

近红外荧光探针对黏度和极性的双响应

余 奥^{1,2}, 冯 艳^{1,2}, 武紫燕^{1,2}, 杨焜洸^{1,2}, 贾春满^{1,2*}

(1. 海南省精细化工重点实验室, 海南 海口 570228; 2. 海南大学 化学化工学院, 海南 海口 570228)

摘要: 以 3,4-二甲氧基吡喃酮为吸电子基团、半花菁染料为给电子基团, 通过 Witting 反应合成了一种基于真菌荧光素的近红外荧光探针 FUNG。通过 ¹HNMR、¹³CNMR 和 HRMS 表征了其结构, 测试其对不同溶液体系的黏度、极性的响应性能, 考察其在响应过程中的抗干扰能力、pH 适用范围。结果表明, 探针 FUNG 在水中的斯托克斯位移为 178 nm, 荧光发射波长 (λ_{em}) 为 700 nm, 能同时对溶液体系的黏度和极性作出响应, 符合扭曲的分子内电荷转移机制; 在不同体积分数甘油水溶液中, 探针 FUNG 对溶液黏度的响应表现为荧光强度线性变化, 随着溶液的黏度的增加, 其在 700 nm 处荧光强度增加 6 倍多, 荧光寿命也能随之增加; 探针 FUNG 对溶液极性的响应表现为荧光发射光谱的红移, 随着溶剂极性参数的增加, λ_{em} 从 606 nm 红移至 698 nm; 在甲苯/二甲基亚砜 (DMSO) 中, 随着甲苯体积分数从 100% 减至 10%, λ_{em} 从 669 nm 红移至 712 nm; 在 1,4-二氧六环/DMSO 中, 随着 1,4-二氧六环体积分数从 100% 减至 10%, λ_{em} 从 631 nm 红移至 717 nm; 探针 FUNG 对溶液黏度和极性的响应具有选择性好、抗干扰能力强、pH 适用范围广等特点。

关键词: 真菌荧光素; 荧光探针; 黏度; 极性; 近红外; 功能材料

中图分类号: O657.3 文献标识码: A 文章编号: 1003-5214 (2024) 08-1693-08

Dual responses of near infrared fluorescence probe to viscosity and polarity

YU Ao^{1,2}, FENG Yan^{1,2}, WU Ziyan^{1,2}, YANG Kunlong^{1,2}, JIA Chunman^{1,2*}

(1. Hainan Provincial Key Lab of Fine Chemical Engineering, Haikou 570228, Hainan China; 2. School of Chemical Engineering and Technology, Hainan University, Haikou 570228, Hainan, China)

Abstract: A fungal fluorescein-based near-infrared fluorescence probe FUNG was synthesized from Witting reaction between 3,4-dimethoxypyranone as electron-withdrawing group and semicarboxyanine dye as electron-donating group, and characterized by ¹HNMR, ¹³CNMR and HRMS. The response performance of the probe to viscosity and polarity of different solution systems was evaluated, while its anti-interference ability and pH applicability during the response process were also investigated. The results showed that the Stokes shift of FUNG in water was 178 nm, and the fluorescence emission wavelength (λ_{em}) was 700 nm. The probe could respond to the viscosity and polarity of different solution systems simultaneously, following a complex twisted intramolecular charge transfer (TICT) mechanism. In glycerol/water solutions with different glycerol volume fractions, the fluorescence intensity of the probe showed a linear relationship with solution viscosity, with its fluorescence intensity at 700 nm increased by about six times with the increase of the solution viscosity and its fluorescence lifetime increased accordingly. The response of the probe FUNG to the polarity of the solution was reflected by the red-shift of its fluorescence emission spectra, with its emission wavelength (λ_{em}) red-shifted from 606 nm to 698 nm with the increase of solvent polarity parameter. λ_{em} red-shifted from 669 nm to 712 nm with the decrease of the volume fraction of toluene from 100% to 10% in toluene/dimethyl sulfoxide (DMSO) solution, and from 631 nm to 717 nm when the volume fraction of 1,4-dioxane decreased from 100% to 10% in 1,4-dioxane/DMSO solution. The response of probe FUNG to the viscosity and polarity of solution displayed good selectivity, strong anti-interference ability, and a wide pH range.

Key words: fungal fluorescein; fluorescence probes; viscosity; polarity; near-infrared; functional materials

收稿日期: 2023-08-27; 定用日期: 2023-10-19; DOI: 10.13550/j.jxhg.20230711

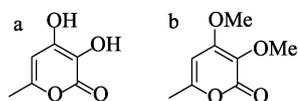
基金项目: 国家自然科学基金项目 (22161017, 22161016)

作者简介: 余 奥 (1997—), 男, 硕士生, E-mail: 1051114068@qq.com. 联系人: 贾春满 (1981—), 男, 教授, E-mail: jiachunman@hainanu.edu.cn.

黏度是细胞微环境的一个重要参数,在细胞中黏度不仅与物质的转运和代谢废物的运输有关,而且和细胞间信号分子的传导过程也有着紧密的联系^[1-4];极性是另一个重要的细胞微环境参数,在化学和化学生物学中起着不可或缺的作用^[5]。细胞极性的变化是一个复杂的过程,打破了生物学中事件的对称性,涉及一系列非共价相互作用,如氢键、偶极矩、极化率以及水合作用^[6-8]。极性对膜融合、蛋白质变性、酶的构象变化和肽聚集有显著影响^[9-10]。因此,开发能够同时检测生物体内黏度和极性的方法显得尤为重要。

由于生物微环境的特殊性,传统的黏度计和极性检测器显然不适合用于生物体黏度和极性的检测。荧光成像技术因具有较高的准确性、灵敏度、时间和空间分辨率而被广泛应用于生物体黏度和极性检测中^[11-13]。目前,多数荧光探针只能单一检测微环境中的极性或者黏度,这不利于疾病模型的多因素分析^[14-15]。在当前已报道的这类荧光探针中,斯托克斯位移普遍较小,容易导致背景干扰和荧光自猝灭^[16-17]。能同时检测细胞黏度和极性且具有大斯托克斯位移的近红外荧光探针报道较少,因而,研究此类近红外荧光探针,并将其运用到对生物体黏度和极性的检测具有重要意义。

3,4-二羟基吡喃酮是真菌荧光素生物发光的主要功能基团(结构式 a),其羟基容易被氧化^[18]。为了更好地研究真菌荧光素是否能作为荧光探针且同时对细胞的黏度和极性响应,本文拟将 3,4-二羟基吡喃酮的 3 位和 4 位的羟基用甲氧基保护(结构式 b)后,作为吸电子基团(受体),另外以半花菁染料作为给电子基团(供体),将二者通过 Wittig 反应合成一种新的化合物 FUNG,通过对探针 FUNG 的基本光学性质的表征,探究该探针应用到细胞中且同时检测生物体的黏度和极性变化的潜力。



1 实验部分

1.1 试剂与仪器

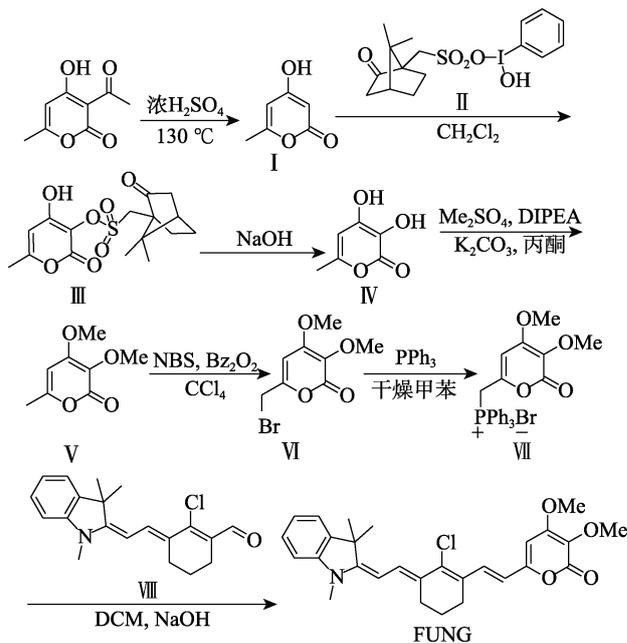
N,N-二异丙基乙胺(DIPEA)、二氯甲烷(DCM)、四氯化碳(CCl_4)、氢氧化钠(NaOH)、碳酸钾(K_2CO_3)、丙酮、过氧化二苯甲酰(Bz_2O_2)、1,4-二氧六环、二甲亚砜(DMSO)、脱氢乙酸、1,2,3,3-四甲基-3*H*-碘化吡啶、环己烷,AR,上海麦克林生化科技股份有限公司;浓硫酸(质量分数 96%~98%)、甲苯,AR,西陇科学股份有限公司;碘苯二乙酯、樟脑磺酸、硫酸二甲酯(Me_2SO_4)、*N*-溴

琥珀酰亚胺(NBS)、三苯基膦(PPh_3),AR,北京伊诺凯科技有限公司;氯化钠、氯化钙六水合物、三氯化铁六水合物、氯化锌、氯化亚铁四水合物、氯化亚铜、无水氯化镁、次氯酸钠,AR,上海阿拉丁生化科技股份有限公司;半胱氨酸、高半胱氨酸、谷胱甘肽,AR,上海毕臣生化科技有限公司;柱层析硅胶(200~300目),青岛海洋化工有限公司;所有溶剂均为分析纯,实验用水为超纯水。

AVANCE NEO 400 型核磁共振波谱仪,德国 Bruker 公司;LCMS-IT-TOF 液相色谱-质谱联用仪、UV-2600 型紫外-可见分光光度计,日本 Shimadzu 公司;Fluorolog-3 型荧光光谱仪,美国 HORIBA Instruments 公司。

1.2 合成方法

探针 FUNG 的合成路线如下所示,其中,化合物 I~VIII 按照文献^[19-21]方法合成,化合物 6-三苯基溴化膦-3,4-二甲氧基吡喃酮(VII)的总产率为 3.22%,化合物(*E*)-2-氯-3-{2-[(*E*)-1,3,3-三甲基吡啶-2-亚基]乙亚基}环己烯-1-甲醛(VIII)的总产率为 14.6%。



将 90 mg (0.176 mmol) VII、90 mg (0.264 mmol) VIII 加入到 50 mL 圆底烧瓶中,并加入 6 mL DCM 使其溶解后,加入 6 mL 浓度为 2 mol/L 的 NaOH 水溶液,在避光条件下室温反应 14 h。反应结束后,向体系中加入 10 mL DCM,再加入 10 mL 水洗涤,分液取有机相,用无水硫酸钠干燥,在旋转蒸发仪上除去溶剂,残留物使用柱层析纯化,洗脱剂为 *V*(乙酸乙酯):*V*(石油醚)=1:5,最后得到 50 mg 暗红色固体化合物 FUNG,收率为 40.26%。¹HNMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$), δ : 7.57 (d, $J = 15.6$ Hz, 1H), 7.42 (d, $J = 12.8$ Hz, 1H), 7.31~7.25 (m, 1H), 7.20~7.15 (m, 1H), 6.86 (d, $J = 7.7$ Hz, 2H), 6.70 (s,

1H), 6.42 (d, $J = 15.6$ Hz, 1H), 5.51 (d, $J = 12.7$ Hz, 1H), 3.91 (s, 3H), 3.66 (s, 3H), 3.33~3.30 (m, 2H), 3.20 (s, 3H), 2.57 (t, $J = 6.2$ Hz, 2H), 1.83~1.72 (m, 2H), 1.56 (s, 6H)。 ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6), δ : 160.30, 160.06, 159.98, 155.45, 145.01, 138.94, 136.46, 131.46, 128.29, 127.71, 127.28, 127.18, 124.42, 122.13, 120.46, 118.89, 107.31, 98.75, 93.59, 59.92, 57.54, 45.89, 29.54, 28.29, 27.12, 26.22, 21.43。ESI-HRMS, m/z : $\text{C}_{28}\text{H}_{30}\text{ClNO}_4[\text{M}+\text{H}]^+$ 理论值 480.1943, 测定值 480.1893。

1.3 结构表征

ESI-HRMS 测试: 取适量 FUNG 粉末用甲醇(色谱级)中和, 采用液相色谱-质谱联用仪进行测定。NMR 测试: 取少量 FUNG 粉末用氘代二甲基亚砷(DMSO- d_6)溶解, 四甲基硅烷(TMS)为内标, 分别在核磁共振波谱仪上进行 ^1H NMR 与 ^{13}C NMR 测定。

1.4 性能测试

1.4.1 测试溶液的配制

配制 FUNG 母液: 将 4.8 mg 的 FUNG 溶于 2 mL 的 DMSO 中, 振荡摇匀配成 5 mmol/L 的探针母液, 密封备用。配制不同体积分数(100%、90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、0)的甘油水溶液, 并测定各溶液黏度(η)分别为 965.0、360.9、112.3、63.8、35.7、18.5、11.5、7.1、5.3、3.6、2.4 mPa·s, 密封备用。配制不同体积分数(100%、90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%)的甲苯/DMSO 溶液, 密封备用。配制不同体积分数(100%、90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%)的 1,4-二氧六环/DMSO 溶液, 密封备用。每次取 20 μL 浓度为 5 mmol/L 的 FUNG 母液加入到 10 mL 不同测试体系中, 配成浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 的测试溶液。

1.4.2 探针 FUNG 的斯托克斯位移测定

取 20 μL 浓度为 5 mmol/L 的 FUNG 母液加入到 10 mL 超纯水中配成浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 的测试溶液, 取 3 mL 上述溶液测试其紫外吸收光谱, 再以最大紫外吸收波长作为激发波长去测试荧光发射光谱。

1.4.3 探针 FUNG 对黏度的响应实验

(1) 测试探针 FUNG 在水和甘油中的荧光发射光谱: 分别取 20 μL 浓度为 5 mmol/L 的 FUNG 母液加入到 10 mL 超纯水和 10 mL 甘油(分析纯)中, 取 3 mL 上述溶液并分别测试其荧光发射光谱。

(2) 测试探针 FUNG 在不同黏度体系中的荧光发射光谱: 将 20 μL 现配制的探针母液(5 mmol/L)加到 10 mL 不同体积分数的甘油/水溶液中(甘油体积分数分别为 90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、0), 制成具有不同黏度的 FUNG 混合探针溶液, 最终所有具有不同黏度的探针

FUNG 浓度均为 10 $\mu\text{mol/L}$ 。将上述探针溶液放入超声仪中超声 5 min 除去溶液中的气泡, 然后在室温下静置 1 h 后, 立即测试其荧光发射光谱。

(3) 将探针 FUNG 在 700 nm 处的荧光强度对数($\lg I_{700}$)与甘油水溶液黏度的对数($\lg \eta$)作线性拟合(I_{700} 为 700 nm 处的荧光强度; η 为甘油水溶液的黏度, mPa·s; 发射光谱激光激发波长 520 nm)。

1.4.4 探针 FUNG 对极性的响应实验

测试探针 FUNG 在不同极性的溶剂、甲苯/DMSO、1,4-二氧六环/DMSO 溶液中的紫外吸收光谱和荧光发射光谱。分别取 3 mL 浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 的测试溶液, 激发波长为 520 nm, 测试探针 FUNG 的荧光发射光谱。

1.4.5 探针 FUNG 在不同黏度体系中的荧光寿命测试

将 FUNG 加入体积分数分别为 0%、10%、20%、30%、40%、50%、60% 和 100% 的甘油水溶液中配成测试溶液, 分别取 3 mL 浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 的测试溶液, 用 NanoLED 灯以 520 nm 作为激发波长, 狭缝为 10 nm, 测试 FUNG 在不同黏度体系中的荧光寿命。

1.4.6 探针 FUNG 的 pH 稳定性、抗干扰性测试

选用两种黏度溶液测试体系进行测试: 高黏度的体积分数为 50% 的甘油水溶液(18.5 mPa·s); 低黏度的水(2.4 mPa·s)。

(1) 测试探针 FUNG 分别在两种黏度溶液中不同 pH 范围(3.0~12.0)下的荧光发射光谱, 并以 I_{700} 为指标。分别取 20 μL 浓度为 5 mmol/L 的探针母液加入到 10 mL 不同 pH 的溶液中, 选取激发波长为 520 nm, 测试其荧光发射光谱。

(2) 测试探针 FUNG 对两种黏度溶液测试体系中黏度和极性检测是否会受到干扰物的影响, 通过在模拟生理条件下测试其与各种干扰物的反应来检测其选择性。分别取 20 μL 探针母液加入到 10 mL 体积分数为 50% 的甘油水溶液和 10 mL 纯水中, 再分别向其中加入 10 μL 浓度为 0.5 mmol/L 的各种干扰物溶液〔谷胱甘肽(GSH)、高半胱氨酸(Hcy)、半胱氨酸(Cys)、过氧亚硝酸根(OONO^-)、羟基自由基($\cdot\text{OH}$)、过氧化氢(H_2O_2)、单线态氧($^1\text{O}_2$)、 Br^- 、 F^- 、 SO_3^{2-} 、 Na^+ 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Fe^{3+} 〕, 并立即测试其荧光发射光谱, 激发波长为 520 nm, 狭缝为 5 nm。

2 结果与讨论

2.1 探针的结构设计

探针 FUNG 对黏度和极性的识别机制如图 1 所示。基于扭曲的分子内电荷转移(TICT)理论设计

的荧光分子通常会对环境的黏度和极性有响应。因此，以修饰的真菌荧光素作为受体，半花菁染料作为供体，设计具有供体-受体 (D-A) 结构的荧光探针 FUNG。根据设想，在低黏度环境下，由于存在 TICT 机制，此时，被激发后的探针分子将以非辐射的形式消耗大部分的能量，从而产生微弱的荧光发射。而在高黏度的环境中，TICT 机制受到抑制，这时分子将会以辐射跃迁的方式回到基态，从而产生强烈的荧光发射，最终实现对环境黏度的响应。在高极性溶剂中，分子将以一种更加稳定的构象与所处的溶剂形成 TICT 态，这种 TICT 态会使最高占据轨道 (HOMO) 能级升高，导致带隙变窄，从而使荧光发射光谱红移^[22]。

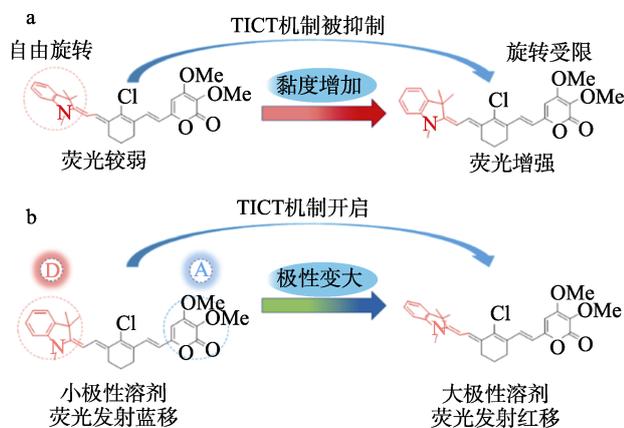


图 1 探针 FUNG 对黏度 (a) 和溶剂极性 (b) 的识别机理
Fig. 1 Recognition mechanism of probe FUNG on viscosity (a) and solvent polarity (b)

2.2 探针对黏度的响应性分析

图 2a 为探针 FUNG 在水中的紫外吸收光谱和荧光发射光谱。表 1 是文献报道的典型的黏度型荧光探针的斯托克斯位移 (即荧光发射波长与紫外吸收波长之间的差值)。从图 2a 可以看出，探针 FUNG 在水中斯托克斯位移达到 178 nm。与典型的黏度型荧光探针的斯托克斯位移 (表 1) 相比，探针 FUNG 的斯托克斯位移更大，说明其可能具有背景干扰低、对生物样品的光损伤小、检测灵敏度高等优点^[23]。

图 2b 为探针 FUNG 在甘油和水中的荧光发射光谱。从图 2b 可以看出，探针 FUNG 在甘油和水中的最大吸收波长为 700 nm，探针 FUNG 在甘油中的 I_{700} (361.2) 比在水中荧光强度 (48.8) 增加 6 倍多。

图 2c 为探针 FUNG 在不同体积分数甘油水溶液 (即黏度 $\eta=2.4\sim 360.9$ mPa·s) 中的荧光发射光谱。从图 2c 可以看出，随着溶液黏度的增加，探针 FUNG 对溶液的荧光强度增强。图 2d 是探针 FUNG 在不同体积分数甘油水溶液中 $\lg I_{700}$ 与 $\lg \eta$ 的线性拟合关系。根据 Förster-Hoffmann 方程^[24]，得到拟合线性方程为 $y=0.3202x+4.6477$ ($R^2=0.97$)，说明探针 FUNG 能够

对所处环境的黏度作出线性响应，有望成为一种优秀的黏度型荧光探针，检测细胞黏度微环境的变化。

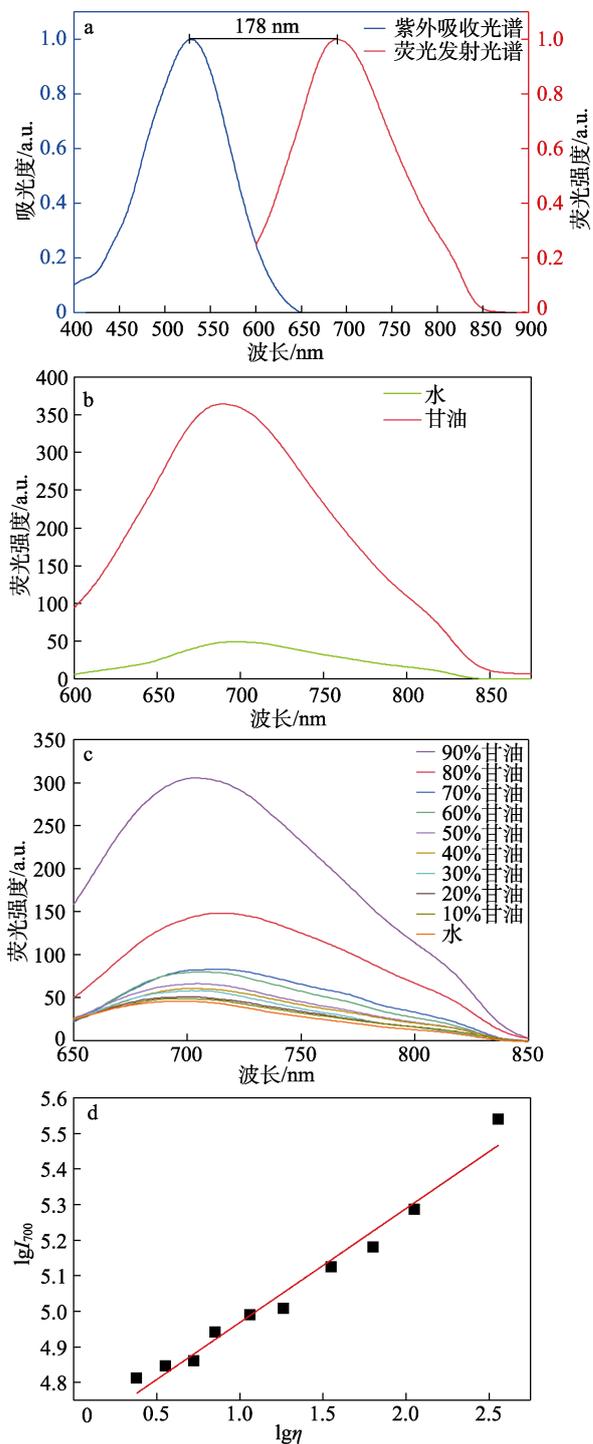
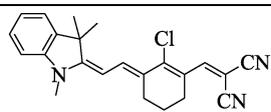
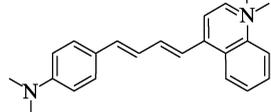
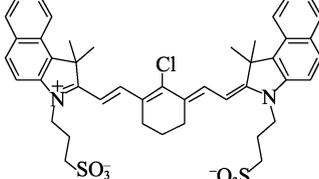
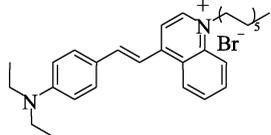
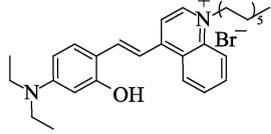
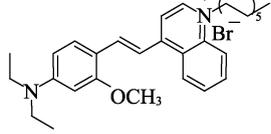


图 2 探针 FUNG 在水中的 UV 吸收光谱和荧光发射光谱 (a); 在水和甘油 (b) 及在不同体积分数甘油水溶液 (c) 中的荧光发射光谱; 荧光强度与溶液黏度的线性拟合线 (d)

Fig. 2 UV absorption and fluorescence emission spectra of probe FUNG in water (a); Fluorescence emission spectra in glycerol/water (b) and in aqueous solutions of glycerol with different volume fractions (c); Linear fitting line between fluorescence intensity and solution viscosity (d)

表 1 文献报道的黏度型荧光探针的斯托克斯位移
Table 1 Stokes shift of some viscosity type fluorescent probes in the reported literature

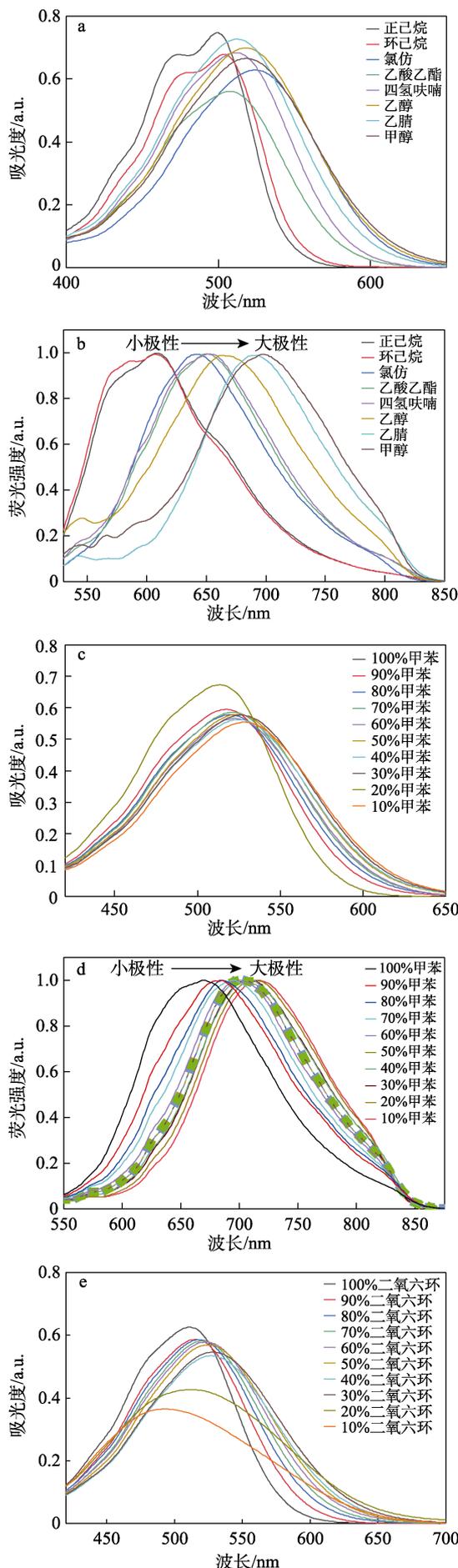
荧光探针的结构式	斯托克斯位移/nm	参考文献
	69	[25]
	120	[26]
	56	[27]
	95	[28]
	71	[28]
	85	[28]

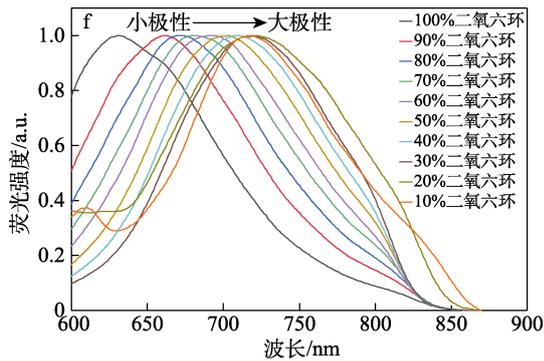
探针 FUNG 对黏度的响应能用 TICT 机制很好地解释: 在低黏度体系中, 由于半花菁部分能够自由旋转, 使得整个分子不能很好地共轭, 此时, 被激发后的探针分子将以非辐射的形式消耗大部分的能量, 从而产生微弱的荧光发射; 而在高黏度环境中, 半花菁部分的旋转受到了抑制, 整个分子能很好地共轭, 因此产生强烈的荧光。

2.3 探针对极性的响应性分析

极性是化学和生物学活动中的重要参数之一, 是控制反应过程的重要因素。极性在大量蛋白质的相互作用和细胞膜的通透性调节中都起到决定性的作用, 维持极性的稳定对于生物系统的正常运转至关重要^[29]。不仅如此, 极性还与细胞的迁移、分化、凋亡等过程息息相关^[30]。

图 3 是探针 FUNG 在不同极性溶剂中和不同体积分数的甲苯/DMSO 溶液、不同体积分数的 1,4-二氧六环/DMSO 溶液中的紫外吸收光谱和荧光发射光谱。表 2 为探针 FUNG 在不同极性溶剂中的激发波长 (λ_{ex})、发射波长 (λ_{em})、斯托克斯位移以及溶剂的极性参数 (Δf)。





激发波长为探针在各自溶剂体系中的最大紫外吸收波长

图 3 探针 FUNG 在不同极性溶剂中的 UV 吸收光谱 (a) 和归一化后的荧光发射光谱 (b); 探针 FUNG 在不同体积分数的甲苯/DMSO 溶液中的 UV 吸收光谱 (c) 和归一化后的荧光发射光谱 (d); 探针 FUNG 在不同体积分数的 1,4-二氧六环/DMSO 溶液中的 UV 吸收光谱 (e) 和归一化后的荧光发射光谱 (f)

Fig. 3 UV absorption spectra (a) and normalized fluorescence emission spectra (b) of probe FUNG in different polar solvents; UV absorption spectra (c) and normalized fluorescence emission spectra (d) of probe FUNG in toluene/DMSO solutions with different volume fractions; UV absorption spectra (e) and normalized fluorescence emission spectra (f) of probe FUNG in 1,4-dioxane/DMSO solutions with different volume fractions

表 2 探针 FUNG 在不同溶剂中激发和发射波长、斯托克斯位移和溶剂的极性参数^[31-32]

Table 2 Excitation and emission wavelengths, Stokes shift, and polarity parameters of probe FUNG in different solvents^[31-32]

溶剂	λ_{ex}/nm	λ_{em}/nm	斯托克斯位移/ nm	Δf
正己烷	500	606	106	0
环己烷	503	606	103	0
氯仿	524	641	117	0.149
乙酸乙酯	511	653	142	0.201
四氢呋喃	508	654	146	0.210
乙醇	519	664	145	0.288
乙腈	513	689	176	0.306
甲醇	511	698	187	0.309

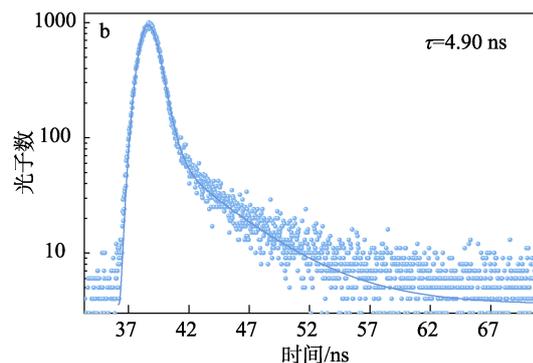
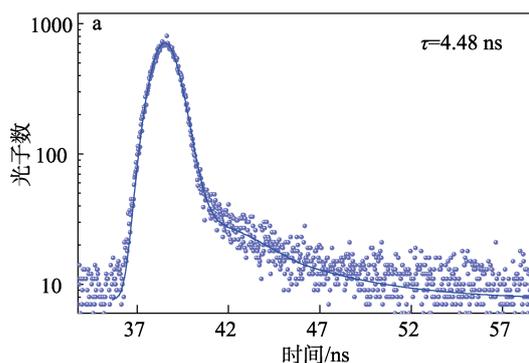
从图 3 和表 2 可以看出, 随着溶剂极性参数的增加, 探针 FUNG 的荧光发射光谱会出现红移的现象, 从极性参数为 0 的正己烷或环己烷到极性参数为 0.309 的甲醇, λ_{em} 从 606 nm 红移到了 698 nm; 在不同体积分数的甲苯/DMSO 溶液中, 随着甲苯体积分数从 100% 减小至 10%, λ_{em} 从 669 nm 红移到了 712 nm; 在 1,4-二氧六环/DMSO 溶液中, 随着 1,4-二氧六环体积分数的减小, λ_{em} 从 631 nm 红移到了 717 nm。

上述结果表明, 探针 FUNG 能够对溶剂极性的变化作出响应。这种随着溶剂极性的增加而引起的发光分子的荧光发射波长红移的现象能用 TICT 机制很好地解释: 在局部激发态 (LE) 状态下, 分子呈平面构象。在非极性溶剂中, 被激发的发光分子能与周围的溶剂分子间形成稳定的平面构象; 而在极性溶剂中, 发光分子与周围的溶剂分子难以形成稳定的平面构象, 分子内旋转将发光分子从 LE 态带到 TICT 态, 供体与受体分子之间存在总电荷分离, 形成新的平衡态, 扭曲的分子构象通过极性溶剂的溶剂化作用而稳定。由于每个发光分子都有不同的扭曲角, 因此, 具有独特的发射特性。TICT 态会使得 HOMO 能级升高而使带隙变窄, 从而使发射光谱红移^[22]。

2.4 探针在不同黏度体系中的荧光寿命分析

荧光寿命是物质的一种固有属性, 也是一种对黏度高度敏感的关键参数, 与荧光发射光谱相比, 荧光寿命不随样品浓度以及激发光源强度的改变而改变^[33]。图 4 为探针 FUNG 在不同体积分数的甘油水溶液 (甘油体积分数为 0~100%) 中 ($\eta=2.4\sim 360.9\text{ mPa}\cdot\text{s}$) 的荧光寿命测试结果。

从图 4 可以看出, 探针 FUNG 在体积分数为 0、10%、20%、30%、40%、50%、60% 和 100% 的甘油水溶液的荧光寿命分别为 4.48、4.90、5.00、5.15、5.26、5.38、5.41 和 5.46 ns, 随着溶液黏度的增加, 探针 FUNG 的荧光寿命逐渐增加, 进一步地表明探针 FUNG 可用于监测黏度的变化。



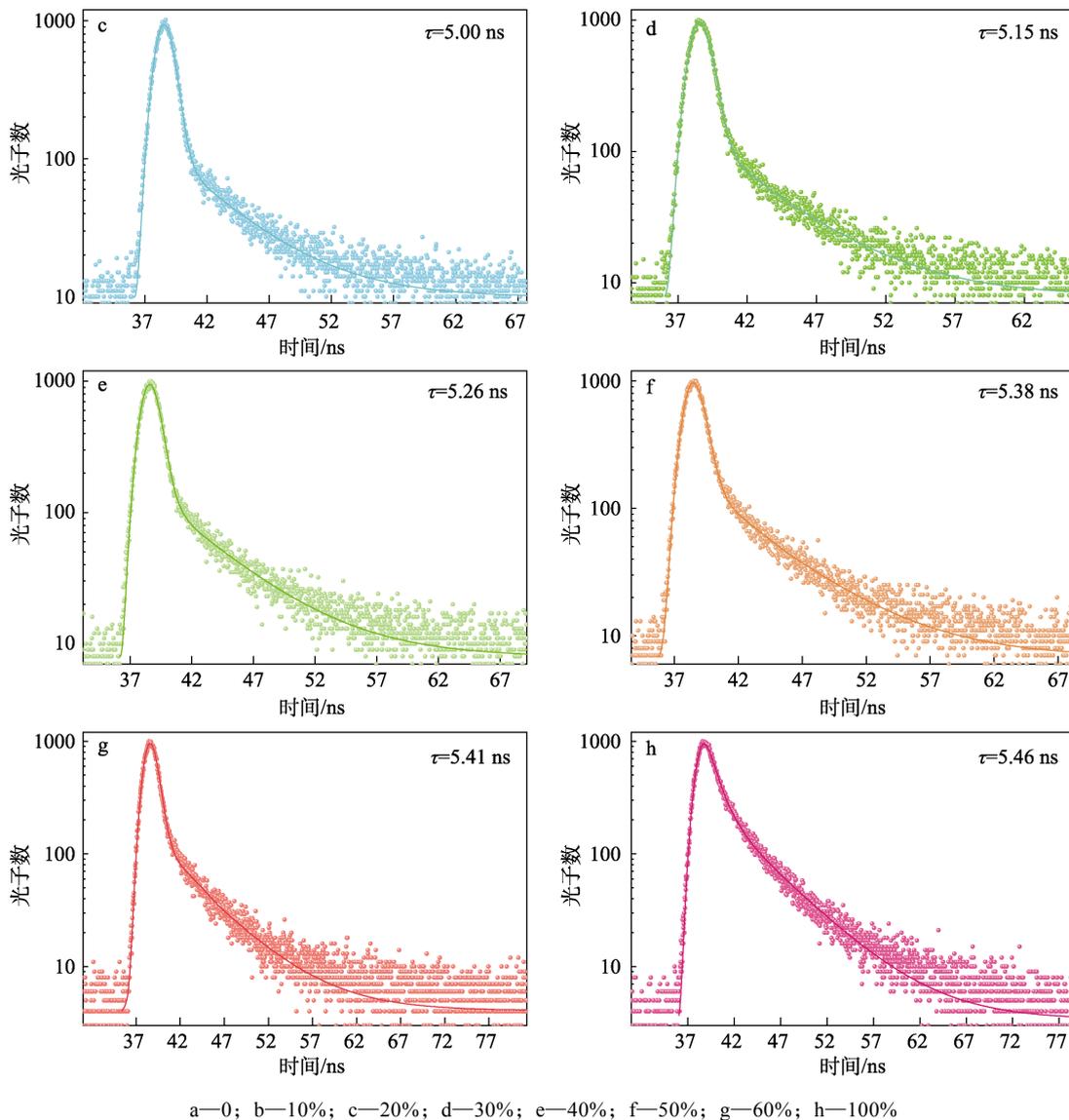


图 4 探针 FUNG 在不同体积分数甘油水溶液中的荧光寿命衰减曲线

Fig. 4 Fluorescence lifetime decay curves of probe FUNG in glycerol/water solutions with different volume fractions

2.5 探针的 pH 稳定性、抗干扰性分析

在细胞微环境中, pH 是一个至关重要的参数, 会极大地干扰探针对细胞黏度和极性的检测^[34-35]。图 5 为探针 FUNG 在不同 pH 的两种黏度溶液中的 I_{700} 。其中, $\lambda_{ex}=520\text{ nm}$, $\lambda_{em}=700\text{ nm}$ 。

从图 5 可以看出, 在高黏度和低黏度下, 探针 I_{700} 会随着 pH 的变化出现变化。尽管探针在不同的 pH 下其荧光强度会出现微小变化, 但相对于探针的荧光发射光谱随着黏度的变化程度来说, 这种变化可忽略不计, 因此, 探针具有 pH (3~12) 适用范围广的特点。

细胞质是一种复杂的异质性液体, 存在各种能对黏度和极性的检测产生干扰的离子、活性氧 (ROS)、活性硫 (RSS) 等干扰物。图 6 为探针 FUNG 对黏度和极性检测的抗干扰测试结果。其中, $\lambda_{ex}=520\text{ nm}$, $\lambda_{em}=700\text{ nm}$ 。

从图 6 可以看出, 探针在高黏度和低黏度下, 当加入 ROS、RSS、阴阳离子等干扰物后, 探针 I_{700} 会有细微变化, 然而相比于黏度对探针荧光强度的影响, 干扰物对探针荧光强度的影响可忽略不计。

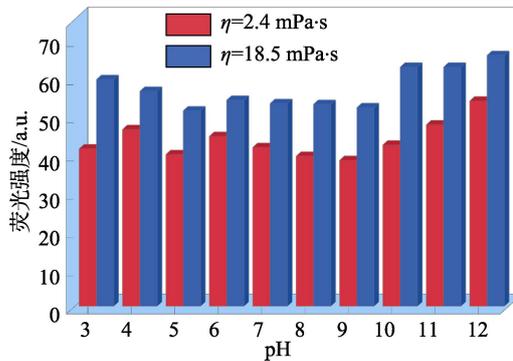


图 5 探针 FUNG 在不同 pH 的两种黏度溶液中的 I_{700}
Fig. 5 I_{700} of probe FUNG at two viscosity solutions with different pH

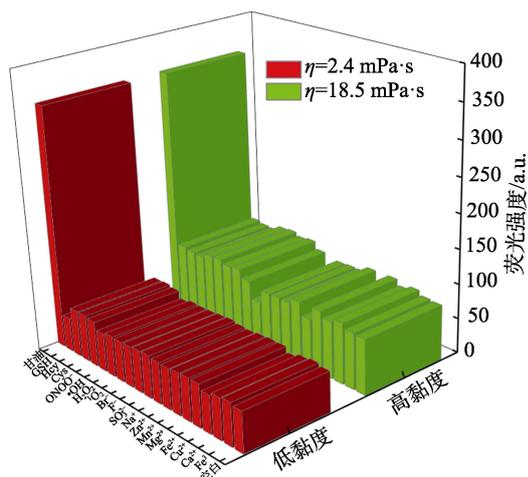


图 6 探针 FUNG 在两种黏度溶液测试体系中加入各种干扰物后的 I_{700}

Fig. 6 I_{700} of probe FUNG at two viscosity solutions after adding various interfering substances

3 结论

(1) 本文以 3,4-二羟基吡喃酮为原料, 将 3 位和 4 位的羟基用甲氧基保护后作为吸电子基团(受体), 另外以半花菁染料作为给电子基团(供体), 通过 Wittig 反应合成了一种基于真菌荧光素的近红外荧光探针 FUNG, 它在水中的斯托克斯位移达到了 178 nm, 能够同时对溶液体系的黏度和极性作出响应。

(2) 探针 FUNG 对溶液黏度的响应表现为荧光强度变化。在不同体积分数的甘油水溶液中, 探针 FUNG 对溶液黏度的变化表现出线性响应, 荧光强度随着溶液黏度的增加 ($\eta=2.4\sim 360.9$ mPa·s) 而增强 ($I_{700}=48.8\sim 361.2$), 其荧光寿命也随之增加 (4.48~5.46 ns)。

(3) 探针 FUNG 对溶液极性的响应表现为荧光发射光谱的红移现象。在不同极性参数 ($\Delta f=0\sim 0.309$) 的溶剂中, 探针 FUNG 的荧光发射光谱随着溶剂极性参数的增加, 其 λ_{em} 从 606 nm 红移至 698 nm; 在甲苯/DMSO 溶液测试体系中, 随着甲苯体积分数从 100%减小至 10%, 探针 FUNG 的 λ_{em} 从 669 nm 红移到了 712 nm; 在 1,4-二氧六环/DMSO 溶液测试体系中, 随着 1,4-二氧六环体积分数的减小从 100%减小至 10%, 探针 FUNG 的 λ_{em} 从 631 nm 红移到了 717 nm。

(4) 探针 FUNG 具有对黏度和极性选择性好、抗干扰能力强、pH 适用范围广 (3~12) 等优点。因此, 探针 FUNG 有望在生物体疾病模型的分析上得到很好的应用。

参考文献:

[1] ZHANG W, XU K X, YUE L X, *et al.* Two-dimensional

- carbazole-based derivatives as versatile chemosensors for colorimetric detection of cyanide and two-photon fluorescence imaging of viscosity *in vitro*[J]. *Dyes and Pigments*, 2017, 137: 560-568.
- [2] OLZMANN J A, CARVALHO P. Dynamics and functions of lipid droplets[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2019, 20: 137-155.
- [3] YANG Z G, CAO J F, HE Y X, *et al.* Macro-/micro-environment-sensitive chemosensing and biological imaging[J]. *Chemical Society Reviews*, 2014, 43(13): 4563-4601.
- [4] WANG Y X, QIU Y T, SUN A Y, *et al.* Dual-functional AIE fluorescent probes for imaging β -amyloid plaques and lipid droplets[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2020, 1133: 109-118.
- [5] RUDY B, GITLER C. Microviscosity of the cell membrane[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1972, 288(1): 231-236.
- [6] YANG Y, HE J H, WANG X H, *et al.* Preparation, characterization and *in vitro* antitumoral activity of a nanosize liposome complex encapsulated polyoxotungstate $K_6H_2[CoW_{11}TiO_{40}]$ [J]. *Transition Metal Chemistry*, 2004, 29(1): 96-99.
- [7] MICHALET X, WEISS S, MARCUS J. Single-molecule fluorescence studies of protein folding and conformational dynamics[J]. *Chemical Reviews*, 2006, 106(5): 1785-1813.
- [8] BHAT M A, IZADDOOST S, LU Y, *et al.* Discs lost, a novel multi-PDZ domain protein, establishes and maintains epithelial polarity[J]. *Cell*, 2003, 115(6): 765-766.
- [9] OWYONG T C, SUBEDI P, DENG J, *et al.* A molecular chameleon for mapping subcellular polarity in an unfolded proteome environment[J]. *Angewandte Chemie*, 2020, 132(25): 10215-10221.
- [10] LI P, XIAO H B, CHENG Y F, *et al.* A near-infrared-emitting fluorescent probe for monitoring mitochondrial pH[J]. *Chemical Communications*, 2014, 50(54): 7184-7187.
- [11] MENG F F, NIU J, ZHANG H M, *et al.* A pH-sensitive spirocyclization strategy for constructing a single fluorescent probe simultaneous two-color visualizing of lipid droplets and lysosomes and monitoring of lipophagy[J]. *Analytical Chemistry*, 2021, 93(34): 11729-11735.
- [12] LI Z H, CHENG J, HUANG P, *et al.* Imaging and detection of hepatocellular carcinoma with a hepatocyte-specific fluorescent probe[J]. *Analytical Chemistry*, 2022, 94(7): 3386-3393.
- [13] COLLOT M, BOU S, FAM T K, *et al.* Probing polarity and heterogeneity of lipid droplets in live cells using a push-pull fluorophore[J]. *Analytical Chemistry*, 2019, 91(3): 1928-1935.
- [14] LI X Y, LI X H, MA H M. A near-infrared fluorescent probe reveals decreased mitochondrial polarity during mitophagy[J]. *Chemical Science*, 2020, 11(6): 1617-1622.
- [15] SONG J (宋健), YANG X Q (杨晓琴), ZHANG Y J (张颖君), *et al.* Synthesis and application of caffeic acid based fluorescent probe for detection of hydrazine hydrate[J]. *Fine Chemicals (精细化工)*, 2023, 40(1): 50-55, 62.
- [16] QI Y L, WANG H R, KANG Q J, *et al.* A versatile fluorescent probe for simultaneously detecting viscosity, polarity and nitroreductases and its application in bioimaging[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2022, 352: 130989.
- [17] CUI J J, YAO Y H, CHEN C, *et al.* Mitochondria-targeted ratiometric fluorescent probes for micropolarity and microviscosity and their applications[J]. *Chinese Chemical Letters*, 2019, 30(5): 1071-1074.
- [18] KASKOVA Z M, DORR F A, PETUSHKOV V N, *et al.* Mechanism and color modulation of fungal bioluminescence[J]. *Science Advances*, 2017, 3(4): e1602847.
- [19] FILIPPONI P, BAXENDALE I R. The generation of a library of bromodomain-containing protein modulators expedited by continuous flow synthesis[J]. *European Journal of Organic Chemistry*, 2016, 2016(11): 2000-2012.

(下转第 1725 页)