

一种基于“聚集诱导发光+激发态分子内质子转移”机制的 苯并噻唑衍生物荧光探针及其对次氯酸根的识别

刘 梦^a 黄延茹^a 孙小飞^{*,b} 汤立军^{*,a}

(^a 渤海大学化学与材料工程学院 辽宁锦州 121013)

(^b 渤海大学食品科学与工程学院 辽宁锦州 121013)

摘要 合成了一种基于苯并噻唑衍生物的荧光探针(Z)-O-(2-(苯并[d]噻唑-2-基)-4-(2-氰基-2-(4-氰基苯基)乙烯基)-6-甲基苯基)二甲基硫代氨基甲酸酯(HBTY-N), 探针在 Tris 溶液(pH=7)中能够通过荧光“Off-On”变化, 高选择性识别 ClO⁻. 向该探针中加入 ClO⁻后溶液由无荧光变为橙红色荧光, 斯托克位移为 235 nm, 且识别响应快速. 探针 HBTY-N 对 ClO⁻的检测限为 2.127×10⁻⁷ mol/L, pH 适用范围为 1~10, 并且有较强的抗干扰能力. 机理研究表明, 在 ClO⁻的作用下, 探针通过“氧化去保护”机制释放出具有“聚集诱导发光+激发态分子内质子转移(AIE+ESIPT)”性质的荧光团(Z)-4-(2-(3-(苯并[d]噻唑-2-基)-4-羟基-5-甲基苯基)-1-氰基乙烯基)苯腈(HBTY), 量子产率由 0 变为 42.88%. 此外, 探针 HBTY-N 可对活细胞中 ClO⁻进行荧光成像, 且对细胞毒性低, 还可用于实际水样中的 ClO⁻检测, 具有潜在的应用价值.

关键词 聚集诱导发光+激发态分子内质子转移(AIE+ESIPT); ClO⁻; 细胞成像; 苯并噻唑; 荧光探针

An “Aggregation-Induced Emission+Excited-State Intramolecular Proton Transfer” Mechanisms-Based Benzothiazole Derived Fluorescent Probe and Its ClO⁻ Recognition

Liu, Meng^a Huang, Yanru^a Sun, Xiaofei^{*,b} Tang, Lijun^{*,a}

(^a College of Chemistry and Materials Engineering, Bohai University, Jinzhou, Liaoning 121013)

(^b College of Food Science and Technology, Bohai University, Jinzhou, Liaoning 121013)

Abstract A fluorescent probe (Z)-O-(2-(benzo[d]thiazol-2-yl)-4-(2-cyano-2-(4-cyanophenyl)vinyl)-6-methylphenyl) dimethyl cabarmthioate (HBTY-N) based on benzothiazole derivatives was synthesized. The probe can recognize ClO⁻ with high selectivity through fluorescence Off-On change in Tris solution (pH=7). After adding ClO⁻ to the probe, the probe solution changed from no fluorescence to orange-red fluorescence, the Stokes shift is 235 nm, and the recognition response is fast. The detection limit of the probe HBTY-N for ClO⁻ is 2.127×10⁻⁷ mol/L, the applicable pH range is 1~10, and it has strong anti-interference ability. Mechanistic studies show that under the action of ClO⁻, the probe releases the fluorophore (Z)-4-(2-(3-(benzo[d]thiazol-2-yl)-4-hydroxy-5-methylphenyl)-1-cyanovinyl)benzonitrile (HBTY) with “aggregation-induced emission (AIE)+excited-state intramolecular proton transfer (ESIPT)” properties through the “oxidative deprotection” mechanism, and the quantum yield changes from 0 to 42.88%. In addition, the probe HBTY-N can perform fluorescence imaging of ClO⁻ in living cells with low cytotoxicity, and can also be used for the detection of ClO⁻ in actual water samples, which has potential application value.

Keywords aggregation-induced emission (AIE)+excited-state intramolecular proton transfer (ESIPT); ClO⁻; cell imaging; benzothiazole; fluorescent probe

次氯酸(HClO)广泛存在于生物体的各个细胞、组织、器官和细胞器中^[1-3], ClO⁻的异常累积会破坏大量的生物基本成分, 导致与之相关的组织和细胞凋亡或坏

死, 增加阿尔莫兹海默病、神经退行性疾病、心脑血管疾病和癌症等疾病的发生风险^[4-6]. 因此, 寻找在生理条件下对 ClO⁻具有灵敏、快速以及高选择性的特异性检

* Corresponding authors. E-mail: ljtang@bhu.edu.cn; sunxf@bhu.edu.cn

Received April 22, 2022; revised July 17, 2022; published online August 25, 2022.

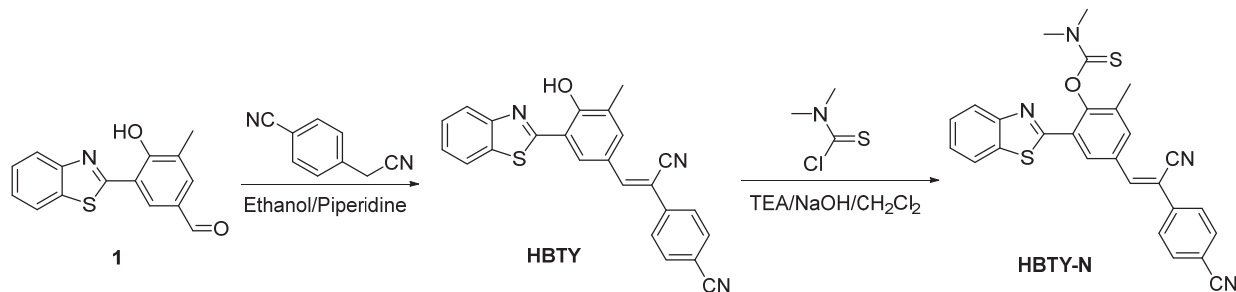
Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 21878023, U1608222) and the Program for Distinguished Professor of Liaoning Province.

国家自然科学基金(Nos. 21878023, U1608222)及辽宁特聘教授支持计划资助项目.

测方法具有重要意义。

与传统的分析方法相比, 荧光检测技术具有灵敏度高、选择性好、操作简单以及实时成像等优点^[7-8]。目前已有多种类型的 ClO^- 探针被报道, 所用荧光团包括苯并噻唑^[9-10]、氟化硼二吡咯(BODIPY)^[11]、香豆素^[12]、罗丹明^[13]及萘酰亚胺^[14]等。其中苯并噻唑及其衍生物荧光团因具有激发态分子内质子转移(ESIPT)、易于合成、高量子产率以及长波长发射等点被广泛引入至探针中^[15], 获得了良好的荧光效果。但苯并噻唑衍生物也存在水溶性差、易受到聚集导致猝灭(ACQ)现象的影响、灵敏度低以及选择性差等问题, 在生物系统中难以得到应用^[16]。为此, 开发一种能够克服以上问题的荧光探针来检测 ClO^- 是十分有必要的。

聚集诱导发光(AIE)现象的发现为克服 ACQ 问题提供了根本性解决方案^[17-19]。近年来, 荧光团 2-(2'-羟基苯基)苯并噻唑(HBT)及其部分衍生物由于具有 ESIPT 性质, 表现出大的斯托克斯位移及较高的量子产率^[20-21], 很多该类衍生物还具有 AIE 性质^[22-24], 因此得到了广泛关注。将 AIE 和 ESIPT 双重性质赋予同一荧光团可能带来新颖的性质。受此启发, 本文设计合成了一种基于苯并噻唑衍生物的荧光探针 **HBTY-N**。通过 HBT 衍生物 **1** 与对氰基苯乙腈缩合, 延长其 π 共轭体系, 其中共轭引入的氰基苯乙腈结构能够增强分子内电荷转移(ICT)效应^[25-26], 期望可获得长波长发射的荧光团 **HBTY**。在此基础上引入二甲基氨基硫代甲酸酯(DMTC)结构作为 ClO^- 的识别基团^[27], 合成了探针 **HBTY-N**。后续研究发现, 荧光团 **HBTY** 具有“AIE+ESIPT”双重性质、长的发射波长以及高量子产率; 由其衍生的探针 **HBTY-N** 能够在高水含量的溶剂中反应型识别 ClO^- 并释放出具有“AIE+ESIPT”性质的荧光团 **HBTY**, 识别过程具有响应快速、选择性高、灵敏度好及适用的 pH 范围宽等优点。探针合成的具体实验步骤如 Scheme 1 所示。



图式 1 探针分子 **HBTY-N** 的合成路线
Scheme 1 Synthetic route of probe **HBTY-N**

1 结果与讨论

1.1 荧光团 **HBTY** 的性质研究

基于探针设计思路, 本工作研究了化合物 **HBTY** 在良性溶剂乙醇和不良溶剂 Tris 缓冲溶液(1×10^{-2} mol/L, pH=7)的混合物中的荧光性质, 用不同体积的 EtOH 稀释 Tris 缓冲溶剂并加入 **HBTY** 储备液, 得到不同 Tris 含量(f_w)的 **HBTY** 浓度为 1×10^{-5} mol/L 的测试液。经紫外吸收测试确定以 366 nm 作为激发波长, 记录了不同 f_w 时化合物 **HBTY** 的荧光光谱(图 1)。由于 ICT 效应在 f_w 小于 40% 的 Tris/EtOH 溶液中, **HBTY** 出现以 460 nm 为中心的荧光发射带, 但随水含量增加, ICT 效应逐渐减弱, 当 f_w 为 50% 时, 荧光发射中心红移到 597 nm, 并且荧光强度随水含量增加而增强, f_w 为 90% 时荧光强度达到最大值, 而继续加大 f_w 后, 荧光强度略有减弱(图 2)。在 450 和 601 nm 处观察到的荧光发射峰分别归属于 **HBTY** 的烯醇式和酮式发射峰, 即具有双发射现象, 该结果说明 **HBTY** 具有 ESIPT 性质。通过激光笔照射 f_w 为 0% 和 99% 的样品, 观察到 $f_w=99\%$ 的样品有明显的

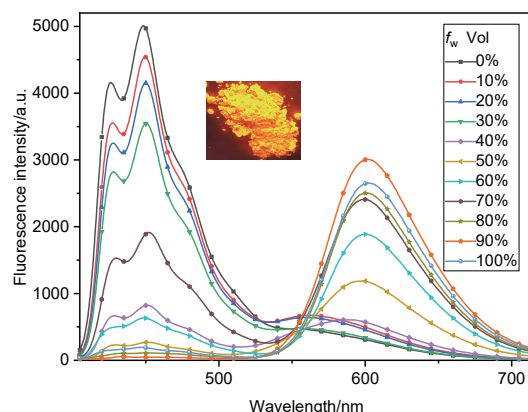


图 1 在不同 Tris 含量的 EtOH 溶液中 **HBTY** 的荧光光谱(插图: **HBTY** 固体的荧光照片, $\lambda_{\text{ex}}=366$ nm)

Figure 1 Fluorescence spectra of **HBTY** in EtOH solutions with different Tris contents (Inset: fluorescent photograph of **HBTY** solids, $\lambda_{\text{ex}}=366$ nm)

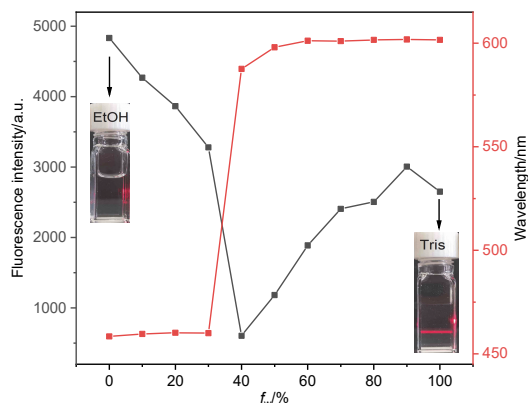


图2 在不同 Tris 含量的 EtOH 溶液中 HBTY 在 601 nm 处荧光强度变化及发射波长(内插图: HBTY 在不同溶剂中的丁达尔现象照片, $\lambda_{\text{ex}}=366$ nm)

Figure 2 Fluorescence intensity changes at 601 nm and emission wavelength of HBTY in EtOH solutions with different Tris contents (Inset: photograph of the Tyndall phenomenon of HBTY in different solvents, $\lambda_{\text{ex}}=366$ nm)

光,即存在丁达尔现象,通过稳态荧光测试出 HBTY 固体的量子产率为 42.88%. 以上结果表明化合物 HBTY 具有典型的 AIE 性质,且在可以观察到聚集状态下荧光性能良好.

1.2 探针 HBTY-N 对 ClO^- 的荧光响应

首先,评估了探针 HBTY-N 对各种潜在影响因子的荧光响应,包括 F^- , Cl^- , CO_3^{2-} , Ac^- , SCN^- , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, $\text{ROO}\cdot$, ONOO^- , H_2O_2 , $\text{NO}\cdot$, $\cdot\text{OH}$, $^1\text{O}_2$, O_2^- , Al^{2+} , Ca^{2+} , Cr^{3+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Hg^{2+} , K^+ , Mg^{2+} , Na^+ , Pb^{2+} , Zn^{2+} , Hcy, Cys 和 GSH. 结果如图 3 所示,以 366 nm 作为激发波长,在加入其他离子的待测液中,探针表现出以 460 nm 为中心的弱发射,在 601 nm 处荧光发射无明显变化;当加入等物质的量的 ClO^- 时,探针在 601 nm 处有显著荧光增强, Stokes 位移为 235 nm. 此外,还考察了探针 HBTY-N 对 ClO^- 的时间响应,如图 4,在 601 nm 处,探针 HBTY-N 对 ClO^- 反应的荧光强度随时间延长显著增强,大约 10 min 荧光强度达到最大值,但在荧光强度达到最高点后,其数值在一定时间内略有下降,但将测试样品分别在 0.5、1 和 5 h 后摇晃并重新测试,其荧光强度没有明显降低,故判断这是由于探针分子在 Tris 体系中溶解度较差,分子聚集导致,对实验结果不产生显著影响. 以上结果表明探针 HBTY-N 对 ClO^- 具有良好的选择性,且能够在短时间内完成对 ClO^- 的响应.

考虑到探针在复杂测试环境中的实际应用,本工作研究了其他潜在干扰离子(F^- , Cl^- , CO_3^{2-} , Ac^- , SCN^- , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, $\text{ROO}\cdot$, ONOO^- , H_2O_2 , $\text{NO}\cdot$, $\cdot\text{OH}$, $^1\text{O}_2$, O_2^- , Al^{2+} , Ca^{2+} , Cr^{3+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Hg^{2+} , K^+ , Mg^{2+} , Na^+ , Pb^{2+} ,

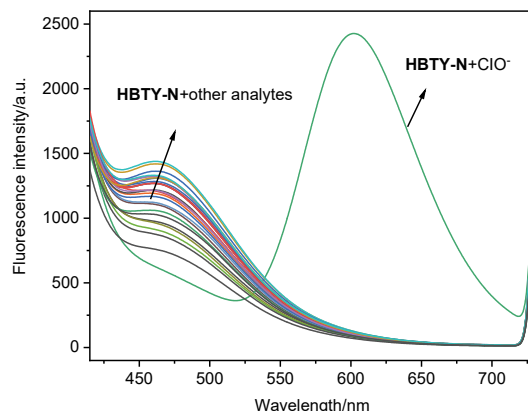


图3 探针 HBTY-N 在 Tris 溶液中分别加入 1.5×10^{-4} mol/L 的不同分析物的荧光光谱($\lambda_{\text{ex}}=366$ nm)

Figure 3 Fluorescence spectra of probe HBTY-N in Tris solution upon addition of 1.5×10^{-4} mol/L different analytes ($\lambda_{\text{ex}}=366$ nm)

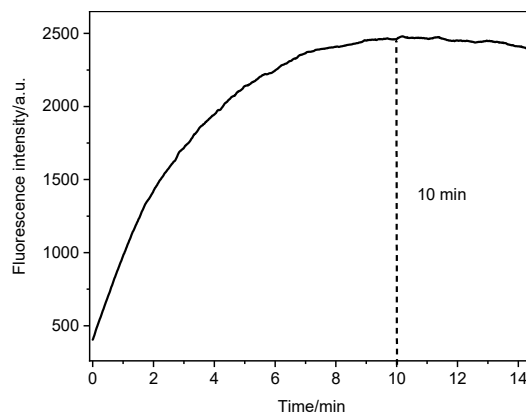


图4 探针 HBTY-N 加入 ClO^- 后荧光强度随时间的变化 ($\lambda_{\text{ex}}=366$ nm, $\lambda_{\text{em}}=601$ nm)

Figure 4 Time-dependent fluorescence intensity changes of probe HBTY-N after adding ClO^- ($\lambda_{\text{ex}}=366$ nm, $\lambda_{\text{em}}=601$ nm)

Zn^{2+} , Hcy, Cys 和 GSH)对探针 HBTY-N 识别 ClO^- 的影响. 如图 5 所示,引入其他离子(1.5×10^{-4} mol/L)时,探针溶液在 601 nm 处的几乎无荧光变化,继续向测试液中加入等物质的量的 ClO^- 时,601 nm 处的荧光强度均明显增强. 结果表明,在其他离子与 ClO^- 共存时,探针 HBTY-N 对 ClO^- 的识别几乎不受干扰,说明探针 HBTY-N 对 ClO^- 的识别具有较强的抗干扰能力.

进一步考察了 pH 对探针 HBTY-N 识别 ClO^- 的影响,结果如图 6 所示,在 pH 为 1~13 范围内探针 HBTY-N 在 601 nm 处均无明显荧光变化;探针 HBTY-N 与 ClO^- 反应后,在 pH 为 1~8 时能够观察到明显的荧光变化,在 pH 为 8~10 时随着 pH 增加荧光强度略有下降,但仍能对 ClO^- 响应,这表明探针 HBTY-N 可在较宽的 pH 范围内对 ClO^- 进行识别,能够应用于复

杂测试环境中的检测。

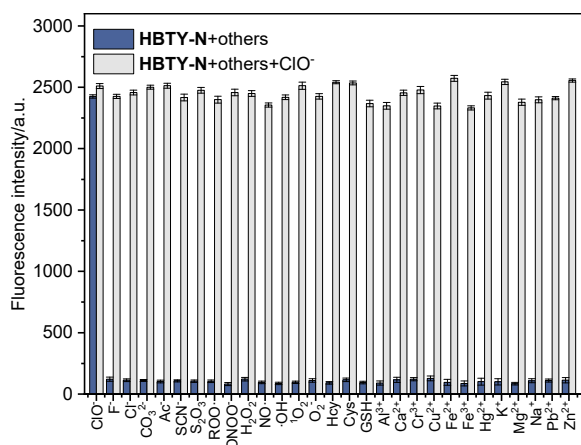


图5 干扰离子和 ClO^- 共存时探针 **HBTY-N** 在 Tris 溶液中的荧光发射光谱($\lambda_{\text{ex}}=366\text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}=601\text{ nm}$)

Figure 5 Fluorescence emission spectra of probe **HBTY-N** in Tris solution when interfering ions and ClO^- coexist ($\lambda_{\text{ex}}=366\text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}=601\text{ nm}$)

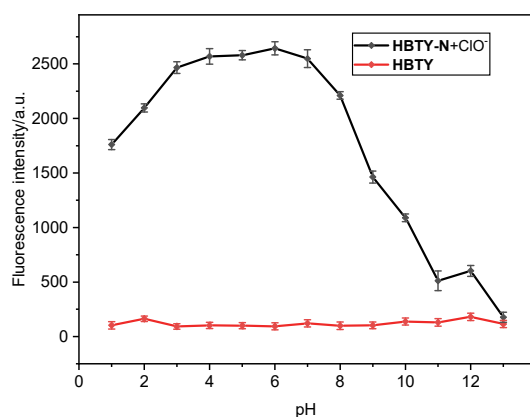


图6 不同 pH 值时 **HBTY-N** 和 **HBTY-N**+ ClO^- 在 601 nm 处荧光强度变化($\lambda_{\text{ex}}=366\text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}=601\text{ nm}$)

Figure 6 Fluorescence intensity (601 nm) changes of **HBTY-N** and **HBTY-N**+ ClO^- at varied pH values ($\lambda_{\text{ex}}=366\text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}=601\text{ nm}$)

为探讨 **HBTY-N** 对 ClO^- 响应的灵敏度, 对其进行了滴定测试, 荧光光谱如图 7 所示. 在待测液中, 随着 ClO^- 浓度的增加, 601 nm 处的荧光强度逐渐增强, 当 ClO^- 浓度达到 $1.5 \times 10^{-4}\text{ mol/L}$ 时, 荧光强度达到最高且不再变化, 此时滴定已达到饱和. 探针在 601 nm 处的荧光强度与 ClO^- 的浓度($1 \times 10^{-5} \sim 5 \times 10^{-5}\text{ mol/L}$)呈现出良好的线性关系($R^2=0.998$). 同时依据公式 $\text{LOD}=3S/K$, 计算得出探针对 ClO^- 的检测限为 $2.138 \times 10^{-7}\text{ mol/L}$ (图 8). 以上结果表明, 探针对 ClO^- 具有较高的灵敏度, 可用于定量分析.

1.3 探针 **HBTY-N** 对 ClO^- 的传感机制

将探针 **HBTY-N** 与 ClO^- 反应后与化合物 **HBTY** 具

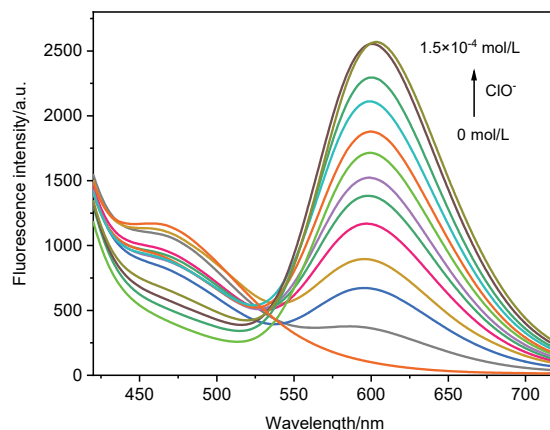


图7 逐渐增加 ClO^- ($0 \sim 1.5 \times 10^{-4}\text{ mol/L}$)时, 探针 **HBTY-N** 在 Tris 溶液中的荧光光谱($\lambda_{\text{ex}}=366\text{ nm}$)

Figure 7 Fluorescence spectra of probe **HBTY-N** in Tris solution upon incremental addition of ClO^- ($0 \sim 1.5 \times 10^{-4}\text{ mol/L}$) ($\lambda_{\text{ex}}=366\text{ nm}$)

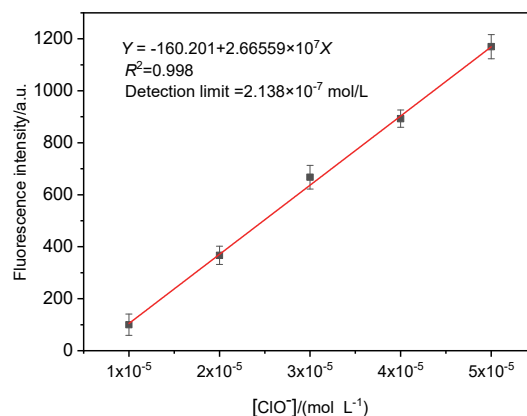


图8 荧光强度(601 nm)与 ClO^- 浓度之间的线性关系($\lambda_{\text{ex}}=366\text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}=601\text{ nm}$)

Figure 8 Linear relationship between fluorescence intensity (601 nm) and ClO^- concentration ($\lambda_{\text{ex}}=366\text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}=601\text{ nm}$)

有相同 R_f 值的产物分离出来, 对其进行了 ^1H NMR 和 HRMS 的测试, 从所测得的 ^1H NMR 中可以看出, **HBTY** 的酚羟基在被成酯保护后消失并出现新的甲基峰, 由于羰基的吸电子效应使苯环上的氢向低场移动. **HBTY-N** + ClO^- 反应中分离产物的 ^1H NMR 中, **HBTY-N** 的甲基峰消失, 并且酚羟基的峰又重新出现. HRMS 测试结果中, 在 $m/z=394.1018$ 处的峰可归属于 $[\text{M}-\text{H}]^+$ (calcd 394.1019). 此外, 测试了 **HBTY-N** 与 ClO^- 作用前后的紫外-可见吸收光谱图, 探针识别后的吸收光谱与 **HBTY** 的吸收光谱几乎重合. 结合相关文献^[27-28]以及测试结果可推测, 探针 **HBTY-N** 与 ClO^- 反应后的分离产物为 **HBTY**.

1.4 探针 **HBTY-N** 对活细胞中 ClO^- 的检测

荧光光谱测试表明, 探针 **HBTY-N** 对 ClO^- 具有较高的灵敏度和选择性, 能在生理条件下实现对 ClO^- 的

快速响应. 为此, 进一步开展了 ClO^- 生物成像研究. 在荧光成像实验前, 测试了 **HBTY-N** 在 MCF-7 细胞中的毒性, 结果表明, **HBTY-N** 的浓度达到 $5 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 时, 细胞存活率仍处在较高水平. 随后采用荧光显微镜探究了探针 **HBTY-N** 在 MCF-7 细胞中对外源性 ClO^- 的荧光成像. 通过观察载有 **HBTY-N** ($1 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$) 的 MCF-7 细胞与不同浓度的 ClO^- 孵育后的荧光图片(图 9)可以发现, 随着 ClO^- 浓度增加, 细胞逐渐由无荧光变为红色荧光, 荧光强度与 ClO^- 浓度呈正相关, 这些结果表明探针 **HBTY-N** 具有良好的细胞渗透性, 可以用来检测细胞内的 ClO^- .

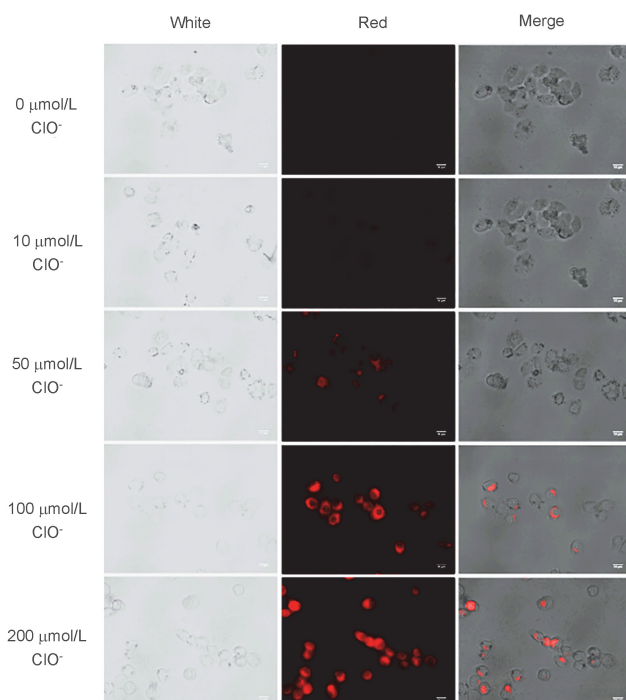


图 9 载有探针 **HBTY-N** 的 MCF-7 细胞被不同浓度的 ClO^- 溶液处理后的共聚焦荧光图像

Figure 9 Confocal fluorescence images of MCF-7 cells containing probe **HBTY-N** treated with different concentrations of ClO^- solution

1.5 探针 **HBTY-N** 试纸条测试

为了方便快速检测实际环境中的 ClO^- , 制作了探针 **HBTY-N** 的检测试纸. 将直径为 1.5 cm 的圆形滤纸浸泡在探针 **HBTY-N** ($1 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$) 的二甲基亚砜(DMSO)溶液中浸泡 10 min 后取出, 在室温下干燥后将湖水(lake)、自来水(water)和不同浓度的 ClO^- 溶液分别滴加在滤纸上(50 μL), 并再次干燥. 在日光下和紫外灯下观察试纸条的颜色变化. 如图 10 所示, 在 365 nm 的紫外照射灯下, 未添加 ClO^- 的滤纸与普通滤纸颜色相近, 浓度增加时黄色荧光逐渐增强, 在 $6 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$ 时达到饱和, 滴加自来水和湖水的滤纸出现微弱的黄色荧

光. 日光下可以观察到, 当 ClO^- 浓度超过 $2 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$ 时, 滤纸逐渐变为黄色. 结果表明探针 **HBTY-N** 可被开发成便携式的 ClO^- 检测试纸, 用于实际水样中的检测.

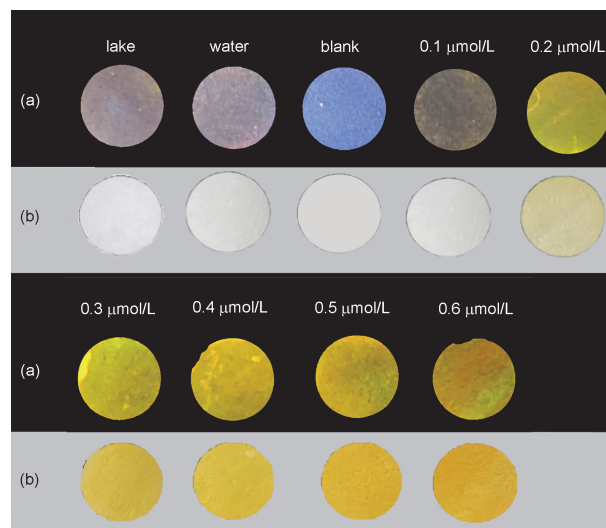


图 10 在紫外灯下(a)或日光下(b)载有探针 **HBTY-N** 的试纸条暴露于含有不同浓度 ClO^- 的溶液的荧光颜色变化图

Figure 10 Color changes of the probe **HBTY-N** test strips after exposure to different concentrations of ClO^- under UV light (a) or natural light (b)

2 结论

总之, 合成了一种基于“**AIE**+**ESIPT**”的荧光探针 **HBTY-N**. 探针在 Tris 缓冲溶液中对 ClO^- 的识别具有高选择性和抗干扰能力、大 Stokes 位移(235 nm)、低检测限($2.138 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$)以及宽的 pH (1~10)适用范围. 通过 ^1H NMR 和 HRMS 谱证实了探针 **HBTY-N** 的识别机理是通过 ClO^- 引发的“氧化去保护”机制释放出具有高量子产率(42.88%)的荧光团 **HBTY**, 从而识别 ClO^- . 生物成像实验表明, 该探针可在活细胞中识别 ClO^- . 通过试纸条实验证明, 该探针还可用于自来水等水样品中 ClO^- 的检测.

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

日立 FL-4700 荧光分光光度计(日立高新技术公司, 日本); WRS-1B 型数字熔点仪(上海优浦); PHS-25B pH 计(上海大普); 核磁共振光谱仪(400 MHz, Agilent 公司, 美国); 质谱分析仪 Bruker micr OTOF-Q.

5-甲基水杨醛、2-氨基苯硫酚、焦亚硫酸钠、邻甲酚、六次亚甲基四胺、三氟乙酸、邻氨基苯硫酚、多聚甲醛、对氰基苯乙腈、哌啶和 DMTC 等均来自阿拉丁(上海, 中国), 无需纯化即可使用; 化合物 **1** 按照文献方法

合成^[29]. 本实验所使用的溶剂均是市售分析纯, 需干燥后使用.

3.2 合成方法

3.2.1 化合物 **HBTY** 的合成

将对羟基苯乙腈(220 mg, 1.1 mmol)、化合物 **1** (300 mg, 0.92 mmol)和哌啶(0.5 mL)在干乙醇(10 mL)中反应搅拌 12 h (80 °C). 待反应完成后冷却、过滤, 用冰乙醇(10 mL)清洗 2 次. 粗产物采用硅胶柱层析分离(二氯甲烷/石油醚, $V:V=1:20$). 产物为黄色粉末, 264 mg, 产率为 88%. m.p. 233.3~234.8 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 13.40 (s, 1H), 8.33 (s, 1H), 7.99 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.93 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.79 (d, $J=8.0$ Hz, 3H), 7.74 (d, $J=8.0$ Hz, 2H), 7.57~7.51 (m, 2H), 7.45 (s, 1H), 2.41 (s, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 168.75, 159.23, 151.51, 145.25, 143.62, 139.08, 137.92, 135.12, 133.05, 132.77, 129.76, 128.24, 127.78, 127.00, 126.23, 126.04, 124.12, 122.23, 121.71, 116.49, 112.18, 106.82, 16.06; HRMS (ESI⁻) calcd for C₂₄H₁₅N₃OS 392.0863, found 392.0873.

3.2.2 探针 **HBTY-N** 的合成

将 **HBTY** (200 mg, 0.5 mmol)、*N,N*-二甲氨基硫代甲酸氯(124 mg, 1 mmol)、NaOH (20 mg, 0.5 mmol)和三乙胺(100 mg, 0.8 mmol)溶于 10 mL 干燥的二氯甲烷中, 室温搅拌 12 h. 反应结束后蒸除溶剂, 残留物经硅胶柱分离纯化(二氯甲烷/石油醚, $V:V=1:3$), 得到 120 mg 白色粉末 **HBTY-N**, 产率为 50%. m.p. 229.2~223.3 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 8.77 (s, 1H), 8.33 (s, 1H), 8.11 (d, $J=6.4$ Hz, 1H), 8.01 (d, $J=13.0$ Hz, 2H), 7.94 (s, 3H), 7.52 (t, $J=7.2$ Hz, 1H), 7.44 (t, $J=7.2$ Hz, 1H), 3.51 (s, 3H), 3.44 (s, 3H), 2.26 (s, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 183.61, 161.59, 152.11, 151.37, 144.30, 138.14, 135.19, 133.68, 133.21, 131.48, 129.20, 127.55, 126.82, 125.91, 123.03, 122.34, 118.54, 117.23, 109.60, 43.32, 40.20, 39.93, 39.70, 39.57, 39.27, 39.15, 38.94, 16.58; HRMS (ESI⁺) calcd for C₂₇H₂₁N₄OS₂ 481.1151, found 481.1160.

3.3 测试液的配制

3.3.1 Tris 缓冲溶液的配制

将三羟甲基氨基甲烷(0.606 g)溶于二次蒸馏水, 用 NaOH 水溶液调节 pH 值为 7.0, 定容至 500 mL, 得到 Tris-HCl (1×10^{-2} mol/L)缓冲溶液.

3.3.2 活性氧和活性氮溶液的配制

ClO⁻溶液: 用 Tris 适当稀释市售的 NaClO 溶液, 根据 292 nm 处的吸光度和摩尔消光系数($350 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), 通过紫外-可见吸收光谱测定 ClO⁻的浓度, 然后用 Tris 稀释至 50 mmol/L.

ROO[•]溶液: 将 2'-偶氮二异丁基脒二盐酸盐(0.136 g)溶于 Tris 中制备 5×10^{-2} mol/L 的储备溶液.

H₂O₂ 溶液: 用 Tris 稀释商业 H₂O₂ 溶液以制备 5×10^{-2} mol/L 的储备溶液.

ONOO⁻溶液: 将 NaNO₂ (0.6 mol/L, 10 mL)和 H₂O₂ (0.7 mol/L, 10 mL)溶液在去离子水中搅拌, 在 0 °C 下, 加入 HCl (0.6 mol/L, 10 mL), 然后立即快速加入 NaOH (1.5 mol/L, 20 mL). 将所得溶液倒入 MnO₂ 柱中, 去除过量 H₂O₂. 通过紫外光谱测定其浓度后用 Tris 配置成 5×10^{-2} mol/L 溶液.

NO[•]溶液: 将亚硝基铁氰化钠二水合物溶于 Tris 中, 搅拌 1 h 制备 5×10^{-2} mol/L 的储备溶液.

•OH 溶液: 将 H₂O₂ 溶液与等物质的量的 FeSO₄•7H₂O 溶液混合, 通过 Fenton 反应产生 •OH, 通过 Fe²⁺ 的浓度估算 •OH 的浓度.

¹O₂ 溶液: 将 Tris 用稀释后的 NaMoO₄ 溶液(10 mmol/L)与 10 mmol/L H₂O₂ 溶液等体积混合, 得到 5×10^{-2} mol/L ¹O₂ 溶液.

O₂⁻溶液: 用 Tris 溶解 KO₂ 后稀释得到 5×10^{-2} mol/L 的储备溶液.

3.3.3 阴离子溶液的配制

使用相应的钠盐或钾盐制备阴离子溶液. 以 Cl⁻为例: 将 NaCl (29.22 mg)用少量 Tris 溶解后定容至 10 mL, 得到 Cl⁻溶液(5×10^{-2} mol/L). 其他阴离子溶液均采用 Tris 缓冲溶液配制, 溶液浓度均为 5×10^{-2} mol/L.

3.3.4 待测液的配制

用 DMSO 制备 **HBTY-N** 的储备溶液(1.0 mmol/L), 然后用 Tris 稀释, 得到 1×10^{-5} mol/L 的 **HBTY-N** 测试液(pH=7, 1×10^{-5} mol/L).

3.4 细胞测试方法

在密度为 1.0×10^3 细胞/孔的孔板中接种 MCF-7 细胞, 孵育 12 h. 采用不同浓度的(1×10^{-6} 、 5×10^{-6} 、 10×10^{-6} 、 30×10^{-6} 、 50×10^{-6} mol/L) **HBTY-N** 测试液孵育细胞 24 h, 然后用 Tris 洗涤细胞两次测试细胞毒性. 为促进测试液与细胞之间的亲和力, 细胞培养过程添加了浓度为 10 g/L 的表面活性剂十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB)的水溶液.

室温下, 将载有 **HBTY-N** 的 MCF-7 细胞与不同浓度的 ClO⁻ (0、 10×10^{-6} 、 50×10^{-6} 、 100×10^{-6} 、 200×10^{-6} mol/L)溶液孵育 30 min, 然后用 Tris 缓冲溶液洗涤 3 次并采集细胞图像.

辅助材料(Supporting Information) 探针在不同时间的荧光强度图片, **HBTY-N** 结合 ClO^- 的反应机理及其反应后分离产物的吸收光谱、 ^1H NMR、HRMS 谱图, 探针 **HBTY-N** 的细胞毒性测试图片, **HBTY** 与 **HBTY-N** 的 ^1H NMR、 ^{13}C NMR 和 HRMS 谱图, **HBTY-N** 与其他 ClO^- 探针性能对比. 这些材料可以免费从本刊网站 (<http://sioc-journal.cn/>) 上下载.

References

- [1] Xie, X.; Wang, J.; Yan, Y.; Zhang, X.; Liu, C.; Yang, J.; Hua, J. *Analyst* **2018**, *143*, 5736.
- [2] Huo, B.; Du, M.; Shen, A.; Li, M.; Lai, Y.; Bai, X.; Gong, A.; Fang, L.; Yang, Y. *Sens. Actuators, B* **2019**, *284*, 23.
- [3] Shi, W. J.; Feng, L. X.; Wang, X.; Huang, Y.; Wei, Y. F.; Huang, Y. Y.; Ma, H. J.; Wang, W.; Xiang, M.; Gao, L. *Talanta* **2021**, *233*, 122581.
- [4] Xiao, H.; Li, J.; Zhao, J.; Yin, G.; Quan, Y.; Wang, J.; Wang, R. *J. Mater. Chem. B* **2015**, *3*, 1633.
- [5] Li, J.; Li, P.; Huo, F.; Yin, C.; Liu, T.; Chao, J.; Zhang, Y. *Dyes Pigm.* **2016**, *130*, 209.
- [6] Wu, L.; Yang, Q.; Liu, L.; Sedgwick, A. C.; Cresswell, A. J.; Bull, S. D.; Huang, C.; James, T. D. *Chem. Commun.* **2018**, *54*, 8522.
- [7] Huo, B. L.; Du, M.; Shen, A.; Li, M. W.; Lai, Y.; Bai, X.; Gong, A. J.; Yang, Y. X. *Anal. Chem.* **2019**, *91*, 10979.
- [8] Yang, M. P.; Su, N.; Li, Y. X.; Wang, L.; Ma, L. F.; Zhang, Y.; Li, J.; Yang, B. Q.; Kang, L. L. *Chin. J. Org. Chem.* **2017**, *38*, 636 (in Chinese). (杨美盼, 苏娜, 李玉香, 王莉, 马利锋, 张媛, 李靖, 杨秉勤, 康龙丽, 有机化学, **2017**, *38*, 636.)
- [9] Ma, T.; Zhang, Y.; Fu, K.; Li, Z.; Yuan, C.; Ma, W. *Bioorg. Chem.* **2022**, *123*, 105798.
- [10] Singh, G.; Devi, A.; Gupta, S.; Yadav, R.; Sehgal, R. *J. Mol. Struct.* **2022**, *1262*, 132967.
- [11] VanDenburgh, K. L.; Liu, Y.; Sadhukhan, T.; Benson, C. R.; Cox, N. M.; Erbas-Cakmak, S.; Qiao, B.; Gao, X.; Pink, M.; Raghavachari, K.; Flood, A. H. *Org. Biomol. Chem.* **2020**, *18*, 431.
- [12] Sun, X. Y.; Liu, T.; Sun, J.; Wang, X. J. *RSC Adv.* **2020**, *10*, 10826.
- [13] Deng, F.; Sun, D.; Yang, S.; Huang, W.; Huang, C.; Xu, Z.; Liu, L. *Spectrochim. Acta, Part A* **2022**, *268*, 120662.
- [14] Tian, Y.; Li, M.; Liu, Y. *Molecules* **2020**, *25*, 4465.
- [15] Liu, J.; Xiong, Y.; Huang, Y.; Zhu, X.; Liu, Y.; Zhang, L.; Yan, J. *New J. Chem.* **2021**, *45*, 18453.
- [16] Mei, H.; Gu, X.; Wang, M.; Cai, Y.; Xu, K. *J. Photochem. Photobiol., A* **2021**, *418*, 113335.
- [17] Wu, Q.; Li, Y.; Li, Y.; Wang, D.; Tang, B. Z. *Mater. Chem. Front.* **2021**, *5*, 3489.
- [18] Liu, S.; Feng, G.; Tang, B. Z.; Liu, B. *Chem. Sci.* **2021**, *12*, 6488.
- [19] Shi, J.; Deng, Q.; Wan, C.; Zheng, M.; Huang, F.; Tang, B. *Chem. Sci.* **2017**, *8*, 6188.
- [20] Anthony, K.; Brown, R. G.; Hepworth, J. D.; Hodgson, K. W.; May, B. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1984**, 2111.
- [21] Cai, Y.; Fang, J.; Wang, B.; Zhang, F.; Shao, G.; Liu, Y. *Sens. Actuators, B* **2019**, *292*, 156.
- [22] Chen, L.; Jiang, H.; Li, N.; Meng, Q.; Li, Z.; Han, Q.; Liu, X. *Spectrochim. Acta, Part A* **2022**, *268*, 120704.
- [23] Pan, Y. X.; Ban, L. F.; Li, J. J.; Liu, M.; Tang, L. J.; Yan, X. M. *Dyes Pigm.* **2022**, *203*, 110305.
- [24] Xu, D.; Tang, L.; Tian, M.; He, P.; Yan, X. *Tetrahedron Lett.* **2017**, *58*, 3654.
- [25] Tian, Y.; Zhou, D. Y.; Jiang, W. L.; She, Z. P.; Li, Y.; Li, C. Y. *Talanta* **2021**, *223*, 121720.
- [26] Wang, W. X.; Jiang, W. L.; Liu, Y.; Li, Y.; Zhang, J.; Li, C. Y. *Sens. Actuators, B* **2020**, *320*, 128296.
- [27] Zhou, K.; Ren, M.; Wang, L.; Li, Z.; Lin, W. *Anal. Methods* **2018**, *10*, 2546.
- [28] Tang, H.; Qiang, X.; Gao, Y.; Teng, H.; Chen, X.; Zhang, Y.; Tian, J.; Qin, B.; Guo, Y. *Dyes Pigm.* **2021**, *188*, 109219.
- [29] Jiao, X.; Li, Y.; Niu, J.; Xie, X.; Wang, X.; Tang, B. *Anal. Chem.* **2018**, *90*, 533.
- [30] Liu, M.; Bai, Y.; He, Y.; Zhou, J.; Ge, Y. L.; Zhou, J. G.; Song, G. W. *Microchim. Acta* **2021**, *188*, 15.
- [31] Han, Z.; Dong, L.; Sun, F.; Long, L.; Jiang, S.; Dai, X.; Zhang, M. *Anal. Biochem.* **2020**, *602*, 113795.
- [32] Tang, X.; Zhu, Z.; Wang, Z.; Tang, Y.; Wang, L.; Liu, L. *Spectrochim. Acta, Part A* **2020**, *228*, 117845.
- [33] Wang, W.; Ning, J. Y.; Liu, J. T.; Miao, J. Y.; Zhao, B. X. *Dyes Pigm.* **2019**, *171*, 107708.
- [34] Yang, Y.; Cheng, S.; Dong, W. *Luminescence* **2021**, *36*, 1377.

(Zhao, C.)