

Application of
Fluorescent Molecular
Sensing Technology

荧光分子 传感技术应用

曹 俭 主 编
瞿 祎 王 乐 副主编

系统介绍荧光分子探针的
结构设计 | 基本机理 | 实际应用 | 发展趋势

探寻荧光分子探针在
化学、环境、生物、医学等领域的应用

前沿成果、案例丰富、深入浅出
帮助读者更好地理解荧光分子发展的动态演进过程



华东理工大学出版社
EAST CHINA UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY PRESS

荧光分子传感技术应用

主 编 曹 俭

副主编 瞿 玮 王 乐



華東理工大學出版社
EAST CHINA UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY PRESS

· 上海 ·

图书在版编目(CIP)数据

荧光分子传感技术应用 / 曹俭主编; 瞿伟, 王乐副
主编. —上海: 华东理工大学出版社, 2023. 11
ISBN 978-7-5628-7302-0

I. ①荧… II. ①曹… ②瞿… ③王… III. ①荧光—
光化学反应 IV. ①O644.17

中国国家版本馆 CIP 数据核字(2023)第 202411 号

内 容 提 要

本书结合有机小分子的光化学光物理性能以及最新的研究成果,系统地介绍了荧光分子探针的传感机制和实际应用。本书内容循序渐进,通过介绍荧光分子的结构、能量发射机制、分子探针结构设计和实际应用等,引出对荧光分子传感技术的论述,有助于读者理解有机小分子荧光探针的基本机理、发展趋势及其在环境学、生物学、医学等领域的应用。

本书可作为荧光分子传感技术相关专业教材,也可供从事相关研究工作的技术人员参考。

项目统筹 / 马夫娇

责任编辑 / 宋佳茗

责任校对 / 陈婉毓

装帧设计 / 徐 蓉

出版发行 / 华东理工大学出版社有限公司

地址: 上海市梅陇路 130 号, 200237

电话: 021-64250306

网址: www.ecustpress.cn

邮箱: zongbianban@ecustpress.cn

印 刷 / 上海新华印刷有限公司

开 本 / 710 mm × 1000 mm 1/16

印 张 / 15.75

字 数 / 257 千字

版 次 / 2023 年 11 月第 1 版

印 次 / 2023 年 11 月第 1 次

定 价 / 88.00 元

版权所有 侵权必究

前言

荧光分子传感技术的发展已有几十年的历程,其概念和理论已成为当今探针分子合成和传感机制研究的重要组成部分,同时也为有机化学、分析化学、化学生物学和生物医学等领域的发展提供了帮助。虽然相关技术的发展十分迅速,但基本理论仍然是当前荧光分子传感研究和应用的基石,所以一本包含荧光分子传感机制研究理论和实际应用案例的教材显然对化学科学、生物科学和医学科学等众多领域的研究工作人员、学生及教学工作者大有裨益,这样一本教材有助于将荧光分子传感技术的概念融汇于相关研究和教学之中。

本书是一本内容全面、特色鲜明的教材,它可以使教师和学生理解分子探针传感的机制及其在环境学、生物学、医学等领域的应用。本书在详细介绍有机小分子荧光探针知识的基础上,通过众多生动的实例描述了如何利用先进的光谱技术阐明荧光分子的传感机制,如何利用推拉电子基团修饰改性荧光探针分子的光谱性能,如何设计探针分子对目标物的作用位点来实现高灵敏度、高选择性地识别,如何设计能广泛用于生物学、医学等领域的分子探针。本书首次根据有机小分子的光化学光物理性能,系统介绍了荧光分子探针的传感机制和实际应用,有助于理解有机小分子荧光探针的本质和发展趋势。

本书意在让研究者和学生能够熟悉有机小分子荧光探针研究的基本概念和方法,每一章都配有详细的案例说明,具备大学普通化学、有机化学和分析化学基础知识的学生能够容易地理解。本书总结了大量的本领域文献,将这些文献的成果归纳分类,使读者能够系统地理解荧光分子传感技术的应用和

发展。

作为一本入门书籍,本书包括6章内容,从基本原理入手,逐步展开,系统地介绍了有机小分子传感的概念,通过介绍荧光分子的结构、能量发射机制、分子探针结构设计和实际应用等,引出对荧光分子传感技术的论述。对文献的归纳、总结、分类,使得探针分子传感机制、探针分子结构的修饰改性和实际应用之间的关系易于理解,有助于将相关技术应用于其他有意义的研究体系之中。

本书整理于荧光分子传感技术应用的课程和讲座,在此感谢课题组成员及其他参与其中的老师和学生。他们通过不断提问和探索,协助了本书的成形。

曹 俭

2023年6月

于上海工程技术大学

目录

第 1 章 绪论 001

- 1.1 超分子化学概述 / 001
- 1.2 荧光概述 / 003
 - 1.2.1 荧光与物质结构的关系 / 004
 - 1.2.2 荧光与溶液浓度的关系 / 007
 - 1.2.3 荧光与其他影响因素的关系 / 009

第 2 章 荧光分子探针基本原理 012

- 2.1 荧光分子探针(传感器) / 012
 - 2.1.1 荧光分子探针(传感器)的基本模型 / 012
 - 2.1.2 荧光分子传感器的特点与发展 / 014
 - 2.1.3 分子探针的荧光团作为分析工具的应用 / 015
 - 2.1.4 最终时间和空间分辨 / 016
- 2.2 荧光分子探针(传感器)的作用原理 / 016
 - 2.2.1 分子激发态反应动力学 / 016
 - 2.2.2 分子激发态能量转移 / 017
 - 2.2.3 荧光共振能量转移 / 019
 - 2.2.4 分子激发态电子转移 / 021
 - 2.2.5 光诱导电子转移 / 022
 - 2.2.6 分子内电荷转移 / 025

- 2.2.7 激基缔合物与激基复合物 / 029
- 2.2.8 光诱导质子转移 / 029
- 2.3 荧光分子探针结构及各部分的作用 / 030

第3章 有机小分子功能荧光染料

032

- 3.1 氟化硼二吡咯甲川类 / 035
- 3.2 DCM 类 / 041
- 3.3 荧光素类 / 043
- 3.4 罗丹明类 / 044
- 3.5 花菁类 / 045
- 3.6 香豆素类 / 045
- 3.7 吩(噻)嗪类 / 047
- 3.8 蒽、菲、芘类 / 049
- 3.9 蔡酰亚胺类 / 050
- 3.10 硝基苯并-2-氧杂-1,3-二唑荧光团类 / 054
 - 3.10.1 苯并-2-氧杂-1,3-二唑类化合物 / 054
 - 3.10.2 硝基苯并-2-氧杂-1,3-二唑荧光团衍生物的研究进展 / 055
- 3.11 噁嗪类 / 056
- 3.12 偶氮类硝基水杨醛染料 / 057
- 3.13 苯并噻唑类 / 058
- 3.14 四苯乙烯类 / 059
- 3.15 其他类荧光团染料 / 061
 - 3.15.1 由迈克尔加成合成的染料 / 061
 - 3.15.2 基于苯并咪唑型亲核加成的染料 / 063
 - 3.15.3 基于金属配合物类荧光团 / 068
 - 3.15.4 五元环联六元环类荧光团 / 072

第 4 章 荧光分子传感器检测基团

088

- 4.1 反应型检测基团 / 088
 - 4.1.1 阴离子检测 / 088
 - 4.1.2 阳离子检测 / 098
- 4.2 络合型检测基团 / 109
- 4.3 冠醚类检测基团 / 115
- 4.4 酰胺类检测基团 / 121
- 4.5 杯芳烃类 Hg^{2+} 检测基团 / 123
- 4.6 其他类型 Hg^{2+} 检测基团 / 124
- 4.7 席夫碱检测基团 / 125
- 4.8 氧化还原型检测基团 / 127
 - 4.8.1 常见次氯酸根荧光探针 / 127
 - 4.8.2 常见过氧化氢荧光探针 / 128
 - 4.8.3 其他常见 ROS/RNS 荧光探针 / 128
- 4.9 氢键型检测基团 / 129
- 4.10 金属配位型检测基团 / 130
- 4.11 聚集传感型检测基团 / 132
- 4.12 利用自身分子结构作为检测基团 / 133
 - 4.12.1 黏度探针 / 133
 - 4.12.2 pH 探针 / 135
 - 4.12.3 温度探针 / 136
- 4.13 作为生物硫醇的检测基团 / 137
- 4.14 作为 DNA 的检测基团 / 138
- 4.15 作为细胞和组织的检测基团 / 141
 - 4.15.1 荧光探针在酶检测中的应用 / 141
 - 4.15.2 荧光探针在组蛋白脱乙酰基酶检测中的应用 / 141
 - 4.15.3 荧光探针在碱性磷酸酶检测中的应用 / 143
- 4.16 检测气体的荧光团 / 145
 - 4.16.1 检测 H_2S 荧光探针的研究进展 / 145

- 4.16.2 利用将叠氮化物还原成氨基的机理检测 H_2S / 146
- 4.16.3 利用亲核加成反应机理检测 H_2S / 147
- 4.16.4 利用生成硫化铜沉淀的反应机理检测 H_2S / 149
- 4.16.5 检测 SO_2 荧光探针的研究进展 / 150
- 4.16.6 检测 NO 荧光探针的研究进展 / 154
- 4.16.7 基于邻苯二胺的 NO 荧光传感器 / 154
- 4.16.8 基于 Cu^{2+} 还原的 NO 荧光传感器 / 157
- 4.16.9 基于其他方法的 NO 荧光传感器 / 158
- 4.16.10 检测 HNO 荧光探针的研究进展 / 159
- 4.16.11 利用施陶丁格连接反应检测 HNO / 159
- 4.16.12 基于 Cu^{2+} 的还原反应机理检测 HNO / 161
- 4.16.13 基于其他反应机理检测 HNO / 163
- 4.17 $-\text{OH}$ 检测基团 / 164

第5章 荧光分子传感器

169

- 5.1 荧光分子传感器 / 169
 - 5.1.1 探针的分子结构对传感的影响 / 169
 - 5.1.2 探针的氧化还原性对传感的应用 / 170
 - 5.1.3 探针的聚合状态对传感的应用 / 171
 - 5.1.4 荧光分子探针的光致变色对分子传感的研究 / 172
 - 5.1.5 探针的光电转换对传感的研究 / 173
- 5.2 荧光分子探针应用研究 / 174
 - 5.2.1 阴离子传感器 / 174
 - 5.2.2 阳离子传感器 / 181
- 5.3 温度探针 / 198
- 5.4 pH 探针 / 199
- 5.5 细胞和生物探针 / 200
- 5.6 气体探针 / 202
- 5.7 逻辑门 / 203
- 5.8 光动力 / 204

<<<<

- 5.9 单线态氧 / 204
- 5.10 荧光开关 / 205
- 5.11 双响应作用探针 / 206
- 5.12 近红外荧光分子探针 / 207
- 5.13 AIE 型荧光探针 / 208
- 5.14 活性氧(ROS) / 210
 - 5.14.1 次氯酸根荧光探针 / 210
 - 5.14.2 双氧水荧光探针 / 210
 - 5.14.3 其他 ROS/RNS 荧光探针 / 211

第 6 章 进展

212

- 6.1 荧光技术在生物成像技术上的应用 / 212
- 6.2 荧光技术偶联生物缀合技术的应用 / 213

参考文献

216

第 1 章

绪 论

1.1 超分子化学概述

超分子化学(supramolecular chemistry)的概念在 20 世纪 70 年代被提出。不同于建立在共价键基础上的分子化学,超分子化学建立在分子有序体和非共价分子间作用力概念的基础上,是用于描述如何控制分子间价键的理论^[1]。

分子之间通常以弱相互作用组合,而超分子化学提出将分子之间的弱相互作用转变成有选择性和方向性的强相互作用,这种强相互作用的强度与以共价键力形成的分子内化学键的强度相当,能形成超分子体系。利用超分子化学的概念可以进行分子识别和分子装配等实际应用。

所谓分子识别是指受体分子有选择地结合底物分子,形成超分子体系,通过分子信息储存及超分子信息读取来表示分子识别的状况。分子信息可以储存在底物和受体分子的络合点处,也可储存在底物周围的受体分子的 σ 键中。超分子信息读取的方式表现为超分子体系的形成和分解,整个超分子体系所体现出来的动力学选择性和热力学稳定性与体系所处的环境有关。

由于分子之间的识别不能任意进行,需要合适地相互匹配,匹配的概念最早是 Fisher 于 1894 年提出的,他以“锁”与“钥匙”的形象来描述分子识别^[2]。华东理工大学朱为宏课题组于 2011 年报道了化合物 BN^[3],借用“锁”与“钥匙”的例子,形象地描述了分子识别的概念(图 1-1),无色的底物 BN 在紫外光照射下关环,形成红色化合物 c-BN,最大吸收波长由 365 nm 移到 526 nm,等吸收点在 374 nm 处,紫外光停止照射后,c-BN 恢复到无色的 BN 结构。如果底物 BN 和 BF_3 反应,则把 BF_3 形象地比作“锁”,形成 $\text{BN} \cdot \text{BF}_2$ ，“锁”住

BN,用紫外光照射后,没有光致变色效应。在 BN_BF_2 中加入 Et_3N 作为“钥匙”,把“锁”的结构打开, BN_BF_2 回到无色 BN 结构,再用紫外光照射,可关环形成红色化合物 c-BN。在图 1-1 中以 BT 为参照物,将 BN 中的噻唑换成 BT 中的噻吩后,由于缺少了“锁”的搭扣,将不再产生“锁”与“钥匙”的关系。

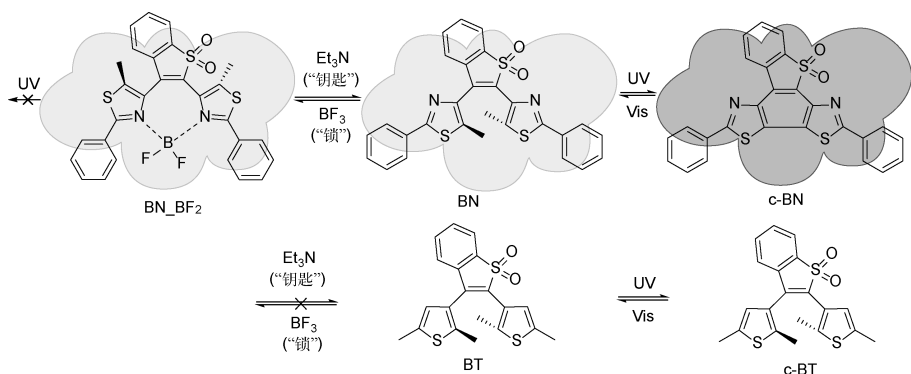


图 1-1 “锁”与“钥匙”

分子识别过程伴随着能量的变化,从热力学和动力学的角度研究认为,受体分子与底物络合所需自由能的大小决定识别过程的发生,络合所需自由能的大小主要受以下条件的影响:(1)受体分子和底物之间相应络合位置上的作用力和立体形状互补;(2)两者接触区域大小导致两者相互包含;(3)多个相互作用位点和整个范围的强络合;(4)溶剂分子、底物和受体分子三者相互作用而表现出两两几何匹配的疏水或亲水区域的介质效应。

在分子识别研究领域,实际应用价值较高、表现形式较复杂的是生物分子识别。比如图 1-2 中关于小分子和 DNA 之间的相互作用的研究可以帮助设计新的有效药物来治疗许多疾病^[4]。

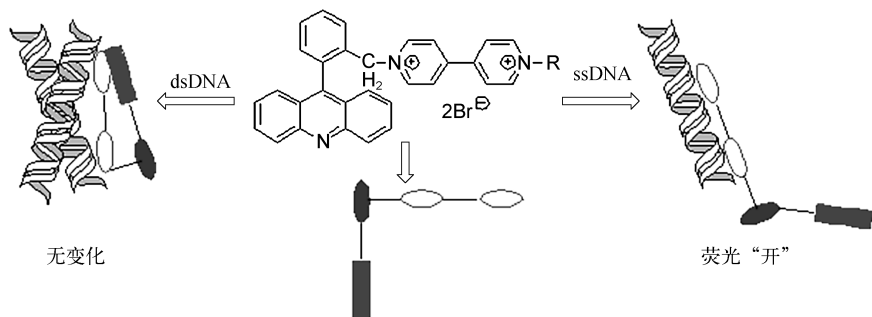


图 1-2 有机化合物与 DNA 之间的相互作用

1.2 荧 光 概 述

荧光(photoluminescence)的发光机制是光致发光,物质的分子吸收辐射后由激发单重态最低振动能级降到基态,同时发射出荧光。自然界存在着许多荧光物质,荧光的初期发展进程如表 1-1 所示。

表 1-1 荧光的初期发展进程

时 间	内 容	研 究 者
16 世纪	发现植物提取液和矿物的荧光现象	
19 世纪中期	探究确定产生荧光的条件和原理	
1852 年	发现叶绿素和奎宁的荧光波长比照射光波长更长,证实荧光是发射光	Stokes
1867 年	以桑色素为荧光试剂,用荧光法检测铝	Goppetsroder
19 世纪中期	研究物质的浓度与荧光强度的关系	Stokes
1924 年	测定荧光量子产率	Wawwillous
1926 年	测定荧光寿命	Gaviola

有机物的分子结构是荧光发生的内在因素,产生荧光的分子中大多数含有 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁的刚性共轭体系, $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁引起有或没有精细结构的宽发射带。有机分子络合金属离子后也会产生荧光,而某些金属离子可能由于 f 轨道的跃迁,出现窄荧光峰谱带。荧光强度和荧光寿命是荧光表征的两个重要参数,分子或络合物的结构及其所处的环境决定了荧光的强度,荧光寿命通常是指激发光停止后约 10 ns 内持续发光的时长^[5]。

存在的物质有确定的结构,研究表明物质本质上有能级存在,能级与物质结构有关,荧光光谱可以用于物质结构的表征,因为物质的能级不随发射和吸收而改变,相同能级间隔的荧光光谱的波长是一样的。图 1-3 为分子发光机理能级图,图中显示分子吸收能量后的振动弛豫、无辐射跃迁和辐射跃迁过程^[6]。

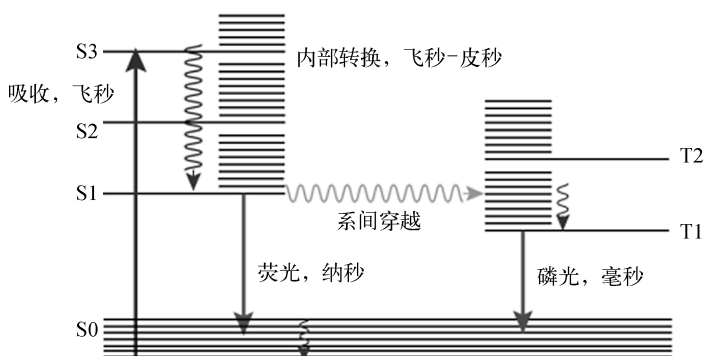


图 1-3 分子发光机理能级图

荧光光谱法中荧光强度与物质的浓度直接相关,与光源功率没有直接关系,所以通过增强光源功率或放大荧光信号可提高荧光灵敏度。荧光光谱法的灵敏度可达 10^{-9} g/L 以上,适合分析微量试样。荧光光谱能提供许多光谱参数,这些参数对于在分子水平上研究物质有重要意义。其中荧光量子效率(荧光效率)是一个重要的参数指标,溶液的荧光强度与该物质的吸光程度和荧光效率有关。荧光效率是荧光物质发出荧光的光量子(简称量子)数与吸收的激发光的光量子数的比值,即:

$$\text{荧光效率 } \varphi = \frac{\text{发出荧光的光量子数 } E_m}{\text{吸收的激发光的光量子数 } E_x}$$

理想状态下分子结构不变,荧光光谱也不变。一定的分子结构对应一定的荧光光谱,荧光光谱可以作为分子结构的表征谱图之一。荧光光谱对分子的共轭结构、分子结构中的取代基和环境因素如溶剂极性、pH 值及淬灭效应等非常敏感,从这一角度考虑,荧光光谱适合于分析测试研究,并且分子本身具有更广泛的研究前景。

1.2.1 荧光与物质结构的关系

物质能否产生荧光取决于其分子结构:能够产生荧光的物质的分子结构必须具有吸收光量子 and 发射荧光量子的能力。一些物质的分子结构具有较强的吸光能力,但发射荧光量子效率低,使得荧光强度不够大;而另一些物质的分子结构能发射荧光,但是吸光能力差。从物质的分子结构出发,可以大致判断荧光物质和非荧光物质,还可以把非荧光物质改造为吸光能力强和发射荧

光量子效率高的结构。提高荧光光谱的分析应用效能,是研究荧光分子传感技术的内在研究动力。

1. 荧光量子效率

荧光量子效率用来表示物质的荧光强度,物质的荧光量子效率由激发态失活的各个过程的相对速率所决定。 k_f 表示荧光过程的速率常数, k_c 表示第一激发单重态无辐射(内转换和外转换)过程的速率常数, k_x 为系间跨越速率常数,则发射过程的荧光量子效率:

$$\varphi_f = \frac{k_f}{k_f + k_c + k_x} \quad (1-1)$$

式(1-1)表示物质的分子结构和分子所处环境两种因素对荧光量子效率的影响。其中分子结构决定 k_f 的大小,而分子所处环境对 k_f 影响较小。分子所处环境对 k_c 影响很大,而分子结构对 k_c 影响很小。 k_x 受分子结构影响较大,也受分子所处环境一定的影响。由式(1-1)可见,当 k_f 远大于 k_c 和 k_x 时, φ_f 趋近于1,荧光量子效率就高;反之,当 φ_f 趋近于零时,荧光就弱。 k_f 表示第一激发单重态和基态之间以辐射形式发生的跃迁效率的量度。这种跃迁主要是 $\pi^* \rightarrow \pi$ 过程,所产生的是常见的荧光。研究表明,荧光产生机理如下:(1) 荧光发射所需的激发能较低。当物质受到激发能高于 250 nm 的紫外辐射时,激发态便可预离解或离解失活从而失去能量,导致无发射产生。因此低能激发后的 $\pi^* \rightarrow \pi$ 和 $\pi^* \rightarrow n$ 过程的跃迁能发射荧光。而 $\sigma \rightarrow \sigma^*$ 跃迁需很高的激发能量,因此由 $\sigma^* \rightarrow \sigma$ 跃迁产生的发射荧光很少。(2) 荧光发射来自波长较长的低能吸收。分子长波长吸收带的最大摩尔吸光系数 $\epsilon_{\text{最大}}$ 可作为 k_f 的定性量度。 $\epsilon_{\text{最大}}$ 减小时, k_f 相应减小,则激发单重态的寿命相应增加。 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁的摩尔吸光系数约比 $n \rightarrow \pi^*$ 跃迁的摩尔吸光系数大 10^3 倍。 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁的寿命($10^{-9} \sim 10^{-7}$ s)比 $n \rightarrow \pi^*$ 跃迁的寿命($10^{-7} \sim 10^{-5}$ s)短。相比之下 $\pi \rightarrow \pi^*$ 类型跃迁的量子效率高、寿命短。因此 k_f 值越大,越易发生荧光。荧光发射需要较低的激发辐射能量,所以应是 π, π^* 型或 n, π^* 激发态辐射失活产生的荧光。但 π, π^* 型比 n, π^* 型的荧光量子效率高,所以 π, π^* 型的化合物更易产生荧光。(3) 系间跨越跃迁的速率常数 k_x 比 $\pi \rightarrow \pi^*$ 激发态的 k_f 值小,据式(1-1), $k_f > k_x$,对荧光量子效率是有利的。因为激发单重态与三重态两者的振动能级重叠不大,系间跨越跃迁概率小,并且单重态与三重态之间

的能量差较大,要使 $\pi \rightarrow \pi^*$ 激发态改变电子自旋就需要较大能量。

2. 共轭结构

物质通过 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁过程吸收辐射并发射强烈荧光,因此分子结构中具有共轭双键,尤其是具有刚性结构、平面结构和稠环结构的 π -电子共轭体系的分子更有利于发射荧光。分子的结构共平面性越大,其 π -电子离域性也越大,即 π -电子的共轭度越大,荧光量子效率也越大。荧光光谱的波长也将向长波方向移动,波长的红移表明第一激发单重态的能量降低。含有低能 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁的芳香族和稠环结构的杂环化合物、脂肪族及脂环族等化合物都能发射荧光。

分子结构中有利于提高 π -电子共轭度的结构因素,能使荧光波长向波长较长的方向移动并提高荧光量子效率。分子立体异构现象对荧光强度有显著的影响。分子的平面结构增大,荧光增强。若分子形成聚集体则破坏了平面性,荧光减弱或者成为非荧光物质。在最新的研究中,有文献表明有机小分子在聚集态时发射荧光,为此研究者提出了聚集态发光理论,目前聚集态发光机制在不断探索研究中。

3. 结构刚性效应

分子结构刚性效应,即具有 π -电子共轭体系分子的平面性增加, π -电子的非定域性就增加,其荧光效率和荧光强度也将增大。如果 π -电子共轭体系分子具有刚性平面结构,分子就不致发生形变,而保持大的平面结构,即保持了大的 π -电子共轭度。刚性的增加还可以降低内转换的速度,减少系间跨越跃迁以及碰撞去活化等无辐射过程的可能性。因此,结构刚性效应可使分子的平面性增大,增加了 π -电子的共轭度,同时减少了分子的内转换和系间跨越跃迁。式(1-1)中的 k_c 和 k_x ,以及分子内部的振动等无辐射失活的能量损失,增强了荧光效率。另外分子刚性结构的增强还可以使一些不发生荧光或荧光很弱的物质转化为强荧光物质。

4. 取代基的影响

在分子的共轭结构上进行不同的基团的取代,对荧光强度和荧光光谱的波长将产生以下影响:(1) 增强荧光的基团: $-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$, $-\text{OCH}_3$, $-\text{NHR}$ 等给电子基团,可增大最低激发单重态与基态之间的跃迁概率。(2) 减弱荧光甚至淬灭荧光的基团: $-\text{COOH}$, $-\text{NO}_2$, $-\text{N}=\text{N}-$, $-\text{SH}$ 及卤素等吸电子基团,其荧光减弱的原因各不相同:有些基团发生预离解,有些

基团有“重原子效应”而影响系间跨越跃迁的速度,这个效应与原子光谱中随着原子序数的增加而 $\Delta s=0$ 的选择逐渐失效的情况类似,当重原子引入 π -电子体系中时,系间跨越速度增加,从而减弱荧光。(3) 对分子荧光影响不明显的基团: $-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{O}^-$ 和烷基等,因为这些基团与 π -电子体系作用较小,取代基改变了荧光效率,使最大吸收峰发生位移,荧光峰也相应改变。双取代物和多取代物对离域 π -电子激发的影响较难预测。如果取代基之间形成氢键,而且分子平面性增加,有利于荧光增强。抗磁性物质能发射荧光,顺磁性物质的荧光减弱或不发射荧光。因顺磁性物质分子中有不成对的电子自旋,系间跨越速度增大。

给电子基的氧或氮原子的 n 电子受激发后参与母体结构的 π 键,形成大共轭体系,导致光谱波长红移。含有给电子基的有机分子在碱性极性溶剂中释放出 H^+ ,例如 $-\text{OH} \rightarrow -\text{O}^-$,使分子带负电,增强荧光;在酸性极性溶剂中分子被质子化,例如 $-\text{NH}_2 \rightarrow -\text{NH}_3^+$,使分子带正电,减弱荧光。

吸电子基的 n 电子跃迁是禁阻的,不能参与母体结构的 π 键共轭。在吸电子基中硝基的吸电子能力最强,减弱荧光也最强,而氟离子和不饱和的氰基 ($-\text{C}\equiv\text{N}$) 表现出诱导效应和共轭效应协同作用的效果,使荧光增强,有文献把氰基归于给电子基类^[7]。磺酸基对荧光的影响更复杂,磺酸基能增加水溶性,有利于在生物体系中的应用。

取代基体积的大小影响分子共轭效应的大小^[8]。其他影响因素还有取代基的数量、所处位置、重原子效应和芳香环中的杂原子等。

1.2.2 荧光与溶液浓度的关系

物质在溶液中的浓度通常也会影响荧光强度。根据比尔定律,透射光的强度 $I = I_0 e^{-\epsilon bc}$, 式中, ϵ 为荧光分子的摩尔吸光系数; ϵbc 为其吸光度 (A); I_0 为入射光的强度。因吸收而减弱的比强度(单位时间吸收的光量)可表示为:

$$I_0 - I = I_0(1 - e^{-\epsilon bc})$$

因而发射的荧光强度 I_F 与 $I_0 - I$ 和荧光效率 φ 成比例,即

$$I_F = (I_0 - I)\varphi = \varphi I_0(1 - e^{-\epsilon bc}) \quad (1-2)$$

$$I_F = \varphi I_0 \left[\epsilon bc - \frac{(\epsilon bc)^2}{2!} + \frac{(\epsilon bc)^3}{3!} - \dots \right] = \varphi I_0 \left[\epsilon bc - \frac{(\epsilon bc)^2}{2} + \frac{(\epsilon bc)^3}{6} - \dots \right] \quad (1-3)$$

当溶液为稀溶液时,被吸收的总激发光能不超过 5%,即 $\epsilon bc = A \leq 0.05$ 时,式(1-2)括号内第二项以后各项可忽略不计,则式(1-3)可改写为: $I_F = \varphi I_0 \epsilon bc$ 。当 I_0 为一常数,且浓度 c 很小时

$$I_F = Kc \quad (1-4)$$

从式(1-4)可以看出:荧光强度与荧光物质的浓度成正比,但是荧光强度与溶液浓度呈线性关系仅限于极稀的溶液。当溶液浓度 $c_{\text{最大}} > 0.05/\epsilon bc$ 时,荧光强度与溶液浓度不再呈线性关系。这是因为物质先吸收能量再发射荧光,而物质的 ϵ 及 b 是确定的,由式(1-2)可看出:当 c 增大时, $e^{-\epsilon bc}$ 变小,荧光强度 I_F 增大;当 c 很小时, c 与 I_F 呈线性关系,当浓度继续增大, $e^{-\epsilon bc}$ 趋近于零,则式(1-2)变成了 $I_F = \varphi I_0$,说明此时荧光强度与溶液中各组分的浓度无关。所以当荧光物质浓度增大到某一限度后,溶液浓度再增大,荧光强度也不再增加。

溶液浓度与荧光强度测定的关系是低浓度时成正比,高浓度下曲线斜率变小甚至正负符号改变,这主要是自吸收和自淬灭两个因素所导致的。在极稀溶液中,入射光 I_0 照射产生荧光均匀分布于溶液中;在较浓溶液中,液池前部的溶液强吸收则发生强的荧光,而后部的溶液不易接收入射光,则不发生荧光,所以荧光强度反而降低。

自吸收是指荧光发射的波长和该物质的吸收峰重叠,导致荧光强度降低乃至淬灭的现象。荧光光谱的短波长一端常和其吸收光谱长波长一端重叠。当溶液浓度较大时,液池前部所发射的荧光通过后部溶液时,短波长的荧光被自吸收,因而降低了荧光强度。如果物质中含有能吸收入射光和荧光的杂质,该杂质的存在也会导致荧光强度降低或淬灭,此种作用称为内滤光效应。

自淬灭是单重激发态分子在发射荧光之前与未激发的物质分子碰撞而引起的,通常在浓度大于 1 g/L 时发生。除碰撞原因之外,在高浓度的溶液中,水分子的氢键或强的极化作用下分子形成二聚体或多聚体。它们与单体不同,不会产生荧光或产生的荧光很弱。二聚体对于荧光的淬灭作用可能是电子能在二聚体分子间来回转移而延长了分子在发射荧光之前的寿命所致。物

质分子与溶剂分子的相互作用也会引起荧光淬灭。

引起溶液中荧光淬灭的原因很多,机理也很复杂。下面讨论几种导致荧光淬灭作用的主要类型。

(1) 碰撞淬灭是荧光淬灭的主要原因。碰撞淬灭是指处于单重激发态的荧光分子与其他分子发生碰撞后,激发态分子以无辐射跃迁方式回到基态,因而产生淬灭作用。碰撞淬灭还与溶液的黏度有关。在黏度大的溶剂中,淬灭作用较小。此外,碰撞淬灭随温度升高而增加。

(2) 能量转移。这种淬灭作用是由于其他分子与处于单重激发态的荧光分子作用后,发生能量转移,使其他分子得到激发。

(3) 氧的淬灭作用。溶液中的溶解氧常对荧光产生淬灭作用。这可能是顺磁性的氧分子与处于单重激发态的荧光物质分子相互作用,促进形成顺磁性的三重态荧光分子,即加速系间窜跃所致。

(4) 自淬灭和自吸收。当荧光物质浓度较大时,常会发生自淬灭和自吸收现象。

1.2.3 荧光与其他影响因素的关系

荧光的产生及其强度主要取决于分子结构,但在荧光发射过程中还受到无辐射失活过程的环境因素的影响(k_c 和 k_x),如温度、溶剂种类、溶液的 pH 值及淬灭效应等诸多因素的影响。

1. 温度与溶剂种类对荧光的影响

(1) 温度升高荧光效率下降的主要原因是分子内能的转移作用。

图 1-4 位能曲线表明:激发态分子受到额外热能时,沿位能曲线上升则转换至基态位能曲线,激发能转换为基态振动能,继而通过碰撞将能量转移给其他分子,无辐射失活过程概率增大。随温度上升荧光效率下降的另一个原因是激发态分子和溶剂分子间发生某些可逆的光化学过程。

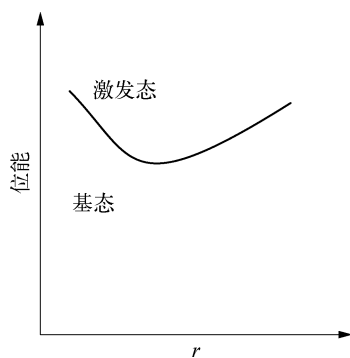


图 1-4 位能和 r (温度变化速率) 的关系

(2) 荧光强度和荧光光谱的位置,在不同的溶剂中有显著的改变。

溶剂的极性对荧光有较大的影响,通常荧光强度随着溶剂极性的增强而

增强。如果溶质激发态的极性比基态大,溶剂极性增大,对激发态有稳定作用。随着溶剂极性的增加, $n \rightarrow \pi^*$ 跃迁的吸收峰蓝移(蓝移效应是由于未成键电子对的溶剂化作用的增加,降低了 n 轨道的能量。极性溶剂分子和溶质分子间形成氢键。处于 S_0 态的键比处于 S_1^* 态的键更强些,结果增加了 $n \rightarrow \pi^*$ 电子跃迁的能量而使吸收峰移向较短的波长)。而溶剂极性的增强往往使 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁的能量降低,从而使荧光增强。

如果溶剂含有 Br、I 等重原子以及 $-\text{NO}_2$ 或 $-\text{N}=\text{N}-$ 取代基,则对荧光是不利的,重原子核心周围的磁场促进了电子自旋的反转,使形成三重态的速率增加,从而导致荧光减弱(磷光增强)。

如果溶质分子在溶剂中离解或与溶剂形成化合物,荧光强度和荧光峰的波长都会改变。

混合溶剂对荧光产生重大作用。如一种溶质分别在两种不同的溶剂中均不发生荧光,但是在这两种溶剂的混合物中,有可能发生很强的荧光。因此,除选择适宜的溶剂外,还要求溶剂应达到足够的纯度。

2. 溶液的 pH 值对荧光的影响

溶液的 pH 值对荧光的影响较大,质子化很容易对 π -电子体系产生影响。分子的酸式或碱式的光谱有显著的差别,由于弱酸或弱碱分子和离子的电子构型不同,因而分子和离子的荧光光谱和荧光强度呈现显著差异。大多数芳香化合物有酸性或碱性取代基时,受 pH 变化的影响较大,如果弱酸或弱碱只有分子或离子能吸光和产生荧光,其荧光强度与 pH 的关系可绘制成曲线,由曲线上的半荧光强度求得该弱电解质的离解常数 $\text{p}K_{\text{a}}$ 。

分子的激发态也参与酸碱平衡,但其 $\text{p}K_{\text{a}}$ 值与基态的 $\text{p}K_{\text{a}}$ 值相差较大。当 pH 值大大偏离 $\text{p}K_{\text{a}}$ 值时,溶质分子和溶剂分子之间发生明显的质子交换,溶质把能量传递给溶剂,使荧光淬灭。也有一些溶质在酸性或碱性溶液中发生水解,发生环的破裂或链的断开,使荧光强度改变,这是不可逆的化学变化引起的荧光强度的变化,与 pH 值对荧光强度的影响有所区别。pH 的变化对金属络合物的荧光影响很大,可使络合物的组成改变或使其离解。

3. 溶解氧对荧光的影响

溶液中的氧分子对荧光的影响有以下几个方面:(1) 物质发生氧化导致荧光淬灭;(2) 处于基态的三重态能级的氧分子和激发单重态的溶质相碰撞,形成了单重激发态的氧分子和三重态的溶质分子,导致荧光淬灭;(3) 氧分子

<<<< -----

的顺磁性作用促使激发态溶质分子发生系间跨越跃迁而转换成三重态。研究表明,溶解氧几乎对所有的有机荧光物质都有不同程度的淬灭作用,对芳香烃尤为显著。溶解氧的淬灭作用随着溶剂的介电常数减小而增加。其他顺磁性气体对荧光淬灭也有相同的作用。

第 2 章

荧光分子探针基本原理

2.1 荧光分子探针(传感器)

荧光分子探针(传感器)是一种特殊的受激响应结构系统,其特有的受体结构在特定的刺激条件下(如黏度、温度、特定化学及生物物质等)能够改变荧光团的发光性质(如发射波长、荧光强度、寿命等),并且将产生的微观变化通过光学介质传递给人类感知系统。

2.1.1 荧光分子探针(传感器)的基本模型

完成荧光分子探针的整个传感流程,所设计的传感器必须具备下列基本结构:受体基团(acceptor unit)、信号单元(signal unit)以及二者之间的连接体(spacer)(图 2-1)。受体基团和信号单元通过共价键或金属配位键相连。当受体基团与待测物结合之后,会影响分子的光物理性质,并且通过信号单元的光谱变化表现出来,从而实现对待测物的检测。



图 2-1 荧光分子传感器的基本结构

荧光分子探针是众多分子器件中的一种。例如 Fe^{3+} 荧光传感器是通过一个荧光团和一个离子受体基团结合构造成的,离子受体基团能选择性络合 Fe^{3+} 形成 Fe -荧光团络合物,从而引起荧光强度的变化。到目前为止,各种材

料例如有机荧光染料、金纳米簇、金属有机结构体(MOFs),以及还原氧化石墨烯(rGO)被利用来做 Fe^{3+} 的荧光传感器。

分子识别和分子荧光技术是荧光分子探针技术应用所要具备的两个基本条件,目标分子被探针分子的识别部位(或称识别点)结合后通过传导机制将自身信息转换为可检测的荧光信号,随后通过解读荧光谱图判别所检测目标分子的信息。由于荧光分子探针技术能在单分子水平上进行在线和原位检测,能准确得到目标分子信息,并且有高灵敏度和低检测限,可用于医学上碱基和蛋白质的检测,所以荧光分子探针技术在生物学、医学、环境学等许多领域有广泛应用,对荧光分子探针技术的探索在不断进行^[9]。图 2-2 表示了荧光分子探针中化学传感器(chemosensors)和化学计量型荧光探针(chemodosimeters)的区别。

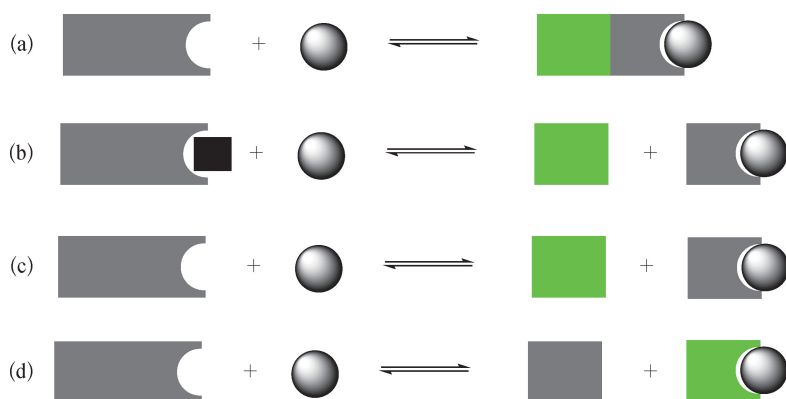


图 2-2 化学传感器(a)(b)和化学计量型荧光探针(c)(d)的作用原理

chemodosimeters 通常可理解为探针分子与目标分子发生反应,探针分子结构发生不可逆化学变化导致分子间共价键断裂,图 2-2(c)中,目标分子以共价键和探针分子中的一个或多个原子结合,随后一起脱离 chemodosimeters。图 2-2(d)中,目标分子与 chemodosimeters 配位结合并分离成两部分,与目标分子配位结合的部分发射荧光达到检测分析的目的^[10,11]。chemosensors 指的是探针分子和目标分子之间可逆的相互配位作用,产生实时(real time)的、可测量的信号^[12-14]。图 2-2(a)中,探针分子两个单元以共价键连接,随后配位一个选择性底物,发出光学响应。图 2-2(b)中,探针分子两个单元不以共价键连接,加入的目标分子和配位识别部分配位,探针分子中的荧光团(信号单元)

被目标分子替换释放出来,游离在溶液中发光^[15,16]。

2.1.2 荧光分子传感器的特点与发展

与传统检测方法相比,荧光分子传感检测技术具有以下优点:

- (1) 具有较高的灵敏度和良好的选择性。
- (2) 可以实现原位、实时检测。
- (3) 具有很好的时间、空间分辨性和较大的信噪比。
- (4) 成本低,设计的灵活性高。

这些优点可以大部分甚至全部集成在荧光传感器分子上,这使其在阴阳离子检测、生物分子检测、活体成像、环境监测等许多领域有着非常重要的潜在应用价值。

近年来,荧光发光材料在检测、成像领域的应用已受到广泛的关注与认可。2008年,诺贝尔化学奖授予了钱永健教授等人,以表彰其在绿色荧光蛋白及大量其他颜色的荧光蛋白体系的研究。这些多色的荧光蛋白标记技术让科学家能够用不同颜色对多种蛋白和细胞进行标记,从而实现了同时对多个生物学过程进行追踪的工作^[17]。在临床医学中,钱永健与其合作者也成功地在肿瘤切除的模拟手术中对肿瘤和包裹在肿瘤中的神经末端进行了双色标记。

2014年,诺贝尔化学奖授予在超高分辨率荧光显微镜工作中作出重大贡献的三位科学家:Eric Betzig、Stefan W. Hell 和 William E. Moerner。超高分辨率荧光显微镜同时在多个课题组被科学家们提出,它的诞生超越了普通光学显微镜的物理识别极限,哈佛大学的庄小威教授与前面的几位科学家同时开展了研究工作。与前面几位不同的是,庄小威课题组提出了使用有机小分子这种成本低、结构简单、尺寸较小的发光材料作为荧光蛋白这些发光大分子结构的替代品。图2-3为化合物1 Cy5和化合物2的形成及结构^[18],TCEP

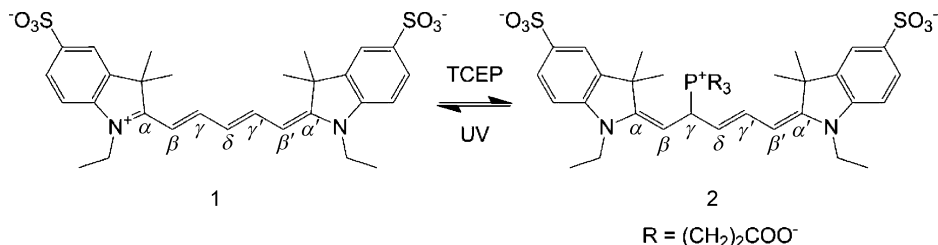
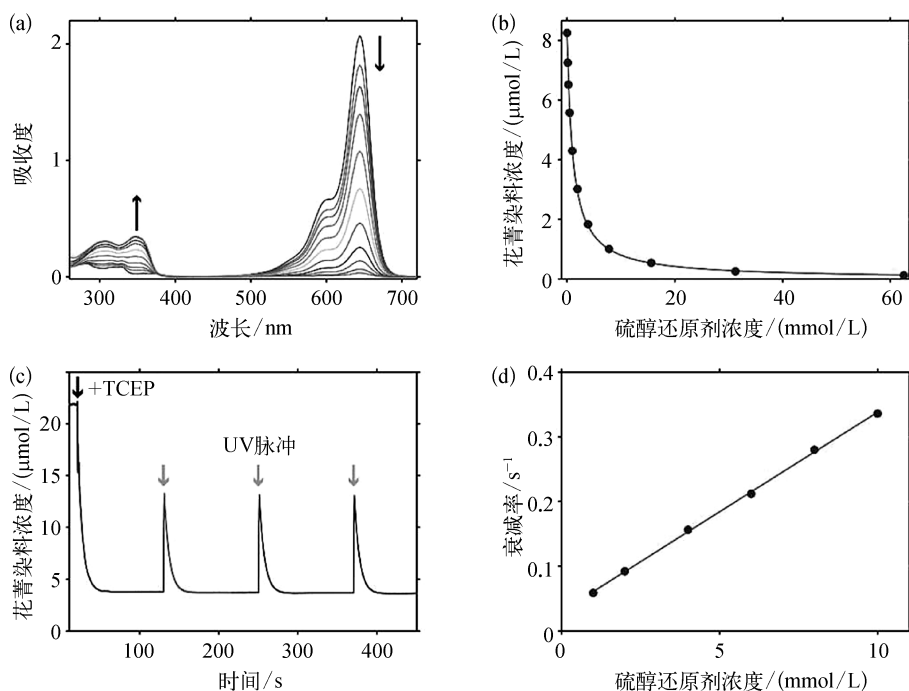


图2-3 化合物1和化合物2的结构式

与荧光染料 1 的 γ 位处发生 1,4-加成反应,生成共价化合物 2,在这个过程中发生荧光淬灭。用紫外光去照射,共价化合物 2 就会发生解离,重新变成荧光染料 1 的状态,TCEP 对荧光染料 1 的淬灭是可逆的(图 2-4)。



(a) Cy5 随 TCEP 加入的吸收光谱变化;(b) Cy5 随 TCEP 加入在 650 nm 处的吸收光谱线性变化;(c) Cy5 加入 TCEP 后随时间变化的吸收光谱强度;(d) Cy5 加入 TCEP 后随时间变化的吸收光谱强度线性变化

图 2-4 TCEP 对 Cy5 的淬灭是可逆的

2.1.3 分子探针的荧光团作为分析工具的应用

因为荧光检测的高敏感性和高选择性,随着空间和时间分辨方法的进步,以及光学纤维遥控传感的发展,建立在这个基础上的分析技术的应用日益广泛。当一个分析物是荧光的,通过荧光光谱仪在适当的激发和观察波长下,可实现荧光检测。许多领域的应用被报道,如空气、水、油、食物和药物污染的分析;工业过程的监控;临床监控;犯罪学等。分子探针荧光团作为分析工具主要的、直接的方法有:(1) 衍生化,即分析物和一个试剂反应产生一个荧光化合物,通常和液相色谱联合应用于荧光检测。这个方法通常被用在生物化学

和临床化学。(2) 通过分析荧光化合物的构成进行离子和分子识别。(3) 分析物和荧光化合物的碰撞导致荧光淬灭。这个方法特别适用于气体的检测, 例如氧气(溶解在水中或血液中)、 SO_2 、 H_2S 、 NH_3 、 HCl 、 Cl_2 、氯碳化合物等。所以荧光免疫检测是生物化学和生物医学应用中重要的方法之一。

2.1.4 最终时间和空间分辨

最终时间和空间分辨能力可达到飞秒、飞升、飞摩尔和单分子检测。自从激发态寿命第一次被 Gaviola 在 1926 年使用相位荧光计检测起已经有了很大的进步。通过脉冲和相位荧光计以及使用高重复率的皮秒激光和微通道板光电倍增管, 可实现几十皮秒的时间分辨。这样的时间分辨容易被光电倍增管所限制, 但不是被激光脉冲的宽度(50~100 fs, 即钛: 蓝宝石激光)所限制。通常时间分辨用条纹相机能被减少到几皮秒。要得到一个更好的时间分辨(100~200 fs), 需要大力发展荧光转换的最新技术, 而若想得到更好的空间分辨, 共聚焦或者双光子激发荧光光谱仪是一个较有前景的发展方向。

2.2 荧光分子探针(传感器)的作用原理

荧光分子传感原理很复杂, 科研工作者经过探索研究, 已经揭示了一些机理, 并得到了实验验证, 且在研究领域不断深入发展。

2.2.1 分子激发态反应动力学

光化学反应中, 分子激发态的特点是能量高、寿命短、初始反应速度快, 针对不同的分子激发态, 分子激发态反应动力学的研究也有不同的方法。

激发态能量为中等微扰(perturbation), 测定方法为竞争(competitive)测定, 属于光化学稳态反应动力学研究的范围, 可用荧光淬灭法, 采用斯顿-伏尔莫公式即式(2-1)来分析研究。

$$\frac{F_0}{F} = \frac{\gamma + k_q[Q]}{\gamma} = 1 + k_q\tau_0[Q] \quad (2-1)$$

以 F_0/F 为 Y 轴, 以 $[Q]$ 为 X 轴作图, 可得一线性直线。通过直线斜率和

激发态寿命可以得出 k_q 值(淬灭速度常数), k_q 值可以判断在激发态淬灭过程中, 激发态分子和淬灭剂分子两者之间的反应效果。如图 2-5 所示, 如果激发态分子和淬灭剂分子之间为碰撞淬灭(collisional quenching), 则图中线性关系的斜率随温度的升高而增加, 两者之间受扩散过程控制。如果两者之间发生能量共振转移, 则为静态淬灭(static quenching), 图中线性关系的斜率随温度的升高而减小, 激发态分子和淬灭剂分子之间的轨道重叠度减小^[19]。

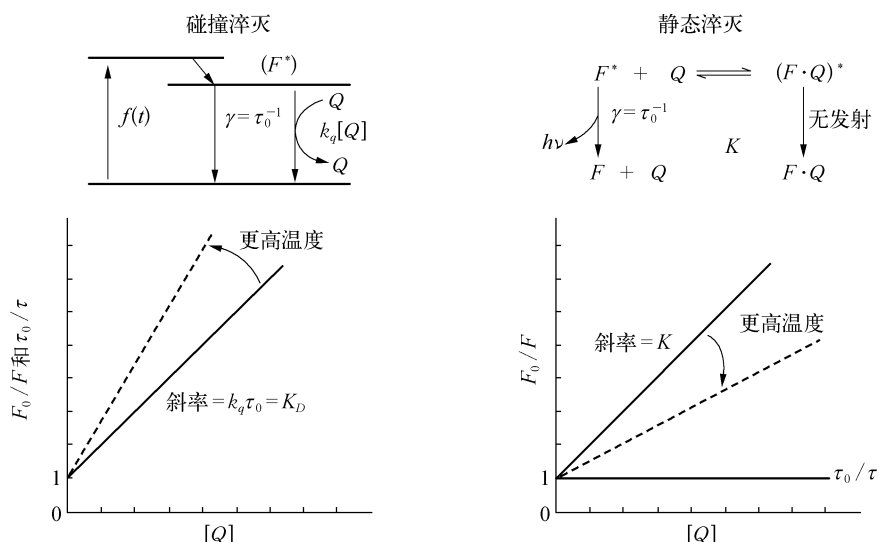


图 2-5 碰撞淬灭和静态淬灭

激发态能量为强烈微扰, 测定方法为实时测定, 属于光化学瞬态反应动力学研究的范围, 可采用闪光光解法来分析研究。闪光光解技术以激光为激发光源, 以脉冲氙灯为检测光源, 时间分辨能力达到飞秒级别^[20]。

在实验方法上, 分子动力学过程用时间分辨光谱表征, 慢于纳秒尺度的磷光发射、三重态能量转移等过程用纳秒时间分辨光谱技术研究, 纳秒量级的荧光发射、内转换等超快过程用光源为飞秒激光器的时间分辨光谱技术研究。

2.2.2 分子激发态能量转移

激发态与基态或激发态与激发态之间能量能够发生迁移。在凝聚介质(刚性和液体溶液)中研究的是电子能量转移过程, 过程的转移时间在飞秒(10^{-15} s)到毫秒(10^{-3} s)之间, 距离在 $1 \sim 100$ Å 之间。能量转移反应为 $D^* +$

$A \longrightarrow D + A^*$, 其中 D^* 表示能量给体(donor), A 表示能量受体(acceptor)。有如下几种机制:

(1) 辐射机制: A 的吸收带与 D^* 的发射带有较大重叠, A 吸收 D^* 发射的光, 按照辐射机制进行的能量转移与给体和受体之间的直接相互作用无关, 不受介质黏度影响, D^* 的荧光寿命不改变。

(2) 无辐射机制: 包括库仑转移机制和电子交换转移机制, 如图 2-6 所示, 库仑转移机制又称为 Förster 理论[图 2-6(a)], 是偶极-偶极能量转移过程。激发态分子产生跃迁偶极矩, 通过库仑能量转移极化基态分子成激发态, 这种能量转移过程是长程能量转移, 其 D^* 和 A 之间的距离可达几个纳米, Förster 能量转移有两种不同的形式, 分别是通过空间传输能量和通过共价键传输能量。Förster 能量转移机理不同于分子内电荷转移机理和光致电子转移机理, 它的相互作用发生在分子内或分子间的两个发色团之间。两个发色团各自拥有独立的吸收和发射性质, 在它们之间完成能量转移必须具备两个条件: 一是给体的发射光谱与受体的吸收光谱要相互重叠, 而且重叠的部分越多, 能量转移的效率就越高; 另一个是给体、受体之间的距离在一定范围之内^[21]。

电子交换转移机制又称为 Dexter 理论[图 2-6(b)]。该能量转移过程要求前线轨道重叠, A 的 LUMO 轨道接受 D^* 的 SOMO 轨道的电子, 同时 A 的一个 HOMO 轨道电子跃迁到 D^* 的 SOMO 轨道上, 生成 A^* 和 D , 这要求 D^* 和 A 之间的距离小于 1 nm, 是短程能量转移。

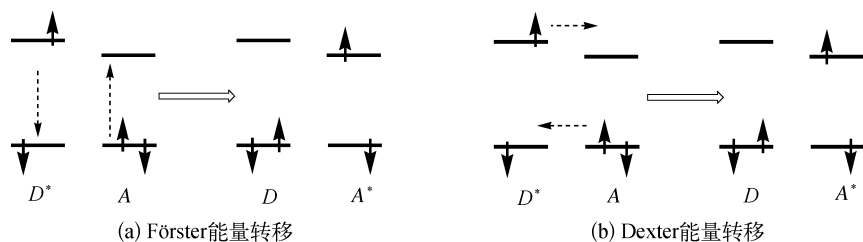


图 2-6 无辐射机制

能量转移过程需要符合自旋守恒定律, 当 $E_{D^*} > E_{A^*}$ 时, $D^* \rightarrow A$ 被允许, 当 $E_{D^*} < E_{A^*}$ 时, $D^* \rightarrow A$ 禁阻^[22]。

(3) 超交换机制: 能量转移通过键进行超交换相互作用, 一般要求 5 个 σ 键的距离。超交换机制不同于 Dexter 理论和 Förster 理论, 因为根据 Dexter

理论中转移速率常数与距离 R_{DA} 呈指数衰减的原则,不可能有能量给体和受体之间前线轨道的直接重叠,不符合 Dexter 模型;而根据 Förster 理论中转移速率常数与距离 R_{DA} 成反比的原则,速率常数大于 Förster 公式计算的速率常数,不适用 Förster 模型。某些文献中报道的含有双发色团的分子,如果连接给体和受体发色团的桥是刚性的,那么通过键进行超交换作用的影响就较大。

(4) 激子转移机制:能量给体和受体之间发生强耦合或强相互作用,激发态在整个体系上呈离域状态分布,称为激子态,引起的能量转移称为激子转移。许多染料和二聚体和生物蛋白大分子中存在这种机制的能量转移。

2.2.3 荧光共振能量转移

荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer, FRET)遵循无辐射机制,分子中存在能量给体和能量受体,在光照下,激发态的能量给体通过偶极-偶极作用以无辐射机制将能量转移给基态的能量体。

图 2-7 中给体通过 FRET 过程回到电子基态,而受体可能会发射荧光(也有可能荧光淬灭)。FRET 过程受以下条件影响:受体和给体之间的距离、给体发射和受体吸收之间的光谱重叠范围、给体发射偶极和受体吸收偶极之间的相对定位,其中受体和给体之间的距离要大于两者的碰撞距离(达到长程能量转移),才能符合无辐射能量转移机制产生 FRET 过程^[23]。

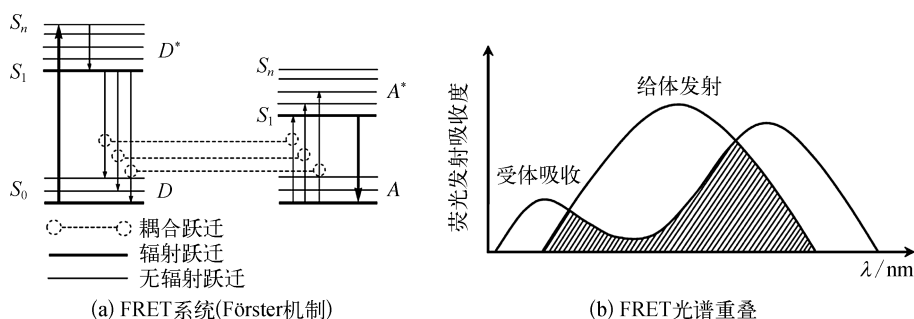


图 2-7 FRET 系统(Förster 机制)和 FRET 光谱重叠

Acikgoz 组^[24]报道了 BODIPY 染料分子的荧光动力学机理。在水凝胶结构基础上,BODIPY 染料分子与聚乙二醇共价络合,在不同浓度下,采用皮秒时间分辨光谱技术进行实验。由于水凝胶结构能吸收大量水而膨胀,不分解

不变形, BODIPY 染料之间的距离就能可控变化, 能观察到定位于水凝胶网络的高浓度给体染料分子荧光寿命从 2.03 ns 变到 7.14 ns。计算表明, 受水凝胶网络限制的 BODIPY 染料分子服从 Förster 能量转移。如果水凝胶是干的, 给体和受体的距离最小为 4.59 nm, 由于染料分子的偶极-偶极相互作用, 近距离引起荧光强度减小, 能量转移效率是 72%。当水凝胶膨胀分离增加时, FRET 效率减少到 2%, 相应地, 在 BODIPY 染料之间有 10 nm 的分离, 引起荧光强度增加。而在稀释的水凝胶样品中, 染料分子的距离比 Förster 距离更大, 稀释样品的能量转移效率更低。

FRET 型探针的设计比 PET 型探针和 ICT 型探针简单, 更适合应用于生物大分子及超分子组装结构的研究。如图 2-8 所示。通过共价键传输能量的分子, 有传输速度快、损失小的特点。设计的探针一般由两个或多个荧光团相连, 当受体识别检测物之后, 传输能量受阻或者增强会使荧光性质发生变化。

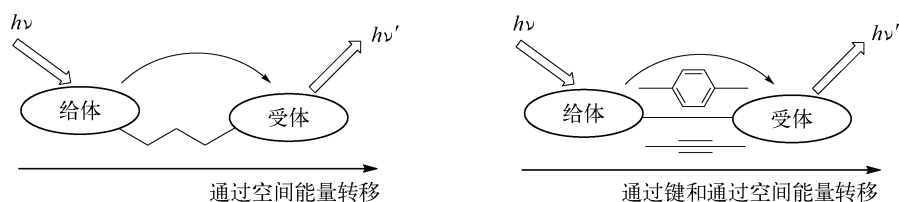


图 2-8 FRET 型化学传感器的工作原理

另一个 FRET 模型如图 2-9 所示, 近红外荧光探针 15 具有吡啶和罗丹明 B 这一对给受体荧光团^[25], 该化合物与铜离子发生络合反应生成化合物 16

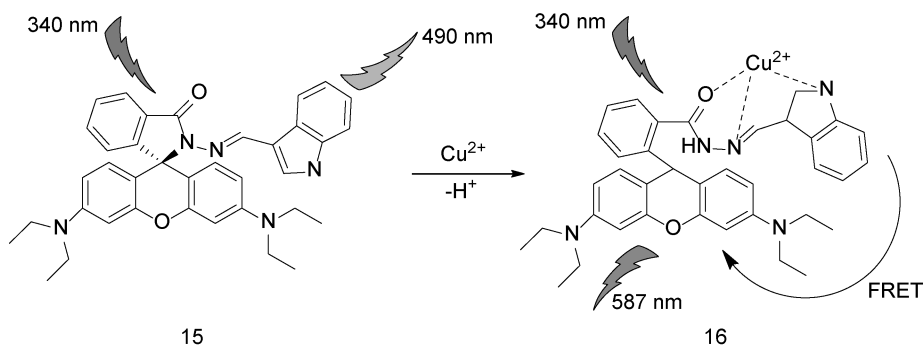


图 2-9 基于 FRET 机理的荧光探针 15 与铜离子发生络合反应生成化合物 16

16. 这一识别过程中, 由于 FRET 作用的调制, 探针 15 可以在 490 nm/587 nm 双通道里输出比率荧光信号, 并且可以直接观察到颜色和荧光的改变。

2.2.4 分子激发态电子转移

1. 分子激发态电子转移机制

电子转移过程是指电子由给体向受体转移的过程。电子转移发生在各种体系中, 过程的转移时间在飞秒(10^{-15} s)到秒(s)之间, 距离在几埃(Å)到几十埃之间。根据状态电子转移分为基态电子转移和激发态电子转移, 如图 2-10 所示, 激发态比基态更容易发生电子转移。

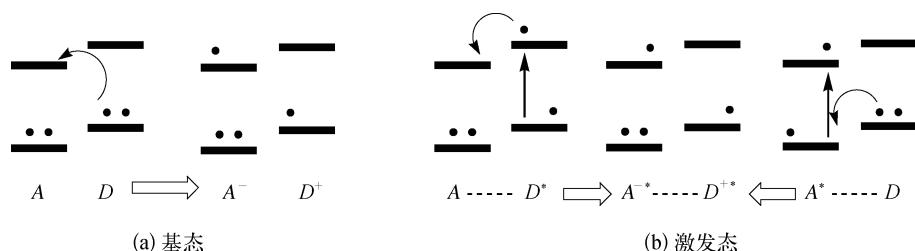


图 2-10 基态与激发态的电子转移

2. 电子转移反应动力学理论模型

电子转移反应动力学理论的经典模型为 Marcus 理论模型, 式(2-2)为 Marcus 理论电子转移反应速率常数公式:

$$k_{et} = \frac{1}{2\pi} \sqrt{f/\mu} \exp \left[-\frac{(\lambda + \Delta G_0)^2}{4\lambda kT} \right] \quad (2-2)$$

Marcus 理论是 Marcus 于 20 世纪 50 年代后期创立的经典理论^[26], 在 1984 年由 Miller 等验证了理论中电子转移反应反转区的存在, 实验中化合物为“给体-桥-受体”结构, 其中电子给体不同, 电子受体(联苯)和桥(甾族化合物骨架)相同^[27], 见图 2-11(Rudolph A. Marcus 获 1992 年诺贝尔化学奖)。

Marcus 模型的缺点是没有考虑量子隧道效应, 不适用于高温低频和低温高频的条件, 适用于电子转移因子 $\kappa_{el} = 1$, $\Gamma_n = 1$ 的情况 (Γ_n 为核隧道效应因子)。量子力学模型适用于所有情况, 当考虑量子隧道效应时, 电子转移的动力学研究采用量子力学模型, 但是计算上比较困难, 只用于低温高频 $h\nu \gg kT$

的情况,而非经典模型适用于 $\kappa_{\text{el}} < 1$ 的非绝热电子转移反应。

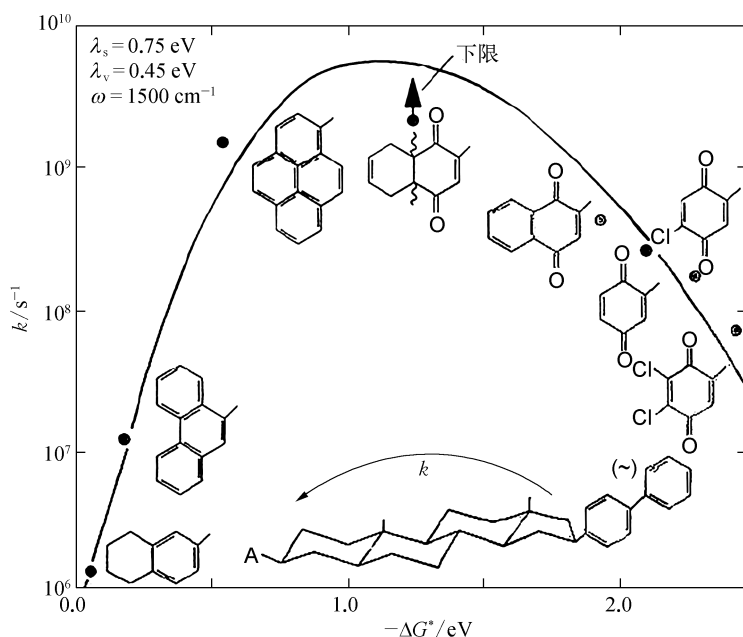


图 2-11 Marcus 理论的实验验证

2.2.5 光诱导电子转移

光诱导电子转移(photoinduced electron-transfer, PET)过程即为电子受体(或给体)受光照激发与电子给体(或受体)发生的电子转移,分别形成阴、阳离子自由基。阴离子自由基中电子受光照激发留出的空轨道被阳离子给出的电子占据,受光照激发的电子无法直接跃迁回到原轨道而导致荧光淬灭,分子处于“关”响应(turn-off)状态。当电子给体结合被识别的底物后,受光照激发,电子给体形成的阳离子自由基的给电子能力下降,氧化电势升高,不能还原电子受体形成的阴离子自由基,PET 过程被禁阻,阴离子自由基中受激电子跃迁回基态而发射荧光,分子处于“开”响应(turn-on)状态。

如图 2-12 所示,(a)中没有结合的被识别基团的 HOMO 能级作为电子给体,有效淬灭探针的荧光;(b)中在底物配位情况下,由于和阳离子物种的静电作用,识别基团的 HOMO 能级下降,PET 过程禁阻^[28]。

PET 过程的发生可由以下几种方法判断:

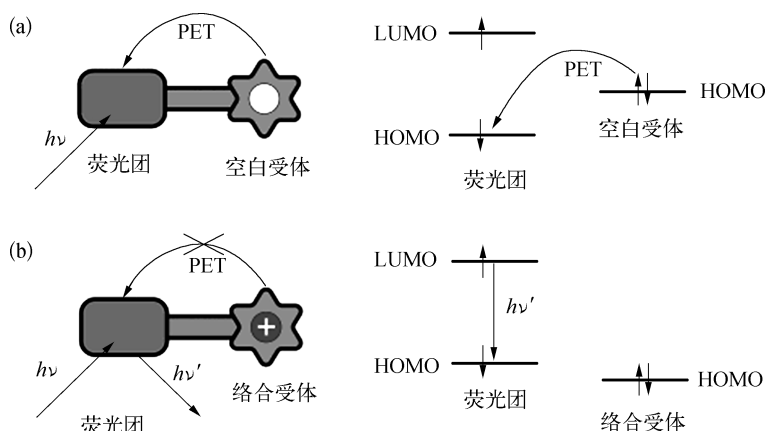
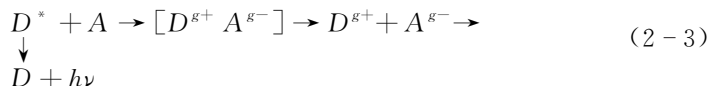


图 2-12 荧光分子探针 PET 机理

(1) 由荧光猝灭判断电子转移,如式(2-3):



其中 $[D^{g+} A^{g-}]$ 为激基复合物(exciplex),可在长波长处观察到发光。

(2) 由光照前后体系电导变化判断电子转移。测定光照前后溶液的电导率可以判断是否发生了分子间的光诱导电子转移,因为根据有机溶液的介电常数,溶液在光照前电导率小,光照后电子转移生成离子自由基,溶液电导率增加。

(3) 通过荧光淬灭常数判断电子转移。电子在给体和受体之间的转移与两者的距离有关,而距离与体系中物质的扩散过程有关,淬灭常数与扩散常数接近,可通过扩散常数判断电子转移,扩散常数由德拜方程(Debye 方程)获得:

$$k_{\text{diff}} = 8RT/3\,000\eta(1/\text{mol} \cdot \text{s}) \quad (2-4)$$

(4) 由氧化还原电位判断电子转移,Rehm - Weller 公式为

$$\Delta G = E(D/D^+) - E(A^-/A) - \Delta E_{0,0} - e^2/\alpha\epsilon \quad (2-5)$$

$E(D/D^+)$ 为电子给体氧化电位, $E(A^-/A)$ 为电子受体还原电位, $\Delta E_{0,0}$ 与光照有关, $\Delta E_{0,0}$ 的引入使 $\Delta G < 0$ 更容易实现,从而由 Marcus 理论可判断,随着 ΔG 作为负数的绝对值增大,电子转移速率先增大后降低。

在荧光分子传感器的调控模式中有一类开关型输出模式,即 Fluorescent Switch。这种荧光探针的识别过程具有两种明显的始末状态,即荧光“开”响应和荧光“关”响应。这种荧光探针的传感机理基本上都是基于光致电子转移机理的。光致电子转移机理的实现,需要荧光团、受体及连接体这三个部分。通过具有一定长度的连接体,将吸收光能和发射荧光的荧光团和能够与客体结合并产生信号的受体连接起来,使荧光团与受体可以实现前线轨道上的电子传递,从而实现光致电子转移机理。基于 PET 机理的化学传感器的基本工作原理如图 2-13 所示。

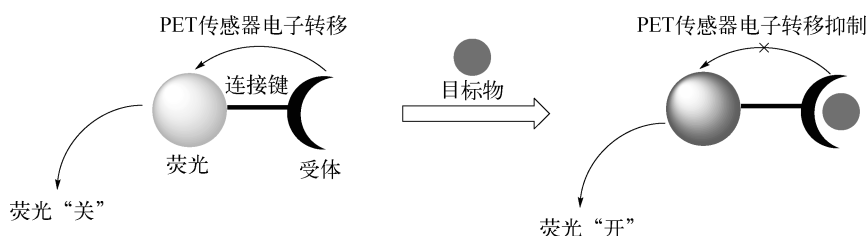


图 2-13 基于 PET 机理的化学传感器的工作原理

PET 过程一般分为两种过程,分别是 d-PET(donor-excited PET)过程和 a-PET(acceptor-excited PET)过程。

d-PET 过程即电子给体向荧光团的 PET 过程(图 2-14),受体的 HOMO 轨道介于荧光团前线轨道之间,受体向荧光团的电子转移,受体被还原,荧光团被氧化,且没有荧光发射。a-PET 过程就是荧光团向电子受体的反向 PET 过程(图 2-15),受体的 LUMO 轨道位于前线轨道之间,荧光团的电子向受体传递,受体被氧化,荧光团被还原,因此没有荧光发射。

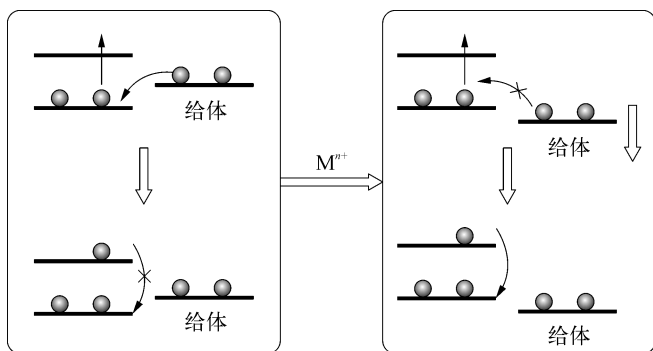


图 2-14 d-PET 型传感器的前线轨道理论

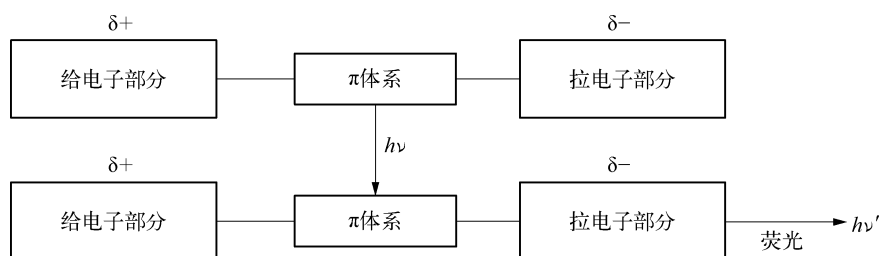


图 2-17 ICT 共轭体系发光机理

charge transfer, ICT)态, ICT 态荧光峰表现出扁平状宽峰, 由整个 ICT 体系贡献, 在推拉电子部分之间有电子跃迁, 整个分子结构中电子云分布较稀疏, 偶极距受溶剂极性影响, 在极性溶剂中能稳定存在; (3) 扭转分子内电荷转移 (twisted intra-molecular charge transfer, TICT) 态, TICT 态可以认为是由电荷转移到电子转移的一个中间态, 分子中强推、拉电子基团使分子具有强电荷转移能力, 能引起电子转移, 使分子结构中的推拉电子部分扭曲成正交平面, 等同于电子给体通过 σ 体系与电子受体作用的 PET 过程, 分子发生自去耦现象, 引起分子内荧光自淬灭。

Hu 组^[31]研究了在溶液和聚集态下由推电子和拉电子基团组成的 BODIPY 衍生物的光谱性能, 由于 LE - TICT 的跃迁, 荧光团有溶致变色效应, 通过改变溶剂极性, 发射从可见到近红外是可调的, 在非极性溶剂中, 荧光团的荧光光谱和 LE 态发射有关; 在极性溶剂中, 荧光团的荧光光谱和 TICT 态的弱红外发射有关, 不良溶剂(水)大量加入荧光团的溶液中, 导致 BODIPY 分子聚集, AIE 过程增强了 TICT 发射。在溶液的 TICT 过程中, 分子内旋转降低了发射效率, 颜色红移; 而在聚集态的 AIE 过程中, 分子内的旋转被限制, 周围环境极性减小, 发射效率增加, 颜色蓝移。

如图 2-18 所示, 曲线 1 到 8 分别代表 dioxane/water: 100 - 40/0 - 60, DMABE [p -(dimethylamino) benzethyne, 4-二甲氨基苯乙炔] 的荧光最大发射波长在 355 nm 随溶剂比例变化的梯度变化。

此发射为荧光团的 LE 态发射。随着溶剂极性变大, 光谱轻微红移, 荧光量子产率有很大下降。与 DMABE 不同, DMABN (p -dimethylaminobenzonitrile, 4-二甲氨基苯甲腈) 在荧光光谱上产生两个带, 对应于 LE 态的 350 nm 的发射有溶剂诱导的小程度 Stokes 位移。DMABN 在二氧六环溶液中的 425 nm 的宽峰是 ICT 峰, 随着溶剂极性变大, 光谱红移^[32]。

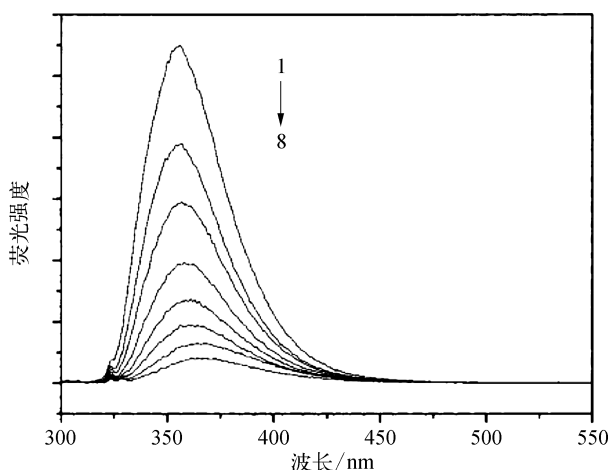


图 2-18 DMABE 在混合溶剂(dioxane-water)中的荧光光谱

分子内电荷转移是复杂共轭有机分子中存在的一种普遍现象,现阶段主要的电荷转移理论有:扭转分子内电荷转移模型(twisted intra-molecular charge transfer, TICT)、平面分子内电荷转移模型(planar intra-molecular charge transfer, PICT)、重杂化分子内电荷转移模型(rehybridized intra-molecular charge transfer, RICT)等。一些简单的分子内电荷转移分子只有受体或者给体中的一个,图 2-19 是 ICT 型化学传感器的结构。

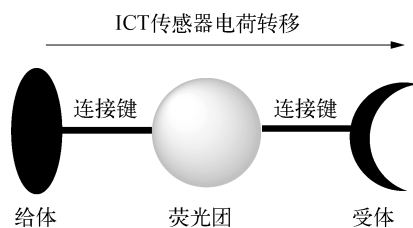


图 2-19 ICT 型化学传感器的结构

ICT 型化学传感器对被测物质的检测,主要是针对给体或者受体而进行特别设计得到的。给体和受体的推、拉电子能力在识别过程中会发生变化,从而引起电荷转移程度的改变,进而使荧光发射波长产生移动(图 2-20)。比率

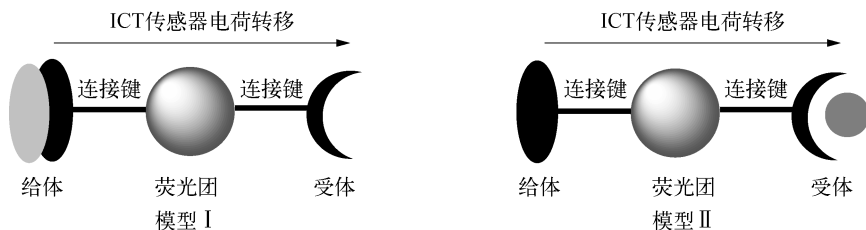


图 2-20 ICT 型化学传感器的工作原理

型荧光探针,即可以同时在两个不同的波长处发生荧光变化的探针,就是利用 ICT 的机理设计得到的。比率型探针对于位于两个不同波长的荧光发射强度进行比值计算,计算出的比值不会受到探针实际浓度变化的影响。

通过探针与被分析物的反应直接改变荧光团的共轭状态,可以最大限度地改变光谱特性。如李振教授等人^[33]利用氰化物特殊的亲核性,设计合成得到了比率型荧光比色探针 11(图 2-21),该探针是通过 π -共轭键相连接设计而形成的 ICT 探针分子。加入阴离子 CN^- 后,打断了探针分子拉电子部分与荧光团主体部分的共轭,缺少了拉电子部分的 ICT 作用,导致峰位置发生很大的蓝移,其荧光光谱和吸收光谱蓝移均达到了 90 nm。

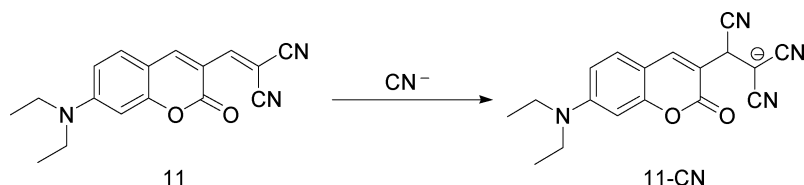


图 2-21 荧光探针 11 的结构及其识别过程

通过同样的设计策略,可以用 7-氨基香豆素来合成 α, β -不饱和酮并作为中间体,再通过 Michael 亲核加成反应,最终合成得到荧光探针 12(图 2-22)^[34]。该探针是一个快捷的比率型荧光探针,可用于谷胱甘肽的检测,其不饱和结构可以与谷胱甘肽发生快速的亲核加成反应。

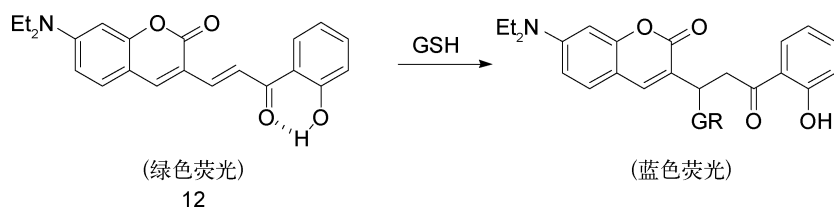


图 2-22 荧光探针 12 的结构及其识别过程

强 ICT 性质的 1,8-萘二甲酰亚胺可作为小分子荧光团加以利用,荧光探针 13 和荧光探针 14 是通过在其 4 位引入给电子单元而衍生出来的新的氮杂冠醚(图 2-23)。该荧光探针与钙离子有很强的亲和力,可以选择性识别钙离子^[35]。

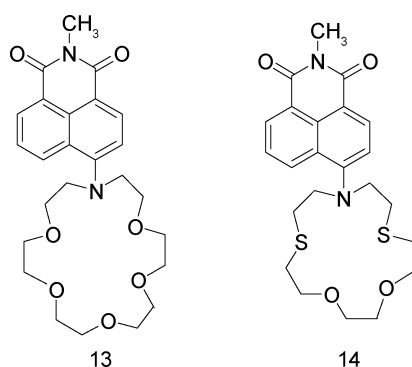


图 2-23 荧光探针 13 和荧光探针 14 的结构

2.2.7 激基缔合物与激基复合物

激基缔合物是分子的基态和同类分子的激发态碰撞后发生电荷转移,按比例形成的激发态络合物。随着溶液浓度的增加,激基缔合物的荧光在长波处出现强发射峰,与原发光峰同源,互为依存,可看到等发光点,并且受溶剂极性影响小,有更大的稳定性,对能量传递、淬灭、三重态湮灭等过程有很大影响,在光化学反应中能影响反应机理和产物结构。激基复合物是不同种分子的基态和激发态碰撞形成的络合物,极性大,受溶剂介电常数的影响大,在长波长处的发射峰在弱极性溶剂中存在。

Mula 组^[36]报道了激基复合物在长范围电子能量转移(EET)中作为桥联,激基复合物的构成影响给体中心的结构变化,随后引起连接键的第二次改变。因为激基复合物的荧光寿命是前体局域激发态的荧光寿命 7 倍多,所以结构改变可以保证第二次光化学反应通过激发态的辐射或者非辐射失活,因此,激基复合物可被用于提高 EET。BODIPY 分子激发单线态失活机理如图 2-24 所示, $^1\text{Bod} \sim \text{PhNHR}$ 经过短范围能量转移很快失活,而形成 $^1\text{Bod} \sim \text{PhNHR} \sim \text{XBod}$ 后为长范围能量转移,提高了荧光寿命。

2.2.8 光诱导质子转移

质子转移是重要的超分子核重排之一,在光诱导氧化还原反应中发生,在生化过程的某些步骤如酶水解反应、呼吸过程中有重要意义。激发态分子质子转移的推动力取决于 pK_a 值的范围,含不稳定质子的激发态分子的 pK_a 值上下波动差可达 8 个数量级。理论上可用 Förster 循环来估算 pK_a 值,但受

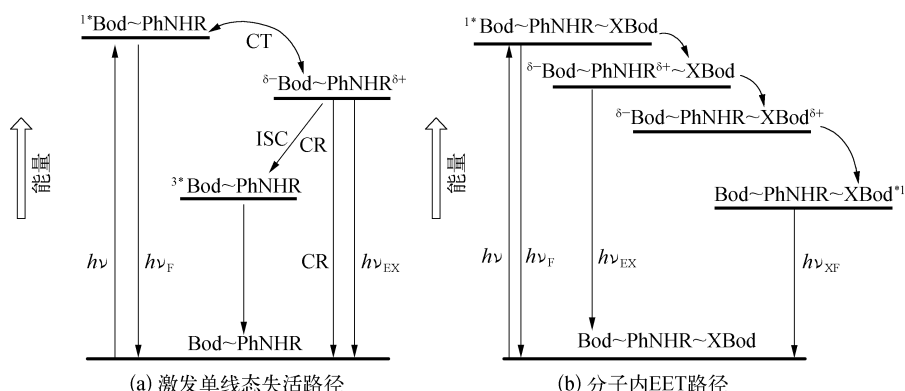


图 2-24 BODIPY 分子激发单态失活机理

该理论局限性的影响。

Ding 组^[37]报道了光脱羧反应研究。如图 2-25 所示, $S_{CT}(^1\pi\pi^*)$ 是分子内质子转移的前体状态, 引发超快脱羧反应。分子内质子转移(激发态)和脱羧过程用不同步的协调方法进行。 S_{CT}/S_0 的交叉、电子转移、基态可逆质子转移对最终产物的形成起到了重要作用。

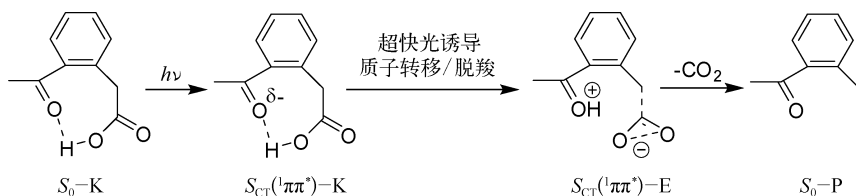


图 2-25 分子内质子转移

激发态分子内质子转移(excited state intra-molecular proton transfer, ESIPT), 是指当探针分子受光激发后, 发生在激发态分子内部邻近的质子给体和受体之间的质子转移的反应。ESIPT 效应是生物过程中质子的基本转移方式, 广泛存在于自然界中。该机理是 1974 年 Frolov 教授通过在醇溶液中观察到了 3-羟基黄酮的双荧光现象而发现的, Sengupta 和 Kasha 针对这种现象提出了 ESIPT 理论。

2.3 荧光分子探针结构及各部分的作用

荧光分子探针由三部分组成(图 2-26), 即报告器部分(reporter)、桥联部

分(relay)和接受器部分(或称分子识别部分, recognize)^[19,38], 这三部分也称为3R。接受器部分用于识别目标物种, 通过桥联部分将目标物种的信息传递到报告器部分, 报告器部分以某种表现形式(如荧光增强)将目标物种信息表示出来。

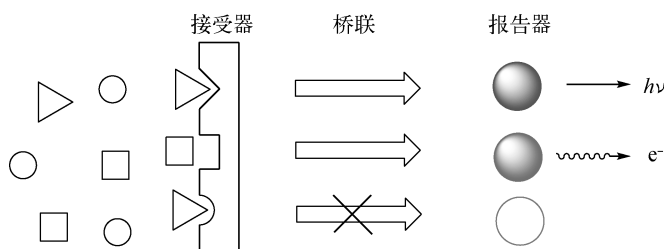


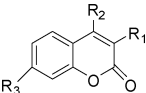
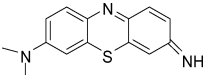
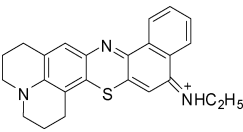
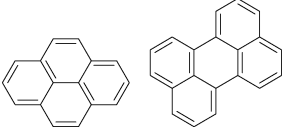
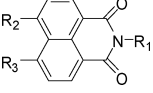
图 2-26 3R 结构及作用示意图

第 3 章

有机小分子功能荧光染料

有机小分子功能染料结构稳定,修饰容易,因其特定结构而大多数都有荧光信号,所以可作为荧光分子传感器的荧光信号源(荧光团),表 3-1 为目前可以作为荧光分子传感器的荧光信号源的名称和分子结构式。

表 3-1 有机小分子功能荧光染料的名称和分子结构式

序 号	荧光团种类名称	荧光团代表性结构
1	香豆素类	
2	噻嗪类	
3	噁嗪类	
4	芘、花类	
5	萘酰亚胺类	

续 表

序 号	荧光团种类名称	荧光团代表性结构
6	咕吨类	
7	花菁类	
8	四吡咯基类	
9	稀土配合物类	
10	量子点型类	
11	罗丹明(Rhodamine)类	
12	氟化硼二吡咯(BODIPY)类	

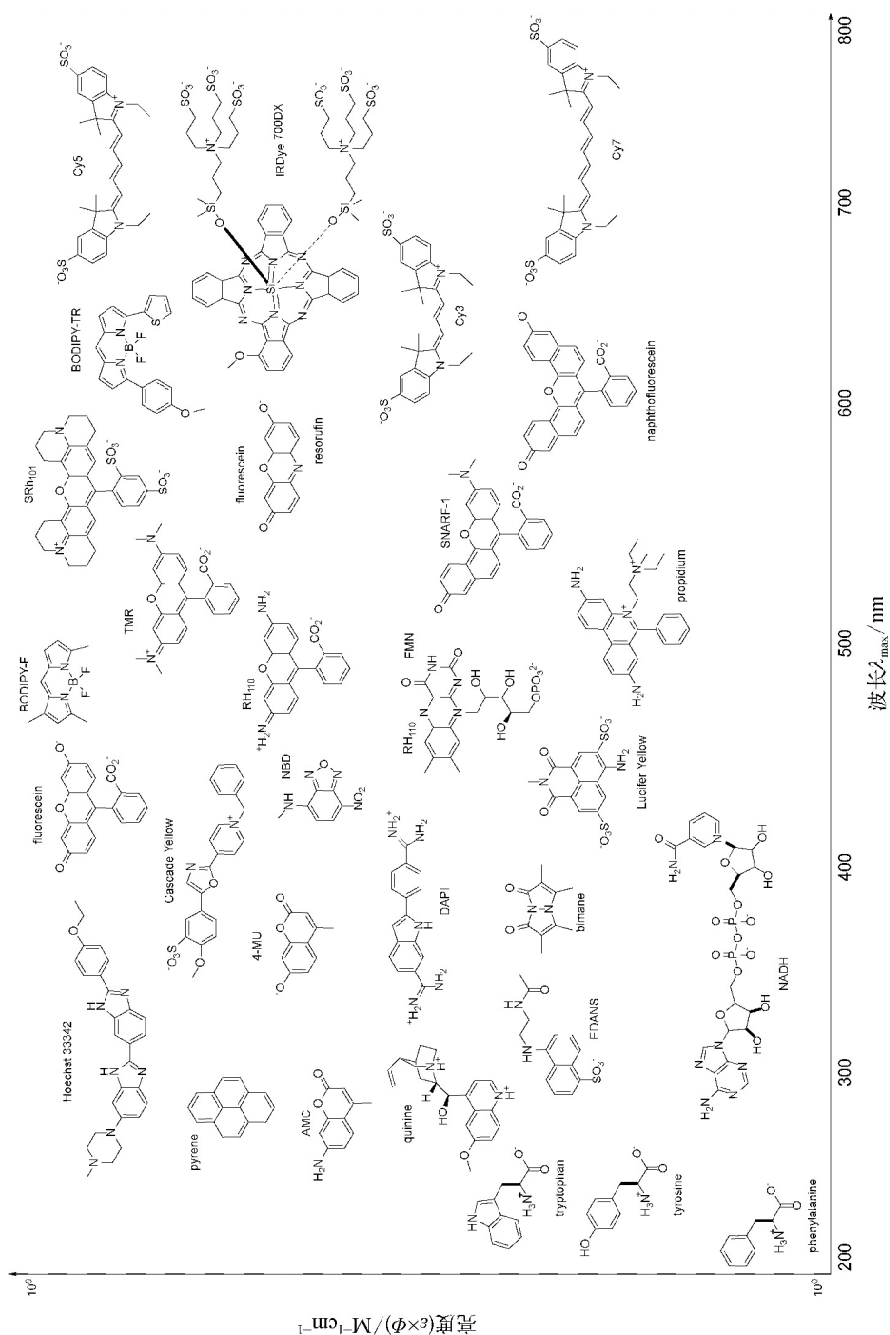


图 3-1 常见荧光团一瞥图

3.1 氟化硼二吡咯甲川类

在众多的荧光分子探针中,氟化硼二吡咯甲川类染料(Boradiazaindacenes-difluoro-bora-dipyrro-methenes, Boron-dipyrrolemethene,缩写为 BODIPYs, BDPs, BODIPY)是应用较为广泛的一类荧光基团,其结构为通过硼桥键和甲川桥键所固定的两个吡咯环,整体在同一个刚性平面上,从而有很强的荧光发射性。除了具有较好的光稳定性、较高的摩尔吸光系数和荧光量子效率高等优势外,通过修饰其结构可将吸收、发射波长调至近红外区域,同时其结构不容易受到 pH 等外界因素的干扰。BODIPY 染料由 Treibs 和 Kreuzer 在 1968 年首次报道^[40],图 3-2 中为 BODIPY 染料最基本的结构,每个吡咯碳原子都有可能受到亲电进攻,从而增加合成的难度。

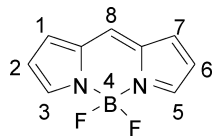


图 3-2
BODIPY 的结构

在发现 BODIPY 染料的随后十年中,因为向该染料结构中引入活性基团或对其进行修饰有一定的难度,所以 BODIPY 染料并没有引起研究者的广泛关注,也没有相关的文献报道。直到 1977 年,Pardeon 等^[41]对含有不同取代基的 BODIPY 染料的光谱性质进行了系统的研究。1985 年,研究者在 BODIPY 染料母体结构 2 位上引入磺酸基,合成了磺酸钠盐形式的水溶性染料,从而认识到 BODIPY 染料结构可以引入合适的基团。1988 年报道了 50 余种新型的 BODIPY 染料,其中有两种发射波长大于 600 nm,1995 年发现发射波长大于 700 nm 的 BODIPY 染料。

目前报道的 BODIPY 染料荧光分子探针的优点如下:(1) BODIPY 染料有高的消光系数 $[70\,000 \sim 80\,000 (\text{mol/L})^{-1} \text{cm}^{-1}]$,能容易地用官能团修饰;(2) 通过简单地修饰,吸收峰能移到比可见光与近红外光波长更长的波段,保持宽的吸收有效截面;(3) BODIPY 染料在电荷的重新分配上内部不对称,在激发下产生 $S_0 - S_1$ 跃迁,增加了在 meso-C 上的电荷密度,而在其他位置相应的电荷密度降低,电荷密度能精确地定位在 meso-C 上,使之成为电荷注入的最理想的位置;(4) 通过对激发态的定向观察,能够更准确地设计拉电子基团和推电子基团的取代位置;(5) BODIPY 核有相对温和的氧化还原电势,这是设计建立在电子转移过程上的荧光开关的必要条件;(6) BODIPY 染料对

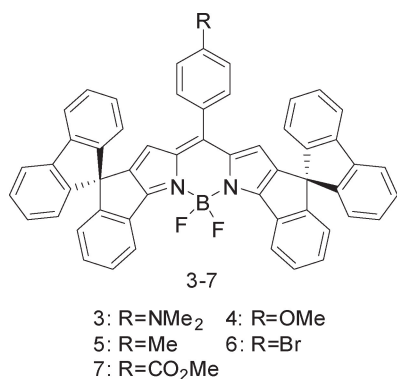
光热稳定,受环境如溶液 pH 等因素影响小。

由于具有上述优点,BODIPY 染料衍生物作为荧光探针的研究近年来有了很大进展^[42,43]。在最近的几年里,文献报道了大量 BODIPY 类衍生物的化学传感器,研究人员将 BODIPY 染料和不同识别基团组合,设计合成了各种荧光分子探针。BODIPY 类衍生物作为一种重要的分析工具逐渐进入环境学、生命科学等领域。但是,研究发现基于 BODIPY 染料的荧光探针还有一些关键问题需要解决:一是要能适用于近似生物环境的水溶液体系,并且有高选择性和高荧光量子产率;二是荧光波长最好可以近红外,因为在分子影像领域应用中,对生物体进行实时、原位测试时,近红外波长能减少对细胞的损伤,同时能减少背景荧光的干扰。

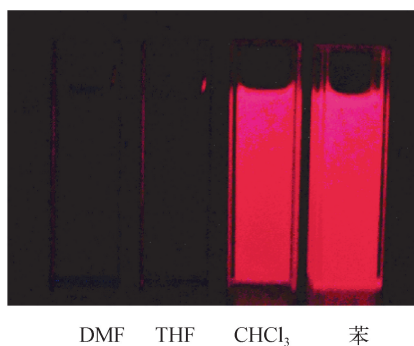
研究者从各个角度探索与 BODIPY 染料有关的有机分子,试图在众多的研究结果中找到 BODIPY 类有机荧光分子探针之间的某种联系,进而探索设计荧光分子探针的一些思路。

1. 溶剂极性对 BODIPY 类荧光分子探针的影响

研究发现 BODIPY 染料的最大吸收峰很少受取代基 R 的电子性能影响,发射波长也很少受其影响。但是图 3-3(a)的 BODIPY 染料在 THF 溶液中有强且尖锐的 627~641 nm 吸收带,最大发射峰在 636~652 nm。因为受螺旋荧光团的限制,BODIPY 核的刚性增加,激发态的非辐射衰退减少,荧光量子产率增加,吸收和荧光光谱向红移,图 3-3(b)显示了在 365 nm 激发下发射的长波长荧光。



(a) 分子结构



(b) 不同溶剂中的荧光发色

图 3-3 BODIPY 荧光分子探针

另外,分子中电子转移的可行性研究表明,从电子给体(N,N -二甲基氨基苯基)到电子受体(BODIPY 核)的难易程度可通过 Rehm - Weller 公式进行评价,结果表明,电子转移按下列顺序进行得更容易:在 DMF 中>在 THF 中>在 CHCl_3 中,在 THF 中发射峰明显消失($\Phi_F=0.16$)[图 3-3(b)],所以荧光激活的临界值应该在 CHCl_3 和 THF 之间^[44]。

[illegible]

在 B3LYP/6-31G level 上计算荧光量子产率和 R 位置的 HOMO 能级之间的联系,得到在 DMSO 中荧光激活的临界值在 $-0.21 \sim -0.20 E_h$ 。在己烷中,所有衍生物的荧光最强,导致临界值无法测定,说明在己烷中通过 PET 过程淬灭荧光需要一个更高的 HOMO 能级;在其他溶剂中,随着溶剂介电常数的下降,荧光激活临界值的位置处于更高的 HOMO 能级,BODIPY 的荧光被 PET 过程淬灭。荧光团和淬灭剂之间的电子转移程度可以从自由能 (ΔG_{ET}) 的变化上判断,在循环伏安曲线实验中,当溶剂极性下降(从 DMSO 到 CH_2Cl_2),电子给体的氧化势增加,BODIPY 荧光团的还原势下降,说明在弱极性溶剂中很难氧化电子给体和还原荧光团。研究表明,氧化还原势影响 ΔG_{ET} 和电子转移速率,荧光激活临界值受溶剂极性影响的主要原因是 ΔG_{ET} 发生了变化, ΔG_{ET} 值在弱极性溶剂中向正值变化,而在弱极性溶剂中荧光的

淬灭需要更负的 ΔG_{eT} 值,根据 Rehm - Weller 公式,PET 过程自由能变化不但受 R 部分的给电子能力的影响,而且受还原势和荧光激发能的影响,电子转移过程在高极性溶剂中更容易发生。

研究表明 BODIPY 衍生物的 R 部分有高的 HOMO 能级作为 PET 的电子给体,BODIPY 荧光团的 2,6 位的乙烯基容易被还原,BODIPY 荧光团的还原势由于引入乙烯基数值向正值变化。基于 PET 过程的受溶剂极性影响的 BODIPY 衍生物可作环境敏感荧光探针。

2. BODIPY 类荧光分子探针的有关机理分析

作为探针分子,BODIPY 染料的受体部分是探针分子的重要部分,它直接影响对底物分子的选择性和检测限等参数。Erten - Ela 组^[46]设计了图 3-5(a)的 BODIPY 染料敏化剂 8 结构、图 3-5(b)的轨道模拟图和图 3-5(c)的实验谱线。

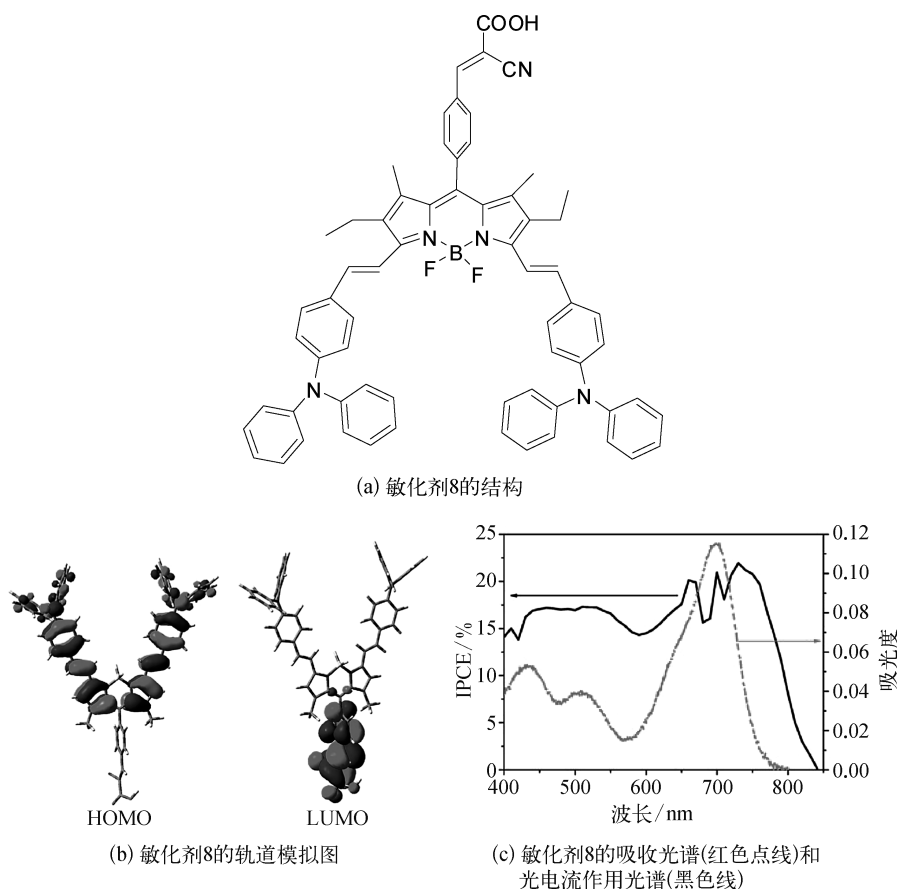


图 3-5 BODIPY 染料敏化剂 8 的结构及性能

敏化剂 8 的 DFT 计算支持激发态电荷的定向移动, HOMO 轨道由 BODIPY 和苯乙烯基的 π 骨架组成, 有明显的二苯基氨基的 π 电子的贡献 [图 3-5(b)]。而 LUMO 轨道被限制在固定基团的 π 系统里, 图中可观察到 $\pi-\pi^*$ 类型垂直方向的激发使电子密度从 BODIPY 核移动到苯乙烯基的 π 骨架和下垂的羧基部分上。敏化剂 8 在氯仿溶液中有相当宽的吸收峰, 如图 3-5(c) 所示, 在短波长处两个增加的跃迁是这种染料全色的表现。

Yuan 组^[47]报道了图 3-6 中的 BODIPY 化合物 9, 在 BODIPY 和罗丹明之间的 FRET 过程构成罗丹明两个状态的同分异构体, 时间分辨纳秒荧光实验证明从激发态 BODIPY 到罗丹明的分子内能量转移。由于 PET 过程, BODIPY 的光谱为弱发射; 加入一种特殊离子后, PET 部分被限制, 505 nm 的发射增强; 用另一种离子处理可使无色的罗丹明螺旋内酰胺状态变为红色的开环形式, 吸收光谱出现新带和在长波长处强的荧光带; 加入所有离子后, 诱导 PET 过程减少, FRET 过程转向开的状态。

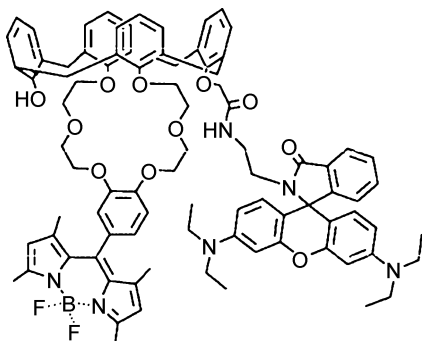


图 3-6 化合物 9 的结构式

向化合物 9 的乙腈溶液中加入 Hg^{2+} , 在 585 nm 处出现罗丹明的特征吸收峰, 这是由罗丹明离域的咕吨部分变成开环胺形式引起。 $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ 的响应时间要长很多, 其他离子没有响应。化合物 9 的 505 nm 处吸收峰为 BODIPY 特征峰, 加入 Hg^{2+} 后, 在 505 nm 处下降, 585 nm 处上升, 等吸收点在 541 nm 处, Hg^{2+} 诱导罗丹明基团形成开环状态, 585 nm 处是典型的罗丹明发射带。除了加入 20 eq 的 Ba^{2+} 在 505 nm 处有 15 倍的荧光增加, 其他离子没有响应。这表明化合物 9 能作为荧光比值探针。紫外灯下观察到加入 Hg^{2+} 后化合物 9 的发射从亮绿到橘色。化合物 9 对 Ba^{2+} 有高选择性, 氧杂-冠-6 环上氧原子的孤对电子通过 PET 机理淬灭 BODIPY 部分的发射, 加入 Ba^{2+} 后, 受体抓住 Ba^{2+} 导致氧对 BODIPY 部分的给电子能力减少, PET 过程部分被禁阻, 引起荧光增加。加入 Ba^{2+} 是 PET 机理, 加入 Hg^{2+} 是 FRET 机理, 同时加入 $\text{Ba}^{2+}/\text{Hg}^{2+}$, PET 过程被禁阻, FRET 被打开, 绿色发射被有效淬灭, 红色发射更强, 这些现象能用组合循环圈理论分析。

不对称硼化合物因为容易分解和转化,合成的产率很低。Haefele 组^[50]报道了图 3-8 中荧光探针的氟原子被各种功能取代基取代,二吡咯亚甲基上连接合适的取代基,构成结构对称的 $B^+ - BODIPY(16rac)$ 。接着在吡咯单元

上引入甲酰基,通过和氟的氢键作用,稳定了结构,并使结构不对称。结构对映体在室温日光下能稳定转化,硼原子成为手性中心,与选择性识别基团连接后,在手性环境中能够用作荧光手性的识别。

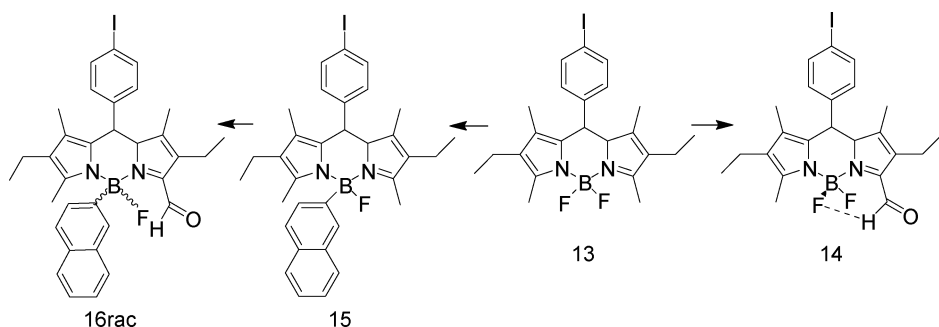


图 3-8 B^{*}-BODIPY 外消旋化合物的合成

BODIPY 类荧光染料是一个有发展前景的荧光团,荧光量子产率高,在生物细胞中能产生有效的图像。前期一些报道提到 BODIPY 作为检测氟离子的荧光团,在发射波长上荧光减弱及灵敏度不高。另有报道科研小组设计了 6-羟基吡啶基 BODIPY, BODIPY-OH, 通过控制酚/酚盐转换表现出有意义的光谱位移^[51]。因为在 BODIPY 单元中合并了 6-羟基吡啶,形成大的共轭,在 644 nm 波长处被激发,阴离子形式的荧光团在 676 nm 波长处的荧光较强(在近红外区),而在同样条件下,中性形式的荧光团基本没有荧光。这个现象能够用来设计比色和高开关比例的近红外荧光增强探针。

3.2 DCM 类

DCM(dicyanomethylene-4H-pyran chromophores)染料因为有优良的光物理性而受到化学家的关注,DCM 是典型的给体- π -受体体系(图 3-9),有来自 ICT 过程的宽的吸收峰。DCM 有长波长发射(红光)、量子产率高等优点。

1989 年, Tang^[52] 等首先将 DCM 染料作为荧光掺杂材料引入有机电致发光二极管中。迄今为

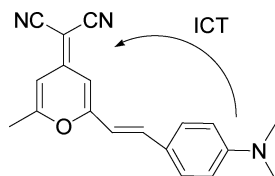
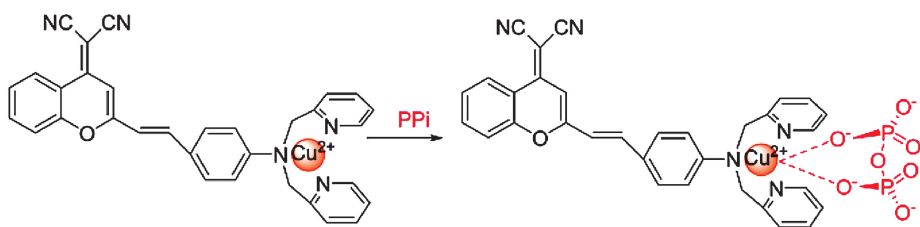


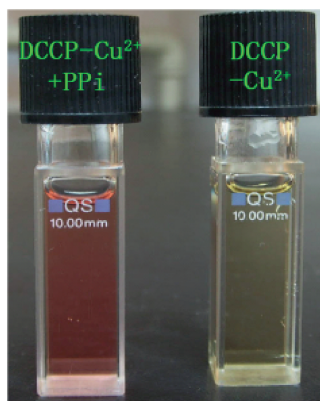
图 3-9 DCM 荧光团中 ICT 过程的原理图

止,由于有好的光电性能和容易修饰的结构,许多 DCM 染料衍生物已经被合成并应用于荧光探针、逻辑门和光伏传感器等领域。

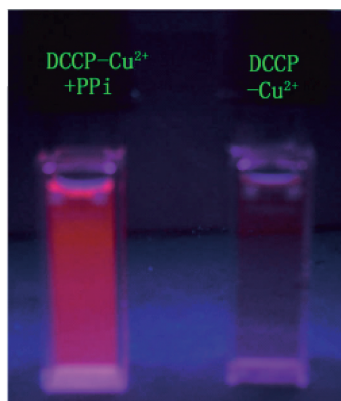
焦磷酸盐阴离子(PPi)在生物能量学和代谢过程如细胞信号传导和蛋白质合成中有广泛的应用。通常金属化合物比水容易能络合阴离子,因此金属离子化合物作为 PPi 的络合基的应用成为最常用的方法。Zhu 组^[53]发展了金属化合物基荧光探针 $\text{DCCP}-\text{Cu}^{2+}$ (图 3-10),该研究对 PPi 在长波长处荧光增强,量子产率高。游离 DCCP 发射带在 650 nm 处,有来自 DCM 荧光团($\lambda_{\text{em}}=595\text{ nm}$)的 ICT 过程。DCM 中引入一个苯环单元导致 55 nm 的红移。 Cu^{2+} 加入 DCCP 中引起了荧光强度下降,原因是 Cu^{2+} 被受体 DPA 抓住,降低了氨基的给电子能力,禁阻了 ICT 过程。加入 PPi 后, $\text{DCCP}-\text{Cu}^{2+}$ 和 PPi 形成 1:1 络合物,络合常数 K_{a} 为 $4.6 \times 10^5 (\text{mol/L})^{-1}$,荧光强度恢复,相比之下其他阴离子恢复的荧光可以忽略, $\text{DCCP}-\text{Cu}^{2+}$ 对 PPi 有更高的灵敏度和更好的选择性。



(a) $\text{DCCP}-\text{Cu}^{2+}$ 和 PPi 的作用机理



(b) $\text{DCCP}-\text{Cu}^{2+}$ 加入 PPi 后的颜色变化



(c) 365 nm 激发的荧光发射

图 3-10 金属化合物基荧光探针 $\text{DCCP}-\text{Cu}^{2+}$

朱为宏组^[54]发展了含 DCM 化合物的亲水共聚物聚(HEMA-co-DCPDP)作为 Cu^{2+} 和 PPi 的荧光薄膜探针(图 3-11)。在聚(HEMA-co-DCPDP)中,聚羟乙基甲基丙烯酸酯(PHEMA)表现了高亲水性,被选择作为亲水链段来提高离子进入聚合物骨架的渗透性,DCM 荧光团被嫁接于聚合物骨架作为金属感应单元。聚(HEMA-co-DCPDP)不但表现出对 Cu^{2+} 的选择性淬灭,而且其相关金属化合物聚(HEMA-co-DCPDP)- Cu^{2+} 表现了对 PPi 的高敏感荧光激活,在溶液中和在薄膜中超过了如 AMP、ADP、ATP、Pi 等其他阴离子。而且,低成本高亲水性的共聚物薄膜聚(HEMA-co-DCPDP)- Cu^{2+} 在石英片上对 PPi 表现了橘色-红色快响应荧光激活,这是由它的侧链的高渗透性引起的。

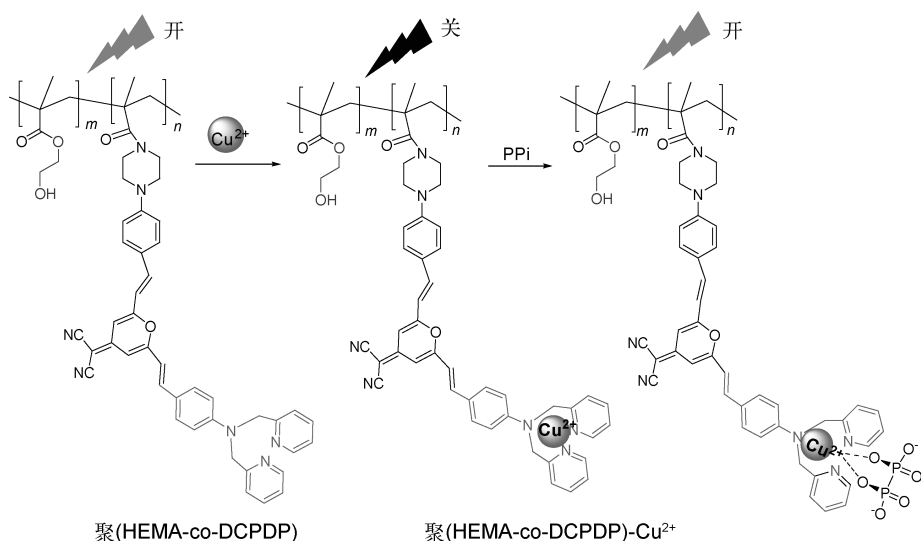


图 3-11 分别基于聚(HEMA-co-DCPDP)和聚(HEMA-co-DCPDP)- Cu^{2+} 的荧光“开-关”和“关-开”的 Cu^{2+} 和 PPi 探针的示意图

3.3 荧光素类

荧光素属于氧杂蒽类染料,荧光素类染料基本结构为 3,6 位被羟基取代的氧杂蒽。其较高的量子效率和摩尔吸光系数、良好的光稳定性、位于可见光区域吸收和发射等性质,使得这类染料有着广泛的应用。

荧光素是最常用的供体分子,其荧光发射峰处于 500~530 nm,处于绿光区。荧光素和罗丹明是最常见的 FRET 能量供体和受体。如图 3-12 所示,文献报道一个基于荧光素为供体,罗丹明为受体的 FRET 比率型羟基自由基荧光探针^[55],在没有羟基自由基存在的条件下,当激发供体 6-FAM(496 nm)时,受体 5-TAMRA 在 576 nm 处发射荧光。当遇到羟基自由基后,羟基自由基会使两个荧光团的连接键断裂,而当激发供体 6-FAM 的时候只能观测到其自身在 518 nm 处的荧光发射光谱,荧光光谱出现比率型的变化。

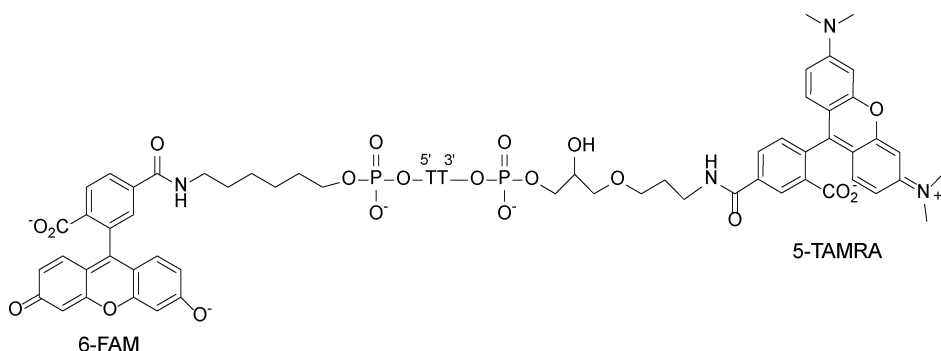


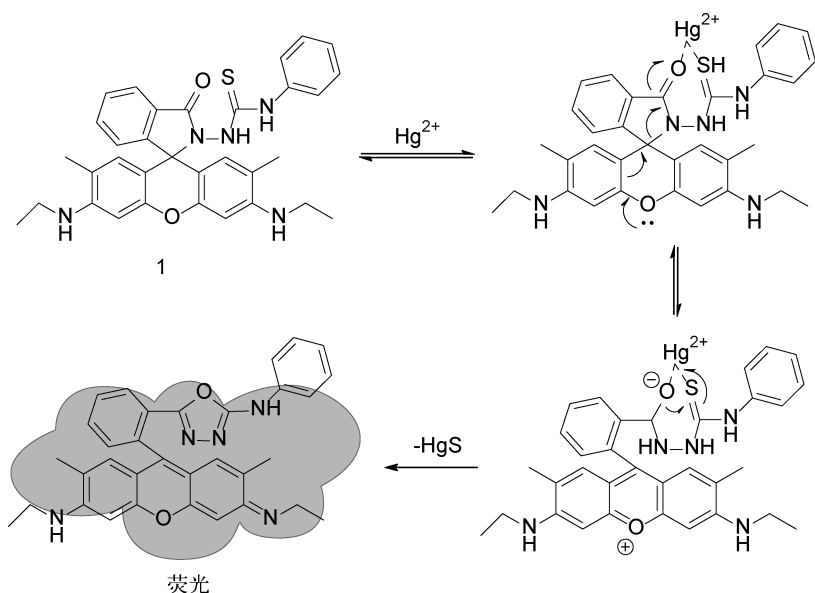
图 3-12 对羟基自由基识别的 FRET 比率型探针

3.4 罗丹明类

罗丹明属于氧杂蒽类染料,罗丹明类染料的基本结构为在 3,6 位被胺基取代的氧杂蒽,通过在 3 位和 6 位引入不同类型的胺基取代基,可以获得不同吸收、发射波长的罗丹明类染料。罗丹明类染料同样具有较高的量子效率和摩尔吸光系数、良好的光稳定性、位于可见光区域的吸收和发射等性质。

罗丹明类的应用之一是作为阳离子传感器螺环化合物系统的开环,Czarnik 组报道了利用罗丹明 B 衍生物一个开环反应设计检测 Cu(II) 化学比例计探针^[56]。随后,类似工作不断被发表,Tae 组研究了图 3-13 中探针 1 检测 Hg(II) 的技术^[10]。

像预期的一样,螺内酯开环过程和 Hg(II) 的组合引起了氨基硫脲的 1,3,4-噁二唑环化,该研究提供了一个用于 Hg(II) 检测的新的化学比例计探

图 3-13 探针 1 检测 $\text{Hg}(\text{II})$

针^[57]。近红外荧光探针 15 具有吡啶和罗丹明 B 这一对给受体荧光团(FRET 模型),该化合物与铜离子发生络合反应生成化合物(图 2-9)。

3.5 花 菁 类

花菁类荧光染料是使用较广的一类荧光基团,其结构一般为在两个氮杂原子间含有奇数个碳原子并且键长均匀分布的共轭发色团。这类荧光染料的吸收和发射波长较长且可调控,大部分在 600~800 nm,吸收半峰宽较窄,具有较高的摩尔吸光系数。这类染料所衍生的荧光分子探针能有效避开生物体内的自发荧光和散射光的干扰,提高了检测的灵敏度。但同时,这类染料也存在着对光敏感、易分解、光稳定性较差、量子效率较低等缺点。

3.6 香 豆 素 类

香豆素类荧光团也是应用比较广泛的一类荧光探针母体,它含有内酯环

结构,具有光稳定性好、荧光量子效率较高、Stokes 位移大等优势。通过在母环的 3 位引入吸电子基团,在 7 位引入拉电子基团,可以获得较高的量子产率^[58]。哈佛大学的庄小威教授与前面的几位科学家同时开展了与之相关的研究工作(图 2-3)。香豆素的荧光发射波长通常处于蓝绿光谱,也是较为常用的能量供体。如图 3-14 所示,Chang 报道了一个以香豆素为供体、以荧光素为受体的比率型过氧化氢探针^[59],探针分子在未遇到过氧化氢前,由于荧光素经硼酸酯的“mask”作用,呈类荧光素螺内酯的环状结构,其吸收光谱处于紫外区,与香豆素的发射光谱没有交叉,所以激发香豆素荧光团时观察不到能量受体的荧光,只能观测到香豆素的蓝色荧光。与过氧化氢作用后,由于过氧化氢可以解除类荧光素中硼酸酯的“mask”作用,使其生成荧光素,能量受体荧光素的吸收光谱与香豆素的发射光谱有很好的重叠,此时荧光共振能量转移顺利发生,激发香豆素时观察到了荧光素的发射光谱,这一过程实现了 FRET 由“关”变为“开”,探针的荧光光谱红移并呈比率型变化。该探针已被成功用于细胞内过氧化氢的检测。

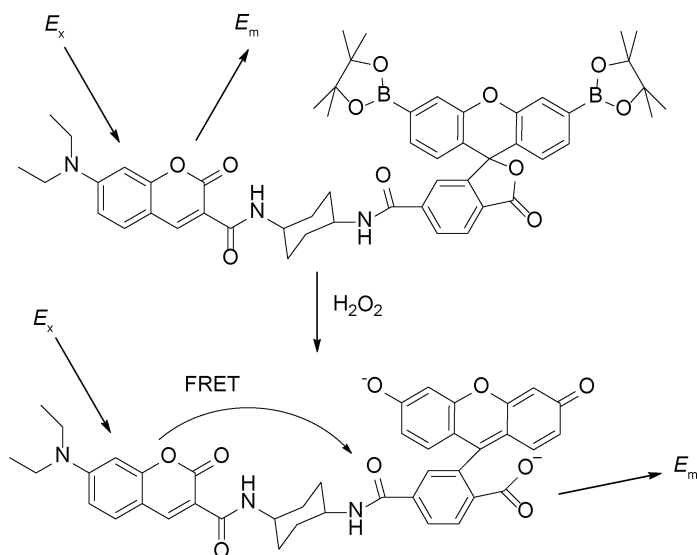


图 3-14 以香豆素为供体的 FRET 比率型过氧化氢探针

在图 2-21 中,比率型荧光比色探针 11 通过 π -共轭键相连接设计而形成,利用氰化物特殊的亲核性可检测阴离子 CN^- 。通过同样的设计策略,荧光团 7-氨基香豆素能够用来合成作为中间体的 α, β -不饱和酮,最终合成得

到荧光探针 12(图 2-22),用于谷胱甘肽的检测,其 α, β -不饱和结构可以快速地与谷胱甘肽发生亲核加成反应。

3.7 吩(噻)嗪类

吩(噻)嗪类小分子荧光团具有强的推电子中心(N 和 S 原子),其吸收和发射波长位于短波的(近)紫外区域,因此常被用于检测药物、配位化合物配体等方向,但很少单独以其作为母体荧光团。研究发现,吩(噻)嗪这一类荧光团通过分子内电荷转移机制设计,在给电子单元对位引入强吸电子单元,可以获得光谱大幅红移的近红外荧光染料。而且与普通 ICT 荧光团不同的是:这一类荧光团的强给体是集成在 π 体系内的刚性给体,其对溶剂极性的影响较扭曲性强的普通 ICT 荧光团更弱。一个较好的类比是具有吡啶结构的罗丹明 101 与具有二甲氨基结构的罗丹明 B。吩嗪和吩噻嗪的区别在于母核中心是两个氮原子还是一个硫原子和一个氮原子,其中,吩噻嗪具有一个硫原子,对于次氯酸等反应氧体系来说,这是一个氧化还原反应位点。根据研究结果,通过在吩嗪 N 对位引入强吸电子的氰基乙酸单元构建了一个近红外的荧光化学传感器,其吸电子的氰基乙酸与吩嗪母核之间的乙烯基具有明显的电荷分离性质,可以作为巯基氨基酸的靶向位点。

近年来,多个研究组报道了具有高量子效率、较好的光稳定性及多种发射波长的荧光探针。这些探针大部分基于优化后的商业染料,如花菁类染料、荧光素、罗丹明、氟硼二吡咯、萘酰亚胺、吡喃腈等^[60-65]。这些材料在发光和生物相容性方面的性能都非常优异。然而,对于染料在生物环境中常常造成的聚集荧光淬灭性质,成熟商业染料都显示出较差的适应性。此外,为了检测强氧化性的次氯酸体系,要求选择的荧光探针分子必须具有可靠的抗氧化能力,保证在强氧化性环境下仍能输出稳定的光信号。1985 年,布鲁贝克等人报道了用次氯酸钠脱硫的技术。这一技术对于煤中有机硫的组成部分——吩噻嗪衍生物的反应机制引起了关注。如图 3-15 所示,在次氯酸作用下,吩噻嗪的硫原子会发生氧化,形成亚砷或砷的结构。研究人员还发现,这个反应同样可以在加热条件的过氧化氢环境下实现^[66]。与次氯酸的温和反应相比,过氧化氢需要更高的温度来实现这一转化,从探针的角度来说,也就意味着这一识别机

制对次氯酸具有更好的选择性。更重要的是,吩噻嗪材料氧化前后的两类物质都具有荧光发射,这表明吩噻嗪是设计双通道比率型荧光传感器的一个合适的染料母体。

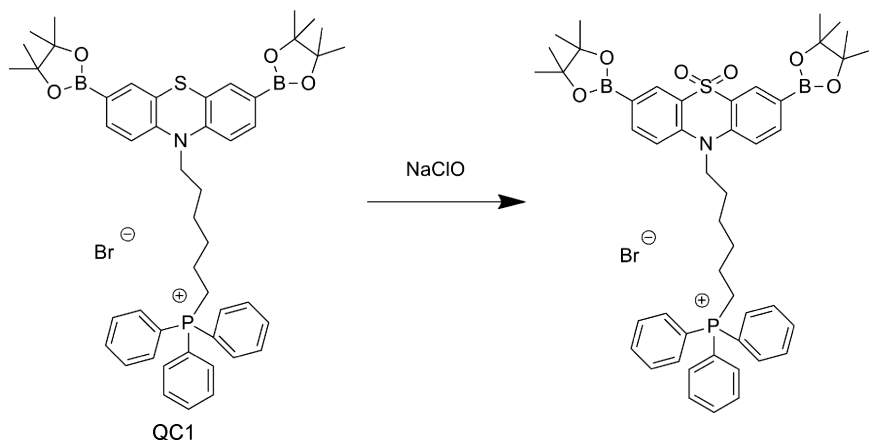


图 3-15 探针 QC1 及其对 NaClO 的识别机理

在吩噻嗪母体的基础上,进一步引入两个位阻型硼酸酯的结构,以降低吩噻嗪的大 π 结构平面性,从而抑制染料刚性共轭平面的 $\pi-\pi$ 堆叠作用。在吩噻嗪的 N 原子上引入的三苯基季磷盐大位阻单元也用于设计增加传感器的空间位阻效应。

吩噻类染料本身的吸收与发射都在近紫外区域,是一种常见的生物代谢物和金属配合物配体。2013 年,花建丽教授课题组通过在吩噻 N 对位引入吸电子的醛基与丙二腈,构建了一个 ICT 型的吩噻近红外染料体系。这一系列近红外染料,利用吩噻还原后两个芳胺的强推电子性质,在很小的分子结构上获得了超过 700 nm 的荧光输出信号。譬如基于这一设计构建的探针 3 和 4^[67],都是用于检测 CN^- 的具有高选择性和高灵敏度的探针(图 3-16)。探针 3 是一个具有两个二氰基乙烯基作为反应性位点的开-关型近红外荧光探针,荧光发射在 730 nm 处变化,其检测限很低,能达到 $5.77 \times 10^{-8} \text{ mol/L}$,颜色发生显著的变化,肉眼可观察到从深紫色变成无色。探针 4 携带一个甲酰基和一个二氰基乙烯基团,随着氰根离子的加入,在 720 nm 和 630 nm 处展现出明显的成比率的近红外光谱响应,因此得到了一个具有高选择性、更灵敏的化学传感器,其检测限只有 $2.31 \times 10^{-8} \text{ mol/L}$ 。

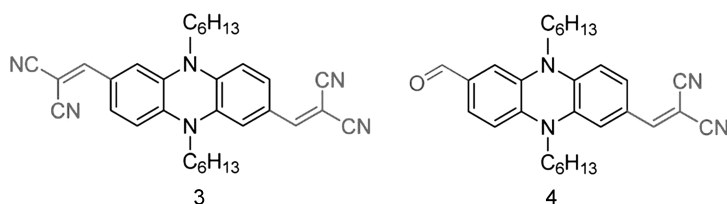


图 3-16 探针 3 和探针 4 的结构式

探针 5 和 6^[68] 是另一系列吩嗪类近红外荧光探针, 通过引入吡啶单元实现了光谱的大幅红移。两个探针对氰根离子具有高灵敏度, 检测限分别是 $1.4 \mu\text{mol/L}$ 和 200 nmol/L , 且对其他阴离子具有较强的抗干扰能力(图 3-17)。由于作为给体的吩嗪和受体吡啶之间的 ICT 作用的影响, 吩嗪-菁染料荧光团发生淬灭作用, 从而使染料 5 和 6 在初始状态荧光很弱。加入氰化物后, ICT 效应减弱并逐渐消失, 出现明显的荧光增强。探针 5 在 630 nm 处的荧光增强, 较 6 的发射波长红移是由于探针与氰根反应后, 5 的结构较 6 多一个醛基, 具有更强的 ICT 作用。探针 5 被应用于检测 Hela 细胞内的氰化物, 并且通过共焦激光扫描显微成像证实了荧光信号的增强。

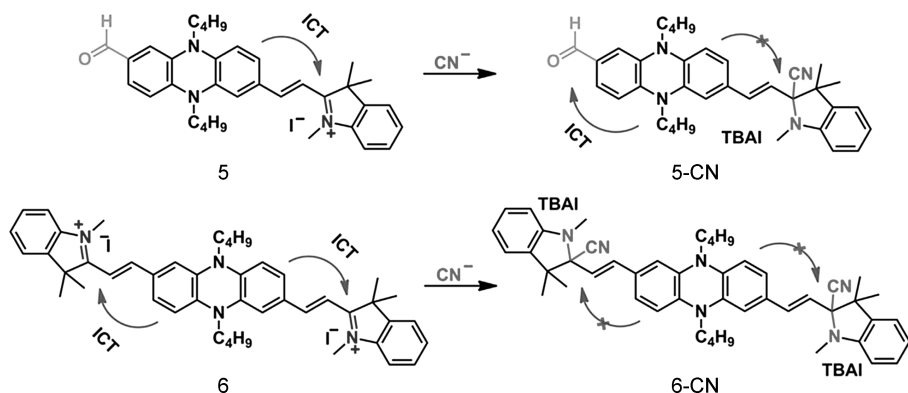


图 3-17 化合物 5 和化合物 6 的结构式

3.8 蒽、菲、芘类

稠环芳烃化合物, 例如蒽、菲、芘等, 都是典型的荧光基团。这类化合物最大的特点是易于发生聚集, 具有激基缔合物的荧光特征。但这类化合物具有

较强的毒性和潜在的致癌性,并且大多吸收波段处于紫外光区域,限制了其在生物体中的应用。目前仍有很多探针以该类荧光团为母体。

3.9 萘酰亚胺类

萘酰亚胺类荧光染料具有良好的光稳定性,其吸收波长通常位于 300~460 nm,荧光发射通常在蓝绿光区,Stokes 位移较大,光谱可调范围相对较窄,同时萘酰亚胺还具有较大的双光子激发荧光的特性,这些优点是其他荧光染料无法比拟的。萘酰亚胺中的酰亚胺一端具有强烈的吸电子能力,通过改变 4 或 5 位取代基的种类来调节其荧光光谱,结构修饰相对简单,因此大量基于萘酰亚胺类比率型荧光探针被开发出来,其在阳离子、阴离子及有机小分子的识别上尤为突出。

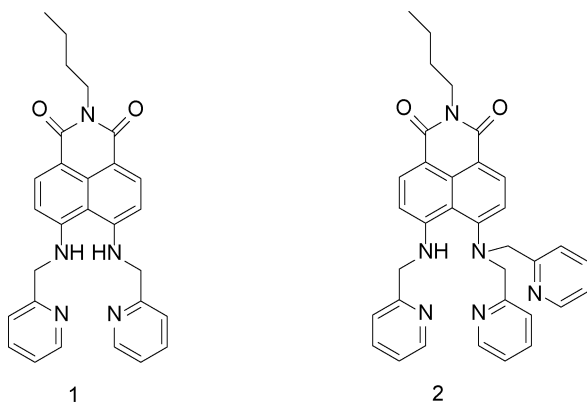


图 3-18 基于萘酰亚胺的 Cu^{2+} 探针 1 和 Zn^{2+} 探针 2 的结构式

例如 Qian 研究报道了基于萘酰亚胺的铜离子探针 1^[69] 和锌离子探针 2^[70] (图 3-18)。其中探针 1 是一个波长移动的比率型荧光探针,利用受体中电子供体补偿铜离子的缺电性,从而阻断铜离子与荧光团之间的电子传递或者能量传递过程,使荧光得以保持。在探针 1 与铜离子络合过程中,铜离子通过配位与脱氢双重作用改变 4 位和 5 位氮原子的供电子能力,从而改变其分子内电荷转移过程,由此来使探针的发射波长发生改变,从而实现了双波长比率检测。这就为铜离子的检测提供了量化信息。探针 2 在水溶液中能对锌离

子实现专一识别,在与锌离子结合后,其吸收和荧光波长都发生了红移,分别由原来的黄色和黄绿色变成了粉红色和红色,颜色变化明显,是独特的比色兼比率型荧光探针。

Kim 研究组及 Liu 研究组分别报道了基于萘酰亚胺的氟离子反应型荧光探针 3^[71] 和汞离子反应型探针 4^[72]。图 3-19 中探针 3 和 4 具有相似的识别机理,利用氟离子或汞离子诱导 Si—O 键以及 C—O(CH₂ = CH—O) 键的断裂,使 4 位酰亚胺基水解释放出氨基,从而改变了萘酰亚胺的推拉电子体系,使得探针分子的荧光光谱出现红移的现象,最终获得双波长比率的变化。探针 3 和 4 的荧光颜色变化相似,氟离子或汞离子加入后,荧光颜色由蓝色变为绿色。Qian 研究组也报道了基于上述的设计模式设计的萘酰亚胺比率型荧光探针 5^[73],借助于该探针可以直观地评价癌细胞内硝基还原酶的活性。探针 3、4、5 与探针 1、2 不同,探针 3、4、5 为不可逆的反应型荧光探针,而探针 1、2 与客体金属离子的识别过程是可逆的。

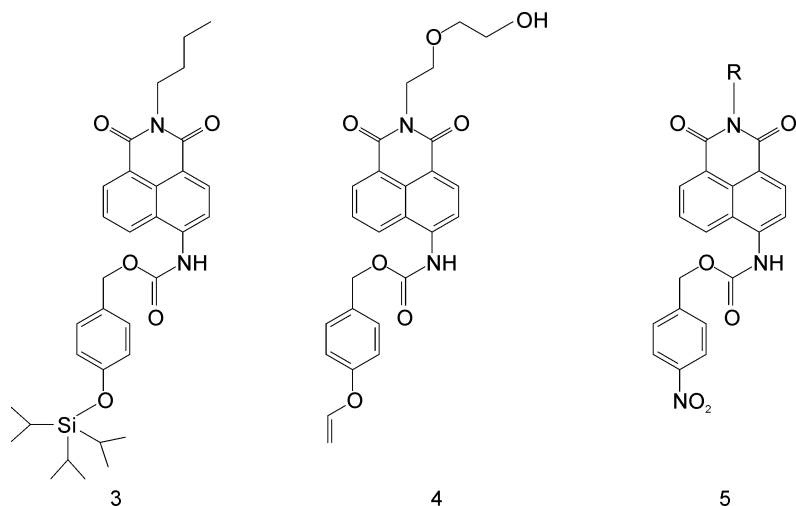


图 3-19 基于萘酰亚胺的氟离子和汞离子比率型探针

与吩(噻)嗪母核类似,萘酰亚胺母核也是一个集成 ICT 的小分子荧光团,其 1,8 位上的双酰亚胺提供了强的吸电子单元,因此大部分已有工作集中于在吸电子单元的对位(4 位)引入强给电子单元,并将该给电子单元设计成识别受体单元,通过调制其给电子性能实现荧光探针响应。在萘酰亚胺 4 位引入一个苯环,可以有效地提高荧光团的荧光量子效率,参考 AIE 类化合物的结

构,推测苯环与萘酰亚胺萘环通过单键连接有利于增强其在聚集状态时的荧光,因此,可以设计双萘酰亚胺和苯环桥连单萘酰亚胺两个体系。

基于双联萘酰亚胺的荧光分子转子也是研究的方向之一。通过钯催化偶联反应合成了一种双萘酰亚胺串联型转子分子(BNAP)。分子转子具有极广的黏度响应范围,并且其聚集态具有与分子状态不同的荧光发射波长。在此基础上,可以实现双波长的黏度响应。与普通单波长“开-关”型黏度响应探针不同,该转子由于具有分子短波荧光和聚集态长波荧光两类本质上不同的荧光,通过对二者进行比率计算,可以有效避免环境带来的误差。通过光物理性质的研究发现其在聚集态时具有聚集发光的性质,并且与普通 AIE 发色团不同的是:该转子型分子在自由旋转状态时,单一的萘酰亚胺荧光团仍然可以输出短波长的荧光。通过结构对比发现,大多数 AIE 活性染料在自由分子状态时缺乏有效的共轭结构。例如,四苯乙烯类染料(TPE)在普通的有机溶剂中没有荧光,这是因为其在自由旋转状态时,四个苯基与乙烯基处于不共轭状态,任一独立单元都不具备足够大、能够发射可见光的共轭体系。而 BNAP 的两个单一平面都具有明显的分子内电荷转移特征,保证了局部发射可见光的能力。如图 3-20 所示,BNAP 的每半部分都是独立的发射器,它可以在短波长处输出荧光信号。一旦 AIE 荧光团形成了聚集态,其半部分的“ $\pi-A$ ”就会趋于结

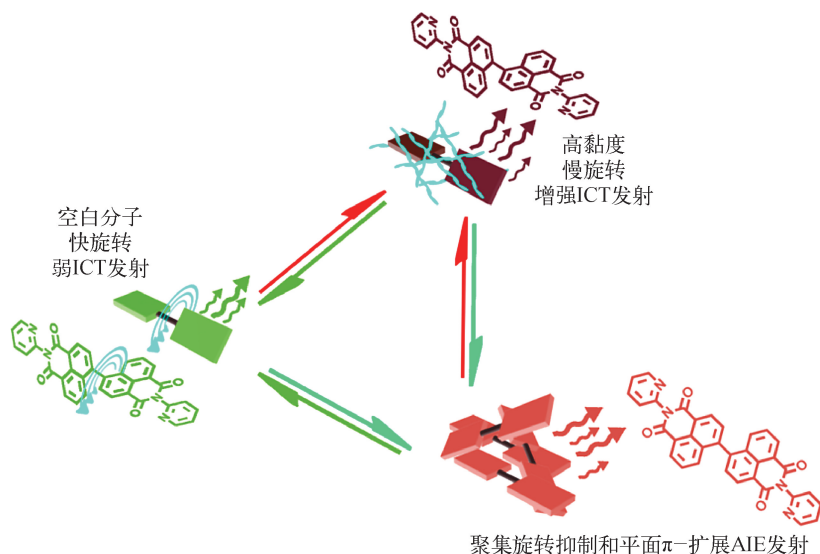


图 3-20 串联型萘酰亚胺荧光转子(BNAP)在低黏度、高黏度及聚集态时的工作示意图

合为一个更大的“ $A-\pi-\pi-A$ ”平台,并且发射波长较长的光子。由于萘酰亚胺衍生物具有更好的荧光效率和这一新发现的聚集态的发光性能,所以 BNAP 是一个很好的研究对象,可以提供在一个在不同波长通道的两种发射状态的新型荧光传感器系统。在自由分子状态, BNAP 显示了强的分子内电荷转移效应的性质,发射波长随溶剂极性的变化实现了从 405 nm 到 453 nm 的红移,其发射波长能量与溶剂极性呈较好的相关性。BNAP 在水中呈聚集状态,其发射光谱可以红移到 473 nm,并且在固体粉末时发射光谱带能进一步红移到 500 nm。

刘和田第一个报道了基于 Hg^{2+} 激发分子间环化鸟苷酸化的荧光化学比例计^[74]。其间,合成和研究了一个新的萘酰亚胺衍生物(10)。当衍生物 10 本身在 290 nm 被激发,发出黑绿光,最大发射波长在 530 nm 处, Hg^{2+} 加入衍生物 10 的溶液中引起硫脲的环化,形成一个深的黑蓝绿色荧光化学比例计,最大发射波长在 475 nm(图 3-21)。

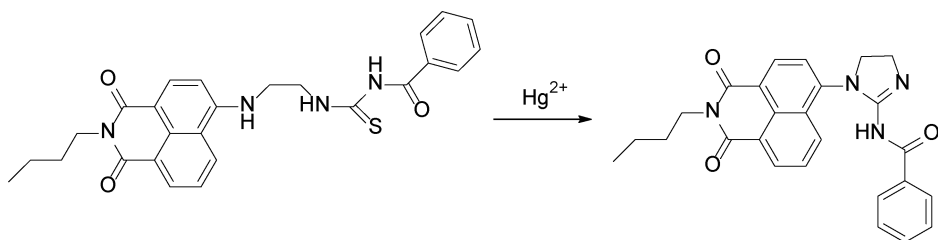


图 3-21 衍生物 10 对 Hg^{2+} 的作用机理

1,8-萘二甲酰亚胺是一类具有强 ICT 性质的小分子荧光团,如图 2-23 所示,化合物 13 和 14 能够高效地络合阳离子,可以选择性识别钙离子。

在基于二硫氨基酸酯保护基团裂解的基础上,设计合成了萘二甲酰亚胺衍生物 59(图 3-22),它是一个能够在生理过程中检测谷胱甘肽(GSH)的

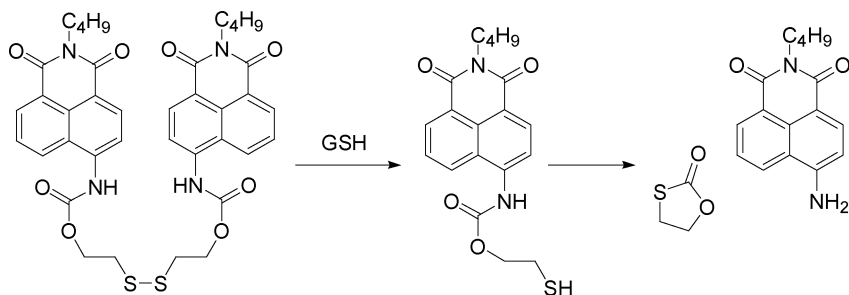


图 3-22 化合物 59 的传感机理

发光化学传感器^[75]。化合物 59 与硫醇的反应是由二硫氨基甲酸酯保护基团的裂解,导致内部电荷转移发生显著的变化引起的。化合物 59 已成功地应用于活 Hela 细胞的硫醇的生物成像中。

Ramaiah 等人报道了基于萘酰亚胺和丹磺酰胺的 FRET 比率型铜离子荧光探针^[59],如图 3-23 所示,萘酰亚胺与丹磺酰胺的吸收光谱极为相近,在没有铜离子存在的条件下,激发萘酰亚胺发色团,由于萘酰亚胺的发射光谱与丹磺酰胺的吸收光谱重叠,从而发生荧光共振能量转移,可以观测到丹磺酰胺的荧光发射(525 nm);当加入铜离子后,铜离子与丹磺酰胺结合,使得丹磺酰胺的吸收光谱出现蓝移,其与萘酰亚胺的发射光谱重叠较小,荧光共振能量转移不能发生,所以当激发萘酰亚胺时,只能观测到萘酰亚胺的荧光峰(375 nm),从而实现了比率识别铜离子。然而由于该探针的激发波长为 337 nm,处于紫外光区,在用于生物样品中铜离子的检测时,较短的激发波长会对生物样品造成损伤。该工作具有重要的理论意义,为设计通过光谱调节调控 FRET 过程的比率型荧光探针提供了新的思路。

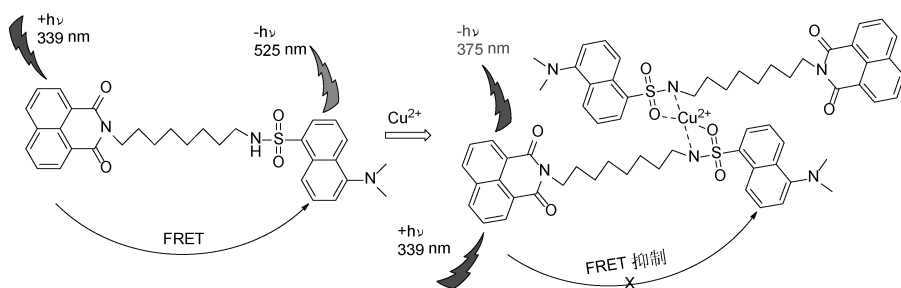


图 3-23 铜离子 FRET 比率型荧光探针

3.10 硝基苯并-2-氧杂-1,3-二唑荧光团类

3.10.1 苯并-2-氧杂-1,3-二唑类化合物

苯并-2-氧杂-1,3-二唑(Benz-2-oxa-1,3-diazole, BD)类化合物(图 3-24)具有抗炎生物活性。1886 年,这类化合物被 Von Iinski 和 Koreff 两位科学家首次发现^[76]。研究表明,这类化合物的硝基衍生物有防辐射、防白血病和抗癌等功能。除此之外,在工业生产中,这类化合物还常用在照相乳胶

感光促进剂、金属抛光剂、防腐剂及电池去极剂等方面。20 世纪 80—90 年代,人们对 BD 结构的不同位置的取代进行了详细的研究,特别是日本 Kazuhiro Imai 课题组。Kazuhiro Imai 等人的研究结果显示:(1) BD 类化合物在 R1 位和 R2 位分别连接供电子基团和吸电子基团会形成分子内显著的电子“推-拉”体系,符合 ICT 机理要求,分子具有荧光。(2) 改变 R1 位和 R2 位的取代基会导致荧光性能的变化。(3) 在所合成的 70 多种不同 R1 位和 R2 位取代的 BD 类化合物中,依据 R1 位和 R2 位的哈密特取代常数的总和与差值,将具有高荧光强度的 BD 类化合物分成了两类^[77]。该课题组的研究成果为后来基于 BD 结构的荧光探针设计打下坚实的理论基础。

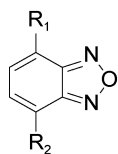


图 3-24 苯并-2-氧杂-1,3-二唑的结构式

3.10.2 硝基苯并-2-氧杂-1,3-二唑荧光团衍生物的研究进展

硝基苯并-2-氧杂-1,3-二唑(Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazole, NBD)是苯并-2-氧杂-1,3-二唑结构中 7 位被硝基取代的一类化合物。该类化合物是 BD 类化合物中一种重要的化合物,在荧光方面也被认为是一类重要荧光基团,其系列胺基衍生物具有摩尔吸光系数大、荧光量子产率高、对环境变化灵敏及荧光发射波长在可见光区域等优点。硝基是一个强吸电子基团,当 4 位上被一个氨基或者胺类取代形成胺基衍生物时,形成分子内电子“推-拉”体系,产生分子内电荷转移,从而形成典型的 ICT 荧光团。4-氯-7-硝基苯并-2-氧杂-1,3-二唑(4-Chloro-7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazole, NBD-Cl)和 4-氟-7-硝基苯并-2-氧杂-1,3-二唑(4-Fluoro-7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazole, NBD-F)是常用的两种氨基衍生化试剂。早在 20 世纪 80—90 年代,人们常用这两种衍生化试剂对氨基酸进行柱前衍生化,用于荧光高效液相色谱分析,定量检测氨基酸^[78]。2001 年,Kazuhiro Imai 课题组对 NBD 的研究进展进行了总结,2013 年北京师范大学邢国文教授课题组也对 NBD 荧光探针研究进展进行了总结报道。近些年,随着交叉学科的兴起,荧光探针技术在各个领域的应用,特别是对生物体系内目标物的检测成为研究热点。NBD 作为一个小分子荧光团(相对分子质量小于 200),本身具备一定的生物活性,NBD 依靠自身众多荧光优点,使人们认识到它在荧光探针方面的开发潜力,研究方向渐渐开始向着荧光探针设计方面发展。目前,已经报道

基于 NBD 设计的荧光探针大体分以下几大类：阳离子探针、阴离子探针、小分子探针、荧光标记探针等。

3.11 噁 嗪 类

噁嗪类染料也是常用的荧光团之一。

Kim 组研究了基于 ICT 机理的氰根离子探针在加入 CN^- 后引起双重颜色和荧光变化的现象^[79](图 3-25)。

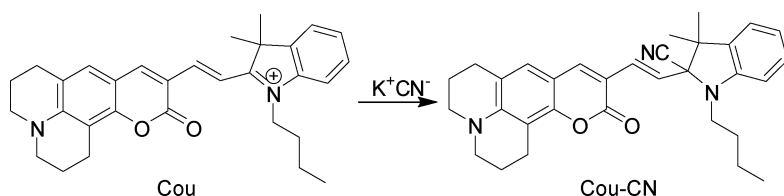


图 3-25 化合物 Cou 和产物 Cou-CN 的结构式

在 12 种离子中只有 CN^- 有颜色变化,紫外光下从黑蓝色变为黄色,荧光从弱蓝变为强绿,紫外吸收在 $\text{H}_2\text{O}-\text{CH}_3\text{CN}$ (体积比为 5 : 95)中有 398 nm 和 609 nm,加入 CN^- 后 398 nm 红移到 409 nm,609 nm 处全部消失,ICT 过程从 coumarin N 原子到正离子的吡啶基通过共轭的双键发生。但是 ICT 过程被加入的 CN^- 和化合物 Cou 反应所打断,因为 CN^- 对化合物 Cou 的 $-\text{C}=\text{N}^+$ 亲核加成破坏了吡啶的共轭。在 490 nm 的等吸收点说明 CN^- 和化合物 Cou 反应产生了新物种。在 484 nm 处荧光增加,而其他钾盐离子没有这个变化。

用 Gaussian 03 在 6-31G* 计算 DFT,表明在香豆素和吡啶基团之间为 sp^2 杂化轨道,反应产物有接近 90 度的构成,有在香豆素垂直方向上的 sp^3 杂化轨道,化合物 Cou 和产物 Cou-CN 比较,分子结构的 π -共轭是不同的,因此 ICT 过程在产物 Cou-CN 上不能被观察到。化合物 Cou 和产物 Cou-CN 的 HOMO-LUMO 能带计算分别是 2.41 eV 和 3.37 eV,因此实验中化合物 Cou(2.03 eV/609 nm)和产物 Cou-CN(3.03 eV/409 nm)的最大吸收峰变化就能通过离域变化解释了。产物 Cou-CN 不可逆转,加入 Cu^{2+} 没有影响。

3.12 偶氮类硝基水杨醛染料

水杨醛结构上的酚羟基可以与邻位醛基上的羰基氧形成分子内氢键,活化羰基。羰基被活化后能够与氰离子发生亲核加成反应。探针与氰离子发生反应时,氰离子攻击醛基上活化了了的碳氧双键,导致酚羟基上产生一个烷氧基负离子,产生的烷氧基负离子与酚羟基依靠分子内氢键相互结合,进而质子转移后形成氰醇化合物。探针与氰离子的反应过程可以通过由“激发态质子转移”(ESIPT)所产生的荧光光谱变化而明显地被观察到。通过研究加入氰离子前后原位核磁中水杨醛的醛基质子氢所对应的核磁信号峰变化也能够对这一反应现象做出更精确的阐述。有大量文献曾经报道如何基于这一原理来设计氰离子探针。

K. S. Lee 等人设计合成了偶氮类硝基水杨醛染料 1(反应机理如图 3-26 所示)。这种探针在加入氰离子之前是无色的,加入氰离子之后溶液的颜色迅速变为红色。由于羰基与氰离子反应之后能够和酚羟基形成稳定的分子内氢键,因此反应过程特别灵敏,能够远远超过 WHO 规定的检测标准^[80]。

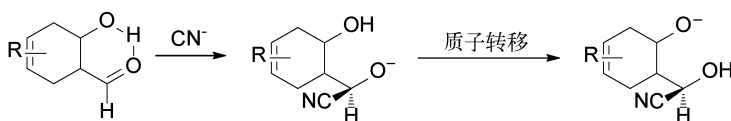


图 3-26 偶氮类硝基水杨醛染料 1 的识别机理

Malik 等人设计合成了一种新的水杨醛基荧光比率探针 6(图 3-27)^[81]。此探针能够同时通过溶液的颜色变化和荧光强度的变化对体系中的氰离子进行检测。在 520 nm 的激发光照射时,加入氰离子后,化合物的荧光强度增加了 9 倍之多。化合物对氰离子的识别表现出了非常优异的选择性和极低的检出限(0.06 ppm)。加入氰离子之后荧光的“开”响应(turn-on)现象表明氰离子与探针之间是由激发态电子转移导致的,其激发态下的 TD-DFT 数据也支持这一结论。

Mongkol 等人^[82]设计了一系列新的荧光染料(7、8 和 9),这一系列氰离子探针通过炔基将显色基团和受体基团连接。显色基团的引入能够在很大程度上增加探针对氰离子识别的灵敏程度和比色效果。这些探针能够实现在水

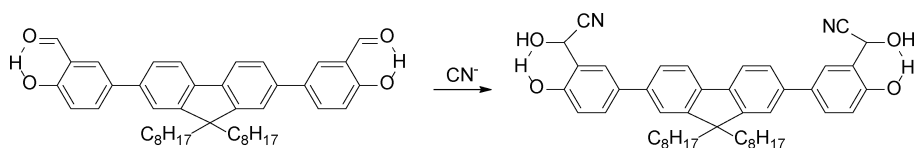


图 3-27 探针 6 的反应机理

环境中识别氰离子,并且能够检测到纳米量级摩尔浓度的氰化物,其最低检出限能够达到 $1.6 \mu\text{mol/L}$ 。

Ravikanth 等人^[83]报道了水杨醛取代的 BODIPY 染料 10 可作为氰离子识别探针。在 521 nm 激发波长的荧光照射下,向探针所在溶液中加入氰离子,荧光淬灭,随着氰离子浓度的增加,荧光淬灭速度明显加快。通过研究探针 10 的吸收光谱、荧光光谱及其在电化学充放电的进程,能够很好地了解探针加入氰离子前后电荷转移的情况(图 3-28)。

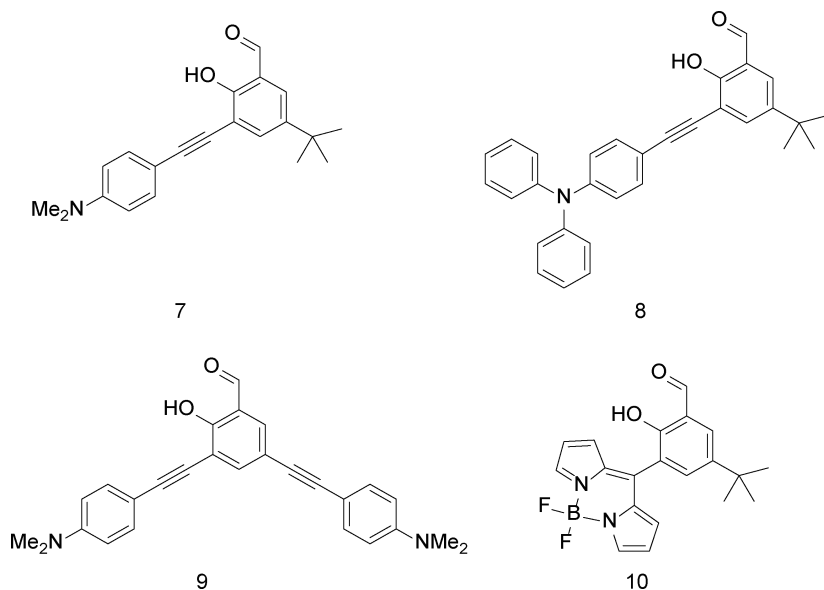


图 3-28 探针 7~10 的分子结构

3.13 苯并噻唑类

Goswami 等人^[84]报道了一个氰离子荧光比率探针 11(图 3-29),探针的

主体结构为 2-(2-羟基苯基)苯并噻唑。加入氰离子之前在 551 nm 处显示绿光,随着氰离子的不断增加,551 nm 处的吸收峰值强度逐渐降低,并且在 436 nm 处出现一个新的吸收峰,伴随着氰离子不断加入,峰值也在不断增加。探针 11 对氰离子的检出限极低,甚至已经远低于 WHO 规定的标准。

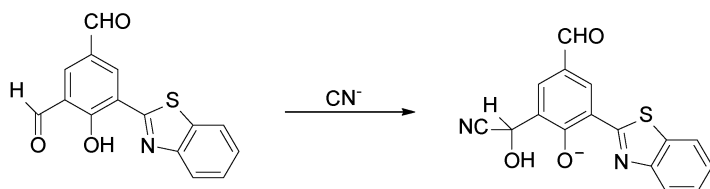


图 3-29 探针 11 的分子结构及可能的反应机理

3.14 四苯乙烯类

图 3-30 中的化合物 TPETPEFN 形成的 AIE 点比量子点发出的光要亮 40 倍^[85]。由于 AIE 的存在,在有限的空间密度越高,产生的亮度就越强。这在一些应用上非常有利,如组织的可视化和对癌细胞的长期跟踪,每个细胞每

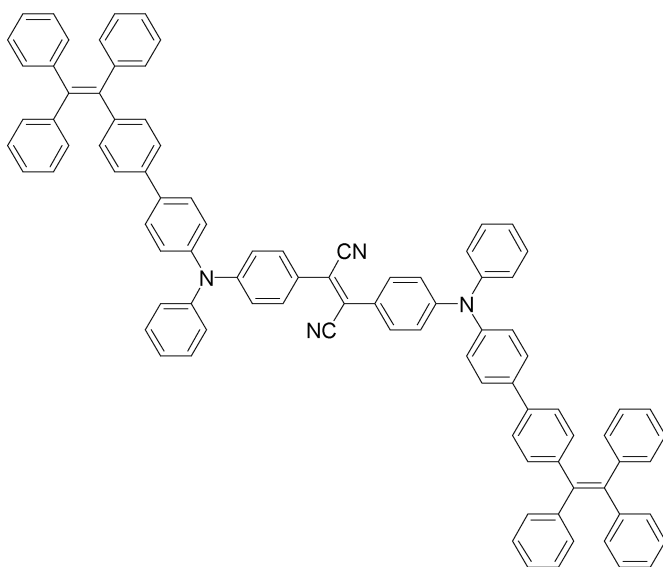


图 3-30 化合物 TPETPEFN 的结构式

次分裂都会使纳米颗粒的数量减半。但亮度也有不利的一面：量子点产生的光纯净且颜色明亮,但 AIE 点产生一个更加宽广、更加温和的光谱。新加坡的 LuminiCell 公司,就是研究生产三种颜色和三种规格的 AIE 点。他们希望能够将 AIE 点应用到如用荧光指导手术等领域。

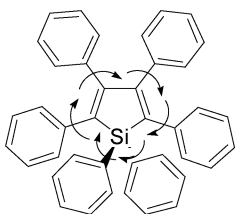


图 3-31
HPS 的化学结构

2001 年,唐本忠教授课题组发现了一个与普通荧光染料聚集荧光淬灭现象相反的发光现象:一个带六个苯基的 Silole 化合物 HPS(图 3-31),在溶液中没有发光的现象,但是当它在硅胶板上干燥后,研究者发现了强烈的荧光^[86]。

由于 Silole 类化合物的特殊荧光性质,现在大都将“在溶液时几乎没有发出荧光,但在聚集态时却能够发出较强的荧光”的现象定义为“聚集诱导发光效应”(Aggregation-induced Emission, AIE 效应)。近年来,越来越多具有 AIE 效应的荧光探针分子被设计并合成出来,并被应用于各个不同的领域,如荧光探针、有机晶体管、发光显示材料、照明材料等。

图 3-32 中列举的四苯乙烯(TPE)及 17~21 等化合物都是具有 AIE 效应的简单荧光分子^[87]。其中,TPE 由于结构非常简单,容易合成,荧光稳定性好,且具有良好的 AIE 效应等优点,受到了研究者的高度关注。

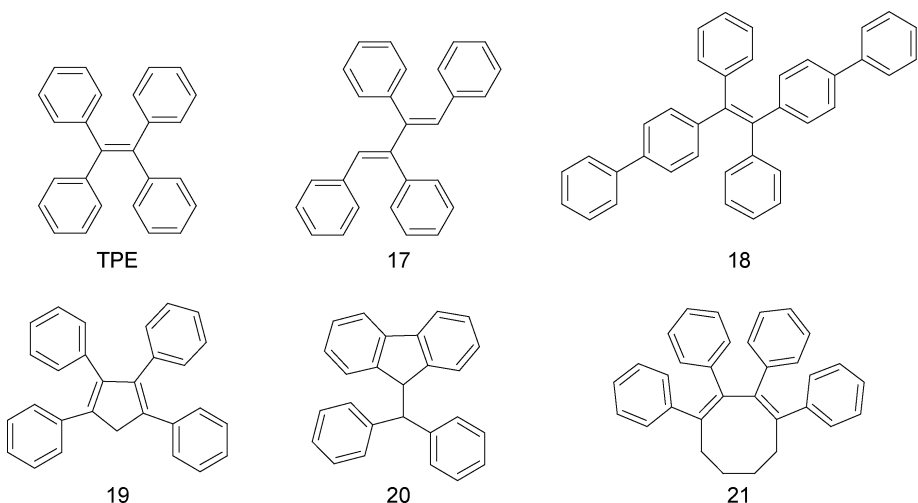


图 3-32 一些简单的 AIE 荧光分子

2008年,张德清教授的课题组利用具有AIE特性的四苯乙烯,在上面连接具有可以特异性结合银离子与汞离子的腺嘌呤基团和胸腺嘧啶基团,合成了化合物22和23,如图3-33所示^[88]。这两个荧光探针在未与金属离子结合时,在溶液中呈分子状态,荧光暗态。只有在与离子发生络合后,多个分子与多个离子结合成为一个聚集体,才打开了AIE荧光的发光通道。

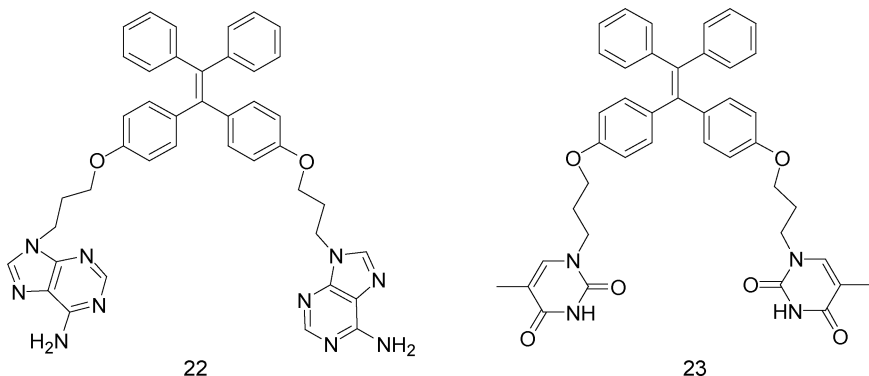


图3-33 化合物22和23的结构式

李振教授等合成并研究了TPE的磺酸盐的衍生物28,如图3-34所示。化合物28是一种具有AIE特性的荧光团,其对天然的牛血清蛋白具有高效的识别作用。该化合物的性质较稳定,可长时间贮存不分解。由于聚集的作用,在溶液中的Stokes位移较大。它在中性的磷酸盐缓冲溶液中没有荧光,向其中加入血清蛋白后,溶液发出荧光并逐渐增强^[89]。

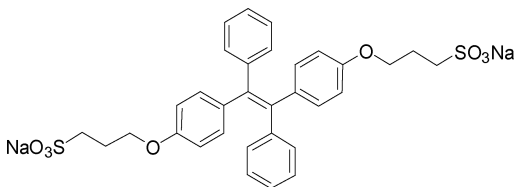


图3-34 化合物28的结构式

3.15 其他类荧光团染料

3.15.1 由迈克尔加成合成的染料

氰化物是一种很好的亲核试剂,因此氰离子能够攻击迈克尔受体。近年来,一大批关于迈克尔加成反应原理设计的氰离子选择性探针被开发出来。Kim等人^[90]设计了一种含有 α, β -不饱和羰基的橙酮氰离子探针12(图3-

35)。探针 12 本身没有荧光,然而加入氰离子后,随着化合物结构从 12-I 到 12-II 的转变,其荧光也增强了 1 300 倍,同时化合物溶液的颜色从黄色逐渐转变为无色,探针 12 的检出限仅有 $1.7 \mu\text{mol/L}$ 。

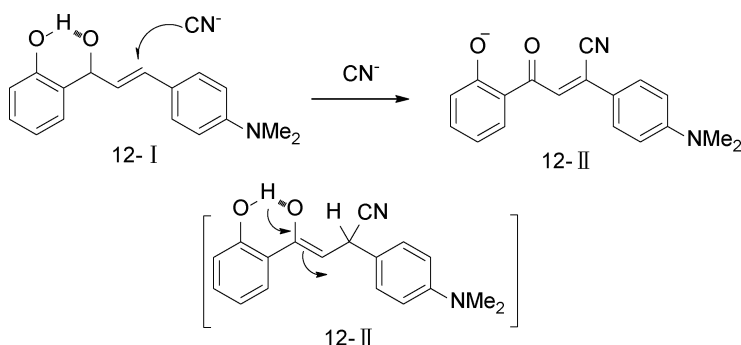


图 3-35 探针 12 的分子结构和可能的反应机理

利用氢键活化迈克尔受体的方法开发了香豆素基荧光探针 13^[91],该探针能够同时通过颜色和荧光的变化来识别氰离子(图 3-36)。通过迈克尔反应,氰离子攻击香豆素基团的 4 号位碳原子,随后发生分子内电子转移,由于氰基的强吸电子作用,氰基与酰胺键发生环化,结构的改变影响了光谱的变化,课题组还通过 X 射线等方式对氰化物反应前后的探针结构进行了分析,从而直观简单地证明了这一反应机理的正确性。

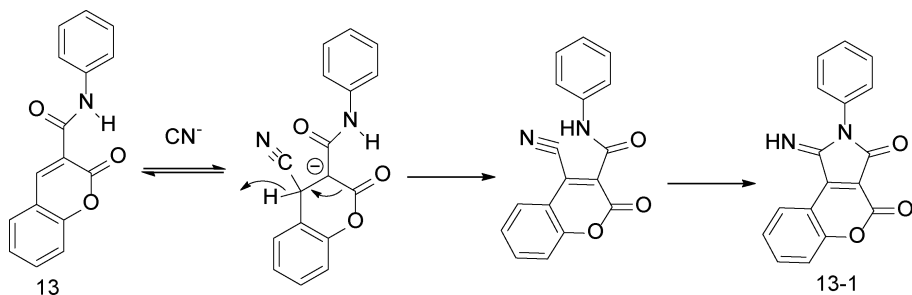


图 3-36 探针 13 的分子结构及其可能的反应机理

Kim 和 Lee 等人^[92]报道了一个烯酮功能化的氰离子探针 14,该离子探针能够实现在缓冲溶液中对氰化物的专一性识别(图 3-37)。其识别机理是当氰离子进攻探针受体时首先发生迈克尔加成反应,然后发生(1,3)- σ 分子重排。

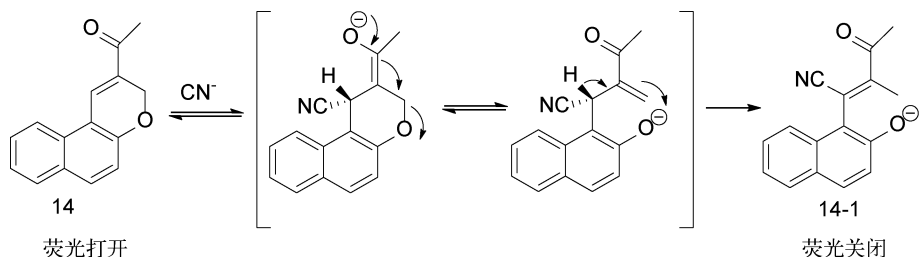


图 3-37 探针 14 的分子结构及其可能的反应机理

3.15.2 基于苯并吡啶型亲核加成的染料

将具有明显色谱性质的吡啶基团作为显色基团和反应基团进行修饰和设计是一个非常具有研究意义的氰离子检测方向。同时,近期报道的大量文献都成功地将这一类氰离子荧光探针应用于生物成像和传感技术。由于吡啶基团中带正电荷的氮原子对 CN^- 中 sp^2 杂化的亲核性碳原子具有强吸引力,同时由于氰离子与吡啶基团的 $\text{C}=\text{N}$ 发生迈克尔亲核加成反应,反应后化合物的 ICT 过程被打断,导致探针颜色和激发光谱变化,因此吡啶基团的 $\text{C}=\text{N}$ 可以作为一个氰离子反应位点进行比色识别和荧光比率识别。基于这一特性,Chae Yeong Kim 等人^[93]将苯并噻唑衍生物和 4-*N,N*-二甲基苯甲醛进行组装,开发设计出了一种新的氰离子荧光探针 15(图 3-38),探针 15 对氰离子具有非常明显的选择性,不仅能够通过颜色对氰离子进行识别,还能够实现荧光检测,该探针具有非常高的荧光量子产率,探针 15 能够在缓冲溶液中对氰离子进行识别,具有极低的检出限。该探针的另一个特点是加入汞离子后还能够恢复到原来的结构。Wei Dong 等人报道了一个氰离子探针 16^[94],该探针由茈和苯并噻唑组装构成。通过光谱滴定发现,探针对氰离子识别具有极高的选择性和灵敏性,并且其溶液表现出了极为明显的荧光变化和颜色变化,以至于肉眼能够直接观察,当氰离子滴加到体系中时,表现出了很明显的光谱位移。氰离子直接进攻噻唑环的不饱和碳氮双键,导致分子内电荷转移被打断,该课题组通过¹H NMR(核磁共振氢谱)和质谱对研究机理进行了证明。Wei Dong 及其团队在前期工作的基础上进一步开发了一种选择性极好的新型苯丙吡啶类氰离子荧光探针 17^[95]。该探针能够发出红色荧光,是一种双通道氰离子探针。向探针溶液体系中逐渐滴加氰离子时,探针表现出非常大的荧光蓝移(130 nm)和吸收峰蓝移(100 nm)。明显的颜色变化能够

很容易地被肉眼观察到。其他类的阴离子对该探针的光谱不产生任何影响。通过氰离子的亲核攻击,苯并噻唑的 $C=N$ 键断开,导致分子内电荷转移被打断,从而影响了体系的颜色和光谱改变。该探针对于氰离子的最低检出限为 $0.29 \mu\text{mol/L}$ 。

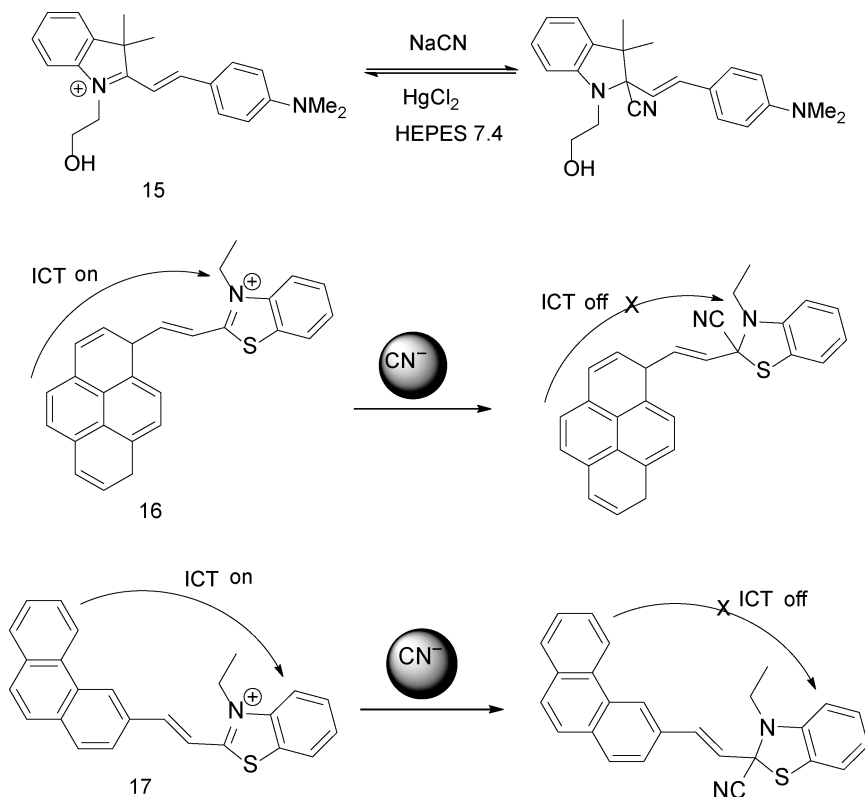


图 3-38 探针 15~17 的分子结构及其可能的反应机理

Guo 和 Yang 等人成功地开发了一系列香豆素半菁类氰离子探针 18~20^[96] (图 3-39)。此类探针能够根据比色或者荧光比率对氰离子进行选择性的识别。由于亲核加成反应,氰离子加入探针溶液体系后,氰离子打断了吡啶基团和香豆素之间的共轭体系,导致化合物的颜色和荧光发生明显的变化。该识别机理通过原位核磁和质谱等方式进行了理论验证。

Goswami 等人^[97]介绍了一种新的探针 21,该探针是基于吡啶基团和咪唑基团设计合成的。通过比色法和荧光比率法实现了对氰离子的选择性检测,该探针的优点是能够在很短的时间内实现对氰离子的识别(少于 90 s),并且

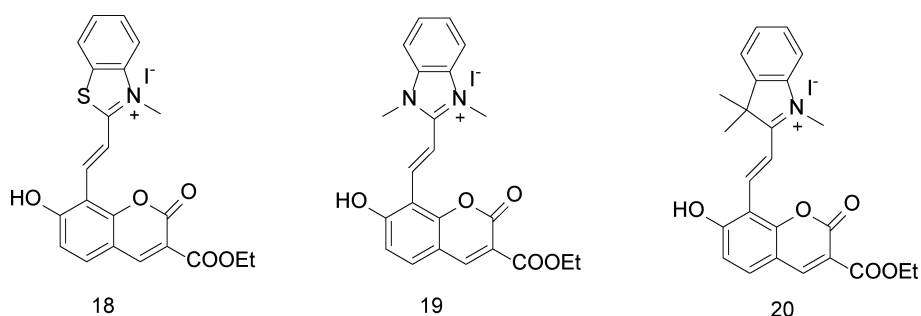


图 3-39 探针 18~20 的分子结构

在乙腈和水的混合溶液中具有非常低的检出限,约为 $0.54 \mu\text{mol/L}$ 。该团队用薄层色谱板技术研发的试纸条能够有效地实现氰离子在裸眼条件下的检测。Yin 和 Huo 等人^[98]设计和开发了一种包含三个吡啶基团的新型氰离子荧光探针 22,该探针在 DMSO 的溶液系统中具有蓝-绿色荧光,可以选择性识别氰离子。由于氰离子的亲核加成作用破坏了体系大 π 共轭键,导致其荧光发生明显变化。该探针的检测限为 $45 \mu\text{mol/L}$ (图 3-40)。

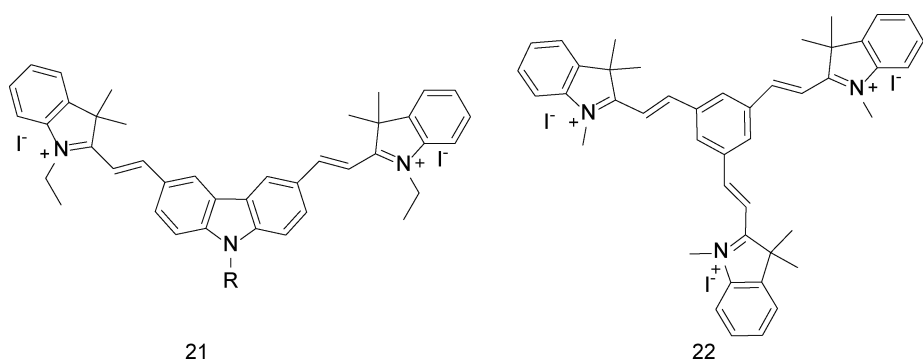


图 3-40 探针 21 和 22 的分子结构

Yang 和 Li 等人^[99]介绍了一种新的噻吩嗪类氰离子荧光探针 23(图 3-41)。该探针具有响应时间短、检测限低($6.67 \times 10^{-8} \text{ mol/L}$)的优点。探针对于氰离子识别体现出了非常明显的颜色变化:从紫色变为无色;加入氰离子后绿色荧光逐渐消失。研究者还开发出该探针的试纸条,用于检测环境中的氰化物并取得了良好的效果。研究者还将该探针应用于 Hela、GES 等多种癌细胞中,对细胞毒性等进行了详细测试,同时将该探针应用于斑马鱼中对鱼体的氰离子浓度进行检测,取得了良好的效果。

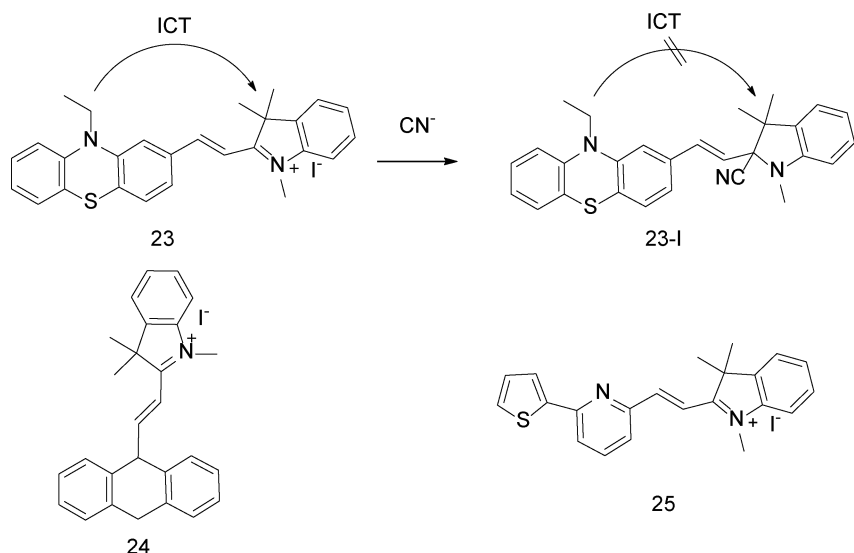


图 3-41 探针 23~25 的分子结构及化合物 23 可能的反应机理

Yang 等人设计开发了一种新的吡啶类荧光探针 24, 该探针属于荧光“开”响应型(图 3-41)^[100]。据报道, 探针能够在几秒内实现对氰离子的迅速识别。加入氰离子后探针的颜色从红色迅速变为无色, 同时伴随着荧光的迅速增强。他们通过理论计算对氰离子识别机理进行了验证, 结合其他数据证明, 加入氰离子后, 探针的 ICT 过程被打断。Mahapatra 等人^[101]用噻吩-吡啶和吡啶设计了共轭氰离子荧光探针 25, 根据报道, 探针能够实现对氰离子识别的最低检出限为 $1.5 \mu\text{mol/L}$ 。该探针成功地实现了在 RAW 细胞中的生物成像(图 3-41), 在 1 min 内能够实现对氰离子的快速识别, 加入氰离子前后的明显颜色变化能够通过肉眼观察到, 该变化也能证明 TLC 过程的发生。

基于此, Mahapatra 又设计了一个新的探针 26(BISP)^[102], 该探针将苯并噻唑基团和螺吡喃组装在一起。该探针经过光处理后能够断开醚键, 进而开环形成 26-I。在 HEPES 缓冲溶液中加入氰离子后, 开环后的分子结构在 445 nm 的激发光下检测到发生了迈克尔加成反应, 形成 26-III。该探针对于氰离子具有高度选择性, 同时具有非常低的检出限, 研究者进一步在 26-III 的溶液中加入 Au^{3+} 溶液, 26-III 又恢复到了 26 结构(图 3-42)。

Huo 和 Yin 等人^[103]将三苯基和吡啶基团进行组装, 报道了新的荧光探针 27, 这一新的研究发现探针 27 在乙醇和水的混合溶液中能够实现氰离子识别的荧光“开”响应, 其检出限仅有 $50 \mu\text{mol/L}$, 研究者将该探针应用于 Hep G2

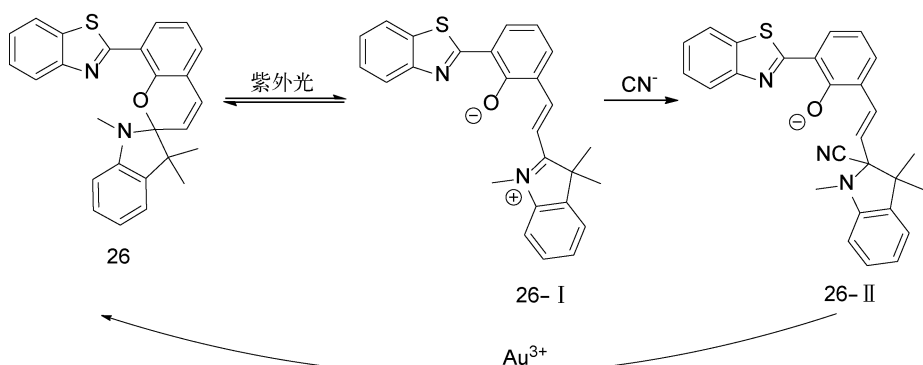


图 3-42 探针 26 的分子结构及其可能的反应机理

细胞中的氰离子识别。Feng 等人^[68]将菲咪唑和吡啶等单元组合在一起,设计了氰离子荧光探针 28,该探针同样依靠氰离子的亲核加成反应实现了检测,在探针 28 的黄色溶液中加入氰离子时,溶液逐渐转变为无色,但是在 432 nm 处的荧光却不断增强。类似地,Sun 和 Duan 等人^[104]开发了一个荧光比率探针 29,该探针的溶液体系中加入氰离子后,溶液从黄色逐渐转变为无色,同时红色荧光逐渐转变为蓝色荧光。Bhatyacharya 等人^[105]介绍了一种双咪唑基氰离子荧光探针 30,它可以实现在水中识别氰离子。该探针识别氰离子的速度非常迅速,根据荧光滴定数据计算得到该探针的荧光检出限为 0.38 ppm (图 3-43)。

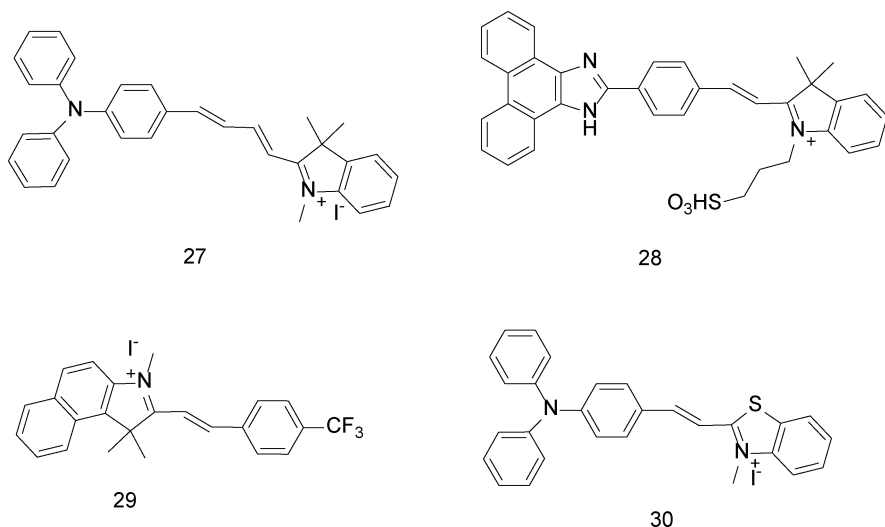


图 3-43 探针 27~30 的分子结构

3.15.3 基于金属配合物类荧光团

大量研究利用 CN^- 配位能力特别强的特点,开发了基于金属配合物的氰化物探针,这一类探针具有灵敏性好、选择性高、快速检测等优点。探针分子与金属离子配位形成配合物后,氰离子能够将配合物中的配位金属置换出来,继而实现了 CN^- 的检测识别。配位型氰离子探针可以分为两类,一类是 CN^- 与金属配合物的金属竞争性配位,探针分子的配体分子被释放出来。另一类是 CN^- 与探针分子中的金属直接发生配位。Hong 等人^[106]研究了基于钴-席夫碱和香豆素类结构的探针分子 31(图 3-44),当加入 2 个当量的 CN^- 时, CN^- 和钴以 2:1 的比例进行配位,这样就使得香豆素荧光团向钴原子光诱导的电子转移发生中断,产生荧光,从而实现了探针对 CN^- 荧光识别的单一选择性。

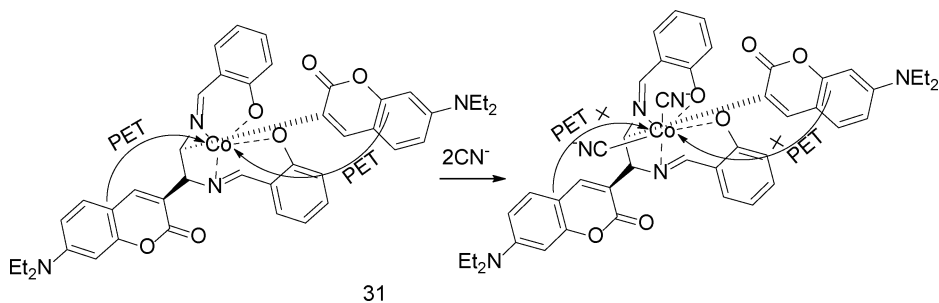


图 3-44 探针 31 被诱导后的荧光变化机制

Tian 等人^[107]研究开发了基于氰化物探针的铜配合物探针 32(图 3-45)。其结构由作为荧光团的含萘基的不对称乙烯基团和一个能够与铜离子络合的亚胺供体组成。该化合物在乙腈中用 365 nm 的光照射,在 607 nm 处会有一个新峰出现,溶液从无色变到蓝色。其可能的反应机理是从 32a 到 32b 的一个过程。然而当用 550 nm 的光照射后,蓝色溶液变为无色,32a 的紫外光谱开始恢复。当 Cu^{2+} 加入含有 32a 的溶液中后,颜色从无色变为黄色,这是 32a - Cu^{2+} 络合物形成的结果。异构体 32b - Cu^{2+} 的闭环结构是通过 32a - Cu^{2+} 的溶液在 365 nm 的光的照射下产生的,溶液颜色从黄色到蓝色,从吸收光谱上可以看出,354 nm 处吸收峰逐渐降低并在 584 nm 处出现新峰。再用自然光照射,溶液颜色和吸收光谱都相应恢复。

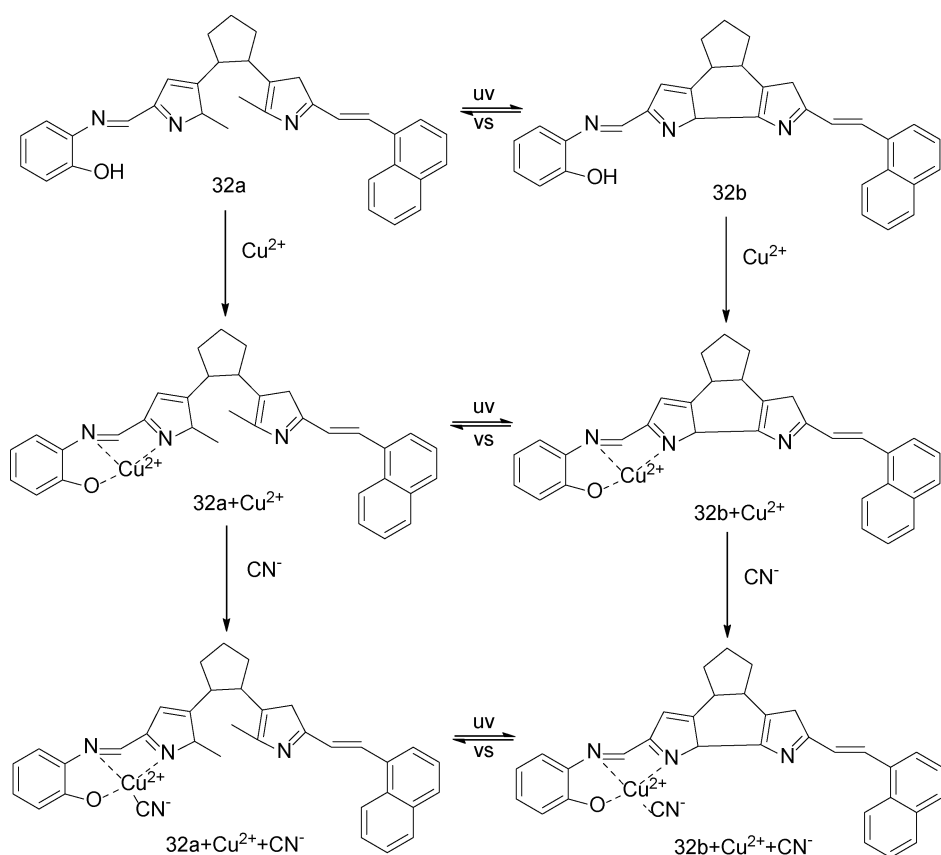


图 3-45 探针 32a 和 32b 与 Cu^{2+} 的络合过程及配合物
32a - Cu^{2+} 和 32b - Cu^{2+} 与 CN^- 的反应过程

将 CN^- 加入含有 32a 和 Cu^{2+} 的溶液后, 354 nm 处的吸收带降低。其原理是由于形成了复杂的络合物 32a - Cu - CN。用 365 nm 光照射, 络合物 32a - Cu - CN 在 350 nm 处的吸收峰强度逐渐降低, 在 581 nm 处出现一个吸收峰, 伴随着从黄色到蓝色的颜色变化。在可见光的照射下, 颜色由蓝色变到黄色, 原始吸收强度恢复。每加入 1 个当量的 Cu^{2+} 时, 32a 的荧光会逐渐增强。这种变化取决于两个因素, 包括通过 32a 与 Cu^{2+} 络合激发自由 $\text{C}=\text{N}$ 键异构的抑制作用和抑制光诱导电子转移(PET)淬灭。加入 3 个当量的 CN^- 到 $32a - \text{Cu}^{2+}$ 中会导致在 448 nm 处的荧光强度明显增加, 这表明形成了络合物 32a - Cu - CN。该探针对 CN^- 的检出限为 $22.5 \mu\text{mol/L}$ 。

Guo 等人开发了一种基于氰基配合金属复合物的氰离子探针 33^[108], 在体积比为 9 : 1 的 $\text{CH}_3\text{CN} - \text{Tris} - \text{HCl}$ 缓冲溶液中, 由于铜离子与酰肼形成络合

物,这一过程促进 PET(光诱导电子转移)或 EET(电子能量转移),导致罗丹明荧光团荧光减弱。然而加入氰离子后,氰离子和铜的配合物发生反应,进一步配位,导致罗丹明基团强荧光恢复。探针和氰离子之间的反应可以在 5 min 之内完成,其检测限为 $1.4 \times 10^{-7} \mu\text{mol/L}$ (图 3-46)。

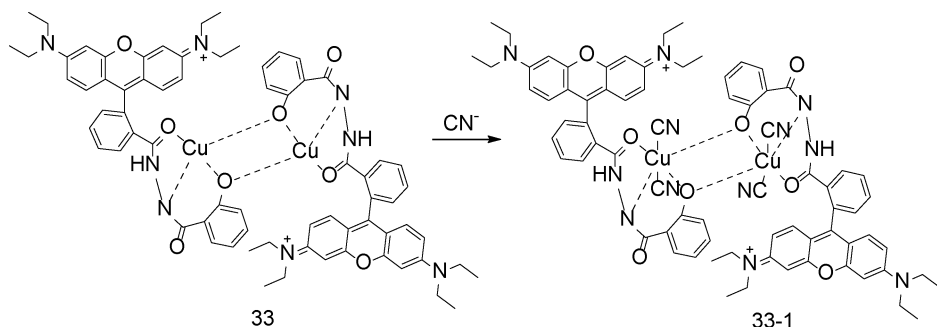


图 3-46 探针 33 加入氰离子后导致荧光变化的反应机理

将检测氰化物的荧光探针应用于含水的介质中,以实现水环境中氰离子的识别,比只能在有机溶液中检测更有实际意义。部分金属离子置换反应的传感器已被应用于在水介质中检测氰离子。

Yoon 和 Park 等人设计了这种类型的氰离子探针 34^[109](图 3-47),该探针检测氰离子是在 20 mmol/L 的 HEPES 缓冲溶液中($\text{pH} = 7.4$, 0.5% CH_3CN)。在探针 34 溶液体系加入铜离子后,718 nm 处吸收峰降低,同时 743 nm 处有新峰产生,由于氰离子和铜离子反应形成稳定的 $[\text{Cu}(\text{CN})_x]^{n-}$ 使得荧光增强,更重要的是,该探针对其他阴离子没有响应。

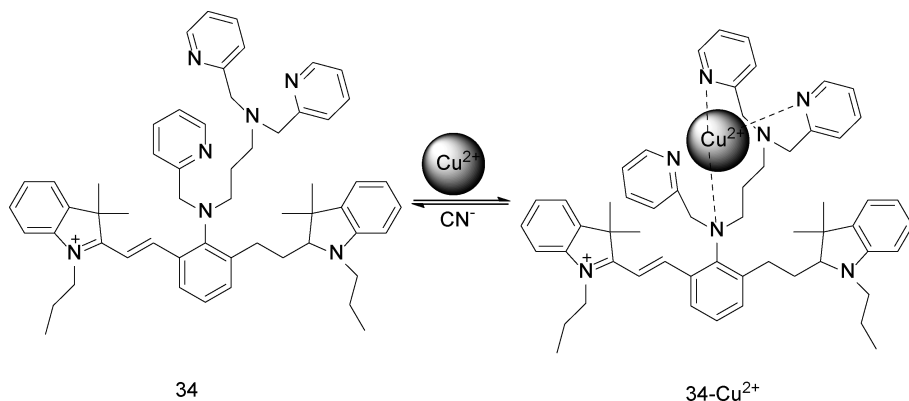


图 3-47 探针 34 和 34-Cu²⁺ 的结构

Tae^[110]报道了一个氰离子荧光探针 35, 该探针是在氮蒽的基础上设计合成的一种荧光“关”响应型氰离子探针, 能够在 DMSO-H₂O (体积比 95:5) 的检测环境中实现从橙色到淡蓝色的变化过程 (图 3-48)。Job 点测试数据显示, 探针 35 与氰离子之间的反应是按照 1:1 进行的。并且该探针能够实现氰离子识别的最低检出限为 1.9 μmol/L。该探针的 9 号位置首先与氰离子发生了亲核加成反应, 得到了 35-I, 然后迅速发生氧化反应得到 35-II。Kaur 和 Singh^[111]介绍了三芳基烷类荧光染料 36 作为氰离子探针, 该探针也是利用了氰离子与探针之间的亲核反应。这一探针能够在水溶液中对氰离子的选择性识别, 溶液加入氰离子之后颜色能够从蓝绿色逐渐转变为无色, 该探针具有成为滴定检测氰离子的实用手段的潜力。Afkhami 等人^[112]将甲基紫固定在醋酸纤维素膜上设计了一种比色氰离子探针 37。当氰离子遇到甲基紫基团时, 其在 598 nm 处的吸收峰逐渐降低, 该探针的检出限为 62 ppm。

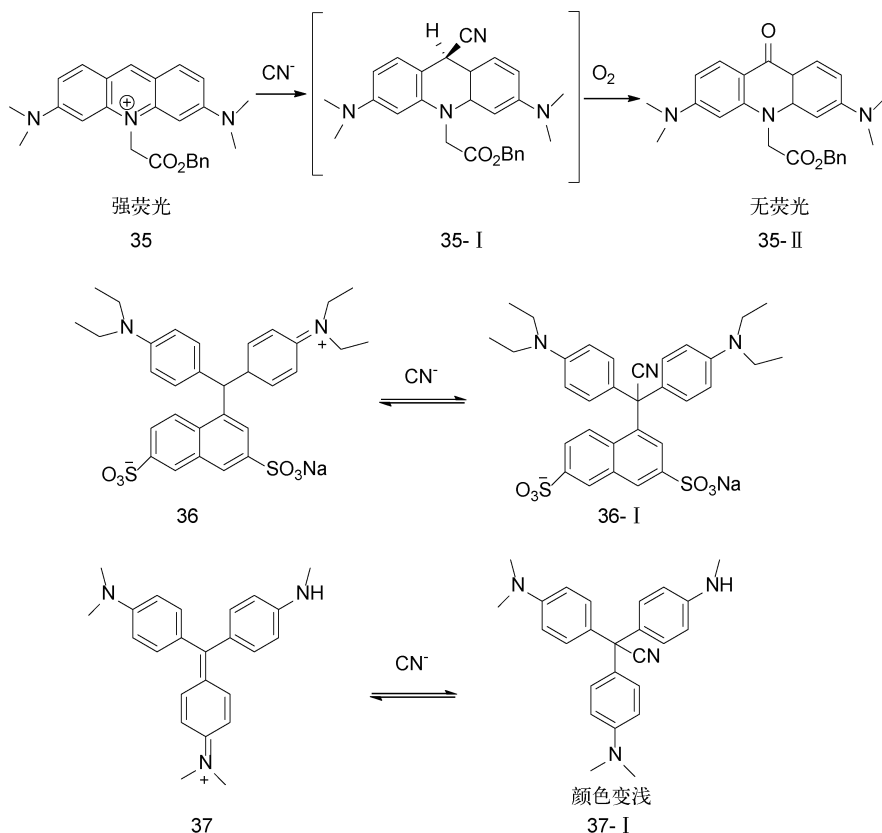


图 3-48 探针 35~37 的分子结构及其可能的反应机理

C—Si 键被成功地应用到了氟离子识别等方面。Machado 等人^[113]开发了一种探针 38, 该研究显示探针在 CATB 溶液中(pH=8)能够选择性识别氟离子, 其反应机理是氟离子的加入导致了硅氧键断裂, 形成了 38-I 的结构, 但是该反应需要的时间较长(图 3-49)。据报道该探针的检出限为 1.48×10^{-5} mol/L, 不过具有实际现实意义的是该探针能够实现检测人体血液环境中的氟离子。

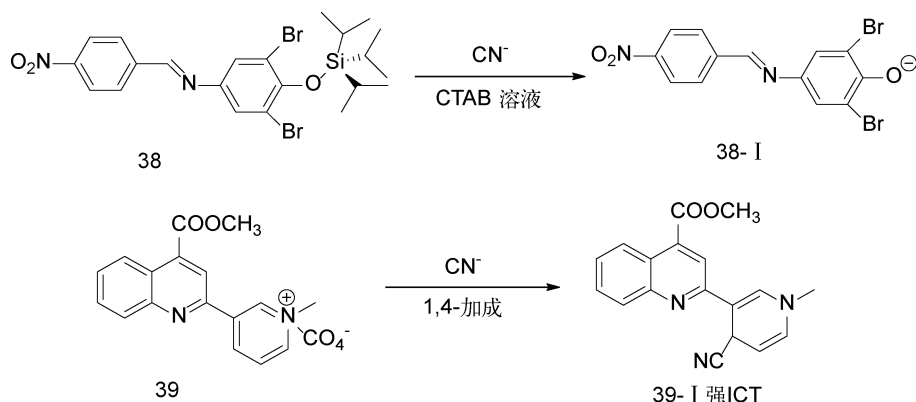
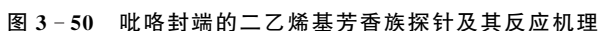


图 3-49 探针 38~39 的分子结构及其可能的反应机理

Mashraqui 等人以吡啶为基础设计合成了氟离子荧光比率探针 39^[114], 该探针也能够实现对氟离子的比色检测。探针的识别机理是具有亲核性的氟离子攻击吡啶环的 4 号位, 发生加成反应, 形成 39-I 结构, 增强了 ICT 进程。探针 39 与氟离子之间按照 1:1 的反应当量比进行的。研究者根据原位核磁共振验证了这一反应机理的正确性。

3.15.4 五元环联六元环类荧光团

对 Zn^{2+} 特异性视比例传感器的需求加上在特定阳离子探针设计方面的专业知识促使研究人员设计了一种简单的荧光团, 吡咯封端的二乙烯基芳香族已知系统是用于合成电致变色和低带隙聚合物的强荧光结构单元(图 3-50)。由于已知联吡啶部分是过渡金属离子的好配体, 设计了一些吡咯封端的 5,5'-二乙烯基-2,2'-联吡啶衍生物(图 3-50 中 3a-c)使用相应的吡咯甲醛(1)和 2,2'-联吡啶二磷酸酯(2)的维蒂希-霍纳反应(Wittig-Horner 反应), 产率为 25%~40%。该荧光团在 407 nm 处吸收, 在乙腈中的 537 nm ($\Phi=0.4$)处强发射, 具有 130 nm 的大 Stokes 位移^[114]。



“开”响应

π -共轭

“关”响应

(a) 含硼的 π -共轭系统作为氟离子化学传感器原理



图 3-51 含硼化合物 48、49

常数, 约为 $10^3 (\text{mol/L})^{-1}$, 对其他卤素离子也不敏感。对比单硼系统化合物 48, 化合物 49 有 4 个硼原子, 在吸收光谱上通过和氟离子逐步络合表现出多级变化。

Zhu 组^[116]设计了两亲性的荧光比率型传感器 50, 可运用 ICT 机理在缓冲水溶液中和生物体内检测氟离子。亲水的苯并噻唑阳离子半菁蓝染料作为荧光团, 因为它有好的光谱表现、优秀的 ICT 结构、没有毒性和亲油性的 TBDPS 部分, 所以作为氟离子的特别反应基, 反应机理如图 3-52 所示。在乙醇和 PBS 缓冲溶液中(体积比为 3 : 7), 50 的吸收带在 407 nm 处, 当氟离子被逐渐加入后, 最大吸收峰在 110 nm 处红移, 等吸收点在 442 nm 处, 溶液颜色从浅黄到橘色, 能肉眼观察到。在荧光光谱中, 没加氟离子时最大发射峰在 500 nm 处, 加入氟离子后红移到 558 nm 处, 等发射点在 539 nm 处。另外, 在荧光强度上呈现出好的线性相关, 所以 50 可以作为检测氟离子的比率型传感器。

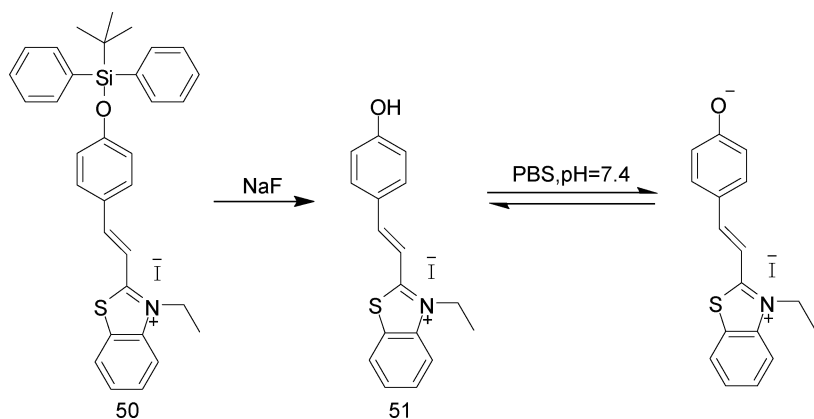


图 3-52 传感器 50 和 F^- 的反应机理

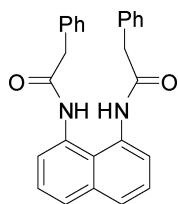


图 3-53
探针 52 的结构式

Xu 组^[117]报道了如图 3-53 所示的新探针 52, 该探针络合氟离子后荧光增强, 其他卤素离子引起轻微的荧光增强, 这是因为络合了氟离子以后, 分子变得更加平面, 更可能增加荧光, 而氯、溴、碘的络合物没有表现出更多的平面性, 因此荧光增强不明显。另外, 一些更大的离子有更弱的络合键, 是好的荧光淬灭剂, 可能抵消因结构变化引起的荧光增加。