



## 基于亚甲基蓝的近红外荧光探针用于HOCl的特异性检测

姚书帆, 尧雨斯, 郑武斌, 叶晨喆, 应杰, 吕光磊, 李春霞

引用本文:

姚书帆, 尧雨斯, 郑武斌, 等. 基于亚甲基蓝的近红外荧光探针用于HOCl的特异性检测[J]. *发光学报*, 2020, 41(7): 791–799.  
YAO Shu-fan, YAO Yu-si, ZHENG Wu-bin, et al. Near-infrared Fluorescent Probe Based on Methylene Blue for Specific Detection of Hypochlorous Acid[J]. *Chinese Journal of Luminescence*, 2020, 41(7): 791–799.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.37188/fgxb20204107.0791>

## 您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

### 近红外荧光传感法测定中药材中赭曲霉毒素A

A Novel Near-infrared Fluorescence Aptasensor Assay for Ochratoxin A in Traditional Chinese Medicine  
*发光学报*. 2019, 40(1): 115–121 <https://doi.org/10.3788/fgxb20194001.0115>

### 基于InP@ZnS QDs/Dured纳米荧光探针的DNA检测

InP@ZnS QDs/Dured Fluorescent Nanoprobe for The Detection of DNA  
*发光学报*. 2017, 38(3): 288–295 <https://doi.org/10.3788/fgxb20173803.0288>

### 基于稀土上转换纳米荧光探针的肿瘤标志物体外检测

Lanthanide-doped Upconversion Nano-bioprobes for In-vitro Detection of Tumor Markers  
*发光学报*. 2018, 39(1): 27–49 <https://doi.org/10.3788/fgxb20183901.0027>

### 基于近红外上转换纳米探针的固相免疫检测研究

Studies of Solid Phase Immunoassay Based on Near Infrared Upconversion Nanoprobe  
*发光学报*. 2018, 39(8): 1059–1065 <https://doi.org/10.3788/fgxb20183908.1059>

### 半导体聚合物量子点-亚甲基蓝荧光能量转移体系测定水中Bi<sup>3+</sup>

Semiconducting Polymer Dots-methylene Blue Fluorescence Energy Transfer System for Determination of Bi(III) Ions in Water  
*发光学报*. 2017, 38(10): 1353–1358 <https://doi.org/10.3788/fgxb20173810.1353>

文章编号: 1000-7032(2020)07-0791-09

# 基于亚甲基蓝的近红外荧光探针用于 HOCl 的特异性检测

姚书帆, 尧雨斯, 郑武斌, 叶晨喆, 应 杰, 吕光磊\*, 李春霞\*

(浙江师范大学 化学与生命科学学院, 浙江 金华 321004)

**摘要:** 次氯酸(HOCl)是一种由过氧化氢和氯离子在髓过氧化物酶(MPO)催化作用下产生的活性氧。由于其在机体抵抗病原体的免疫防御中起着至关重要的作用,因此对 HOCl 的识别和检测具有重要的意义。目前,检测 HOCl 的方法有电分析法、色谱法、化学发光法和荧光分析法,其中荧光检测法以其简单、快速、高选择性、高灵敏度和实时检测等突出优点引起了许多研究者的兴趣。本文以亚甲基蓝(Methylene blue, MB)为荧光母核,设计合成了一种近红外荧光探针 **MB-1** 用于 HOCl 的特异性检测。该探针可在体外特异性检测 HOCl,响应之后,荧光会有显著的增强,同时伴有溶液颜色从无色到蓝色的明显变化。该探针对 HOCl 具有较高的灵敏度,其检测限为 8.2 nmol/L。此外,该探针具有较好的抗干扰能力,为在生理水平上检测 HOCl 提供了可能。

**关键词:** 次氯酸; 荧光探针; 活性氧; 亚甲基蓝; 近红外

中图分类号: O656 文献标识码: A DOI: 10.37188/fjxb20204107.0791

## Near-infrared Fluorescent Probe Based on Methylene Blue for Specific Detection of Hypochlorous Acid

YAO Shu-fan, YAO Yu-si, ZHENG Wu-bin, YE Chen-zhe, YING Jie, LYU Guang-lei\*, LI Chun-xia\*

(College of Chemistry and Life Sciences, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004, China)

\* Corresponding Authors, E-mail: guanglei@zjnu.edu.cn; cxli@zjnu.edu.cn

**Abstract:** Hypochlorous acid (HOCl) is a reactive oxygen species produced by hydrogen peroxide and chloride ions under the catalysis of myeloperoxidase (MPO). HOCl plays an important role in immune defense against pathogens. Therefore, it is of great significance to sense and detect HOCl. There are several methods for the detection of HOCl, such as electroanalysis, chromatography, chemiluminescence and fluorescence analysis and so on. Currently, fluorescence imaging technique has attracted many researchers' interest because of its advantages, including high selectivity and sensitivity, easy operation, quick response, and real-time detection. In this paper, a methylene blue-based near-infrared fluorescence probe **MB-1** was designed and synthesized for the fast and specific detection of HOCl. The probe can specifically detect HOCl *in vitro*, accompanied by a significant enhancement of near-infrared fluorescence intensity and a remarkable colour change from colorless to blue. Moreover, the probe displayed high sensitivity towards HOCl and limit of detection (LOD) was as low as 8.2 nmol/L. In addition, the probe showed good anti-interference ability, indicating that it has the potential to detect HOCl at a physiological level.

**Key words:** hypochlorous acid; fluorescent probes; reactive oxygen species; methylene blue; near-infrared

收稿日期: 2020-05-05; 修订日期: 2020-05-25

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(51872263); 浙江省自然科学基金重点项目(LZ19E020001)和青年项目(LQ19B050003); 国家级大学生创新创业训练计划项目资助

Supported by National Natural Science Foundation of China(51872263); Zhejiang Provincial Natural Science Foundation of China(LZ19E020001, LQ19B050003); National Training Program of Innovation and Entrepreneurship for Undergraduates

## 1 引 言

活性氧(Reactive oxygen species, ROS)是介导多种生物过程的重要信号分子<sup>[1-3]</sup>。次氯酸(HOCl)/次氯酸盐( $\text{OCl}^-$ )是一种由过氧化氢和氯离子在髓过氧化物酶(MPO)催化作用下产生的 ROS<sup>[4]</sup>。HOCl 在机体抵抗病原体的免疫防御中起着至关重要的作用<sup>[5]</sup>。人们发现,HOCl 不仅可以清除先天免疫系统中的病原体和微生物,而且在调节细胞内氧化还原平衡中起着重要作用,并参与多种信号传导过程<sup>[4]</sup>。尽管如此,越来越多的证据表明过量的 HOCl 会导致细胞和器官的氧化应激,从而引发很多疾病,例如帕金森病<sup>[6]</sup>、类风湿性关节炎<sup>[7]</sup>、肝损伤<sup>[8]</sup>和癌症等<sup>[9]</sup>。因此,开发一种可靠、精准以及能够在生理水平条件下检测 HOCl 的分析方法至关重要。

内源性 HOCl 具有很高的活性,能与其他生物分子和抗氧化剂迅速反应,给跟踪和分析其在生物体内的生理功能带来了巨大挑战<sup>[2,10]</sup>。在过去的几十年里,科学家们已经开发了一些检测 HOCl 的方法,如电分析法、色谱法、化学发光法和荧光分析法<sup>[11-14]</sup>。其中荧光探针以其简单、快速、高选择性、高灵敏度和实时检测等突出优点,被证明是最有效的非侵入性和原位识别 HOCl 的方法<sup>[15-22]</sup>。

近年来已经有一些有机小分子荧光探针被广泛应用于 HOCl 检测,按发光母核的不同大致可以分为: BODIPY<sup>[23-26]</sup>、萘酰亚胺<sup>[27-28]</sup>、罗丹明<sup>[20,29]</sup>、香豆素<sup>[30]</sup>等。许多荧光探针能够在体外或在细胞中检测 HOCl,但由于发射波长较短,使其在活体中的检测受到了限制<sup>[31-36]</sup>。与可见光荧光探针相比,近红外(NIR)荧光探针具有一些显著的优势,如较高的组织穿透深度和较低背景荧光等<sup>[37-41]</sup>。因此,迫切需要开发出具有检测生物体中 HOCl 的近红外荧光探针,而构建“turn-on”荧光探针是检测 HOCl 的一种重要策略,其具有高的灵敏度和信噪比。

本文以亚甲基蓝(Methylene blue, MB)<sup>[42]</sup>为荧光母核,利用其还原形式(RMB)和氧化形式(LMB)之间的荧光变化,设计合成了一种近红外荧光探针 **MB-1** 用于 HOCl 的检测。该探针可在体外特异性检测 HOCl,伴随着显著的近红外荧光强度的增强和颜色从无色到蓝色明显的变化,在 HOCl 的分析检测方面具有良好的应用潜力。

## 2 实 验

### 2.1 试剂与仪器

实验过程中使用的所有试剂和溶剂均来自商业供应商(表 1),未经进一步纯化。

表 1 药品和溶剂

Tab. 1 Reagents and solvents

试剂名称	试剂纯度	生产厂家
TBHP	-	上海萨恩化学技术有限公司
5% NaOCl	-	上海萨恩化学技术有限公司
30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-	上海展云化工有限公司
硝基铁氰化钠(Ⅲ)二水合物	分析纯	上海萨恩化学技术有限公司
2,2'-偶氮(2-脒基丙烷)二盐酸盐	分析纯	上海阿拉丁科技有限公司
亚铁硫酸盐	分析纯	国药集团药业股份有限公司
二氯甲烷	分析纯	国药集团药业股份有限公司
碳酸钠	分析纯	国药集团药业股份有限公司
保险粉	分析纯	国药集团药业股份有限公司
三光气	分析纯	上海阿拉丁科技有限公司
对异丙基苯胺	分析纯	上海阿拉丁科技有限公司
对甲氧基苯胺	分析纯	上海阿拉丁科技有限公司
乙酸乙酯	分析纯	国药集团药业股份有限公司
石油醚	分析纯	国药集团药业股份有限公司
二甲亚砜	分析纯	国药集团药业股份有限公司
无水硫酸钠	分析纯	国药集团药业股份有限公司

在乙腈或乙醇(HPLC级)中制备探针 **MB-1** 的储备溶液(1 mmol/L),并进一步用 PBS(磷酸钠缓冲液,pH = 7.4)稀释至最终浓度(10  $\mu$ mol/L)。根据文献报道的方法合成活性物种<sup>[43]</sup>。所用材料包括叔丁基过氧化氢(TBHP)、5% NaOCl 溶液、30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液、硝基铁氰化钠(III)二水合物(SNP)、2,2'-偶氮二(2-脞基丙烷)二盐酸盐、超氧化钾(KO<sub>2</sub>)、3-吗啉代嘧啶盐酸盐和亚铁硫酸盐,在超纯水或二甲基亚砜(DMSO)中制备 ROS 或活性氮物质(RNS)。自由基( $\cdot$ OH 和 TBO $\cdot$ )由芬顿反应生成:在 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(1 eq)存在下加入 FeSO<sub>4</sub>(5 eq)制备  $\cdot$ OH,在 TBHP(1 eq)存在下加入 FeSO<sub>4</sub>(5 eq)制备 TBO $\cdot$ 。最后在 PBS 缓冲溶液中稀释到设定的浓度进行测试。

在 F-4600 荧光分光光度计上测量了探针在 HOCl 存在时荧光强度的变化,激发波长  $\lambda_{ex}$  = 620 nm。探针的吸收光谱在 UH 5300 紫外-可见分光光度计上进行测量。<sup>1</sup>H NMR(400 MHz)和<sup>13</sup>C NMR(100 MHz)在 Bruker AV-400 或 AV-600 NMR 光谱仪上进行测量。使用 TOF MS 仪器进行高分辨率质谱(HRMS)分析。

## 2.2 探针的合成步骤

**MB-1** 的合成(图 1):向 MB(1.00 g,3.13 mmol,1.0 eq)的 10 mL 水溶液中加入二氯甲烷(DCM,5 mL)和 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(1.33 g,12.52 mmol,4.0 eq)。在氮气气氛下,将上述混合溶液于 40  $^{\circ}$ C 持续搅拌。接着,使用注射器将溶于水中的连二亚硫酸钠(10.89 g,12.52 mmol,4.0 eq)直接注入混合溶液中。然后,

在氮气气氛下,将反应溶液于 40  $^{\circ}$ C 持续搅拌 1 h,直到溶液变为黄色。用冰水浴对溶液进行冷却,然后向里面滴加溶于 5 mL 二氯甲烷中的双(三氯甲基)碳酸酯(0.56 g,1.88 mmol,0.6 eq)。添加完毕后,在氮气气氛下,将混合物于室温下搅拌 2 h。最后,将反应溶液倒入 100 mL 冰水中,并用 DCM 进行萃取。通过合并有机相,萃取物用无水硫酸钠干燥后在旋转蒸发仪上蒸发除去溶剂,然后通过柱色谱法纯化得到化合物 **MB-Cl**(白色固体,产率为 48.2%;乙酸乙酯/正己烷 = 1/10)。<sup>1</sup>H NMR(600 MHz,CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 7.42(s,2H),6.72(s,2H),6.65(d, $J$  = 8.0 Hz,2H),2.98(s,12H)。

向 100 mL 的 schlenk 管中加入化合物 **MB-Cl**(50.0 mg,0.144 mmol)、Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(61.4 mg,0.576 mmol)、N,N-二甲基苯胺(78.6 mg,0.576 mmol),加入溶剂二氯甲烷(5.0 mL)。在 40  $^{\circ}$ C 条件下,对反应液进行薄层色谱跟踪直至反应完全。反应结束后,反应液冷却到室温,减压浓缩,柱层析分离提纯得到化合物 **MB-1**(黑色固体,产率为 58.3%;乙酸乙酯/石油醚 = 1/1)。<sup>1</sup>H NMR(600 MHz,CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 7.43(d, $J$  = 8.2 Hz,2H),7.23(d, $J$  = 7.5 Hz,2H),6.75(s,1H),6.71(s,2H),6.65(s,4H),2.92(s,12H),2.86(s,6H)。<sup>13</sup>C NMR(100 MHz,CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 153.7,149.0,147.5,134.3,128.7,128.2,127.2,121.6,113.4,111.3,111.0,41.2,40.7。HR-MS(ESI, $m/z$ ): calcd for C<sub>25</sub>H<sub>29</sub>N<sub>5</sub>OS [M + H]<sup>+</sup>,448.2143,found 448.2126。

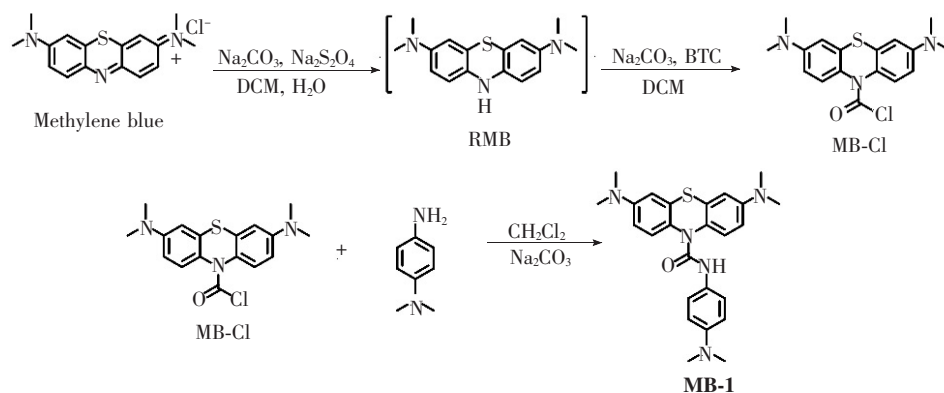


图 1 **MB-1** 的合成路线

Fig. 1 Synthetic route of **MB-1**

## 2.3 检出限的测定

根据常用的荧光滴定法确定检测限(LOD)。通过收集 11 次探针(10  $\mu$ mol/L)在 PBS 缓冲液

中的发射光谱以确认其标准偏差( $\sigma$ )。然后,根据 HOCl 在 0.0 ~ 4.0  $\mu$ mol/L 范围内 686 nm 处的荧光滴定数值拟合线性回归曲线,并获得曲线的

斜率( $k$ )。最后,使用以下公式计算检出限: $D = 3\sigma/k$ 。

### 3 结果与讨论

#### 3.1 探针对 HOCl 的响应性

如图 2, 探针 **MB-1** 本身基本无荧光, 但在 HOCl 存在条件下, 缺电子的酰胺羰基处很容易受到攻击从而断裂生成荧光团 MB。基于此, 我们认为 **MB-1** 具有实时检测 HOCl 的潜在能力。为进一步研究探针对 HOCl 的响应特性, 我们在室温下的 PBS 溶液中记录了相应的光谱信号。如图 3(b) 所示, 添加 HOCl 后, 探针在 686 nm 处显示出显著的荧光发射增强, 并且当添加 10  $\mu\text{mol/L}$  的 HOCl 时, 探针 **MB-1** 的荧光强度增强倍数达到最大, 为 198 倍。接着, 使用荧光滴定法测试了探针的检出限 (HOCl 浓度范围为 0.0 ~ 4.0  $\mu\text{mol/L}$ ),

**MB-1** 的检测限低至 8.2 nmol/L (图 3(c)、(d))。除此之外, 我们还通过吸收滴定方法测得其检测限为 62 nmol/L (图 3(e)、(f)), 远大于 8.2 nmol/L, 进一步说明荧光检测法比吸收光谱的灵敏度高。此外, 与荧光强度变化同步发生的是溶液颜

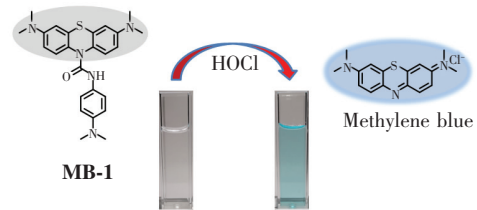


图 2 **MB-1** 与 HOCl 反应示意图, 插图为探针与 HOCl 反应前后溶液颜色变化。

Fig. 2 Schematic diagram of the reaction between **MB-1** and HOCl. The inset represents the colour change of the solution before and after the addition of HOCl.

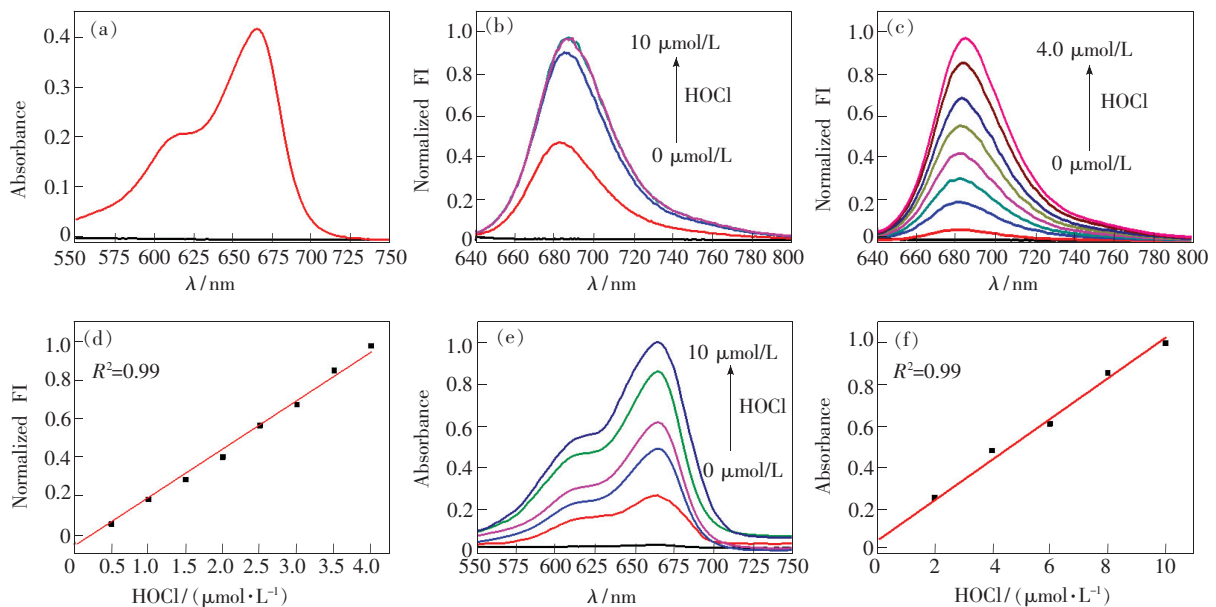


图 3 (a) 在 HOCl (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 存在下, **MB-1** (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 在 PBS 中的紫外-可见吸收光谱; (b) 在不同浓度的 HOCl (0, 2.5, 5.0, 7.5, 10  $\mu\text{mol/L}$ ) 存在下, **MB-1** (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 在 PBS 中的荧光光谱; (c) 在 PBS 缓冲液中用 HOCl (0.0 ~ 4.0  $\mu\text{mol/L}$ ) 进行连续滴定, 探针 **MB-1** (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 的发射光谱; (d) 根据 HOCl 从 0.0 ~ 4.0  $\mu\text{mol/L}$  范围内 **MB-1** 在 686 nm 处的荧光强度进行线性回归曲线拟合; (e) 在 PBS 缓冲液中用 HOCl (0 ~ 10  $\mu\text{mol/L}$ ) 进行连续滴定, 探针 **MB-1** (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 的吸收光谱; (f) 根据 HOCl 从 0 ~ 10  $\mu\text{mol/L}$  范围内 **MB-1** 在 665 nm 处的吸收值进行线性拟合。PBS (pH = 7.4),  $\lambda_{\text{ex}} = 620 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 686 \text{ nm}$ 。

Fig. 3 (a) Absorption spectrum of **MB-1** (10  $\mu\text{mol/L}$ ) in the presence of HOCl (10  $\mu\text{mol/L}$ ) in PBS buffer. (b) Fluorescence spectra of **MB-1** (10  $\mu\text{mol/L}$ ) towards different concentrations of HOCl (0, 2.5, 5.0, 7.5, 10  $\mu\text{mol/L}$ ) in PBS buffer. (c) Emission spectra of **MB-1** (10  $\mu\text{mol/L}$ ) under different concentrations of HOCl (0.0 - 4.0  $\mu\text{mol/L}$ ). (d) Linear relationship between fluorescence intensities of **MB-1** at 686 nm and concentrations of HOCl (0.0 - 4.0  $\mu\text{mol/L}$ ). (e) Absorption spectra of probe **MB-1** (10  $\mu\text{mol/L}$ ) under different concentrations of HOCl (0 - 10  $\mu\text{mol/L}$ ) in PBS buffer. (f) Linear relationship between absorption intensities of **MB-1** at 665 nm in concentrations of HOCl from 0 to 10  $\mu\text{mol/L}$  in PBS (pH = 7.4),  $\lambda_{\text{ex}} = 620 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 686 \text{ nm}$ .

色变化,加入HOCl后,溶液由无色变为显著的蓝色(图2)。因此,该探针可以作为HOCl的“裸眼”指示剂。上述结果表明,MB-1探针对溶液中的HOCl具有较高的敏感性。

### 3.2 探针对HOCl的选择性

一种好的探针应具备对被分析物的良好选择性。因此,我们评估了与活性氧/氮物种( $\text{H}_2\text{O}_2$ 、TBHP、 $\text{ROO}\cdot$ 、 $\text{O}_2^-$ 、 $\text{ONOO}^-$ 、 $\cdot\text{OH}$ 、 $\text{TBO}\cdot$ )、普通阴阳离子( $\text{CH}_3\text{COO}^-$ 、 $\text{CO}_3^{2-}$ 、 $\text{SO}_4^{2-}$ 、 $\text{Cl}^-$ 、 $\text{F}^-$ 、 $\text{I}^-$ 、 $\text{NO}_2^-$ 、 $\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Ni}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Al}^{3+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、

$\text{NH}_4^+$ )和常见氨基酸(Pro、Ser、Ala、Gln、Val、Thr、Ile、Gly、Tyr、Met、Trp、Phe、Cys、Glu、Lys)相比,探针对HOCl的选择性。如图4所示,在对各种物种的检测中,由HOCl引起的MB-1的荧光信号最为显著,阴离子和氨基酸的加入不会引起MB-1荧光信号的显著增加,而对于活性氧/氮物种和阳离子,虽然其中的 $\cdot\text{OH}$ (73倍)、 $\text{TBO}\cdot$ (43倍)、 $\text{Fe}^{2+}$ (11倍)和 $\text{Cu}^{2+}$ (44倍)也会使探针荧光信号增强,但其增强倍数仍远小于HOCl(189倍)。综上所述,探针MB-1对HOCl具有优异的选择性。

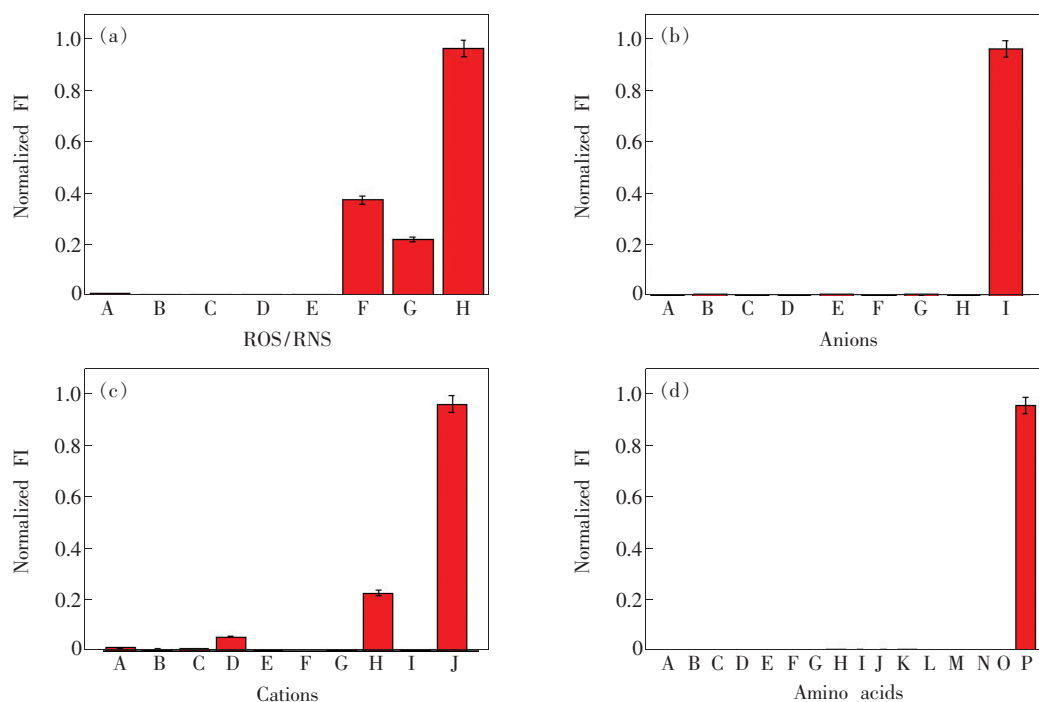


图4 在PBS溶液(pH=7.4)中存在各种分析物(100  $\mu\text{mol/L}$ )下探针MB-1(10  $\mu\text{mol/L}$ )在686 nm处的荧光响应。(a)添加不同的ROS/RNS(从A到G: $\text{H}_2\text{O}_2$ 、TBHP、 $\text{ROO}\cdot$ 、 $\text{O}_2^-$ 、 $\text{ONOO}^-$ 、 $\cdot\text{OH}$ 、 $\text{TBO}\cdot$ )和H:HOCl;(b)添加各种阴离子(从A到I: $\text{CH}_3\text{COO}^-$ 、 $\text{CO}_3^{2-}$ 、 $\text{SO}_4^{2-}$ 、 $\text{Cl}^-$ 、 $\text{F}^-$ 、 $\text{I}^-$ 、 $\text{NO}_2^-$ 、 $\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$ )和I:HOCl;(c)添加各种阳离子(从A到J: $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Ni}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Al}^{3+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{NH}_4^+$ )和J:HOCl;(d)添加各种氨基酸(从A到O:Pro、Ser、Ala、Gln、Val、Thr、Ile、Gly、Tyr、Met、Trp、Phe、Cys、Glu、Lys)和P:HOCl。激发和发射波长( $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$ )分别为620/686 nm。

Fig. 4 Fluorescence intensity of MB-1(10  $\mu\text{mol/L}$ ) at 686 nm after the addition of various analytes(100  $\mu\text{mol/L}$ ) in PBS(pH = 7.4). (a) Different ROS/RNS(from A to H:  $\text{H}_2\text{O}_2$ , TBHP,  $\text{ROO}\cdot$ ,  $\text{O}_2^-$ ,  $\text{ONOO}^-$ ,  $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{TBO}\cdot$  and HOCl). (b) Various anions(from A to I:  $\text{CH}_3\text{COO}^-$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{F}^-$ ,  $\text{I}^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$  and HOCl). (c) Various cations (from A to J:  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{NH}_4^+$  and HOCl). (d) Several amino acids(from A to P: Pro, Ser, Ala, Gln, Val, Thr, Ile, Gly, Tyr, Met, Trp, Phe, Cys, Glu, Lys, and HOCl). The excitation and emission wavelength( $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$ ) are 620/686 nm, respectively.

### 3.3 探针的抗干扰能力

生物体内不只含有HOCl,为验证该探针具有应用于生物体的潜力,我们研究了加入其他还原剂(包括N-乙酰半胱氨酸(NAC)、谷胱甘肽(GSH)、葡萄糖和醛)的情况下探针的抗干扰能

力。如图5,高浓度的葡萄糖和醛(0.5 mmol/L)不会干扰探针对HOCl的检测,而由于NAC和GSH能在一定程度上消耗HOCl,随着它们浓度的逐渐增加,探针的荧光发射强度有所降低,但即使在分别存在20  $\mu\text{mol/L}$  NAC和GSH情况下,探

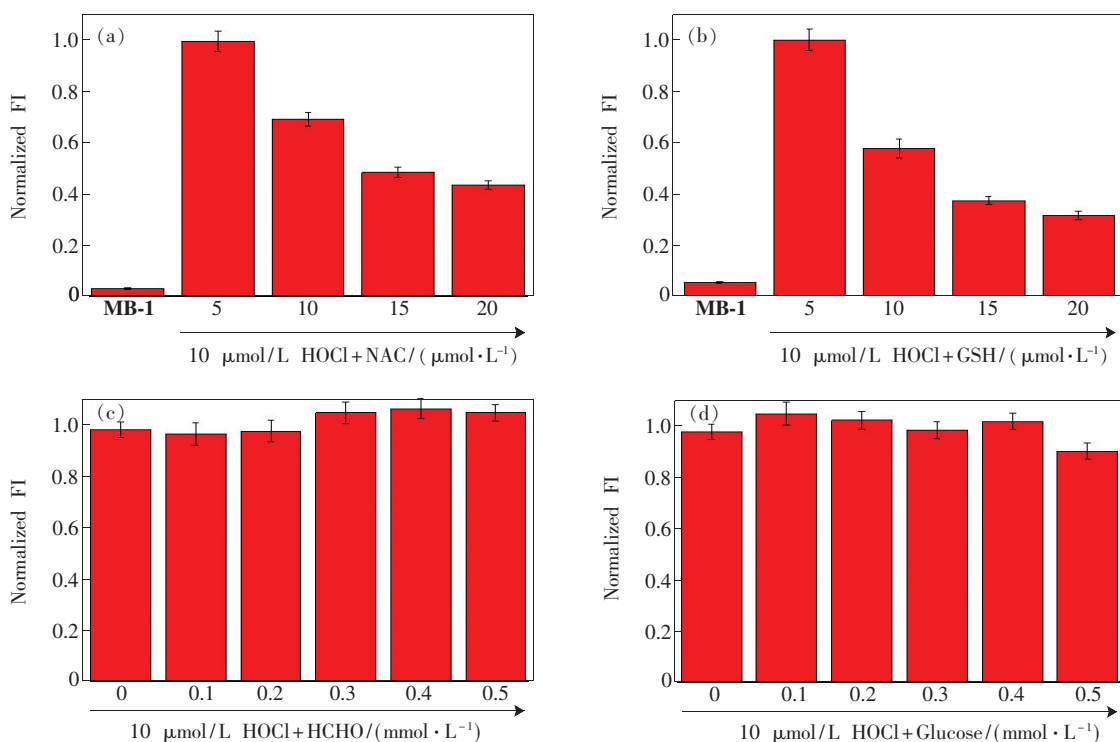


图5 几种细胞还原剂对 **MB-1** ( $10 \mu\text{mol/L}$ ) 响应  $\text{HOCl}$  的干扰。(a) NAC; (b) GSH; (c) HCHO; (d) 葡萄糖。激发和发射波长 ( $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$ ) 分别为 620/686 nm。

Fig. 5 Anti-interference of **MB-1** ( $10 \mu\text{mol/L}$ ) to  $\text{HOCl}$  in the presence of several cell reducing substances. (a) NAC. (b) GSH. (c) HCHO. (d) Glucose. The excitation and emission wavelength ( $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$ ) are 620/686 nm, respectively.

针的荧光强度仍比仅存在探针本身时增加了 13 倍和 6 倍。此外,不同 pH 值对探针检测  $\text{HOCl}$  的影响也是我们要考虑的情况之一。如图 6,我们检测了探针 **MB-1** 在  $\text{pH} = 2 \sim 12$  的 PBS 溶液中与

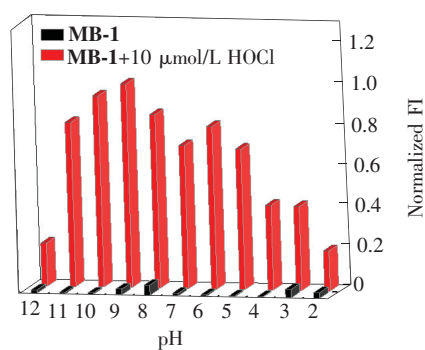


图6 在不存在和存在  $\text{HOCl}$  ( $10 \mu\text{mol/L}$ ) 情况下,  $\text{pH}$  对 **MB-1** ( $10 \mu\text{mol/L}$ ) 在 686 nm 处荧光强度的影响。激发和发射波长 ( $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$ ) 分别为 620/686 nm。

Fig. 6 Effect of  $\text{pH}$  on the fluorescence intensity of **MB-1** ( $10 \mu\text{mol/L}$ ) at 686 nm in the absence and presence of  $\text{HOCl}$  ( $10 \mu\text{mol/L}$ ). The excitation and emission wavelength ( $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$ ) are 620/686 nm, respectively.

$\text{HOCl}$  ( $10 \mu\text{mol/L}$ ) 反应后的荧光强度。结果表明,在  $10 \mu\text{mol/L}$  的  $\text{HOCl}$  存在下,探针的荧光发射强度在  $5 \sim 11$  的  $\text{pH}$  范围内均显示出显著的荧光发射增强。综上所述,探针 **MB-1** 在复杂的溶液环境中具有出色的抗干扰能力,表明它具有能够在生理水平上进行  $\text{HOCl}$  检测的可能。

## 4 结 论

本文基于亚甲基蓝的结构,设计合成了探针分子 **MB-1** 用于  $\text{HOCl}$  的检测。**MB-1** 对  $\text{HOCl}$  具有良好的特异性、较低的检测限和较好的抗干扰能力,可以实现微量  $\text{HOCl}$  的特异性检测。另一方面,本文还提供了一种设计思路:通过调整苯胺对位官能团的取代基可以设计合成一系列对  $\text{HOCl}$  响应的探针分子。该类探针可为检测病变组织部位的  $\text{HOCl}$  提供可能。该探针也存在一些不足,如只能在  $\text{HOCl}$  浓度范围比较窄的区间内进行定量测定以及探针对  $\text{HOCl}$  的响应时间相对较长等。这些都是我们今后需要改进和完善的问题。

## 参 考 文 献:

- [ 1 ] LAMBETH J D. Nox enzymes, ROS, and chronic disease: an example of antagonistic pleiotropy [ J ]. *Free Radic. Biol. Med.*, 2007, 43(3):332-347.
- [ 2 ] WINTERBOURN C C. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species [ J ]. *Nat. Chem. Biol.*, 2008, 4(5):278-286.
- [ 3 ] BRECKWOLDT M O, CHEN J W, STANGENBERG L, et al. Tracking the inflammatory response in stroke *in vivo* by sensing the enzyme myeloperoxidase [ J ]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008, 105(47):18584-18589.
- [ 4 ] PATTISON D I, DAVIES M J. Evidence for rapid inter- and intramolecular chlorin transfer reactions of histamine and carnosine chloramines: implications for the prevention of hypochlorous-acid-mediated damage [ J ]. *Biochemistry*, 2006, 45(26):8152-8162.
- [ 5 ] PROKOPOWICZ Z M, ARCE F, BIEDRON R, et al. Hypochlorous acid: a natural adjuvant that facilitates antigen processing, cross-priming, and the induction of adaptive immunity [ J ]. *J. Immunol.*, 2010, 184(2):824-835.
- [ 6 ] MEHTA N J, ASMARO K, HERMIZ D J, et al. Hypochlorite converts cysteinyl-dopamine into a cytotoxic product: a possible factor in Parkinson's disease [ J ]. *Free Radic. Biol. Med.*, 2016, 101:44-52.
- [ 7 ] STAMP L K, KHALILOVA I, TARR J M, et al. Myeloperoxidase and oxidative stress in rheumatoid arthritis [ J ]. *Rheumatology*, 2012, 51(10):1796-1803.
- [ 8 ] GORRINI C, HARRIS I S, MAK T W. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy [ J ]. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2013, 12(12):931-947.
- [ 9 ] PAN B, REN H, LV X F, et al. Hypochlorite-induced oxidative stress elevates the capability of HDL in promoting breast cancer metastasis [ J ]. *J. Transl. Med.*, 2012, 10(1):65-1-13.
- [ 10 ] ODOBASIC D, MULJADI R C M, O'SULLIVAN K M, et al. Suppression of autoimmunity and renal disease in pristane-induced lupus by myeloperoxidase [ J ]. *Arthritis Rheumatol.*, 2015, 67(7):1868-1880.
- [ 11 ] THIAGARAJAN S, WU Z Y, CHEN S M. Amperometric determination of sodium hypochlorite at poly MnTAPP-nano Au film modified electrode [ J ]. *J. Electroanal. Chem.*, 2011, 661(2):322-328.
- [ 12 ] WATANABE T, IDEHARA T, YOSHIMURA Y, et al. Simultaneous determination of chlorine dioxide and hypochlorite in water by high-performance liquid chromatography [ J ]. *J. Chromatogr. A*, 1998, 796(2):397-400.
- [ 13 ] MARINO D F, INGLE J D. Determination of chlorine in water by luminol chemiluminescence [ J ]. *Anal. Chem.*, 1981, 53(3):455-458.
- [ 14 ] PAK Y L, PARK S J, WU D, et al. N-heterocyclic carbene boranes as reactive oxygen species-responsive materials: application to the two-photon imaging of hypochlorous acid in living cells and tissues [ J ]. *Angew. Chem.*, 2018, 130(6):1583-1587.
- [ 15 ] XU Q L, HEO C H, KIM J A, et al. A selective imidazoline-2-thione-bearing two-photon fluorescent probe for hypochlorous acid in mitochondria [ J ]. *Anal. Chem.*, 2016, 88(12):6615-6620.
- [ 16 ] JIANG Y L, WU S S, JIN C, et al. Novel diaminomaleonitrile-based fluorescent probe for ratiometric detection and bioimaging of hypochlorite [ J ]. *Sens. Actuators B Chem.*, 2018, 265:365-370.
- [ 17 ] ZHAN Z X, LIU R, CHAI L, et al. Turn-on fluorescent probe for exogenous and endogenous imaging of hypochlorous acid in living cells and quantitative application in flow cytometry [ J ]. *Anal. Chem.*, 2017, 89(17):9544-9551.
- [ 18 ] JIAO X Y, XIAO Y S, LI Y, et al. Evaluating drug-induced liver injury and its remission via discrimination and imaging of HClO and H<sub>2</sub>S with a two-photon fluorescent probe [ J ]. *Anal. Chem.*, 2018, 90(12):7510-7516.
- [ 19 ] XING P F, FENG Y X, NIU Y M, et al. A water-soluble, two-photon probe for imaging endogenous hypochlorous acid in live tissue [ J ]. *Chem. Eur. J.*, 2018, 24(22):5748-5753.
- [ 20 ] LIN Y, WANG L, AGRAWALLA B K, et al. Development of targetable two-photon fluorescent probes to image hypochlorous acid in mitochondria and lysosome in live cell and inflamed mouse model [ J ]. *J. Am. Chem. Soc.*, 2015, 137(18):5930-5938.
- [ 21 ] HAN X, TIAN C, JIANG J J, et al. Two ratiometric fluorescent probes for hypochlorous acid detection and imaging in living cells [ J ]. *Talanta*, 2018, 186:65-72.



- [22] KOIDE Y, URANO Y, HANAOKA K, *et al.*. Development of an Si-rhodamine-based far-red to near-infrared fluorescence probe selective for hypochlorous acid and its applications for biological imaging [J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, 133(15): 5680-5682.
- [23] JIN Y, LV M H, TAO Y F, *et al.*. A water-soluble BODIPY-based fluorescent probe for rapid and selective detection of hypochlorous acid in living cells [J]. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.*, 2019, 219: 569-575.
- [24] KANG J, HUO F J, YUE Y K, *et al.*. A solvent depend on ratiometric fluorescent probe for hypochlorous acid and its application in living cells [J]. *Dyes Pigm.*, 2017, 136: 852-858.
- [25] EMRULLAHOĞLU M, ÜÇÜNCÜ M, KARAKUŞ E. A BODIPY aldoxime-based chemodosimeter for highly selective and rapid detection of hypochlorous acid [J]. *Chem. Commun.*, 2013, 49(71): 7836-7838.
- [26] HU JJ, WONG N K, GU Q S, *et al.*. HKOCl-2 series of green BODIPY-based fluorescent probes for hypochlorous acid detection and imaging in live cells [J]. *Org. Lett.*, 2014, 16(13): 3544-3547.
- [27] ZHANG B B, YANG X P, ZHANG R, *et al.*. Lysosomal-targeted two-photon fluorescent probe to sense hypochlorous acid in live cells [J]. *Anal. Chem.*, 2017, 89(19): 10384-10390.
- [28] GUO T, CUI L, SHEN J N, *et al.*. A dual-emission and large Stokes shift fluorescence probe for real-time discrimination of ROS/RNS and imaging in live cells [J]. *Chem. Commun.*, 2013, 49(18): 1862-1864.
- [29] ZHANG C Y, NIE Q C, ISMAIL I, *et al.*. A highly sensitive and selective fluorescent probe for fast sensing of endogenous HClO in living cells [J]. *Chem. Commun.*, 2018, 54(31): 3835-3838.
- [30] NIU H W, CHEN K K, XU J H, *et al.*. Mitochondria-targeted fluorescent probes for oxidative stress imaging [J]. *Sens. Actuators B Chem.*, 2019, 299: 126938.
- [31] FAN J L, MU H Y, ZHU H, *et al.*. Recognition of HClO in live cells with separate signals using a ratiometric fluorescent sensor with fast response [J]. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 2015, 54(36): 8842-8846.
- [32] SONG W H, DONG B L, LU Y R, *et al.*. Development of an endoplasmic reticulum-targeting fluorescent probe for the two-photon imaging of hypochlorous acid (HClO) in living cells [J]. *Anal. Methods*, 2019, 11(35): 4450-4455.
- [33] HALDAR U, SHARMA R, RUIDAS B, *et al.*. Toward rapid and selective detection of hypochlorous acid in pure aqueous media and its application to cell imaging: BODIPY-derived water-soluble macromolecular chemosensor with high sensitivity [J]. *Dyes Pigm.*, 2020, 172: 107858.
- [34] LIU S Z, YANG D, LIU Y J, *et al.*. A dual-channel and fast-response fluorescent probe for selective detection of HClO and its applications in live cells [J]. *Sens. Actuators B Chem.*, 2019, 299: 126937.
- [35] JIANG C, YAO Y W, KONG C L, *et al.*. A novel colorimetric and ratiometric fluorescent probe for targeted detection of hypochlorous acid based on HClO-mediated anthracene-hydrazone to anthracene-triazole transformation [J]. *Anal. Methods*, 2019, 11(32): 4157-4164.
- [36] MA Q J, WANG C Y, BAI Y, *et al.*. A lysosome-targetable and ratiometric fluorescent probe for hypochlorous acid in living cells based on a 1,8-naphthalimide derivative [J]. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.*, 2019, 223: 117334.
- [37] YANG D M, MA P A, HOU Z Y, *et al.*. Current advances in lanthanide ion ( $Ln^{3+}$ )-based upconversion nanomaterials for drug delivery [J]. *Chem. Soc. Rev.*, 2015, 44(5): 1416-1448.
- [38] LIU B, LIC X, YANG P P, *et al.*. 808 nm light-excited lanthanide-doped nanoparticles: rational design, luminescence control and theranostic applications [J]. *Adv. Mater.*, 2017, 29(18): 1605434-1-24.
- [39] HOU Z Y, DENG K R, WANG M F, *et al.*. Hydrogenated titanium oxide decorated upconversion nanoparticles: facile laser modified synthesis and 808 nm nir-light triggered phototherapy [J]. *Chem. Mater.*, 2019, 31(3): 774-784.
- [40] LV G L, SHEN Y, ZHENG W B, *et al.*. Fluorescence detection and dissociation of amyloid- $\beta$  species for the treatment of Alzheimer's disease [J]. *Adv. Therap.*, 2019, 2(9): 1900054.
- [41] WANG F, WEN S H, HE H, *et al.*. Microscopic inspection and tracking of single upconversion nanoparticles in living cells [J]. *Light: Sci. Appl.*, 2018, 7(4): 18007-1-6.
- [42] WEI P, LIU L Y, WEN Y, *et al.*. Release of amino- or carboxy-containing compounds triggered by HOCl: application for imaging and drug design [J]. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2019, 58(14): 4547-4551.
- [43] WEI P, YUAN W, XUE F F, *et al.*. Deformylation reaction-based probe for *in vivo* imaging of HOCl [J]. *Chem. Sci.*, 2018, 9(2): 495-501.



姚书帆(1998-),女,浙江绍兴人,在读本科生,主要从事有机荧光探针分子的合成及其在疾病检测中应用的研究。

E-mail: yaoshufan@zjnu.edu.cn



李春霞(1977-),女,山东德州人,博士,教授,硕士研究生导师/博士研究生导师,2008年于中国科学院长春应用化学研究所获得博士学位,主要从事功能纳米材料在荧光检测和肿瘤诊疗中的研究。

E-mail: cxli@zjnu.edu.cn



吕光磊(1986-),男,山东泰安人,博士,讲师,2017年于复旦大学获得博士学位,主要从事有机无机杂化材料的设计合成及其在疾病诊疗中应用的研究。

E-mail: guanglei@zjnu.edu.cn

### 青年编委介绍:

李春霞,《发光学报》第一届青年编委,博士,教授,博士研究生导师,国家优秀青年基金获得者。2008年于中国科学院长春应用化学研究所获得理学博士学位。毕业后留所工作,2016—2019年在浙江师范大学工作,2020年调至山东大学工作。近年来在稀土发光材料的可控合成、表面修饰及肿瘤诊疗领域从事研究,重点探索如何设计、合成基于刺激-响应型的稀土上转换多功能纳米诊疗平台,研究其药物传递和肿瘤治疗中的应用,从而解决传统化疗药物存在的诸如药物利用率低、毒副作用大、治疗效果低、靶向性差等问题,为恶性肿瘤的诊疗一体化提供了新思路。2007年以来共发表SCI学术论文150余篇,包括*Chem. Soc. Rev.*, *Adv. Mater.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, *ACS Nano*, *Adv. Funct. Mater.*, *Chem. Mater.*等国际权威刊物。工作引起国内外同行的广泛关注和反响,他引17 000余次,H指数76,单篇最高他引670次,12篇论文入选ESI高被引论文。主持多项国家级及省重点等项目。2014—2016年、2018年四次入选全球材料领域“高被引科学家”。