硫醇亲核反应及其荧光识别研究

岳永康^①, 霍方俊^②, 阴彩霞^{①*}^① 化学生物学与分子工程教育部重点实验室, 能量转换与存储材料山西省重点实验室, 山西大学分子科学研究所, 太原 030006^② 山西大学应用化学研究所, 太原 030006

*通讯作者, E-mail: yincx@sxu.edu.cn

收稿日期: 2016-07-01; 接受日期: 2016-08-02; 网络版发表日期: 2016-11-17

国家自然科学基金(编号: 21472118)、山西省优秀青年基金(编号: 2014021002)和山西省人才支持项目(编号: 2014401)资助

摘要 生物小分子硫醇以其重要的生理学和病理学作用受到科学家们的广泛关注. 近些年来, 利用荧光探针对其浓度的测定方法得到了极大的发展. 本文以硫醇亲核反应机理为主线, 对本课题组近年来在硫醇探针的设计及其识别性能研究方面的工作进行了系统总结, 并讨论了硫醇荧光探针今后的设计思路和重点研究方向.

关键词 硫醇, 亲核反应, 荧光探针, 成像, 识别

1 引言

生物小分子硫醇包括半胱氨酸(Cysteine, Cys)、同型半胱氨酸(Homocysteine, Hcy)、还原型谷胱甘肽(Glutathione, GSH), 其在体内参与了大量的生物过程, 在机体代谢中扮演着重要的角色.

L-Cys 是 20 种天然氨基酸中唯一具有还原性巯基(-SH)的氨基酸, 其与 L-胱氨酸的结构转变能够调节细胞内活性氧(ROS)的水平, 起到抗衰老的作用^[1]. 半胱氨酸水平偏低会导致许多综合症如儿童生长缓慢、毛发色素脱失、皮肤病变等. 成人细胞中 Cys 的含量为 30~200 μM , 血浆中可达到 300 μM ^[2]. 半胱氨酸在医药、食品添加剂及化妆品领域有着广泛的应用, 具有重要的生物化学研究价值^[3].

Hcy 是蛋氨酸和半胱氨酸代谢过程中一个重要的中间产物, 它在体内主要通过再甲基化、转硫作用两种途径进行代谢. 此过程中涉及的酶及辅酶的缺

失会引起 Hcy 在细胞及血液中的累积. 过量的 Hcy 在氨基酰-tRNA 合成酶的作用下, 生成同型半胱氨酸硫内酯(HTL). HTL 可以直接或间接导致血管内皮细胞损伤, 促进血管平滑肌细胞增殖, 增强血小板功能, 促进血栓形成. 医学研究表明, 成年人血清中总 Hcy 的安全范围为 9~13 μM , 高于 15 μM 则属于高同型半胱氨酸血症, 增大患心血管和脑血管疾病的风险^[4,5]. 人体血浆总 Hcy 的水平已经成为临床预测患心脏病、中风和老年痴呆症的主要指标.

GSH 是一种由谷氨酸、半胱氨酸及甘氨酸构成的含有巯基的三肽, 是机体内的重要活性物质. 作为细胞内主要的抗氧化物质之一, GSH 与氧化型谷胱甘肽的转变能够有效特异地清除细胞内自由基, 起到保健、抗衰老的作用. 研究表明, 肿瘤细胞的增殖过程中会产生大量的氧化性物质(ROS), 而氧化性物质的过量分泌会诱导细胞的凋亡. 因此, 人为调控谷胱甘肽的水平能够极化肿瘤细胞中氧化还原过程的平

引用格式: 岳永康, 霍方俊, 阴彩霞. 硫醇亲核反应及其荧光识别研究. 中国科学: 化学, 2016, 47: 249-257

Yue Y, Huo F, Yin C. Thiol nucleophilic reactions and their applications in thiol fluorescent recognition. *Sci Sin Chim*, 2016, 47: 249-257, doi: 10.1360/N032016-00138

衡从而实现肿瘤细胞的靶向清除^[6,7]。同时, GSH 的三肽结构能够与铅、汞、砷等重金属离子生成稳定的配合物从体内排出, 起到解毒作用, 维持正常的新陈代谢过程和免疫系统的功能。正常人体细胞中 GSH 含量为 1~10 mM, 血浆中为 2 μ M^[8]。而癌症患者由于其体内谷胱甘肽过氧化物酶活力降低导致 GSH 水平偏高。因此, 测定血浆中 GSH 浓度在癌症早期诊断中具有重要意义。

此外, 具有活性巯基的高毒性芳香类化合物苯硫酚及其衍生物广泛应用于农药、医药生产和高分子聚合物合成。苯硫酚在鱼类体内的半数致死浓度为 0.01~0.4 mM^[9,10]。人体暴露于苯硫酚蒸气中会引起包括中枢神经系统损伤、肢体麻痹、昏迷甚至死亡等一系列严重机体损害^[11]。准确分析苯硫酚的浓度日益受到人们的关注。

荧光探针以其高选择性、高灵敏性、非侵入性等优点被广泛应用于生物小分子、金属离子和阴离子的识别检测, 其在生物标记、成像中的应用前景尤为突出^[12~17]。1981 年, Sippel^[18]报道了基于硫醇-马来酰亚胺亲核加成过程识别硫醇的荧光探针。近些年来, 用于硫醇识别的反应类型不断扩充, 包括亲核加成^[19]、亲核取代^[20,21]、硫醇-色烯点击开环^[22]、金属离子配位^[23]、亲核取代-分子内环化重排^[24,25]等设计机理被广泛开发, 探针响应从对 3 种生物小分子硫醇特异识别到对其区分识别^[26,27], 生物应用从细胞标记到组织、活体成像^[28,29], 荧光探针用于硫醇识别得到了空前的发展。但是, 针对 3 种生物小分子硫醇的活性研究依然处于模糊状态, 其在体内的生理学和病理学作用机制研究因此受到严重限制。为了进一步促进硫醇荧光探针的发展、深化硫醇检测标记的应用, 我们创新地将“硫醇-色烯点击”反应引入硫醇识别领域, 开发了一系列色烯衍生物用于硫醇高选择性识别研究。同时, 利用优良荧光活性的三苯胺、萘酰亚胺、香豆素、荧光素等荧光团发展了系列基于亲核反应历程的硫醇荧光探针。本文将针对本课题组近年来在硫醇荧光探针设计识别方面的工作做全面论述, 以期今后硫醇荧光探针的设计发展提供参考。

2 基于“硫醇-色烯点击”化学的硫醇探针

色烯又称为苯并吡喃, 是一类具有优秀光谱学性质的重要的有机化合物。其衍生物苯并- α -吡喃酮

和苯并- γ -吡喃酮广泛存在于植物中, 是许多天然药物的结构单元。苯并- α -吡喃酮(即香豆素)被广泛应用于光学探针的设计^[30]。我们利用咪唑作为催化剂, 通过水杨醛和环戊烯酮的 Baylis-Hillman 反应, 合成制备了一系列具有极化双键的色烯衍生物。其共轭羰基对碳碳双键的极化作用为硫醇亲核反应提供了可能。硫醇-色烯点击开环过程具有优秀的特异性, 其亲核加成-分子内电子转移过程极大地改变了色烯分子的共轭体系和平面结构, 导致其在紫外-可见光谱和荧光光谱上发生剧烈的变化(图 1)。

2009 年, 我们报道了含有增色团硝基的色烯衍生物 **1** 用于硫醇的识别检测^[22]。结合探针和探针-巯基丙酸体系在二甲基亚砜- d_6 (DMSO- d_6) 中 ^1H 谱峰位移变化及探针-巯基丙酸体系的 ^1H - ^1H 相关谱数据, 确定了色烯分子 **1** 对硫醇特异性响应的产物, 并对其响应机制进行了阐述。探针 **1** 在 Hepes 缓冲溶液(pH 7.0, 含有 1% EtOH)中为无色溶液。随着 Cys 溶液的加入, 巯基对色烯分子的亲核过程破坏了色烯分子共轭结构, 生成对硝基酚单元, 体系的最大吸收峰由 292 nm 红移至 405 nm (红移 113 nm), 颜色由无色变为黄色。通过对 405 nm 处紫外吸收强度的检测, 我们对其反应动力学(拟一级反应)进行了测定。探针 **1** 与 Cys 在 pH 7.0、25 $^\circ\text{C}$ 体系中的反应速率常数 k_{obs} 为 0.62 s^{-1} , 半衰期 $t_{1/2}$ 为 1.0 s, 说明在该实验条件下探针 **1** 与硫醇可快速反应。探针对 Hcy 和 GSH 体现出类似的响应。本研究中, 我们将这一识别反应定义为硫醇-色烯点击开环反应。同时, 包括 Ala、Arg、Asn、Asp、Gln、Glu、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr、Val、 F^- 、 Cl^- 、 Br^- 、 I^- 、 AcO^- 、 SCN^- 、 NO_3^- 、 SO_4^{2-} 、 CO_3^{2-} 、 OOC^- 、 PO_4^{3-} 、 Na^+ 、 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Ba^{2+} 、 V^{4+} 、 Cr^{3+} 、 Mn^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Al^{3+} 、

图 1 色烯衍生物的合成通式及“硫醇-色烯点击开环”反应机理

Ga^{3+} 、 Sn^{2+} 、 Zr^{4+} 、 Ce^{3+} 、 Nd^{3+} 、 Sm^{3+} 、 Eu^{3+} 、 Er^{3+} 、 Tb^{3+} 、 Ho^{3+} 和 Yb^{3+} 等氨基酸和离子不干扰探针 **1** 对硫醇的测定. 进一步的研究中, 我们合成了色烯衍生物 **2**^[31]. 在含有 **2** 的 Tris-HCl 缓冲溶液(pH 8.0)中加入硫醇会引起体系在 250、302 和 377 nm 处紫外吸收峰逐渐降低, 颜色由淡黄色逐渐变为无色. 伴随着紫外光谱图的变化, 体系在 550 nm 处荧光逐渐淬灭($\lambda_{\text{ex}}=380$ nm), 其对 Cys 的线性响应浓度范围为 0.3~3.9 μM (图 2). 有趣的是, 在探针 **2** 与 Cys 作用后的体系中加入 Hg^{2+} 后, 体现出以上光学变化的逆过程, 且此可逆过程可以有效循环数次. 机理研究发现, 该过程是汞离子诱导的脱巯基-酚羟基分子内亲核加成环化历程(图 3). 此过程在实现了探针 **2** 可再生的同时, 提供了硫醇、 Hg^{2+} ON-OFF-ON 连续识别的研究思路.

为了优化色烯探针的荧光性能, 我们利用 7-羟基香豆素为原料, 设计合成了探针 **3** 用于硫醇特异性识别(图 4)^[32]. 探针 **3** 在 Hepes 缓冲溶液(pH 7.4)体系中, 在 320 nm 处有强的紫外吸收. 随着 Cys 的逐渐加入, 体系在 372 nm 处出现新峰并在 350 nm 处有等吸收点. 探针在该体系中体现弱荧光发射, 加入 Cys 后, 455 nm 处荧光强度逐渐增强至原体系的两倍. 探针 **3** 对 Cys、Hcy 和 GSH 体现了很好的选择性, 其检出限分别为 0.18、0.82 和 0.70 μM . 通过理论计算, 我们对探针和 Cys 作用前后结构进行了优化, 对其反应前后的紫外及荧光响应做了理论分析, 从理论计算角度对其响应机理进行了进一步论证. 探针与 Cys 的后反应体系在加入 Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 和 Hg^{2+} 后, 其紫外和荧光光谱图体现出以上过程的逆过程. 其他金属离子不

图 2 探针 **1** 及其对 Cys 特异性响应紫外可见光谱图^[20] (网络版彩图)

图 3 探针 **2** 及其对硫醇、汞离子连续识别示意图^[31] (网络版彩图)

图 4 基于香豆素的色烯衍生物 **3**^[32] (网络版彩图)

干扰该后反应体系对 Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 和 Hg^{2+} 的定量测定, 其对 3 种金属离子的检出限分别为 0.058、0.065 和 0.072 μM . 该探针可用于血浆中硫醇的检测和内源性生物硫醇的标记成像.

生物硫醇由于其结构的相似性, 前述色烯分子对 3 种生物硫醇均显示了类似的光学响应. 为了开发能够对单一生物硫醇的特异性识别的色烯分子, 我们设计合成了化合物 **4**^[33]. 探针 **4** 在 Hepes 缓冲溶液(pH 7.4, 含有 50% DMSO)中, 在 270 和 387 nm 处有较强紫外吸收, Cys 的加入引起这两处吸收峰降低, 同时在 342 nm 处有新的吸收峰出现. 伴随着紫外吸收的变化, 体系在 515 nm 处荧光强度激增, 最终达

到 10 倍荧光增强. 而在分别加入 10 当量的 Hcy 和 GSH 后, 体系紫外吸收光谱和荧光光谱均体现出微弱变化, 竞争性实验证实了包括 Hcy 和 GSH 在内的其他氨基酸不干扰探针 **4** 对 Cys 的特异检测. 同时, 我们在适用 pH 体系测定实验中发现, 在弱酸性和中性环境中, 探针与 Cys 没有荧光响应, 随着 pH 的增大, 探针与 Cys 响应速率逐渐加快, 同时体系荧光强度大幅升高, 说明硫醇-色烯点击开环过程是碱催化过程, 这也进一步证实了之前报道的 RSH-RS^- 在不同 pH 环境中解离平衡对巯基亲核活性的影响^[34,35]. 探针 **4** 对 Cys 的检出限为 64 nM 且能够用于内源性 Cys 的成像标记(图 5).

3 基于亲核加成历程的硫醇探针

马来酰亚胺衍生物自 1981 年报道用于硫醇识别检测以来, 基于其为反应位点设计的硫醇荧光探针被广泛开发, 针对香豆素、荧光素、BODIPY、萘酰亚胺等荧光团修饰的马来酰亚胺衍生物均有报道用于硫醇选择性识别^[36]. *N*-甲基马来酰亚胺(NMM)和 *N*-乙基马来酰亚胺(NEM)作为高效的硫醇捕获剂, 现已广泛应用作细胞内源性硫醇的清除剂^[37,38]. 马来

酰基具有强的吸电子能力, 其与荧光团中氨基作用后, 能够引起由荧光团到马来酰亚胺结构单元的光致电子转移(d-PET)过程, 从而使探针分子荧光淬灭. 硫醇对马来酰亚胺的亲核加成过程使得马来酰基双键断裂, 弱化了其吸电子能力, d-PET 过程被抑制, 进而改变了荧光团的荧光活性, 实现探针分子对硫醇的荧光检测(图 6). 但是, 对于大部分基于马来酰亚胺识别硫醇的反应, 其反应过程中的紫外吸收光谱变化较小, 这也限制了其用于比色检测硫醇的应用. 与马来酰亚胺结构单元类似, 丙烯酰基也具有极化的 $\alpha\text{-}\beta$ 不饱和核性中心, 该中心与硫醇的 Michael 加成反应过程可以实现硫醇的特异性识别.

通过两步反应, 对 1,8-萘二甲酸酐进行修饰, 制备得到探针 **5** 并用于硫醇识别检测^[39]. 探针 **5** 对 Cys、Hcy 和 GSH 体现了极好的选择性和较高的灵敏性, 其在水体系中对 3 种生物硫醇的检出限分别为 135、144 和 88 nM. 其 turn-on 型荧光响应可以用于外源生物硫醇的成像标记. 但由于该探针的荧光发射波长较短, 对生物体系杀伤性较大, 我们进一步选取了荧光性能好的荧光素作为荧光团, 马来酰亚胺作为反应位点, 合成了探针 **6**^[40]. 探针 **6** 在 Hepes (pH 7.0, 75% DMSO) 溶液中没有荧光发射. 体系中加入

图 5 特异性识别 Cys 的色烯衍生物 **4** 及其生物成像应用^[33]. (a) 空白组 HepG2 细胞; (b) 20 μM 探针孵育后的 HepG2 细胞; (c) NEM 预处理的 HepG2 细胞继续孵育 20 μM 探针; (d~f) (a~c) 的相应明场(网络版彩图)

图 6 基于马来酰亚胺的硫醇荧光探针及识别机理(网络版彩图)

GSH 后会引起其在 534 nm 处荧光激增, 且在 10 s 内达到峰值. 探针 **6** 对 Cys 和 Hcy 具有类似的荧光响应. 探针 **6** 对 Cys、Hcy 和 GSH 的检出限分别为 40、34 和 26 nM. 基于其高的灵敏性和水溶性, 我们将其用于 HepG2 细胞荧光成像分析. 结果表明该探针可以用于细胞内源性生物硫醇特异性成像(图 7).

基于香豆素的探针 **7** 对 Cys 具有出色的选择性, 包括 Hcy、GSH 在内的其他氨基酸不干扰探针对 Cys 的检测^[41]. 其对 Cys 的 turn-on 型荧光响应检出限为 38 nM, 对比其他硫醇探针, 该探针具有更高的灵敏性. 该探针可以用于细胞内源性 Cys 的特异性标记成像. 在进一步的研究中, 我们对荧光团体积、水溶性进行了选择性设计合成, 得到了探针 **8**、**9** 和 **10**^[42-44]. 这 3 种荧光探针均对硫醇显示了很好的选择性, 且检出限较低. 细胞实验表明, 这 3 种荧光探针均具有较好的细胞通透性, 能够用于细胞内生物硫醇的标记检测. 表 1 中对比表明, 基于马来酰亚胺的硫醇荧光探针均对硫醇均具有高的选择性和灵敏性, 其响应速率随着荧光团结构的增大而逐渐减小, 这也反映出空间位阻效应对识别过程的影响. 同时, 水溶性较好的荧光探针能够更快速地对硫醇做出响应, 更有利于荧光探针对于生物硫醇的实时监测应用.

近期, 通过对香豆素进行修饰, 我们制备了以丙烯酰基为识别位点的探针 **11** 用于硫醇的识别. 在 pH 7.4 体系中, Cys 的加入会引起其在 499 nm 处荧光增强 44 倍. 而该体系中 **11** 对包括 Hcy 和 GSH 在内的其他氨基酸响应微弱. 在 pH 7.6 体系中, Cys 引起的 499 nm 处的荧光强度在反应 22 min 后出现下降, 并在 554 nm 处出现新峰. 相应的, 探针对 Hcy 在 499 nm 处的荧光增强响应比 pH 7.4 体系中更加明显, 且

其强度在反应 2 h 后不出现降低. GSH 和其他氨基酸不干扰 **11** 对 Cys 和 Hcy 的区分别. 随着测定体系 pH 的逐渐增大, **11** 对 Cys 的 turn-on-ratio 型荧光响应和对 Hcy 的 turn-on 型荧光响应逐渐加速. 通过核磁滴定实验, 我们确定了该识别过程是 pH 调控的硫醇对丙烯酰基的 Michael 加成和氨基对酯基的加成消去过程, 该过程实现了 **11** 对 Cys 和 Hcy 的区分别. 生物实验表明, **11** 可以在 pH 7.4 (图 8) 和 pH 7.8 (图 9) 体系中分别对 Cys 和 Hcy 特异性成像. 该微小 pH 差异对硫醇识别过程的调控为生物硫醇的区分别及其活性研究提供了新思路.

基于方酸为活性中心的探针 **12** 在 645 nm 处有强的紫外-可见光吸收, 巯基对其的亲核加成过程打破了其原有的共轭体系(图 10), 体系颜色逐渐由绿色变为无色^[45]. 同时, 其原有的在 661 nm 处的荧光发射

图 7 探针 **6** 用于内源性和外源性生物硫醇的荧光成像^[38]. (a) 空白组 HepG2 细胞; (b) 10 μ M 探针孵育后的 HepG2 细胞; (c) 10 μ M 探针预孵育的 HepG2 细胞继续孵育 50 μ M GSH; (d~f) (a~c) 的相应明场(网络版彩图)

表 1 基于马来酰亚胺的硫醇荧光探针性质总结^{a)}

探针	特异性	$\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$ (nm) FEF ^{b)}	检出限(nM)	响应时间(s)	溶剂体系
5	Cys/Hcy/GSH	310/393 4	135/144/88	20	Hepes (pH 7.0)
6	Cys/Hcy/GSH	420/534 24	40/34/26	10	Hepes (pH 7.0, 75% DMSO)
7	Cys	300/398 —	38	5	Hepes (pH 7.4)
8	Cys/Hcy/GSH	285/502 21/26/23	43/17/53	600	Hepes (pH 7.4, 75% DMSO)
9	Cys/Hcy/GSH	390/497 —	45/37/35	120	Hepes (pH 7.4, 50% DMSO)
10	Hcy/GSH	370/480 24	85/120	75	Hepes (pH 7.4, 50% MeOH)

a) 数据从原文采集; b) FEF 为荧光强度增强倍数

图8 探针 11 在 pH 7.4 体系中外源性生物硫醇荧光成像. (a) NEM 预处理的 HepG2 细胞继续孵育 5 μM 探针; (b) NEM 预处理的 HepG2 细胞孵育 5 μM 探针后, 继续孵育 100 μM Cys; (c) NEM 预处理的 HepG2 细胞孵育 5 μM 探针后, 继续孵育 100 μM Hcy; (d~f) (a~c) 的相应明场. $\lambda_{\text{ex}} = 458 \text{ nm}$, 绿色通道, $500 \pm 20 \text{ nm}$ (网络版彩图)

图9 探针 11 在 pH 7.8 体系中外源性生物硫醇荧光成像. (a) NEM 预处理的 HepG2 细胞继续孵育 5 μM 探针; (b) NEM 预处理的 HepG2 细胞孵育 5 μM 探针后, 继续孵育 100 μM Cys; (c) NEM 预处理的 HepG2 细胞孵育 5 μM 探针后, 继续孵育 100 μM Hcy; (d~f) (a~c) 的相应红色通道成像; (g~i) (a~c) 的相应明场. $\lambda_{\text{ex}} = 458 \text{ nm}$, 绿色通道, $500 \pm 20 \text{ nm}$; 红色通道, $600 \pm 25 \text{ nm}$ (网络版彩图)

逐渐淬灭. 12 对 Cys 和 Hcy 的荧光响应检出限分别为 59 和 67 nM.

半花菁染料由于其优秀的水溶性和光学性质被广泛开发用于小分子识别, 其季胺盐活性中心为亲核性物质提供了反应位点. 利用对苯二甲醛与吡啶碘盐作用, 我们合成制备了半花菁衍生物 13 用于硫醇识别^[46]. 探针 13 在 HEPES 缓冲溶液(pH 7.0, 含有 50% 二甲基甲酰胺(DMF))中在 445 nm 处有强的紫外-可见光吸收, 硫醇的加入引起其 445 nm 吸收强度降

低并在 292 nm 处出现新峰. 体系相应的荧光光谱在 545 nm 处发射强度逐渐降低. 13 对 Cys、Hcy 和 GSH 具有很好的选择性, CN^- 、 HS^- 、其他氨基酸等不干扰其对硫醇的检测(图 11).

4 基于亲核取代历程的硫醇探针

2,4-二硝基苯磺酰基和 2,4-二硝基苯酚具有强的吸电子能力, 其与荧光团连接后能够有效淬灭分子

图 10 基于方酸的硫醇荧光探针及识别机理

图 11 基于半花菁的硫醇荧光探针及识别机理

荧光发射. 同时, 由于硝基的活化作用, 2,4-二硝基苯基在亲核试剂的芳香环亲核加成过程中容易离去释放出荧光团, 恢复荧光团荧光发射, 该反应过程整体体现为亲核取代历程. 已报道的基于此历程设计开发的荧光探针可用于硫氢根离子^[47]、生物硫醇^[48]、硒醇^[35]和苯硫酚^[49]的 turn-on 型荧光识别检测.

基于 2,4-二硝基苯磺酰基的探针分子对硫醇的选择性的主要因素在于脂肪硫醇和芳香硫醇在测定体系中的亲核性强弱. 根据文献报道, Cys、Hcy、GSH 和苯硫酚的 pK_a 值分别为 $pK_{a(\text{Cys})}=8.0$ 、 $pK_{a(\text{Hcy})}=8.87$ 、 $pK_{a(\text{GSH})}=9.20$ 和 $pK_{a(\text{thiophenol})}=6.5$ ^[50,51]. 巯基负离子具有比巯基更强的亲核性. 结合前述 pH 对硫醇亲核性的影响, 这 4 种硫醇在中性环境中的亲核性顺序为苯硫酚>Cys>Hcy>GSH. 基于三苯胺的 2,4-二硝基苯磺酰基衍生物 **14** 能够用于硫醇的特异性识别检测(图 12)^[52]. 其在 440 nm 处的 turn-on 型荧光响应对 Cys、Hcy 和 GSH 的检测限分别为 37、48 和 120 nM. 该探针可用于细胞内源性硫醇的成像. 基于马来酰亚胺的 2,4-二硝基苯磺酰基衍生物 **15** 对苯硫酚及其衍生物表现出较好的选择性(图 12)^[53]. 苯硫酚对 2,4-二硝基苯基的亲核取代过程使得体系在 523 nm 处荧光强度激增 60 倍, 该过程可在 150 s 内完成. **15** 对苯硫酚的检出限为 13 nM.

5 总结与展望

硫醇亲核反应在其现有识别技术中占据主导地位, 这些基于硫醇-色焯点击开环、亲核加成、亲核取代等历程的荧光探针与硫醇的作用过程由于受到空间位阻、溶剂体系、硫醇自身亲核性的筛选, 其对硫醇的识别具有高度的特异性. 通过优化反应位点和

图 12 基于亲核取代反应的硫醇探针及识别机理

荧光团, 使可控的设计合成识别性能优异的探针分子成为可能. 例如, 基于 3 种生物硫醇在生理条件下的亲核性差异, 我们合成的探针 **4** 和探针 **7** 对 Cys 具有优秀的选择性. 另外, 探针 **11** 能够用于对 Cys 和 Hcy 的双通道区分别识别检测. 2013 年, 我们对硫醇的亲核加成反应类型及其在硫醇识别中的应用进行了系统总结^[36]. 截至目前, 新的、大量的硫醇识别工作又被报道, 荧光探针用于硫醇的荧光检测方法得到了进一步的扩展^[54-56]. 针对硫醇识别设计, 我们认为主要有 3 个发展需求: 能够特异性荧光区分别识别 Cys、Hcy 和 GSH; 发展近红外区荧光发射的荧光探针; 开发环保型、可重复使用的硫醇荧光探针.

现已报道的用于区分别 3 种生物硫醇的方法主要是基于亲核取代-分子内环化重排过程, 此过程能够有效地对体积较大的 GSH 和体积较小的 Cys、Hcy 进行区分别. 但 Cys 和 Hcy 之间的相互干扰却很难排除. 基于此, 在开发新的硫醇响应机制的同时, 利用 Cys、Hcy 和 GSH 的活性差异, 设计合成包含多个反应位点的硫醇荧光探针, 将为 3 种生物硫醇的区分荧光识别提供可能.

近红外区荧光发射具有更好的组织穿透性, 适合用于组织和活体成像. 同时, 能够有效避开生物自发荧光对荧光检测造成的假性干扰. 开发具有长波

区域吸收和近红外荧光发射的硫醇荧光探针用于活体标记将促进对硫醇体内的作用机制研究。

随着仪器设备的发展, 荧光成像在生物体系中

的应用不断深化, 这也将进一步促进硫醇荧光探针的设计开发. 我们相信, 硫醇荧光探针的发展必将促进其他相关领域如生物学、材料学等的进步.

参考文献

- 1 Yang P, Chen YH, Zhu QY, Wang FW, Li YX. *Microchim Acta*, 2008, 163: 263–269
- 2 Zhang YL, Shao XM, Wang Y, Pan FC, Kang RX, Peng FF, Huang ZT, Zhang WJ, Zhao WL. *Chem Commun*, 2015, 51: 4245–4248
- 3 Abbaspour A, Ghaffarinejad A. *Electrochim Acta*, 2008, 53: 6643–6650
- 4 Nygård O, Vollset SE, Refsum H, Stensvold I, Tverdal A, Nordrehaug JE, Ueland PM, Kvåle G. *J Am Med Assoc*, 1995, 274: 1526–1533
- 5 Nygård O, Nordrehaug JE, Refsum H, Ueland PM, Farstad M, Vollset SE. *N Engl J Med*, 1997, 337: 230–236
- 6 Yang JC, Lu MC, Lee CL, Chen GY, Lin YY, Chang FR, Wu YC. *Free Radical Bio Med*, 2011, 51: 641–657
- 7 Liu CC, Gebicki JM. *Free Radical Bio Med*, 2012, 52: 420–426
- 8 Hong R, Han G, Fernández JM, Kim BJ, Forbes NS, Rotello VM. *J Am Chem Soc*, 2006, 128: 1078–1079
- 9 Heil TP, Lindsay RC. *J Environ Sci Health B*, 1989, 24: 349–360
- 10 Amrolia P, Sullivan SG, Stern A, Munday R. *J Appl Toxicol*, 1989, 9: 113–118
- 11 Munday R. *J Appl Toxicol*, 1985, 5: 402–408
- 12 Chen XQ, Pradhan T, Wang F, Kim JS, Yoon JY. *Chem Rev*, 2012, 112: 1910–1956
- 13 Vendrell M, Zhai DT, Er JC, Chang YT. *Chem Rev*, 2012, 112: 4391–4420
- 14 Yin J, Hua Y, Yoon JY. *Chem Soc Rev*, 2015, 44: 4619–4644
- 15 Ashton TD, Jolliffe KA, Pfeffer FM. *Chem Soc Rev*, 2015, 44: 4547–4595
- 16 Jung HS, Chen XQ, Kim JS, Yoon JY. *Chem Soc Rev*, 2013, 42: 6019–6031
- 17 Chen XQ, Zhou Y, Peng XJ, Yoon JY. *Chem Soc Rev*, 2010, 39: 2120–2135
- 18 Sippel TO. *J Histochem Cytochem*, 1981, 29: 314–316
- 19 Sreejith S, Divya KP, Ajayaghosh A. *Angew Chem Int Ed*, 2008, 47: 7883–7887
- 20 Maeda H, Matsuno H, Ushida M, Katayama K, Saeki K, Itoh N. *Angew Chem Int Ed*, 2005, 44: 2922–2925
- 21 Yin J, Kwon Y, Kim D, Lee D, Kim G, Hu Y, Ryu JH, Yoon JY. *J Am Chem Soc*, 2014, 136: 5351–5358
- 22 Huo FJ, Sun YQ, Su J, Chao JB, Zhi HJ, Yin CX. *Org Lett*, 2009, 11: 4918–4921
- 23 Chow CF, Chiu BKW, Lam MHW, Wong WY. *J Am Chem Soc*, 2003, 125: 7802–7803
- 24 Niu LY, Guan YS, Chen YZ, Wu LZ, Tung CH, Yang QZ. *J Am Chem Soc*, 2012, 134: 18928–18931
- 25 Liu J, Sun YQ, Huo YY, Zhang HX, Wang LF, Zhang P, Song D, Shi YW, Guo W. *J Am Chem Soc*, 2014, 136: 574–577
- 26 Rusin O, Luce NNS, Agbaria RA, Escobedo OJ, Jiang S, Warner IM, Dawan FB, Lian K, Strongin RM. *J Am Chem Soc*, 2004, 126: 438–439
- 27 Yang XF, Guo YX, Strongin RM. *Angew Chem Int Ed*, 2011, 50: 10690–10693
- 28 Lim CS, Masanta G, Kim HJ, Han JH, Kim HM, Cho BR. *J Am Chem Soc*, 2011, 133: 11132–11135
- 29 Yuan L, Lin WY, Zhao S, Gao WS, Chen B, He LW, Zhu SS. *J Am Chem Soc*, 2012, 134: 13510–13523
- 30 Santos-Figueroa LE, Moragues M, Climent E, Agostini A, Martínez-Máñez R, Sancenón F. *Chem Soc Rev*, 2013, 42: 3489–3613
- 31 Huo FJ, Sun YQ, Su J, Yang YT, Yin CX, Chao JB. *Org Lett*, 2010, 12: 4756–4759
- 32 Yang YT, Huo FJ, Yin CX, Zheng AM, Chao JB, Li YQ, Nie ZX, Martínez-Máñez R, Liu DS. *Biosensor Bioelectron*, 2013, 47: 300–306
- 33 Yue YK, Yin CX, Huo FJ, Chao JB, Zhang YB. *Sensor Actuat B Chem*, 2016, 223: 496–500
- 34 Lin WY, Long LL, Tan W. *Chem Commun*, 2010, 46: 1503–1505
- 35 Zhang BX, Ge CP, Yao J, Liu YP, Xie HC, Fang JG. *J Am Chem Soc*, 2015, 137: 757–769
- 36 Yin CX, Huo FJ, Zhang JJ, Martínez-Máñez R, Yang Y, Lv HG, Li SD. *Chem Soc Rev*, 2013, 42: 6032–6059
- 37 Kong FP, Liu RP, Chu RR, Wang X, Xu KH, Tang B. *Chem Commun*, 2013, 49: 9176–9178
- 38 Zhang HT, Liu RC, Liu J, Li L, Wang P, Yao SQ, Xu ZT, Sun HY. *Chem Sci*, 2016, 7: 256–260
- 39 Qu LJ, Yin CX, Huo FJ, Li JF, Chao JB, Zhang YB. *Sensor Actuat B Chem*, 2014, 195: 246–251
- 40 Huo FJ, Kang J, Yin CX, Zhang YB, Chao JB. *Sensor Actuat B Chem*, 2015, 207: 139–143
- 41 Yang YT, Huo FJ, Yin CX, Chao JB, Zhang YB. *Dyes Pigments*, 2015, 114: 105–109
- 42 Zhang YB, Huo FJ, Yin CX, Yue YK, Hao JS, Chao JB, Liu DS. *Sensor Actuat B Chem*, 2015, 207: 59–65

- 43 Liu T, Huo FJ, Li JF, Chao JB, Zhang YB, Yin CX. *Sensor Actuat B Chem*, 2016, 232: 619–624
- 44 Liu T, Huo FJ, Yin CX, Li JF, Chao JB, Zhang YB. *Dyes Pigments*, 2016, 128: 209–214
- 45 Liu T, Huo FJ, Yin CX, Li JF, Niu LX. *RSC Adv*, 2015, 5: 28713–28716
- 46 Li JF, Yin CX, Huo FJ, Chao JB, Zhang YB, Niu LX. *Anal Method*, 2015, 7: 8545–8549
- 47 Zhang CY, Wei L, Wei C, Zhang J, Wang RY, Xi Z, Yi L. *Chem Commun*, 2015, 51: 7505–7508
- 48 Zhang JJ, Yu BF, Ning LL, Zhu XY, Wang JX, Chen ZJ, Liu XY, Yao XJ, Zhang XY, Zhang HX. *Eur J Org Chem*, 2015: 1711–1718
- 49 Li J, Zhang CF, Yang SH, Yang WC, Yang GF. *Anal Chem*, 2014, 86: 3037–3042
- 50 Li Z, Geng ZR, Zhang C, Wang XB, Wang ZL. *Biosensor Bioelectron*, 2015, 72: 1–9
- 51 Wang Z, Han DM, Jia WP, Zhou QZ, Deng WP. *Anal Chem*, 2012, 84: 4915–4920
- 52 Zhang WJ, Yin CX, Zhang YB, Chao JB, Huo FJ. *Sensor Actuat B Chem*, 2016, 233: 307–313
- 53 ZhanWJ, Huo FJ, Liu T, Wen Y, Yin CX. *Dyes Pigment*, 2016, 133: 248–254
- 54 Zhang J, Bao XL, Zhou JL, Peng FF, Ren H, Dong XC, Zhao WL. *Biosensor Bioelectron*, 2016, 85: 164–170
- 55 Han CM, Yang HR, Chen M, Su QQ, Feng W, Li FY. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2015, 7: 27968–27975
- 56 Chen H, Tang YH, Ren MG, Lin WY. *Chem Sci*, 2016, 7: 1896–1903

Thiol nucleophilic reactions and their applications in thiol fluorescent recognition

Yongkang Yue¹, Fangjun Huo², Caixia Yin^{1*}

¹Key Laboratory of Chemical Biology and Molecular Engineering of Ministry of Education, Key Laboratory of Materials for Energy Conversion and Storage of Shanxi Province, Institute of Molecular Science, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

²Research Institute of Applied Chemistry, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

*Corresponding author (email:yincx@sxu.edu.cn)

Abstract: Because of the physiology and pathology importance of bio-thiols, more and more scientists devoted to visualize the biological processes induced by bio-thiols. Fluorescent probes as one of the most attractive tools have been widely developed for thiols specific detection and imaging because of the nonintrusive nature. Based on the thiol nucleophilic reaction, we herein summarized the designing strategies and the optical properties of the thiols probes developed by our group in recent years. Further, we discussed the trend for thiols probes development.

Keywords: thiol, nucleophilic reaction, fluorescent probe, imaging, recognition

doi: 10.1360/N032016-00138