

# 基于水解识别机制的可视化ClO<sup>-</sup>和ONOO<sup>-</sup>荧光探针的合成及性质研究

来素涵, 陈佳敏, 曾 竟\*, 李佳佳

新疆师范大学化学化工学院, 新疆 乌鲁木齐

收稿日期: 2022年4月26日; 录用日期: 2022年5月24日; 发布日期: 2022年5月31日

## 摘 要

次氯酸(ClO<sup>-</sup>)和过氧化亚硝酸盐(ONOO<sup>-</sup>)作为生命体中的重要活性氧, 参与老化、免疫等生理过程, 因此构建合成方法简单、灵敏度高、选择性好、且同时精准识别不同ROS/RNS的分析方法具有重要的意义。本文通过酰胺键连接四苯基乙烯和罗丹明荧光母体合成荧光探针TPE-RhB, 当探针TPE-RhB与ClO<sup>-</sup>作用时, 5秒后在490 nm处产生98.6%的荧光猝灭, 而在582 nm处荧光强度增强, 同时引起探针溶液由无色变为粉红色, 实现了对ClO<sup>-</sup>的可视化荧光识别, 检出限可至 $8.2 \times 10^{-6}$  M。但当加入ONOO<sup>-</sup>后, 30秒内仅在490 nm处实现了97.5%荧光猝灭效应, 检测限为 $1.4 \times 10^{-5}$  M。光谱结果表明探针TPE-RhB具有稳定性强、灵敏度高等优点。此外, 通过TPE-RhB-ClO<sup>-</sup>和TPE-RhB-ONOO<sup>-</sup>混合物的ESI-MS分析, 初步确定了探针TPE-RhB识别ROS/RNS的反应机理, 即在ClO<sup>-</sup>存在下, 探针TPE-RhB结构中罗丹明荧光母体侧的酰胺键更易氧化水解开环, 引起探针溶液颜色及荧光强度同时变化, 而在ONOO<sup>-</sup>存在下, 探针TPE-RhB结构中四苯基乙烯荧光母体侧的酰胺键更易水解, 仅引起490 nm处荧光猝灭。

## 关键词

四苯乙烯, 罗丹明B, 可视化识别, ClO<sup>-</sup>和ONOO<sup>-</sup>荧光探针

# Synthesis and Characterization of Visualized ClO<sup>-</sup> and ONOO<sup>-</sup> Fluorescent Probes Based on Hydrolytic Recognition Mechanism

Suhan Lai, Jiamin Chen, Jing Zeng\*, Jiajia Li

College of Chemistry and Chemical Engineering, Xinjiang Normal University, Urumqi Xinjiang

Received: Apr. 26<sup>th</sup>, 2022; accepted: May 24<sup>th</sup>, 2022; published: May 31<sup>st</sup>, 2022

\*通讯作者。

文章引用: 来素涵, 陈佳敏, 曾竟, 李佳佳. 基于水解识别机制的可视化 ClO<sup>-</sup>和 ONOO<sup>-</sup>荧光探针的合成及性质研究[J]. 化学工程与技术, 2022, 12(3): 209-225. DOI: 10.12677/hjct.2022.123029

## Abstract

Hypochlorous acid ( $\text{ClO}^-$ ) and peroxynitrite ( $\text{ONOO}^-$ ) as important reactive oxygen species in living organisms, are involved in physiological processes such as ageing and immunity, so it is important to construct analytical methods that are simple to synthesize, sensitive, selective, and accurate in identifying different ROS/RNS at the same time. In this paper, the fluorescent probe TPE-RhB was synthesized by linking tetraphenylethylene and rhodamine fluorophore through amide bonding. When the probe TPE-RhB interacted with  $\text{ClO}^-$ , 98.6% fluorescence burst was generated at 490 nm after 5 s, while the fluorescence intensity was enhanced at 582 nm, causing the probe solution to change from colourless to pink at the same time, achieving visual fluorescence recognition of  $\text{ClO}^-$  with detection limits. However, when  $\text{ONOO}^-$  was added, only 97.5% of the fluorescence burst was achieved at 490 nm within 30 s, with a detection limit of  $1.4 \times 10^{-5}$  M. The spectral results indicate that the probe TPE-RhB has the advantage of high stability and sensitivity. In addition, the ESI-MS analysis of TPE-RhB- $\text{ClO}^-$  and TPE-RhB- $\text{ONOO}^-$  mixtures tentatively determined the reaction mechanism of ROS/RNS recognition by the probe TPE-RhB, in the presence of  $\text{ClO}^-$ , the amide bond on the rhodamine fluorescent parent side of the probe TPE-RhB structure was more prone to oxidative hydrolysis and ring opening, causing a change in colour and fluorescence intensity of the probe solution, while in the presence of  $\text{ONOO}^-$ , the amide bond on the rhodamine fluorescent parent side of the probe TPE-RhB structure was more prone to oxidative hydrolysis and ring opening. In the presence of  $\text{ONOO}^-$ , the amide bond on the fluorescent parent side of tetraphenylethylene in the TPE-RhB structure was more readily hydrolysed, causing a fluorescence burst at 490 nm.

## Keywords

Tetraphenylethylene, Rhodamine B, Colorimetric Recognition,  $\text{ClO}^-$  and  $\text{ONOO}^-$  Fluorescence Probes

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

次氯酸( $\text{ClO}^-$ )和过氧化亚硝酸盐( $\text{ONOO}^-$ )作为生命体中的重要活性氧[1] [2] [3] [4] [5], 具有较强氧化性和亲核性[6] [7], 在维持体内氧化还原平衡中发挥了重要作用, 但过量活性氧也会引起疾病[8] [9], 因此开发准确识别活性氧的有效方法具有重要的意义。与其他检测方法相比, 荧光检测法具有灵敏度高、选择性好、实时检测等优点[10] [11] [12] [13]。人们已经开发出形式多样的识别活性氧/氮的荧光探针。到目前为止, 基于酰胺/酯的氧化裂解[14] [15] [16], 双键的氧化裂解( $\text{C}=\text{C}$ 、 $\text{C}=\text{N}$ 、 $\text{C}=\text{S}$  和  $\text{N}=\text{N}$ ) [17] [18] [19], 硫醚化合物/硒化合物的氧化[20]等作用原理开发设计了许多  $\text{ClO}^-$  荧光探针; 同时基于硼酸盐/硼酸氧化裂解[21] [22] [23]成苯酚, 与反应酮生成二环氧乙烷[24] [25], 有机硒/有机碲化合物的氧化[26] [27] [28], 芳香族化合物的硝化[29], 苯酚的氧化[30], 亚硝胺[31]的生成及其水解的作用机制设计合成了  $\text{ONOO}^-$  的荧光探针, 上述探针均对  $\text{ClO}^-$  和  $\text{ONOO}^-$  的识别表现出较高的灵敏度和选择性, 但在探针合成上也存在识别基构建困难, 不易合成等缺点, 而酰胺键易于合成, 往往通过羧酸衍生物氨解既可以快速合成, 因此利用酰胺键水解前后的荧光信号改变设计次氯酸或过氧化亚硝酸盐荧光探针具备可行性和必要性。

罗丹明荧光母体螺内酰胺闭环时溶液为无色、荧光强度较弱, 而开环结构具有光稳定性好、刚性共轭结构大、发射波长长、水溶性好的优势, 往往用于可视化荧光探针的设计与合成。而四苯基乙烯荧光

母体作为聚集诱导发光(AIE)物质的典型代表,具有结构易修饰等优势,鉴于上述荧光母体优势,本文利用2,6-吡啶二甲酰氯通过酰胺键连接四苯基乙烯和罗丹明结构,合成得到探针 **TPE-RhB**,探针充分发挥罗丹明的可视化优势和四苯基乙烯的聚集诱导发光特性,利用  $\text{ClO}^-$ 和  $\text{ONOO}^-$ 氧化和亲核能力的差异,通过对探针 **TPE-RhB** 中酰胺键识别机制的不同,同时实现了对  $\text{ClO}^-$ 和  $\text{ONOO}^-$ 的可视化选择性识别。这项研究可以扩大检测活性氧  $\text{ClO}^-$ 和  $\text{ONOO}^-$ 荧光探针的设计思路,为众多的研究者设计合成荧光探针提供依据。

## 2. 实验部分

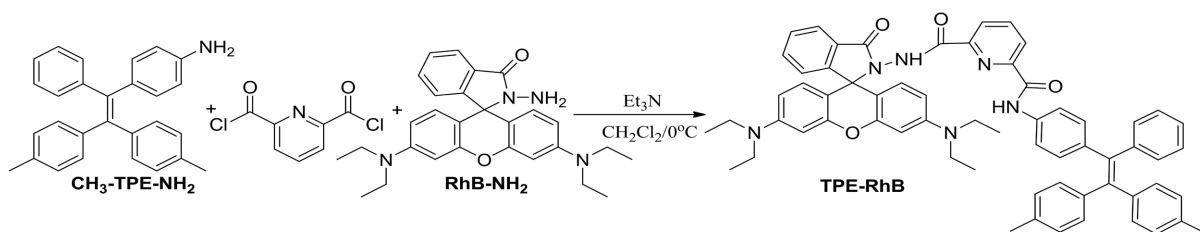
### 2.1. 仪器与试剂

通过美国 Varian 公司 Varian 400-MR 测定核磁共振数据;由日立 U-3310 紫外可见分光光度计测定紫外吸收光谱数据;利用 Bruker TENSOR27 红外光谱仪测定红外光谱数据;借助 Varian Cary Eclipse 荧光分光光度计测定荧光光谱数据;由 TRACE MS 质谱仪测定质谱数据。

无水乙醇,四氢呋喃,2,6-吡啶二甲酰氯均为市售分析纯或化学纯试剂。

### 2.2. 化合物 **TPE-RhB** 的合成

参照图式 1 合成探针 **TPE-RhB**:称量 0.306 g (1.5 mmol) 2,6-吡啶二甲酰氯置于 100 mL 干燥圆底烧瓶中,并用 15.0 mL 二氯甲烷溶解,启动搅拌,将体系冰浴降温到  $0^\circ\text{C}$  左右后,缓慢滴入 0.375 g (1 mmol) 1,1-二(4-甲基苯基)-2-(4-氨基苯基)-2-苯基乙烯(**CH<sub>3</sub>-TPE-NH<sub>2</sub>**)的二氯甲烷溶液。待 **CH<sub>3</sub>-TPE-NH<sub>2</sub>** 基本消失后滴入 0.91 g (2 mmol)罗丹明酰肼(**RhB-NH<sub>2</sub>**)的二氯甲烷溶液,全部滴加完毕后,加入 0.5 mL 三乙胺,缓慢回至室温,30 min 停止反应,加入 20 mL 蒸馏水猝灭反应,二氯甲烷萃取( $3 \times 30$  mL)有机相,并用无水硫酸镁干燥 2 h,过滤、洗涤、旋蒸溶剂得到紫红色粗品,粗品用石油醚/乙酸乙酯( $v/v = 3:1$ )柱层析分离得白色粉末固体 **TPE-RhB** 0.5 g,产率:58%,m.p.  $249^\circ\text{C} \sim 251^\circ\text{C}$ ;表征数据如图 S4~S6,  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$ : 1.05 (t,  $J = 7.2$  Hz,  $J = 7$  Hz, 12H), 2.24 (s, 6H), 3.11~3.24 (m, 8H), 6.22 (t,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 6.23 (s, 2H), 6.61 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H), 6.85~7.14 (m, 16H), 7.33~7.5 (m, 5H), 7.66 (s, 2H), 7.78 (d,  $J = 6.8$  Hz, 1H), 8.23 (d,  $J = 7.2$  Hz, 1H), 9.68 (s, 1H);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)  $\delta$ : 12.5, 21.1, 021.2, 44.2, 97.8, 107.9, 119.61, 123.8, 124.0, 126.0, 127.5, 128.2, 128.4, 129.1, 131.1, 131.2, 131.4, 131.6, 133.0, 135.8, 136.0, 138.3, 139.4, 139.8, 140.6, 140.8, 141.0, 144.46, 147.1, 148.8, 149.0, 151.6, 153.8, 160.6, 160.8, 166.2. IR (v, KBr): 2970, 1633, 1518, 1402, 1221, 1119, 699  $\text{cm}^{-1}$ ; ESI-MS  $m/z$  (%): 964.9 (M + H 100)。



**Scheme 1.** Synthetic routes of probe **TPE-RhB**

**图式 1.** 探针 **TPE-RhB** 的合成路线

### 2.3. 溶液配制方法

称量 48.15 mg 探针 **TPE-RhB** 置于干燥的小烧杯中,用无水乙醇溶解,并转移至 100 毫升容量瓶中,

定容得浓度为  $5.0 \times 10^{-4}$  mol/L 储备液。识别  $\text{ClO}^-$  和  $\text{ONOO}^-$  的光谱研究均在 EtOH/H<sub>2</sub>O (50  $\mu\text{mol/L}$ , v/v, 1/1, PBS, pH 7.4) 溶液中进行, 激发波长为  $\lambda_{\text{Ex}} = 364$  nm, 激发和发射狭缝宽度均为 5 nm。

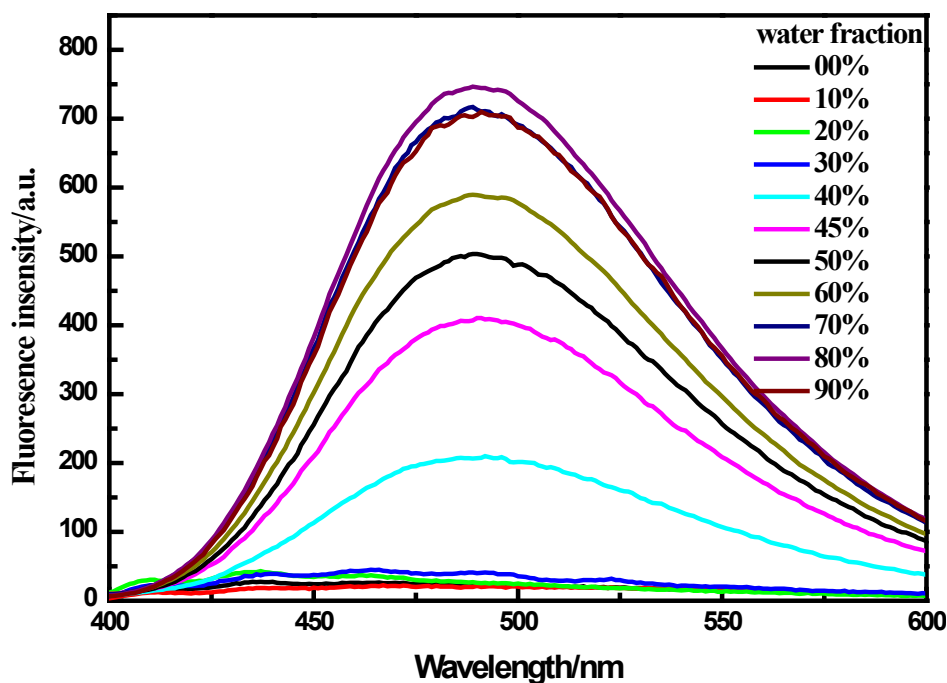
活性氧/氮的配制参照文献方法[32] [33]:  $\text{NaClO}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 叔丁基过氧化氢(TBHP), NO 均用超纯水进行稀释得到;  $\cdot\text{OH}$  通过  $\text{Fe}^{2+}$  和  $\text{H}_2\text{O}_2$  发生芬顿反应得到; TBO-通过  $\text{Fe}^{2+}$  和 TBHP 发生芬顿反应得到;  $^1\text{O}_2$  通过钼酸钠和  $\text{H}_2\text{O}_2$  发生反应得到;  $\text{ONOO}^-$  通过以下方法获得: 冰浴条件下, HCl 水溶液(0.6 M, 5 mL) 和  $\text{H}_2\text{O}_2$  溶液(0.7 M, 5 mL)混合, 搅拌 20 min 后, 加入 NaOH 溶液(1.5 M, 5 mL)和  $\text{NaNO}_2$  溶液(0.6 M, 5 mL) 的混合溶液继续反应 1 min, 得到微黄溶液, 即为  $\text{ONOO}^-$  储备液, 储备液在  $-20^\circ\text{C}$  下保存, 其浓度通过紫外-可见吸收光谱由 302 nm 处的吸光度计算,  $\epsilon = 1670 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 。

### 3. 结果与讨论

#### 3.1. 聚集诱导荧光性质研究

众所周知, 四苯基乙烯衍生物是典型的 AIE 物质, 当连接上罗丹明荧光母体后是否保留该特性, 对能否利用聚集诱导发光原理设计探针具有重要意义。

结果如图 1 所示, 化合物 TPE-RhB 的荧光强度随含水量的增加呈现上升趋势, 当水体积分数为 80% 时, 荧光强度达到最大为 757, 比纯乙醇溶液时增强了 37 倍, 结果表明当四苯乙烯与罗丹明连接后探针 TPE-RhB 仍具有典型的 AIE 特征。

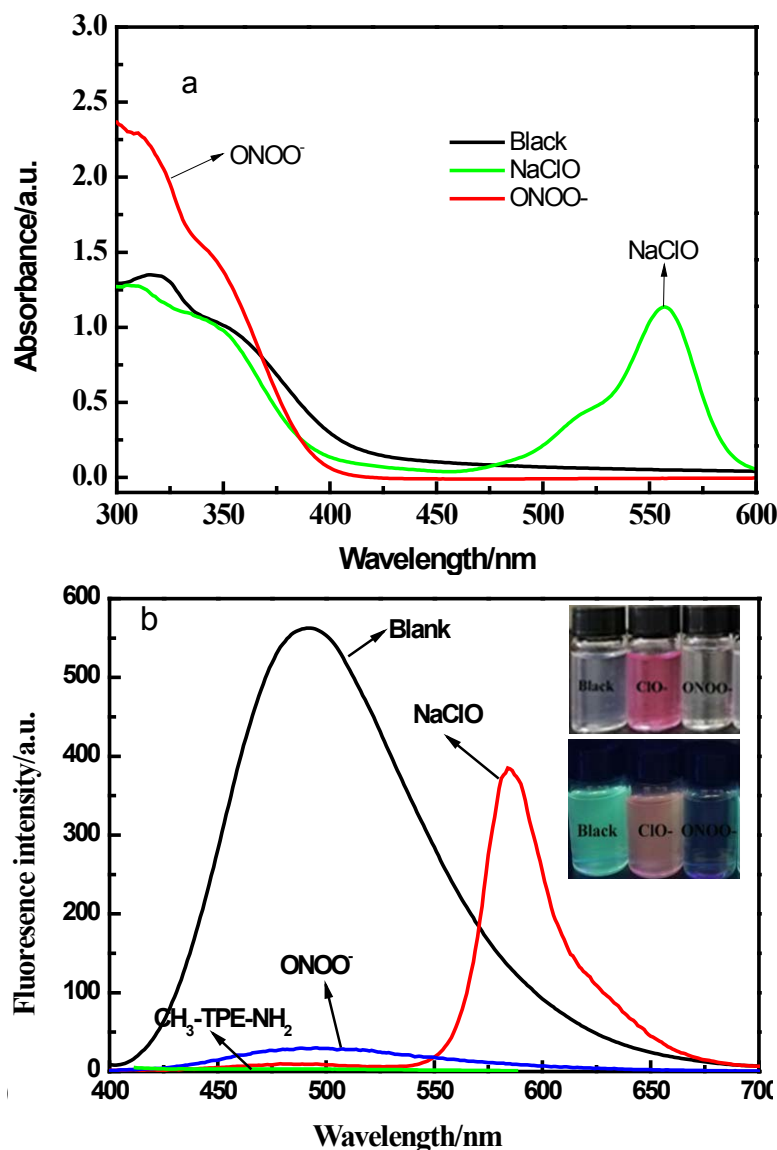


**Figure 1.** Emission spectra of probe TPE-RhB (50  $\mu\text{mol/L}$ ) in EtOH-H<sub>2</sub>O mixtures with different water fraction ( $\lambda_{\text{Em}} = 490$  nm)

**图 1.** 探针 TPE-RhB (50  $\mu\text{mol/L}$ ) 在不同水体积分数的乙醇/水溶液中的聚集诱导荧光图 ( $\lambda_{\text{Em}} = 490$  nm)

#### 3.2. 探针 TPE-RhB 的选择性识别研究

为考察 TPE-RhB 对活性氧的响应情况, 测定了探针 TPE-RhB 与活性氧反应前后的紫外光谱和荧光光谱, 结果如图 2 和图 S1~S3 所示。



**Figure 2.** UV-visible absorption spectrum (a) and fluorescence spectra (b) of probe **TPE-RhB** solution after adding 8 equiv.  $\text{ClO}^-$  and  $\text{ONOO}^-$  (the inner pictures were taken under visible light and 365 nm uv lamps before and after adding  $\text{ClO}^-$  and  $\text{ONOO}^-$  into the probe solution)

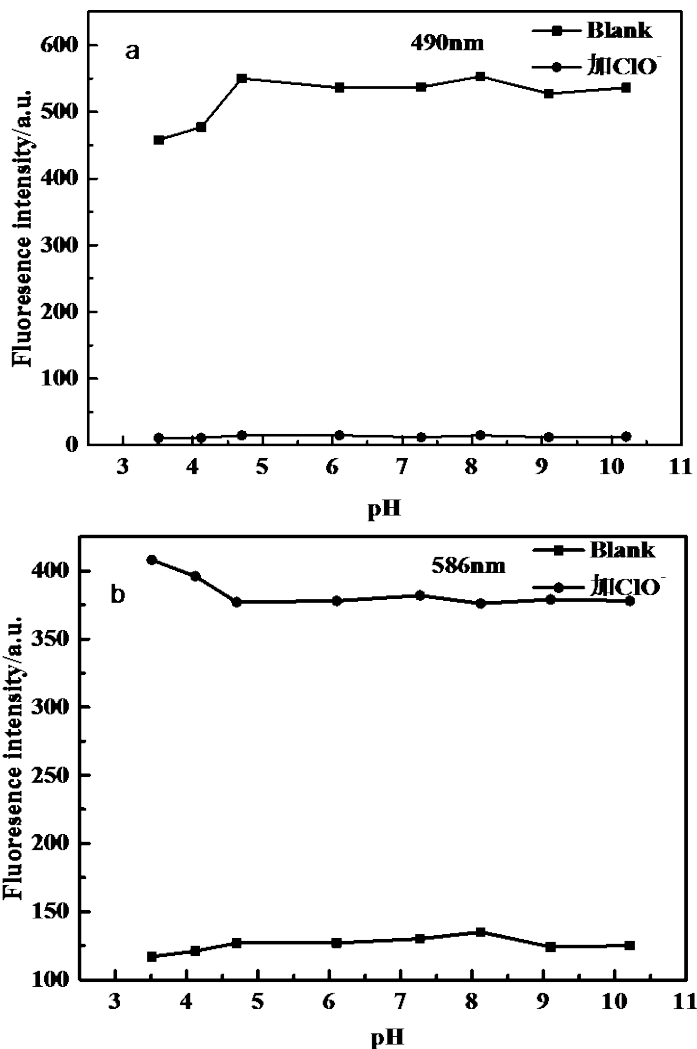
**图 2.** 探针 **TPE-RhB** 的乙醇/水溶液中加入 8 equiv.  $\text{ClO}^-$  和  $\text{ONOO}^-$  后的紫外-可见吸收光谱图(a)和荧光光谱图(b) (内图为探针溶液中加入  $\text{ClO}^-$ 、 $\text{ONOO}^-$  前后在可见光和 365 nm 紫外灯下照片)

从上述结果中可知, 探针 **TPE-RhB** 的乙醇/水溶液在 325 nm 和 360 nm 处有明显的紫外吸收峰, 在加入  $\text{ClO}^-$  后, 该位置的紫外吸收略微减弱, 同时 582 nm 处产生新的吸收峰。但与  $\text{ONOO}^-$  反应后, 探针在 325 nm 和 360 nm 的紫外吸收峰明显增强, 说明探针与  $\text{ONOO}^-$ 、 $\text{ClO}^-$  发生了化学反应(图 2(a))。探针在加入  $\text{ClO}^-$  后, 在 5 秒内引起探针溶液颜色由无色变为粉红色, 同时 490 nm 处发生猝灭比为 98.6% 的荧光猝灭效应, 而 582 nm 处实现了荧光增强,  $I_{582}/I_{490}$  增大了 218 倍, 实现对  $\text{ClO}^-$  的可视化荧光识别。当加入  $\text{ONOO}^-$  后, 30 秒内仅观察到 490 nm 处荧光强度急剧下降, 猝灭比为 97.5% (图 2(b))。而在其他活性氧或金属离子存在下则无上述现象, 表明探针对  $\text{ONOO}^-$ 、 $\text{ClO}^-$  表现出可视化识别能力。

### 3.3. 探针 TPE-RhB 识别 $\text{ClO}^-$ 的光谱性质研究

#### 3.3.1. 探针 TPE-RhB 识别 $\text{ClO}^-$ 前后在不同 pH 条件下荧光性质研究

研究了 pH 值对该探针的荧光响应影响, 结果如图 3 所示。



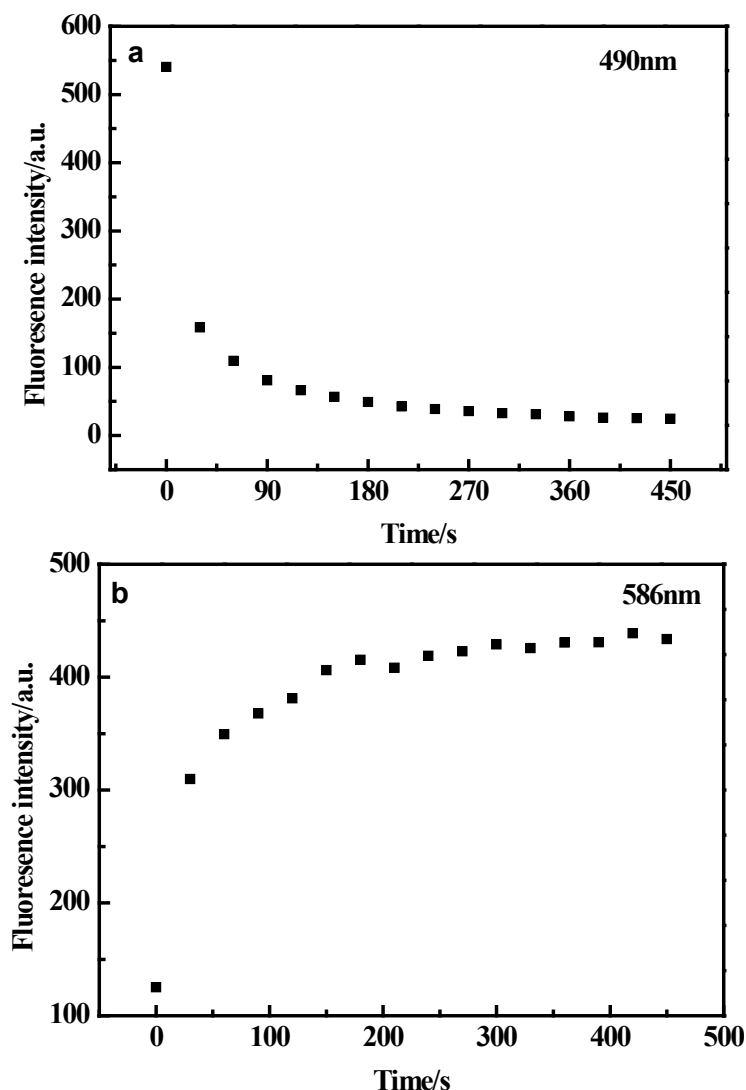
**Figure 3.** The pH value influence on the fluorescence intensity of probe TPE-RhB in the absence and presence of  $\text{ClO}^-$  (a:  $\lambda_{Em} = 490 \text{ nm}$ , b:  $\lambda_{Em} = 586 \text{ nm}$ )

**图 3.** 在不同 pH 值条件下, 探针 TPE-RhB 与  $\text{ClO}^-$  作用前后的荧光强度变化图(a:  $\lambda_{Em} = 490 \text{ nm}$ , b:  $\lambda_{Em} = 586 \text{ nm}$ )

在无  $\text{HClO}/\text{ClO}^-$  存在下, 探针溶液在 pH 4.7~10.2 范围内表现出较为稳定的荧光响应, 且始终处于无色状态。在  $\text{HClO}/\text{ClO}^-$  存在下, 探针溶液在 pH 3.5~10.2 范围内, 490 nm 荧光强度表现出猝灭, 586 nm 出现新的发射峰且溶液变为粉红色, 由于生命体系大部分为中性, 在后续光谱性质测试中以 PBS 溶液为缓冲溶液, pH 值选为 7.4。

#### 3.3.2. 探针 TPE-RhB 与 $\text{ClO}^-$ 反应动力学实验

在探针 TPE-RhB 的乙醇/水加入 8 equiv.  $\text{ClO}^-$ , 观察并测定探针溶液颜色以及荧光强度变化, 结果如图 4 所示。



**Figure 4.** Time-dependent fluorescence changes of probe TPE-RhB in the absence and presence of  $\text{ClO}^-$  (a:  $\lambda_{Em} = 490 \text{ nm}$ , b:  $\lambda_{Em} = 586 \text{ nm}$ )

**图 4.** 在不同反应时间条件下, 探针 TPE-RhB 与  $\text{ClO}^-$  作用前后的荧光强度变化图(a:  $\lambda_{Em} = 490 \text{ nm}$ , b:  $\lambda_{Em} = 586 \text{ nm}$ )

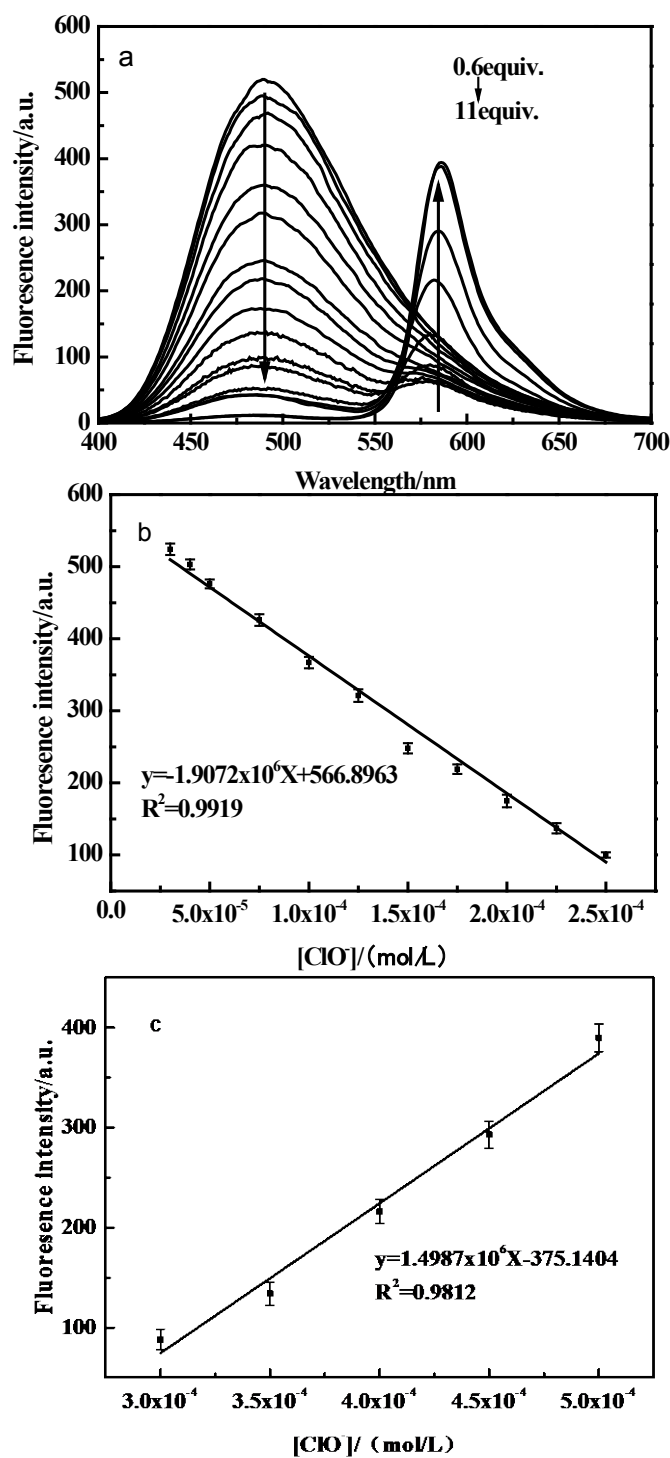
当探针 TPE-RhB 的乙醇/水溶液加入 8 equiv.  $\text{ClO}^-$  后, 探针溶液 5 秒内迅速变红, 同时 490 nm 处荧光强度迅速降低, 而 586 nm 处的荧光强度迅速增加, 在 180 s 左右, F586 荧光强度保持稳定, 结果表明探针与  $\text{ClO}^-$  反应非常迅速, 后续荧光测试选择 180 秒后测定。

### 3.3.3. 探针 TPE-RhB 在不同浓度 $\text{ClO}^-$ 存在下的荧光滴定实验

利用荧光光谱法测定了在不同浓度  $\text{ClO}^-$  存在下的荧光发射强度, 结果如图 5 所示。

在探针 TPE-RhB 的乙醇/水溶液中, 490 nm 处荧光强度逐渐减弱, 其荧光强度与  $\text{ClO}^-$  浓度在 30~250  $\mu\text{M}$  范围符合线性方程  $y = -1.91 \times 10^6 x + 566.90$ , 线性系数为 0.9919 (图 5(b)), 通过公式  $D = 3S_d/\rho$  (其中  $\rho$  是荧光强度与  $\text{ClO}^-$  的斜率,  $S_d$  是空白标准偏差), 得出检测限为  $8.2 \times 10^{-6} \text{ M}$ , 586 nm 发射波长下荧光强度与  $\text{ClO}^-$  浓度在 300~500  $\mu\text{M}$  范围内符合线性方程  $y = 1.50 \times 10^6 x - 375.14$ , 线性系数为 0.9812 (图 5(c)), 并通过公式  $D = 3S_d/\rho$  (其中  $\rho$  是荧光强度与  $\text{ClO}^-$  的斜率,  $S_d$  是空白标准偏差), 得出检测限为  $6.1 \times 10^{-6} \text{ M}$ 。

该法已应用于自来水中  $\text{ClO}^-$  的加标回收定量检测, 回收率均在 97%~102% (表 S1 和表 S2, 研究结果表明了该法的有效性)。



**Figure 5.** Fluorescence emission spectra (a) and linear relationship of probe TPE-RhB in the presence of different  $\text{ClO}^-$  concentrations (b:  $\lambda_{Em} = 490 \text{ nm}$ , c:  $\lambda_{Em} = 586 \text{ nm}$ )

**图 5.** 在不同浓度  $\text{ClO}^-$  存在下探针 TPE-RhB 溶液的荧光发射光谱图(a)及线性关系图(b:  $\lambda_{Em} = 490 \text{ nm}$ , c:  $\lambda_{Em} = 586 \text{ nm}$ )



### 3.3.4. 探针 TPE-RhB 与 $\text{ClO}^-$ 识别机理初探

为了解 TPE-RhB 与  $\text{ClO}^-$  的作用机制, 对 TPE-RhB- $\text{ClO}^-$  混合物进行了 ESI-MS 分析, 结果如图 6 所示, 初步将  $m/z = 443.76$  和  $m/z = 527.76$  处的峰分别归因于 3 和 6, 因此提出了图 7 中描述的认识机制。即探针 TPE-RhB 经  $\text{NaClO}$  氧化诱导罗丹明结构开环得到罗丹明 N-Cl 化合物 1, 并继续脱氯化氢获得偶氮化合物 2, 2 经水解获得罗丹明 B 3 和中间体 4, 4 进一步水解脱氮得化合物 6。在这识别过程中, 化合物 3 的产生将会导致 586 nm 处的荧光强度迅速增加, 并伴随探针溶液颜色变红, 而化合物 6 在溶液中溶解性更好, 则会引起 490 nm 荧光猝灭。

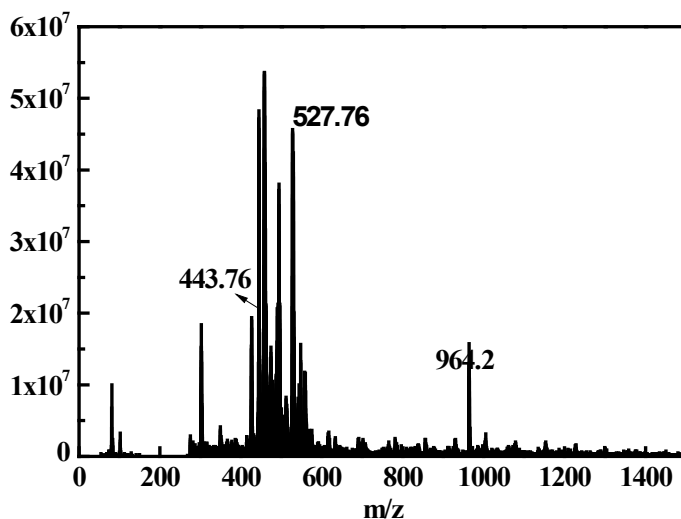


Figure 6. ESI-MS diagram of TPE-RhB- $\text{ClO}^-$  mixture

图 6. TPE-RhB- $\text{ClO}^-$  混合物的 ESI-MS 图

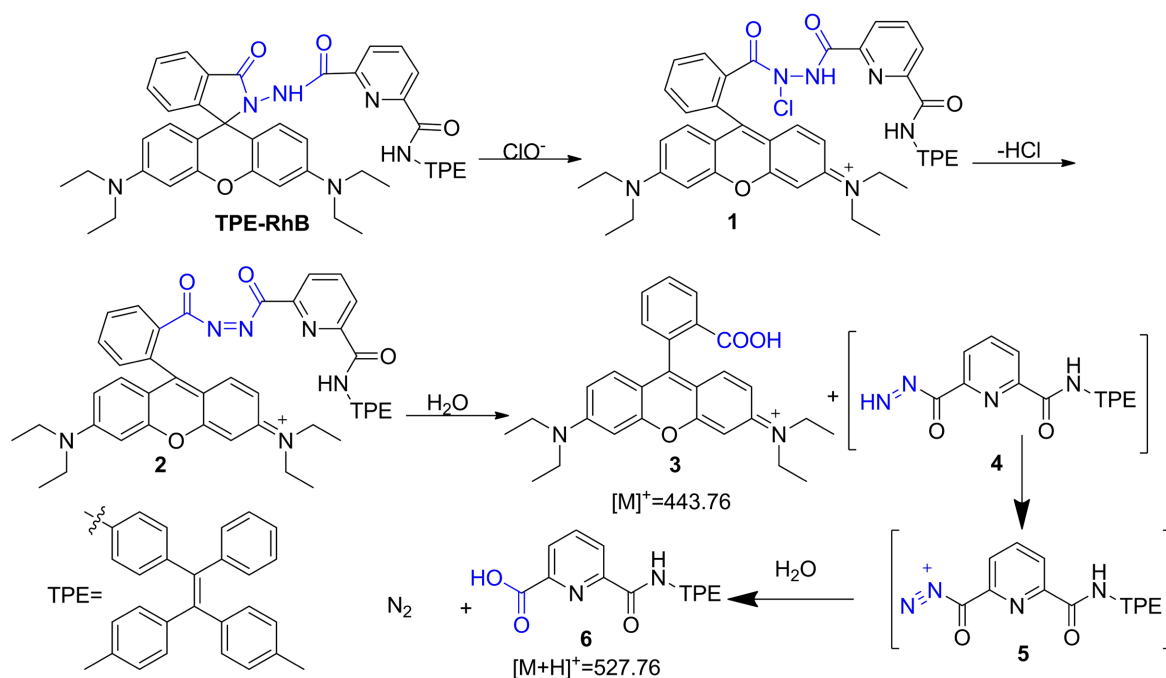


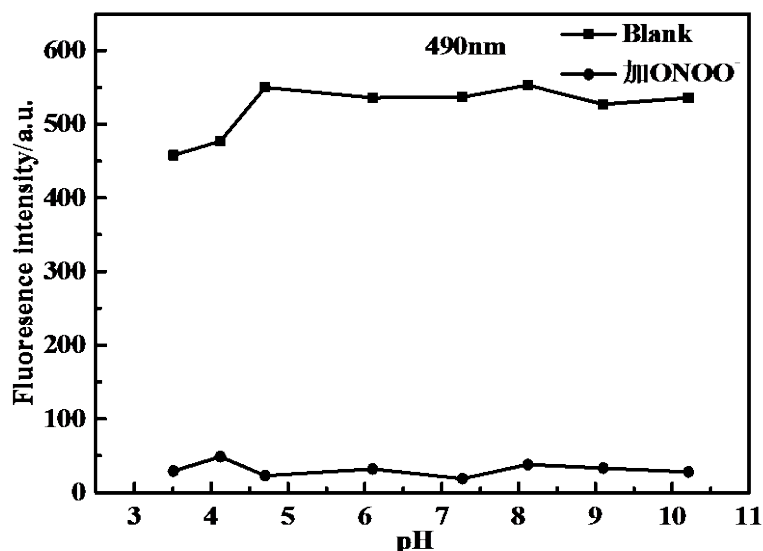
Figure 7. The possible mechanism of probe TPE-RhB identifies  $\text{ClO}^-$

图 7. 探针 TPE-RhB 识别  $\text{ClO}^-$  的可能机理

### 3.4. 探针 TPE-RhB 识别 $\text{ONOO}^-$ 的光谱性质研究

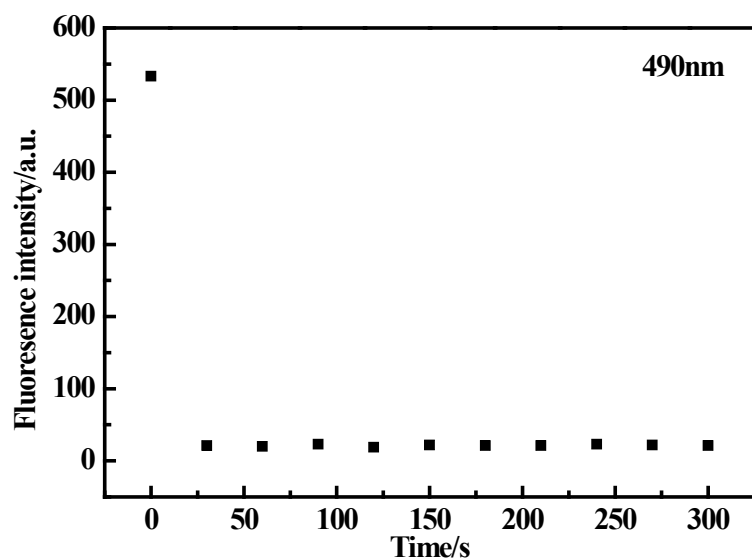
#### 3.4.1. 探针 TPE-RhB 识别 $\text{ONOO}^-$ 前后在不同 pH 条件下荧光性质研究

研究了不同 pH 值条件下该探针对  $\text{ONOO}^-$  的荧光响应, 结果如图 8 所示。显然, 在无  $\text{ONOO}^-$  存在下, 探针溶液在 pH 3.5~10.2 范围内荧光强度较为稳定; 在  $\text{ONOO}^-$  存在下, pH 3.5~10.2 范围内的, 490 nm 荧光强度表现出猝灭, 探针溶液由无色聚集状态变为无色透明状态。由于生命体系大部分为中性, 在后续光谱性质测试中以 PBS 溶液为缓冲溶液, pH 值选为 7.4。



**Figure 8.** The pH value influence on the fluorescence intensity of probe TPE-RhB in the absence and presence of  $\text{ONOO}^-$  ( $\lambda_{Em} = 586 \text{ nm}$ )

**图 8.** 在不同 pH 值条件下, 探针 TPE-RhB 与  $\text{ONOO}^-$  作用前后的荧光强度变化图( $\lambda_{Em} = 586 \text{ nm}$ )



**Figure 9.** Time-dependent fluorescence changes of probe TPE-RhB in the absence and presence of  $\text{ONOO}^-$  ( $\lambda_{Em} = 490 \text{ nm}$ )

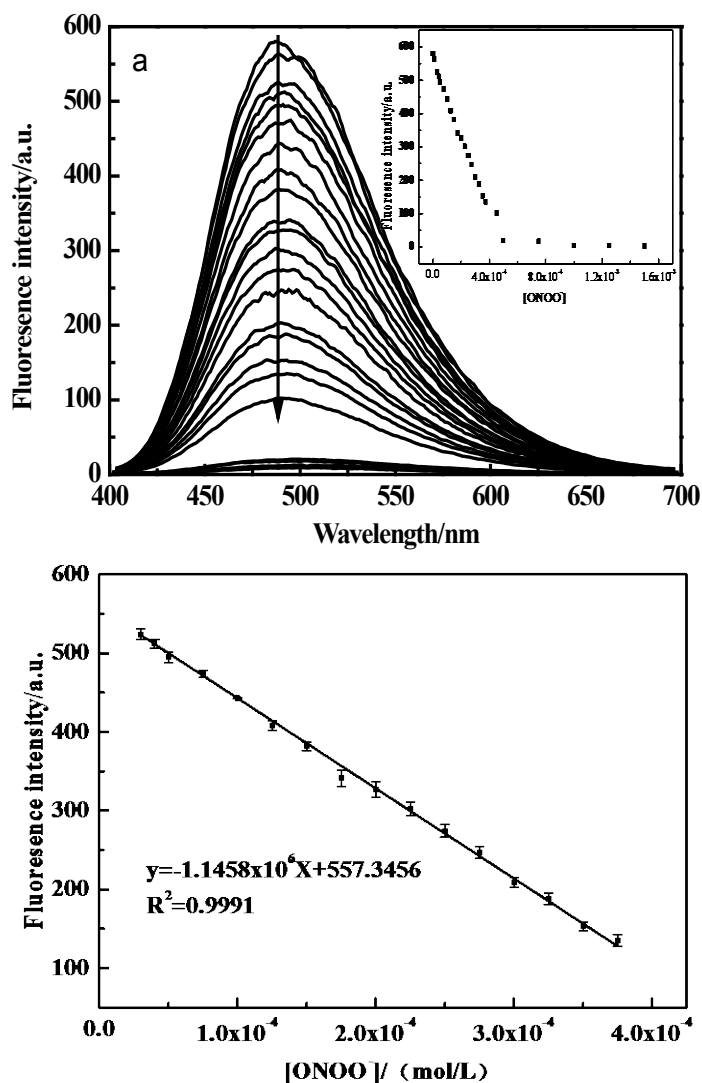
**图 9.** 在不同反应时间条件下, 探针 TPE-RhB 与  $\text{ONOO}^-$  作用前后的荧光强度变化图( $\lambda_{Em} = 490 \text{ nm}$ )

### 3.4.2. 探针 TPE-RhB 与 ONOO<sup>-</sup> 反应动力学测试

为了获得最佳的灵敏度,对响应时间也进行了优化,在加入 ONOO<sup>-</sup>后,结果如图 9 表明,在 30 秒内观察到荧光强度急剧下降,这表明探针与 ONOO<sup>-</sup>反应非常迅速。这种快速反应的探针分子可作为实时检测 ONOO<sup>-</sup>的有效探针,并优于许多其他探针。

### 3.4.3. 探针 TPE-RhB 在不同浓度 ONOO<sup>-</sup> 存在下的荧光滴定实验

在不用浓度 ONOO<sup>-</sup>存在下,探针 TPE-RhB 溶液仅在 490 nm 处荧光强度逐渐减弱,结果如图 10 所示。



**Figure 10.** Fluorescence emission spectra (a) and linear relationship (b:  $\lambda_{Em} = 490$  nm) of probe TPE-RhB in the presence of different ONOO<sup>-</sup> concentrations

**图 10.** 探针 TPE-RhB 的乙醇/水溶液中逐渐加入不同浓度的 ONOO<sup>-</sup> 后的荧光光谱图(a)及线性关系曲线(b:  $\lambda_{Em} = 490$  nm)

从上图可知,荧光强度与 ONOO<sup>-</sup>浓度在 30~375  $\mu$ M 范围内符合线性方程  $y = -1.15 \times 10^6 x + 557.35$ , 线性系数为 0.9991,并通过公式  $D = 3S_d/\rho$  得出检出限为  $1.43 \times 10^{-5}$  M,说明该探针可应用于 ONOO<sup>-</sup>的

定量检测。

### 3.4.4. 探针 TPE-RhB 与 $\text{ONOO}^-$ 反应识别机理初探

为了解 TPE-RhB 与  $\text{ONOO}^-$  之间的作用机制，对 TPE-RhB- $\text{ONOO}^-$  混合物进行了 ESI-MS 分析，结果如图 11 所示，初步将  $m/z = 363.9$  和  $m/z = 302.1$  处的峰归因于探针水解产物  $\text{CH}_3\text{-TPE-NH}_2$  脱甲基和脱 4-甲基苯基后产生的碎片离子峰。因此提出了图 12 中描述的信号机制，即在  $\text{ONOO}^-$  作用下，增强水分子的亲核性，引起 TPE-RhB 结构中四苯基乙烯侧的酰胺键优先水解，获得水解产物 TPE- $\text{NH}_2$ ，诱导荧光猝灭，但罗丹明荧光母体在此过程中未产生诱导开环，因此探针溶液颜色和 586 nm 处荧光强度均未发生变化。

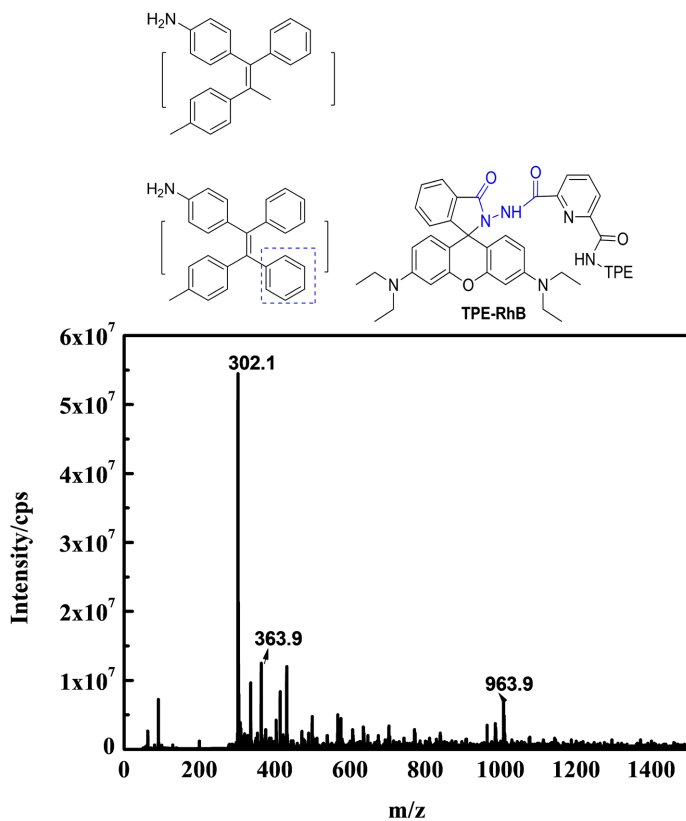


Figure 11. ESI-MS diagram of TPE-RhB- $\text{ONOO}^-$  mixture

图 11. TPE-RhB- $\text{ONOO}^-$  混合物的 ESI-MS 图

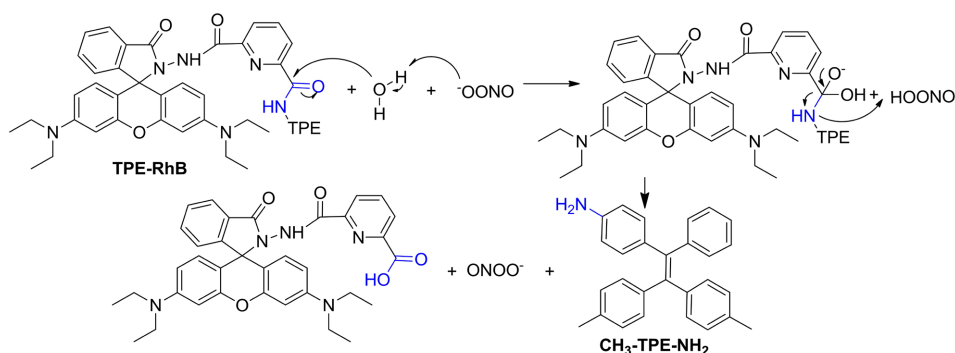


Figure 12. The possible mechanism of probe TPE-RhB identifies  $\text{ONOO}^-$

图 12. 探针 TPE-RhB 识别  $\text{ONOO}^-$  的可能机理

## 4. 结论

本文利用 2,6-吡啶二甲酰氯合成得到基于四苯乙烯-罗丹明的双酰胺化合物 **TPE-RhB**, 通过光谱性能研究表明, 探针 **TPE-RhB** 在 5 秒内实现可视化比率荧光识别  $\text{ClO}^-$ , 探针溶液由无色变为粉色, 490 nm 处荧光产生 98.6% 的猝灭, 在 582 nm 处实现了荧光增强。而在  $\text{ONOO}^-$  存在时, 30 秒内仅观察到 490 nm 处荧光强度下降, 猝灭比为 97.5%, 对其它活性氧/氮及金属离子则无明显变化。通过 **TPE-RhB-ClO<sup>-</sup>** 和 **TPE-RhB-ONOO<sup>-</sup>** 混合物的 ESI-MS 分析, 初步证明在  $\text{ClO}^-$  作用下, **TPE-RhB** 结构中罗丹明侧的酰胺键优先氧化水解, 引起探针溶液荧光和颜色多重信号变化, 但  $\text{ONOO}^-$  存在时, 则优先引起四苯乙烯侧的酰胺键水解, 仅实现 490 nm 处的荧光变化。

## 基金项目

新疆维吾尔自治区高校科研计划自然科学基金项目(XJEDU2019Y028)和新疆师范大学优秀青年教师科研启动基金项目(XJNU202013)资助。

## 参考文献

- [1] Ma, H., Song, B., Wang, Y., *et al.* (2017) Dual-Emissive Nanoarchitecture of Lanthanide-Complex-Modified Silica Particles for *in Vivo* Ratiometric Time-Gated Luminescence Imaging of Hypochlorous Acid. *Chemical Science*, **8**, 150-159. <https://doi.org/10.1039/C6SC02243J>
- [2] Liu, X., Tang, Z., Song, B., *et al.* (2017) A Mitochondria-Targeting Time-Gated Luminescence Probe for Hypochlorous Acid Based on a Europium Complex. *Journal Materials Chemical B*, **5**, 2849-2855. <https://doi.org/10.1039/C6TB02991D>
- [3] Xu, K., Wang, L., Qiang, M., *et al.* (2011) A Selective Near-Infrared Fluorescent Probe for Singlet Oxygen in Living Cells. *Chemical Communications*, **47**, 7386-7388. <https://doi.org/10.1039/c1cc12473k>
- [4] Chen, L.D., Ding, H.L., Wang, N., *et al.* (2019) Two Highly Selective and Sensitive Fluorescent Probes Design and Apply to Specific Detection of Hypochlorite. *Dyes and Pigments*, **161**, 510-518. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2018.09.071>
- [5] 赵云, 李艳芳, 李蓉晓, 等. 基于亲电氯代反应的次氯酸荧光探针构建及细胞成像研究[J]. 有机化学, 2021, 41(5): 1974-1981.
- [6] Xiong, H., He, L., Zhang, Y., *et al.* (2019) A Ratiometric Fluorescent Probe for the Detection of Hypochlorous Acid in Living Cells and Zebra Fish with a Long Wavelength Emission. *Chinese Chemical Letters*, **30**, 1075-1077. <https://doi.org/10.1016/j.ccl.2019.02.008>
- [7] Chen, X., Tian, X., Shin, I., *et al.* (2011) Fluorescent and Luminescent Probes for Detection of Reactive Oxygen and Nitrogen Species. *Chemical Society Reviews*, **40**, 4783-4804. <https://doi.org/10.1039/c1cs15037e>
- [8] Chen, X., Wang, F., Hyun, J.Y., *et al.* (2016) Recent Progress in the Development of Fluorescent, Luminescent and Colorimetric Probes for Detection of Reactive Oxygen and Nitrogen Species. *Chemical Society Reviews*, **45**, 2976-3016. <https://doi.org/10.1039/C6CS00192K>
- [9] Jiao, X., Li, Y., Niu, J., *et al.* (2018) Small-Molecule Fluorescent Probes for Imaging and Detection of Reactive Oxygen, Nitrogen, and Sulfur Species in Biological Systems. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **90**, 533-555. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b04234>
- [10] Ou, Z., Shi, L., Huang, W., *et al.* (2017) A Ratiometric Fluorescent Probe for Selective Detection of Hypochlorite Anion. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, **38**, 1443-1446. <https://doi.org/10.1002/bkcs.11321>
- [11] Wang, W., Jin, L., Shen, Z., *et al.* (2019) A Fluorescent Probe with a Significant Selective Turn-On Response for  $\text{HClO}$  Detection and Bioimaging in Living Cells. *ChemistrySelect*, **4**, 7425-7430. <https://doi.org/10.1002/slct.201901587>
- [12] Liu, R., Zhao, Y., Cui, X., *et al.* (2020) A Turn-On Fluorescent Probe Based on Quinoline and Coumarin for Rapid, Selective and Sensitive Detection of Hypochlorite in Water Samples. *Luminescence*, **35**, 1231-1237. <https://doi.org/10.1002/bio.3882>
- [13] Wang, C., Wang, Y., Wang, G., *et al.* (2020) A New Mitochondria-Targeting Fluorescent Probe for Ratiometric Detection of  $\text{H}_2\text{O}_2$  in Live Cells. *Analytica Chimica Acta*, **1097**, 230-237. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.11.024>
- [14] Wang, H., He, Y., Li, Y., *et al.* (2019) Selective Ratiometric Fluorescence Detection of Hypochlorite by Using Aggre-

- gation-Induced Emission Dots. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **411**, 1979-1988. <https://doi.org/10.1007/s00216-019-01653-0>
- [15] Duan, Q., Zheng, G., Li, Z., *et al.* (2019) An Ultra-Sensitive Ratiometric Fluorescent Probe for Hypochlorous Acid Detection by the Synergistic Effect of AIE and TBET and Its Application of Detecting Exogenous/Endogenous HOCl in Living Cells. *Journal Materials Chemical B*, **7**, 5125-5131. <https://doi.org/10.1039/C9TB01279F>
- [16] Zhang, W., Wang, H., Li, F., *et al.* (2020) A Ratiometric Fluorescent Probe Based on AIEgen for Detecting HClO in Living Cells. *Chemical Communications*, **56**, 14613-14616. <https://doi.org/10.1039/D0CC06582J>
- [17] Han, X., Ma, Y., Chen, Y., *et al.* (2020) Enhancement of the Aggregation-Induced Emission by Hydrogen Bond for Visualizing Hypochlorous Acid in an Inflammation Model and a Hepatocellular Carcinoma Model. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **92**, 2830-2838. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b05347>
- [18] Huang, Y., Zhang, P., Gao, M., *et al.* (2016) Ratiometric Detection and Imaging of Endogenous Hypochlorite in Live Cells and *in Vivo* Achieved by Using an Aggregation Induced Emission (AIE)-Based Nanoprobe. *Chemical Communications*, **52**, 7288-7291. <https://doi.org/10.1039/C6CC03415B>
- [19] Shi, R., Chen, H., Qi, Y., *et al.* (2019) From Aggregation-Induced to Solution Emission: A New Strategy for Designing Ratiometric Fluorescent Probes and Its Application for *in Vivo* HClO Detection. *Analyst*, **144**, 1696-1703. <https://doi.org/10.1039/C8AN01950A>
- [20] Wang, L., Hu, Y., Qu, Y., *et al.* (2016) Aggregated-Induced Emission Phenothiazine Probe for Selective Ratiometric Response of Hypochlorite over Other Reactive Oxygen Species. *Dyes and Pigments*, **128**, 54-59. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2016.01.010>
- [21] Mulay, S.V., Kim, Y., Lee, K.J., *et al.* (2017) A Fluorogenic and Red-Shifted Diphenyl Phosphinate-Based Probe for Selective Peroxynitrite Detection as Demonstrated in Fixed Cells. *New Journal of Chemistry*, **41**, 11934-11940. <https://doi.org/10.1039/C7NJ02530K>
- [22] Sk, M., Nandi, S., Singh, R.K., *et al.* (2018) Selective Sensing of Peroxynitrite by Hf-Based UiO-66-B (OH) 2 Metal-Organic Framework: Applicability to Cell Imaging. *Advances in Inorganic Chemistry*, **57**, 10128-10136. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.8b01310>
- [23] Dong, L., Fu, M., Liu, L., *et al.* (2020) Supramolecular Assembly of TPE-Based Glycoclusters with Dicyanomethylene-4 H-pyran (DM) Fluorescent Probes Improve Their Properties for Peroxynitrite Sensing and Cell Imaging. *Chemical European Journal*, **26**, 14445-14452. <https://doi.org/10.1002/chem.202002772>
- [24] Yang, D., Wang, H.L., Sun, Z.N., *et al.* (2006) A Highly Selective Fluorescent Probe for the Detection and Imaging of Peroxynitrite in Living Cells. *Journal of the American Chemical Society*, **128**, 6004-6005. <https://doi.org/10.1021/ja0603756>
- [25] Cheng, P., Zhang, J., Huang, J., *et al.* (2018) Near-Infrared Fluorescence Probes to Detect Reactive Oxygen Species for Keloid Diagnosis. *Chemical Science*, **9**, 6340-6347. <https://doi.org/10.1039/C8SC01865K>
- [26] Xu, K., Chen, H., Tian, J., *et al.* (2011) A Near-Infrared Reversible Fluorescent Probe for Peroxynitrite and Imaging of Redox Cycles in Living Cells. *Chemical Communications*, **47**, 9468-9470. <https://doi.org/10.1039/c1cc12994e>
- [27] Tian, J., Chen, H., Zhuo, L., *et al.* (2011) A Highly Selective, Cell-Permeable Fluorescent Nanoprobe for Ratiometric Detection and Imaging of Peroxynitrite in Living Cells. *Chemical European Journal*, **17**, 6626-6634. <https://doi.org/10.1002/chem.201100148>
- [28] Yu, F., Peng, L., Li, G., *et al.* (2011) A Near-IR Reversible Fluorescent Probe Modulated by Selenium for Monitoring Peroxynitrite and Imaging in Living Cells. *Journal of the American Chemical Society*, **133**, 11030-11033. <https://doi.org/10.1021/ja202582x>
- [29] Miao, J., Huo, Y., Qian, L., *et al.* (2016) A New Class of Fast-Response and Highly Selective Fluorescent Probes for Visualizing Peroxynitrite in Live Cells, Subcellular Organelles, and Kidney Tissue of Diabetic Rats. *Biomaterials*, **107**, 33-43. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.08.032>
- [30] Zhang, Q., Zhu, Z., Zheng, Y., *et al.* (2012) A Three-Channel Fluorescent Probe That Distinguishes Peroxynitrite from Hypochlorite. *Journal of the American Chemical Society*, **134**, 18479-18482. <https://doi.org/10.1021/ja305046u>
- [31] Lin, K.K., Wu, S.C., Hsu, K.M., *et al.* (2013) A N-(2-Aminophenyl)-5-(Dimethylamino)-1-Naphthalenesulfonic Amide (Ds-DAB) Based Fluorescent Chemosensor for Peroxynitrite. *Organic Letters*, **15**, 4242-4245. <https://doi.org/10.1021/ol401932p>
- [32] Yu, F., Song, P., Li, P., Wang, B., *et al.* (2012) A Fluorescent Probe Directly Detect Peroxynitrite Based on Boronate Oxidation and Its Applications for Fluorescence Imaging in Living Cells. *Analyst*, **137**, 3740-3749. <https://doi.org/10.1039/c2an35246j>
- [33] Uppu, R.M. (2006) Synthesis of Peroxynitrite Using Isoamyl Nitrite and Hydrogen Peroxide in a Homogeneous Solvent System. *Analytical Biochemistry*, **354**, 165-168. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2005.11.003>

## 附件支持信息



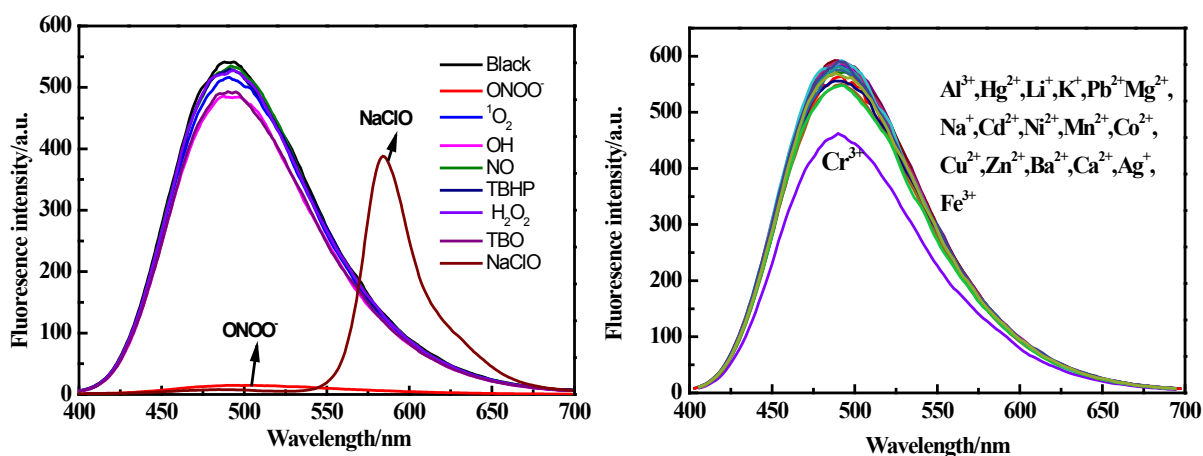
**Figure S1.** Photos of the probe **TPE-RhB** in ethanol/water (50  $\mu\text{mol/L}$ , v/v, 1/1, PBS, pH 7.4) after adding different ROS/RON and metal ions (8 equiv.) under natural light

**图 S1.** 探针 **TPE-RhB** 的乙醇/水(50  $\mu\text{mol/L}$ , v/v, 1/1, PBS, pH 7.4)中加入不同 ROS/RON 及金属离子(8 equiv.)后的在日光灯下照片



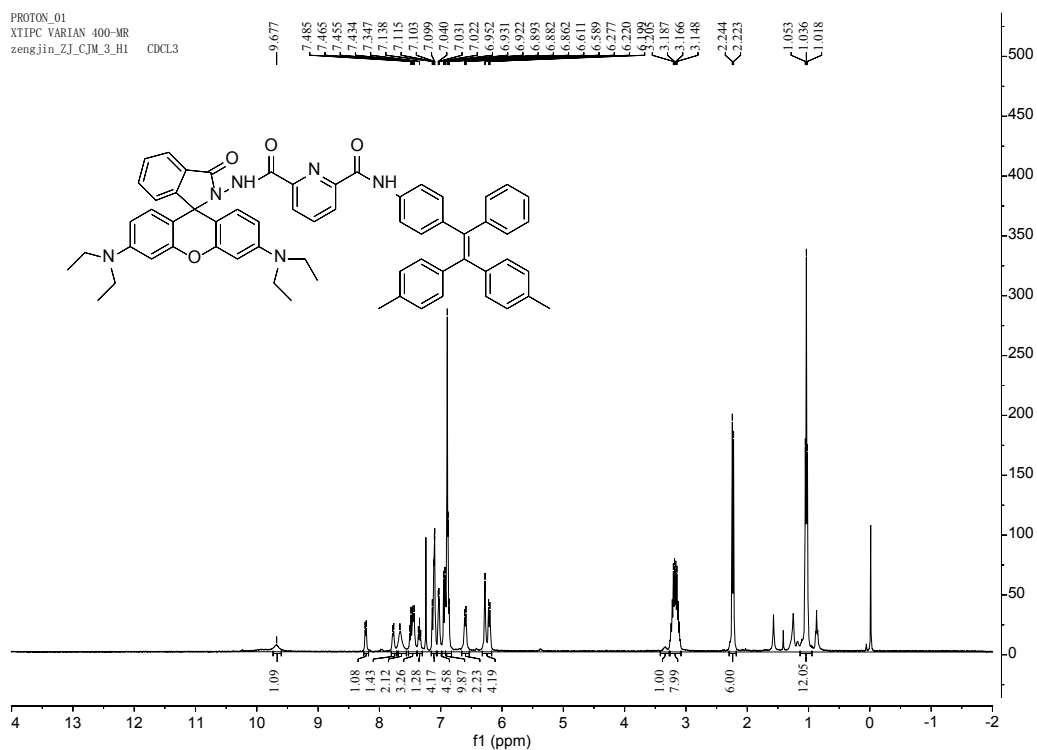
**Figure S2.** Photos of probe **TPE-RhB** under 365 nm UV lamp after adding ROS/RON and metal ions (8 equiv.) to ethanol/water (50  $\mu\text{mol/L}$ , v/v, 1/1, PBS, pH 7.4)

**图 S2.** 探针 **TPE-RhB** 的乙醇/水(50  $\mu\text{mol/L}$ , v/v, 1/1, PBS, pH 7.4)中加入不同 ROS/RON 及金属离子(8 equiv.)后的在365 nm 紫外灯下照片

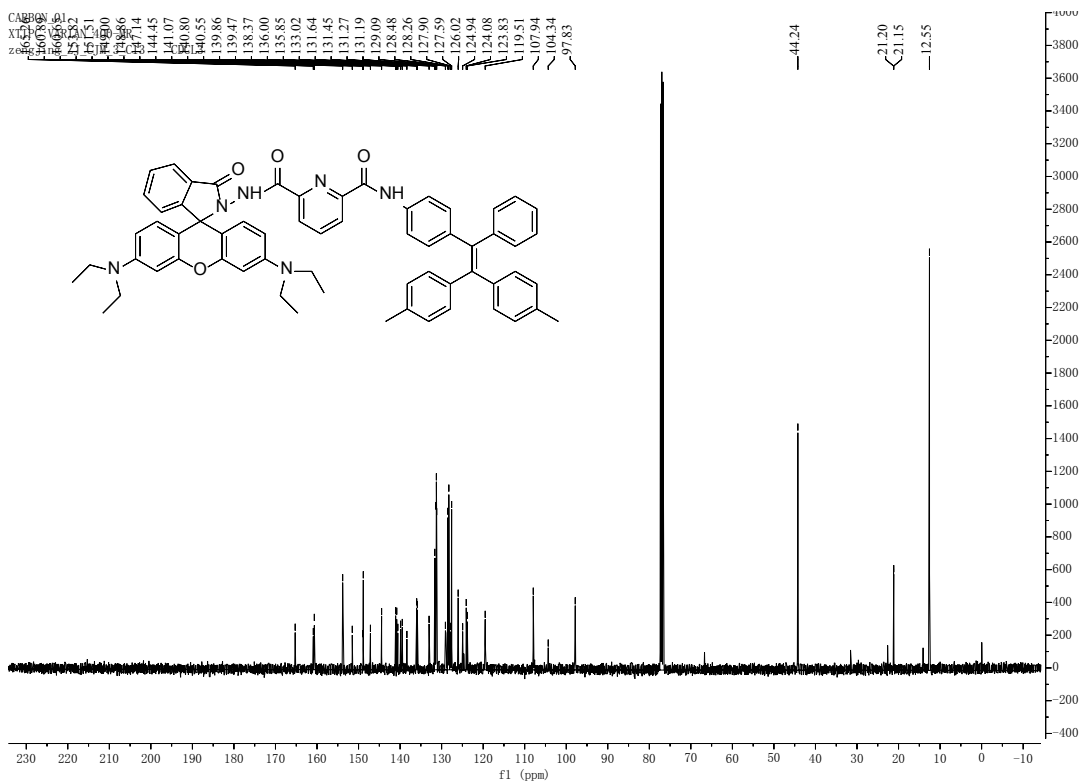


**Figure S3.** Fluorescence spectra ( $E_x = 364 \text{ nm}$ ) of probe **TPE-RhB** after adding different ROS/RON and metal ions (8 equiv.) to ethanol/water (50  $\mu\text{mol/L}$ , v/v, 1/1, PBS, pH 7.4)

**图 S3.** 探针 **TPE-RhB** 的乙醇/水(50  $\mu\text{mol/L}$ , v/v, 1/1, PBS, pH 7.4)中加入不同 ROS/RON 及金属离子(8 equiv.)后的荧光光谱图( $E_x = 364 \text{ nm}$ )

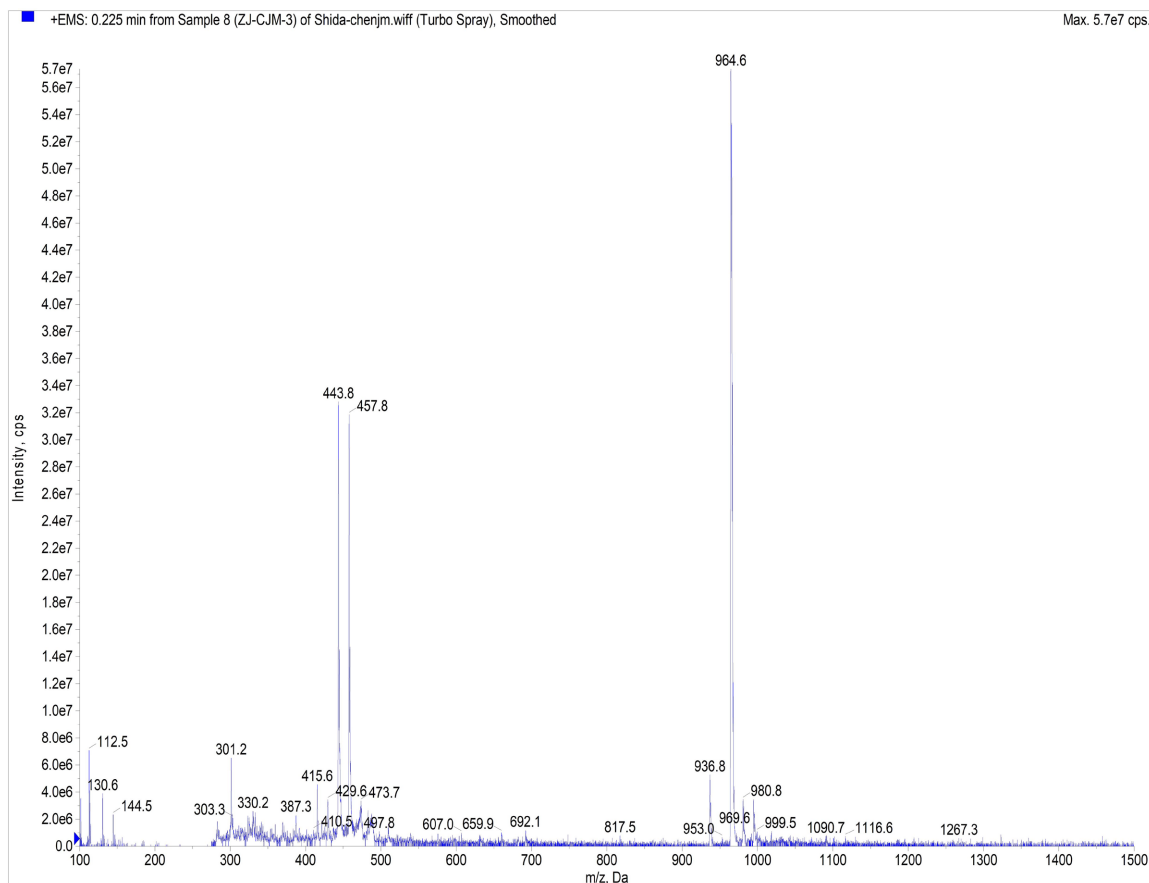


**Figure S4.**  $^1\text{H}$ NMR diagram of compound TPE-RhB  
**图 S4.** 化合物 TPE-RhB 的  $^1\text{H}$ NMR 图



**Figure S5.**  $^{13}\text{C}$ NMR diagram of compound TPE-RhB  
**图 S5.** 化合物 TPE-RhB 的  $^{13}\text{C}$ NMR 图





**Figure S6.** ESI-MS diagram of compound **TPE-RhB**

**图 S6.** 化合物 **TPE-RhB** 的 ESI-MS 图

**Table S1.** Recovery of  $\text{ClO}^-$  in water samples measured by probe at 490 nm

**表 S1.** 490 nm 处探针测定水样中  $\text{ClO}^-$  的回收率研究

Entry	Spiked amount/ $\mu\text{M}$	Recovered amount/ $\mu\text{M}$	%Recovery $\pm$ SD (n = 3)
1	0	0	—
2	50	48.63	97.28% $\pm$ 2.34%
3	100	102.00	102.04% $\pm$ 2.19%
4	150	152.00	101.42% $\pm$ 3.26%
5	200	203.00	101.37% $\pm$ 3.54%

**Table S2.** Recovery of  $\text{ClO}^-$  in water samples measured by probe at 586 nm

**表 S2.** 586 nm 处探针测定水样中  $\text{ClO}^-$  的回收率研究

Entry	Spiked amount/ $\mu\text{M}$	Recovered amount/ $\mu\text{M}$	%Recovery $\pm$ SD (n = 3)
1	0	0	—
2	350	349.43	99.84% $\pm$ 4.19%
3	400	393.65	98.41% $\pm$ 2.72%
4	450	443.65	98.59% $\pm$ 1.73%
5	500	502.32	100.46% $\pm$ 2.38%