

功能材料

# 双氰基二苯代乙烯型双光子荧光温度敏感探针

黄池宝<sup>1,2,3</sup>, 王 谦<sup>1</sup>

(1. 遵义师范学院 信息工程学院, 贵州 遵义 563002; 2. 中国科学院 地球化学研究所 环境地球化学国家重点实验室, 贵州 贵阳 550002; 3. 韶关大学 英东生物与农业学院, 广东 韶关 512005)

**摘要:** 对二甲苯分别经过亲电取代、亲核取代、 $\alpha$ -位溴代和亲核取代消除反应得到 1,4-二氰基-2-甲基-5-(二乙基磷酰基甲基)苯 (V); 咔唑经过亲核取代反应得到中间体 4-(9-咔唑基)-苯甲醛 (VII); 中间体 V 与 VII 经维蒂希-霍纳尔反应得到目标化合物 2,5-二氰基-4-甲基-4'-(9-咔唑基)二苯乙烯 (供体- $\pi$ -受体, D- $\pi$ -A) (SP), 反应总产率达 45.5%。SP 的溶剂显色范围由 412 nm (环己烷) 红移至 541 nm (二甲基亚砜) (最大发射波长), SP 具有非常大的双光子吸收截面 ( $\delta_{\text{TPA}} = 6930 \text{ GM}$ ) 和高的荧光量子产率 [ $\Phi = 0.992$  (环己烷)], 其荧光强度对溶剂极性和温度显示很强的依赖性。在单光子荧光发射 (OPE) 和双光子荧光发射 (TPE) 谱图中, SP 的单、双光子荧光发射强度与温度之间的线性相关系数 ( $R^2$ ) 均  $> 0.998$ , 表达式分别为  $I_{\text{F}} = -0.0141\theta + 1.2881$  (OPE) 和  $I_{\text{F}} = -0.0143\theta + 1.2698$  (TPE) [ $I_{\text{F}}$  为荧光强度,  $\theta$  为温度 ( $^{\circ}\text{C}$ ) ]。

**关键词:** 溶剂显色; 二苯代乙烯; 双光子激发; 环境敏感探针; 咔唑; 功能材料

中图分类号: O625.34; O625.63; O625.72 文献标识码: A 文章编号: 1003-5214 (2024) 04-0804-06

## Dicyanostilbene type two-photon fluorescence temperature-sensitive probe

HUANG Chibao<sup>1,2,3</sup>, WANG Qian<sup>1</sup>

(1. School of Information Engineering, Zunyi Normal University, Zunyi 563002, Guizhou, China; 2. State Key Laboratory of Environmental Geochemistry, Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, Guiyang 550002, Guizhou, China; 3. Henry Fok School of Biology and Agriculture, Shaoguan University, Shaoguan 512005, Guangdong, China)

**Abstract:** Intermediate 1,4-dicyano-2-methyl-5-(diethylphosphomethyl)benzene (V) was obtained from paraoxylene through electrophilic substitution, nucleophilic substitution,  $\alpha$ -site bromine substitution and nucleophilic substitution elimination, while intermediate 4-(9-carbazole)-benzaldehyde (VII) was synthesized from nucleophilic substitution of carbazole. Target compound 2,5-dicyano-4-methyl-4'-(9-carbazolyl)stilbene (donor- $\pi$ -acceptor, D- $\pi$ -A) (SP) with a total yield of 45.5% was finally synthesized from Wittig-Horner reaction of intermediates V and VII. The solvatochromism of SP was redshifted from 412 nm (cyclohexane) to 541 nm (dimethyl sulfoxide) (maximum emission wavelength). Compound SP exhibited remarkably large two-photon absorption cross section ( $\delta_{\text{TPA}} = 6930 \text{ GM}$ ) and high fluorescence quantum yield ( $\Phi$ ) in cyclohexane, with its fluorescence highly dependent on solvent polarity and temperature. In the one-photon emission (OPE) and two-photon emission (TPE) spectra, the dependent coefficients ( $R^2$ ) between single and two-photon emission fluorescence intensity and temperature of SP was  $> 0.998$ , and the function expressions were  $I_{\text{F}} = -0.0141\theta + 1.2881$  (OPE) and  $I_{\text{F}} = -0.0143\theta + 1.2698$  (TPE) [ $I_{\text{F}}$ : fluorescence intensity;  $\theta$ : temperature ( $^{\circ}\text{C}$ )], respectively.

**Key words:** solvatochromism; dicyanostilbene; two-photon excitation; environment-sensitive probe; carbazole; functional materials

收稿日期: 2023-05-25; 定用日期: 2023-07-17; DOI: 10.13550/j.jxhg.20230410

基金项目: 贵州省高层次创新型人才培养计划项目——“百”层次人才 ([2016]5683); 贵州省科技支撑计划项目 (“防控新型冠状病毒技术攻关及集成应用”项目[2020]4Y001); 贵州省第八批科技创新人才团队建设专项基金[2015]4007; 贵州省科学技术基金项目 (黔科合 J 字[2015]2146); 贵州省教育厅自然科学研究项目 (KY [2019]068); 贵州省教育厅自然科学重点研究项目 (黔教合 KY 字 [2014]296)

作者简介: 黄池宝 (1969—), 男, 教授, E-mail: huangchibao@163.com。

双光子 (TP) 吸收机制为分子同时吸收两个光子, 能量跃迁至激发态, 再从激发态回落至基态, 并发出荧光<sup>[1-2]</sup>。双光子荧光与单光子 (OP) 荧光相比, 具有定点激发、高横纵向分辨率、灵敏度高、光损害小等优势<sup>[3-9]</sup>。双光子荧光探针的开发与研究是当前的研究热点之一<sup>[10-19]</sup>, 但用于温度检测的双光子荧光探针报道较少。文献[20-22]报道的探针侧重于黏度和溶剂极性的检测, 用于温度检测则效果不理想。因此, 开发性能优良的双光子荧光温度探针势在必行。

细胞内的温度分布反映了细胞内分子的热力学与功能, 癌细胞等病态细胞发热激烈。因此, 通过分析细胞内的温度分布, 不仅可加深对细胞功能的理解, 还有望为新型诊断、治疗法的开发作出积极贡献, 这有赖于双光子荧光探针的开发。文献已报道的双光子荧光团 4-甲基-2,5-二氰基-4'-氨基二苯乙烯 (DCS) 具有非常大的双光子吸收截面 ( $\delta_{\text{TPA}}$ ), 已成功应用于各种双光子荧光探针的设计与开发<sup>[23-26]</sup>。DCS 是具有供体- $\pi$ -受体 (D- $\pi$ -A) 结构的推拉发色团, 通过合理的结构设计, 可使简单的结构拥有最大化的  $\delta_{\text{TPA}}$ , 是理想的双光子荧光团<sup>[27]</sup>。在前期探索研究中发现, 氨基上的柔性取代基不但能显著降低探针的荧光量子产率 ( $\Phi$ ) 和  $\delta_{\text{TPA}}$ <sup>[28-29]</sup>, 而且能提高对黏度的依赖性, 这势必会过多地干扰对温度的依赖性, 从而带来较大的测量误差。因此, 作者拟在 DCS 的氨基端上引入一个较大的芳香环, 即平面刚性基团咪唑基, 能进一步拓展分子的芳香体系与平面刚性, 从而显著提高分子的  $\Phi$  和  $\delta_{\text{TPA}}$ , 同时提高分子对温度的依赖性, 且削弱对黏度的依赖性。

基于此, 本文以 DCS 为双光子荧光探针母体, 在氨基端引入咪唑基, 设计开发双光子荧光温度探针 2,5-二氰基-4-甲基-4'-(9-咪唑基)二苯乙烯 (SP), 并用于温度检测, 以期得到具有优良检测性能的双光子荧光探针。

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

对二甲苯, 四川天权化工厂; 液溴, 潍坊英盛化学品有限公司; 二氯甲烷 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ )、*N,N*-二甲基甲酰胺 (DMF)、四氯化碳 ( $\text{CCl}_4$ )、碳酸钾 ( $\text{K}_2\text{CO}_3$ )、四氢呋喃 (THF)、二甲基亚砜 (DMSO)、环己烷 (*c*-Hexane)、甲苯 ( $\text{CH}_3\text{C}_6\text{H}_5$ )、苯 ( $\text{C}_6\text{H}_6$ )、二噁烷 ( $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$ )、氯仿 ( $\text{CHCl}_3$ )、丙酮 ( $\text{CH}_3\text{COCH}_3$ )、乙腈 (MeCN)、氰化亚铜 ( $\text{CuCN}$ ), 湖北成丰化工有限公司; *N*-溴代丁二酰亚胺 (NBS), 江西达索化工有限公司; 亚磷酸三乙酯 [ $\text{P}(\text{OEt})_3$ ], 上海中一化工有限公司; 咪唑, 杭州可菲克化学有限公司;

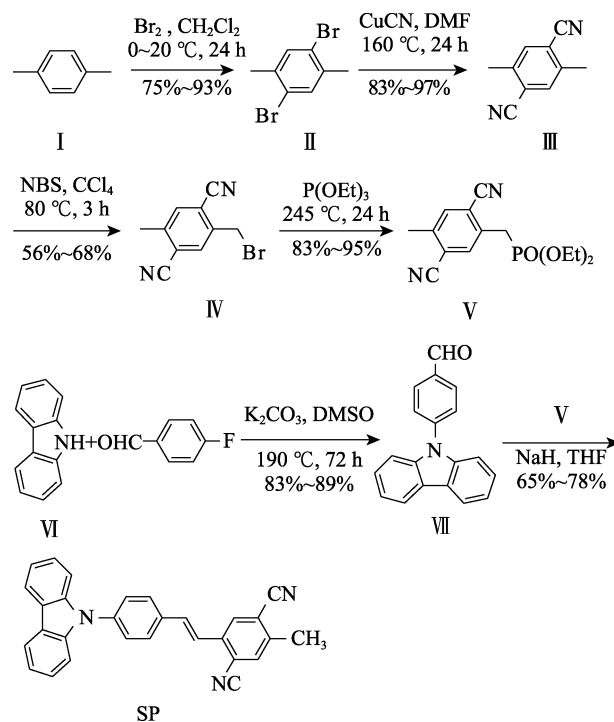
对氟苯甲醛 (*p*- $\text{FC}_6\text{H}_4\text{CHO}$ ), 营口兴福化工有限公司; 氢化钠 (NaH)、硫酸奎宁、硫酸, 安徽省沃土化工有限公司。所用试剂均为化学纯。

FT/IR-430 傅里叶变换红外光谱仪 (波数范围为  $350\sim 7800\text{ cm}^{-1}$ , KBr 压片法), 日本 Jasco 公司; Sartorius BP211D 型电子微量天平 (精度为  $0.01\text{ mg}$ ), 德国赛多利斯集团; DC-0506 型低温恒温槽, 上海衡平仪器仪表厂; HP 8453 型紫外-可见分光光度计, 美国惠普公司; RF-5000 型荧光分光光度计, 日本岛津公司; Mira 900-F 型锁模飞秒钛蓝宝石激光器, 美国 Coherent 公司; XYZ-3050 型 XYZ 膜处理平台, 美国 Biodot Inc 公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 中间体 II~V 和 VII 的合成

根据文献方法合成化合物 2,5-二溴对二甲苯 (II)<sup>[30]</sup>、2,5-二甲基对苯二甲腈 (III)<sup>[30]</sup>、2-溴甲基-5-甲基对苯二甲腈 (IV)<sup>[31]</sup>、1,4-二氰基-2-甲基-5-(二乙基磷酰基甲基)苯 (V)<sup>[31]</sup> 和 4-(9-咪唑基)苯甲醛 (VII)<sup>[32]</sup>。SP 的合成路线如下所示:



#### 1.2.2 目标化合物 SP 的合成

准确称取中间体 VII (309 mg, 1.14 mmol) 和氢化钠 (55 mg, 2.28 mmol) 置于 25 mL 干燥单口烧瓶中; 准确称取 V (333 mg, 1.14 mmol) 溶于 10 mL THF, 置于恒压加料器中; 将恒压加料器装在单口烧瓶上, 并抽真空用氩气保护。将烧瓶置于冰水浴中, 在强烈搅拌和避光条件下, 将 V 的 THF 溶液逐滴滴加到混合液中 (滴加时间 40~50 min)。滴加完毕后, 室温搅拌反应 24 h。反应结束后, 真空抽滤

脱除 THF, 用二氯甲烷萃取 (3×15 mL), 水洗 (3×10 mL), 加无水硫酸镁干燥, 过滤, 真空抽滤脱除溶剂。粗品经硅胶柱层析分离 [洗脱液为 V(正己烷): V(乙酸乙酯) = 12 : 1], 得到黄绿色粉末 SP, 产率为 72% (336 mg, 0.82 mmol), 熔点 245~248 °C。反应总产率最高为 45.5%。

FTIR (KBr,  $\nu/\text{cm}^{-1}$ ): 2237 (C≡N), 1657 (C=C)。  
 $^1\text{H}$ NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$ : 8.15 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 8.06 (s, 1H), 7.81 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 7.64 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 7.63 (s, 1H), 7.48~7.39 (m, 6H, Ar-H), 7.33 (d,  $J = 16.0$  Hz, 1H, CH=CH), 7.31 (d,  $J = 16.0$  Hz, 1H, CH=CH), 2.65 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ )。  $^{13}\text{C}$ NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$ : 140.94, 140.71, 138.80, 134.62, 134.04, 129.51, 128.88, 127.45, 126.27, 123.78, 122.78, 120.57, 120.45, 117.48, 116.34, 114.97, 110.54, 20.23。MS,  $m/z$ :  $\text{C}_{29}\text{H}_{19}\text{N}_3$  [ $\text{M}^+$ ] 的计算值 (实测值): 409.1579 (409.1572)。元素分析 Calcd. for  $\text{C}_{29}\text{H}_{19}\text{N}_3$ : C, 85.06%; H, 4.68%; N, 10.26%, Found: C, 85.01%; H, 4.72%; N, 10.27%。

### 1.3 光学实验

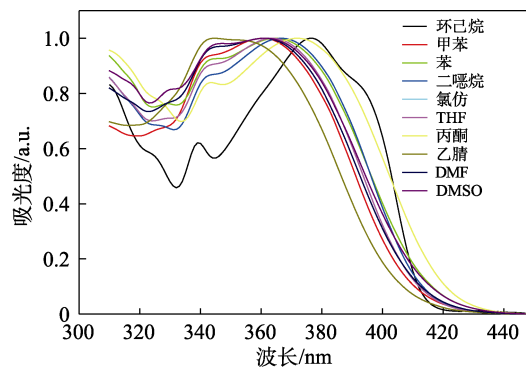
线性吸收光谱与透射光谱由紫外-可见分光光度计测得。单光子荧光光谱和荧光量子产率由荧光分光光度计测得。双光子激发荧光光谱的激发源为锁模飞秒钛蓝宝石激光器, 激光脉冲宽度 120 fs, 重复频率 76 MHz, 激光器的平均输出功率 1.5 W (800 nm), 可调波长范围 700~980 nm, 在实验中飞秒激光波长调至所需测试波长。双光子荧光寿命由条纹相机 (XSC ST10-1L, 北京卓立汉光仪器有限公司) 测定。

## 2 结果与讨论

### 2.1 SP 的 UV-Vis 和单、双光子荧光发射谱图

为深入了解 SP 对不同溶剂的变色特性, 在不同溶剂 (环己烷、甲苯、苯、二噁烷、THF、氯仿、丙酮、DMF、DMSO 和乙腈) 中加入 SP, 测定其紫外-可见吸收光谱、单光子和双光子荧光发射谱图 (OPE 和 TPE) 的变化, 结果见图 1、2 和表 1, SP 在不同溶剂中的荧光照片见图 3。

由图 1 可以看出, SP 的吸收几乎与溶剂无关。由图 2、3 和表 1 可见, SP 的单、双光子荧光发射谱图表现出很强的溶剂变色, SP 的最大发射波长 ( $\lambda_{\text{em,max}}$ ) 从 412 nm (环己烷) 红移到 541 nm (DMSO)。  $\lambda_{\text{em,max}}$  随溶剂极性的增加而增大, 这是因为激发态扭转态发生电荷分离, 溶剂极性越强越有利于电荷分散, 电荷越分散, 电荷分离激发态能量越低, 而基态能量基本不变, 所以能级差减小, 能量降低, 发射波长则增大。



SP 溶液浓度为 10  $\mu\text{mol/L}$ , 激发波长 ( $\lambda_{\text{ex}}$ ) = 360 nm

图 1 SP 的 UV-Vis 吸收光谱

Fig. 1 UV-Vis absorption spectra of SP

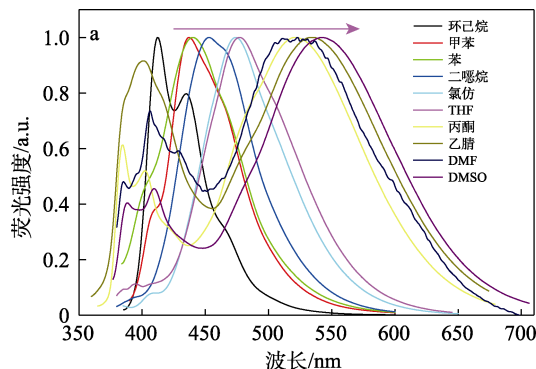
表 1 SP 的光物理性质

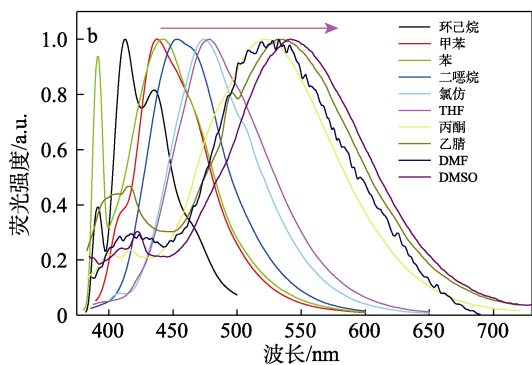
Table 1 Photophysical properties of SP

序号	溶剂 <sup>a</sup>	$\lambda_{\text{AB,max}}/\text{nm}^b$	$\lambda_{\text{em,max}}/\text{nm}^c$	$\Phi^d$	$\lambda_{\text{max}}/\text{nm}^e$	$\delta_{\text{max}}/\text{GM}^f$
1	环己烷	376	412	0.992	780	6930
2	甲苯	361	437	0.978	750	5397
3	苯	365	440	0.986	780	5975
4	二噁烷	367	453	0.968	750	5337
5	THF	364	477	0.972	750	3652
6	氯仿	372	474	0.983	760	4066
7	丙酮	372	520	0.530	740	2125
8	DMF	361	525	0.770	750	1050
9	DMSO	361	541	0.370	750	1560
10	乙腈	344	534	0.440	740	1420

注: a—溶剂依极性经验参数 [ $E_T(30)$ ] 递增排序; b—最大吸收波长,  $c(\text{SP})=10 \mu\text{mol/L}$ ; c—最大发射波长,  $c(\text{SP})=1 \mu\text{mol/L}$ ,  $\lambda_{\text{ex}}=360 \text{ nm}$ ; d—荧光量子产率, 参比为浓度  $1 \mu\text{mol/L}$  硫酸奎宁的  $\text{H}_2\text{SO}_4$  溶液 ( $5 \times 10^4 \mu\text{mol/L}$ ), 误差为 10%; e—双光子最大激发波长; f—最大  $\delta_{\text{TPA}}$  ( $1 \text{ GM}=1 \times 10^{-50} \text{ cm}^4 \cdot \text{s}/\text{photon}$ ),  $c(\text{SP})=10 \mu\text{mol/L}$ , 误差为  $\pm 20\%$ 。

图 4 为 SP 的电荷分离示意图。可以看出, SP 在极性溶剂中呈现两种激发态 ( $a^*$  和  $b^*$ ) 对应的两个发射带 [双光子荧光发射带: A 带 (长波长发射带) 和 B 带 (短波长发射带)]。根据扭曲分子内电荷迁移 (TICT) 假说, 在激发态下, 初始平面分子的供体部分 (9-咪唑基) 围绕  $N$ -芳基键旋转, 这伴随着电子供体和电子受体部分之间电荷分离的发展。





SP 溶液浓度为 1  $\mu\text{mol/L}$ ,  $\lambda_{\text{ex}}=360 \text{ nm}$

图 2 SP 的单光子 (a)、双光子 (b) 荧光发射谱图

Fig. 2 One-photon (a) and two-photon (b) emission spectra of SP

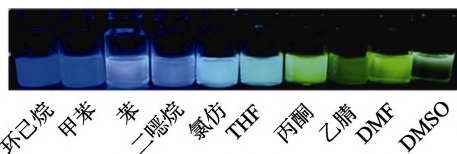


图 3 SP 在不同溶剂中的荧光照片 ( $c = 10 \mu\text{mol/L}$ ,  $\lambda_{\text{ex}} = 365 \text{ nm}$ )

Fig. 3 Fluorescence picture of SP in different solvents ( $c = 10 \mu\text{mol/L}$ ,  $\lambda_{\text{ex}} = 365 \text{ nm}$ )

在极性溶剂中, 扭曲和极性  $a^*$  激发态可通过溶剂偶极化电荷转移来稳定, 因此, B 带对应于平面非电荷转移 (CT), A 带出现在较长的波长区域。

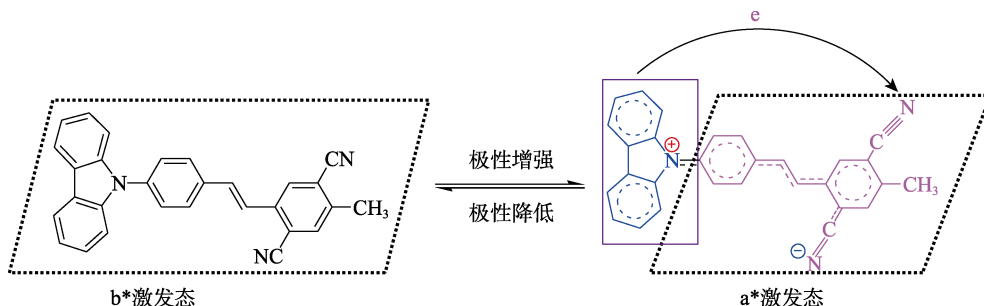
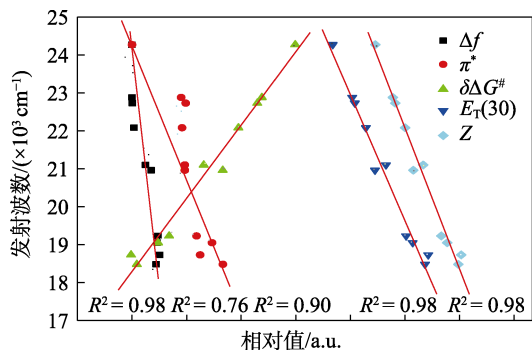


图 4 SP 的电荷分离示意图

Fig. 4 Schematic diagram of charge separation of SP

### 2.2 SP 的最大发射波数与溶剂极性参数的关联

通过常规方法对 SP 的发射波数与溶剂极性参数 [ $E_T(30)$ ] <sup>[33]</sup>、科索尔 (Kosower) 参数 ( $Z$ ) <sup>[31]</sup> 和  $\delta\Delta G^\ddagger$  <sup>[33]</sup> 进行线性拟合, 获得了相应的线性相关系数 ( $R^2 = 0.98, 0.98, 0.98$ ), 如图 5 所示。而与溶剂偶极化/极化率参数 ( $\pi^*$ ) <sup>[34]</sup> 和利珀特马塔加 (Lippert- Mataga) 标度 ( $\Delta f$ ) <sup>[21]</sup> 的相关系数则较小 ( $R^2 = 0.76$  和  $0.90$ )。这说明 SP 能用于溶剂极性的检测。



SP 溶液浓度为  $1 \times 10^{-6} \mu\text{mol/L}$ ,  $\lambda_{\text{ex}} = 360 \text{ nm}$

图 5 SP 的最大发射波数与溶剂极性参数间的关联性

Fig. 5 Correlation between maximum emission wavelength and solvent polarity parameters

由表 1 可见, SP 的最大吸收波长几乎与溶剂性质无关, 这表明由于电子基态 ( $S_0$ ) 和弗兰克-康顿

激发态 <sup>[33]</sup> 在电子跃迁过程中都没有经历过特殊的稳定处理。因此, 发射最大值的变化与激发后的过程相一致, 导致激发态在高  $\pi^*$  的溶剂 (如 DMSO、DMF) 中能量降低。

### 2.3 SP 的单、双光子荧光光谱与温度的关系

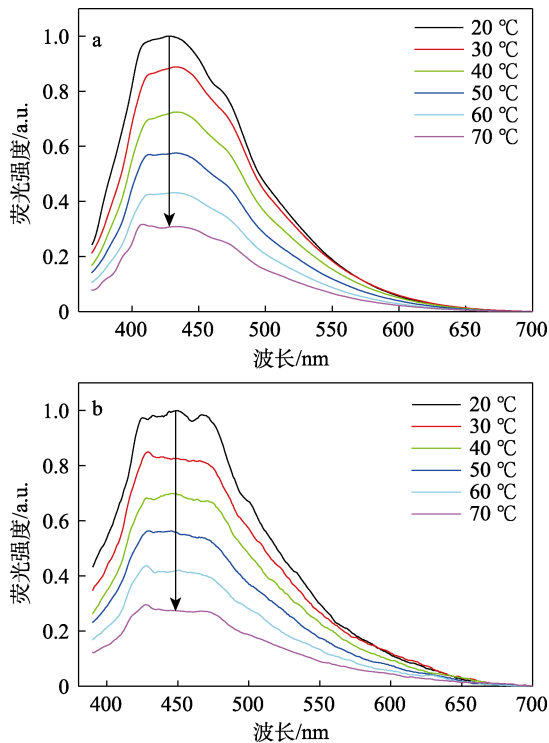
SP 的单、双光子荧光光谱与温度的关系如图 6 所示。可以看出, 在 OPE 和 TPE 中, SP 在甘油中的 B 带随着温度的升高而红移, 且 B 带的相对强度逐渐减小; 但 A 带都未出现。

为了得到 SP 的发射强度与温度之间的规律, 以温度 ( $\theta$ ,  $^\circ\text{C}$ ) 为横坐标、荧光强度 ( $I_F$ ) 为纵坐标绘制数据点, 并进行线性拟合, 得到拟合直线如图 7 所示, 相关数据列于表 2。

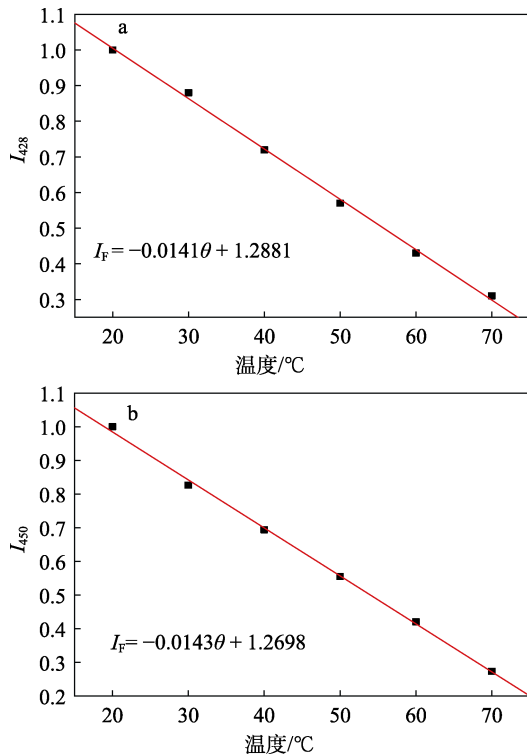
根据图 7 得到在 OPE 和 TPE 中荧光强度与温度的线性方程, 相关系数 ( $R^2$ ) 均高于 0.998。这说明 SP 的荧光强度与温度呈高度线性相关, 且 SP 完全适用于环境温度的检测。TICT 化合物能为偶极子分子与微环境的相互作用提供更详细和丰富的信息。作为一种环境敏感传感器, TICT 化合物具有难以想象的优势。

### 2.4 SP 的双光子吸收截面与双光子激发波长的关系

不同的双光子激发波长对应不同的双光子吸收截面。SP 在各种溶剂中的双光子吸收截面与双光子激发波长的关系如图 8 和表 1 所示。



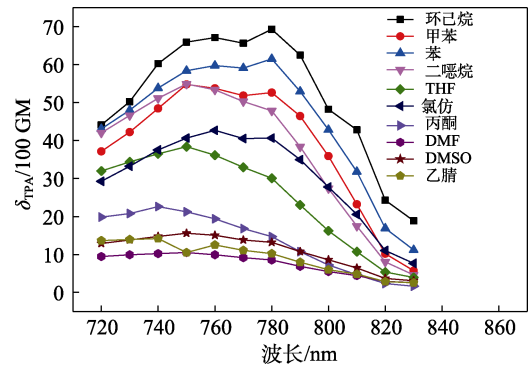
SP 溶液浓度为 1 μmol/L, λ<sub>ex</sub> = 360(OP)、750(TP) nm  
 图 6 SP 甘油溶液在 OPE (a) 和 TPE (b) 中的荧光强度与温度的关系  
 Fig. 6 SP in glycerol OPE (a) and TPE (b) fluorescence intensity in relation to temperature



SP 溶液浓度为 1 μmol/L, λ<sub>ex</sub> = 360(OP)、750(TP) nm  
 图 7 SP 在 OPE (a) 和 TPE (b) 中的荧光强度对温度的线性拟合线  
 Fig. 7 Linear fitting lines of fluorescence intensity of SP to temperature in OPE (a) and TPE (b)

表 2 SP 的荧光强度与温度间的线性拟合相关系数  
 Table 2 Correlation coefficients of linear fitting for fluorescence intensity of SP and temperature

	斜率	截距	R <sup>2</sup>	SD	P
OPE	-0.0141	1.2881	>0.998	0.0127	<0.0001
TPE	-0.0143	1.2698	>0.998	0.0117	<0.001



SP 溶液浓度为 10 μmol/L  
 图 8 SP 在各种溶剂中的双光子吸收截面与双光子激发波长的关系  
 Fig. 8 Two-photon absorption cross sections of SP in various solvents versus two-photon excited wavelengths

与预期一样,在非极性溶剂环己烷中,SP的 δ<sub>TPA</sub> 达到最大值,为 6930 GM,而在强极性非质子溶剂 DMF 中,δ<sub>TPA</sub> 降到最小值,为 1050 GM。一般来说,SP 在低极性非质子溶剂 (PAS) 中的 δ<sub>TPA</sub> 值要比在高 PAS 中大得多,这应该是由激发态构型的转变。δ<sub>TPA</sub> 按 DMF、乙腈、DMSO、丙酮、THF、氯仿、二噁烷、甲苯、苯、环己烷的顺序逐渐增加。由表 1 可见,在大多数溶剂中,SP 的 ϕ 值较高 (高于 0.9),在环己烷中 SP 的 ϕ 达到最大值,0.992,而在 DMSO、乙腈等极性较强的溶剂中,SP 的荧光量子产率较低。SP 在丙酮和其他强极性溶剂中发射强度减弱和几乎没有光反应的发生,这与发射态衰减至一个或多个非共平面和非发射的 TICT 态、随后快速回落到基态是一致的<sup>[35]</sup>。

### 3 结论

本文开发了一种用于温度检测的双光子荧光探针 SP, SP 对温度具有高度的敏感性,亦能用于溶剂极性的测定。总体上说,SP 具有四大显著优点:

- (1) D-π-A 结构的 SP 是溶剂变色和分子转子相结合的典型例子。在 D-π-A 分子转子中,电子供体基团的平面刚性可以较大地提高 δ<sub>TPA</sub> 和 ϕ。
- (2) 平面刚性基团 (咪唑基团) 能显著提高探针对环境温度的敏感性 (R<sup>2</sup> ≥ 0.998),从而大大提高了对温度测定的灵敏度。
- (3) 激发态分子转变为一个或多个 TICT 态,

极性溶剂更有利于电荷分离态分子的稳定性, 在极性溶剂中发射波长更大。

(4) 平面刚性供体基团可以降低探针极性黏度的依赖程度, 提高温度测量的准确度与精确度。

#### 参考文献:

- [1] PAWLICKI M, COLLINS H A, DENNING R G, *et al.* Two-photon absorption and the design of two-photon dyes[J]. *Angew Chem Int Ed*, 2009, 48(18): 3244-3266.
- [2] KIM H M, CHO B R. Two-photon probes for intracellular free metal ions, acidic vesicles, and lipid rafts in live tissues[J]. *Accounts of Chemical Research*, 2009, 42(7): 863-872.
- [3] CARRONE G, ETCHENIQUE R. Chemical two-photon fluorescence[J]. *Anal Chem*, 2015, 87(8): 4363-4369.
- [4] CHEN J, ZHANG W, PULLERITS T. Two-photon absorption in halide perovskites and their applications[J]. *Mater Horiz*, 2022, 9: 2255-2287.
- [5] YU J, CUI Y, WU C D, *et al.* Two-photon responsive metal-organic framework[J]. *J Am Chem Soc*, 2015, 137(12): 4026-4029.
- [6] DROUMAGUET C L, MONGIN O, WERTS M H V, *et al.* Towards "smart" multiphoton fluorophores: Strongly solvatochromic probes for two-photon sensing of micropolarity[J]. *Chem Commun*, 2005: 2802-2804.
- [7] STREHMEL B, SARKER A M, DETERT H. The influence of  $\sigma$  and  $\pi$  acceptors on two-photon absorption and solvatochromism of dipolar and quadrupolar unsaturated organic compounds[J]. *ChemPhysChem*, 2003, 4(3): 249-259.
- [8] KIM H M, KIM B R, CHOO H J, *et al.* Two-photon fluorescent probes for biomembrane imaging: Effect of chain length[J]. *ChemBioChem*, 2008, 9(17): 2830-2838.
- [9] KIM H M, CHOO H J, JUNG S Y, *et al.* A two-photon fluorescent probe for lipid raft imaging: C-laurdan[J]. *ChemBioChem*, 2007, 8(5): 553-559.
- [10] REO Y J, DAI M, YANG Y J, *et al.* Cell-membrane-localizing, two-photon probe for ratiometric imaging of  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase in cancerous cells and tissues[J]. *Anal Chem*, 2020, 92(18): 12678-12685.
- [11] VALVERDE-POZO J, PAREDES J M, WIDMANN T J, *et al.* Ratiometric two-photon near-infrared probe to detect DPP IV in human plasma, living cells, human tissues, and whole organisms using zebrafish[J]. *ACS Sensors*, 2023, 8(3): 1064-1075.
- [12] HAO X L, REN A M, ZHOU L. Theoretical studies and design strategies of highly efficient two-photon excited fluorescent probes for hydrogen sulfide detection through simulation of excited-state dynamics[J]. *J Chem Inf Model*, 2023, 63(8): 2409-2418.
- [13] LEE H W, LEE I J, LEE S J, *et al.* Highly sensitive two-photon lipid droplet tracker for *in vivo* screening of drug induced liver injury[J]. *ACS Sensors*, 2022, 7(4): 1027-1035.
- [14] SINGH A K, NAIR A V, SINGH N D P. Small two-photon organic fluorogenic probes: Sensing and bioimaging of cancer relevant biomarkers[J]. *Anal Chem*, 2022, 94(1): 177-192.
- [15] LEE H W, JUVEKAR V, LEE D J, *et al.* Highly stable red-emissive ratiometric probe for monitoring  $\beta$ -galactosidase activity using fluorescence microscopy and flow cytometry[J]. *Anal Chem*, 2021, 93(44): 14778-14783.
- [16] JUVEKAR V, LEE H W, KIM H M. Two-photon fluorescent probes for detecting enzyme activities in live tissues[J]. *ACS Applied Bio Materials*, 2021, 4(4): 2957-2973.
- [17] JUVEKAR V, LIM C S, LEE D J, *et al.* Near-infrared ratiometric two-photon probe for pH measurement in human stomach cancer tissue[J]. *ACS Applied Bio Materials*, 2021, 4(3): 2135-2141.
- [18] HUANG C B (黄池宝), CHEN X Y (陈小勇), PU H (蒲浩), *et al.* Sodium-ions-selective two-photon fluorescent probe with benzo-15-crown-5 as acceptor[J]. *Fine Chemicals (精细化工)*, 2020, 37(6): 1158-1162.
- [19] HUANG C B (黄池宝), YANG B (杨斌), KANG S (康帅), *et al.* The preparation of two-photon fluorescence immunochromatographic strip for rapid diagnosis of SARS-CoV-2 and cell-imaging[J]. *Fine Chemicals (精细化工)*, 2021, 38(7): 1367-1373.
- [20] UCHIYAMA S, TAKEHIRA K, YOSHIHARA T, *et al.* Environment-sensitive fluorophore emitting in protic environments[J]. *Org Lett*, 2006, 8(25): 5869-5872.
- [21] BOHNE C, IHMELS H, WAIDELICH M, *et al.* *N*-acylureido functionality as acceptor substituent in solvatochromic fluorescence probes: Detection of carboxylic acids, alcohols, and fluoride ions[J]. *J Am Chem Soc*, 2005, 127(49): 17158-17159.
- [22] HUANG C B, PENG X J, YI D S, *et al.* Dicyanostilbene-based two-photon thermo-solvatochromic fluorescence probes with large two-photon absorption cross sections: Detection of solvent polarities, viscosities, and temperature[J]. *Sens Actuators B: Chem*, 2013, 182(1): 521-529.
- [23] HUANG C B, QU J L, QI J, *et al.* Dicyanostilbene-derived two-photon fluorescence probe for free zinc ions in live cells and tissues with a large two-photon action cross section[J]. *Org Lett*, 2011, 13(6): 1462-1465.
- [24] HUANG C B, DING C R. Dicyanostilbene-derived two-photon fluorescence probe for lead ions in live cells and living tissues[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2011, 699(2): 198-205.
- [25] HUANG C B, REN A X, FENG C H, *et al.* Two-photon fluorescent probe for silver ion derived from twin-cyano stilbene with large two-photon absorption cross section[J]. *Sens Actuators B: Chem*, 2010, 151(1): 236-242.
- [26] HUANG C B, KANG S, PAN Q, *et al.* A dicyanocarbazolylstilbene-derived two-photon fluorescence probe for lipid raft with a large two-photon action cross section[J]. *ChemistrySelect*, 2021, 6(21): 5275-5280.
- [27] WANG D, GUO J F, REN A M, *et al.* Computational design of two-photon fluorescent probes for intracellular free zinc ions[J]. *J Phys Chem B*, 2014, 118(34): 10101-10110.
- [28] HUANG C B (黄池宝), PAN Q (潘淇), CHEN H S (陈华仕), *et al.* Triphenylamine-based dicyanostilbene type two-photon fluorescence solvatochromic probe[J]. *Chemical Journal of Chinese Universities (高等学校化学学报)*, 2018, 39(8): 1676-1682.
- [29] HUANG C B (黄池宝), PAN Q (潘淇), CHEN H S (陈华仕), *et al.* A dicyanostilbene-derived two-photon fluorescence environment-sensitive probe[J]. *Chemical Journal of Chinese Universities (高等学校化学学报)*, 2019, 40(6): 1128-1134.
- [30] HUANG H, HE Q, LIN H, *et al.* Synthesis and photophysical properties of a novel semiconducting polymer[J]. *Polym Adv Technol*, 2004, 15(1/2): 84-88.
- [31] HUANG C, FAN J, PENG X, *et al.* Highly selective and sensitive twin-cyano-stilbene-based two-photon fluorescent probe for mercury (II) in aqueous solution with large two-photon absorption cross-section[J]. *J Photochem Photobiol C*, 2008, 199(2/3): 144-149.
- [32] XIA G M, FANG Q, XU X G, *et al.* Synthesis and linear, nonlinear fluorescence of bithiophene derivatives[J]. *Acta Chimica Sinica*, 2003, 61(7): 976-982.
- [33] REICHARDT C. Solvatochromic dyes as solvent polarity indicators [J]. *Chem Rev*, 1994, 94(8): 2319-2358.
- [34] TADA E B, NOVAKI L P, SEUOD O A E. Solvatochromism in pure and binary solvent mixtures: Effects of the molecular structure of the zwitterionic probe[J]. *J Phys Org Chem*, 2000, 13(11): 679-687.
- [35] SHIN D M, WHITTEN D G. Solvatochromic behavior of intramolecular charge-transfer diphenylpolyenes in homogeneous solution and microheterogeneous media[J]. *J Phys Chem*, 1988, 92(10): 2945-2956.