

基于 FRET 机制的硫化氢荧光探针的合成及其性能研究

丁娜, 田庆勤, 赵志刚, 石治川, 刘兴利*

(西南民族大学化学与环境学院, 四川 成都 610041)

摘要:以 2-羟基-1-萘甲醛为原料合成了基于 FRET 机制的 H₂S 反应型荧光探针(L), 并经 NMR、IR、ESI-MS 和元素分析进行表征。利用紫外-可见吸收光谱和荧光发射光谱对探针 L 识别 H₂S 的性能进行了测试。结果表明, 在 pH 为 6.05~8.18 时, 探针 L 对 H₂S 表现出高选择性、高灵敏度和抗干扰性, 检测限低至 0.503 μmol/L, 具有潜在的应用前景。

关键词:硫化氢; 荧光探针; NBD-胺; 硫解

中图分类号: O62

文献标志码: A

文章编号: 0253-4320(2021)03-0240-04

DOI: 10.16606/j.cnki.issn.0253-4320.2021.03.049

Synthesis and properties of a novel FRET-based fluorescent probe for detection of H₂S

DING Na, TIAN Qing-qin, ZHAO Zhi-gang, SHI Zhi-chuan, LIU Xing-li*

(School of Chemistry & Environment, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, China)

Abstract: A novel reaction-based probe(L) for detection of H₂S, based on fluorescence resonance energy transfer (FRET), is synthesized from 2-hydroxy-1-naphthaldehyde. The structure of the probe L is characterized by NMR, IR, ESI-MS and elemental analysis. Ultraviolet-visible absorption spectrum and fluorescence emission are used to test the probe L in identifying H₂S. Results show that in the pH range of 6.05 to 8.18, the probe L exhibits high selectivity, high sensitivity and anti-interference, its detection limit is as low as 0.503 μM, showing a potential application prospect.

Key words: H₂S; fluorescent probe; NBD-N; thiolysis

硫化氢(H₂S)是一种具有特殊臭鸡蛋气味的有毒气体,是继一氧化氮(NO)和一氧化碳(CO)之外的第三种基本内源性信号分子^[1-2]。硫化氢在心血管、神经、免疫和胃肠道系统等的生理过程中具有不同的功能和调节作用^[3-4]。目前已有多种针对硫化氢的检测方法被开发出来,比如比色法^[5]、电化学分析法^[6]、气相色谱法^[7]和硫化物沉淀法^[8]等。然而,由于这些方法在检测过程中具有样品制备复杂、对组织或细胞有破坏性^[9-10]等缺陷,应用范围受到了很大的限制。

荧光成像技术由于简单、高灵敏性、无侵袭性和在生命系统中的实时监测,近年来逐渐引起了科研人员的关注^[11-12]。到目前为止,已开发出一些性能优异的 H₂S 荧光探针。例如, Zhao 等^[13]合成出了一种含吸电子的半花菁结构的氟化硼二吡咯(BODIPY)荧光探针,该探针对于硫化氢具有高选择性和快速响应能力。He 等^[14]开发出了一种以叠氮基为 H₂S 识别基团的双反应双淬灭荧光探针,具有良好的荧光淬灭效果,并成功应用于细胞成像。7-

硝基-2,1,3-苯并氧杂噻二唑(NBD)基团可以发生分子内荧光共振能量转移效应(FRET),进而淬灭荧光基团的荧光。当与 H₂S 发生芳香亲核取代反应后,可以释放出荧光团,从而达到探针荧光增强的效果。Chao 等^[15]首次将 NBD-胺裂解反应应用于 H₂S 探针合成当中。该探针以香豆素为荧光团,对 H₂S 具有良好的选择性,可以用于检测 HeLa 细胞中的 H₂S。

本文中以 2-羟基-1-萘甲醛为起始原料,通过两步反应,合成出了以 2-(苯并噻唑-2-基)萘酚为荧光团,7-硝基-2,1,3-苯并氧杂噻二唑(NBD)为识别基团的新型荧光探针 L。该探针可对 H₂S 进行专一性识别,具有原料便宜易得、合成方法简便、收率高等优点,具有潜在的应用价值。

1 实验部分

1.1 试剂及仪器

400 MHz 核磁共振仪(Me₄Si 作内标),美国 Agilent 公司生产; FINNIGAN-LCQ DECA 型质谱

收稿日期:2020-11-06;修回日期:2021-01-12

基金项目:西南民族大学研究生创新型科研项目(硕士重点项目 CX2020SZ17)

作者简介:丁娜(1994-),女,硕士生;刘兴利(1966-),女,硕士,教授,研究方向为有机小分子合成,通讯联系人,liuxingli2000@swun.cn。

仪,美国赛默飞公司生产;IR200 型傅里叶变换红外光谱仪(KBr 压片),美国赛默飞公司生产;Vario MICRO 型自动元素分析仪,德国 Elementar 公司生产;WRS-1B 型数字熔点仪,温度计未经校正,上海精密仪器仪表有限公司生产;TU-1901 型双光束紫外-可见光分光光度计,北京普析通用仪器公司生产;Dual-FL 型快速荧光光谱仪,日本 HORIBA 公司生产;NEX UP1000 型超纯水机,北京普析通用仪器公司生产;PHSJ-4F 型 pH 计,上海雷磁公司生产。所用试剂均为市售分析纯级。实验用水为去离子水。

1.2 实验方法

1.2.1 荧光分子的制备

以 2-羟基-1-萘甲醛为起始原料,通过两步反应,合成出了以 2-(苯并噻唑-2-基)萘酚为荧光团,7-硝基-2,1,3-苯并氧杂噻二唑(NBD)为识别基团的新型荧光探针 L(图 1)。

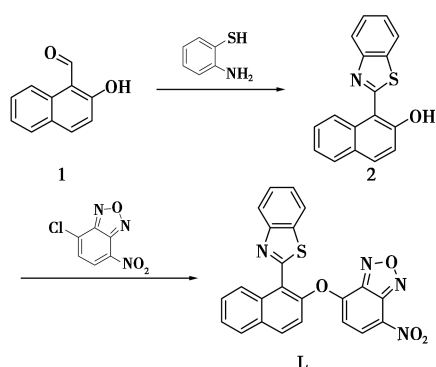


图 1 目标探针 L 的合成路线

向圆底烧瓶中依次加入 2-羟基-1-萘甲醛(1.72 g, 10 mmol)、2-氨基苯硫酚(1.5 g, 12 mmol)和焦亚硫酸钠(1.5 g, 10 mmol),用 *N,N*-二甲基甲酰胺(50 mL)溶解,然后加热至 130℃,搅拌 12 h。将反应液冷却至室温,抽滤,滤饼用无水乙醇洗涤,得到淡黄色中间体 2(2.5 g)。中间体 2 无需纯化,直接用于下一步反应。

向中间体 2(550 mg, 2 mmol)的二氯甲烷(5 mL)溶液中加入三乙胺(240 mg, 2.4 mmol),然后将混合液置于冰水浴中搅拌 10 min,逐滴加入 4-氯-7-硝基-2,1,3-苯并氧杂噻二唑(480 mg, 2.4 mmol)的二氯甲烷(5 mL)溶液,继续搅拌 20 min 后,将反应温度升至室温,继续搅拌 2 h。待中间体 2 基本消耗完毕,将反应液旋干,过柱纯化(洗脱剂石油醚:乙酸乙酯=10:1),得到淡黄色探

针 L(650 mg)。收率为 73.9%, m. p. 292.5 ~ 294.1℃。IR(KBr), ν , cm^{-1} : 3 106、1 679、1 645、1 546、1 460、1 384、1 339、1 261、1 215、1 098、997、969、865、730、699。 ^1H NMR(DMSO- d_6 , 400 MHz), δ 8.61(d, $J=8.4$ Hz, 1H)、8.38(d, $J=9.0$ Hz, 1H)、8.22~7.98(m, 4H)、7.74(d, $J=9.0$ Hz, 1H)、7.72~7.64(m, 2H)、7.58~7.51(m, 1H)、7.51~7.43(m, 1H)、6.96(d, $J=8.4$ Hz, 1H)。 ^{13}C NMR(DMSO- d_6 , 100 MHz), δ 160.73、153.12、152.80、149.46、145.58、144.75、136.04、135.48、134.06、132.52、132.09、131.36、129.09、129.03、127.41、126.98、126.33、125.67、123.70、122.34、120.49、111.72。ESI-MS, m/z : 441.79[$M+1$] $^+$ 。元素分析, $\text{C}_{23}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_4\text{S}$, 实测值(计算值), %: C 62.97(62.72)、H 2.74(2.75)、N 12.68(12.72)、S 7.31(7.28)。

1.2.2 溶液的配制

不同阴离子溶液采用相应的钾盐、钠盐或铵盐,配制成浓度为 1×10^{-3} mol/L 的去离子水溶液。探针 L 用 DMSO 溶解, DMSO/Tris(体积比 1/10)溶液定容得到浓度为 1×10^{-3} mol/L 的探针 L 储备液。测定条件:激发光 401 nm,狭缝宽 2 nm,扫描范围 250~830 nm。

由于 H_2S 在水溶液中主要以 HS^- 形式存在,本实验采用硫化氢钠作为 H_2S 源。

2 结果与讨论

2.1 荧光探针识别 H_2S 的紫外-可见吸收光谱

由含探针 L($10 \mu\text{mol/L}$)的 DMSO/Tris(体积比 1/10)溶液的紫外-可见光谱(图 2)可知,探针 L 在 548 nm 处有较强吸收峰。当向溶液中加入 H_2S ($1\,000 \mu\text{mol/L}$)后,随着反应时间的延长,该处吸收峰逐渐增强,并在反应 20 min 后,吸收峰强度趋于稳定,不再增强。这表明 H_2S 加入后,与探针分子 L

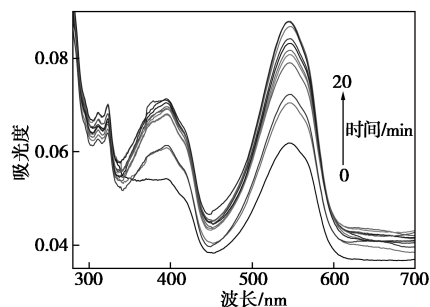


图 2 探针 L 的紫外-可见光光谱

间发生了相互作用,改变了荧光探针分子的能级差,导致吸收峰强度发生了明显变化。

2.2 荧光探针识别 H_2S 的选择性

在探针 L (10 $\mu\text{mol/L}$) 的 DMSO/Tris (体积比 1/10) 溶液中,分别加入不同种类的阴离子或生物硫醇溶液 (1 000 $\mu\text{mol/L}$) 定容至 10 mL,测定相应的荧光发射强度。由图 3 可知,探针 L 本身几乎没有荧光,当加入 H_2S (1 000 $\mu\text{mol/L}$) 溶液并搅拌 20 min 后,在 469 nm 处出现了很强的荧光发射峰。在紫外灯下,探针 L- H_2S 发出显著的蓝色荧光。而当加入其他阴离子 (F^- 、 Cl^- 、 Br^- 、 I^- 、 AcO^- 、 ClO_4^- 、 SCN^- 、 CN^- 、 NO_2^- 、 SO_3^{2-} 、 HSO_3^- 、 N_3^-) 溶液后,荧光强度并没有发生明显变化。特别地,当加入不同生物硫醇 (GSH、Cys、Hcy) 溶液后,探针的荧光强度同样没有发生变化。这些结果表明,探针 L 是一种高选择性的 H_2S 荧光探针,并可达到肉眼识别的效果。

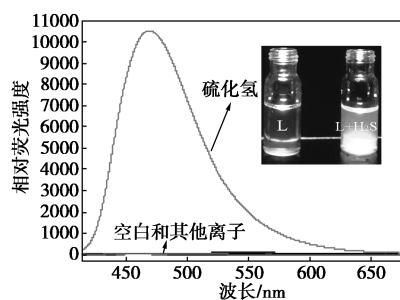
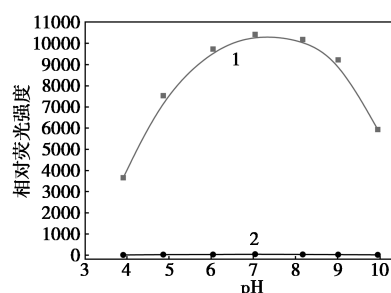


图 3 探针 L 加入不同阴离子或生物硫醇 (1 000 $\mu\text{mol/L}$) 的荧光光谱 ($\lambda_{\text{ex}} = 401 \text{ nm}$)

2.3 pH 对荧光探针识别 H_2S 的影响

研究了探针 L 在不同 pH 环境中对 H_2S 进行检测的适用性 (图 4)。通过分别滴加上述浓度的 0.1 mol/L NaOH 和 0.1 mol/L HCl 溶液,将 DMSO/Tris (体积比 1/10) 溶液的 pH 依次调为 3.92、4.87、6.05、7.05、8.18、9.02、9.96。检测探针 L (10 $\mu\text{mol/L}$) 的 DMSO/水 (体积比 1/10) 溶液、探针 L (10 $\mu\text{mol/L}$) 与 H_2S (1 000 $\mu\text{mol/L}$) 的 DMSO/Tris (体积比 1/10) 混合溶液的荧光强度。由图 4 可知,在 pH 为 3.92~9.96,向探针 L 溶液中加入 H_2S 后,混合溶液的荧光强度均有不同程度的增强。其中,当 pH 为 7.05 时,荧光强度达到最大值。而当 pH < 4.87 或 pH > 9.02 时,混合溶液的荧光强度明显降低。这可能是由于在强酸性条件下,溶液中大量 H^+ 的存在抑制了 H_2S 在水溶液中的电离平衡,减弱了 H_2S 发生芳香族亲核取代速率;而强碱性的环境使得溶液中 H_2S 浓度明显降低。这些结果表明,探针

L 在相对较宽的 pH 范围 (6.05~8.18) 内对 H_2S 高度识别。



1—L+ H_2S ; 2—L

图 4 不同 pH 对探针 L 的影响 ($\lambda_{\text{em}} = 469 \text{ nm}$)

2.4 荧光滴定及检测限

为研究探针 L (10 $\mu\text{mol/L}$) 对 H_2S 检测的灵敏度,测定了其荧光滴定曲线 (图 5)。随着 H_2S 浓度的增加 (50、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550 $\mu\text{mol/L}$),探针 L 在 469 nm 处的荧光强度显著增强,并在 H_2S 浓度增加到 500 $\mu\text{mol/L}$ 后逐渐趋于平稳。由图 6 可知,当添加 0~50 当量的 H_2S 时,L 的荧光强度与 H_2S 的浓度之间具有良好的线性关系 ($R^2 = 0.999 08$)。根据 3σ 方法 ($LOD = 3\sigma/K$, σ 代表空白溶液的标准偏差, K 代表图中标准曲线的斜率),可计算得到探针 L 对 H_2S 的检测限

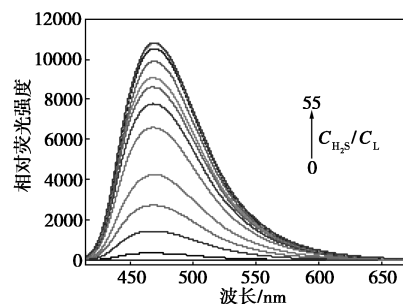
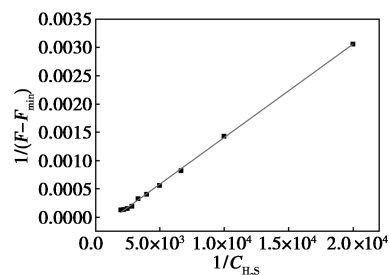


图 5 不同 H_2S 浓度时 L 的荧光光谱及线性拟合 ($\lambda_{\text{em}} = 469 \text{ nm}$)



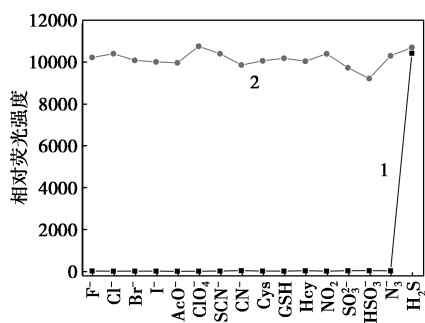
$$y = 1.650 05 \times 10^{-7} x - 2.470 04 \times 10^{-4}, R^2 = 0.999 08$$

图 6 探针 L 与不同浓度 H_2S 的 Bensi-Hildebrand 曲线 ($\lambda_{\text{em}} = 469 \text{ nm}$)

(LOD)为 0.503 $\mu\text{mol/L}$ 。该实验结果表明,探针 L 可以潜在地用于对痕量 H_2S 的检测。

2.5 荧光探针识别 H_2S 的抗干扰性

为探究 L 对 H_2S 的识别反应是否会受到其他共存离子的影响,进行了离子抗干扰实验。在添加 H_2S (10 $\mu\text{mol/L}$) 的同时分别加入其他阴离子或生物硫醇 (500 $\mu\text{mol/L}$),测试其荧光发射光谱。以 469 nm 处荧光峰强度为基准记录作图。由图 7 可知,当环境中存在其他不同共存离子时,探针 L- H_2S 体系的荧光强度没有发生明显变化。这说明,探针 L 对 H_2S 的识别作用具有优异的抗干扰能力,是一种能够在复杂环境中具有潜在应用价值的 H_2S 荧光探针。



1—L+其他离子;2—L+其他离子+ H_2S

图 7 共存离子的影响

2.6 探针 L 与 H_2S 反应机理的探究

为了探究 L 与 H_2S 反应机理,对探针 L- H_2S 体系进行了薄层色谱分析和质谱分析(图 8)。当在无

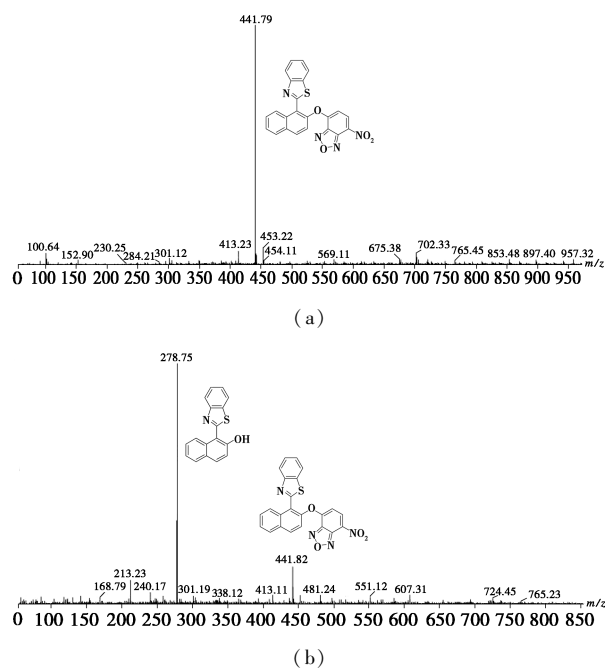


图 8 探针 L 和 L- H_2S 的质谱谱图

荧光的探针 L 溶液中加入大大过量的 H_2S ,溶液出现了很强的蓝色荧光,这与中间体 2 的荧光现象基本相同。通过薄层色谱的初步分析发现,L- H_2S 体系中有新点生成,且其 R_f 值与中间体 2 完全一致。

进一步的质谱分析表明,在探针 L- H_2S 体系中,探针 L 的质谱信号减弱,有新的质谱峰 (278.75, $M+1$) 出现。这些结果说明, H_2S 与 L 发生反应后,NBD-胺被硫解,生成相应的 NBD-SH 和萘酚。基于以上结果,提出了一种 NBD-胺裂解反应的机理(图 9)。由于极度缺电子,7-硝基-2,1,3-苯并氧杂噻二唑 (NBD) 基团可以发生分子内荧光共振能量转移效应 (FRET),进而淬灭荧光基团的荧光。在硫化氢存在下,NBD 可以与 H_2S 发生芳香亲核取代从而进行硫解,释放出荧光供体本身所具有的荧光,使得探针的荧光增强。

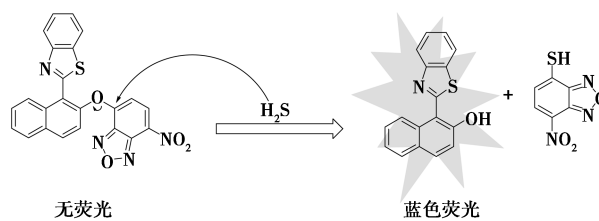


图 9 探针 L 与 H_2S 的反应机理

3 结论

以官能化的萘酚为母体,设计合成了一种含 7-硝基-2,1,3-苯并氧杂噻二唑 (NBD) 为识别基团的反应型 H_2S 荧光探针(L)。在 pH 为 6.05~8.18 的范围内,探针 L 对 H_2S 表现出高选择性、高灵敏度和抗干扰性,检出限最低为 5.03×10^{-7} mol/L,有望进一步用于环境和食品中低浓度 H_2S 的检测。

参考文献

- [1] Culotta E, Koshland D. No news is good news [J]. Science, 1992, 258(5090): 1862-1865.
- [2] Szabo C. Hydrogen sulphide and its therapeutic potential [J]. Nature Reviews Drug Discovery, 2007, 6(11): 917-935.
- [3] Mancardi D, Penna C, Merlino A, et al. Physiological and pharmacological features of the novel gasotransmitter: Hydrogen sulfide [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2009, 1787(7): 864-872.
- [4] Li L, Rose P, Moore P K. Hydrogen sulfide and cell signaling [J]. Annual Review of Pharmacology Toxicology, 2011, 51(1): 169-187.
- [5] Choi M M F. Fluorimetric optode membrane for sulfide detection [J]. Analyst, 1998, 123(7): 1631-1634.

(下转第 250 页)

参考文献

- [1] 王中刚,于学元.稀土元素地球化学[M].北京:科学出版社,1989:76-88.
- [2] Smith M P, Moore K, Kavecsánszki D, *et al.* From mantle to critical zone: A review of large and giant sized deposits of the rare earth elements[J]. *Geosci Front*, 2016, 7(3): 315-334.
- [3] 吴石头,王亚平,孙德忠,等.电感耦合等离子体发射光谱法测定稀土矿石中 15 种稀土元素—四种前处理方法的比较[J]. *岩矿测试*, 2014, 33(1): 12-19.
- [4] Karakaş S Y, Gaga E O, Doğançın A, *et al.* Determination of major and rare earth elements in bastnaesite ores by ICP-AES[J]. *Anal Lett*, 2004, 37(13): 2701-2709.
- [5] 杨小丽,崔森,杨梅,等.碱熔离子交换-电感耦合等离子体质谱法测定多金属矿中痕量稀土元素[J]. *冶金分析*, 2011, 31(3): 11-16.
- [6] Wiethan B A, Nascimento P C, Colim A N, *et al.* Determination of rare earth elements in natural water samples by rapid sequential high-resolution continuum source flame atomic absorption spectrometry (HR CS FAAS) and inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS)[J]. *Anal Lett*, 2019, 52(13): 2057-2068.
- [7] 阿丽莉,贺攀红,张盼盼.粉末压片-X 射线荧光光谱法测定地质样品中镧钪镨钆钇[J]. *冶金分析*, 2019, 39(9): 39-45.
- [8] Nakayama K, Nakamura T. X-ray fluorescence analysis of rare earth elements in rocks using low dilution glass beads[J]. *Anal Sci*, 2005, 21(7): 815-822.
- [9] 周国兴,刘玺祥,崔德松.碱熔 ICP-MS 法测定岩石样品中稀土等 28 种金属元素[J]. *质谱学报*, 2010, 31(2): 120-124.
- [10] 吴葆存,于亚辉,闫红岭,等.碱熔-电感耦合等离子体质谱法测定钨矿石和钼矿石中稀土元素[J]. *冶金分析*, 2016, 36(7): 39-45.
- [11] 张亚峰,冯俊,唐杰,等.基于五酸溶样体系-ICP-MS 同时测定地质样品中稀土等 46 种元素[J]. *质谱学报*, 2016, 37(2): 186-192.
- [12] Masson P, Dalix T. Comparison of open digestion methods for the determination of rare earth elements in plant samples by ICP-MS[J]. *Commun Soil Sci Plan*, 2016, 47(16): 1866-1874.
- [13] Navarro M S, Andrade S, Ulbrich H, *et al.* The direct determination of rare earth elements in basaltic and related rocks using ICP-MS: Testing the efficiency of microwave oven sample decomposition procedure[J]. *Geostand Geoanal Res*, 2008, 32(2): 167-180.
- [14] 王佩佩,李霄,宋伟娇.微波消解-电感耦合等离子体质谱法测定地质样品中稀土元素[J]. *分析测试学报*, 2016, 35(2): 235-240.
- [15] 贾双琳,赵平,杨刚,等.混合酸敞开或高压密闭溶样-ICPMS 测定地质样品中稀土元素[J]. *岩矿测试*, 2014, 33(2): 186-191.
- [16] 吴磊,刘义博,王家松,等.高压密闭消解-电感耦合等离子体质谱法测定锰矿石中的稀土元素前处理方法研究[J]. *岩矿测试*, 2018, 37(6): 40-46.
- [17] 刘菊琴,李小莉.波长与能量色散复合型 X 射线荧光光谱仪测定海洋沉积物、水系沉积物、岩石和土壤样品中 15 种稀土元素[J]. *冶金分析*, 2018, 38(5): 11-16.
- [18] 李冰,杨红霞.电感耦合等离子体质谱原理及应用[M].北京:地质出版社,2005:147-151. ■
- (上接第 243 页)
- [6] Spilker B, Randhahn J, Grabow H, *et al.* New electrochemical sensor for the detection of hydrogen sulfide and other redox active species[J]. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2008, 612(1): 121-130.
- [7] Radford K J, Cutter G A. Determination of carbonyl sulfide and hydrogen sulfide species in natural waters using specialized collection procedures and gas chromatography with flame photometric detection[J]. *Analytical Chemistry*, 1993, 65(8): 976-982.
- [8] Ishigami M, Hiraki K, Umemura K, *et al.* A source of hydrogen sulfide and a mechanism of its release in the brain[J]. *Antioxidants and Redox Signaling*, 2009, 11(2): 205-214.
- [9] Zhang C, Wei L, Wei C, *et al.* A FRET-ICT dual-quenching fluorescent probe with large off-on response for H₂S: Synthesis, spectra and bioimaging[J]. *Chemical Communications*, 2015, 51(35): 7505-7508.
- [10] Olson K R. Is hydrogen sulfide a circulating "gasotransmitter" in vertebrate blood[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2009, 1787(7): 856-863.
- [11] Zhou X, Lee S, Xu Z C, *et al.* Recent progress on the development of chemosensors for gases[J]. *Chemical Reviews*, 2015, 115(15): 7944-8000.
- [12] Yin J, Hu Y, Yoon J. Fluorescent probes and bioimaging: Alkali metals, alkaline earth metals and pH[J]. *Chemical Society Reviews*, 2015, 44(14): 4619-4644.
- [13] Zhao C, Zhang X, Li K, *et al.* Förster resonance energy transfer switchable self-Assembled micellar nanoprobe: Ratiometric fluorescent trapping of endogenous H₂S generation via fluvastatin-stimulated upregulation[J]. *Journal of American Chemical Society*, 2015, 137(26): 8490-8498.
- [14] He L, Lin W, Xu Q, *et al.* A new strategy to construct a FRET platform for ratiometric sensing of hydrogen sulfide[J]. *Chemical Communications*, 2015, 51(8): 1510-1513.
- [15] Chao W, Lv W, Zhen X, *et al.* A FRET-based fluorescent probe for imaging H₂S in living cells[J]. *Tetrahedron Letters*, 2013, (54): 6937-6939. ■