

二卤代荧光素衍生物的荧光性能调控

刘丽敏^{1,2} 张先付^{*,1,3}

(¹ 河北科技师范学院应用光化学研究所, 秦皇岛 066004)

(² 安徽理工大学化工学院, 淮南 232001)

(³ MPC Technologies, Hamilton, Ontario, Canada L8S 3H4)

摘要: 用紫外可见吸收光谱、稳态/瞬态荧光光谱和单线态氧捕捉等方法分别测量了荧光素钠及 4,5 位-二卤代荧光素钠(FLX₂, X=H, Cl, Br, I)的电子吸收光谱、荧光光谱、荧光量子效率(Φ_f)、荧光寿命(τ_f)和单线态氧量子产率(Φ_Δ),并与荧光素钠的相应性质进行了比较。对应于 X=H, Cl, Br, I, FLX₂ 的 Φ_f 值分别为 0.92、0.96、0.69、0.16; τ_f 值分别为 4.16、4.72、3.50、0.80 ns; Φ_Δ 值分别为 0.003 4、0.049、0.30、0.68。随着氯、溴、碘原子量增大,相应的 Φ_f 和 τ_f 值并非顺序减小, Φ_Δ 值逐渐增大,只用重原子效应不能解释二卤代荧光素的荧光和光敏性质变化,而结合分子内光诱导电子转移就能较好的解释实验结果。

关键词: 荧光素; 荧光; 单线态氧; 重原子效应; 光诱导电子转移

中图分类号: O644 文献标识码: A 文章编号: 1001-4861(2014)07-1582-05

DOI: 10.11862/CJIC.2014.244

Fluorescence Performance Tuning for Dihalogenated Fluorescein Derivatives

LIU Li-Min^{1,2} ZHANG Xian-Fu^{*,1,3}

(¹ Institute of Applied Photochemistry, Hebei Normal University of Science & Technology, Qinhuangdao, Hebei 066004, China)

(² School of Chemical Engineering, Anhui University of Science & Technology, Huainan, Anhui 232001, China)

(³ MPC Technologies, Hamilton, Ontario, Canada L8S 3H4)

Abstract: The fluorescence quantum yield (Φ_f), fluorescence lifetime (τ_f) and singlet oxygen formation quantum yield (Φ_Δ) of fluorescein and 4,5-dihalogenated fluoresceins in their dianion forms (FLX₂, X=H, Cl, Br, I) were characterized by using UV-Vis spectroscopy, steady-state/time-resolved fluorescence and singlet oxygen trapping technique. The Φ_f value is 0.92, 0.96, 0.69, and 0.16; the τ_f value is 4.16, 4.72, 3.50 and 0.80 ns; the Φ_Δ value is 0.003 4, 0.049, 0.30, and 0.68 for FLX₂ (X=H, Cl, Br, I), respectively. In comparison with that of fluorescein, the increase of atom size from Cl, Br to I does not cause the decrease of Φ_f and τ_f monotonically, so that heavy atom effect alone cannot explain the experimental results. The observations can be rationalized by the presence of intramolecular photo-induced electron transfer, in which the benzonate acts as the electron donor while the xanthene moiety is the acceptor.

Keywords: fluorescein; fluorescence; singlet oxygen; heavy atom effect; photoinduced electron transfer

荧光素及其衍生物的分子结构(图 1)由相对独立的两部分(即上半部分的苯环和下半部分的占吨环)构成,这两部分几乎垂直而不共轭。由于其高荧

光量子产率、好的生物相容性以及独特的光谱性质,荧光素及其衍生物广泛应用于 DNA 排序^[1-2]、激光染料^[3]、追踪试剂^[4]、单线态氧光敏剂^[5]、荧光检

收稿日期: 2013-12-01。收修改稿日期: 2014-04-11。

河北省自然科学基金(No.B2014407080)资助项目。

*通讯联系人。E-mail: zhangxianfu@tsinghua.org.cn

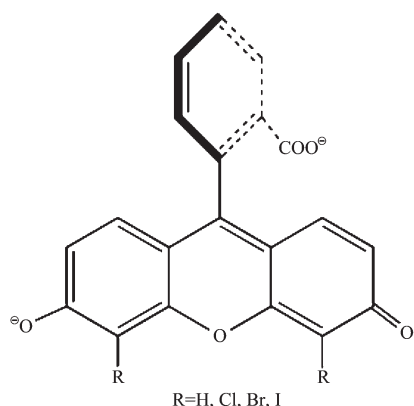


图 1 占吨类染料二价阴离子的化学结构

Fig.1 Chemical structure of xanthene dyes in dianion form

测^[6-7]、荧光成像^[8-10]、标记抗体^[11-12]、细胞内 pH 值的测定^[13]、基因序列排列规则的测定^[14]、细胞着色^[15-16]、角膜病变的荧光着色^[17]等方面。

向苯环和占吨环引入不同的取代基可调节荧光素及其衍生物的理化及光物理性质,如溶解性、 pK_a 值、反应活性、吸收和荧光光谱峰位、荧光效率及寿命等,以适应不同的应用需要,同时可以深入了解反应机理^[18-21]。我们^[22-25]曾经研究过一些不同结构、不同取代荧光素的荧光性能及荧光机理。在此基础上本工作研究二卤代荧光素的光物理性质,进一步加深对荧光素类物质结构-性能关系的认识。结果表明只用重原子效应不能解释二卤代荧光素的荧光和光敏化性质变化,而结合了分子内光诱导电子转移就能较好地解释实验结果。

1 实验部分

1.1 材料

所用二卤代荧光素购于北京化学试剂有限公司,分析纯级并采用经典的碱溶解、酸沉淀、水洗的提纯方法进行过 3 次提纯,经硅胶层析板点样检测,UV-Vis 谱及 IR 谱与文献报道相符。其他溶剂均为重新蒸馏过的分析纯溶剂。

1.2 荧光和吸收光谱溶液配制

先配制含 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 乙醇 100 mL(A),以 A 为溶剂。称量染料溶解至 10 mL 溶剂 A 中以得到 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 染料溶液 B,再取少量溶液 B 稀释至 450 nm 处吸光度为 0.100 的溶液 C,C 用于测量吸收和荧光光谱、荧光效率和荧光寿命。

1.3 单线态氧量子效率溶液配制

先配制含 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 的乙醇 100 mL

(A),以 A 为溶剂。称量染料溶解至 10 mL 溶剂 A 中以得到 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 染料溶液 B。配制 1,3-二苯基异苯并呋喃(DPBF)浓溶液 C。分别取适量溶液 B 和 C 混合,稀释至 500 nm 处吸光度为 1.00,410 nm 处吸光度为 0.80 左右的溶液 D。用 500 nm 光照射 D,用吸收光谱监测 410 nm 处吸光度的变化。

1.4 仪器及测试方法

荧光光谱用 FLS920 稳态/瞬态荧光光谱仪测定,为英国爱丁堡仪器公司产品,激发光源为 450 瓦氙灯,激发波长 450 nm,荧光检测器为日本滨松 R928 型,光谱信号已经校正。UV-Vis 吸收光谱用美国 StenarNet 公司光纤光谱仪测定,光程 10 mm。

荧光量子产率 Φ_f 在 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaOH 乙醇

溶液中测量,用 $\Phi_f = \frac{F}{F_0} \frac{A_0}{A} \Phi_0$ 计算。并以荧光素(FL)

在 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaOH 乙醇溶液中的荧光量子产率为参比,即 $\Phi_0=0.83$ 。其中, F 和 F_0 分别为样品和参比溶液的荧光光谱积分面积, A 和 A_0 代表样品和参比溶液激发波长(450 nm)处的吸光度。荧光寿命用单光子计数法测量,以 379 nm(69 ps 脉冲宽度)半导体脉冲激光器为激发光源,检测器为日本滨松 R928 型。荧光寿命值是将仪器响应函数和指数函数($\sum B_i \exp(-t/\tau_i)$)的叠加对样品信号进行拟合得到,计算判据为 $\chi^2 < 1.25$ 。

单线态氧量子产率在乙醇溶液中测量,以 DPBF 为单线态氧捕捉剂,经 500 nm 的红光照射产生的单线态氧,以四氯四碘荧光素(RB)在乙醇溶液中的单线态氧量子产率为参比,即 $\Phi_{\Delta}^{\text{ref}}=0.76$,用公

式 $\Phi_{\Delta} = \Phi_{\Delta}^{\text{ref}} \frac{k}{k^{\text{ref}}} \frac{I_a^{\text{ref}}}{I_a}$ 计算。其中 $\Phi_{\Delta}^{\text{ref}}$ 为参比 RB 的单线

态氧量子产率, k^{ref} 和 k 分别为参比和样品在以 DPBF 为单线态氧捕捉剂条件下,DPBF 降解的初始反应(零级动力学,线性部分近似)速率常数,用吸收光谱跟踪 DPBF 降解。 I_a^{ref} 和 I 分别为参比和样品在

500 nm 处的光吸收速率,比值可由公式 $\frac{I}{I_a^{\text{ref}}} =$

$$\frac{1-10^{-A_{415}}}{1-10^{-A_{415}^{\text{ref}}}}$$

2 结果和讨论

荧光素类染料分子可以有中性结构、二价阴离

子钠盐、一价阴离子钠盐和酸质子化 4 种不同的存在形式,但二价阴离子钠盐的荧光效率最高,是通常应用时选择的结构形式。因此我们测定了二卤代荧光素在乙醇(内含 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH)溶液中的光物理性质。 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 的存在保证了测量过程中二价阴离子处于绝对主导地位,故以下讨论只限于荧光素类染料二价阴离子盐。

图 2 是二卤代荧光素 FLX_2 ($\text{X}=\text{H}, \text{Cl}, \text{Br}, \text{I}$) 的紫外-可见吸收光谱,呈现了荧光素的典型光谱特征,各光谱形状非常相似,表明 4,5-二卤代没有明显改变占吨环的 π -共轭体系。最大吸收峰位置按如下顺序依次红移,即: $\text{FL} < \text{FLBr}_2 < \text{FLCl}_2 < \text{FLI}_2$, 其中 FLBr_2 和 FLCl_2 的次序与预期的相反。卤素取代通常有两种效应:极化效应和拉电子效应,前者致光谱红移,而后者对光谱位置影响微弱。Cl 原子小,电子云更接近 π -体系,易于参与共轭,导致二氯荧光素比 FLBr_2 红移的更多。

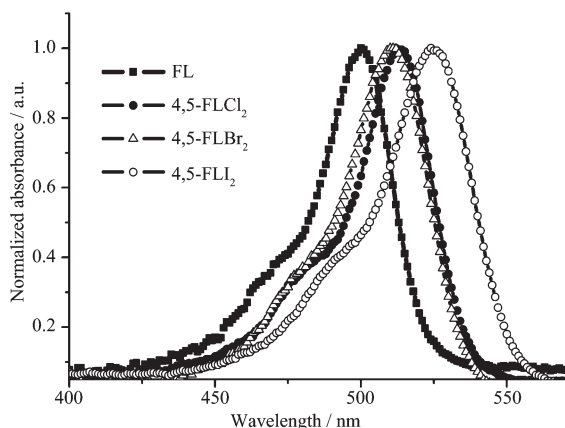


图 2 荧光素类染料二价阴离子在乙醇中的紫外-可见吸收光谱

Fig.2 Normalized UV-Vis spectra for dianions of fluorescein dyes in ethanol

图 3 是二卤代荧光素 FLX_2 ($\text{X}=\text{H}, \text{Cl}, \text{Br}, \text{I}$) 的荧光发射光谱,谱峰形状类似,卤代后位置红移。与吸收光谱情形类似,峰位置并非随卤素原子增大单调增大,同样是 FLBr_2 和 FLCl_2 的次序颠倒,原因如前

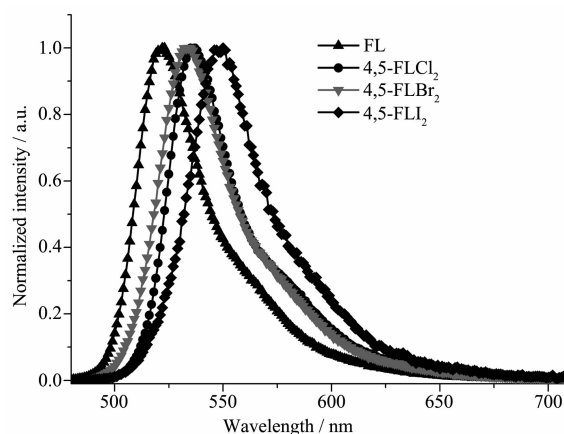


图 3 归一化的荧光素类染料二价阴离子的荧光光谱

Fig.3 Normalized fluorescence spectra for dianions of fluorescein dyes in ethanol with excitation at 450 nm

所述。

测定的二卤代荧光素的荧光量子产率 Φ_f 列在表 1 中,氯代导致了荧光效率增加,而溴代和碘代导致 Φ_f 很明显下降。除氯代外, Φ_f 变化趋势符合通常的重原子效应。

图 4 是二卤代荧光素的荧光衰减曲线,都符合单指数衰减函数,拟合所得荧光寿命 τ_f 列入表 1。氯代导致荧光寿命延长,而溴代碘代导致荧光寿命明显缩短,后者符合重原子效应。随卤素原子增大,荧光寿命的变化趋势与荧光效率的变化趋势相同。

虽然荧光效率(即荧光量子产率, Φ_f)和荧光寿命(τ_f)都受到卤素取代而变化,但是它们的比率($k_f = \Phi_f / \tau_f$)却是常数, k_f 代表了激发态 S_1 的辐射去激发过程的速率常数。

几种染料光敏氧化降解 DPBF 的差距很大,图 5 是吸收光谱变化和相应的动力学。DPBF 浓度对时间作图,在前 10 min 内呈现良好的线性关系,斜率可作为初始反应速率常数。但斜率值各不相同,斜率值越大,代表单线态氧产生的越多。根据斜率值和照射波长的吸光度,以 RB 为参比,可以计算得到单线态氧量子产率 Φ_Δ (计算方法见实验部分)。表

表 1 荧光素类染料在乙醇中的光物理数据

Table 1 Photophysical data of fluorescein dyes in ethanol

	$\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}} / \text{nm}$	$\lambda_{\text{em}}^{\text{max}} / \text{nm}$	E_s / eV	Φ_f	τ_f / ns	Φ_Δ	k_f / s^{-1}
FL	500	522	2.44	0.92	4.16	0.003 4	2.2×10^8
FLCl_2	512	535	2.36	0.96	4.72	0.049	2.0×10^8
FLBr_2	511	534	2.37	0.69	3.50	0.30	2.0×10^8
FLI_2	524	546	2.32	0.16	0.80	0.68	2.0×10^8

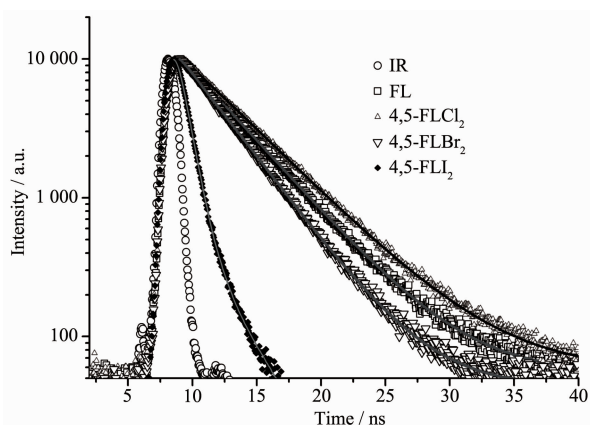


图 4 二卤代荧光素类染料在乙醇中的荧光衰减曲线

Fig.4 Fluorescence decay of the dye dianions in ethanol with excitation at 378 nm; Chi-square value for fitting is 1.08, 1.05, 1.00, 1.09 for FL, FLCl₂, FLBr₂, FLI₂, respectively

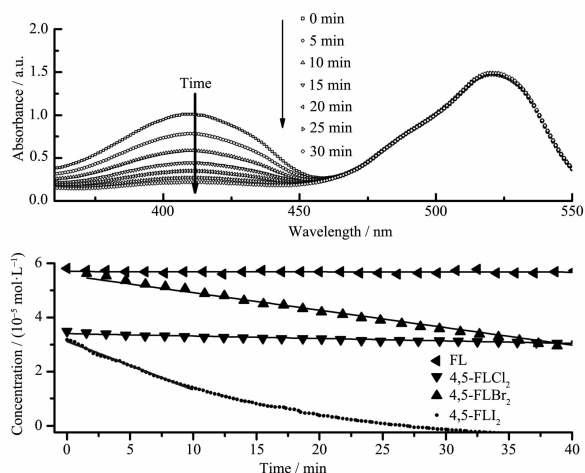


图 5 二碘荧光素吸收光谱随时间的变化及 4 种荧光素相应的动力学

Fig.5 Change of UV-Vis spectra of diiodofluorescein with time and a comparison of the reaction rate of four fluoresceins

1 列出了二卤代荧光素的单线态氧量子产率 Φ_{Δ} 。 Φ_{Δ} 是随卤素原子量的增大而明显增加。

与荧光素相比,二溴代和碘代荧光素的 Φ_f 和 τ_f 值迅速降低,同时 Φ_{Δ} 急剧增大(说明系间窜越量子产率 Φ_{isc} 急剧增大),这是典型的重原子效应导致的结果。单线态氧量子产率 Φ_{Δ} 的增大及最大吸收的红移都有利于占吨类染料在化学生物学上的应用^[26-30]。然而,二氯代荧光素的 Φ_f 和 τ_f 值均大于荧光素的相应值,与重原子效应的趋势相反。而其 Φ_{Δ} 值很小,说明 FLCl₂ 的系间窜越量子产率(Φ_{isc})值也很小。因此荧光素的氯代并不符合有机光物理的

重原子效应。

辐射速率常数 $k_f(=\Phi_f/\tau_f)$ 也列于表 1。虽然 Φ_f 、 τ_f 值从氢、氯到碘变化很大,然而卤代对 k_f 却没有影响,即卤代不改变激发态的辐射过程。尤其是氯代的情形下, Φ_f 、 τ_f 变化虽不符合重原子效应,但 k_f 值并未偏离。这些都说明卤代未改变分子的 π -体系的基态和激发态的几何构型。

Φ_{Δ} 值随卤素原子量增大而增加,通常是由于系间窜越效率 Φ_{isc} 值增加引起的。说明溴代、碘代导致系间窜越速率常数 k_{isc} 增大。

二氯代 Φ_f 、 τ_f 变化的反常效应可以从分子内光诱导电子转移(PET)得到解释。对四氯代的研究表明,在最低激发态 S_1 的去活化过程中还存在除荧光、内转换、系间跨越以外的其他过程 PET^[22]。实际上,占吨类染料具有共价键连接的电子给体-受体(D-A)结构,如图 1 所示,其中苯基部分作为电子受体,占吨(即氧杂恩)部分作为给体。

因为 $\Phi_f=k_f/(k_f+k_{ic}+k_{isc}+k_{PET})$ 、 $\tau_f=1/(k_f+k_{ic}+k_{isc}+k_{PET})$ (式中 k_f 、 k_{ic} 、 k_{isc} 、 k_{PET} 分别为荧光、内转换、系间跨越和除以上 3 种外的其它过程的分子内光诱导电子转移速率常数),氯代的拉电子效应很明显,因为其电负性值 3.16,远大于 C 的电负性(2.55),因此氯代导致给体 D 的给电子能力明显降低,阻止了 PET 过程发生,从而有利于发光, k_{PET} 的减小提高了 Φ_f 、 τ_f 的值。而氯代的重原子效应微弱,虽导致 k_{isc} 的增加,但相对于 k_{PET} 减小而言,不占优势。而溴代和碘代的重原子效应很明显导致 k_{isc} 的增加非常明显,另一方面碘的电负性值 2.66,与 C 原子电负性 2.55 很接近,拉电子效应不明显,对 k_{PET} 的影响较小。

综上所述,将不同卤原子引入占吨环不仅会导致重原子效应,而且也会改变发色团的氧化还原电位和最低激发能 E_s ,这可能会导致分子内光诱导电子转移速率常数的改变,从而促进其发生。然而,卤原子对占吨染料光物理性质的影响比较复杂,由哪种效应起主要作用还要看卤原子本身的物理特性。

3 结 论

将卤素原子(Cl、Br、I)引入荧光素的占吨环不仅使其最大吸收和发射峰发生红移,而且使其荧光寿命和荧光量子产率按照氢、溴、碘的顺序依次降低。另一方面,二卤代荧光素的单线态氧量子产率和系间跨越量子产率则按照从氯到碘的顺序迅速增大。然而,二氯代荧光素的荧光量子产率和荧光寿命超

过或接近荧光素的, 表现出了异常的光物理性质。这是因为重原子效应和苯环与占吨环间的光诱导电子转移同时作用引起的。

参考文献:

- [1] Koziar J C, Cowan D O. *Acc. Chem. Res.*, **1978**,**11**:334-341
- [2] Solov'ev K N. *Phys.-Uspekhi(Adv. Phys. Sci.)*, **2005**,**48**:231-253
- [3] Salleres S, Arbeloa F L, Martinez V, et al. *J. Phys. Chem. C*, **2009**,**113**:965-970
- [4] Chua L H C, Robertson A P, Yee W K, et al. *Groundwater*, **2007**,**45**:85-88
- [5] Redmond R W, Gamlin J N. *Photochem. Photobiol.*, **1999**, **70**:391-475
- [6] HUANG Yan-Qin(黄艳琴), QIN Wei-Sheng(秦伟胜), REN Hou-Ji(任厚基), et al. *Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)*, **2012**,**10**(33):2213-2216
- [7] LI Fang(李芳), SUN Xiang-Ying(孙向英), WU Kai(吴凯), et al. *Chinese J. Anal. Chem.(分析化学学报)*, **2013**,**7**(41):1097-1101
- [8] Yang Y, Zhao Q, Feng W, Li F. *Chem. Rev.*, **2013**,**113**:192-270
- [9] Dong C Y, So P T C, French T. et al. *Biophys. J.*, **1995**,**69**:2234-2242
- [10] Song Y, Suntharalingam K, Yeung J S, et al. *Bioconjugate Chem.*, **2013**,**24**:1733-1739
- [11] Song L, Henninck E J, Young I T, et al. *Biophys. J.*, **1995**, **68**:2588-2600
- [12] HUAN Xian-Hong(黄显虹), ZHANG Guan-Xin(张关心), ZHANG De-Qing(张德清). *Acta Chin. Sinica(化学学报)*, **2012**,**70**:2133-2136
- [13] Wanger J, Lerner R A, Barbas C F. *Bioorg. Med. Chem.*, **1996**,**4**(6):901-916
- [14] Kenmoku S, Urano Y, Handa K, et al. *Tetrahedron*, **2004**,**60**:11067-11073
- [15] Lee L G, Connell C R, Woo S L, et al. *Nucleic Acids Res.*, **1992**,**20**:2471-2483
- [16] Feenstra R P G, Tseng S C G. *Ophthalmol.*, **1992**,**99**:605-617
- [17] Cui L P, Huxlin K R, Xu L S, et al. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **2011**,**52**:2556-2564
- [18] Zhang X F, Liu Q, Wang H B, et al. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2008**,**7**:1079-1084
- [19] Pellosi D S, Estevo B M, Semensato J, et al. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, **2012**,**247**:8-15
- [20] Diehl H, Horschak-Morris N. *Talanta*, **1987**,**34**:739-741
- [21] Diehl H. *Talanta*, **1989**,**36**:413-415
- [22] Zhang X F, Zhang I, Liu L H. *Photochem. Photobiol.*, **2010**, **86**:492-498
- [23] Zhang X F. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2010**,**9**:1261-1268
- [24] Zhang X F, Liu Q, Wang H B, et al. *J. Photochem. Photobiol. A*, **2008**,**200**:307-313
- [25] LIU Li-Min(刘丽敏). *Thesis for the Masterate of Hebei Normal University of Science & Technology(河北科技师范学院硕士论文)*, **2012**.
- [26] TAI Xi-Shi(台夕市), ZHAO Wen-Hua(赵文华), LI Fa-Hui(李法辉). *Chinese J. Inorg. Chem.(无机化学学报)*, **2013**,**29**(10):2200-2204
- [27] DING Lan-Lan(丁兰兰), LUAN Li-Qiang(栾立强), SHI Jia-Wei(施佳伟), et al. *Chinese J. Inorg. Chem.(无机化学学报)*, **2013**,**29**(8):1591-1598
- [28] HUANG Jun-Teng(黄俊腾), ZHANG Yang(张阳), WANG Xiang-li(王湘利), et al. *Chinese J. Inorg. Chem.(无机化学学报)*, **2013**,**29**(8):1649-1656
- [29] YANG Wan-Li(杨万丽), WANG Li-Yan(王丽艳), WANG Qin-Wen(王清文). *Chinese J. Inorg. Chem.(无机化学学报)*, **2013**,**29**(2):295-302
- [30] HU Wei-Ji(胡未极), WU Xiao-Yong(吴小勇), LIU Jian-Feng(刘建风) et al. *Chinese J. Inorg. Chem.(无机化学学报)*, **2013**,**29**(4):861-866