N 1.91.

化合物 **1**: 将双(三氟甲基磺酰基)酰亚胺银(62 mg, 0.10 mmol)用 3 mL 去离子水溶解加入甲醇溶解的化合物 **2** (46.6 mg, 0.12 mmol)溶液中, 室温搅拌过夜, 反应完毕后, 将反应液倒入水中, 二氯甲烷萃取反应体系, 饱和食盐水洗涤三次, 合并有机相, 无水硫酸钠干燥, 过滤旋干, 使用柱层析纯化产品, 淋洗剂为二氯甲烷/甲醇(20 : 1, *V/V*), 得到橙红色固体化合物 **1**, 产率 93.2%. m.p. 89.5~90.7 °C. ^1H NMR (400 MHz, methanol-*d*₄) δ : 8.90 (d, *J*=6.8 Hz, 2H), 8.32 (d, *J*=6.8 Hz, 2H), 7.78 (d, *J*=8.4 Hz, 2H), 7.55 (d, *J*=8.4 Hz, 2H), 7.25~7.22 (m, 4H), 7.14~7.13 (m, 3H), 7.03~7.01 (m, 2H), 6.97~6.91 (m, 4H), 6.69~6.65 (m, 4H), 5.77 (s, 2H), 3.71 (d, *J*=4 Hz, 6H), 2.28 (s, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, methanol-*d*₄) δ : 171.0, 160.4, 160.2, 157.8, 153.5, 151.0, 145.6, 145.0, 144.2, 139.2, 137.1, 137.0, 134.0, 133.8, 133.7, 132.5, 132.33, 132.31, 131.5, 129.1, 128.7, 127.7, 125.8, 124.2, 122.9, 119.7, 114.4, 114.2, 64.1, 55.7, 20.9. ESI-MS: calcd for $\text{C}_{42}\text{H}_{36}\text{NO}_4^+$ (M^+): 618.74; found 618.4. Anal. calcd

for $\text{C}_{44}\text{H}_{36}\text{F}_6\text{N}_2\text{O}_8\text{S}_2$: C 58.79, H 4.04, N 3.12; found C 58.67, H 4.28, N 3.06.

4.2 HeLa 细胞中的 CaE 检测

HeLa 细胞保持在含有 10%胎牛血清的 DMEM (Gibco)中, 温度控制在 37 °C, 放置在含有 5%湿的 CO_2 气氛中. 每次使用前都要在培养基上预处理 20 h. 使用前将 HeLa 细胞用 DMEM 清洗 3 次, 然后加入化合物 **1** (5 $\mu\text{mol/L}$)与细胞孵化 60 min, 直接在激光扫描共聚焦显微镜下观察、拍照.

References

- [1] (a) Satoh, T.; Hosokawa, M. *Chem. Biol. Interact.* **2006**, *162*, 195; (b) Jokanović, M. *Toxicol. Lett.* **2009**, *188*, 1; (c) Hosokawa, M. *Molecules* **2008**, *13*, 412; (d) Nagashima, S.; Yagyu, H.; Takahashi, N.; Takahashi, M.; Tsuchita, T.; Tazoe, F.; Wang, X.; Bayasgalan, T.; Sato, N.; Okada, K.; Nagasaka, S.; Gotoh, T.; Kojima, M.; Hyodo, M.; Horie, H.; Hosoya, Y.; Okada, M.; Yasuda, Y.; Fujiwara, H.; Ohwada, M.; Iwamoto, S.; Suzuki, M.; Nagai, H.; Ishibashi, S. *J. Atheroscler. Thromb.* **2011**, *18*, 190.
- [2] (a) Na, K.; Lee, E.; Lee, H.; Kim, K.; Lee, H.; Jeong, S.; Jeong, A.; Cho, S.; Kim, S.; Song, S.; Kim, K.; Cho, S.; Kim, H.; Paik, Y. *Proteomics* **2009**, *9*, 3989; (b) Yamada, S.; Richardson, K.; Tang, M.; Halaschek-Wiener, J.; Cook, V.; FitzGerald, J.; Elwood, K.; Marra, F.; Brooks-Wilson, A. *Pharmacogenomics J.* **2010**, *10*, 524.
- [3] (a) Yue, Q.; Yang, H.; Li, D.; Wang, J. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2009**, *153*, 169; (b) Koitka, M.; Höchel, J.; Obst, D.; Rottman, A.; Gieschen, H.; Borchert, H. *Anal. Biochem.* **2008**, *381*, 113.
- [4] Koo, Y.; Yoon, E.; Song, J.; Seo, H.; Kim, J.; Lee, Y.; Lee, J.; Cheong, J.; Choi, Y. *J. Chromatogr. B* **2008**, *863*, 80.
- [5] Steinkamp, T.; Schweppe, F.; Krebs, B.; Karst, U. *Analyst* **2003**, *128*, 29.
- [6] (a) Zhang, Y.; Chen, W.; Feng, D.; Shi, W.; Li, X.; Ma, H. *Analyst* **2012**, *137*, 716; (b) Wu, Y.; Huang, S.; Zeng, F.; Wang, J.; Yu, C.; Huang, J.; Xie, H.; Wu, S. *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 12791; (c) Gao, M.; Hu, Q.; Feng, G.; Tang, B.; Liu, B. *J. Mater. Chem. B* **2014**, *2*, 3438; (d) Jin, Q.; Feng, L.; Wang, D.; Dai, Z.; Wang, P.; Zou, L.; Liu, Z.; Wang, J.; Yu, Y.; Ge, G.; Cui, J.; Yang, L. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, *7*, 28474.
- [7] (a) Sinkeldam, R.; Greco, N.; Tor, Y. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 2579; (b) Zhang, X.; Yin, J.; Yoon, J. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 4918; (c) Carter, K.; Young, A.; Palmer, A. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 4564; (d) Li, X.; Gao, X.; Shi, W.; Ma, H. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 590; (e) Du, J.; Hu, M.; Fan, J.; Peng, X. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 4511; (f) Kim, H.; Guo, Z.; Zhu, W.; Yoon, J.; Tian, H. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 79; (g) Huang, X.; Zhang, G.; Zhang, D. *Acta Chim. Sinica* **2012**, *70*, 2133. (黄显虹, 张关心, 张德清, 化学学报, **2012**, *70*, 2133.)
- [8] Luo, J.; Xie, Z.; Lam, J.; Cheng, L.; Chen, H.; Qiu, C.; Kwok, H.; Zhan, X.; Liu, Y.; Zhu, D.; Tang, B. *Chem. Commun.* **2001**, *18*, 1740.
- [9] Hong, Y.; Lam, J.; Tang, B. *Chem. Commun.* **2009**, *29*, 4332.
- [10] (a) Hong, Y.; Lam, J.; Tang, B. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 5361; (b) Mei, J.; Leung, N.; Kwok, R.; Lam, J.; Tang, B. *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 11718.
- [11] (a) Liang, J.; Tang, B.; Liu, B. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 2798. (b) Lu, H.; Xu, B.; Dong, Y.; Chen, F.; Li, Y.; Li, Z.; He, J.; Li, H.; Tian, W. *Langmuir* **2010**, *26*, 6838. (c) Tong, H.; Hong, Y.; Dong, Y.; Haussler, M.; Li, Z.; Lam, J.; Dong, Y.; Sung, H.; Williams, I.; Tang, B. *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 11817. (d) Shen, X.; Huang, G.; Li, K.; Zhang, G.; Zhang, D. *Sci. China Chem.* **2013**, *56*, 1197. (e) Qian, L.; Tong, B.; Zhi, J.; Yang, F.; Shen, J.; Shi, J.; Dong, Y. *Acta Chim. Sinica* **2008**, *66*, 1134 (钱立军, 佟斌, 支俊格, 杨帆, 申进波, 石建兵, 董宇平, 化学学报, **2008**, *66*, 1134.); (f) Li, Q.; Li, Z. *Sci. China Chem.* **2015**, *58*, 1800.
- [12] (a) Qi, Q.; Qian, J.; Ma, S.; Xu, B.; Zhang, S.; Tian, W. *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 1149; (b) Chen, M.; Li, L.; Nie, H.; Tong, J.; Yan, L.; Xu, B.; Sun, J.; Tian, W.; Zhao, Z.; Qin, A.; Tang, B. *Chem. Sci.* **2015**, *6*, 1932; (c) Ruan, Z.; Li, C.; Li, J.; Qin, J.; Li, Z. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 15987; (d) Huang, Y.; Zhang, P.; Gao, M.; Zeng, F.; Qin, A.; Wu, S.; Tang, B. *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 7288; (e) Xun, Z. Q.;

- Tang, H.; Zeng, Y.; Chen, J.; Yu, T.; Zhang, X.; Li, Y. *Acta Chim. Sinica* **2015**, *73*, 819. (寻知庆, 唐海云, 曾毅, 陈金平, 于天君, 张小, 李娜, 化学学报, **2015**, *73*, 819.) (f) Sun, J.; Zhang, G.; Jia, X.; Xue, P.; Jia, J.; Lu, R. *Acta Chim. Sinica* **2016**, *74*, 165. (孙静波, 张恭贺, 贾小宇, 薛鹏冲, 贾俊辉, 卢然, 化学学报, **2016**, *74*, 165.); (g) Xia, Z.; Shao, A.; Li, Q.; Zhu, S.; Zhu, W. *Acta Chim. Sinica* **2016**, *74*, 351 (夏志清, 邵安东, 李强, 朱世琴, 朱为宏, 化学学报, **2016**, *74*, 351).
- [13] (a) Wang, M.; Zhang, G.; Zhang, D.; Zhu, D.; Tang, B. *J. Mater. Chem.* **2010**, *20*, 1858; (b) Zhang, G.; Hu, F.; Zhang, D. *Langmuir* **2015**, *31*, 4593.
- [14] (a) Sun, F.; Zhang, G.; Zhang, D.; Xue, L.; Jiang, H.; Zhang, D. *Org. Lett.* **2011**, *13*, 6378; (b) Liu, L.; Zhang, G.; Xiang, J.; Zhang, D.; Zhu, D. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 4581; (c) Gui, S.; Huang, Y.; Hu, F.; Jin, Y.; Zhang, G.; Yan, L.; Zhang, D.; Zhao, R. *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 1470; (d) Huang, X.; Gu, X.; Zhang, G.; Zhang, D. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 12195.
- [15] (a) Wang, M.; Zhang, D.; Zhang, G.; Zhu, D. *Chem. Commun.* **2008**, 4469; (b) Wang, M.; Zhang, D.; Zhang, G.; Tang, Y.; Wang, S.; Zhu, D. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 6443; (c) Wang, M.; Gu, X.; Zhang, G.; Zhang, D.; Zhu, D. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 4444.
- [16] (a) Peng, L.; Zhang, G.; Zhang, D.; Xiang, J.; Zhao, R.; Wang, Y.; Zhu, D. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 4014; (b) Shen, X.; Zhang, G.; Zhang, D. *Org. Lett.* **2012**, *14*, 1744; (c) Peng, L.; Wang, M.; Zhang, G.; Zhang, D.; Zhu, D. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 1943; (d) Dong, X.; Hu, F.; Liu, Z.; Zhang, G.; Zhang, D. *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 3892.
- [17] (a) Hu, F.; Huang, Y.; Zhang, G.; Zhao, R.; Yang, H.; Zhang, D. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 7987; (b) Huang, Y.; Hu, F.; Zhao, R.; Zhang, G.; Yang, H.; Zhang, D. *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 158; (c) Chen, W.; Li, Q.; Zheng, W.; Hu, F.; Zhang, G.; Wang, Z.; Zhang, D.; Jiang, X. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2014**, *53*, 13734; (d) Huang, Y.; Zhang, G.; Hu, F.; Jin, Y.; Zhao, R.; Zhang, D. *Chem. Sci.* **2016**, DOI: 10.1039/c6sc02395a.

(Lu, Y.)