第37卷第7期 无 机 化 学 学 报 Vol.37 No.7
2021年7月 CHINESE JOURNAL OF INORGANIC CHEMISTRY 1245-1250

基于二氰基异佛尔酮的荧光探针在检测苯硫酚中的应用

张改清[1,2] 阴彩霞*[,2]
([1]吕梁学院化学化工系,吕梁 033000)
([2]山西大学分子科学研究所,化学生物学与分子工程教育部重点实验室,太原 030006)

摘要: 为了开发具有高选择性和高灵敏度检测苯硫酚的方法,我们基于二氰基异佛尔酮染料优异的光学性能及良好的膜渗透性,以二氰基异佛尔酮衍生物作为荧光团,引入强吸电子基2,4-二硝基苯合成荧光探针(**YC1**)用于特异性识别苯硫酚。该探针对苯硫酚显示出明显的红色荧光(发射波长为594 nm,激发波长为420 nm),具有荧光增强(turn-on)的性质。探针对苯硫酚的识别具有良好的选择性且在PBS/DMSO(PBS=磷酸缓冲盐溶液,DMSO=二甲亚砜)的体系中检测限为0.65 μmol·L^{-1}。此外,该探针已成功应用于HeLa细胞内4-甲基苯硫酚的成像。

关键词: 异佛尔酮; 苯硫酚; 荧光增强; 生物成像
中图分类号: TQ617.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-4861(2021)07-1245-06
DOI: 10.11862/CJIC.2021.161

Application of Fluorescent Probe Based on Dicyanoisophorone in Detection of Thiophenol

ZHANG Gai-Qing[1,2] YIN Cai-Xia*[,2]
([1]*Department of Chemistry and Chemical Engineering, Lüliang University, Lüliang, Shanxi* 033000, *China*)
([2]*Key Laboratory of Chemical Biology and Molecular Engineering of Ministry of Education, Institute of Molecular Science, Shanxi University, Taiyuan* 030006, *China*)

Abstract: To develop a method with high selectivity and sensitivity to detect thiophenol, based on the excellent optical properties and good membrane permeability of dicyanoisophorone dyes, we chose dicyanoisophorone derivatives as fluorophores and introduced a strong electron-withdrawing 2,4-dinitrobenzene synthetic fluorescent probe (**YC1**) for the specific recognition of thiophenol. The probe showed obvious red fluorescence on thiophenol (emission wavelength: 594 nm, excitation wavelength: 420 nm) and had a fluorescence-enhanced (turn-on) property for the recognition of thiophenol. The probe had a good selectivity for the recognition of thiophenol and the detection limit of the probe was 0.65 μmol·L^{-1} in PBS/DMSO system (PBS=phosphate buffer saline, DMSO=dimethyl sulfoxide). In addition, the probe has been successfully applied to the fluorescence imaging of 4-methylthiophenol in HeLa cells.

Keywords: dicyanoisophorone; thiophenol; fuorescence enhancement; biological imaging

硫醇主要包括脂肪硫醇和苯硫醇。半胱氨酸(cysteine,Cys)、同型半胱氨酸(homocysteine,Hcy)、谷胱甘肽(glutathione,GSH)等脂肪硫醇在生理过程中起着非常重要的作用[1-7]。作为硫醇的一种,苯硫酚被广泛用于农药生产、化学合成、制药工程和工业生产中的重要中间体,其使用不可避免地面临高毒性和高污染的重要问题[8-9]。苯硫酚及其衍生物具有高毒性,苯硫酚对鱼类的半致死剂量(LC50)范围为0.01~0.4 mmol·L^{-1}[10],对小鼠的LC50为2.15~46.2 mg·kg^{-1}[11]。生物体长期接触硫酚会严重损害

收稿日期:2021-02-18。收修改稿日期:2021-05-14。
山西省高等学校教学改革创新项目(No.J2018192)和国家自然科学基金(No.21775096,22074084)资助。
*通信联系人。E-mail:yincx@sxu.edu.cn;Tel:13934153595

中枢神经和其他神经系统，导致呼吸急促、肌肉无力、后肢麻痹、昏迷甚至死亡[12-13]。因此，考虑到苯硫酚对生物和环境的不良影响，开发检测苯硫酚的简单、灵敏和具有选择性的方法是非常重要的。

由于具有成本低、灵敏度高以及生物相容性好等优点，荧光方法已在检测和标记中得到广泛应用，是一种非常有前景的工具[14]。由于异佛尔酮衍生物类荧光染料具有给体-π-受体(D-π-A)结构，其超快的分子内转移电荷(ICT)引起大的斯托克斯位移[15]，该类染料已经开始应用于各类荧光探针的设计[16-17]。

到目前为止，许多苯硫酚荧光探针已经被设计、合成出来[18-20]，但是大多数荧光探针仍是短波长发射。我们用2,4-硝基苯氟苯修饰了二氰基异佛尔酮衍生物，用作荧光开关，以获得用于检测苯硫酚的探针**YC1**。由于2,4-二硝基苯强的吸电子能力导致的部分的光致电子转移(PET)过程，探针**YC1**基本上具有较弱的荧光。苯硫酚通过芳香族亲核取代反应机理与探针**YC1**发生反应，2,4-二硝基苯作为离去基团离去，随后释放荧光化合物**2**(发射峰主要在594 nm处)，荧光响应信号增强(turn-on)，计算得到相应的检出限为0.65 μmol·L^{-1}。此外，探针被成功应用于HeLa细胞内4-甲基苯硫酚的成像。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

1.1.1 仪 器

所用仪器有ME204E电子天平、FE20-FIve Easy Plus™酸度计、Bruker AVANCE-600 MHz核磁共振仪、LTQ-MS(Thermo)电喷雾质谱、U-3900紫外-可见分光光度计、F-7000荧光分光光度计、TCS SP5激光扫描共聚焦显微镜。

1.1.2 试 剂

异佛尔酮、丙二腈、哌啶、冰醋酸、4-羟基-3-甲氧基苯甲醛(香草醛)、2,4-二硝基氟苯和4-甲基苯硫酚等均为分析纯，购自上海阿拉丁试剂有限公司。4-甲基苯硫酚以及探针**YC1**的储备溶液用二甲亚砜(DMSO)溶液作为溶剂配制得到。

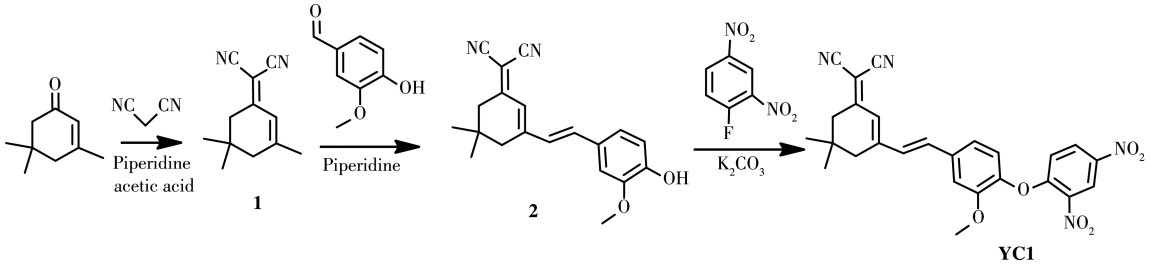
1.2 探针YC1的制备

探针**YC1**的合成路线及响应机理如Scheme 1所示，探针**YC1**通过3步反应即可得到。

化合物**1**和化合物**2**根据文献报道的方法合成[21]。

探针**YC1**的合成：向化合物**2**(640 mg, 2.0 mmol)与*N*,*N*-二甲基甲酰胺(DMF, 10 mL)的混合溶液中加入1-氟-2,4-二硝基苯(391 mg, 2.1 mmol)和K_2CO_3(548 mg, 4 mmol)，室温搅拌2 h。反应过程通过TLC监测。待反应完成后，除去溶剂。所得粗产品通过硅胶柱色谱法(乙酸乙酯/石油醚，1∶3，*V*/*V*)纯化，得到深黄色固体**YC1**(613 mg，产率为63%)。

结构表征：^{1}H NMR(600 MHz, DMSO-d_6)：δ 8.90 (d, *J*=13.2 Hz, 1H), 8.41(d, *J*=9.2 Hz, 1H), 7.67(d, *J*=21.9 Hz, 1H), 7.59~7.47(m, 1H), 7.45~7.30(m, 3H), 7.03(d, *J*=9.3 Hz, 1H), 6.93(s, 1H), 3.83(d, *J*=19.3 Hz, 3H), 2.63(d, *J*=18.8 Hz, 2H), 2.57(s, 2H), 1.04(s, 6H)。^{13}C NMR(151 MHz, DMSO-d_6)：δ 170.8, 156.1, 155.4, 151.4, 142.2, 141.6, 138.8, 137.0, 136.4, 130.8, 130.0, 123.6, 123.1, 122.5, 122.3, 118.1, 114.3, 113.5, 112.6, 77.2, 56.6, 42.8, 38.7, 32.2, 27.9。ESI-MS *m*/*z*：**[YC1**−H]$^-$即[$C_{26}H_{22}N_4O_6$−H]$^-$计算值485.146 1；实测值485.147 0。元素分析按$C_{26}H_{22}N_4O_6$的计算值(%)：C 64.19, H 4.56, N 11.52。实测值(%)：C 64.15, H 4.57, N 11.54。



Scheme 1 Synthetic route of probe **YC1**

1.3 细胞成像

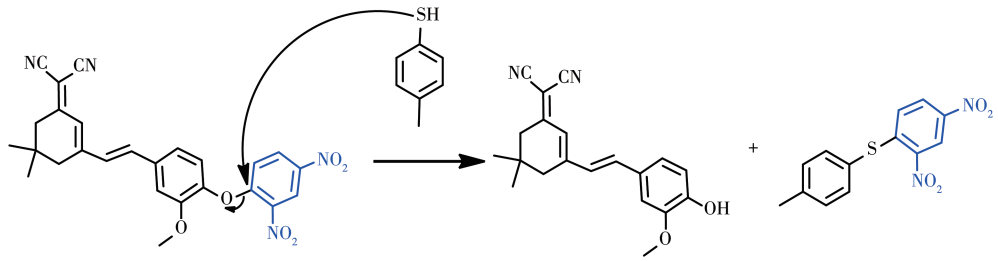
将HeLa细胞接种在激光共聚焦培养皿中，并将细胞于37 ℃、CO_2体积分数5%的孵育箱中继续培养24 h以进行荧光成像实验。荧光成像通过共聚焦激光扫描显微镜进行。在种有HeLa细胞的激光共聚焦培养皿中用探针**YC1**(5 μmol·L^{-1})预处理20 min。

外源性4-甲基苯硫酚成像:再孵入20 μmol·L^{-1} 4-甲基苯硫酚孵育30 min,用458 nm激发获得在红色通道中的活细胞激光共聚焦成像。

2　结果与讨论

2.1　探针YC1的设计以及响应机制

考虑到二氰基异佛尔酮作为荧光母体是一种典型的基于ICT的荧光团,具有长波长荧光发射、大的斯托克斯位移和良好的光稳定性等优势,我们选择二氰基异佛尔酮作为设计探针的荧光团,通过一个醚键,将二氰基异佛尔酮荧光母体与2,4-二硝基苯基作为识别位点的两部分连接成一体。由于2,4-二硝基苯强的吸电子能力导致的部分的PET过程,探针**YC1**基本上是较弱的荧光。苯硫酚中的羟基具有强的亲核性,通过芳香族亲核取代反应机理与探针**YC1**发生反应,2,4-二硝基苯作为离去基团离去,随后释放荧光化合物**2**(主要是酚形式,发射峰主要在594 nm处),荧光响应信号增强(turn-on)。Scheme 2显示了**YC1**探针对4-甲基苯硫酚的检测机理。通过质谱法验证了该机理。在图S4(Supporting information)的核磁氢谱中,我们找到了反应后荧光母体上活泼氢的化学位移δ=9.60。核磁结果支持了Scheme 2中的反应机理。此外,由质谱(图S5)结果发现,[**YC1**+4-methylthiophenol−H]$^-$(即[$C_{26}H_{22}N_4O_6$+C_7H_8S−H]$^-$)的*m/z*计算值319.145 2,与实测值(319.1450 7)吻合,这也支持了Scheme 2中的反应机理。



Scheme 2　Response mechanism of probe **YC1** for detecting 4-methylthiophenol

2.2　探针YC1识别4-甲基苯硫酚的UV-Vis吸收光谱研究

探针**YC1**检测4-甲基苯硫酚的UV-Vis吸收光谱如图1所示。当200 μmol·L^{-1}的4-甲基苯硫酚加入到含有10 μmol·L^{-1}探针**YC1**的PBS(磷酸缓冲盐溶液)/DMSO(1∶1,*V*/*V*,pH=7.4)体系中,随着时间的增加,405 nm处的吸收峰值逐渐下降且红移至442 nm处,同时在598 nm处出现新的吸收峰且峰值逐渐升高,同时,溶液颜色由浅黄色变为深黄色。二氰基异佛尔酮类荧光团的pK_a较高(7.90),在生理条件下会发生部分解离,从而生成2种荧光团:酚形式(主要形式)和酚盐形式(次要形式)。405 nm为探针自身的吸收峰。当与苯硫酚反应后,生成带有羟基的二氰基异佛尔酮类荧光团,部分解离生成2种形式的荧光团的酚形式(主要形式)和酚盐形式(次要形式),UV-Vis光谱中442 nm为酚形式的吸收,598 nm为酚盐形式的吸收。这说明探针**YC1**与4-甲基苯硫酚反应生成了新的化合物,与前述核磁与质谱的结果一致。

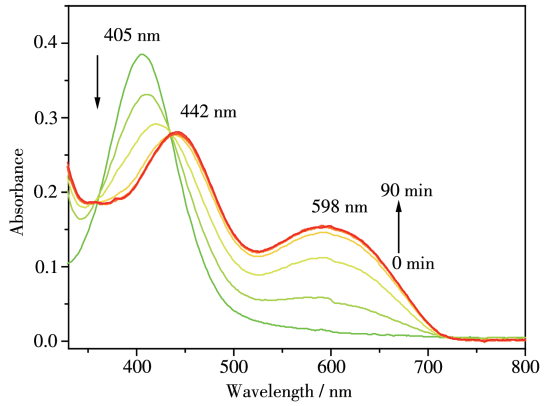


图1　探针**YC1**检测4-甲基苯硫酚的UV-Vis吸收光谱

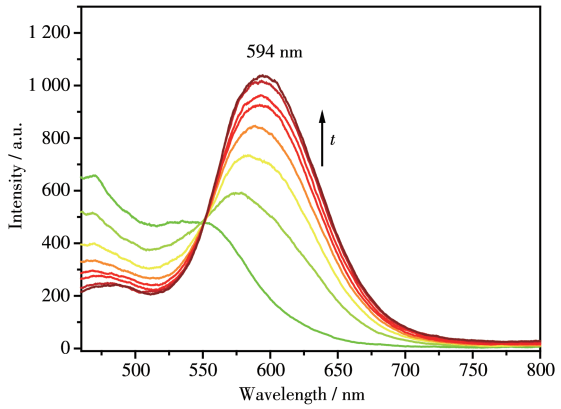
Fig.1　UV-Vis absorption spectra of **YC1** probe for detecting 4-methylthiophenol

2.3　探针YC1识别4-甲基苯硫酚的荧光光谱研究

探针**YC1**检测4-甲基苯硫酚的荧光光谱如图2所示。探针**YC1**在该体系中有较弱的荧光。当30 μmol·L^{-1}的4-甲基苯硫酚加入到含有5 μmol·L^{-1}探针**YC1**的PBS/DMSO(1∶1,*V*/*V*,pH=7.4)体系中,随着时间的增加,594 nm处出现明显的荧光强度增强。这说明探针**YC1**能够用来识别4-甲基苯硫酚,且具有明显的荧光增强(turn-on)响应。

2.4　探针YC1识别4-甲基苯硫酚的动力学研究

探针**YC1**检测4-甲基苯硫酚的动力学研究使



λ_{ex}=420 nm, concentration of 4-methylthiophenol=30 μmol·L^{-1}

图2 探针**YC1**检测4-甲基苯硫酚的荧光光谱

Fig.2 Fluorescence spectra of **YC1** probe for detecting 4-methylthiophenol

用的是荧光光谱法,结果如图3所示。对探针**YC1**持续光照1.5 h之后,荧光强度基本不变,说明探针**YC1**具有一定的光稳定性。当不同浓度的4-甲基苯硫酚(0、5、10、15、20、25和30 μmol·L^{-1})加入到含有5 μmol·L^{-1}探针**YC1**的PBS/DMSO(1∶1, *V*/*V*, pH=7.4)体系中,可以发现4-甲基苯硫酚的浓度为20 μmol·L^{-1},时间约90 min时,荧光响应信号基本达到一个动态平衡状态(激发波长为420 nm,发射波长为594 nm,激发狭缝宽度/发射狭缝宽度:5 nm/5 nm)。

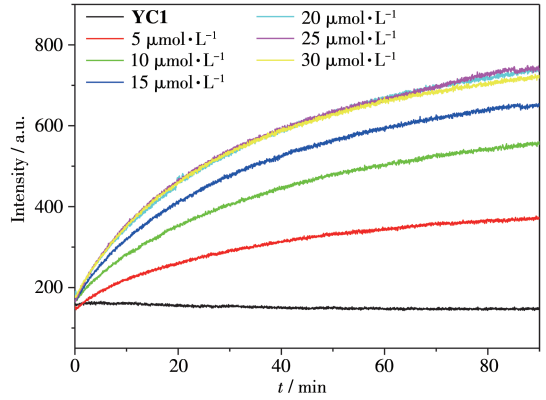


图3 探针**YC1**检测4-甲基苯硫酚的动力学

Fig.3 Kinetic of detecting 4-methylthiophenol by **YC1** probe

2.5 探针YC1识别4-甲基苯硫酚的pH体系研究

为了考察探针**YC1**识别4-甲基苯硫酚的有效pH范围,我们研究了不同pH值(2~10)对探针**YC1**(5 μmol·L^{-1})和**YC1**(5 μmol·L^{-1})+4-甲基苯硫酚(20 μmol·L^{-1})荧光性质的影响。从图4中,我们可以发现强酸以及强碱条件对探针**YC1**本身的荧光强度没有影响。而探针**YC1**检测4-甲基苯硫酚时,在pH=6.0~8.0范围内荧光响应信号明显。这一结果表明,该探针能够应用于生理环境下检测苯硫酚。

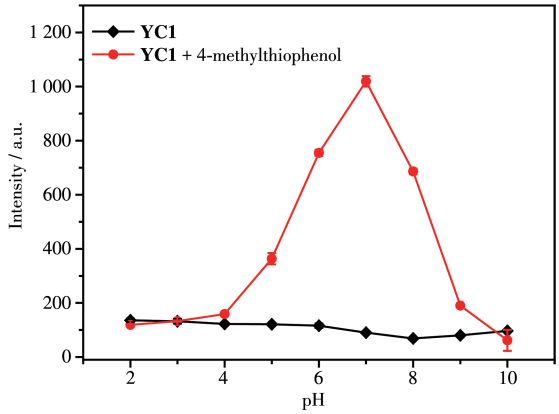


图4 不同pH值下**YC1**(5 μmol·L^{-1})和**YC1**(5 μmol·L^{-1})+4-甲基苯硫酚(20 μmol·L^{-1})的荧光强度

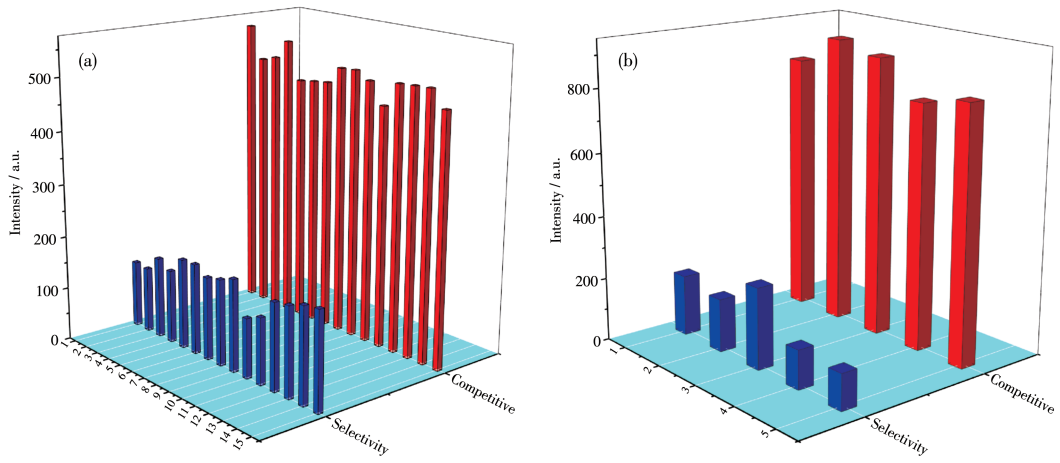
Fig.4 Fluorescence intensity of **YC1** (5 μmol·L^{-1}) and **YC1** (5 μmol·L^{-1})+4-methylthiophenol (20 μmol·L^{-1}) under different pH values

2.6 探针YC1识别4-甲基苯硫酚的选择性研究

为了研究探针**YC1**的选择性,采用荧光光谱考察了探针**YC1**对4-甲基苯硫酚的识别性能。在含有5 μmol·L^{-1}探针**YC1**的PBS/DMSO(1∶1, *V*/*V*, pH=7.4)体系中,先后分别加入100 μmol·L^{-1}各种分析物与20 μmol·L^{-1} 4-甲基苯硫酚,分别进行检测。各种分析物分为2组,第1组如图5a所示,第2组如图5b所示。可以看出,探针与其他分析物不能引起**YC1**在594 nm处的荧光强度增强,而只有在4-甲基苯硫酚(20 μmol·L^{-1})存在的情况下,**YC1**在594 nm处的荧光强度才能增强。这些结果表明,探针**YC1**可以较好地选择性识别4-甲基苯硫酚,其他分析物的存在不干扰探针**YC1**对4-甲基苯硫酚的检测。

2.7 探针YC1识别4-甲基苯硫酚的检测限研究

为了研究探针**YC1**对4-甲基苯硫酚的灵敏度,我们将不同浓度的4-甲基苯硫酚(2~10 μmol·L^{-1})分别加入到含有5 μmol·L^{-1}探针**YC1**的3种不同混合体系中,测试其相应的荧光强度。根据594 nm处的荧光强度变化值与对应的4-甲基苯硫酚浓度得到工作曲线(Y=Ac+B),c的单位为μmol·L^{-1},测量时的激发波长为420 nm,结果如图6所示。根据IUPAC规定的检测限公式:LOD=kS_b/m[22](其中k为与置信度有关的常数,IUPAC建议取k=3,S_b为空白标准偏差,m为分析标准曲线在低浓度范围内的斜率),可以算



(a) 1. Blank, 2. K^+, 3. Ca^{2+}, 4. Zn^{2+}, 5. Ag^+, 6. Mg^{2+}, 7. Cl^-, 8. F^-, 9. Br^-, 10. $S_2O_3^{2-}$, 11. HSO_4^-, 12. SO_4^{2-}, 13. NO_2^-, 14. CO_3^{2-}, 15. HCO_3^-;
(b) 1. Cys, 2. Hcy, 3. GSH, 4. H_2S, 5. Blank

图5　探针**YC1**对4-甲基苯硫酚的选择性及分析物竞争性

Fig.5　Selectivity and analyte competitive of **YC1** probe to 4-methylthiophenol

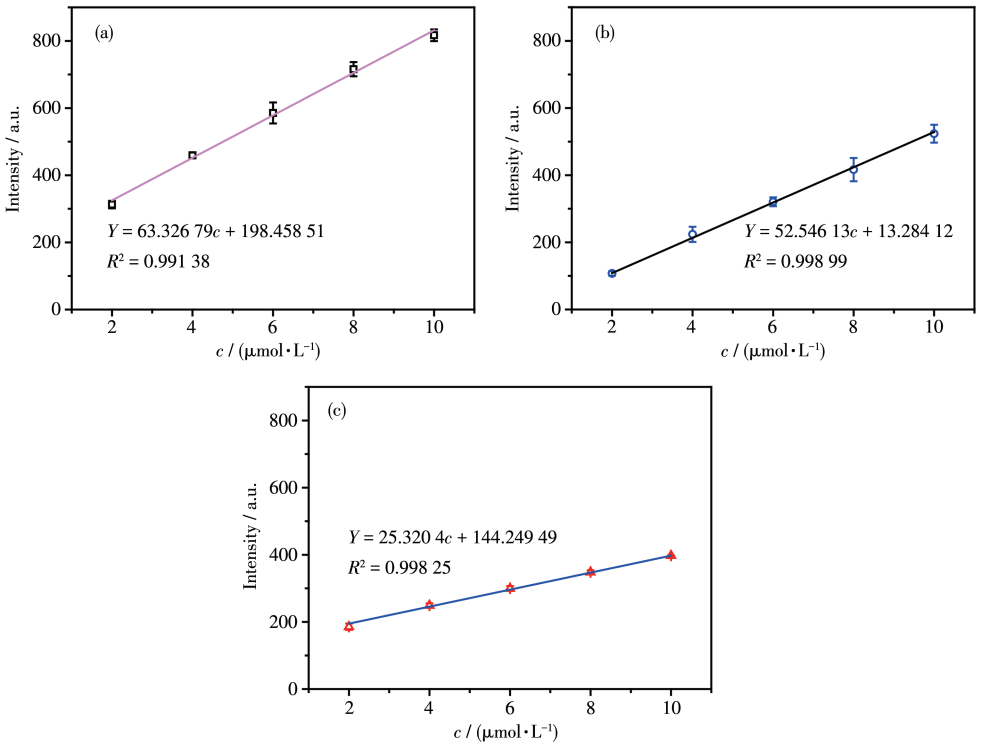


图6　在不同水样中探针**YC1**荧光强度与4-甲基苯硫酚浓度的线性相关: (a) 池塘水、(b) 自来水和(c) PBS

Fig.6　Linear correlation between fluorescence intensity of probe **YC1** and 4-methylthiophenol concentration in different water samples: (a) pond water, (b) tap water and (c) PBS

出探针**YC1**在池塘水、自来水和PBS中对4-甲基苯硫酚的检测限分别为0.19、0.38和0.65 μmol·L^{-1},。

2.8　探针YC1识别4-甲基苯硫酚的细胞成像研究

探针**YC1**在活细胞内对4-甲基苯硫酚的成像标记能力通过激光共聚焦显微镜来评估。图7所示的是将5 μmol·L^{-1}探针孵育到HeLa细胞中,20 min后没有明显的荧光信号;接着将5 μmol·L^{-1}探针孵育到HeLa细胞中,再孵入20 μmol·L^{-1}的4-甲基苯硫酚,30 min后产生明显的红色荧光。细胞成像实验表明探针具有较好的细胞膜通透性,并且探针可

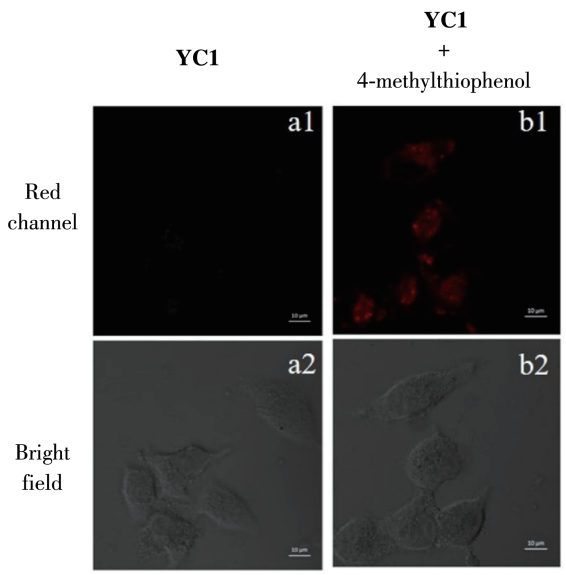


图7 探针**YC1**对4-甲基苯硫酚的激光共聚焦成像:只有探针的荧光图 (a1)和明场图 (a2); 外源性4-甲基苯硫酚响应荧光图 (b1)和明场图 (b2)

Fig.7 Confocal laser imaging of probe **YC1**: fluorescence image (a1) and bright field image (a2) of the probe; fluorescence image (b1) and bright field image (b2) of exogenous 4-methylthiophenol response

以用来标记活细胞中外源性的4-甲基苯硫酚。

3 结 论

我们选择具有强吸电子基的2,4-二硝基苯与二氰基异佛尔酮衍生物连接,设计并合成了基于二氰基异佛尔酮的荧光探针**YC1**用于特异性检测苯硫酚。苯硫酚通过芳香族亲核取代机制与探针**YC1**发生反应,导致2,4-二硝基苯部分离去,随后释放具有明显荧光发射的化合物**2**,荧光响应信号(594 nm)增强。在PBS/DMSO的体系中,**YC1**对苯硫酚的检出限为0.65 μmol·L^{-1}。该方法是基于探针**YC1**对4-甲基苯硫酚的识别具有荧光增强(turn-on)的性质。此外,探针还可以在HeLa细胞中实现对外源性4-甲基苯硫酚的荧光成像。该检测方法可以为今后的苯硫酚检测提供一个有用的工具与手段。

Supporting information is available at http://www.wjhxxb.cn

参考文献:

[1] Yue Y K, Yin C X, Huo F J, Chao J B, Zhang Y B. *Sens. Actuators B*, **2016**,**223**:496-500

[2] Yin C X, Zhang W J, Liu T, Chao J B, Huo F J. *Sens. Actuators B*, **2017**,**246**:988-993

[3] Liu T, Huo F J, Li J F, Chao J B, Zhang Y B, Yin C X. *Sens. Actuators B*, **2016**,**232**:619-624

[4] Yue Y K, Huo F J, Ning P, Zhang Y B, Chao J B, Meng X M, Yin C X. *J. Am. Chem. Soc.*, **2017**,**139**:3181-3185

[5] Yang Y T, Huo F J, Yin C X, Zheng A M, Chao J B, Li Y Q, Nie Z X, Ramón M M, Liu D S. *Biosens. Bioelectron.*, **2013**,**47**:300-306

[6] Yang X Z, Wei X R, Sun R, XuY J, Ge J F. *Spectrochim. Acta A*, **2020**,**226**:117582

[7] Liu X D, Sun R, Xu Y, Xu Y J, Ge J F, Lu J M. *Sens. Actuators B*, **2013**,**178**:525-531

[8] Yu D H, Huang F H, Ding S S, Feng G Q. *Anal. Chem.*, **2014**,**86**:8835-8841

[9] Sun Q, Yang S H, Wu L, Yang W C, Yang G F. *Anal. Chem.*, **2016**, **88**:2266-2272

[10]Hell T P, Lindsay R C. *J. Environ. Sci. Health. Part B*, **2008**,**21**:349-360

[11]Wu F, Wang H Y, Xu J C, Yuan H Q, Zeng L T, Bao G M. *Sens. Actuators B*, **2018**,**254**:21-29

[12]Xie X L, Li M M, Tang F Y, Li Y, Zhang L L, Jiao X Y, Wang X, Tang B. *Anal. Chem.*, **2017**,**89**:3015-3020

[13]Feng W Y, Li M X, Sun Y, Feng G Q. *Anal. Chem.*, **2017**,**89**:6106-6112

[14]Hua B, Shao L, Yu G C, Huang F H. *Chem. Commun.*, **2016**, **52**: 10016-10019

[15]Guo Z Q, Zhu W H, Tian H. *Chem. Commun.*, **2012**,**48**:6073-6084

[16]Cheng Y, Ma F L, Gu X F, Liu Z, Zhang X X, Xue T Z, Zheng Y, Qi Z J. *Spectrochim. Acta Part A*, **2019**,**210**:281-288

[17]Wang J P, Wen Y, Huo F J, Yin C X. *Sens. Actuators B*, **2019**,**294**: 141-147

[18]Liu Q M, Li A Y, Li X K, Li B, Zhang Y H, Li J, Guo Y. *Sens. Actuators B*, **2019**,**283**:820-830

[19]Lv W J, Chen Y L, Bian L, Chen X G. *Talanta*, **2019**,**197**:204-210

[20]Liu H, Guo C L, Guo S J, Fan J T, Wang L J, Shi D Y. *Talanta*, **2019**, **201**:301-308

[21]Wu Q, Yin C X, Wen Y, Zhang Y B, Huo F J. *Sens. Actuators B*, **2019**,**288**:507-511

[22]Goswami S, Das A K, Manna A, Maity A K, Saha P, Quah C K, Fun H K, Abdel-Aziz H A. *Anal. Chem.*, **2014**,**86**:6315-6322