

文章编号: 1000-7032(2024)12-2066-08

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

周金涛, 朱天翔, 尚主业*, 张志强, 孟庆涛*

(辽宁科技大学 化学工程学院, 辽宁 鞍山 114051)

摘要: 亚硫酸氢盐(HSO_3^-)作为一种重要的食品添加剂,在日常生活被广泛使用,但过量的使用和滥用会对生物和环境造成有害影响。同时, HSO_3^- 作为体内信号分子(SO_2)的衍生物,在正常生理活动中发挥着巨大的作用,但体内 HSO_3^- 的异常表达和过量摄入会导致一些疾病的发生。因此,对于体内和环境中 HSO_3^- 的特异性和敏感性检测和监测具有重要意义。为此本文选用N-乙基-咪唑作为电子供体基团,2-氧代-4-苯基-2,5-二氢-3-咪唑甲腈作为电子受体基团,通过羟醛缩合反应合成了具有D- π -A结构的近红外 HSO_3^- 荧光探针(CL)。探针CL识别 HSO_3^- 后其近红外荧光下降且波长发生蓝移。通过高分辨质谱(HR-MS)和理论计算验证了探针CL对 HSO_3^- 的亲核加成传感机制。探针CL具有近红外发射($\lambda_{\text{em}}=685\text{ nm}$)、较大的Stokes位移(195 nm)、良好的选择性以及高灵敏度(49 nmol/L)等优点。另外,探针CL已被制备成试纸,并与智能手机连用实现了水样中 HSO_3^- 的现场快速检测。最重要的是,该探针已成功应用于活鼠体内 HSO_3^- 的荧光成像。

关键词: 亚硫酸氢盐; 荧光探针; 咪唑衍生物; 环境水样; 活体成像

中图分类号: O482.31

文献标识码: A

DOI: 10.37188/CJL.20240228

Carbazole-based Near-infrared Bisulfite Fluorescent Probe and Its Applications in Water Sample and Bioimaging

ZHOU Jintao, ZHU Tianxiang, SHANG Zhuoye*, ZHANG Zhiqiang, MENG Qingtao*

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

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

Abstract: Bisulfite (HSO_3^-) as an important food additive, is widely used in daily life. But excessive use and abuse can cause harmful effects on organisms and the environment. Concurrently, HSO_3^- as a derivative of the signaling molecule (SO_2) in the body, plays a huge role in normal physiological activities. But the abnormal expression and excessive intake of HSO_3^- in the body can lead to a number of diseases. Therefore, it is of great significance to detect and monitor HSO_3^- *in vivo* and in the environment with the specificity and sensitivity. Herein, a near-infrared HSO_3^- fluorescent probe (CL) with D- π -A structure was synthesized by condensation reaction using N-ethylcarbazole as electron donor group and 2-oxo-4-phenyl-2,5-dihydro-3-furanonitrile as electron acceptor group. The near-infrared fluorescence was declined and the wavelength was blue-shifted after the probe CL recognizes HSO_3^- . The nucleophilic addition sensing mechanism of probe CL to HSO_3^- was verified by high resolution mass spectrometry (HR-MS) and theoretical calculation. The probe CL has the advantages of near-infrared emission ($\lambda_{\text{em}}=685\text{ nm}$), large Stokes shift (195 nm), high selectivity and sensitivity (49 nmol/L). In addition, probe CL has been prepared into a test paper and the on-site and rapid detection of HSO_3^- in water samples is realized by connection with smartphones. Most importantly, the probe has been successfully applied to fluorescence imaging of HSO_3^- in living mice.

Key words: bisulfite; near-infrared fluorescent probe; carbazole derivative; environmental water samples; bioimaging

收稿日期: 2024-09-25; 修订日期: 2024-10-11

基金项目: 辽宁科技大学省级重点实验室开放课题基金(2024KFKT-10)

Supported by Open Fund Project of Key Laboratory of Functional Materials in Universities of Liaoning Province (2024KFKT-10)

1 引言

亚硫酸氢盐(HSO_3^-)在染料、造纸、制革、化学合成等工业领域中被广泛应用。它不仅作为塔夫绸的漂白剂和还原剂,而且还是重要的医药原料、食品防腐剂、抗氧化剂和电镀添加剂^[1]。然而, HSO_3^- 含量过高会对环境安全和人体健康造成潜在危害^[2-3]。例如,暴露于空气中的 HSO_3^- 会引起皮肤和角膜损伤,饮用水中含有过量的 HSO_3^- 也会引起恶心、腹痛、腹泻等疾病。因此,开发一种便捷可靠的 HSO_3^- 检测方法对于人类健康和环境安全具有重要意义^[4-5]。

近年来,已经报道了多种用于检测 HSO_3^- 的方法,例如滴定法、光谱化学法、表面增强拉曼光谱法、电化学法、色谱法等^[6-8]。但是,这些传统的检测方法具有一定的局限性,例如检测时需要制备特定的试剂做介质;测试样品时需要进行预处理;仪器操作复杂且检测时间长^[8-10]。因此,需要开发一种可用于 HSO_3^- 的便捷高效的现场检测技术^[11-12]。荧光分子探针技术是一种具有高灵敏度的专一选择性检测手段^[13-16]。然而,目前开发的大部分 HSO_3^- 荧光探针的发射波长较短($<650\text{ nm}$),这导致它们在生物组织成像中存在局限性^[17-18]。另外,有相当一部分荧光探针在自然光条件下颜色变化不够明显,无法通过“裸眼”对 HSO_3^- 进行现场检测^[18-20]。因此,设计开发一种专一性强、稳定好、生物组织穿透力强的荧光探针具有重要意义^[20-21]。

本文选用N-乙基-咪唑作为电子供体基团,以2-氧代-4-苯基-2,5-二氢-3-咪唑甲腈作为电子受体基团,通过羟醛缩合反应构建了探针CL。探针CL的不饱和 $\text{C}=\text{C}$ 双键能够与 HSO_3^- 发生迈克尔加成反应导致其吸收和发射光谱发生显著蓝移。探针CL具有较高的选择性、良好的稳定性、较强的抗干扰能力以及在广泛的pH下可靠等优势。另外,探针CL的发射波长较长(685 nm),具有较强生物组织穿透力,可用于体内 HSO_3^- 的可视化成像。更重要的是,探针CL对 HSO_3^- 的响应可以通过“裸眼”进行检测。另外,通过探针基试纸与智能手机联用实现了水样中 HSO_3^- 的现场快速检测。

2 实验

2.1 主要仪器与试剂

实验仪器:AVANCE 400 MHz型核磁共振波谱仪(瑞士BRUKER公司);6530 Q-TOFLC/MC型液相质谱联用仪(安捷伦科技公司);Lambda-900

型紫外分光光度计(美国P. E. 仪器公司);FS5型爱丁堡荧光光谱仪(英国爱丁堡公司);Ami小动物活体成像系统(Spectral Instruments Imaging)。

主要试剂:N-乙基咪唑-3-甲醛(山东裕康化工有限公司)、2-氧代-4-苯基-2,5-二氢-3-咪唑甲腈(山东裕康化工有限公司),其他所用试剂均为分析纯,测试及配制溶液所需水均为去离子水。

2.2 探针的合成与表征

将 0.223 g (1 mmol) N-乙基咪唑-3-甲醛与 0.185 g (1 mmol) 2-氧亚基-4-苯基-2,5-二氢咪唑-3-甲腈加入到 50 mL 圆底烧瓶中,然后,加入 10 mL 乙醇与6滴哌啶,加热回流一夜(合成路线如图1(a)所示)。反应结束后进行冷却,将析出的固体抽滤出来并用乙醇洗涤,得红色固体产物CL,产率为35%。HR-MS: m/z , $[\text{CL}+\text{H}]^+$, 计算值391.143 9, 检测值390.144 0。 $^1\text{H NMR}$ (400 MHz , $\text{DMSO}-d_6$) δ 8.70 (s, 1H), 8.15 (t, $J = 8.5\text{ Hz}$, 2H), 7.82 ~ 7.76 (m, 3H), 7.76 ~ 7.66 (m, 4H), 7.53 (t, $J = 7.7\text{ Hz}$, 1H), 7.29 (t, $J = 7.5\text{ Hz}$, 1H), 6.90 (s, 1H), 4.50 (q, $J = 7.1\text{ Hz}$, 2H), 1.35 (t, $J = 7.1\text{ Hz}$, 3H)。 $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz , $\text{DMSO}-d_6$) δ 165.1, 163.9, 144.0, 141.6, 140.7, 132.5, 130.0, 129.9, 129.7, 128.1, 127.2, 126.4, 123.8, 123.4, 122.6, 121.1, 120.7, 113.3, 110.7, 110.4, 96.7, 37.9, 14.3。

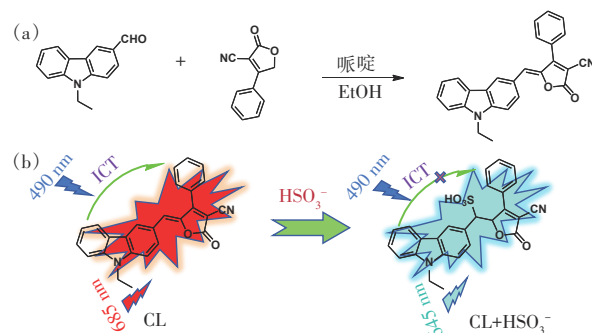


图1 (a)探针CL的合成路线;(b)探针CL对 HSO_3^- 的传感机制

Fig. 1 (a) The synthetic route of probe CL. (b) Sensing mechanism of probe CL to HSO_3^-

2.3 溶液配制及光谱分析测试

溶液配制:将 19.6 mg 探针CL溶解于二甲基亚砜(DMSO)中,配制成 $5\times 10^{-4}\text{ mol/L}$ 的浓溶液(避光保存,备用)。测试时取出 2.0 mL 浓溶液于 100 mL 容量瓶中,用 $\text{DMSO}:\text{PBS}=3:7$ 的溶液稀释到 $1\times 10^{-5}\text{ mol/L}$ 得到测试溶液。 HSO_3^- 及其他干扰离子(Br^- , HClO , Cl^- , AcO^- , S^{2-} , F^- , NO_2^- , I^- , $^1\text{O}_2$, NO_3^- , ONOO^- , OH^- , PO_4^{3-} , $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$, HCO_3^- , SO_4^{2-} ,

H_2PO_4^- , HSO_4^- , $\cdot\text{OH}$, H_2O_2 , Hcy, Cys, GSH, SCN^- , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, CN^-)均使用去离子水配制成 $2 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$ 的离子溶液。

紫外-可见光谱测定:分别向比色皿中加入 3.0 mL 参比液和探针溶液,对探针 CL 溶液的紫外-可见吸收光谱进行测定。紫外-可见吸收光谱的扫描范围设为 300 ~ 575 nm。

荧光光谱测定:向荧光比色皿中加入 3.0 mL 探针 CL 溶液,测定其荧光光谱。荧光光谱的扫描范围设为 500 ~ 900 nm,狭缝宽度设为 15.0 nm/7.0 nm,激发波长设为 490 nm。

2.4 环境水样中 HSO_3^- 的检测

以 Whatman 滤纸作为试纸载体,用 20 $\mu\text{mol/L}$ 的探针 CL 的二氯甲烷(C_2Cl_2)溶液浸泡 2 h,然后自然干燥,得到探针 CL 基试纸。为了现场快速评估水样中的 HSO_3^- 水平,将探针 CL 基试纸浸泡在含有不同浓度 HSO_3^- (0.05 mmol/L、0.1 mmol/L、0.5 mmol/L、1 mmol/L) 的实际水样中 30 min;然后,将浸泡在实际水样中的探针 CL 基试纸自然干

燥,并采用智能手机对其试纸颜色进行成像。

2.5 生物成像分析

以 6~8 周龄裸鼠作为动物模型进行体内荧光成像研究,在实验期间采用异氟烷气流麻醉小鼠。首先在裸鼠右腿处皮下注射 100 μL 的探针 CL (10 $\mu\text{mol/L}$) 溶液,然后再将 10 μL 的 HSO_3^- (1.5 mmol/L) 溶液原位注射到同一感兴趣区域,并采用小动物活体成像 Ami 系统每 2 min 对其进行荧光成像。

3 结果与讨论

3.1 探针 CL 对 HSO_3^- 的紫外-可见光谱响应

首先,在 DMSO/PBS (3:7, v/v , pH=7.4, 20 mmol/L) 的缓冲体系中,考查了不同浓度 HSO_3^- 对探针 CL 紫外-可见光谱响应。结果如图 2(a) 所示,随着 HSO_3^- 浓度的增加,探针 CL 在 490 nm 和 350 nm 处的吸收峰逐渐降低。当 HSO_3^- 的浓度达到 100 $\mu\text{mol/L}$ 时,探针 CL 的吸收光谱不再发生变化达到滴定终点(如图 2(a) 中插图 A),同时探针 CL 的溶液颜色由粉色变为无色(如图 2(a) 中插

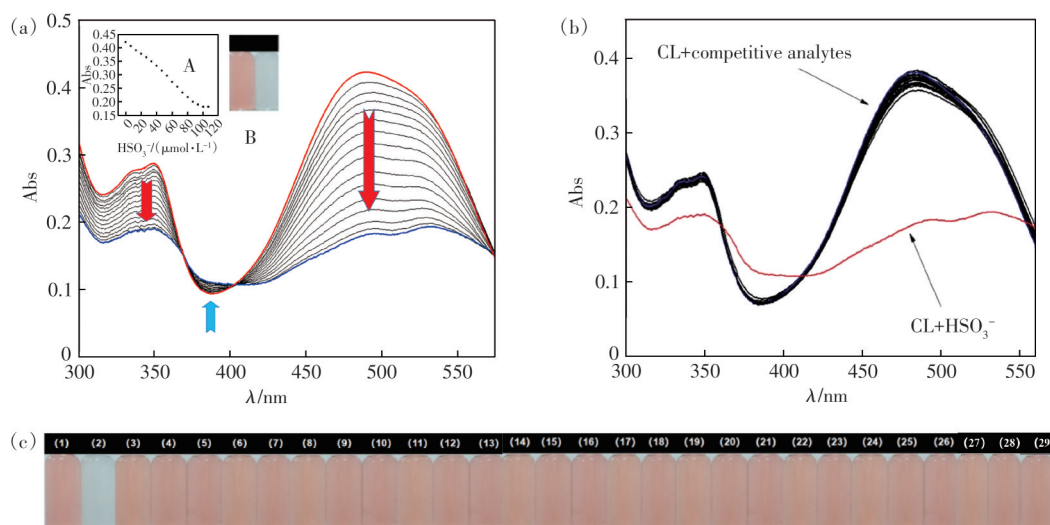


图 2 (a)在探针 CL (10 $\mu\text{mol/L}$) 溶液中逐渐加入 HSO_3^- (0 ~ 100 $\mu\text{mol/L}$) 的紫外-可见光谱(插图 A:探针 CL 在 490 nm 处的吸光度随 HSO_3^- 浓度变化曲线,插图 B:探针 CL 与 HSO_3^- 反应前后溶液颜色);(b)在探针 CL (10 $\mu\text{mol/L}$) 溶液中分别加入各种分析物(100 $\mu\text{mol/L}$) 的紫外-可见光谱;(c)在探针 CL (10 $\mu\text{mol/L}$) 溶液中分别加入各种分析物(100 $\mu\text{mol/L}$) 比色图(1. Blank, 2. HSO_3^- , 3. HClO , 4. Cl^- , 5. AcO^- , 6. S^{2-} , 7. F^- , 8. NO_2^- , 9. I^- , 10. O_2 , 11. NO_3^- , 12. ONOO^- , 13. OH^- , 14. PO_4^{3-} , 15. $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$, 16. CO_3^{2-} , 17. Br^- , 18. HCO_3^- , 19. SO_4^{2-} , 20. H_2PO_4^- , 21. HSO_4^- , 22. $\cdot\text{OH}$, 23. H_2O_2 , 24. Hcy, 25. Cys, 26. GSH, 27. SCN^- , 28. $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, 29. CN^-)

Fig. 2 (a) UV-Vis spectra of gradually adding HSO_3^- (0~100 $\mu\text{mol/L}$) to probe CL (10 $\mu\text{mol/L}$) (Inset A: titration curve of the absorbance of probe CL at 490 nm versus HSO_3^- concentration, inset B: solution color before and after the reaction of probe CL with HSO_3^-). (b) UV-Vis spectra of probe CL (10 $\mu\text{mol/L}$) added with various analytes (100 $\mu\text{mol/L}$). (c) The colorimetric graph of probe CL (10 $\mu\text{mol/L}$) solution added with various analytes (100 $\mu\text{mol/L}$) (1. Blank, 2. HSO_3^- , 3. HClO , 4. Cl^- , 5. AcO^- , 6. S^{2-} , 7. F^- , 8. NO_2^- , 9. I^- , 10. O_2 , 11. NO_3^- , 12. ONOO^- , 13. OH^- , 14. PO_4^{3-} , 15. $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$, 16. CO_3^{2-} , 17. Br^- , 18. HCO_3^- , 19. SO_4^{2-} , 20. H_2PO_4^- , 21. HSO_4^- , 22. $\cdot\text{OH}$, 23. H_2O_2 , 24. Hcy, 25. Cys, 26. GSH, 27. SCN^- , 28. $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, 29. CN^-)

图 B), 因此探针 **CL** 对 HSO_3^- 的响应具有良好的“裸眼”识别效果。

接下来, 利用紫外-可见光谱考查了探针 **CL** 对 HSO_3^- 的选择性。如图 2(b) 所示, 向探针 **CL** 中分别加入各种分析物 (100 $\mu\text{mol/L}$) (Br^- , HClO , Cl^- , AcO^- , S^{2-} , F^- , NO_2^- , I^- , $^1\text{O}_2$, NO_3^- , ONOO^- , OH^- , PO_4^{3-} , $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$, HCO_3^- , SO_4^{2-} , H_2PO_4^- , HSO_4^- , $\cdot\text{OH}$, H_2O_2 , Hcy , Cys , GSH , SCN^- , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, CN^-) 后, 只有加入 HSO_3^- 才会使得探针 **CL** 在 490 nm 和 350 nm 处的吸收峰降低, 而加入其他分析物不会对探针 **CL** 的吸收峰产生影响。此外, 只有在加入 HSO_3^- 时, 探针 **CL** 溶液的颜色才会由粉色变为无色 (图 2(c)), 上述结果表明探针 **CL** 对 HSO_3^- 具有较高

的选择性。

3.2 探针 **CL** 对 HSO_3^- 的荧光光谱响应

良好的光学稳定性是荧光探针应用的前提。因此在 DMSO/PBS (3:7, v/v , $\text{pH}=7.4$, 20 mmol/L) 的缓冲体系中研究了探针 **CL** 的光学稳定性, 如图 S3 所示。探针 **CL** 在 685 nm 处的荧光强度在 7 d 内基本保持不变, 说明探针 **CL** 具有优异的光学稳定性, 这也为后续探针的性能测试和应用提供了基础。

接下来在 DMSO/PBS (3:7, v/v , $\text{pH}=7.4$, 20 mmol/L) 的缓冲体系中, 考查了探针 **CL** 对 HSO_3^- 的荧光光谱响应。如图 3(a) 和图 S4 所示, 探针 **CL** 在 685 nm 处具有强的荧光发射 (荧光量子产率 $\Phi_1 = 0.6131$, 荧光寿命 $\tau = 0.72$ ns), 随着探针

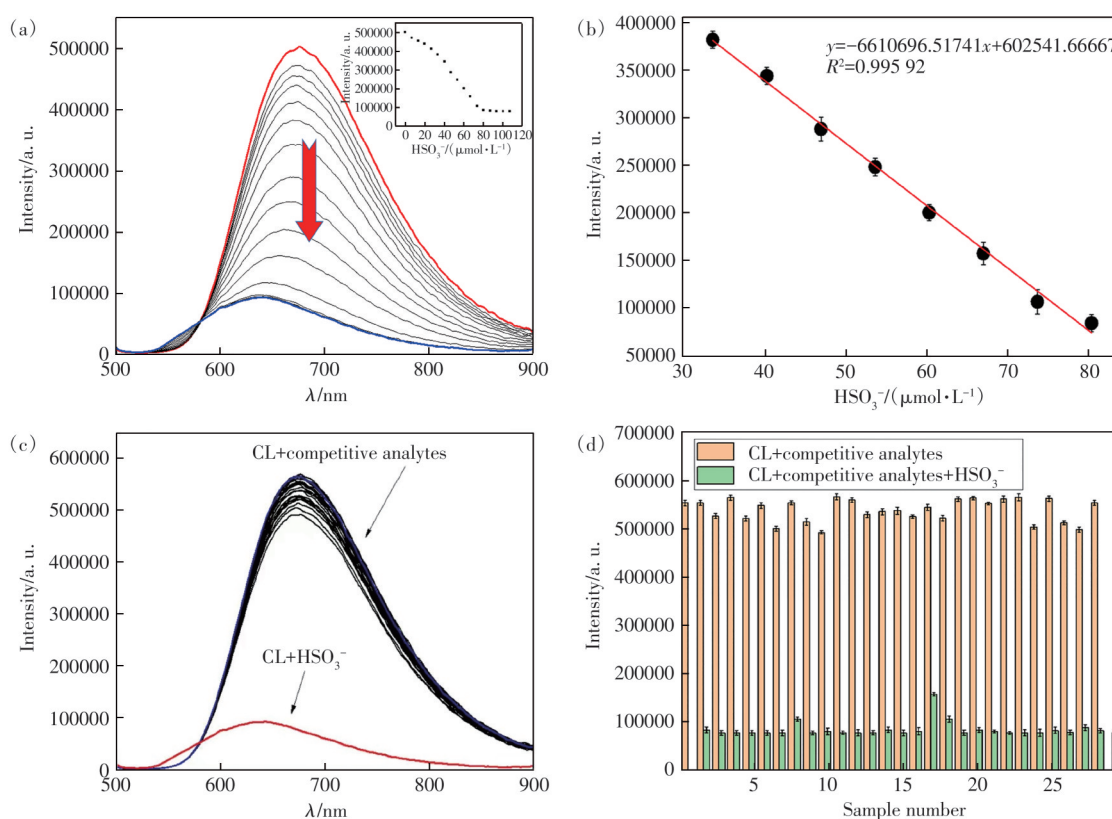


图 3 (a) 添加了不同浓度的 HSO_3^- (0 ~ 100 $\mu\text{mol/L}$) 的探针 **CL** (10 $\mu\text{mol/L}$) 的荧光光谱 (插图: 探针 **CL** 在 685 nm 处的荧光强度与 HSO_3^- 浓度变化曲线); (b) 探针 **CL** (10 $\mu\text{mol/L}$) 的荧光强度随 HSO_3^- 浓度变化曲线; (c) 分别添加了各种分析物 (100 $\mu\text{mol/L}$) 的探针 **CL** (10 $\mu\text{mol/L}$) 荧光光谱; (d) 探针 **CL** 在不同干扰物存在下的 HSO_3^- 荧光响应, 1. Blank, 2. CN^- , 3. HClO , 4. Cl^- , 5. AcO^- , 6. S^{2-} , 7. F^- , 8. NO_2^- , 9. I^- , 10. $^1\text{O}_2$, 11. NO_3^- , 12. ONOO^- , 13. OH^- , 14. PO_4^{3-} , 15. $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$, 16. CO_3^{2-} , 17. Br^- , 18. HCO_3^- , 19. SO_4^{2-} , 20. H_2PO_4^- , 21. HSO_4^- , 22. $\cdot\text{OH}$, 23. H_2O_2 , 24. Hcy , 25. Cys , 26. GSH , 27. SCN^- , 28. $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, 29. HSO_3^-

Fig. 3 (a) Fluorescence spectra of probe **CL** (10 $\mu\text{mol/L}$) added with different concentrations of HSO_3^- (0–100 $\mu\text{mol/L}$) (Inset: Curcurve of fluorescence intensity of probe **CL** (10 $\mu\text{mol/L}$) at 685 nm versus HSO_3^- concentration). (b) Curcurve of fluorescence intensity of probe **CL** (10 $\mu\text{mol/L}$) with HSO_3^- concentration. (c) Fluorescence spectra of probe **CL** (10 $\mu\text{mol/L}$) added with various analytes (100 $\mu\text{mol/L}$). (d) Fluorescence response of probe **CL** on HSO_3^- in the presence of different interfering substances, 1. Blank, 2. CN^- , 3. HClO , 4. Cl^- , 5. AcO^- , 6. S^{2-} , 7. F^- , 8. NO_2^- , 9. I^- , 10. $^1\text{O}_2$, 11. NO_3^- , 12. ONOO^- , 13. OH^- , 14. PO_4^{3-} , 15. $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$, 16. CO_3^{2-} , 17. Br^- , 18. HCO_3^- , 19. SO_4^{2-} , 20. H_2PO_4^- , 21. HSO_4^- , 22. $\cdot\text{OH}$, 23. H_2O_2 , 24. Hcy , 25. Cys , 26. GSH , 27. SCN^- , 28. $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, 29. HSO_3^-

CL 溶液中 HSO_3^- 的浓度不断增加, 探针 CL 在 685 nm 处的荧光强度不断降低并发生小幅度的蓝移。当 HSO_3^- 浓度增加到 100 $\mu\text{mol/L}$ 时, 探针 CL 在 685 nm 处的荧光强度最低 (荧光寿命 $\tau = 0.84$ ns), 达到滴定终点 (图 3(a) 中插图 A)。同时, 探针 CL 溶液在 685 nm 处的荧光强度和 HSO_3^- 浓度 (30 ~ 80 $\mu\text{mol/L}$) 之间具有良好的线性关系 ($R^2 = 0.9959$) (图 3(b)), 由 $D = 3\sigma/k$ (检测限计算公式)^[22] 计算得到探针 CL 的检测限为 0.049 $\mu\text{mol/L}$ 。结果表明, 探针 CL 对 HSO_3^- 的识别具有较高的灵敏度。

随后, 利用荧光光谱考查了 CL 对 HSO_3^- 的选择性, 如图 3(c) 所示。向探针 CL 溶液中加入其他分析物 (Br^- , HClO , Cl^- , AcO^- , S^{2-} , F^- , NO_2^- , I^- , $^1\text{O}_2$, NO_3^- , ONOO^- , OH^- , PO_4^{3-} , $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$, HCO_3^- , SO_4^{2-} , H_2PO_4^- , HSO_4^- , $\cdot\text{OH}$, H_2O_2 , Hcy , Cys , GSH , SCN^- , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, CN^-) 和 HSO_3^- 之后, 只有 HSO_3^- 的加入才会使得探针 CL 在 685 nm 处的荧光强度明显下降。接下来, 又探究了潜在干扰物对探针 CL 识别 HSO_3^- 的干扰。如图 3(d) 所示, 相对于探针 CL 溶液 (图中 1 号橙色柱), 将干扰物加入探针 CL 溶液后 (图中 2 ~ 28 号橙色柱), 探针 CL 的荧光发射强度没有发生明显变化。而将 100 $\mu\text{mol/L}$ HSO_3^- 加入到与干扰物共存的探针 CL 溶液中后, 荧光强度发生明显减弱 (图中 2 ~ 28 号绿色柱), 并且荧光强度的变化与只加入 100 $\mu\text{mol/L}$ HSO_3^- 的基本一致 (图中 26 号绿色柱)。因此, 探针 CL 对 HSO_3^- 的识别不仅具有很强的特异性还具有良好的抗干扰性, 说明该探针能够在复杂的环境中识别 HSO_3^- 。

在 DMSO/PBS (3:7, v/v , 20 mmol/L) 的缓冲体系中, 继续考查了不同 pH 对探针 CL 响应 HSO_3^- 的影响。如图 S5 所示, 在 3.0 ~ 11.5 的 pH 范围内, 探针 CL 的荧光发射强度相对稳定。然而, 当 HSO_3^- 加入到探针 CL 溶液后, 在 pH=6.5 ~ 11.5 范围内, 探针 CL 在 685 nm 处的荧光强度显著减弱, 表明探针 CL 能够在 pH=6.5 ~ 11.5 范围内检测 HSO_3^- , 具有较为广泛的 pH 适用范围。

接下来, 继续探究了探针 CL 对 HSO_3^- 的响应时间。如图 S6 所示, 探针在 200 s 内具有强的荧光发射。然而, 将 100 $\mu\text{mol/L}$ HSO_3^- 加入到探针 CL 中后, 在 685 nm 处的荧光强度在 60 s 内降到最低并达到平衡, 说明探针 CL 对 HSO_3^- 具有较快的响应速度。

3.3 探针 CL 对 HSO_3^- 响应机理研究

首先通过高分辨质谱 (HR-MS) 探究了探针 CL 对 HSO_3^- 的响应机理, 结果如图 S7 所示, 探针 CL 在 $m/z = 391.1439$ 处显示出了明显的分子离子峰 ($[\text{CL}+\text{H}]^+$; 计算 $m/z = 391.1439$)。然而, 向探针 CL 中加入 HSO_3^- 后, 在 $m/z = 471.1010$ 处出现了新的离子峰 (图 S8), 该峰与迈克尔加成产物的离子峰 $[\text{CL}-\text{SO}_3-\text{H}]^+$ (计算结果 $m/z = 471.11$) 相一致, 该峰的形成可能是由于探针 CL 的不饱和 $\text{C}=\text{C}$ 双键与 HSO_3^- 发生迈克尔加成反应所致。同时, 该反应能够破坏探针 CL 的共轭结构从而抑制其 ICT 效应, 导致探针 CL 的荧光减弱并发生小幅度的蓝移。另外, 通过 ^1H NMR 进一步研究了探针 CL 对 HSO_3^- 的响应机理。如图 S9 所示, 向探针 CL 溶液中加入 HSO_3^- 之后, 在 $\delta = 6.90$ 处的 $\text{C}=\text{C}$ 双键上的 H 信号峰消失, 同时在 $\delta = 2.24$ 和 $\delta = 4.06$ 处产生了 $\text{C}=\text{C}$ 双键被加成后的 H 信号峰。因此, 通过 HR-MS 和 ^1H NMR 可推测探针 CL 与 HSO_3^- 的识别机制是如图 1(b) 所示的亲核加成传感机制。

为了深入了解探针 CL 和 HSO_3^- 之间的相互作用, 采用高斯 16 程序进行理论计算, 对探针 CL 和探针 $\text{CL}+\text{HSO}_3^-$ 的几何图形进行 DFT 优化, 并计算了其 LUMO 和 HOMO 的电子云分布。如图 4 所示, 当加入 HSO_3^- 后, 探针分子结构发生扭曲, 导致分子内部的共轭体系被打破, 从而引起吸收和发射光谱的显著变化。在探针 CL 结构中, 大部分 LUMO 电子云主要分布在呋喃环和苯环上, 少量分布在咪唑单元上, 而 HOMO 电子云恰好相反, 大部分分布在咪唑单元上, 少量分布在呋喃环上。当探针 CL 与 HSO_3^- 发生反应后, $\text{CL}+\text{HSO}_3^-$ 的 LUMO 轨道集中分布在呋喃环与苯环上, HOMO 全部分布在咪唑单元, 表明探针的 ICT 效应被破坏。另外, 探针 CL 的 HOMO-HUMO 能隙 (3.05 eV) 小于 $\text{CL}+\text{HSO}_3^-$ 的 (3.44 eV), 这与探针 CL 识别 HSO_3^- 发生荧光蓝移现象相一致, 因此 DFT 计算有力地证实了探针 CL 对 HSO_3^- 的响应机制。另外, 通过 TD-DFT 进一步计算了探针 CL 及与 HSO_3^- 识别产物的最大吸收和发射波长, 计算结果显示探针 CL 在 492.85 nm 处有明显的吸收峰, 在 584.82 nm 处有明显的荧光发射 (振子强度 $f = 0.6458$)。然而, 与 HSO_3^- 反应之后, 识别产物在 269.57 nm 处有明显的吸收峰, 在 601.45 nm 处

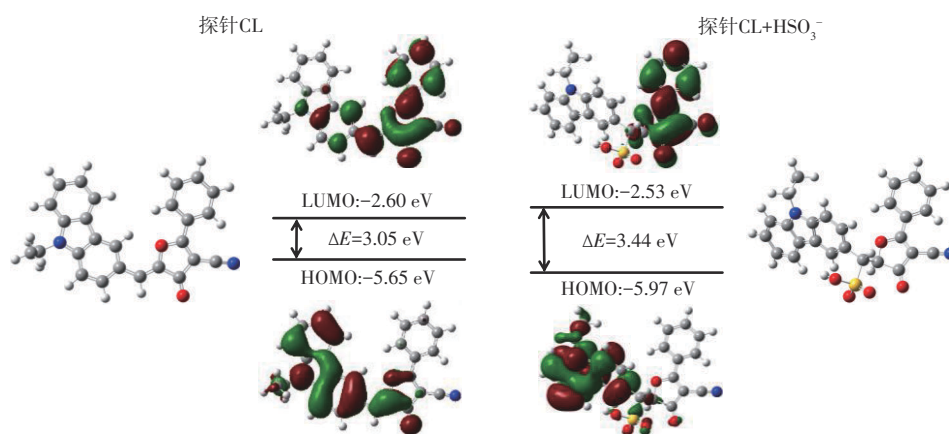


图4 分子最优构像及 LUMO 和 HOMO 分布

Fig. 4 Molecular optimal conformation and the distribution of LUMO and HOMO

无荧光发射(振子强度 $f=0.0094$)。上述理论计算结果与实验现象相一致,因此 TD-DFT 计算也进一步证明了探针 CL 对 HSO_3^- 的亲核加成传感机制。

3.4 环境水样中 HSO_3^- 的检测

基于探针 CL 与 HSO_3^- 相互作用所产生的明显的颜色变化可实现探针 CL 对 HSO_3^- “裸眼”识别。因此,选用 Whatman 滤纸作为试纸载体制备

了探针 CL 基试纸。将探针 CL 基试纸浸泡在含有不同浓度 HSO_3^- (0.05, 0.1, 0.5, 1 mmol/L) 的实际水样中 30 min 后,发现随着水样中 HSO_3^- 浓度的升高,探针 CL 基试纸的颜色发生了明显的褪色,由橘黄色逐渐转变为淡黄色(图 5(a)),表明探针 CL 基试纸可用于实际水样中 HSO_3^- 的半定量检测。

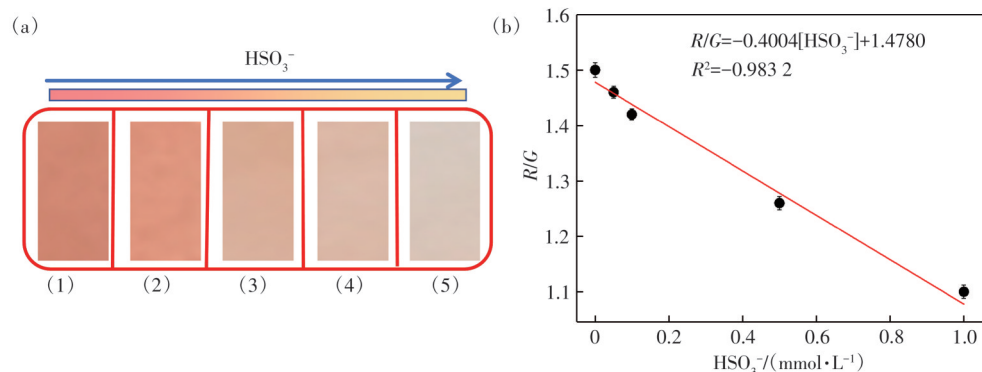


图5 (a)探针 CL 基试纸对不同浓度 HSO_3^- (1: 0 mmol/L, 2: 0.05 mmol/L, 3: 0.1 mmol/L, 4: 0.5 mmol/L, 5: 1 mmol/L) 的颜色响应; (b) 探针 CL 基试纸的 R/G 值与 HSO_3^- 浓度的线性曲线

Fig. 5 (a) Color response of probe CL-based test paper to different concentrations of HSO_3^- (1: 0 mmol/L, 2: 0.05 mmol/L, 3: 0.1 mmol/L, 4: 0.5 mmol/L, 5: 1 mmol/L). (b) Linear curves of R/G values for probe CL-based test paper versus HSO_3^- concentration

接下来,利用智能手机(HONOR 9X 6G+64G)上的颜色识别器 APP,将探针 CL 基试纸的颜色进行数字化以准确检测水样中的 HSO_3^- 水平。在自然光下,发现探针基试纸的 R/G 值随着 HSO_3^- 浓度的增加而逐渐降低,并且探针 CL 基试纸 R/G 值与 HSO_3^- 浓度之间在 0 ~ 1 mmol/L 范围内呈良好的线性关系 ($R^2 = 0.9832$) (图 5(b)),说明使用探针 CL 基试纸与智能手机联用可以准确、便捷地现场检测实际水样中的 HSO_3^- 水平。

3.5 体内 HSO_3^- 的荧光成像

在进行小鼠体内 HSO_3^- 的荧光成像之前,首先通过 MTT 法对探针 CL 的细胞毒性进行了检测,发现即使使用 30 $\mu\text{mol/L}$ 探针 CL 溶液孵育 HeLa 细胞,细胞的成活率仍保持在 86.5% (图 S10),表明探针 CL 具有较低的细胞毒性。接下来,选择裸鼠作为动物模型进行体内荧光成像研究。在裸鼠右腿处皮下注射 100 μL 的探针 CL (10 $\mu\text{mol/L}$) 溶液,再将 10 μL HSO_3^- (1.5 mmol/L)

原位注射到裸鼠右腿处。由图 6 可以看出,裸鼠自身无荧光(a);在裸鼠右腿处注入探针 CL 溶液后,注射区域出现了明显的荧光信号(b);再进一步原位注射 10 μL HSO_3^- (1.5 mmol/L)

后,注射区域荧光信号的强度随时间逐渐减弱(c~g)并于 12 min 后达到最弱(h)。结果表明,探针 CL 能够成像裸鼠体内的外源性 HSO_3^- 。

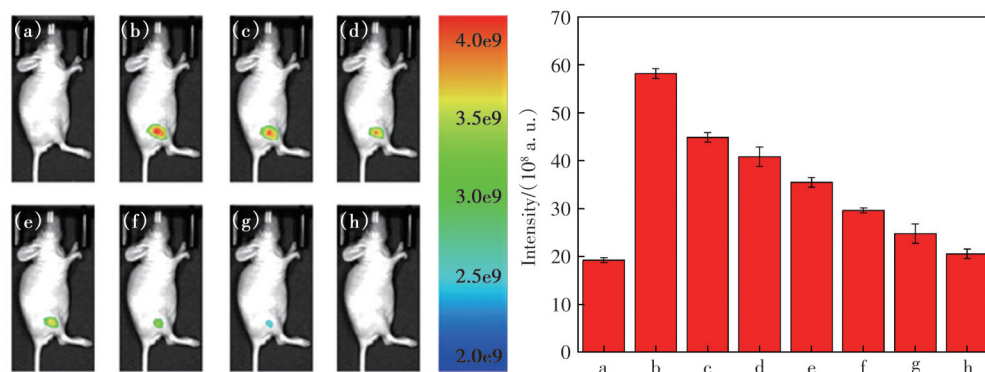


图 6 裸鼠体内外源性 HSO_3^- 的荧光成像。(a)裸鼠,(b)CL(10 $\mu\text{mol/L}$, 100 μL)被皮下注射到小鼠右腿,之后原位注射 10 μL HSO_3^- (1.5 mmol/L)并在(c)2 min、(d)4 min、(e)6 min、(f)8 min、(g)10 min、(h)12 min 时间进行成像。柱状图:注射区域平均荧光强度(a~h)

Fig. 6 Fluorescence imaging of exogenous HSO_3^- in nude. (a) Nude, (b) CL (10 $\mu\text{mol/L}$, 100 μL) was injected in the right leg. Then 10 μL HSO_3^- (1.5 mmol/L) was *in situ* injected, and imaging was performed at (c) 2 min, (d) 4 min, (e) 6 min, (f) 8 min, (g) 10 min, (h) 12 min. Histogram: mean fluorescence intensity of the injected area (a-h)

4 结 论

本文选用 N-乙基-咪唑作为电子供体基团, 2-氧代-4-苯基-2,5-二氢-3-咪唑甲脒作为电子受体基团,通过羟醛缩合反应合成了具有 D- π -A 结构的近红外 HSO_3^- 荧光探针 (CL)。在存在 HSO_3^- 的条件下,探针 CL 溶液颜色由粉色变为无色且荧光光谱发生明显减弱和蓝移。其识别机理可归因于不饱和 C=C 双键与 HSO_3^- 发生迈克尔加成反应,导致 ICT 效应被破坏。探针 CL 具有近红外发射 (λ_{em} =685 nm)、大的 Stokes 位移

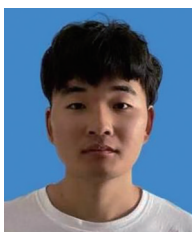
(195 nm)、高的选择性和灵敏度 (49 nmol/L) 等优点。利用探针 CL 成功实现了活鼠体内 HSO_3^- 的荧光成像。另外,通过探针 CL 基试纸与智能手机联用技术实现了水样中 HSO_3^- 浓度的现场检测。因此,探针 CL 的开发可能为了解 HSO_3^- 的病理生理作用以及环境检测提供一种新的方法。

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.20240228>

参 考 文 献:

- [1] SCHACHTER E N, WITEK JR T, BECK G J, *et al.* Airway effects of low concentrations of sulfur dioxide: dose-response characteristics [J]. *Arch. Environ. Health.*, 1984, 39(1): 34-42.
- [2] WU W N, SONG Y F, ZHAO X L, *et al.* Multifunctional 1,3-benzoxazole-merocyanine-based probe for the ratiometric fluorescence detection of pH/ HSO_3^- /viscosity in mitochondria [J]. *Chem. Eng. J.*, 2023, 464: 142553.
- [3] 张文字, 常青, 周雨锋, 等. 一步合成硫、氮共掺杂的碳量子点及其在 Fe^{3+} 检测中的应用 [J]. *发光学报*, 2016, 37(4): 410-415.
ZHANG W Y, CHANG Q, ZHOU Y F, *et al.* One-step synthesis of sulfur- and nitrogen-co-doped carbon quantum dots for $\text{Fe}(\text{III})$ detection [J]. *Chin. J. Lumin.*, 2016, 37(4): 410-415. (in Chinese)
- [4] ZHANG D, LIU W Y, CHEN K K, *et al.* A novel rosamine-based fluorescent probe for bisulfite in aqueous solution [J]. *RSC Adv.*, 2016, 6(106): 103905-103909
- [5] LIU A K, JI R X, SHEN S L, *et al.* A ratiometric fluorescent probe for sensing sulfite based on a pyrido[1,2-a]benzimidazole fluorophore [J]. *New J. Chem.*, 2017, 41(18): 10096-10100.

- [6] MU X Y, ZHU J B, YAN L Q, *et al.* A ratiometric fluorescent probe for the rapid and specific detection of HSO_3^- in water samples [J]. *Luminescence*, 2021, 36(4): 923-927.
- [7] SHEN W L, XU H H, FENG J, *et al.* A ratiometric and colorimetric fluorescent probe designed based on FRET for detecting $\text{SO}_3^{2-}/\text{HSO}_3^-$ in living cells and mice [J]. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.*, 2021, 263: 120183.
- [8] WANG C C, FENG S, WU L Y, *et al.* A new fluorescent turn-on probe for highly sensitive and selective detection of sulfite and bisulfite [J]. *Sens. Actuators: B Chem.*, 2014, 190: 792-799.
- [9] DUAN C, ZHANG J F, HU Y B, *et al.* A distinctive near-infrared fluorescence turn-on probe for rapid, sensitive and chromogenic detection of sulfite in food [J]. *Dyes Pigm.*, 2019, 162: 459-465.
- [10] 张飞飞, 周成合, 颜建平. 咪唑类化合物研究新进展 [J]. 有机化学, 2010, 30(6): 783-796.
ZHANG F F, ZHOU C H, YAN J P. New progress of research in carbazole compounds [J]. *Chin. J. Org. Chem.*, 2010, 30(6): 783-796. (in Chinese)
- [11] LIU Y P, REN T B, CHENG D, *et al.* An ESIPT-based ratiometric fluorescent probe for highly sensitive and rapid detection of sulfite in living cells [J]. *ChemistryOpen*, 2019, 8(10): 1251-1257.
- [12] YANG B, XU J, ZHU H L. Recent progress in the small-molecule fluorescent probes for the detection of sulfur dioxide derivatives ($\text{HSO}_3^-/\text{SO}_3^{2-}$) [J]. *Free Radic. Biol. Med.*, 2019, 145: 42-60.
- [13] HUANG Y R, LI Y, HUANG X Y, *et al.* A novel "AIE+ESIPT" mechanism-based fluorescent probe for visual alternating recognition of $\text{HSO}_3^-/\text{H}_2\text{O}_2$ and its HSO_3^- detection in food samples [J]. *Dyes Pigm.*, 2024, 222: 111901.
- [14] WANG L, LI W X, ZHI W J, *et al.* A rapid-responsive fluorescent probe based on coumarin for selective sensing of sulfite in aqueous solution and its bioimaging by turn-on fluorescence signal [J]. *Dyes Pigm.*, 2017, 147: 357-363.
- [15] LI Y, HUANG Y R, SUN X F, *et al.* An AIE mechanism-based fluorescent probe for relay recognition of $\text{HSO}_3^-/\text{H}_2\text{O}_2$ and its application in food detection and bioimaging [J]. *Talanta*, 2023, 258: 124412.
- [16] ZHANG L J, WANG Z Y, CAO X J, *et al.* An effective ICT-based and ratiometric fluorescent probe for sensing sulfite [J]. *Sens. Actuators: B Chem.*, 2016, 236: 741-748.
- [17] YU T, YIN G X, NIU T T, *et al.* A novel colorimetric and fluorescent probe for simultaneous detection of $\text{SO}_3^{2-}/\text{HSO}_3^-$ and HSO_4^- by different emission channels and its bioimaging in living cells [J]. *Talanta*, 2018, 176: 1-7.
- [18] LI Y, HUANG Y R, HUANG X Y, *et al.* An ultrafast and highly sensitive fluorescent probe for the detection of HSO_3^- and its application in food samples and SO_2 gas [J]. *J. Mol. Struct.*, 2024, 1299: 137168.
- [19] XIE P H, GAO G Q, ZHANG W J, *et al.* A novel fluorescent turn-on probe for bisulfite based on NBD chromophore [J]. *J. Chem. Sci.*, 2015, 127(7): 1267-1273.
- [20] XU S, TANG R R, WANG Z, *et al.* A novel flavone-based fluorescent probe for relay recognition of HSO_3^- and Al^{3+} [J]. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.*, 2015, 149: 208-215.
- [21] SHANG Z Y, WU M M, MENG Q T, *et al.* A near-infrared fluorescent probe for rapid and on-site detection of sulfur dioxide derivative in biological, food and environmental systems [J]. *J. Hazard. Mater.*, 2024, 465: 133165.
- [22] YANG W L, LI Q, WEI T B, *et al.* Novel receptor for the rapid reaction and colorimetric detection of HSO_3^- in aqueous solutions [J]. *Chem. Res. Chin. Univ.*, 2013, 29(2): 236-238.



周金涛(1999-),男,山东泰安人,硕士研究生,2022年于鲁东大学获得学士学位,主要从事分子识别与生物成像方面的应用基础研究。

E-mail: 524373240@qq.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



尚主业(1996-),男,辽宁鞍山人,博士,讲师,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的研究。

E-mail: shangzhuye@ustl.edu.cn