

文章编号: 1000-7032(2024)10-1741-06

基于2-(2'-羟基苯基)苯并噻唑衍生物的过氧化氢 荧光探针及其合成方法与应用

石磊^{1*}, 黄玲², 黄泽键¹, 李东华¹, 龚盛昭^{1*}

(1. 广东轻工职业技术大学 轻工技术学院, 广东 广州 510300;

2. 佛山市安安美容保健品有限公司, 广东 佛山 528099)

摘要: 过氧化氢(H_2O_2)作为小分子活性氧(ROS)的一员,在正常生理活动和许多疾病的发生中起着至关重要的作用。本工作以2-(2'-羟基苯基)苯并噻唑(HBT)为荧光团,以对硝基苯乙酸酯部分为识别位点,合成了一种新型荧光探针1。该探针对 H_2O_2 表现出高灵敏度(检测限为 $1.26 \mu\text{mol/L}$),并且对 H_2O_2 显示出良好的特异性识别能力。通过高效液相色谱(HPLC)分析表明,该探针的识别机制是通过 α -酮酯基团的氧化和酯基的水解以释放荧光团HBT。此外,探针1具有较低的细胞毒性和良好的细胞渗透性,并成功应用于HeLa细胞内 H_2O_2 的生物成像分析,证实了其在细胞水平上检测 H_2O_2 的可行性和实用性。

关键词: 荧光探针; 过氧化氢; 生物成像分析; 2-(2'-羟基苯基)苯并噻唑

中图分类号: O657.3 文献标识码: A DOI: 10.37188/CJL.20240181

Fluorescent Probe Derived from 2-(2'-Hydroxyphenyl)-Benzothiazole for Hydrogen Peroxide Sensing: Synthesis, Characterization and Application

SHI Lei^{1*}, HUANG Ling², HUANG Zejian¹, LI Donghua¹, GONG Shengzhao^{1*}

(1. College of Light Chemical Engineering, Guangdong Polytechnic Normal University, Guangzhou 510300, China;

2. Anan Cosmetics and Healthcare Products Co., Ltd., Foshan 528099, China)

* Corresponding Authors, E-mail: shileinaoh@163.com; 1996103022@gdip.edu.cn

Abstract: Hydrogen peroxide (H_2O_2), a member of small-molecule reactive oxygen species (ROS), plays vital roles in normal physiological activities and the occurrence of many diseases. In this work, a novel fluorescent probe was synthesized with the 2-(2'-hydroxyaryl) benzothiazoles (HBT) as the fluorophores and 4-nitrophenyl acetate moiety as the reaction sites. The probe 1 exhibited a high sensitivity for H_2O_2 with the detection limit of $1.26 \mu\text{mol/L}$, and displayed a good selectivity for H_2O_2 over other reactants such as ROS, amino acids, and various ions and anions. Through high-performance liquid chromatography (HPLC) analysis, the probe's recognition mechanism was based on the oxidation of the α -keto ester group and the hydrolysis of the ester moiety to release the fluorophore HBT. Moreover, probe 1 has low cytotoxicity and cell permeability, and was successfully applied to bioimaging analysis of H_2O_2 within HeLa cells, confirming its feasibility and practicality for H_2O_2 detection at the cellular level.

Key words: fluorescent probe; hydrogen peroxide; bioimaging analysis; 2-(2'-hydroxyphenyl) benzothiazole

收稿日期: 2024-07-29; 修订日期: 2024-08-17

基金项目: 广东省普通高校特色创新类项目(2022KTSCX228); 广东省科技创新战略专项资金项目(pdjh2023a0799)

Supported by Special Innovative Projects of Universities in Guangdong Province(2022KTSCX228); Guangdong Provincial Science and Technology Innovation Strategic Fund(pdjh2023a0799)

1 引 言

作为一种特殊的小分子活性氧(ROS),过氧化氢(H_2O_2)广泛存在于生物系统的各种氧化过程中。鉴于 H_2O_2 在生物体的氧化还原过程中的重要作用,其浓度的微妙平衡对于维护细胞功能至关重要,并且与多种疾病密切相关,例如糖尿病、癌症、心血管疾病以及神经退行性疾病等^[1-3]。因此,精确监测细胞内 H_2O_2 的动态变化,对于理解疾病的分子机制以及开发早期诊断与治疗策略具有重大意义。

在过氧化氢的检测技术中,荧光探针技术凭借其高灵敏度、高分辨率和非侵入性监测特性,在生物学研究中展现出显著优势^[4-5]。它不仅能够实时成像,而且在生物成像领域取得了突破性进展,为研究者提供了强大的工具^[6]。其中,2-(2'-羟基苯基)苯并噻唑(HBT)作为一种拥有激发态分子内质子转移(ESIPT)特性的荧光团,其大斯托克斯散射($>100\text{ nm}$)和良好的量子产率(40%~65%)使其成为理想的荧光探针基团^[7-8];同时,部分HBT衍生物还具备聚集诱导发射(AIE)特性,能够有效避免在水性介质中因聚集导致的荧光猝灭(ACQ),从而拓宽了其在激光染料、高能辐射探测器和生物荧光成像领域的应用范围。因此,基于HBT衍生物的良好荧光性能和生物活性,开发HBT类荧光探针具有良好的应用价值和可行性。

基于上述特性,本文以对硝基苯乙醛酸作为 H_2O_2 的特异性识别位点^[9-11],成功合成了一种基于HBT染料的新型荧光探针化合物1。通过对探针1进行全面的光学性能评估发现,该探针不仅展现出高选择性和明显的荧光信号增强能力(约20倍),而且也成功应用于活细胞中 H_2O_2 的生物成像分析。

2 实 验

2.1 材料与试剂

H_2O_2 (质量分数30%)来源于成都金山化学试

剂有限公司;*N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)、二氯甲烷、乙酸乙酯、石油醚、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠等试剂均为国药集团化学试剂有限公司的分析纯试剂;*N,N*-二异丙基乙胺(DIPEA)、4-硝基苯基乙醛酸、草酰氯、十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)等均为安耐吉试剂公司的分析纯试剂;实验用水为去离子水。4-硝基苯基乙醛酸为阿拉丁试剂公司的分析纯试剂。化合物3采用我们之前所报道的制备方法获得^[12]。

2.2 仪器与设备

AVANCE III HD 400M 型核磁共振波谱仪,德国布鲁克公司;TRACE 2000 型热电气质联用仪,美国 Thermo Quest 公司;LCQ-Advantage 型质谱分析仪,美国 Thermo Finnigan 公司;UV-2100 紫外-可见分光光度计,日本岛津公司;F-6500 荧光分光光度计,英国爱丁堡仪器公司。

2.3 探针制备

化合物2:在氮气保护和室温下,将4-硝基苯基乙醛酸(195 mg, 1.0 mmol)和二氯甲烷(10 mL)混合并搅拌2 min,先后加入草酰氯(0.26 mL, 3.0 mmol)和4滴*N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)。之后,将反应温度升至45 °C,并加热回流1 h;再将混合物冷却至室温,减压蒸发溶剂和过量的草酰氯,得到淡黄色油状液体状的产物2(195 mg, 91%产率),并直接用于下一步。

探针1:在氮气保护下,将化合物3(181 mg, 0.75 mmol)、*N,N*-二异丙基乙胺(DIPEA, 0.58 mL, 3.3 mmol)溶解在 CH_2Cl_2 (15 mL)中,然后将其在冰水浴下搅拌冷却。之后,滴加化合物2(195 mg, 0.913 mmol)的无水 CH_2Cl_2 溶液(3 mL);接着将反应液在室温下搅拌4 h。再将该反应混合物减压蒸馏浓缩,残余物通过硅胶柱色谱法(石油醚/二氯甲烷, $v/v=3/1$)纯化,得到白色固体状化合物1(231 mg, 74%产率)(图1)。 $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 8.52~8.42 (m, 4H), 8.12 (s, 1H), 8.08 (d, $J = 8.0\text{ Hz}$, 1H), 7.77 (d, $J = 8.0\text{ Hz}$,

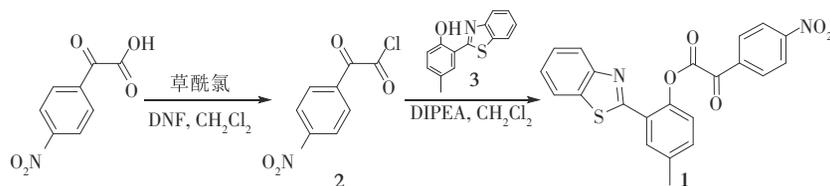


图1 探针化合物1的合成路线

Fig.1 Synthetic route of fluorescent probe 1

1H), 7.54~7.46(m, 3H), 7.45~7.40(m, 1H), 2.51(s, 3H)。¹³C NMR(100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 184.73, 163.47, 161.94, 152.39, 150.64, 145.61, 136.81, 134.47, 134.37, 132.76, 131.55, 130.04, 126.67, 125.69, 124.94, 124.03, 122.69, 122.06, 20.32; HRMS (APCI): calcd for C₂₂H₁₅N₂O₅S *m/z*: [M+H]⁺ 理论值 295.0132; 测定值 419.0698。

2.4 荧光探针 1 光谱性能测试

准确称量探针 1, 并用 DMF 溶解, 转移至 10 mL 容量瓶中, 定容后制得 1.0 mmol/L 探针母液。在光谱测试时, 准确移取 50 μL 上述探针母液至 10 mL 容量瓶中, 并用添加 CTAB(6 mmol/L) PBS 缓冲溶液(pH=7.4, 16 mmol/L)的溶液进行定容, 继而加入不同体积的过氧化氢溶液, 从而获得添加不同浓度过氧化氢浓度的 5 μmol/L 探针测试溶液。之后, 用紫外光度计与荧光光谱仪开展荧光探针的性能测试。在荧光光谱测试时, 以 λ=395 nm 为激发光波长, 扫描波长范围为 400~650 nm, 激发和发射光的狭缝宽度分别设置为 1.0 nm 和 2.5 nm。

2.5 细胞成像实验

将 HeLa 细胞在 DMEM 培养基中接种, 用 10% 胎牛血清(FBS, Invitrogen)、100 U/mL 青霉素和 100 U/mL 庆大霉素的混合物培养, 然后在 37 °C 下

在含有 95% 空气和 5% 二氧化碳的加湿气氛中生长细胞。依据之前的文献叙述^[13-15], 通过甲基噻唑四唑比色法(MTT)测试了探针 3 的细胞毒性作用。在成像之前, HeLa 细胞与探针 1(10.0 μmol/L)一起孵育 30 min, 并用 PBS 缓冲液洗涤三次; 然后加入 H₂O₂(0~200 μmol/L), 并孵育 60 min, 接着用 PBS 缓冲液洗涤。之后, 将细胞送至成像分析, 并通过 Olympus FV1000 共聚焦激光扫描显微镜进行成像分析(λ_{ex}=375 nm)。

3 结果与讨论

3.1 探针 1 对过氧化氢的紫外和荧光响应

如图 2 所示, 随着探针 1 测试液中过氧化氢浓度的逐渐增加, 探针溶液在 285 nm 和 395 nm 波长处的紫外吸收强度出现明显升高; 与此同时, 其 λ=484 nm 处的荧光发射光强度大幅增强, 量子产率 φ 从 0.002 变为 0.145, 并呈现出明显的“turn on”荧光响应变化。通过进一步分析其荧光光谱可知, λ=484 nm 处的荧光发射光强度值(I_{484 nm})与过氧化氢浓度(0~55 μmol/L)呈线性正相关, 其线性拟合系数为 0.990(图 3(a))。此外, 通过公式 $D=3\sigma/k$ 计算可知, 探针 1 对 H₂O₂ 浓度的最低检出限为 1.26 μmol/L。上述测试结果表明, 探针 1 可以实现对 H₂O₂ 的高灵敏定量检测。

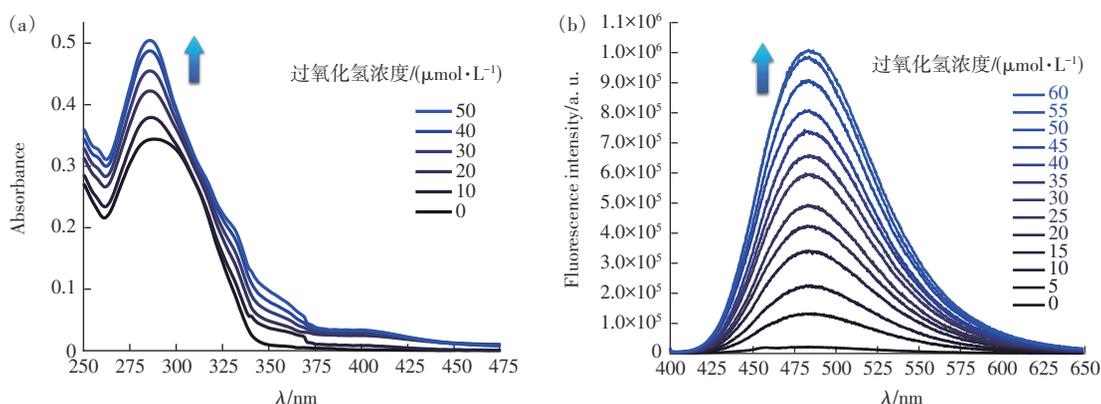


图 2 探针 1(5 μmol/L)与不同浓度 H₂O₂反应前后的紫外光谱(a)和荧光光谱(b)

Fig.2 The UV (a) and fluorescence (b) spectra of probe 1(5 μmol/L) before and after reaction with various concentrations of H₂O₂

为测试探针 1 对于 H₂O₂ 的响应速率, 我们记录了其荧光强度随时间变化的荧光曲线。由图 3(b) 可知, 在加入 H₂O₂ 后, 其发射波长在 484 nm 处的荧光强度(I_{484 nm})显著增强, 并且 25 min 内达到最大值。这表明探针 1 和 H₂O₂ 的反应能够在较短的时间内完成, 可以实现对 H₂O₂ 的快速分析检测。

3.2 探针 1 对过氧化氢的选择性

为考察探针 1 对 H₂O₂ 的特异性响应性能, 随即开展了探针对一系列常见分子和离子的选择性测试。这些分析物包括活性氧(O₂·、次氯酸)、活性氮(NO、NO₂⁻)、活性硫(Cys、HSO₃⁻、S₂O₃²⁻、S²⁻、SO₄²⁻)、金属阳离子(K⁺、Mg²⁺、Ca²⁺、Zn²⁺、Co²⁺、Fe²⁺)、

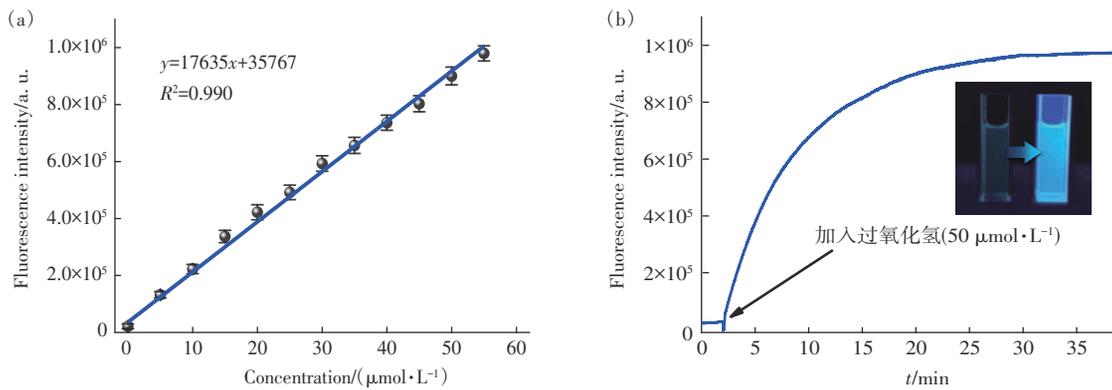


图3 探针1(5 $\mu\text{mol/L}$)的荧光强度($I_{484\text{ nm}}$)与 H_2O_2 浓度的线性关系(a)及在加入 H_2O_2 (50 $\mu\text{mol/L}$)后随时间变化曲线(b)
Fig.3 (a) The linear relationship plot of the fluorescence intensity ($I_{484\text{ nm}}$) of probe 1(5 $\mu\text{mol/L}$) versus the concentration of H_2O_2 . (b)The curve graph depicting the variation of fluorescence intensity over time after adding H_2O_2 (50 $\mu\text{mol/L}$)

负离子(F^- 、 Br^- 、 NO_3^- 、 AcO^- 、 HCO_3^-)和小分子(甘氨酸、谷氨酸、天门冬氨酸)。由图4可以看出,除 H_2O_2 以外,其他物质基本没有引起明显的荧光变化。该结果表明,探针1对 H_2O_2 具有较好的专一选择性。

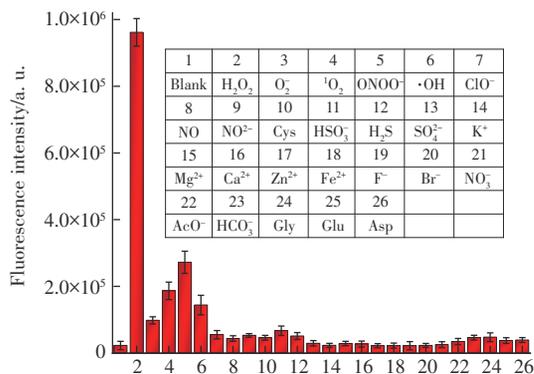


图4 不同检测对象对探针1的影响(添加量均为50 $\mu\text{mol/L}$)

Fig.4 Impact of various analytical targets on probe 1 (all added in a quantity of 50 $\mu\text{mol/L}$)

3.3 pH值对探针1的影响

监测了不同pH值环境下探针1的荧光响应效果(图5)。在pH为4.0~9.1的范围内,探针自身的荧光强度仅有微弱变化。在加入 H_2O_2 后,探针的荧光强度在pH=3~6之间时呈微弱上升趋势,当pH值为中性和弱碱性条件时,其荧光强度达到最大值。这可能是在该条件下,更有利于 H_2O_2 的亲核进攻和后续酯基的水解。上述结果表明,探针1很适合在中性和碱性条件下检测 H_2O_2 。

3.4 探针1对 H_2O_2 的识别机理

依据文献报道^[11]推测探针1与 H_2O_2 的识别机

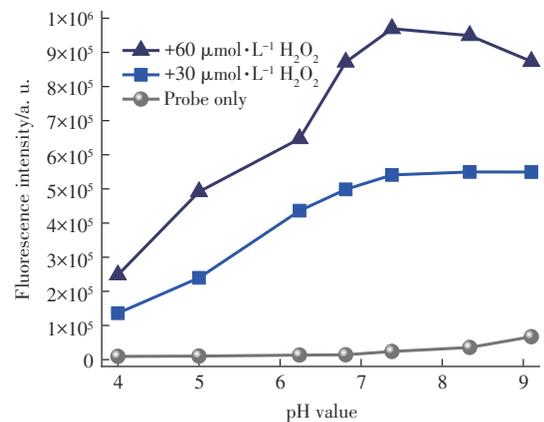


图5 pH值对探针1荧光强度的影响

理,如图6所示。由于4-硝基苯乙醛酸与荧光团HBT中的羟基结合,使其ESIPT过程被抑制而使其自身荧光猝灭。当加入 H_2O_2 后, α -酮酯基会被氧化,之后通过Baeyer-Villiger重排和水解反应,从而得到荧光团化合物3。

为进一步验证以上机制,对探针与 H_2O_2 反应后的溶液进行了高效液相色谱(HPLC)分析。由HPLC分析结果可知(图7),探针1的保留时间为4.23 min,而荧光化合物3的出峰时间为3.21 min。当探针1(10 $\mu\text{mol/L}$)与不同浓度 H_2O_2 反应后,均在保留时间为3.21 min处出现一个与荧光化合物3对应的新信号峰,并且该峰的积分面积随着 H_2O_2 浓度的增加而增大。以上结果证明,探针1能够与 H_2O_2 反应转化为荧光团化合物3。

3.5 探针1的生物成像分析

在生物成像测试之前,开展了不同浓度探针1的细胞毒性测试实验。从图8可以看出,在0~50 $\mu\text{mol/L}$ 探针1的环境下,HeLa细胞的存活率均高于85%。这表明,探针1具有较高的生物安全

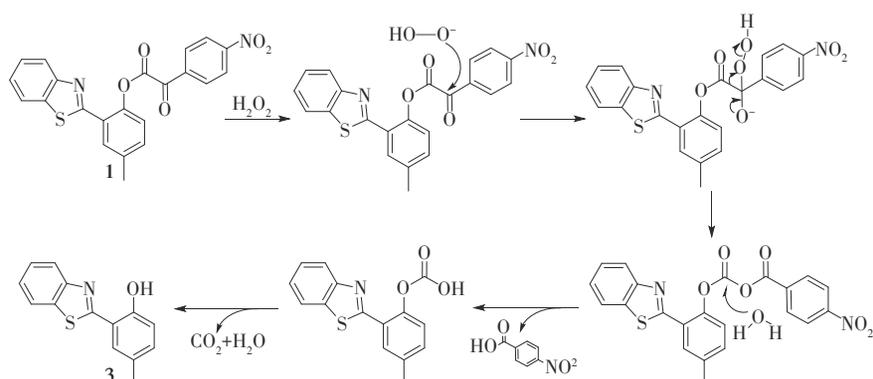


图 6 探针 1 对过氧化氢的响应机理推测图

Fig.6 Speculation on the response mechanism of probe 1 to H₂O₂

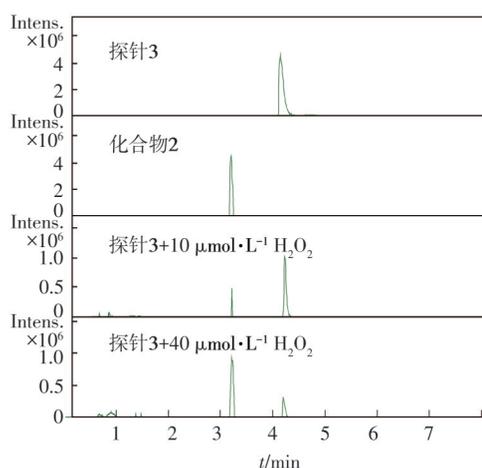


图 7 探针 1、化合物 3 以及探针 1 与不同浓度 H₂O₂ 反应后溶液的 HPLC 谱

Fig.7 HPLC spectra of probe 1, compound 3, and solutions of probe 1 after reacting with different concentrations of H₂O₂

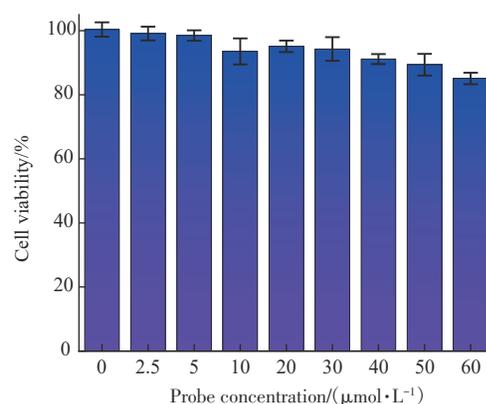


图 8 探针 1 在 HeLa 细胞中孵育 24 h 后的细胞存活率

Fig.8 Cell viability of probe 1 incubated in HeLa cells for 24 h

性,并适合于活细胞体内 H₂O₂ 的生物成像分析。
从细胞成像结果(图 9)来看,仅仅与探针 1 孵育后,HeLa 细胞几乎没有荧光;而加入 H₂O₂ 后,细胞中的蓝色荧光强度显著增强,并且其荧光强度

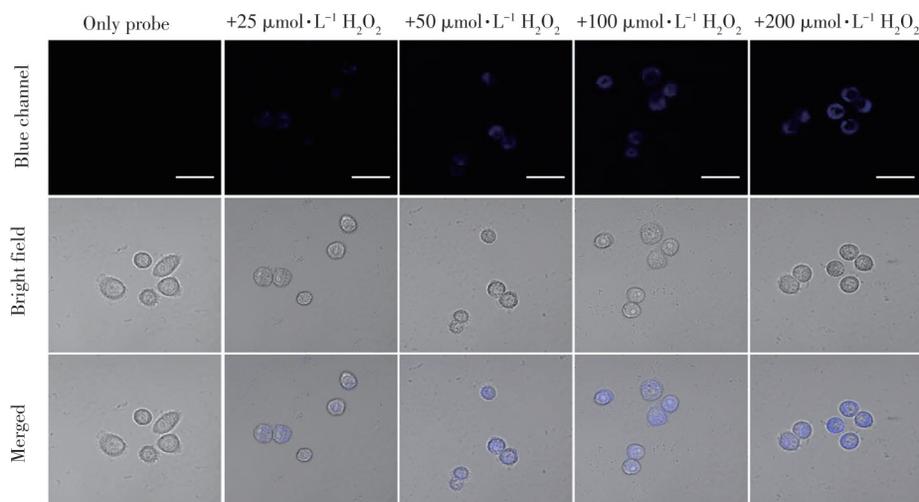


图 9 HeLa 细胞中的荧光显微图像(比例尺: 30 μmol/L)。活细胞用探针 1(10 μmol/L)预处理,然后用不同浓度的 H₂O₂ (0~200 μmol/L)孵育,并在蓝色通道(λ_{ex}=375 nm, λ_{em}=450~550 nm)中收集荧光信号

Fig.9 Fluorescence microscopic images of HeLa cells(Scale bar: 30 μmol/L). The living cells were pretreated with probe 1 (10 μmol/L) and then incubated with different concentrations of H₂O₂(0~200 μmol/L), and the images were collected in blue channel (λ_{ex} = 375 nm, λ_{em} = 450~550 nm)

随着 H₂O₂ 浓度的升高而增强。上述结果充分说明探针 1 具有良好的膜渗透性,并能够实现活细胞中 H₂O₂ 的生物成像分析。

4 结 论

本文成功合成了一种基于 HBT 荧光团的过氧化氢荧光探针,并对其展开了多项性能测试和应用研究。该探针具有合成简单、选择性高、低生物细胞毒性及生物相容性好等优势,可用于生物体

内细胞中 H₂O₂ 的检测。同时,通过 HPLC 分析,揭示了探针的识别机理与过氧化氢的氧化反应及 ESIPT 过程恢复有关。在细胞成像实验中,探针具有良好的膜渗透性和生物安全性,可用于生物体细胞内 H₂O₂ 的检测,具有较好的实际应用前景。

本文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.20240181>.

参 考 文 献:

- [1] LISMONT C, REVENCO I, FRANSEN M. Peroxisomal hydrogen peroxide metabolism and signaling in health and disease [J]. *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, 20(15): 3673.
- [2] PRAVDA J. Hydrogen peroxide and disease: towards a unified system of pathogenesis and therapeutics [J]. *Mol. Med.*, 2020, 26(1): 41.
- [3] LENNICKE C, RAHN J, LICHTENFELS R, *et al.* Hydrogen peroxide-production, fate and role in redox signaling of tumor cells [J]. *Cell Commun. Signal.*, 2015, 13: 39.
- [4] LI S R, XIAO Y S, CHEN C, *et al.* Recent progress in organic small-molecule fluorescent probe detection of hydrogen peroxide [J]. *ACS Omega*, 2022, 7(18): 15267-15274.
- [5] GIARETTA J E, DUAN H W, OVEISSI F, *et al.* Flexible sensors for hydrogen peroxide detection: a critical review [J]. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2022, 14(18): 20491-20505.
- [6] 王晓鹏, 李永东, 王建国. 单胺氧化酶荧光探针研究进展 [J]. *发光学报*, 2021, 42(7): 938-952.
WANG X P, LI Y D, WANG J G. Research progress of fluorescent probes for monoamine oxidases [J]. *Chin. J. Lumin.*, 2021, 42(7): 938-952. (in Chinese)
- [7] LU C X, XU J W, SONG Z, *et al.* Advancements in esipt probe research over the past three years based on different fluorophores [J]. *Dyes Pigments*, 2024, 224: 111994.
- [8] KAUR A, CHAUDHARY R P. Review on synthesis of 2-(2-hydroxyaryl) benzothiazoles (hbt) for excited-state intra-molecular proton transfer (esipt)-based detection of ions and biomolecules [J]. *Top. Curr. Chem.*, 2024, 382(3): 26.
- [9] HUANG X, LI Z P, LIU Z X, *et al.* A near-infrared fluorescent probe for endogenous hydrogen peroxide real-time imaging in living cells and zebrafish [J]. *Dyes Pigments*, 2019, 165: 518-523.
- [10] HE Y Q, MIAO L X, YU L, *et al.* A near-infrared fluorescent probe for detection of exogenous and endogenous hydrogen peroxide *in vivo* [J]. *Dyes Pigments*, 2019, 168: 160-165.
- [11] XIE X L, YANG X E, WU T H, *et al.* Rational design of an α -ketoamide-based near-infrared fluorescent probe specific for hydrogen peroxide in living systems [J]. *Anal. Chem.*, 2016, 88(16): 8019-8025.
- [12] SHI L, CHEN Q H, HONG H J, *et al.* Selective and fast-response fluorescent probes for hypochlorite and their application [J]. *Bull. Korean Chem. Soc.*, 2019, 40(7): 691-695.
- [13] YANG Y, QIU F Z, WANG Y Z, *et al.* A sensitive and selective off-on fluorescent probe for hclo in 100% aqueous solution and its applications in bioimaging [J]. *Sensors Actuators B Chem.*, 2018, 260: 832-840.
- [14] SHI L, YANG S, HONG H J, *et al.* A novel target and ph dual-activatable fluorescent probe for precisely detecting hypochlorite in lysosomes [J]. *Anal. Chim. Acta*, 2020, 1094: 122-129.
- [15] PENG Z J, SHI L, ZENG X Q, *et al.* Rational design of the ratiometric fluorescent probes for sulfur dioxide derivatives and the study on the sensing performance of cyano-containing groups [J]. *Dyes Pigments*, 2021, 186: 108972.



石磊(1985-),男,湖南湘潭人,博士,副教授,2014年于湖南大学获得博士学位,主要从事荧光探针的制备与应用研究。

E-mail: shileinaoh@163.com



龚盛昭(1970-),男,湖南永州人,博士,教授,2006年于华南理工大学获得博士学位,主要从事精细化工技术研究。

E-mail: 328415887@qq.com