

文章编号: 1000-7032(2026)06-1100-09

# 三苯胺基近红外生物硫醇荧光探针合成及活体成像研究

张 蕾, 代永莲, 伍玉林, 贾宏敏\*, 尚主业\*, 孟庆涛\*

(辽宁科技大学 化学工程学院, 辽宁 鞍山 114051)

**摘要:** 生物硫醇(Cys、GSH 和 Hcy)是生物体内含量较高的巯基小分子,其稳态失衡与多种疾病密切相关。因此,开发高灵敏度、高选择性、快速响应生物硫醇的检测方法对于疾病监测尤为重要。本文以三苯胺作为电子供体基团,1,3-茚满二酮为电子受体单元,通过缺电子 C=C 双键作为识别位点,构建了一种三苯胺基近红外生物硫醇荧光探针 **P11**。生物硫醇的巯基与缺电子 C=C 双键发生的 Michael 加成反应会导致其荧光发生猝灭。探针 **P11** 展现出多种优势,如近红外发射(690 nm)、快速响应(60 s)以及大 Stokes 位移(215 nm)等,对 Cys、GSH 和 Hcy 的检测限(LODs)分别低至 33.9  $\mu\text{mol/L}$ 、29.0  $\mu\text{mol/L}$  和 34.3  $\mu\text{mol/L}$ 。探针 **P11** 成功实现了小鼠体内外源性 & 内源性生物硫醇的荧光成像,为生物硫醇相关疾病的诊断与活体成像研究提供了有效工具。

**关键词:** 荧光探针; 生物硫醇; 近红外; 三苯胺; 生物成像

中图分类号: O482.31

文献标识码: A

DOI: 10.37188/CJL.20260026

CSTR: 32170.14.CJL.20260026

## Synthesis and *in vivo* Imaging of Triphenylamine-based Near-infrared Biothiol Fluorescent Probe

ZHANG Lei, DAI Yonglian, WU Yulin, JIA Hongmin\*, SHANG Zhuye\*, MENG Qingtao\*

(School of Chemical Engineering, University of Science and Technology Liaoning, Anshan 114051, China)

\* Corresponding Authors, E-mail: jhongmin66@163.com; shangzhuye@ustl.edu.cn; qtmeng@ustl.edu.cn

**Abstract:** Biothiols (Cys, GSH, and Hcy) are thiol-containing small molecules with relatively high abundance in organisms, and the imbalance of their homeostasis is closely associated with various diseases. Therefore, developing a detection method for biothiols with high sensitivity, high selectivity, and rapid response is particularly crucial for disease monitoring. In this study, a triphenylamine-based near-infrared fluorescent probe **P11** for biothiols was constructed using triphenylamine as the electron donor group, 1,3-indanedione as the electron acceptor unit, and electron-deficient C=C double bonds as the recognition sites. The Michael addition reaction between the thiol group of biothiols and the electron-deficient C=C double bonds results in the fluorescence quenching of the probe. Probe **P11** exhibits multiple advantages, such as near-infrared emission (690 nm), rapid response (60 s), and a large Stokes shift (215 nm). The detection limits (LODs) for Cys, GSH, and Hcy are as low as 33.9  $\mu\text{mol/L}$ , 29.0  $\mu\text{mol/L}$ , and 34.3  $\mu\text{mol/L}$ , respectively. Probe **P11** has successfully achieved fluorescent imaging of exogenous and endogenous biothiols in mice, providing an effective tool for the diagnosis of biothiol-related diseases and *in vivo* imaging research.

**Keywords:** fluorescent probe; biothiols; near infrared; triphenylamine; bioimaging

## 1 引 言

生物硫醇包括半胱氨酸(Cys)、谷胱甘肽

(GSH)和同型半胱氨酸(Hcy),是一类含有巯基(—SH)活性官能团的重要内源性含硫小分子化合物<sup>[1-2]</sup>。生物硫醇在细胞内广泛参与氧化还原、稳态

收稿日期: 2026-01-25; 修订日期: 2026-02-08

基金项目: 辽宁省自然科学基金(2025-BSLH-193)

Supported by Natural Science Foundation of Liaoning Province (2025-BSLH-193)

维持、活性氧清除以及多种信号调控过程,在生命活动中发挥着重要作用。体内生物硫醇水平异常,往往与多种疾病的发生密切相关<sup>[3-5]</sup>。已有研究表明,Cys水平异常可能影响机体正常生长发育<sup>[6]</sup>,GSH含量失衡与癌症、艾滋病及部分神经系统疾病发生密切相关<sup>[7]</sup>,Hcy指标异常与骨质疏松及骨折风险等疾病显著相关<sup>[8]</sup>。因此,在生物体系中实现对生物硫醇的灵敏检测与可视化成像,对于深入理解相关生理病理机制具有重要的现实意义。

目前,已有多种检测生物硫醇的技术被开发,包括化学分析法、高效液相色谱法、电位分析法、分光光度法等<sup>[9-10]</sup>。尽管这些方法具有高准确性和灵敏度,但其复杂的操作流程、昂贵的仪器设备以及对专业人员的需求,限制了它们在生物体内检测生物硫醇的应用<sup>[3-5]</sup>。因此,开发高效、灵敏、低成本且易于操作的生物硫醇检测方法具有重要意义。荧光探针技术因其高灵敏度、快速响应、低成本及活体成像等优势,逐渐成为生物硫醇检测的研究热点<sup>[11-16]</sup>。现有的荧光探针技术仍面临发射波长较短、抗干扰能力不足、组织穿透能力弱等问题,制约其在复杂生物体系中的特异性识别及体内成像的应用<sup>[17-19]</sup>。近红外发射有助于降低组织自发荧光并提高穿透深度<sup>[20-24]</sup>;较大的Stokes位移可减少散射与自吸收带来的背景干扰,从而提升成像信噪比与定量可靠性<sup>[25-28]</sup>。

本文以三苯胺为供电子基团、1,3-茛满二酮为吸电子基团,合成了一种三苯胺基近红外生物硫醇荧光探针P11。生物硫醇的巯基能够与 $\alpha,\beta$ -

不饱和C=C双键发生Michael加成反应,导致探针的近红外荧光发生猝灭。探针P11具有近红外发射(690 nm)、较大的Stokes位移(215 nm)、快速的响应速度(60 s)和优异的选择性等优点,对Cys、GSH与Hcy的检出限分别低至33.9  $\mu\text{mol/L}$ 、29.0  $\mu\text{mol/L}$ 和34.3  $\mu\text{mol/L}$ (补充文件表S1)。探针P11已成功用于裸鼠体内外源性和内源性生物硫醇的荧光成像,为探究生物硫醇的生理效应提供了一种有力工具。

## 2 实 验

### 2.1 试剂与仪器

主要试剂:对溴苯甲醛、4-硼酸三苯胺、1,3-茛满二酮购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;实验中所用的氨基酸及其他化学试剂均为分析纯,购自国药集团化学试剂有限公司。除非另有说明,试剂使用前未进行进一步纯化。

主要仪器:紫外/可见分光光度计(Lambda-900);荧光分光光度仪(LS55);高分辨率质谱系统(6530 Q-TOF LC/MS,HR-MS);核磁共振波谱仪(AVANCE 400 MHz);小动物活体成像系统(SPECTRAL Ami)。

### 2.2 探针P11合成

根据文献报道<sup>[29]</sup>合成化合物1。将0.174 g (0.5 mmol)化合物1和0.073 g (0.5 mmol)1,3-茛满二酮用10 mL无水乙醇溶解,加入0.2 mL吡啶,于80 °C加热回流,反应结束后有大量固体析出,抽滤得到亮橙色粉末状固体产物P11(0.163 g, 68%)(图1)。HR-MS:  $m/z$ , [P11+H]<sup>+</sup>=478.1813,

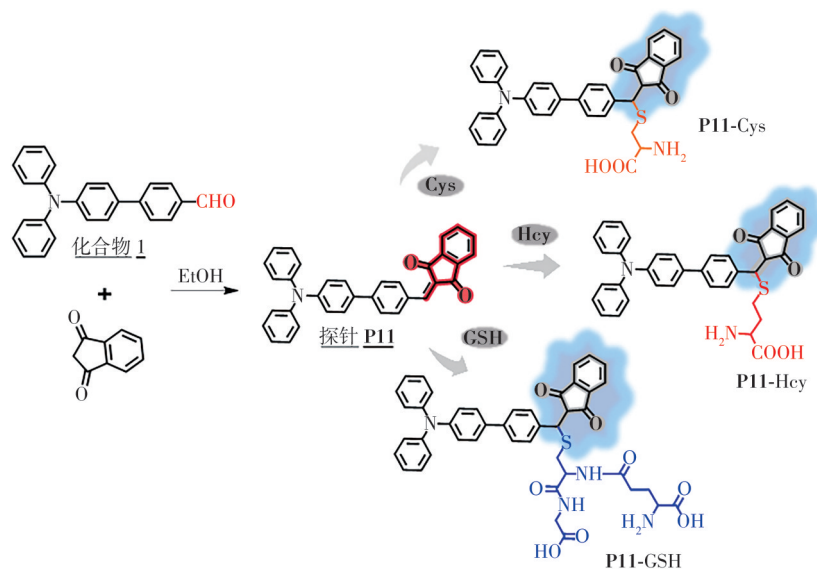


图1 P11的合成路线及其对Cys、Hcy和GSH的识别机制

Fig.1 Synthetic route of probe P11 and its recognition mechanism toward Cys, Hcy, and GSH

(计算值:  $m/z=478.1802$ )。 $^1\text{H NMR}$  (400 MHz, Chloroform- $d$ )  $\delta$ : 8.54 (d,  $J=8.2$  Hz, 2 H), 8.01 (m,  $J=7.0, 4.7, 3.0$  Hz, 2 H), 7.91 (s, 1 H), 7.85~7.75 (m, 2 H), 7.72 (d,  $J=8.1$  Hz, 2 H), 7.60~7.52 (m, 2 H), 7.29 (d,  $J=15.6$  Hz, 4 H), 7.15 (dd,  $J=8.1, 5.6$  Hz, 6 H), 7.07 (t,  $J=7.4$  Hz, 2 H)。  $^{13}\text{C NMR}$  (101 MHz, Chloroform- $d$ )  $\delta$ : 190.5, 189.252, 148.445, 147.353, 146.6, 145.3, 142.6, 140.1, 135.3, 135.1, 135.1, 132.8, 131.6, 129.4, 128.5, 127.9, 126.6, 125.0, 123.5, 123.3, 123.2, 123.0 (具体信息见图 S1~S3)。

### 2.3 配制测试溶液及光谱测试

将 **P11** (23.88 mg) 用 10 mL  $N,N$ -二甲基甲酰胺 (DMF) 溶解, 配制浓度为  $5.0 \times 10^{-4}$  mol/L 的 **P11** 储备液,  $4^\circ\text{C}$  避光保存。测试时用 PBS 缓冲溶液 (25 mmol/L, pH=7.4) 稀释 **P11** 储备液, 配制浓度为 10  $\mu\text{mol/L}$  ( $V_{\text{DMF}}:V_{\text{PBS}}=3:7$ ) 的光谱测试溶液。激发和发射狭缝宽度分别为 5.0 nm 和 2.0 nm。生物硫醇及其他氨基酸等分析物溶液均用去离子水配制, 溶液浓度为 0.02 mol/L。

### 2.4 生物成像分析

采用异氟烷对裸鼠进行麻醉, **P11** 的浓度和注射体积分别为 10  $\mu\text{mol/L}$  和 50  $\mu\text{L}$ 。外源性生物成像: 小鼠左腿右腿分别注射等量  $N$ -乙基马来酰亚胺 (NEM), 孵育 30 min 后, 原位注射等量的 **P11**。左腿为对照组注入生物硫醇 (0.02 mol/L, 3.0  $\mu\text{L}$ ), 分别在 1 min、2 min、5 min、10 min 和 15 min 记录裸鼠荧光成像信号。内源性生物成像: 左腿注射 NEM, 右腿注射等量的 PBS, 孵育 30 min 后, 双腿原位注射 **P11**, 分别在 0 min、1 min、2 min、5 min 和 10 min 时记录裸鼠荧光成像信号。激发波长和发射波长分别为 465 nm 和 660 nm。

## 3 结果与讨论

### 3.1 **P11** 的紫外-可见光谱响应

探针 **P11** 对生物硫醇的紫外-可见吸收光谱响应如图 2(a)~(c) 所示。 **P11** (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 在 475 nm 处呈现显著的特征吸收峰, 随着生物硫醇逐渐加入, 其在 475 nm 处吸收峰强度逐渐下降, 当生物硫醇的浓度分别达到 0.40 mmol/L、0.40 mmol/L 和 0.45 mmol/L 时, 探针 **P11** 在 475 nm 处的吸光度趋

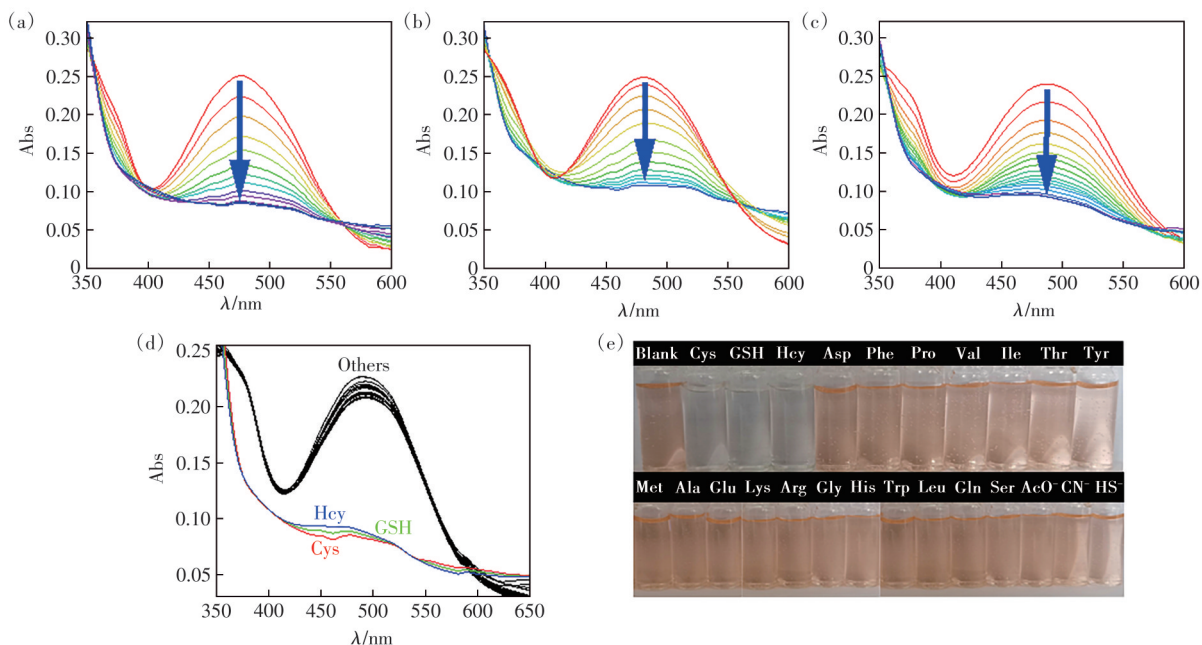


图 2 (a)~(c) **P11** (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 对生物硫醇 (Cys、GSH 和 Hcy) 的紫外-可见吸收光谱; (d)~(e) **P11** (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 对各种分析物 (0.40 mmol/L) 的紫外-可见吸收光谱和显色图, 具体包括: 1. 空白、2. Cys、3. GSH、4. Hcy、5. Asp、6. Phe、7. Pro、8. Val、9. Ile、10. Thr、11. Tyr、12. Met、13. Ala、14. Glu、15. Lys、16. Arg、17. Gly、18. His、19. Trp、20. Leu、21. Gln、22. Ser、23.  $\text{AcO}^-$ 、24.  $\text{CN}^-$ 、25.  $\text{HS}^-$

Fig. 2 (a)~(c) UV-Vis absorption spectra of **P11** (10  $\mu\text{mol/L}$ ) towards biothiols (Cys, GSH, and Hcy). (d)~(e) UV-Vis absorption spectra and colorimetric images of **P11** (10  $\mu\text{mol/L}$ ) in the presence of various analytes (0.40 mmol/L), including: 1. blank, 2. Cys, 3. GSH, 4. Hcy, 5. Asp, 6. Phe, 7. Pro, 8. Val, 9. Ile, 10. Thr, 11. Tyr, 12. Met, 13. Ala, 14. Glu, 15. Lys, 16. Arg, 17. Gly, 18. His, 19. Trp, 20. Leu, 21. Gln, 22. Ser, 23.  $\text{AcO}^-$ , 24.  $\text{CN}^-$ , 25.  $\text{HS}^-$

于稳定,说明体系达到滴定平衡(图S4)。

随后,评估了探针P11对其他分析物的紫外-可见光谱响应,包括天冬氨酸(Asp)、苯丙氨酸(Phe)、脯氨酸(Pro)、缬氨酸(Val)、异亮氨酸(Ile)、苏氨酸(Thr)、酪氨酸(Tyr)、蛋氨酸(Met)、丙氨酸(Ala)、谷氨酸(Glu)、赖氨酸(Lys)、精氨酸(Arg)、甘氨酸(Gly)、组氨酸(His)、色氨酸(Trp)、亮氨酸(Leu)、谷氨酰胺(Gln)、丝氨酸(Ser)、醋酸根(AcO<sup>-</sup>)、氰根(CN<sup>-</sup>)、硫氢根(HS<sup>-</sup>)。如图2(d)所示,仅在加入生物硫醇时,P11的吸收峰发生明显变化;其余分析物的加入对P11的吸收光谱干扰可忽略不计,说明P11对生物硫醇具有良好的选择性。小瓶裸眼显色实验进一步验证了P11对生物硫醇的选择性(图2(e)):只有向P11溶液中加入生物硫醇后,溶液颜色才会发生明显变化(溶液由浅橙红色转为无色)。以上结果表明,P11能

够专一性响应生物硫醇。

### 3.2 P11的荧光光谱响应

我们进一步通过荧光光谱法探究探针P11(10 μmol/L)对生物硫醇的荧光光谱响应。如图3(a)~(c)所示,475 nm激发下,P11在690 nm呈现较强的荧光发射信号。随着生物硫醇浓度的逐渐增加,P11在690 nm处的荧光强度逐渐减弱,当加入的生物硫醇达到一定值时(Cys:0.4 mmol/L,GSH:0.4 mmol/L,Hcy:0.45 mmol/L),探针P11的发射光谱不再发生变化,表明达到反应平衡(图S5)。此外,将探针P11与生物硫醇同时稀释5倍,取690 nm处的发射峰强度进行分析,发现P11与生物硫醇呈现良好的线性响应,如图3(e)~(f)所示。通过检测限公式 $LOD=3\sigma/k$ 计算<sup>[30]</sup>,P11对Cys、GSH和Hcy的检测限分别为33.9 μmol/L、29.0 μmol/L和34.3 μmol/L。

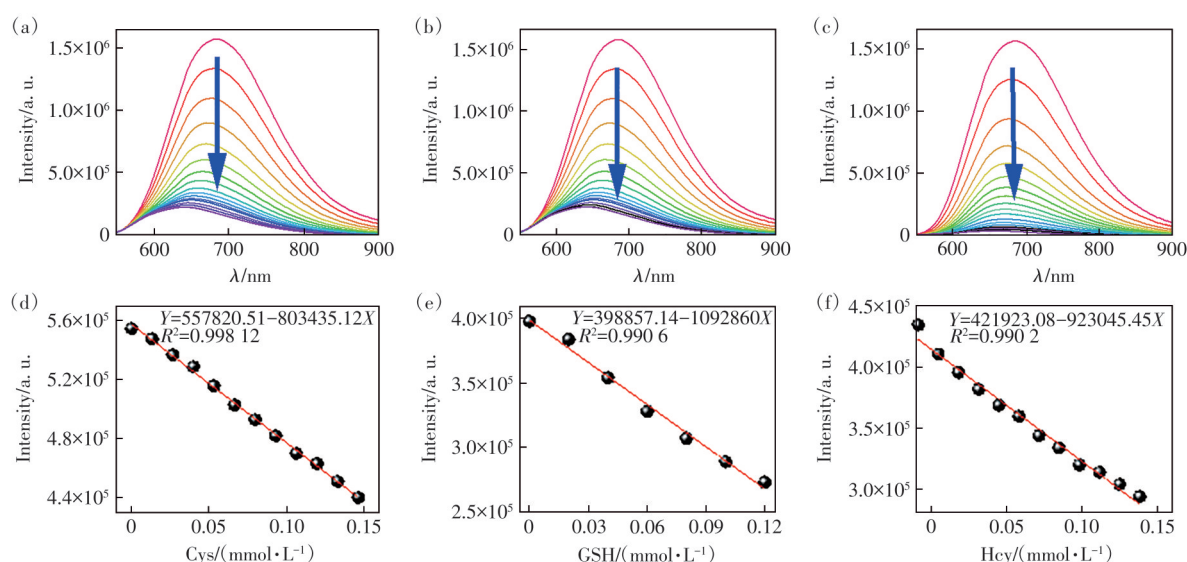


图3 (a)~(c)P11(10 μmol/L)对生物硫醇(Cys、GSH和Hcy)的荧光光谱响应;(d)~(f)P11(2 μmol/L)与生物硫醇浓度的线性关系曲线

Fig.3 (a)~(c)Fluorescence response spectra of P11 (10 μmol/L) toward biothiols (Cys, GSH, and Hcy). (d)~(f)Linear relationships between fluorescence intensity of P11 (2 μmol/L) and bi thiol concentrations

随后探究了P11对上述分析物的荧光光谱响应。如图4(a)所示,仅在加入生物硫醇后,P11(10 μmol/L)在690 nm处的荧光强度显著下降,其他分析物对P11的荧光光谱影响可忽略不计,说明探针P11对生物硫醇具有高度的选择性。进一步通过荧光比色法探究P11对生物硫醇的选择性。在365 nm紫外灯照射下的小瓶荧光显色图中(图4(b)),仅在加入生物硫醇时,P11溶液的荧光颜色发生显著变化,从亮红色猝灭为无色;而加入其他分析物时,P11荧光颜色无明显变化。该结果进一步表

明了P11对生物硫醇的特异性识别能力。此外,构建了生物硫醇与其他分析物共存的对照体系,评估P11在竞争体系中的抗干扰性能(图4(c))。结果显示,在添加了其他分析物时,P11荧光强度基本保持不变;再加入生物硫醇时P11荧光强度显著下降,说明在其他分析物共存条件下,P11仍能对生物硫醇产生明显的荧光响应。以上结果表明,即使在复杂环境中,P11仍对生物硫醇具有良好的选择性与抗干扰能力。

荧光响应时间是评价探针对目标物响应性

能的重要指标。因此,采用荧光光谱法记录了在 690 nm 处探针 **P11** 与生物硫醇反应过程中荧光强度随时间的变化。如图 4(d)所示,加入生物硫醇后,**P11**体系荧光强度在初始阶段快速衰减,60 s 后趋于稳定。随后,探究了 **P11** 检测生物硫醇的 pH 适用范围(图 4(e))。首先测试了 **P11** 在不同 pH 条

件下的荧光强度,其在 pH 3.5~11.5 范围内的荧光强度保持稳定,当分别加入 Cys、GSH 和 Hcy 时,探针 **P11** 的荧光强度均明显下降,说明其仍能对生物硫醇具有良好的识别能力。以上结果表明,**P11** 具有快速的响应时间和优异的 pH 耐受性,说明其在复杂生物环境中具有潜在的实际应用价值。

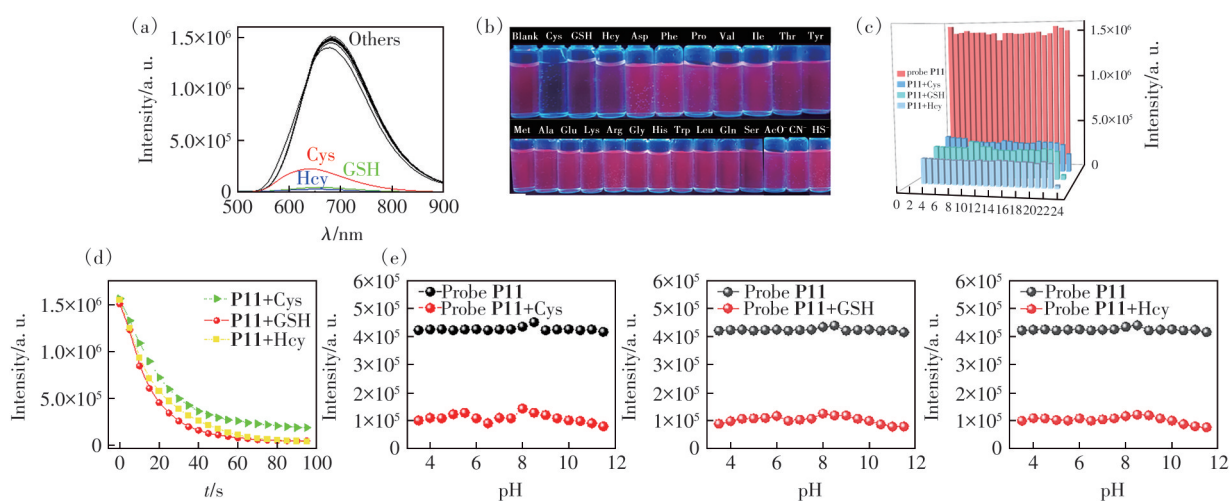


图 4 (a)~(b)**P11** (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 对不同分析物 (0.40 mmol/L) 的荧光光谱响应及荧光比色图; (c) 在不同分析物 (1.0 mmol/L) 存在时, **P11** (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 对生物硫醇 (1.0 mmol/L) 的荧光光谱响应, 包括: 1. 空白、2. Asp、3. Phe、4. Pro、5. Val、6. Ile、7. Thr、8. Tyr、9. Met、10. Ala、11. Glu、12. Lys、13. Arg、14. Gly、15. His、16. Trp、17. Leu、18. Gln、19. Ser、20.  $\text{AcO}^-$ 、21.  $\text{CN}^-$ 、22.  $\text{HS}^-$ 、23. Cys、GSH 和 Hcy; (d) **P11** (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 对生物硫醇 (0 和 0.40 mmol/L) 的时间响应曲线 (0~95 s, 每 5 s 记录一次); (e) **P11** (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 在不同 pH (3.5~11.5) 条件下对生物硫醇 (0 和 1.0 mmol/L) 的荧光光谱响应

Fig.4 (a)–(b) Fluorescence spectral responses and fluorescence colorimetric images of **P11** (10  $\mu\text{mol/L}$ ) to various analytes (0.40 mmol/L). (c) Fluorescence response spectra of **P11** (10  $\mu\text{mol/L}$ ) to biothiols (1.0 mmol/L) in the presence of interference substances (1.0 mmol/L), including: 1. blank, 2. Asp, 3. Phe, 4. Pro, 5. Val, 6. Ile, 7. Thr, 8. Tyr, 9. Met, 10. Ala, 11. Glu, 12. Lys, 13. Arg, 14. Gly, 15. His, 16. Trp, 17. Leu, 18. Gln, 19. Ser, 20.  $\text{AcO}^-$ , 21.  $\text{CN}^-$ , 22.  $\text{HS}^-$ , 23. Cys, GSH, and Hcy. (d) Time-dependent fluorescence response curves of **P11** (10  $\mu\text{mol/L}$ ) toward biothiols (0 and 0.40 mmol/L) recorded every 5 s from 0 to 95 s. (e) Fluorescence response spectra of **P11** (10  $\mu\text{mol/L}$ ) to biothiols (0 and 1.0 mmol/L) at different pH values (3.5–11.5)

### 3.3 **P11** 对生物硫醇的识别机制研究

首先依据实验现象对探针 **P11** 与生物硫醇的识别机理进行了初步推测(图 1)。为进一步验证该识别机理,采用 HR-MS 结合密度泛函理论 (DFT) 对识别过程进行表征与佐证。

如图 S1 所示, **P11** 的分子离子峰出现在  $m/z=478.1813$  处 ( $[\text{P11}+\text{H}]^+$  计算值  $m/z=478.1802$ ), 与生物硫醇反应后, 如图 S6~S8 所示, **P11**-Cys、**P11**-GSH 和 **P11**-Hcy 分别在  $m/z=597.1857$ 、 $m/z=783.2484$  和  $m/z=611.2011$  处出现新的分子离子峰 (理论值  $[\text{P11}-\text{Cys}-\text{H}]$  的  $m/z=597.1853$ 、 $[\text{P11}-\text{GSH}-\text{H}]$  的  $m/z=784.2494$ 、 $[\text{P11}-\text{Hcy}-\text{H}]$  的  $m/z=611.2010$ )。这是由于 **P11** 识别位点处的  $\text{C}=\text{C}$  双键与生物硫醇

发生亲核加成反应, 生成相应产物, 支持我们提出的传感机制(图 1)。生物硫醇对  $\alpha, \beta$ -不饱和  $\text{C}=\text{C}$  键的 Michael 加成会使该识别位点的双键碳由  $\text{sp}^2$  杂化转变为  $\text{sp}^3$  杂化, 从而导致局部  $\pi$  共轭程度降低, 进而影响分子内电荷转移 (ICT) 过程与前线分子轨道电子分布, 最终导致荧光猝灭。为进一步阐明 **P11** 对生物硫醇的传感机制, 采用 DFT 方法, 在 Gaussian 16 B3LYP/6-31G(d,p) 程序中对 **P11** 及其与生物硫醇反应后的产物进行了计算。如图 5 所示, **P11** 的 HOMO 能级主要分布于三苯胺给电子单元, LUMO 能级则集中于 1,3-茚满二酮受体结构及其邻接芳环区域, 呈现出显著的“推-拉电子”结构特征。这表明该分子在激发时电子容易从给

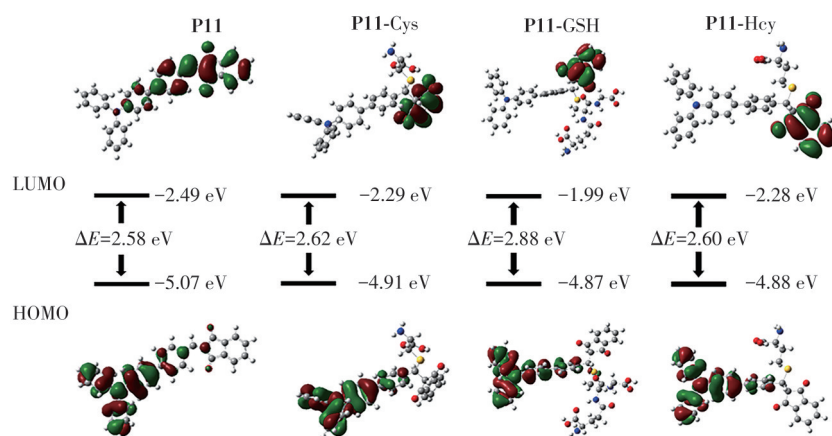


图5 P11与生物硫醇反应前/后的HOMO和LUMO电子云分布及能级图

Fig.5 HOMO and LUMO electron-density distributions and energy-level diagrams of P11 before and after reaction with biothiols

体向受体转移,表现出典型的分子内电荷转移(ICT)特性。当P11与生物硫醇发生相互作用后,所得产物的前线轨道电子分布发生明显变化:HOMO只分布在三苯胺结构,LUMO则局域在1,3-茚满二酮单元,说明P11分子D-A结构被破坏,ICT过程受阻,导致荧光猝灭。综上,HR-MS与DFT计算结果相互印证,与图1所提出的P11对

生物硫醇的传感机制一致。

### 3.4 探针P11的生物成像

首先通过MTT法<sup>[31]</sup>测试了探针P11的细胞毒性(图S10),探针P11浓度达到30 μmol/L时,A549细胞活性保持在80%以上,表明其细胞毒性较低。

然后进行成像实验。先对裸鼠开展生物硫醇的外源性成像(图6(a)~(b))。经生物硫醇蛋

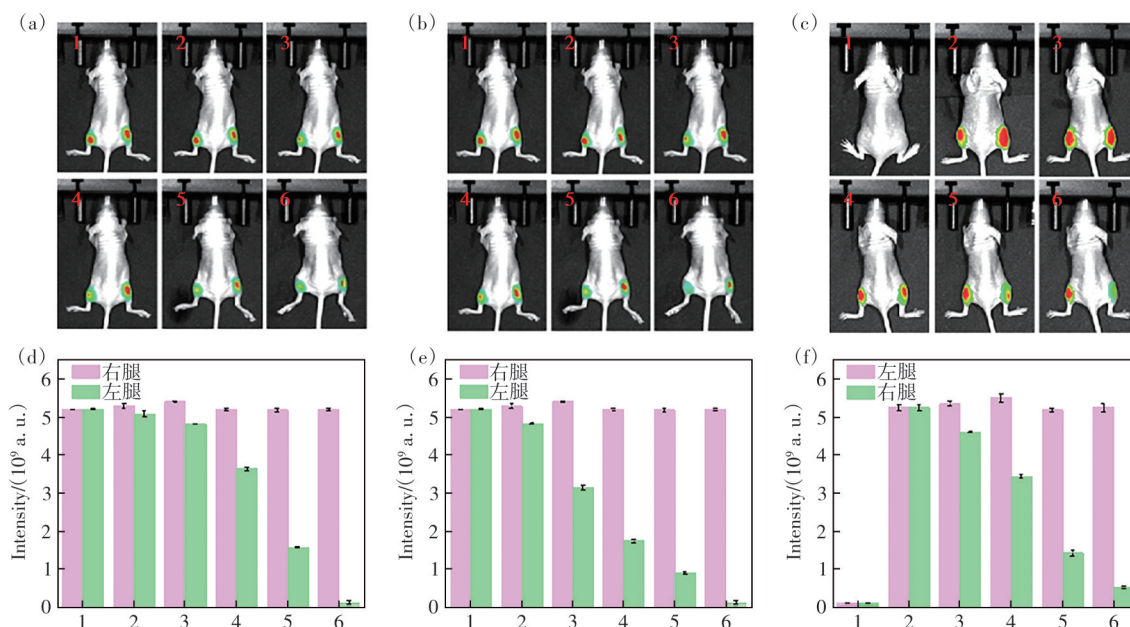


图6 (a)~(b)裸鼠体内Cys和GSH的外源性荧光成像,(1)0 min、(2)1 min、(3)2 min、(4)5 min、(5)10 min、(6)15 min时拍摄图像;(c)裸鼠体内生物硫醇的内源性荧光成像,(1)空白裸鼠、(2)0 min、(3)1 min、(4)2 min、(5)5 min、(6)10 min时拍摄图像;(d)~(f)(a)~(c)中注射部位荧光信号的定量结果:采用AMIView软件在注射部位绘制固定面积ROI,直接读取ROI的RAD值,各时间点成像在相同采集参数下获得并采用一致的ROI设置进行比较(SNR值分别为:11.8,8.0,10.6)

Fig.6 (a)~(b)Exogenous fluorescence imaging of Cys and GSH in nude mice. Image was taken at (1) 0 min, (2) 1 min, (3) 2 min, (4) 5 min, (5) 10 min, (6) 15 min. (c)Endogenous fluorescence imaging of biothiols in nude mice, (1) blank mice, image was taken at (2) 0 min, (3) 1 min, (4) 2 min, (5) 5 min, (6) 10 min. (d)~(f)Quantification of the fluorescence signal at the injection site in (a)~(c), obtained by a fixed-size ROI analysis in AMIView and reported as RAD (SNR values were 11.8, 8.0 and 10.6, respectively)

白酶抑制剂 NEM 孵育后再注射 P11 的裸鼠左右腿显示出明显的荧光信号,左腿分别原位注射 Cys 和 GSH 之后,随时间推移(0~15 min),其荧光信号逐渐减弱,并在 15 min 达到最低值,二者荧光信号都下降至初始荧光信号的 2%。右腿(仅注射 NEM+P11 的对照侧)荧光信号基本保持稳定。表明探针 P11 可用于体内外源性生物硫醇的检测。

随后对裸鼠开展内源性生物硫醇成像研究(图 6(c))。在小鼠左腿注射 NEM,右腿注射等量的 PBS,孵育 30 min 后,双腿原位注射 P11,此时注射部位显示出明显的荧光信号。随着孵育时间的增加(0~10 min),注射了 NEM 的左腿荧光信号基本不变;而注射了 PBS 的右腿的荧光信号逐渐减弱,10 min 达到最低值,荧光信号下降至初始荧光信号的 10%。表明 P11 可用于体内内源性生物硫醇的检测。

## 4 结 论

本文基于三苯胺结构合成了一种检测生物硫醇(Cys、GSH 和 Hcy)的近红外荧光探针 P11。探针 P11 对生物硫醇展现出优异响应性能,如长发射波长(690 nm)、大 Stokes 位移(215 nm)、高选择性、良好的“裸眼识别”效果以及快速的响应速度(60 s)等。其对 Cys、GSH 和 Hcy 的检出限分别低至 33.9  $\mu\text{mol/L}$ 、29.0  $\mu\text{mol/L}$  和 34.3  $\mu\text{mol/L}$ 。探针 P11 已成功应用于裸鼠体内外源性与内源性生物硫醇的荧光成像。因此,探针 P11 在低光损伤与深部组织穿透条件下实现生物硫醇检测方面具有一定参考价值,有望为体内硫醇水平变化的相关疾病检测与疗效动态监测提供新的方法。

本文补充文件和专家审稿意见及作者回复内容的下载地址: <http://cjl.lightpublishing.cn/thesisDetails#10.37188/CJL.20260026>

## 参 考 文 献:

- [ 1 ] ZHANG J, WANG N N, JI X, *et al.* BODIPY-based fluorescent probes for biothiols [J]. *Chem. Eur. J.*, 2020, 26(19): 4172-4192.
- [ 2 ] YIN C X, ZHANG W J, LIU T, *et al.* A near-infrared turn on fluorescent probe for biothiols detection and its application in living cells [J]. *Sens. Actuators B: Chem.*, 2017, 246: 988-993.
- [ 3 ] WANG Y, ZHU M Q, JIANG E K, *et al.* A simple and rapid turn on ESIPT fluorescent probe for colorimetric and ratio-metric detection of biothiols in living cells [J]. *Sci. Rep.*, 2017, 7(1): 4377.
- [ 4 ] XIE W Z, JIANG J Y, SHU D J, *et al.* Recent progress in the rational design of biothiol-responsive fluorescent probes [J]. *Molecules*, 2023, 28(10): 4252.
- [ 5 ] KWON H, LEE K, KIM H J. Coumarin-malonitrile conjugate as a fluorescence turn-on probe for biothiols and its cellular expression [J]. *Chem. Commun.*, 2011, 47(6): 1773-1775.
- [ 6 ] WU Z J, ZHAO T T, JIANG X Y, *et al.* A near-infrared fluorescent probe with a large Stokes shift for the detection and imaging of biothiols *in vitro* and *in vivo* [J]. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2024, 416(28): 6485-6495.
- [ 7 ] WANG X B, ZHANG D T. A novel reaction-based fluorescent turn-on probe for biothiols and its application in cell imaging [J]. *Sens. Actuators B: Chem.*, 2017, 241: 327-334.
- [ 8 ] VAN MEURS J B J, DHONUKSHE-RUTTEN R A M, PLUIJM S M F, *et al.* Homocysteine levels and the risk of osteoporotic fracture [J]. *N. Engl. J. Med.*, 2004, 350(20): 2033-2041.
- [ 9 ] ZHANG Y B, WEN L, ZHANG W J, *et al.* Sulphide activity-dependent multicolor emission dye and its applications in *in vivo* imaging [J]. *Analyst*, 2021, 146(18): 5517-5527.
- [ 10 ] JANEŠ L, LISJAK K, VANZO A. Determination of glutathione content in grape juice and wine by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection [J]. *Anal. Chim. Acta*, 2010, 674(2): 239-242.
- [ 11 ] AYDIN D, ELMAS S N K, GEYIK G A, *et al.* 1, 8-Naphthalimide appended propiolate-based fluorescent sensor for selective detection of cysteine over glutathione and homocysteine in living cells [J]. *New J. Chem.*, 2021, 45(36): 16617-16624.
- [ 12 ] 张月媛, 章焱煜, 尚主业, 等. 吩噻嗪基亚硫酸氢根荧光探针及其在食品和体内成像中的应用 [J]. *发光学报*, 2025, 46(11): 2192-2199.

- ZHANG Y Y, ZHANG Y Y, SHANG Z Y, *et al.* Phenothiazine-based bisulfite fluorescent probe and its applications in food and *in vivo* imaging [J]. *Chin. J. Lumin.*, 2025, 46(11): 2192-2199. (in Chinese)
- [ 13 ] 何静, 杨心怡, 尚主业, 等. 近红外次氯酸荧光探针的构建及其类风湿性关节炎成像研究 [J]. *发光学报*, 2025, 46(7): 1333-1342.
- HE J, YANG X Y, SHANG Z Y, *et al.* Construction of near-infrared hypochlorous acid fluorescent probe and its imaging in rheumatoid arthritis [J]. *Chin. J. Lumin.*, 2025, 46(7): 1333-1342. (in Chinese)
- [ 14 ] 袁柯宇, 胡仲禹. 选择性生物硫醇荧光探针的研究进展 [J]. *化学研究与应用*, 2024, 36(8): 1689-1698.
- YUAN K Y, HU Z Y. Recent advances in the study of selective biothiols fluorescent probes [J]. *Chem. Res. Appl.*, 2024, 36(8): 1689-1698. (in Chinese)
- [ 15 ] 罗凡, 郑东滨, 阳志强, 等. 新型姜黄素衍生物荧光探针的合成及对半胱氨酸的选择性识别 [J]. *发光学报*, 2021, 42(11): 1810-1817.
- LUO F, ZHENG D B, YANG Z Q, *et al.* A novel curcumin derivatives fluorescent probe for selective recognition of cysteine [J]. *Chin. J. Lumin.*, 2021, 42(11): 1810-1817. (in Chinese)
- [ 16 ] 周金涛, 朱天翔, 尚主业, 等. 咪唑基近红外亚硫酸氢根荧光探针及其在水样和生物成像中的应用 [J]. *发光学报*, 2024, 45(12): 2066-2073.
- ZHOU J T, ZHU T X, SHANG Z Y, *et al.* Carbazole-based near-infrared bisulfite fluorescent probe and its applications in water sample and bioimaging [J]. *Chin. J. Lumin.*, 2024, 45(12): 2066-2073. (in Chinese)
- [ 17 ] 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.
- [ 18 ] QI F P, LIU X J, YANG L, *et al.* A red-emitting fluorescent probe for biothiols detection with a large Stokes shift [J]. *Tetrahedron*, 2016, 72(44): 6909-6913.
- [ 19 ] LIU K Y, SHANG H M, KONG X Q, *et al.* A novel near-infrared fluorescent probe with a large Stokes shift for biothiols detection and application in *in vitro* and *in vivo* fluorescence imaging [J]. *J. Mater. Chem. B*, 2017, 5(21): 3836-3841.
- [ 20 ] CHEN S, HOU P, SUN J W, *et al.* A new long-wavelength emission fluorescent probe for imaging biothiols with remarkable Stokes shift [J]. *Spectrochim. Acta Part A: Mol. Biomol. Spectrosc.*, 2020, 241: 118655.
- [ 21 ] WANG Q, MA F T, TANG W Q, *et al.* A novel nitroethylene-based porphyrin as a NIR fluorescence turn-on probe for biothiols based on the Michael addition reaction [J]. *Dyes Pigments*, 2018, 148: 437-443.
- [ 22 ] WANG L, WANG J B, XIA S, *et al.* A FRET-based near-infrared ratiometric fluorescent probe for detection of mitochondria biothiols [J]. *Talanta*, 2020, 219: 121296.
- [ 23 ] WANG K, LENG T H, LIU Y J, *et al.* A novel near-infrared fluorescent probe with a large Stokes shift for the detection and imaging of biothiols [J]. *Sens. Actuators B: Chem.*, 2017, 248: 338-345.
- [ 24 ] GAO B Z, CUI L X, PAN Y, *et al.* A highly selective ratiometric fluorescent probe for biothiols and imaging in live cells [J]. *RSC Adv.*, 2016, 6(49): 43028-43033.
- [ 25 ] WANG J P, ZHANG F, YANG L, *et al.* A red-emitting fluorescent probe for sensing and imaging biothiols in living cells [J]. *J. Lumin.*, 2021, 234: 117994.
- [ 26 ] JIAO S, HE X, XU L B, *et al.* A red-emitting fluorescence turn-on probe for the discrimination of cysteine from biothiols and its bioimaging applications in living cells [J]. *Sens. Actuators B: Chem.*, 2019, 290: 47-52.
- [ 27 ] HE R K, ZHANG Y C, MADHU S, *et al.* BODIPY based realtime, reversible and targeted fluorescent probes for biothiols imaging in living cells [J]. *Chem. Commun.*, 2020, 56(93): 14717-14720.
- [ 28 ] DING S Y, LIU M J, HONG Y N. Biothiols-specific fluorescent probes with aggregation-induced emission characteristics [J]. *Sci. China Chem.*, 2018, 61(8): 882-891.
- [ 29 ] 张诚, 占玲玲, 欧阳密, 等. 一种二苯乙烯腈衍生物及其制备方法和应用: 中国, CN105111102A [P]. 2015-12-02.
- ZHANG C, ZHAN L L, OUYANG M, *et al.* *Cyanostilbene derivative*, preparation method and application thereof: China, CN105111102A [P]. 2015-12-02. (in Chinese)
- [ 30 ] SHANG Z Y, MENG Q T, TIAN D H, *et al.* Red-emitting fluorescent probe for hydrogen sulfide detection and its

applications in food freshness determination and *in vivo* bioimaging [J]. *Food Chem.*, 2023, 427: 136701.

- [ 31 ] ZHAO H W, GUO J R, GUO S J, *et al.* A novel near-infrared fluorescent probe for detecting Cys levels in HeLa cells and zebrafish [J]. *J. Mol. Struct.*, 2025, 1328: 141412.



张蕾(2000-),女,湖南衡阳人,硕士研究生,2022年于湖南科技大学获得学士学位,主要从事分子识别与生物成像方面的应用研究。

E-mail: zhanglei\_230923@163.com



尚主业(1996-),男,辽宁鞍山人,博士,特聘副教授,硕士生导师,2024年于辽宁科技大学获得博士学位,主要从事荧光分子探针智能识别与生物成像领域研究。

E-mail: shangzhuye@ustl.edu.cn



贾宏敏(1971-),女,辽宁辽阳人,博士,教授,2018年于辽宁科技大学获得博士学位,主要从事分子识别与生物成像方面的应用研究。

E-mail: jhongmin66@163.com



孟庆涛(1981-),男,山东曲阜人,博士,教授,博士生导师,2011年于大连理工大学获得博士学位,主要从事生物及医用新材料方面的应用基础研究,包括生物传感与生物成像材料、医用诊断与治疗材料和新型有机荧光染料的研究等。

E-mail: qtmeng@ustl.edu.cn