

# 一种基于苯并噻唑的长波长双响应性荧光探针对粘度与 $H_2O_2$ 的检测

朱单单<sup>1,2</sup>, 瞿鹏<sup>2\*</sup>, 孙闯<sup>2</sup>, 杨媛<sup>2</sup>, 刘道胜<sup>1\*</sup>, 申琦<sup>3</sup>, 郝远强<sup>2\*</sup>

1. 辽宁石油化工大学化学化工与环境学部, 辽宁 抚顺 113006
2. 河南省新能源电池材料工程技术研究中心, 河南省先进电池材料开发应用研究中心, 河南生物分子识别与传感重点实验室, 商丘师范学院化学化工学院, 河南 商丘 476000
3. 郑州大学化学与分子工程学院, 河南 郑州 450001

**摘要**  $H_2O_2$  是一种常见的生物活性小分子, 其在细胞增殖, 炎症反应, 细胞信号传输等过程中都起着重要的作用。细胞粘度是一项重要的生理微环境参数, 其为细胞是否正常运转的关键指标。研究还表明, 一些重大的生理疾病与细胞组织的粘度及过氧化氢浓度异常均有着密切的关联, 如阿尔茨海默病、癌症。因此开发能有效同时检测  $H_2O_2$  及粘度的分析方法对揭示相关生理病理机制及重大疾病的诊断有着重要的意义。研制了一种能有效检测  $H_2O_2$  与粘度的双响应型荧光探针(1)。由于存在扭曲分子内电荷转移(TICT)的猝灭效应, 探针(1)几乎不具有荧光发射特性。而随着环境体系粘度的增高, TICT效应被抑制, 探针(1)呈现出了强的荧光发射, 且发射峰位于近红外波段处(680 nm)。随着粘度从 1.996 cp 增至 851.8 cp, 探针的荧光强度增幅达到了 85 倍。探针还能对  $H_2O_2$  产生灵敏的荧光响应, 发射峰位置在 590 nm 处。响应原理为  $H_2O_2$  能与探针中的苯硼酸基团反应使探针脱除掉与吡啶氮原子相连的亚甲基苯硼酸, 从而减弱了探针分子中的 TICT 效应以及分子内电荷转移(ICT)效应, 因此探针溶液荧光发射显著增强且探针溶液的紫外光谱发生了明显的蓝移(吸收峰从 540 nm 移至 460 nm), 对应溶液颜色从红色变为黄色。荧光光谱测试表明探针(1)对  $H_2O_2$  的检测具有高的选择性与灵敏度, 探针体系在 590 nm 处的荧光强度与  $H_2O_2$  的浓度呈良好的线性关系, 线性范围为  $0 \sim 25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 根据 IUPAC 的  $3\sigma$  法计算得出检测限为  $0.34 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。此外细胞荧光成像实验表明探针(1)具有较好的生物相容性及细胞膜通透性, 且能实现细胞内  $H_2O_2$  的成像分析。

**关键词** 荧光探针; 过氧化氢; 粘度; 近红外; 苯并噻唑

**中图分类号:** O657.3 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2020)06-1775-05

## 引言

过氧化氢( $H_2O_2$ )是一种重要的生理活性含氧分子, 而且其他活性氧的产生与代谢过程也常需要  $H_2O_2$  的参与<sup>[1]</sup>。研究表明过氧化氢的非正常水平与多种疾病相关, 如炎症性疾病、心血管疾病、神经组织退化疾病和癌症<sup>[2-3]</sup>。另一方面, 粘度作为细胞正常运转的重要指标参数, 能反映细胞内生物分子的信号传导, 营养物质和代谢废物的运输状况。研究发现细胞粘度的变化和过氧化氢的非正常水平也与许多疾病有关<sup>[4]</sup>。开发一种简单可靠的方法实现粘度及过氧化氢的同时检测对相关疾病的诊断及病理机制的研究有着重要的意义。

众所周知, 荧光成像分析方法具有高灵敏度、无创检测、实时分析、时空分辨率高等特点, 已应用于多种物质的检测<sup>[5-6]</sup>; 能对多个检测对象具有不同光谱信号通道响应的单一分子荧光探针体系有诸多优点, 如分析程序简单、减少光谱串扰、避免反应产物对另一个探针检测的影响<sup>[7-12]</sup>。而能够同时检测粘度和过氧化氢水平的荧光探针分子还鲜有报道<sup>[13]</sup>。

基于上述考虑, 开发了一种基于苯并噻唑的具有长波长至近红外发射特性的双响应性荧光探针(1), 探针对  $H_2O_2$  的识别基团为苯硼酸结构单元<sup>[14]</sup>, 探针对粘度的响应机制为随着体系粘度的增高探针分子的扭曲分子内电荷转移(TICT)过程逐渐被抑制, 从而探针分子的荧光发射增强。探针(1)具有如下优点: 对目标物均为长波长的增强型荧光响

收稿日期: 2019-05-28, 修订日期: 2019-09-30

基金项目: 国家自然科学基金项目(21804085)资助

作者简介: 朱单单, 女, 1995年生, 辽宁石油化工大学化学化工与环境学部硕士研究生 e-mail: 2648159666@qq.com

\* 通讯联系人 e-mail: qupeng0212@163.com; dsliu05@126.com; hao0736@163.com

应,有利于减低背景荧光的干扰,对  $\text{H}_2\text{O}_2$  的响应荧光波长在 590 nm 附近,对粘度的响应波长为 680 nm;探针体系具有较大的斯托克斯位移值有利于消除激发光的干扰,对  $\text{H}_2\text{O}_2$  与粘度响应的斯托克斯位移值分别为:140 与 230 nm;探针具有良好的生物相容性可用于细胞成像分析。

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

2-氨基苯硫(安耐吉),其他试剂(2-羟基-5-甲基苯甲醛,乌洛托品,4-溴甲基苯硼酸,三氟乙酸,4-甲基吡啶)均为阿达玛斯试剂。所有的水溶液均使用 Millipore 的纯水( $18 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$ )配置。

CPA224S 分析天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司);IKA®C-MAG HS7 电磁搅拌器(德国 IKA 公司);ZF-II 型四用紫外分析仪(上海顾村电光仪器厂);IKA®RV 10 旋转蒸发仪(德国 IKA 公司);BRUKER AV400 核磁共振仪(德国 BRUKER 公司);Waters Acquity UPLC H-Class 系统(美国 Waters 公司);Lambda 850 紫外可见分光光度计(美国 PerkinElmer 公司);LS55 荧光光谱仪(美国 PerkinElmer 公司);Zeiss LSM710 激光扫描共聚焦显微镜(德国 Zeiss 公司)。

### 1.2 光谱测试

#### 1.2.1 紫外光谱

选择 DMSO-PBS 体系,在配置的反应液中探针浓度为  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,DMSO 所占比例为 50%,溶液 pH 为 7.4,磷酸缓冲溶液的浓度为  $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,选择 DMSO-PBS 体积比为 1:1 的溶液作为参比溶液。

#### 1.2.2 荧光光谱测试

用 DMSO 溶解探针配置成母液待用,测试体系中探针浓度为  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。 $\text{H}_2\text{O}_2$  母液用去离子水稀释配置,通过移取不同体积的  $\text{H}_2\text{O}_2$  母液配置成一系列浓度梯度的待测液,在激发波长为 450 nm 下检测其荧光发射强度, $\text{H}_2\text{O}_2$  和粘度荧光检测的激发及发射狭缝宽度分别为 2.5 和 5 nm。探针与  $\text{H}_2\text{O}_2$  的反应时间为 3 h。

### 1.3 细胞实验

将培养的 A549 细胞与探针(1)( $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )、和依次与  $\text{H}_2\text{O}_2$ ( $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )及探针(1)( $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )在  $37^\circ\text{C}$  时在 DMEM (Dulbecco's modified Eagles medium)溶液中孵育。培育时间均为 3 h。培育后用 PBS 缓冲液冲洗所培育的细胞 3 次以除去多余探针分子及金属离子。细胞用共聚焦荧光显微镜进行成像(红色通道)。

### 1.4 探针(1)的合成

探针(1)的合成流程如图 1 所示,其中苯并噻唑 4 及其醛基化衍生物 3 的合成参见文献[15]。化合物 2 由 4-溴甲基苯硼酸与 4-甲基吡啶在无水乙腈中在回流反应得到。

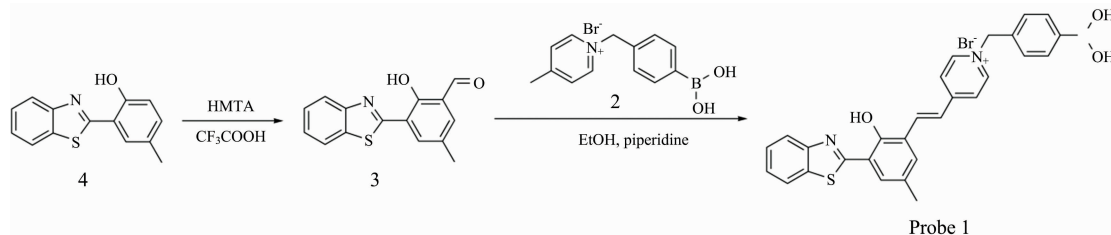


图 1 探针(1)的合成路线图

Fig. 1 Synthetic route for probe 1

将化合物 2 (0.200 g, 0.649 3 mmol)与化合物 3 (0.174 6 g, 0.649 0 mmol)溶于 30 mL 乙醇中,加入 0.5 mL 哌啶, $80^\circ\text{C}$  回流反应 6 h。再经减压蒸馏旋干溶剂,用二氯甲烷与甲醇溶解,经柱层析纯化(二氯甲烷:甲醇=5:1, V/V)过柱,最后得到近红色固体粉末 0.152 0 g,收率:41.87%。 $^1\text{H NMR}$  (400 MHz, DMSO)  $\delta$  8.66 (s, 2H), 8.54~8.39 (m, 2H), 8.13~8.03 (m, 2H), 7.94 (s, 4H), 7.82 (s, 2H), 7.44 (s, 4H), 7.23 (s, 3H), 5.58 (s, 2H), 2.22 (s, 3H)。MS:  $m/z$ , 理论值:  $[\text{M}-\text{Br}]^-$  479.16; 测量值: 478.95。

## 2 结果与讨论

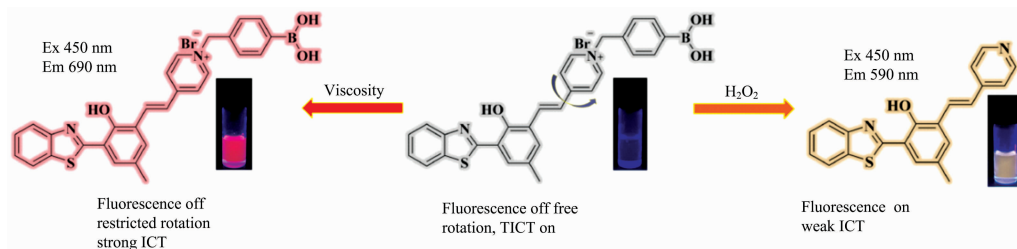
### 2.1 探针(1)对粘度及 $\text{H}_2\text{O}_2$ 响应的机理

探针(1)结构中在吡啶结构单元氮原子上连有体积较大的 4-亚甲基苯硼酸基团,从而促进了整体分子的 TICT 效

应,因此探针(1)在溶液中不具有荧光发射特性。而在粘度较大的溶液中,TICT 效应能有效被抑制,且分子内保留了从苯并噻唑单元至正离子吡啶环强烈的 ICT 效应,因此探针(1)能呈现出较强的荧光发射,且发射波长位于较长的近红外波段处(680 nm)。在有  $\text{H}_2\text{O}_2$  存在条件下, $\text{H}_2\text{O}_2$  能与探针(1)中的苯硼酸识别单元反应使其氧化成酚羟基,进一步经 1,4-消除反应可脱除亚甲基苯硼酸基团,得到的产物呈现出强的橙色荧光。基于上述不同的响应过程,探针(1)能实现对粘度及  $\text{H}_2\text{O}_2$  的双波长通道的同时响应(图 2)。

### 2.2 探针(1)对粘度荧光响应

首先测试了探针(1)在不同比例丙三醇-DMSO 体系中荧光光谱随粘度变化的曲线。如图 3(a)所示,探针(1)在所考察的波长处几乎无荧光发射。而随着溶液体系粘度的增高,探针在 680 nm 处的荧光逐渐增强,粘度从  $1.996 \text{ cp}$ (100% DMSO)变化至  $851.8 \text{ cp}$ (10% DMSO, 90% 丙三醇),荧光强度增加了 85 倍。且荧光强度的对数与粘度的对数在

图 2 探针(1)对粘度及  $\text{H}_2\text{O}_2$  响应的原理图Fig. 2 The response mechanisms of probe (1) for viscosity and  $\text{H}_2\text{O}_2$ 

96.58~568.88 cp 范围内呈现出良好的线性关系[图 3(b)], 线性方程为  $\log(I_{680}) = 1.2132 \times \log(V_{\text{viscosity}}) - 1.4023$ , 相关系数的平方为 0.997。

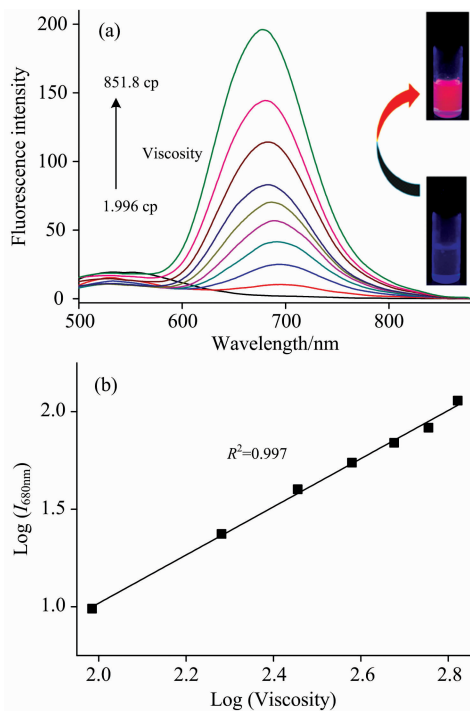


图 3 (a) 探针(1) ( $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 在不同比例丙三醇-DMSO 溶液体系中 (比例依箭头方向依次为: 0 : 10, 1 : 9, 2 : 8, 3 : 7, 4 : 6, 5 : 5, 6 : 4, 7 : 3, 8 : 2, 9 : 1) 的荧光发射光谱图; 插图为探针在低粘度及高粘度溶液中的荧光照片图, 激发光源为手持式紫外灯 (365 nm); (b) 体系荧光强度对数与粘度对数的线性拟合图

Fig. 3 (a) Fluorescence spectra of probe (1) in DMSO-glycerol solution. Inset: the photographs of probe (1) at low (down) and high (up) viscosity under a 365 nm UV lamp; (b) The fitted curve of  $\log(I_{680})$  versus  $\log(V_{\text{viscosity}})$ ,  $\lambda_{\text{ex}} = 450 \text{ nm}$

### 2.3 探针(1)对 $\text{H}_2\text{O}_2$ 响应的紫外光谱测试

首先考察了探针(1)在磷酸缓冲溶液/DMSO 混合溶剂体系 ( $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , pH 7.4, 1/1, V/V) 中对  $\text{H}_2\text{O}_2$  的紫外光谱响应。如图 4 所示, 探针(1)在 375 和 540 nm 处有吸收,

溶液呈紫红色、红色(图 4)。随着  $\text{H}_2\text{O}_2$  的加入, 体系在 375 和 540 nm 处吸收逐渐减弱, 在 460 nm 处出现新的吸收峰, 并且随  $\text{H}_2\text{O}_2$  浓度的增大而逐渐增强, 当  $\text{H}_2\text{O}_2$  浓度为  $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  吸收峰达到最大值, 反应进行完全, 溶液变为黄色。反应过程中, 紫外光谱的蓝移可归因于探针与  $\text{H}_2\text{O}_2$  反应后, 脱除了亚甲基苯硼酸基团, N 取代吡啶正离子结构随之消失, 从而削弱了分子的 ICT 效应。

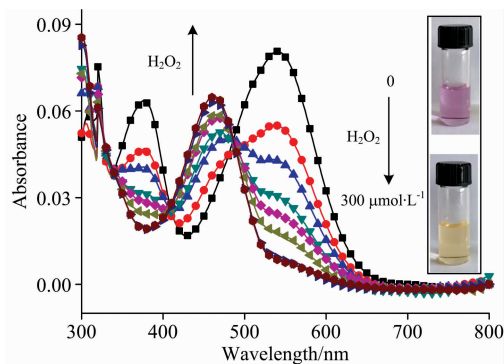


图 4 探针(1) ( $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 在不同浓度  $\text{H}_2\text{O}_2$  (依箭头方向, 浓度依次为: 0, 20, 40, 60, 80, 100, 200 和  $300 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 存在条件下的紫外光谱图; 插图为相应探针溶液(上)及探针与  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 混合溶液(下)的照片

Fig. 4 UV-Vis spectra of probe (1) in the presence of different concentrations of  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0, 20, 40, 60, 80, 100, 200 and  $300 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), Inset: the photographs of probe (1) (up) and probe 1 with  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) (down)

### 2.4 探针(1)对 $\text{H}_2\text{O}_2$ 检测的灵敏度与选择性

实验在磷酸缓冲与 DMSO 的混合溶剂体系中 ( $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , pH 7.4, 1/1, V/V) 考察了探针(1)的荧光响应与  $\text{H}_2\text{O}_2$  浓度之间的定量关系。如图 5(a, b), 随着  $\text{H}_2\text{O}_2$  浓度的增加, 探针体系的荧光发射逐渐增强, 当过氧化氢为  $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 反应达到平台。且线性拟合发现体系在 590 nm 处的荧光发射强度与过氧化氢浓度在  $0 \sim 25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  范围内呈现良好的线性关系, 线性方程为:  $I_{590} = 2.742 \times c_{\text{H}_2\text{O}_2} / \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} + 27.986$  ( $R^2 = 0.9966$ ), 根据  $3\sigma$  规则计算检出限为  $0.34 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

实验考察了探针(1)对  $\text{H}_2\text{O}_2$  检测的选择性。实验平行

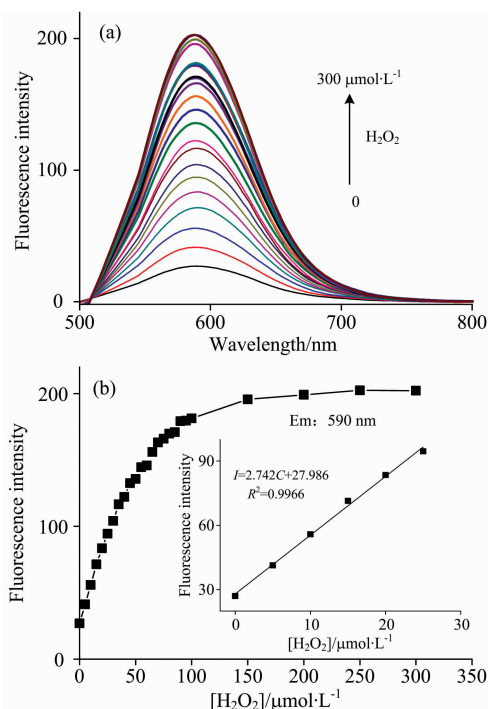


图 5 (a) 探针与不同浓度的  $\text{H}_2\text{O}_2$  (依箭头方向, 浓度依次为: 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 150, 200, 250 和  $300 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 反应后的荧光图谱; (b) 对应的探针与不同浓度的  $\text{H}_2\text{O}_2$  反应后的荧光发射的强度, 插图为荧光强度与  $\text{H}_2\text{O}_2$  浓度的线性拟合图

Fig. 5 (a) Fluorescence spectra of probe (1) in the presence of different concentrations of  $\text{H}_2\text{O}_2$  (from 0 to  $300 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ); (b) The correlation between fluorescence intensity of probe (1) with the concentration of  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Inset: the fitted curve of  $I_{590}$  versus the concentration of  $\text{H}_2\text{O}_2$

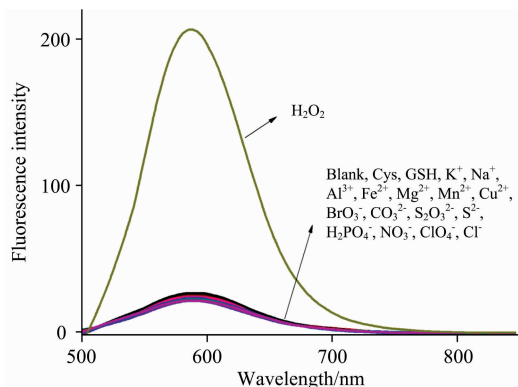


图 6 探针(1) ( $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 与  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 及其他干扰物 ( $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 反应后的荧光光谱图

Fig. 6 Fluorescence spectra of probe (1) ( $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) in the presence of  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) and other interferences ( $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )

考察了探针(1)对  $\text{H}_2\text{O}_2$  及其他离子与重要生物分子的荧光光谱响应。选择的离子包括  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{BrO}_3^-$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{S}^{2-}$ ,  $\text{ClO}_4^-$ ,  $\text{Cl}^-$ , 生物分子包括常见的 Cys 与 GSH。荧光光谱测试结果如图 6 所示, 仅  $\text{H}_2\text{O}_2$  使荧光产生了明显增强, 而其他的潜在干扰物均没有引起明显的荧光发射光谱的变化, 说明该探针对  $\text{H}_2\text{O}_2$  具有良好的选择性。

## 2.5 细胞成像分析

实验用探针(1)进行了活细胞成像分析[见图 7(a-f)], 当 A549 细胞与探针(1)培育后仅显示出了很微弱的荧光[图 7(b)]。而 A549 细胞先用  $\text{H}_2\text{O}_2$  处理, 再加入探针(1)培育, 结观察到了强的细胞内荧光[图 7(e)], 且细胞保持了较好的存在形态。上述结果表明, 探针(1)具有较好的生物相容性及细胞膜通透性, 且可有效用于活细胞内的成像分析。

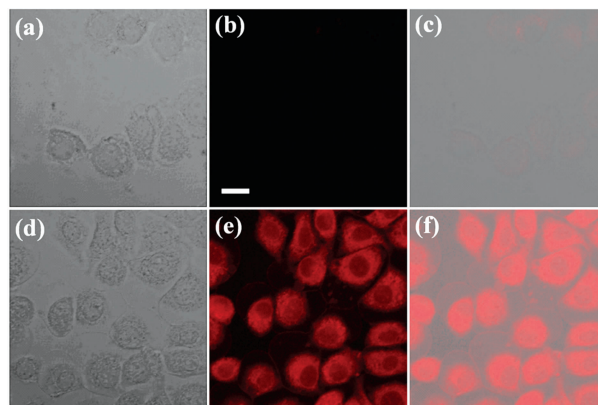


图 7 探针(1)的细胞成像照片

(a), (b), (c) 为 A549 细胞与探针(1)培育的照片; (d), (e), (f) 为 A549 细胞与  $\text{H}_2\text{O}_2$  培养后再与探针(1)培育的照片; (a), (d) 为明场照片; (b), (e) 为荧光成像照片; (c), (f) 分别为 (a), (b) 及 (d), (e) 合并的图片; 浓度标尺为  $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

Fig. 7 Confocal fluorescence images of live A549 cells

Cells incubated with  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  probe (1) (a), (b), (c), cells incubated with  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  and consequently with  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  probe (1) (d), (e), (f); (a) and (d) are bright-field images; (b) and (e) are fluorescence images in red channel; (c) and (f) are merged images; Scale bar:  $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

## 3 结论

合成了一种具有 D- $\pi$ -A 结构的近红外荧光探针, 探针能实现对粘度及  $\text{H}_2\text{O}_2$  的双重响应。其中对粘度响应的荧光发射波长在 680 nm 处, 线性范围为  $96.58 \sim 568.88 \text{ cp}$ 。对  $\text{H}_2\text{O}_2$  的增强型荧光响应波长在 590 nm 处, 线性范围为  $0 \sim 25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 检出限为  $0.34 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 且对  $\text{H}_2\text{O}_2$  的检测具有良好的选择性。此外细胞实验表明, 该探针具有良好的生物相容性与细胞膜通透性, 且可有效用于细胞内  $\text{H}_2\text{O}_2$  的成像分析。

## References

- [ 1 ] Xu K, He L, Yang X, et al. *Analyst*, 2018, 143(15): 3555.
- [ 2 ] Barnham K J, Masters C L, Bush A I. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2004, 3(3): 205.
- [ 3 ] Lin M T, Beal M F. *Nature*, 2006, 443(7113): 787.
- [ 4 ] Kuimova M K. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2012, 14(37): 12671.
- [ 5 ] Zhang J, Chai X, He X P, et al. *Chem. Soc. Rev.*, 2019, 48(2): 683.
- [ 6 ] Sedgwick A C, Wu L, Han H H, et al. *Chem. Soc. Rev.*, 2018, 47(23): 8842.
- [ 7 ] YUAN Jian-ying, WU Yu-tian, MU Lan, et al(袁剑英, 吴玉田, 牟 兰, 等). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 2017, 37(5): 1424.
- [ 8 ] Chen Y, Shi X, Lu Z, et al. *Anal. Chem.*, 2017, 89(10): 5278.
- [ 9 ] Lu H Z, Yu C W, Quan S, et al. *Analyst*, 2019, 144(4): 1153.
- [10] Tang Y Q, Sun J G, Yin B Z. *Anal. Chim. Acta*, 2016, 942: 104.
- [11] Wang F F, Liu Y J, Wang B B, et al. *Dyes Pigments*, 2018, 152: 29.
- [12] Zhang B B, Liu H Y, Wu F X, et al. *Sensor. Actuat B Chem.*, 2017, 243: 765.
- [13] Ren M, Deng B, Zhou K, et al. *Anal. Chem.*, 2017, 89(1): 552.
- [14] Chan J, Dodani S C, Chang C J. *Nat. Chem.*, 2012, 4: 973.
- [15] Nguyen K H, Hao Y, Zeng K, et al. *Spectrochim. Acta A*, 2018, 199: 189.

## A Benzothiazole-Based Long-Wavelength Fluorescent Probe for Dual-Response to Viscosity and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

ZHU Dan-dan<sup>1, 2</sup>, QU Peng<sup>2\*</sup>, SUN Chuang<sup>2</sup>, YANG Yuan<sup>2</sup>, LIU Dao-sheng<sup>1\*</sup>, SHEN Qi<sup>3</sup>, HAO Yuan-qiang<sup>2\*</sup>

1. College of Chemistry, Chemical Engineering and Environmental Engineering, Liaoning Shihua University, Fushun 113006, China
2. Henan Engineering Center of New Energy Battery Materials, Henan D&A Engineering Center of Advanced Battery Materials, Henan Key Laboratory of Biomolecular Recognition and Sensing, College of Chemistry and Chemical Engineering, Shangqiu Normal University, Shangqiu 476000, China
3. College of Chemistry and Molecular Engineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China

**Abstract** Hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) is an important biological molecule and plays vital roles in cell growth, immune responses, and cell signaling pathways. Cellular viscosity is a significant physiological parameter and also indicates the normal or abnormal functions of cells. Moreover, both abnormal levels of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and cellular viscosity are found to be highly related to some major diseases, such as Alzheimer's disease and cancers. Therefore, the development of effective analytical tools for simultaneously detecting H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and cellular viscosity is of great significance to elucidating some critical physiological and pathological mechanisms, as well as the diagnosis of some relevant diseases. In this work, we developed a dual-responsive fluorescent probe (1) for viscosity and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Probe (1) is almost non-fluorescent due to the quenching effect arisen from the twisted intramolecular charge transfer (TICT) process within the probe. While the probe exhibited strong near-infrared fluorescence (~680 nm) in solution with high viscosities, which can be attributed the restricted TICT process. The turn-on fluorescence reached 85 folds with the solution viscosity increased from 1.996 cp to 851.8 cp. Furthermore, probe (1) also can sensitively response to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> with the evolution of a new emission band at about 590 nm. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> can effectively react with the phenylboronic acid moiety of probe (1) and result in the conversion of pyridinium unit to pyridine, which could attenuate the ICT (intramolecular charge transfer) and TICT effects of the probe, and thus lead to a dramatic increase in the fluorescence intensity as well as a blue-shift in absorption profile (from 540 to 460 nm) with the observed color of the solution changed from purple-red to yellow. Fluorescence measurements indicated that probe (1) is highly sensitive and selective for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The fluorescence intensity of the probe assay at 590 nm was found to vary linearly with the concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the range of 0~25 μmol · L<sup>-1</sup>, the detection limit was calculated to be 0.34 μmol · L<sup>-1</sup> (3σ). Furthermore, cellular imaging experiment confirmed that probe (1) is highly biocompatible and cell-membrane permeable, and can be utilized for monitoring H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in living cells.

**Keywords** Fluorescent probe; Hydrogen peroxide; Viscosity; Near-infrared; Benzothiazole

\* Corresponding authors