

基于水解识别机制的过氧化亚硝酸盐 荧光探针的合成及性质研究

何潞潞, 张 珍, 李佳佳, 曾 竟*

(新疆师范大学化学化工学院, 新疆 乌鲁木齐 830054)

摘要:以典型聚集诱导发光(AIE)性质的四苯乙烯基为荧光母体,通过酯基连接上水溶性佳的聚乙二醇基合成了具有 AIE 特性的化合物 TPE-PEG₂₀₀₀-TPE;利用光谱法研究探针 TPE-PEG₂₀₀₀-TPE 的光学性能,结果表明,探针在 DMF/H₂O 混合溶液中具有典型的 AIE 性能,其溶液(探针溶液浓度为 10 μmol/L, DMF/H₂O 体积比为 1/4, 在 PBS 缓冲溶液中 pH 值为 7.4)对 ONOO⁻表现出“turn-off”特异性识别,猝灭比可达 97.86%,检出限为 1.26×10⁻⁶ mol/L,具有较好的选择性、较高的灵敏度和较大的 Stokes 位移(164 nm)。通过薄层色谱法和高分辨质谱法对探针识别 ONOO⁻的机制进行研究,结果表明,该探针通过酯基水解生成 TPE-COOH,进而使荧光发生变化,实现对 ONOO⁻的特异性识别。

关键词:四苯乙烯;聚集诱导发光;过氧化亚硝酸盐;荧光探针

中图分类号:O621.2

文献标志码:A

文章编号:0253-4320(2023)12-0230-07

DOI:10.16606/j.cnki.issn0253-4320.2023.12.042

Synthesis and properties of peroxy nitrite fluorescent probe based on hydrolysis recognition mechanism

HE Lu-lu, ZHANG Zhen, LI Jia-jia, ZENG Jing*

(School of Chemistry & Chemical Engineering, Xinjiang Normal University, Urumqi 830054, China)

Abstract: TPE-PEG₂₀₀₀-TPE, a compound with aggregation-induced luminescence (AIE) characteristics, is synthesized by using tetraphenylethylene group with typical AIE property as the fluorescent parent through the ester group connecting water-soluble polyethylene glycol group. The optical properties of TPE-PEG₂₀₀₀-TPE probe are studied by means of spectroscopy, and it is shown that TPE-PEG₂₀₀₀-TPE probe has a typical AIE performance in a DMF/H₂O mixed solution. The solution of TPE-PEG₂₀₀₀-TPE probe (10 μmol/L, v/v, 1/4, PBS, pH = 7.4) shows a “turn-off” specific recognition to ONOO⁻, with a quenching ratio of 97.86% and a detection limit of 1.26×10⁻⁶ mol·L⁻¹, and also presenting a better selectivity, a relatively high sensitivity and a large Stokes displacement (164 nm). It is indicated through exploring the recognition mechanism of the probe for ONOO⁻ by TLC and ESI-MS that this probe generates TPE-COOH through ester group hydrolysis, which enables specific recognition of ONOO⁻.

Key words: tetraphenylethylene; aggregation induced luminescence; peroxy nitrite; fluorescence probe

活性氧/氮(ROS/RNS)是生命系统中的重要物质,在不同的生理病理过程中起着调节作用^[1-2]。ONOO⁻作为一种具有高氧化和亚硝化活性的活性氧物种,在生物体内由一氧化氮(NO)和超氧阴离子自由基(·O₂⁻)快速结合产生^[3],在调节细胞内氧化还原平衡和信号转导途径方面发挥关键作用。但浓度异常的 ONOO⁻会损伤核酸、脂质和过渡金属酶中心等许多生物分子^[4-5],引发多种疾病^[6-7],包括心血管疾病、炎症和癌症等。因此,开发一种快速、准确检测 ONOO⁻水平的分析方法对疾病研究具有重要意义。

目前,报道的检测 ONOO⁻的方法有电化学法、化学发光法和离子色谱法等^[8-10]。虽然这些方法在

检测 ONOO⁻方面取得了很好的效果,但很难实时监测生物体内 ONOO⁻水平的动态变化。而荧光探针法^[11-12]因优越的实时可视化、快速响应和无损检测等优势,被广泛用于细胞和生物体中的生物活性物质的实时监测。目前多数 ONOO⁻荧光探针均是基于传统荧光染料为荧光母体,通过 C=C/C=N 键氧化^[13-14]、硼酸酯氧化^[15]、酰胺/酯的氧化水解^[16-17]、磷酸基氧化^[18]和醚键氧化^[19]等识别策略实现对 ONOO⁻特异性识别。例如 Feng 等^[20]以香豆素为荧光母体、C=C 键为识别位点设计合成了高尔基体靶向型 ONOO⁻荧光探针,该探针具有低细胞毒性和高灵敏度(LOD = 13 nmol/L)。Peng 等^[21]以罗丹明为荧光母体、硼酸酯为识别位点设计合成了

收稿日期:2022-12-24;修回日期:2023-10-25

基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金项目(2022D01A95);新疆师范大学优秀青年教师科研启动基金项目(XJNU202013)

作者简介:何潞潞(1998-),女,硕士生;曾竟(1981-),女,博士,教授,主要从事有机合成研究,通讯联系人,zengjing800111@163.com。

ONOO⁻ 荧光探针,该探针具有优异的抗干扰性和敏感性(LOD = 34 nmol/L),能够对肝缺血/再灌注(I/R)过程中的 ONOO⁻ 进行成像。Su 等^[22] 基于 BODIPY 荧光母体以磷酸酯为 ONOO⁻ 的特异性识别位点设计并合成了荧光探针,该探针反应快、选择性好、灵敏度高。上述 ONOO⁻ 荧光探针均具有良好的发光性能、选择性等优势,但依旧存在一些问题,比如传统荧光探针在高浓度下容易聚集导致荧光猝灭,在测定中易存在假阴性的影响;另外由于探针的 Stokes 位移较小,会引起激发光谱与发射光谱之间的串扰和自吸收干扰。因此开发具有聚集诱导发光(AIE)特性和 Stokes 位移大的 ONOO⁻ 荧光探针可以很好地解决上述问题。

具有 AIE 特性的荧光探针中,基于四苯乙烯(TPE)荧光母体的探针因结构简单、易于修饰、聚集诱导荧光性能好、Stokes 位移大等优势^[23],引起人们广泛关注,但用于检测 ONOO⁻ 的四苯乙烯类荧光探针^[24-25] 研究较少,且多数探针更多利用 ONOO⁻ 的氧化性进行设计,合成较为困难。因此,本文中基于四苯乙烯为荧光母体,用高水溶性的聚合物材料—聚乙二醇 2000 进行修饰,通过亲核取代反应两步合成得到以酯基为识别位点的 ONOO⁻ 荧光探针 TPE-PEG₂₀₀₀-TPE。研究表明,该探针具有良好的水溶性和较大的 Stokes 位移(164 nm),能够特异性识别 ONOO⁻,具有较高的选择性和较好的灵敏度。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

U-3310 型紫外-可见分光光度计(日本日立公司);TRACE MS 型质谱仪(美国赛默飞世尔公司);Cary Eclipse 型荧光分光光度计(美国 Varian 公司);Varian 400-MR 型核磁共振波谱仪。

丁二酸酐、聚乙二醇 2000(PEG₂₀₀₀)、二环己基碳二亚胺(DCC)、4-二甲氨基吡啶(DMAP)、二甲亚砜(DMSO)、无水乙醇(CH₃CH₂OH)、无水甲醇(CH₃OH)、*N,N*-二甲基甲酰胺(DMF),上述试剂均为分析纯。

1.2 探针 TPE-PEG₂₀₀₀-TPE 的合成与表征

以四苯乙烯荧光母体 4-(1-苯基-2,2-二对甲苯基)苯胺(TPE-NH₂)为起始原料,先后与丁二酸酐和聚乙二醇 2000(PEG₂₀₀₀)通过亲核取代反应合成得到化合物 TPE-PEG₂₀₀₀-TPE,总产率为 76%,合成路线如图 1 所示。

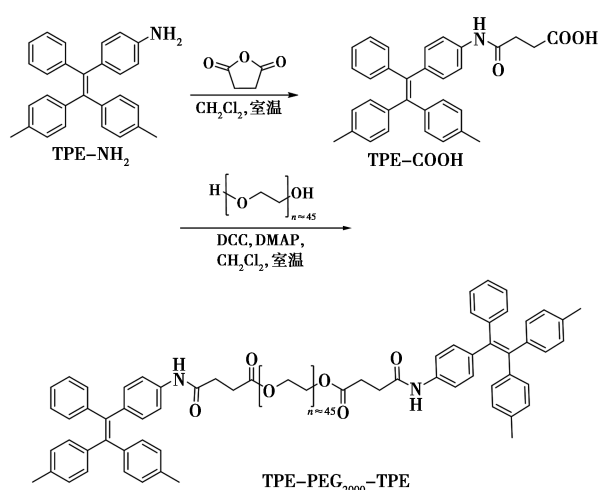


图 1 探针 TPE-PEG₂₀₀₀-TPE 的合成路线

1.2.1 TPE-COOH 的合成与表征

首先称取 3.740 9 g TPE-NH₂ (10 mmol) 和 1.001 8 g 丁二酸酐(10 mmol) 在 100 mL 的圆底烧瓶中,用 40 mL CH₂Cl₂ 溶解,搅拌,体系由淡黄色澄清溶液析出大量白色固体,TLC 跟踪 1 h 后,抽滤出固体,用无水乙醇重结晶,最终得到白色固体 4.518 9 g,产率为 95%。¹HNMR(CDCl₃, 400 MHz): 2.24(2s, 6H), 2.61(t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 2.75(t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 6.87~7.35(m, 17H)。

1.2.2 探针 TPE-PEG₂₀₀₀-TPE 的合成与表征

在 100 mL 的干燥圆底烧瓶内加入 0.946 4 g TPE-COOH(2.0 mmol), 0.618 2 g DCC(3.0 mmol), 0.061 2 g DMAP(0.5 mmol), 并用 40 mL CH₂Cl₂ 溶解,搅拌,30 min 后加入 2.001 5 g PEG₂₀₀₀(1.0 mmol), 室温搅拌,TLC 跟踪,2 h 反应完全后,将体系旋转蒸发去除溶剂,柱层析(二氯甲烷-甲醇,20:1, v/v) 分离得淡绿色固体 2.346 1 g,产率为 80%。¹HNMR(CDCl₃, 400 MHz): 2.24(2s, 12H), 2.63(t, *J* = 8.0 Hz, 4H), 2.76(t, *J* = 8.0 Hz, 4H), 3.61~3.67(m, 180H), 6.92~7.09(m, 30H), 7.29~7.32(m, 4H)。

1.3 溶液配制和测试方法

聚集诱导荧光溶液配制和性能测试方法:首先分别移取 0.10 mL 探针储备液($C_0 = 5 \times 10^{-4}$ mol/L)、4.90 mL DMF 和 0 mL 不良溶剂-水到体积为 5.00 mL 的小瓶中,获得水体积分数为 0% 的纯 DMF 待测液($C = 1 \times 10^{-5}$ mol/L),按照此法,分别配制水体积分数 10%~90% 的待测液,并测定聚集诱导发光性能($\lambda_{Ex} = 326$ nm)。

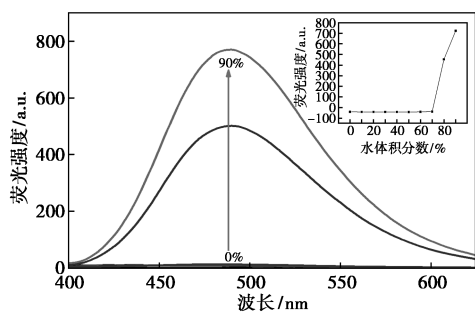
探针 TPE-PEG₂₀₀₀-TPE 的 DMF/H₂O 测试溶液

(10 $\mu\text{mol/L}$, v/v, 1/4, PBS, pH = 7.4) 配置和性能测试方法: 首先向体积为 5.00 mL 的小瓶中加入 0.10 mL 探针 TPE-PEG₂₀₀₀-TPE 储备液、0.90 mL DMF 和 3.99 mL 的不良溶剂水, 再加入 0.01 mL PBS 溶液, 得到 TPE-PEG₂₀₀₀-TPE 的 DMF/H₂O 测试溶液 (10 $\mu\text{mol/L}$, v/v, 1/4, PBS, pH = 7.4)。依照此法, 在上述测试溶液中加入 0.03 mL ONOO⁻ (11.9 mmol/L, 7 equiv.) 测定光谱性能, 探究该探针的选择性能 ($\lambda_{\text{Ex}} = 326 \text{ nm}$)。

2 结果与讨论

2.1 探针 TPE-PEG₂₀₀₀-TPE 的聚集诱导荧光性能

以 DMF 为良溶剂, 水为不良溶剂, 探讨了探针 TPE-PEG₂₀₀₀-TPE 的 AIE 特性。由图 2 可知, 探针 TPE-PEG₂₀₀₀-TPE 的 DMF 溶液在 440 nm 处荧光强度为 10; 在水体积分数为 0%~70% 时, 荧光强度上下浮动不到 3。在水体积分数为 80% 后荧光强度随水体积分数增加而增强, 当水体积分数为 90% 时荧光强度增强最大, 在 490 nm 处荧光强度达到 773, 较纯 DMF 溶液时增强了 77 倍, 证明其具有良好的 AIE 特性。



水体积分数: 1—0%; 2—10%; 3—20%; 4—30%; 5—40%;
6—50%; 7—60%; 8—70%; 9—80%; 10—90%

图 2 探针 TPE-PEG₂₀₀₀-TPE (10 $\mu\text{mol/L}$) 在不同含水量的 DMSO/H₂O 混合溶液体系中聚集诱导荧光光谱 (内图为最大荧光强度折线图, $\lambda_{\text{Ex}} = 326 \text{ nm}$)

2.2 探针 TPE-PEG₂₀₀₀-TPE 对 ONOO⁻ 识别条件优化

2.2.1 不同溶剂条件下探针 TPE-PEG₂₀₀₀-TPE 溶液对 ONOO⁻ 选择性识别研究

为获得较优的 ONOO⁻ 选择性识别条件, 考察了不同溶剂条件下探针 TPE-PEG₂₀₀₀-TPE 对 ROS/RNS 的识别能力研究。由表 1 可知, 探针 TPE-

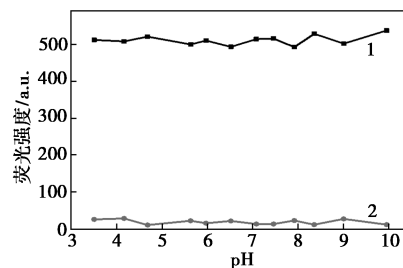
PEG₂₀₀₀-TPE (10 $\mu\text{mol/L}$, v/v, 1/4) 的 CH₃CH₂OH/H₂O、CH₃OH/H₂O、DMSO/H₂O 溶液条件下虽能识别 ONOO⁻, 猝灭比分别为 87.20%、97.30%、98.40%, 但同时 ClO⁻ 也产生了响应识别。只有探针 TPE-PEG₂₀₀₀-TPE 的 DMF/H₂O (10 $\mu\text{mol/L}$, v/v, 1/4) 溶液实现了对 ONOO⁻ 专一性选择识别, 在 490 nm 处荧光强度由 513 降到 11, 猝灭比达到 97.86%。实验结果表明, 探针 TPE-PEG₂₀₀₀-TPE 的 DMF/H₂O (10 $\mu\text{mol/L}$, v/v, 1/4) 溶液条件下对 ONOO⁻ 的识别能力最优, 故以下测试选用 DMF 溶剂作为性能研究的良性溶剂。

表 1 探针 TPE-PEG₂₀₀₀-TPE (10 $\mu\text{mol/L}$, v_{溶剂}/v_水, 1/4) 在不同溶液中加入不同 ROS/RNS (7 equiv) 后 490 nm 处的荧光强度

溶剂	ROS/RNS	空白	¹ O ₂	TBO ⁻	ClO ⁻	TBHP	NO ⁻	H ₂ O ₂	·OH	ONOO ⁻
CH ₃ CH ₂ OH/H ₂ O		719	840	649	322	650	661	784	611	92
CH ₃ OH/H ₂ O		480	504	410	178	543	527	540	411	13
DMSO/H ₂ O		437	404	331	97	434	398	390	313	7
DMF/H ₂ O		513	484	444	499	503	470	496	434	11

2.2.2 探针 TPE-PEG₂₀₀₀-TPE 对 pH 的响应性研究

考察探针 TPE-PEG₂₀₀₀-TPE 的稳定性和反应活性, 加入不同体积的 0.10 mol/L 盐酸和 0.10 mol/L 氢氧化钠调节溶液的 pH, 使得溶液 pH 在 3.5~10.0 之间, 以荧光光谱法分别测定该探针的 DMF/H₂O 溶液 (10 $\mu\text{mol/L}$, v/v, 1/4) 在加入 ONOO⁻ 前后的荧光变化, 由图 3 可知, 在加入 ONOO⁻ 之前, 探针 TPE-PEG₂₀₀₀-TPE 在 pH 3.5~10.0 之间荧光强度趋于稳定, 荧光强度在 493~538 之间。而在该探针中加入 ONOO⁻ 后, 在 pH 3.5~10.0 之间, 490 nm 处均发生了荧光猝灭。结果表明该探针在 pH 3.5~10.0 之间具有较优的反应活性



1—TPE-PEG₂₀₀₀-TPE; 2—TPE-PEG₂₀₀₀-TPE+ONOO⁻

图 3 pH 对探针 TPE-PEG₂₀₀₀-TPE 的 DMF/H₂O 反应体系荧光强度的影响 (10 $\mu\text{mol/L}$, v/v, 1/4, $\lambda_{\text{Ex}} = 326 \text{ nm}$)

和稳定性,为进一步考察在生物体系中的实用性,故以下性质研究在缓冲溶液 pH 7.4 中进行。

2.2.3 探针 TPE-PEG₂₀₀₀-TPE 的时间响应性研究

为考察探针 TPE-PEG₂₀₀₀-TPE 达到最优识别效果的时间及探针的灵敏度,对探针 TPE-PEG₂₀₀₀-TPE 进行时间的响应性研究。在探针的 DMF/H₂O 溶液 (10 μmol/L, v/v, 1/4, PBS, pH = 7.4) 中加入 7 equiv 的 ONOO⁻,以荧光光谱法测试了探针溶液在不同时间点的荧光强度,结果如图 4 所示。探针 TPE-PEG₂₀₀₀-TPE 与 ONOO⁻ 作用后,随着时间的延长荧光强度逐渐降低,约 4 min 后荧光强度趋于稳定,结果表明探针 TPE-PEG₂₀₀₀-TPE 对 ONOO⁻ 的响应时间短,灵敏度高,因此后期实验均采用 4 min 后进行测试。

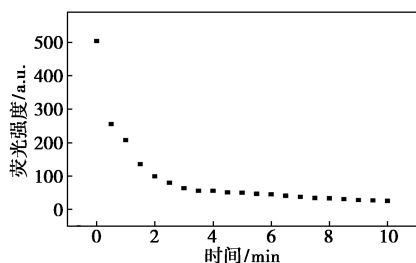


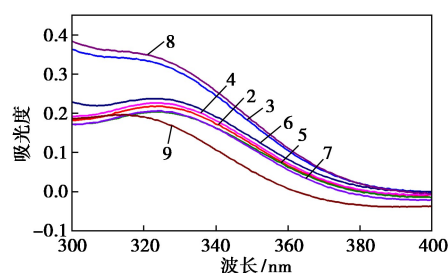
图 4 探针 TPE-PEG₂₀₀₀-TPE 的 DMF/H₂O (10 μmol/L, v/v, 1/4, PBS, pH = 7.4) 溶液中加入 ONOO⁻ 后的时间响应荧光光谱 (λ_{Ex} = 326 nm)

2.3 探针 TPE-PEG₂₀₀₀-TPE 的光谱性能研究

2.3.1 探针 TPE-PEG₂₀₀₀-TPE 对活性氧/氮、金属离子的选择性识别研究

(1)用紫外-可见吸收光谱法考察探针 TPE-PEG₂₀₀₀-TPE 的选择性识别性能

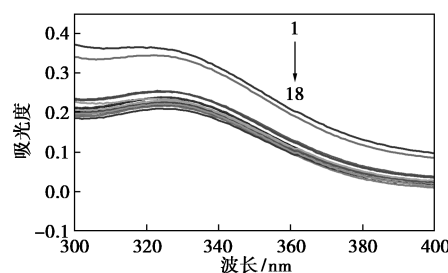
基于探针 TPE-PEG₂₀₀₀-TPE 聚集诱导测试结果及条件筛选结果,分别配制加入不同 ROS/RNS、金属离子 (7 equiv) 的探针 TPE-PEG₂₀₀₀-TPE 的 DMF/H₂O 溶液 (10 μmol/L, v/v, 1/4, PBS, pH = 7.4),以紫外-可见吸收光谱法研究了选择性能,结果如图 5 所示。空白探针 TPE-PEG₂₀₀₀-TPE 溶液的最大吸收波长在 325 nm,可能是由于探针结构中存在 π-π* 跃迁产生 K 带和 R 带;而当加入 ONOO⁻ 后探针溶液最大吸收波长从 325 nm 蓝移到了 315 nm 处,吸收强度由 0.218 下降至 0.196。在其他活性氧/氮、金属离子存在下,探针溶液均没有发生上述变化,产生这一变化的原因可能是 ONOO⁻ 促使探针中的助色团聚乙二醇链发生断裂,引起最大吸收波长发生部分蓝移。结果表明该探针可以实现对 ONOO⁻ 的专一性识别。



1—空白;2—¹O₂;3—TBO⁻;4—ClO⁻;5—TBHP;6—NO⁻;7—H₂O₂;8—·OH;9—ONOO⁻

(a) 探针 TPE-PEG₂₀₀₀-TPE 与等量的 ROS/RNS (7 equiv)

紫外-可见吸收光谱



1—Li⁺;2—Ag⁺;3—K⁺;4—Na⁺;5—Hg²⁺;6—Mg²⁺;7—Cd²⁺;8—Pd²⁺;9—Mn²⁺;10—Ni²⁺;11—Co²⁺;12—Ba²⁺;13—Ca²⁺;14—Cu²⁺;15—Zn²⁺;16—Cr³⁺;17—Al³⁺;18—Fe³⁺

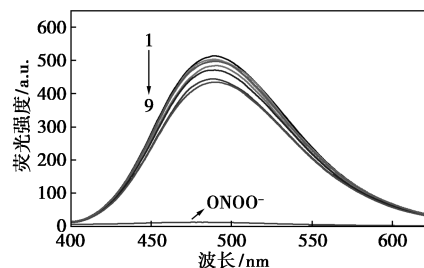
(b) 探针 TPE-PEG₂₀₀₀-TPE 与等量的金属离子 (7 equiv)

荧光光谱

图 5 探针 TPE-PEG₂₀₀₀-TPE 的 DMF/H₂O 溶液 (10 μmol/L, v/v, 1/4, PBS, pH = 7.4) 的紫外-可见吸收光谱

(2)用荧光光谱法考察探针 TPE-PEG₂₀₀₀-TPE 的选择性识别性能

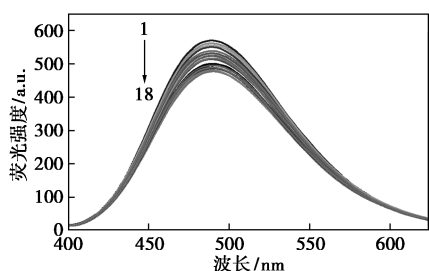
在探针 TPE-PEG₂₀₀₀-TPE 的 DMF/H₂O 溶液 (10 μmol/L, v/v, 1/4, PBS, pH = 7.4) 中分别加入 7 equiv 的 ROS/RNS 或金属离子 (TBHP、NO⁻、¹O₂、·OH、TBO⁻、H₂O₂、ClO⁻、ONOO⁻、Al³⁺、Li⁺、Ag⁺、K⁺、Na⁺、Cr³⁺、Hg²⁺、Mg²⁺、Fe³⁺、Cd²⁺、Pd²⁺、Ni²⁺、Co²⁺、Ba²⁺、Ca²⁺、Cu²⁺、Mn²⁺、Zn²⁺),探究探针的选择性识别能力。结果如图 6 所示,只有 ONOO⁻ 的加入能使



1—空白;2—TBHP;3—NaClO;4—H₂O₂;5—¹O₂;6—NO⁻;7—TBO⁻;8—·OH;9—ONOO⁻

(a) 探针 TPE-PEG₂₀₀₀-TPE 与等量的 ROS/RNS (7 equiv)

荧光光谱



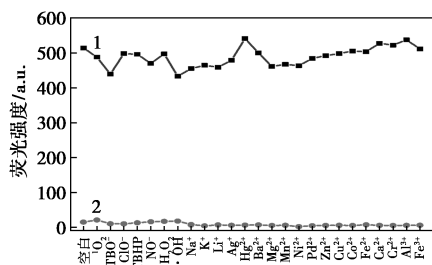
1—Li⁺; 2—Ag⁺; 3—K⁺; 4—Na⁺; 5—Hg²⁺; 6—Mg²⁺; 7—Cd²⁺; 8—Pd²⁺; 9—Mn²⁺; 10—Ni²⁺; 11—Co²⁺; 12—Ba²⁺; 13—Ca²⁺; 14—Cu²⁺; 15—Zn²⁺; 16—Cr³⁺; 17—Al³⁺; 18—Fe³⁺
(b) 探针 TPE-PEG₂₀₀₀-TPE 与等量的金属离子 (7 equiv) 荧光光谱

图 6 探针 TPE-PEG₂₀₀₀-TPE 的 DMF/H₂O 溶液 (10 μmol/L, v/v, 1/4, PBS, pH = 7.4) 的荧光光谱 (λ_{Ex} = 326 nm)

得探针在 490 nm 处荧光发生猝灭, 荧光强度由 513 降至 11, 猝灭比为 97.86%, 而其他离子的加入则无明显变化。结果表明探针 TPE-PEG₂₀₀₀-TPE 对 ONOO⁻ 具有特异选择性, 此外, 该探针还具有较大的 Stokes 位移 (164 nm), 可有效避免检测中的荧光背景干扰和内滤效应。

2.3.2 探针 TPE-PEG₂₀₀₀-TPE 的抗干扰能力研究

为了验证探针 TPE-PEG₂₀₀₀-TPE 的选择性, 用 7 equiv 的 ROS/RNS 或金属离子与 ONOO⁻ 共存时进行了抗干扰实验。在探针 TPE-PEG₂₀₀₀-TPE 的 DMF/H₂O 体系 (10 μmol/L, v/v, 1/4, PBS, pH = 7.4) 中分别加入 7 equiv 的 ROS/RNS 或金属离子的溶液, 然后再分别加入 7 equiv 的 ONOO⁻ 溶液, 以荧光光谱法进行抗干扰性能测试。结果如图 7 所示, 当探针 TPE-PEG₂₀₀₀-TPE 与除 ONOO⁻ 溶液外的不同离子共存时, 与空白相比这些离子不会使探针



1—未加入 ONOO⁻ 的活性氧; 2—加入 ONOO⁻ 的活性氧

图 7 探针 TPE-PEG₂₀₀₀-TPE 的 DMF/H₂O 溶液 (10 μmol/L, v/v, 1/4, PBS, pH = 7.4) 中 ONOO⁻ (7 equiv) 与其他离子共存时的荧光强度对比图 (λ_{Ex} = 326 nm)

发生荧光猝灭, 荧光强度在 433 ~ 541 之间, 而加入 ONOO⁻ 溶液后, 探针溶液在 490 nm 处均发生了荧光猝灭, 表明该探针具有很强的抗干扰能力, 有望适用于复杂的生物环境中。

2.3.3 探针 TPE-PEG₂₀₀₀-TPE 的浓度响应性探究

为进一步评价探针 TPE-PEG₂₀₀₀-TPE 对 ONOO⁻ 的选择识别的实用性, 进行了浓度响应性实验研究。在探针 TPE-PEG₂₀₀₀-TPE 的 DMF/H₂O (10 μmol/L, v/v, 1/4, PBS, pH = 7.4) 溶液中分别加入不同浓度的 ONOO⁻ 溶液 (0 ~ 90 μmol/L), 以荧光光谱法进行探针溶液的浓度响应性能探究。由图 8 可知, 探针 TPE-PEG₂₀₀₀-TPE 溶液与不同浓度的 ONOO⁻ 溶液 (0 ~ 90 μmol/L) 处理后, 荧光强度随加入 ONOO⁻ 物质的量增大而减小, 最大发射波长由 490 nm 蓝移至 470 nm, ONOO⁻ 浓度在 10 ~ 45 μmol/L 范围内与荧光强度有良好的线性关系, 线性方程 $y = -9.6068 \times 10^6 x + 489.0588$, R^2 为 0.9930, 并通过检出限公式 $DOL = 3S/k$, 其中 k 是荧光强度与 ONOO⁻ 浓度的斜率, S 是空白标准偏差, 得出检出限为 1.26×10^{-6} mol/L。结果表明, 探针 TPE-PEG₂₀₀₀-TPE 能够灵敏响应 ONOO⁻, 在线性范围内, 该探针可对 ONOO⁻ 可进行定量分析。

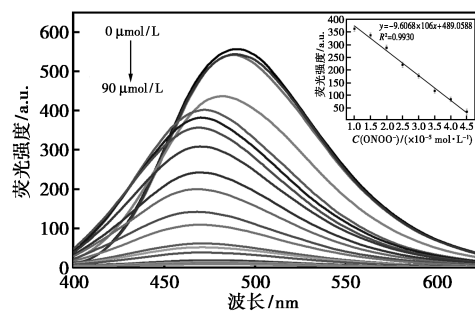


图 8 探针 TPE-PEG₂₀₀₀-TPE 的 DMF/H₂O 溶液 (10 μmol/L, v/v, 1/4, PBS, pH = 7.4) 与不同浓度 ONOO⁻ (0 ~ 90 μmol/L) 作用后的荧光光谱 (内图为荧光强度与 ONOO⁻ 浓度的线性关系, $R^2 = 0.9930$)

2.3.4 探针 TPE-PEG₂₀₀₀-TPE 识别 ONOO⁻ 可能机制的推断

首先通过薄层色谱法初步探究探针 TPE-PEG₂₀₀₀-TPE 对 ONOO⁻ 的识别机制, 将探针溶于 CH₃CH₂OH/H₂O 溶液 (v/v, 1/4) 中, 加入过量 ONOO⁻, 室温下反应 10 min。将探针 TPE-PEG₂₀₀₀-TPE 与 ONOO⁻ 反应后的混合物与荧光母体 TPE-NH₂、四苯乙烯衍生物 TPE-COOH 以及探针 TPE-

PEG₂₀₀₀-TPE 的薄层色谱板进行对比发现(图9): 探针 TPE-PEG₂₀₀₀-TPE 和 ONOO⁻ 的混合体系与 TPE-COOH 在同一高度,极性相似。初步判断该探针与 ONOO⁻ 响应的机制为探针 TPE-PEG₂₀₀₀-TPE 在 ONOO⁻ 的作用下,促进酯键水解引起断裂脱除聚乙二醇基,生成了 TPE-COOH,从而引起荧光变化,达到识别的效果。然后进一步对探针 TPE-PEG₂₀₀₀-TPE-ONOO⁻ 混合物进行了高分辨质谱法分析,其中 $m/z=474.21$ 处的峰可归因于 TPE-COOH 的分子离子峰($M=75.21 \text{ mol}^{-1}$),验证了探针 TPE-PEG₂₀₀₀-TPE 在 ONOO⁻ 作用下通过酯基水解反应生成了 TPE-COOH 的反应机制。

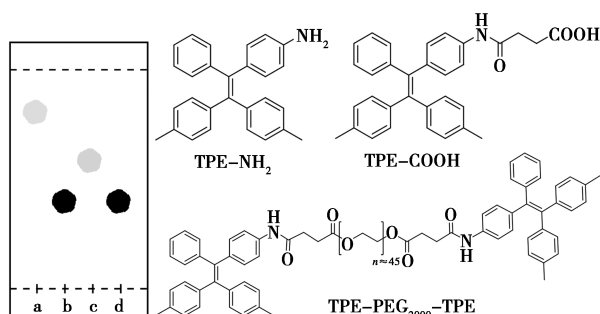


图9 探针 TPE-PEG₂₀₀₀-TPE 与 ONOO⁻ 反应的在 254 nm 紫外灯下薄层色谱图(a: 荧光母体 TPE-NH₂; b: 四苯乙烯衍生物 TPE-COOH; c: 探针 TPE-PEG₂₀₀₀-TPE; d: 探针 TPE-PEG₂₀₀₀-TPE 和 ONOO⁻ 反应; 展开剂为 二氯甲烷: 甲醇 = 10:1)

通过薄层色谱法和高分辨质谱法的实验结果, 推测该探针与 ONOO⁻ 反应过程如图 10 所示, 在 ONOO⁻ 作用下, 促使探针 TPE-PEG₂₀₀₀-TPE 水解发生酯键断裂, 从而产生 TPE-COOH。由于 TPE-

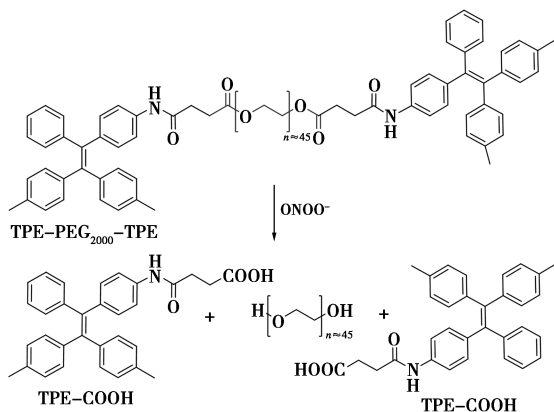


图10 探针 TPE-PEG₂₀₀₀-TPE 与 ONOO⁻ 反应的可能过程

COOH 水溶性大, 在水溶液中易于分散, 故而导致荧光猝灭, 从而达到识别 ONOO⁻ 的目的。

3 结论

通过亲核取代反应以聚乙二醇 2000 修饰四苯乙烯, 得到了探针 TPE-PEG₂₀₀₀-TPE。该探针具有良好的聚集诱导特性和水溶性, 并且探针 TPE-PEG₂₀₀₀-TPE 的 DMF/H₂O 溶液(10 μmol/L, v/v, 1/4, PBS, pH=7.4) 随 7 equiv 的 ONOO⁻ 加入, 猝灭比可达 97.86%, 实现了对 ONOO⁻ 的特异性“turn-off”识别, 检出限为 $1.26 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$, 具有较大的 Stokes 位移(164 nm)、良好的选择性和抗干扰性。还通过薄层色谱法和高分辨质谱法研究了探针 TPE-PEG₂₀₀₀-TPE 的识别机制, 探针与 ONOO⁻ 发生酯基水解, 生成 TPE-COOH, 从而发生荧光变化。总之, 探针 TPE-PEG₂₀₀₀-TPE 可作为一种具有高灵敏性和专一选择性的 ONOO⁻ 荧光探针, 并有望在生物体系或环境中发挥应用价值。

参考文献

- [1] 王阳, 黄楚森, 贾能勤. 监测细胞微环境及活性分子的有机小分子荧光探针[J]. 化学进展, 2020, 32(S1): 204-218.
- [2] Abot A, Fried S, Cani P D, et al. Reactive oxygen species/reactive nitrogen species as messengers in the gut: Impact on physiology and metabolic disorders[J]. Antioxid Redox Signaling, 2022, 37(4/5/6): 394-415.
- [3] Li Y Y, Tu L, Ma X, et al. Engineering a smart nanofluidic sensor for high-performance peroxynitrite sensing through a spirocyclic ring open/close reaction strategy[J]. ACS Sens, 2021, 6(3): 808-814.
- [4] Korkmaz A, Oter S, Seyrek M, et al. Molecular, genetic and epigenetic pathways of peroxynitrite-induced cellular toxicity[J]. Interdisciplinary Toxicol, 2009, 2(4): 219.
- [5] Anushree G, Aravind P, Vinod D, et al. Peroxynitrite-induced conformational changes in DNA that lead to cell death: UV, CD spectral, molecular dynamics simulation and FACS analysis[J]. Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids, 2020, 40(1): 1-15.
- [6] Su H, Ji X, Zhang J, et al. Red-emitting fluorescent probe for visualizing endogenous peroxynitrite in live cells and inflamed mouse model[J]. J Mol Struct, 2022, 1265: 133443.
- [7] Qin S, Lu H, Zhang J, et al. An activatable reporter for fluorescence imaging drug-induced liver injury in diverse cell lines and in vivo[J]. Dyes Pigments, 2022, 203: 110345.
- [8] Chen H Y, Kouadio F E, Jiang L, et al. Simultaneous detection of intracellular nitric oxide and peroxynitrite by a surface-enhanced Raman scattering nano sensor with dual reactivity[J]. ACS Sens, 2019, 4(12): 3234-3239.
- [9] Cao J, An W, Reeves A G, et al. A chemiluminescent probe for cel-

- lular peroxynitrite using a selfimmolative oxidative decarbonylation reaction[J]. Chem Sci, 2018, 9(9): 2552–2558.
- [10] Quinton D, Griveau S, Bedioui F. Electrochemical approach to detect the presence of peroxynitrite in aerobic neutral solution[J]. Electrochem Commun, 2010, 12(10): 1446–1449.
- [11] Wang J, Liu Y, Dong C, et al. Ratiometric imaging of peroxynitrite in live cells, *Locusta* Malpighian tubes and zebrafish by a benzothiazole-based mitochondria-targetable fluorescent probe[J]. J Lumin, 2023, 254: 119504.
- [12] Zeng X, Chen X, Chen J, et al. A simple highly selective ratiometric fluorescent probe for detection of peroxynitrite and its bioimaging applications[J]. Dyes Pigments, 2022, 210: 110993.
- [13] Zheng Y L, Li X C, Tang W, et al. A coumarin-based fluorescent probe: Small but multi-signal [J]. Sens Actuators B, 2022, 368: 132169.
- [14] Wu J, Lin Y, Yu Y, et al. A highly selective and sensitive fluorescence probe based on Rhodol for imaging of endogenous peroxynitrite in living cells[J]. Dyes Pigments, 2022, 206: 110597.
- [15] Ma L, Yang Q, Zan Q, et al. A benzothiazole-based fluorescence probe for imaging of peroxynitrite during ferroptosis and diagnosis of tumor tissues[J]. Anal Bioanal Chem, 2022, 414(27): 7753–7762.
- [16] Yan Z, Tang Z, Wang X, et al. A novel Golgi-targetable fluorescent probe for imaging peroxynitrite in Golgi stress and sepsis-induced acute lung injury[J]. Sens Actuators B, 2022, 369: 132352.
- [17] Wen L, Ma X, Yang J, et al. A new ratiometric design strategy based on modulation of Π -conjugation unit for developing fluorescent probe and imaging of cellular peroxynitrite[J]. Anal Chem, 2022, 94(11): 4763–4769.
- [18] Wu Y, Shi A, Li Y, et al. A near-infrared xanthene fluorescence probe for monitoring peroxynitrite in living cells and mouse inflammation model[J]. Analyst, 2018, 143(22): 5512–5519.
- [19] Huang Y, Yu L, Fu L, et al. Molecular fluorescent probes for imaging and evaluation of peroxynitrite fluctuations in living cells and in vivo under hypoxic stress [J]. Sens Actuators B, 2022, 370: 132410.
- [20] Feng S, Zheng Z, Gong S, et al. A unique probe enables labeling cell membrane and Golgi apparatus and tracking peroxynitrite in Golgi oxidative stress and drug-induced liver injury [J]. Sens Actuators B, 2022, 361: 131751.
- [21] Peng C, Yang J, Li W, et al. Development of probes with high signal-to-noise ratios based on the facile modification of xanthene dyes for imaging peroxynitrite during the liver ischemia/reperfusion process [J]. Anal Chem, 2022, 94(30): 10773–10780.
- [22] Su H, Wang N, Zhang J, et al. An activatable fluorescent probe for monitoring the up-regulation of peroxynitrite in drug-induced hepatotoxicity model[J]. Dyes Pigments, 2022, 203: 110341.
- [23] Pan D, Don Y, Lu Y, et al. AIE fluorescent probe based on tetraphenylethylene and morpholine-thiourea structures for detection of HClO [J]. Anal Chim Acta, 2022, 1235: 340559.
- [24] Guo B, Shu W, Liu W, et al. Mitochondria-specific ultrasensitive ratiometric AIE probe for imaging endogenous peroxynitrite [J]. Sens Actuators B, 2021, 344: 130206.
- [25] Zhang J, Liang M, Wang X, et al. Visualizing peroxynitrite fluxes in myocardial cells using a new fluorescent probe reveals the protective effect of estrogen [J]. Chem Commun, 2019, 55(47): 6719–6722. ■

(上接第 229 页)

进行测定, 滴定剂为 0.01 mol/L 硝酸银标准溶液。测定范围为质量分数 0.60%~1.80%, 方法重复性为 0.03%, 再现性为 0.15%。

通过干扰考察发现, 重整催化剂上存在的碳和硫元素对测定没有明显干扰, 如果存在其他卤素, 则 F^- 对测定没有明显干扰, 但 Br^- 和 I^- 对测定有明显干扰。采用加标回收实验、标准样品检测实验及方法间比对实验证明该方法准确、可靠, 与现行炼油企业常用标准检测结果无显著性差异。

采用碱溶-电位滴定法测定重整催化剂中的氯含量, 价格低、稳定性好、检测下限低, 可在炼厂推广应用。建立了标准 NB/SH/T 6060—2022《重整催化剂中氯含量的测定 电位滴定法》, 该方法已实施, 建议相关单位可根据该标准及本文中建立相应分析方法, 完善重整催化剂中氯含量的测定。

参考文献

- [1] 林世雄. 石油炼制工程[M]. 北京: 石油工业出版社, 2007: 488–493.
- [2] 徐承恩. 催化重整工艺与工程[M]. 北京: 中国石化出版社, 2006: 507–510.
- [3] Conrad A L, Evans J K. Determination of platinum, sulfur, and chlorine in platinum reforming catalysts [J]. Analytical Chemistry, 1960, 32(1): 46–49.
- [4] Peddy R, Kalpana G, Koshy V J, et al. Determination of the platinum, rhenium and chlorine contents of alumina-based catalysts by X-ray fluorescence spectrometry [J]. Analyst, 1991, 116(8): 847.
- [5] 赵碧良, 郭振, 王世聪. X 射线荧光光谱法测定重整铂催化剂中氯 [J]. 化学分析计量, 2020, 29(2): 75–78.
- [6] SH/T 0343—1992(2004). 催化剂中氯含量测定法(离子选择电极法)[S].
- [7] Total chloride in alumina and silica-Alumina catalysts by microwave digestion and potentiometric titration: UOP291-2015[S].
- [8] 吕娟, 姜素玉. 离子色谱法同时测定重整催化剂中 Cl^- 、 NO_3^- 和 SO_4^{2-} [J]. 石油炼制与化工, 1996, (11): 65–67.
- [9] 赵雅郡, 谢莉, 周勇, 等. 淋洗液自动发生-离子色谱法测定重整催化剂中氯的含量 [J]. 分析化学, 2011, 39(3): 429–431.
- [10] 迟莹, 单红飞, 赵素云, 等. 自动电位滴定仪和盐含量测定仪测定催化剂中氯含量的比较 [J]. 当代化工, 2018, 47(7): 1537–1540.
- [11] 王安川. 硫氰酸汞分光光度法测定重整催化剂中的氯含量 [J]. 石油炼制与化工, 1991, (10): 64.
- [12] 赵雅郡, 潘锦程, 周勇, 等. 重整催化剂中氯含量的测定方法与选择 [J]. 石油炼制与化工, 2016, 47(1): 101–104. ■