高选择性过氧化亚硝酰荧光探针的设计与研究

后际挺^{1,2}, 李坤¹, 覃彩芹^{2*}, 余孝其^{1*}

1. 绿色化学与技术教育部重点实验室; 四川大学化学学院, 成都 610064

2. 生物质资源转化利用湖北省协同创新中心, 湖北工程学院, 孝感 432000

*通讯作者, E-mail: qincq@hbeu.edu.cn; xqyu@scu.edu.cn

收稿日期: 2018-05-15; 接受日期: 2018-07-04; 网络版发表日期: 2018-08-15

国家自然科学基金(编号: 31371750)资助项目

摘要 过氧化亚硝酰(peroxynitrite)是细胞内重要的活性氧素之一, 其在细胞内氧化还原平衡生理过程中发挥着重要作用. 基于本课题组前期报道, 我们设计合成了一系列基于香豆素-喹啉共轭体系的荧光染料, 并考察了它们对各活性氧素的选择性, 发现在磷酸盐缓冲液(PBS)体系中(pH 7.40), C-QL-1和C-QL-2能够特异性地对过氧化亚硝酰产生“off-on”的荧光信号变化, 其检测限可分别达到69和140 nM. 通过核磁共振氢谱、质谱等手段, 发现在过氧化亚硝酰作用下, C-QL-1和C-QL-2发生了分子内碳碳双键氧化水解成醛的过程.

关键词 过氧化亚硝酰, 荧光探针, 香豆素, 喹啉盐

1 引言

作为细胞内高活性氧素(highly reactive oxygen species, hROS; ONOO⁻, ClO⁻和·OH)之一, 过氧化亚硝酰(ONOO⁻, peroxynitrite)是由一氧化氮(NO)和超氧根自由基(O₂⁻)通过扩散控制的方式, 以1:1的化学计量比反应生成. 自Beckman等^[1]于1990年发现ONOO⁻以来, 科学家们相继揭示了ONOO⁻在细胞内多种生理过程中的作用, 如生物大分子(如DNA和蛋白质)的硝化以及线粒体功能失调^[2,3]. 过去10年中, ONOO⁻被认为是疾病诊断中的一种标志物, 因为在多种病理过程中均发现ONOO⁻的生成, 如炎症、心血管病、神经退行性疾病和癌症等^[4-8]. 最近, Rao课题组^[9]发现在药物引起的肝损伤中, 可以观察到ONOO⁻的生成, 因此该课题组认为ONOO⁻可以作为药物安全评估

中的指示剂.

基于ONOO⁻在生物体系中的重要功能, 探索可靠有效的ONOO⁻检测技术则显得有必要且有意义^[10]. 荧光分析法具有高测试效率、无损检测以及高时空分辨率等特点^[11-16], 因此利用荧光技术检测ONOO⁻在过去10年中得到了快速发展. 2006年, Yang课题组^[17]报道了首例ONOO⁻高选择性荧光探针. 自此, ONOO⁻荧光探针的报道逐年增加, 而这些探针在生物体系中的应用也得到了广泛研究^[18-31]. 对于ONOO⁻荧光探针, 其他活性氧素的干扰会影响其选择性; 若反应速度较慢, 则无法实现实时检测. 目前, 开发具有高选择性、高灵敏性及快速响应的ONOO⁻荧光探针依然面临着挑战.

2014年, 本课题组^[32]设计合成了一例基于香豆素-吡啶盐共轭体系的化合物C-Py-1. 该化合物的碳碳双键可以选择性地被ONOO⁻氧化裂解, 进而生成香豆素

引用格式: Hou JT, Li K, Qin C, Yu XQ. The design and study of highly selective fluorescent probes for peroxynitrite. *Sci Sin Chim*, 2019, 49: 346–352, doi: 10.1360/N032018-00113

醛,并在490 nm处出现强烈的荧光发射峰.然而,研究发现, **C-Py-1**和 ONOO^- 之间的反应并不完全,具体表现为除了在490 nm处出现主要发射峰,在600 nm左右也伴随产生微弱的肩峰.该反应的完成需要3 min左右,无法满足实时检测.鉴于以上不足,我们在**C-Py-1**的基础上,制备出反应活性更高的 ONOO^- 荧光探针**C-QL-1**和**C-QL-2**.合成路线如图1所示,将**C-Py-1**中的吡啶盐替换成结构类似的喹啉盐或异喹啉盐,不仅能够保留探针的水溶性,还能保留碳碳双键对 ONOO^- 的反应活性.两种喹啉盐的引入对碳碳双键活性的影响也被考察.作为对照,我们也合成了二乙基氨基香豆素-喹啉共轭体系**C-QL-3**,并对其活性进行考察.

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

LCMS-IT-TOF型质谱仪(Shimadzu, 日本); Bruker AV-400核磁共振仪(^1H : 400 MHz, ^{13}C : 100 MHz, 0.5% 四甲基硅烷(TMS)为内标); U-1900紫外光谱仪(Hitachi, 日本); FluoroMax-4荧光光谱仪(JONIN-YVON, Horiba, 日本); ZEISS LSM 780激光共聚焦荧光成像仪(德国).

所用试剂和药品除特别注明外,未经进一步处理.溶液测试过程均使用色谱纯有机溶剂或去离子水.色谱纯有机溶剂购自Roe Scientific Inc. (美国)或者Dikma Technologies Inc. (中国);薄层色谱分析(TLC)监测

通过薄层硅胶板进行,柱色谱分离采用青岛海洋化工厂(中国)生产的硅胶H(未加活化, 300~400目).

2.2 探针合成与表征

2.2.1 1,4-二甲基喹啉盐1的合成

将4-甲基喹啉(2.86 g, 20 mmol)和碘甲烷(4.3 g, 30 mmol)混溶于10 mL甲苯中.将反应升温至50℃下搅拌4 h后冷却至室温.抽滤所析出固体,并用乙醚洗涤,然后真空干燥,得到黄色固体**1** (4.1 g, 14.1 mmol).产率: 70.5%. ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 9.37 (d, $J=6.0$ Hz, 1H), 8.55 (dd, $J=8.4, 0.6$ Hz, 1H), 8.50 (d, $J=8.8$ Hz, 1H), 8.31~8.27 (m, 1H), 8.10~8.06 (m, 2H), 4.59 (s, 3H), 3.02 (s, 3H). ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 158.6, 149.4, 138.1, 135.4, 130.1, 128.9, 127.3, 122.9, 120.0, 45.6, 20.1. HRMS calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}^+$ $[\text{M}]^+$: 158.0964, found: 158.0960.

2.2.2 2,6-二甲基异喹啉盐2的合成

将6-甲基异喹啉(1.0 g, 7 mmol)和碘甲烷(1.5 g, 10.5 mmol)溶于甲苯/甲醇=5:1 (V/V)的混合溶液中.将反应升温至50℃下搅拌4 h后冷却至室温.减压蒸除溶剂后通过300~400目硅胶柱层析分离,以二氯甲烷/甲醇=10:1为洗脱剂,得到土黄色固体**2** (1.1 g, 3.9 mmol).产率: 55.1%. ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 9.92 (s, 1H), 8.65 (dd, $J=6.8, 1.2$ Hz, 1H), 8.44 (d, $J=6.8$ Hz, 1H), 8.38 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 8.13 (s, 1H), 7.92 (dd, $J=8.5, 1.2$ Hz, 1H), 4.45 (s, 3H), 2.67 (s, 3H). ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 150.4, 148.7, 137.3, 136.4, 133.8, 130.3, 126.4, 125.8, 124.9, 48.2, 22.7. HRMS calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}^+$ $[\text{M}]^+$: 158.0964, found: 158.0960.

2.2.3 C-QL-1的合成

将香豆素醛^[32] (54 mg, 0.2 mmol)和1,4-二甲基喹啉盐**1** (86 mg, 0.3 mmol)溶于3 mL无水乙酸酐中,升温至130℃反应4 h后,冷却至室温,抽滤得到绿色粉末状固体**C-QL-1** (66 mg, 1.23 mmol).产率: 61.5%. ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 9.21 (d, $J=6.6$ Hz, 1H), 8.71 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 8.49~8.32 (m, 4H), 8.24 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 8.06~8.03 (m, 2H), 7.14 (s, 1H), 4.49 (s, 3H), 3.38~3.37 (m, 4H), 2.76 (s, 4H), 1.93~1.90 (m, 4H).

图1 探针分子的设计合成路线(网络版彩图)

Figure 1 The synthetic route of the probes (color online).

^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 160.6, 152.9, 151.9, 148.4, 147.9, 145.6, 139.2, 135.2, 129.7, 127.1, 126.4, 125.9, 120.1, 119.8, 117.9, 115.5, 113.1, 108.9, 105.6, 50.2, 49.6, 44.8, 40.9, 27.2, 21.0, 20.1. HRMS calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_2^+$ $[\text{M}]^+$: 409.1911, found: 409.1908.

2.2.4 C-QL-2的合成

将香豆素醛**3** (108 mg, 0.4 mmol)和2,6-二甲基异喹啉盐**2** (172 mg, 0.6 mmol)溶于5 mL无水乙醇中, 加入2滴吡啶, 升温至80℃反应3 h后, 冷却至室温, 抽滤得到暗红色固体. 将该固体通过碱性三氧化二铝柱层析分离, 以二氯甲烷/甲醇=20:1为洗脱剂, 得到红棕色固体**C-QL-2** (65 mg, 1.23 mmol). 产率: 32.6%. ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 9.80 (s, 1H), 8.59 (d, $J=6.8$ Hz, 1H), 8.43~8.33 (m, 2H), 8.28 (s, 2H), 8.08 (d, $J=3.4$ Hz, 1H), 7.73 (d, $J=16.2$ Hz, 1H), 7.59 (d, $J=13.2$ Hz, 1H), 7.09 (s, 1H), 4.40 (s, 3H), 3.31 (s, 4H), 2.78~2.72 (m, 4H), 1.95~1.85 (m, 4H). ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 160.6, 152.9, 151.9, 148.4, 147.9, 145.6, 139.2, 135.2, 129.7, 127.1, 126.4, 126.0, 120.1, 119.8, 118.0, 115.5, 113.1, 108.9, 105.6, 99.9, 50.2, 49.6, 44.8, 27.2, 21.0, 20.0. HRMS calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_2^+$ $[\text{M}]^+$: 409.1911, found: 409.1907.

2.2.5 C-QL-3的合成

将香豆素醛**4**^[32] (49 mg, 0.2 mmol)和1,4-二甲基喹啉盐**1** (86 mg, 0.3 mmol)溶于3 mL无水乙酸酐中, 升温至120℃反应6 h后, 冷却至室温, 将抽滤所得固体通过碱性三氧化二铝柱层析分离, 以二氯甲烷/甲醇=20:1为洗脱剂, 得到紫红色固体**C-QL-3** (31 mg, 0.62 mmol). 产率: 30.3%. ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 9.27 (d, $J=6.6$ Hz, 1H), 8.76 (d, $J=8.5$ Hz, 1H), 8.61~8.33 (m, 4H), 8.30~8.21 (m, 1H), 8.15~7.96 (m, 2H), 7.58 (d, $J=9.0$ Hz, 1H), 6.85 (dd, $J=9.0, 2.2$ Hz, 1H), 6.66~6.62 (m, 1H), 4.53 (s, 3H), 3.53 (dd, $J=13.4, 6.4$ Hz, 4H), 1.18 (t, $J=6.8$ Hz, 6H). ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 160.5, 156.9, 152.8, 152.6, 148.2, 145.6, 139.2, 138.7, 135.3, 131.4, 129.8, 126.4, 126.1, 119.9, 118.9, 115.8, 114.4, 110.7, 109.0, 96.8, 44.9, 44.9, 12.9. HRMS calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_2^+$ $[\text{M}]^+$: 385.1911, found: 385.1916.

3 结果与讨论

3.1 光谱性质测试

首先考察了**C-QL-1**~**C-QL-3** 3个化合物在不同溶剂(CH_2Cl_2 , CH_3OH 和 H_2O)中的紫外吸收光谱及荧光发射光谱. 从表S1 (补充材料)中可以看出, 在 CH_2Cl_2 中, **C-QL-1**的最大吸收波长位于632 nm, 在 CH_3OH 和 H_2O 中则分别蓝移至572和533 nm, 说明溶剂极性对**C-QL-1**的吸收光谱有明显影响. 另一方面, **C-QL-1**在 CH_2Cl_2 和 CH_3OH 中的最大发射波长分别位于725和710 nm, 因此在这两种溶剂中**C-QL-1**的Stokes位移分别为93和138 nm. 在 H_2O 中, **C-QL-1**的荧光强度非常弱, 可能是由于染料分子和水分子之间形成了分子间氢键, 从而导致荧光淬灭^[33].

在**C-QL-2**和**C-QL-3**的光谱测试中发现类似的结果. 在同一种溶剂中, 3个化合物最大吸收波长的顺序为**C-QL-1**>**C-QL-3**>**C-QL-2**, 说明1,4-二甲基喹啉盐的吸电子性比2,6-二甲基异喹啉盐强, 同时**C-QL-1**中的氨基取代基的供电子性比**C-QL-3**中的二乙基氨基取代基强.

3.2 探针对 ONOO^- 的荧光响应

接着测试了3个化合物对 ONOO^- 的荧光响应. 如图2所示, 向5 μM 每种化合物的磷酸盐缓冲液(PBS) (pH 7.40, 10 mM, 含0.1% 二甲亚砜(DMSO))中加入25 μM ONOO^- , 可以发现**C-QL-1**溶液在494 nm处出现32倍荧光增强, **C-QL-2**溶液在496 nm处出现15倍荧光增强, 而**C-QL-3**溶液的荧光光谱几乎不变, 说明二乙基氨基取代的共轭体系中的碳碳双键反应活性较低, 与我们之前的报道结果一致. 值得注意的是, 在**C-QL-1**和**C-QL-2**与 ONOO^- 的反应光谱中只出现了主要产物的荧光发射峰, 没有在其他波段出现肩峰, 说明与**C-Py-1**相比, 这两个探针与 ONOO^- 的反应更为彻底. 将**C-QL-1**和**C-QL-2**与 ONOO^- 反应后的荧光光谱进行归一化处理, 与香豆素醛**3**的荧光发射光谱对比, 发现三者基本吻合(图S1, 补充材料), 推测这两个化合物与 ONOO^- 反应生成香豆素醛**3**.

3.3 反应机理研究

为了进一步验证探针与 ONOO^- 的反应机理, 我们将少量**C-QL-2**与 ONOO^- 反应, 通过常规后处理操作

图2 PBS缓冲溶液(pH 7.40, 10 mM, 含0.1% DMSO)中, 探针(a) C-QL-1, (b) C-QL-2及(c) C-QL-3与ONOO⁻作用前后的荧光光谱图; (d) 3个化合物在ONOO⁻作用下的荧光强度变化(λ_{ex} =425 nm, 探针浓度5 μM , [ONOO⁻]=25 μM , 狭缝宽度: 3 nm/3 nm) (网络版彩图)

Figure 2 Fluorescence spectra of C-QL-1 (a), C-QL-2 (b), and C-QL-3 (c) before and after reaction with ONOO⁻ in PBS buffer (pH 7.4, 10 mM, containing 0.1% DMSO); (d) emission intensity changes of the three compounds with ONOO⁻. [probe]=5 μM , [ONOO⁻]=25 μM , λ_{ex} =425 nm, slit: 3 nm/3 nm (color online).

得到反应产物, 并将反应产物进行¹H NMR和质谱表征. 从产物的¹H NMR图谱中(图S2)可以发现, 在9.86 ppm处出现典型的醛基氢信号峰, 该峰位移与香豆素醛3中醛基氢的位移一致, 说明产物中醛基的存在. 同时, 化合物3的香豆素环上的两组芳香氢也能分别在产物的¹H NMR谱中得到匹配. 和C-QL-2的¹H NMR谱相比, 产物谱图中位于7.8~7.4 ppm之间的碳碳双键上一组氢的特征信号峰消失, 证明了碳碳双键的断裂. 从产物的ESI-MS谱中(图S3), 我们发现在 m/z =292.0928处出现明显的离子峰, 与化合物3的分子离子峰一致([3+Na]⁺: m/z =292.0950). 以上实验结果表明, C-QL-1和C-QL-2在ONOO⁻作用下经历氧化水解断裂, 从而生成荧光产物香豆素醛3.

3.4 反应动力学研究

根据前期研究, C-Py-1和ONOO⁻的作用需要3 min, 不适合实时检测. 作为对比, 我们测试了C-QL-1和C-QL-2与ONOO⁻的反应动力学. 如图S4所示, 两个探针与ONOO⁻的反应均可在数秒内完成, 说明将吡

啉盐替换为喹啉盐或异喹啉盐可以提高碳碳双键的反应活性, 从而提高其与ONOO⁻的反应速率. 另一方面, 与ONOO⁻作用7 min后, C-QL-3的荧光强度基本保持不变, 再次确认了二乙基氨基取代基对碳碳双键活性的负影响.

3.5 探针选择性研究

以上实验结果表明, 利用喹啉盐或异喹啉盐替代C-Py-1中的吡啉盐, 可以提高其碳碳双键的反应活性. 而为了进一步确认该碳碳双键活性的提高不会影响探针与其他活性氧素选择性, 我们测试了探针与其他活性氧素及活性物质的作用. 如图3所示, 向5 μM C-QL-1或C-QL-2的PBS溶液中加入100 μM 其他待测物质, 包括 $\cdot\text{OH}$, $\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , ClO^- , tBuOOH , $^1\text{O}_2$, NO, NO_2^- , NO_3^- , SO_3^{2-} , S^{2-} , CN^- , F^- , GSH, Cys以及Hcy, 均未发现明显的荧光强度变化(ClO^- 可引起C-QL-2荧光强度增强两倍). 该结果表明, 探针碳碳双键的活性虽然增强, 但依然保持对ONOO⁻优秀的特异性. 需要注意的是, 作为强力的亲核试剂, SO_3^{2-} 并未引起两个探针荧光强

图 3 探针C-QL-1在不同活性物质作用下的(a)荧光光谱图及(b)荧光强度变化; 探针C-QL-2在不同活性物质作用下的(c)荧光光谱图及(d)荧光强度变化 ($\lambda_{\text{ex}}=425$ nm, 探针浓度5 μM , 狭缝宽度: 3 nm/3 nm) (网络版彩图)

Figure 3 (a) Fluorescence spectra and (b) fluorescence intensity of C-QL-1 at 494 nm before and after reaction with various species; (c) fluorescence spectra and (d) fluorescence intensity of C-QL-2 at 496 nm before and after reaction with various species. [probe]=5 μM , $\lambda_{\text{ex}}=425$ nm, slit: 3 nm/3 nm (color online).

度变化. 而我们之前的研究表明, 将C-Py-1中的吡啶盐替换为3-氰基吡啶盐, 可以得到高选择性的增强型SO₃²⁻荧光探针^[34]. 因此, 通过对C-Py-1的结构进行调整, 我们成功地开发出反应更充分、响应更快速的ONOO⁻荧光探针.

3.6 探针对ONOO⁻浓度的荧光响应

接下来, 我们测试了C-QL-1和C-QL-2的荧光强度随着ONOO⁻浓度增加的变化趋势. 如图4所示, 在PBS缓冲溶液中, 随着ONOO⁻浓度的增加, C-QL-1在486 nm处的荧光强度逐渐增强; 当加入12当量ONOO⁻之后, 其荧光强度趋于饱和, 增强幅度约为40倍. 当ONOO⁻浓度在0~15 μM 时, C-QL-1的荧光呈线性增强, 检测限为69 nM ($S/N=3$). 对于C-QL-2, 当加入12当量ONOO⁻后, 其在490 nm处的荧光强度亦趋于饱和, 增强幅度约为22倍. 当ONOO⁻浓度在0~20 μM 时, C-QL-2的荧光呈线性增强, 检测限为140 nM ($S/N=3$, 图S5). 这两个探针对ONOO⁻的灵敏度可与已报道的ONOO⁻荧光探针相媲美. 在PBS溶液中, C-QL-1和C-QL-2的量子产率分别为0.0093和0.013; 与ONOO⁻作用后, 其量子产率分别提高至0.23和0.21.

3.7 pH对探针与ONOO⁻作用的影响

随后测试了pH对C-QL-1和C-QL-2反应活性的影响(图S6). 结果表明, C-QL-1和C-QL-2本身的荧光强度在pH 4.2~9.4之间基本不变, 而在pH 6~9之间, 两个探针表现出对ONOO⁻的明显响应. 考虑到ONOO⁻的酸式结构ONOOH的pK_a为6.8, 且在酸性条件下易于分解, 因此两个探针对ONOO⁻的pH响应区间是合理的.

3.8 细胞毒性与荧光成像

我们对C-QL-1和C-QL-2在HeLa细胞中的毒性进行了考察(图S7). 结果表明, 当探针浓度不高于5 μM 时, HeLa细胞的存活率可以保持在80%以上.

为了更深入地了解探针对细胞内ONOO⁻的检测性能, 我们进一步探索了探针在HeLa细胞中的荧光成像性能. 将C-QL-1和C-QL-2与HeLa细胞分别培养30 min后, PBS冲洗3次, 后用于共聚焦成像. 结果发现, 与溶液测试中表现出的弱荧光性能不同, C-QL-1在细胞中呈现出红色荧光, 而C-QL-2呈现出橙黄色荧光(图S8). 我们推测该两种化合物中的正电性导致其与细胞中带负电荷的大分子(如DNA)发生了作用, 从而影响其荧光性能. 测试两个探针与单、双链DNA及

图 4 探针(a) C-QL-1和(b) C-QL-2的荧光强度随 ONOO^- 浓度的变化. 插图: C-QL-1和C-QL-2的荧光强度与 ONOO^- 浓度的滴定曲线 ($\lambda_{\text{ex}}=425\text{ nm}$, 探针浓度 $5\text{ }\mu\text{M}$, 狭缝宽度: $3\text{ nm}/3\text{ nm}$) (网络版彩图)

Figure 4 Fluorescence titration spectra of (a) C-QL-1 and (b) C-QL-2 upon the addition of ONOO^- . [probe]= $5\text{ }\mu\text{M}$, $\lambda_{\text{ex}}=425\text{ nm}$, slit: $3\text{ nm}/3\text{ nm}$. Inset: the titration plot of C-QL-1 and C-QL-2 upon the addition of ONOO^- , respectively (color online).

富G四联体DNA作用后的荧光光谱, 发现双链DNA和富GDNA确实可以引起两个探针的荧光增强(图S9).

4 结论

通过对前期工作所报道的 ONOO^- 荧光探针C-Py-1进行结构改变, 设计合成了C-QL-1和C-QL-2. 与C-

Py-1相比, C-QL-1和C-QL-2保持了对 ONOO^- 的高选择性, 但响应更快速、反应更彻底、检测更灵敏. 虽然活细胞成像中易受到核酸或蛋白等大分子的干扰, 但是通过对已知探针进行结构调控获得性能更加优异的荧光探针这一策略的实现, 对开发新的高选择性、高灵敏性荧光探针具有一定的启发意义.

补充材料

本文的补充材料见网络版<http://chemcn.scichina.com>. 补充材料为作者提供的原始数据, 作者对其学术质量和内容负责.

参考文献

- Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990, 87: 1620–1624
- Kaur H, Halliwell B. *FEBS Lett*, 1994, 350: 9–12
- Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies MJ. *Biochem J*, 1997, 324: 1–18
- Wiseman H, Halliwell B. *Biochem J*, 1996, 313: 17–29
- Schieke SM, Briviba K, Klotz LO, Sies H. *FEBS Lett*, 1999, 448: 301–303
- Kossenjans W, Eis A, Sahay R, Brockman D, Myatt L. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol*, 2000, 278: H1311–H1319
- Salminen A, Ojala J, Kauppinen A, Kaarniranta K, Suuronen T. *Prog Neurobiol*, 2009, 87: 181–194
- Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. *Cell*, 2010, 140: 883–899
- Shuhendler AJ, Pu K, Cui L, Uetrecht JP, Rao J. *Nat Biotechnol*, 2014, 32: 373–380
- Ferrer-Sueta G, Radi R. *ACS Chem Biol*, 2009, 4: 161–177
- de Silva AP, Gunaratne HQN, Gunnlaugsson T, Huxley AJM, McCoy CP, Rademacher JT, Rice TE. *Chem Rev*, 1997, 97: 1515–1566
- Yuan L, Lin W, Zheng K, He L, Huang W. *Chem Soc Rev*, 2013, 42: 622–661
- Fan J, Hu M, Zhan P, Peng X. *Chem Soc Rev*, 2013, 42: 29–43
- Guo Z, Park S, Yoon J, Shin I. *Chem Soc Rev*, 2014, 43: 16–29
- He L, Dong B, Liu Y, Lin W. *Chem Soc Rev*, 2016, 45: 6449–6461

- 16 Hou JT, Ren WX, Li K, Seo J, Sharma A, Yu XQ, Kim JS. *Chem Soc Rev*, 2017, 46: 2076–2090
- 17 Yang D, Wang HL, Sun ZN, Chung NW, Shen JG. *J Am Chem Soc*, 2006, 128: 6004–6005
- 18 Ueno T, Urano Y, Kojima H, Nagano T. *J Am Chem Soc*, 2006, 128: 10640–10641
- 19 Sun ZN, Wang HL, Liu FQ, Chen Y, Tam PKH, Yang D. *Org Lett*, 2009, 11: 1887–1890
- 20 Peng T, Yang D. *Org Lett*, 2010, 12: 4932–4935
- 21 Yu F, Li P, Li G, Zhao G, Chu T, Han K. *J Am Chem Soc*, 2011, 133: 11030–11033
- 22 Zhang Q, Zhu Z, Zheng Y, Cheng J, Zhang N, Long YT, Zheng J, Qian X, Yang Y. *J Am Chem Soc*, 2012, 134: 18479–18482
- 23 Lin KK, Wu SC, Hsu KM, Hung CH, Liaw WF, Wang YM. *Org Lett*, 2013, 15: 4242–4245
- 24 Yu F, Li P, Wang B, Han K. *J Am Chem Soc*, 2013, 135: 7674–7680
- 25 Sun X, Xu Q, Kim G, Flower SE, Lowe JP, Yoon J, Fossey JS, Qian X, Bull SD, James TD. *Chem Sci*, 2014, 5: 3368–3373
- 26 Peng T, Wong NK, Chen X, Chan YK, Ho DHH, Sun Z, Hu JJ, Shen J, El-Nezami H, Yang D. *J Am Chem Soc*, 2014, 136: 11728–11734
- 27 Li X, Tao RR, Hong LJ, Cheng J, Jiang Q, Lu YM, Liao MH, Ye WF, Lu NN, Han F, Hu YZ, Hu YH. *J Am Chem Soc*, 2015, 137: 12296–12303
- 28 Song Z, Mao D, Sung SHP, Kwok RTK, Lam JWY, Kong D, Ding D, Tang BZ. *Adv Mater*, 2016, 28: 7249–7256
- 29 Jia X, Chen Q, Yang Y, Tang Y, Wang R, Xu Y, Zhu W, Qian X. *J Am Chem Soc*, 2016, 138: 10778–10781
- 30 Miao J, Huo Y, Liu Q, Li Z, Shi H, Shi Y, Guo W. *Biomaterials*, 2016, 107: 33–43
- 31 Cheng D, Pan Y, Wang L, Zeng Z, Yuan L, Zhang X, Chang YT. *J Am Chem Soc*, 2017, 139: 285–292
- 32 Hou JT, Yang J, Li K, Liao YX, Yu KK, Xie YM, Yu XQ. *Chem Commun*, 2014, 50: 9947–9950
- 33 Zhao GJ, Han KL. *Acc Chem Res*, 2012, 45: 404–413
- 34 Yang J, Li K, Hou JT, Lu CY, Li LL, Yu KK, Yu XQ. *Sci China Chem*, 2017, 60: 793–798

The design and study of highly selective fluorescent probes for peroxynitrite

Ji-Ting Hou^{1,2}, Kun Li¹, Caiqin Qin^{2*}, Xiao-Qi Yu^{1*}

¹ Key Laboratory of Green Chemistry and Technology, Ministry of Education, College of Chemistry, Sichuan University, Chengdu 610064, China

² Hubei Collaboration Innovation Center for Biomass Conversion and Utilization, Hubei Engineering University, Xiaogan 432000, China

*Corresponding authors (email: qincq@hbeu.edu.cn; xqyu@scu.edu.cn)

Abstract: As one of the most important intracellular reactive oxygen species, peroxynitrite plays vital roles in various cellular processes such as the redox balance. On the basis of the work reported by our group, we designed and synthesized a series of fluorescent dyes based on the coumarin-quinolinium conjugates, and investigated their reactivities toward the reactive oxygen species. The results showed that in phosphate buffered saline (PBS), **C-QL-1** and **C-QL-2** could exhibit selective fluorescence intensity enhancements in the presence of peroxynitrite, with detection limits to be 69 and 140 nM, respectively. The oxidative cleavage and hydrolysis of the carbon-carbon double bond in the probes to form aldehyde was confirmed via ¹H NMR and electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS).

Keywords: peroxynitrite, fluorescent probe, coumarin, quinolinium

doi: [10.1360/N032018-00113](https://doi.org/10.1360/N032018-00113)