

Zn²⁺-胆红素络合物的超快激发态动力学研究

陈琦琛, 刘阳依, 曹潇丹, 陈 壮, 曹思敏, 潘海峰, 陈缙泉*

华东师范大学精密光谱科学与技术国家重点实验室, 上海 200062

摘 要 胆红素(Bilirubin, BR)是脊椎动物分解代谢血红素的最终产物之一, 具有抗氧化和消炎等作用。体内保持正常含量的胆红素对人类的健康起着非常重要的作用, 被认为有利于预防癌症、中风、糖尿病和心血管等疾病的发生^[1-2]。然而胆红素过量则被认为是肝功能障碍的征兆, 同时也是引起新生儿严重脑损伤的原因^[3]。因此, 对人体中胆红素含量的快速精准检测具有十分重要的应用价值。目前为止, 用于检测血清样品中胆红素含量的方法主要有重氮法、过氧化物酶法、光纤传感检测法和荧光光谱法等^[4]。其中, 荧光光谱法具有检测迅速和操作简便的优势^[5], 吸引了越来越多研究人员的关注。但是, 由于胆红素自身的荧光量子产率通常低至10⁻⁴量级^[6], 直接荧光测量难度很大, 因此通常采用间接方式解决胆红素含量测量的难题。例如, Wabaidur等^[7]通过胆红素猝灭Ru(bpy)₃²⁺荧光的方式来测量胆红素的含量; Aparna等^[8]通过胆红素猝灭铜纳米团簇荧光的方式来测量胆红素的含量; Iwatani等^[9]通过UnaG蛋白结合胆红素增强荧光的方式来测量胆红素的含量。UnaG与胆红素具有极高的亲和力, 且自身几乎不发射荧光, 其与胆红素结合后, 会将胆红素的荧光提高三个数量级^[10], 可以用作人体内的荧光传感器^[11]。然而, 由于蛋白的制备和保存的成本十分高昂, 人们更希望使用有机小分子或无机分子对胆红素的荧光进行增强。例如, Yang等^[12]发现Zn²⁺有助于显著增强胆红素的荧光, Kotal等^[13]提出了将Zn²⁺用于胆红素代谢物(尿胆素原)含量测量的方法。为了研究Zn²⁺增强胆红素荧光的机理并用于胆红素含量的测量, 研究首先使用了稳态荧光光谱和紫外-可见吸收光谱表征了不同Zn²⁺浓度下胆红素的光学特性, 并采用相对法测量了其量子产率。通过分析Zn²⁺-胆红素络合物在不同探测波长下的激发谱, 提出了该络合物具有两个发光基团的设想。为了进一步验证关于发光基团的设想, 使用了飞秒瞬态吸收光谱的手段研究分析了Zn²⁺-胆红素络合物的超快光动力学过程, 分析结果与之前发表的对胆红素和Zn²⁺配位方式的结论有很好的吻合。根据瞬态吸收光谱和稳态荧光光谱的数据以及所提出的模型, 得到了在有无Zn²⁺条件下胆红素的平均激发态寿命, 进一步计算出了其辐射跃迁速率和非辐射跃迁速率的理论值。通过数据对比, 得出了络合物相对单纯胆红素有更大的消光系数而具有更高的辐射跃迁速率的结论, 同时发现胆红素与Zn²⁺的配位方式增加了胆红素以锥型交叉退激发态的效率。

关键词 锌离子; 胆红素; 荧光增强; 飞秒瞬态吸收

中图分类号: R313 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2019)06-1667-05

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

试剂: 胆红素(Bilirubin, 99%)购自北京百灵威科技有限公司; 无水乙酸锌(Zincacetate, 99.5%), 氢氧化钠(NaOH, ≥96%), 荧光素(Fluorescein)均购自国药集团化学试剂有限公司; N,N-二甲基甲酰胺(N,N-Dimethylformamide, ≥99.8%)购自上海阿拉丁生化科技股份有限公

司。以上所有药品与试剂均未进一步纯化。实验所用水均为18.2 MΩ去离子水。

实验仪器: 紫外-可见分光光度计(TU1901, 北京普析通用仪器有限责任公司), 稳态荧光光谱仪(FluoroMax-4, Horiba), 飞秒瞬态吸收系统包含1 kHz钛蓝宝石激光器(Astrella, Coherent)、光参量放大器(OPerA Solo, Coherent)和瞬态吸收光谱仪(Helios-EOS fire, Ultrafast System)。

1.2 样品

样品制备: 避光条件下, 将新鲜配制在DMF(二甲基甲

收稿日期: 2018-04-13, 修订日期: 2018-09-12

基金项目: 国家自然科学基金面上基金项目(11674101)资助

作者简介: 陈琦琛, 1992年生, 华东师范大学精密光谱科学与技术国家重点实验室硕士研究生 e-mail: 1607801922@qq.com

* 通讯联系人 e-mail: jqchen@lps.ecnu.edu.cn

酰胺)溶液中的 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 胆红素与 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Zn^{2+} (乙酸锌)按照不同比例混合,并用 DMF 进一步稀释到不同的特定浓度。如无特殊说明,稳态吸收和荧光实验中,所有溶液中胆红素的浓度均保持为 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, Zn^{2+} 的浓度分别为 0, 10, 20, 30, 50 和 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

稳态荧光: 激发波长为 470 nm, 荧光光谱的强度用该样品在 470 nm 处的吸光度来校正(用荧光强度除以该样品在 470 nm 处的吸光度值以消除吸光度(浓度)不同对荧光强度的影响)。

样品荧光量子产率的测量采用相对法, 参比样品选用荧光素的碱性溶液($0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 水溶液, 相对量子产率为 $0.95^{[14]}$)。

瞬态吸收: 样品是含有 Zn^{2+} 的胆红素 DMF 溶液(Zn^{2+} 的浓度为 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 胆红素的浓度为 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 激发波长为 530 nm, 探测波段为 330~660 nm。

1.3 辐射跃迁速率与非辐射跃迁速率计算

物质的荧光量子产率 QY 可以由相对法测量获得, 也可由式(1)计算得出

$$QY = \frac{k_{\text{RAD}}}{k_{\text{EXC}}} \quad (1)$$

式中 k_{RAD} 为物质的辐射跃迁速率, k_{EXC} 为物质的激发态衰退速率。

k_{EXC} 的值为激发态寿命 τ_{EXC} 的倒数

$$k_{\text{EXC}} = \frac{1}{\tau_{\text{EXC}}} \quad (2)$$

当瞬态吸收检测到两个激发态(发射)信号时, 平均激发态寿命 $\overline{\tau_{\text{EXC}}}$ 为

$$\overline{\tau_{\text{EXC}}} = \frac{\sum_i \tau_i A_i}{\sum_i A_i}, \quad i = 1, 2 \quad (3)$$

式(3)中, τ_i 对应第 i 激发态(发射)的寿命, A_i 为对应 τ_i 时刻下瞬态吸收光谱信号的面积积分。

利用式(1)和式(2), 辐射跃迁速率为

$$k_{\text{RAD}} = QY \cdot k_{\text{EXC}} = \frac{QY}{\tau_{\text{EXC}}} \quad (4)$$

非辐射跃迁速率 k_{NR} 为

$$k_{\text{NR}} = k_{\text{EXC}} - k_{\text{RAD}} \quad (5)$$

2 结果与讨论

2.1 稳态光谱

为了研究 Zn^{2+} 对胆红素光谱特性的影响, 首先测量了胆红素在 Zn^{2+} 浓度梯度下的稳态吸收和发射光谱。图 1(a) 为胆红素溶液中加入不同浓度 Zn^{2+} 后的吸收光谱。 Zn^{2+} 浓度为零时, 胆红素在溶液中的吸收特征峰位于 450 nm 处, 与文献报道一致^[15]。随着溶液中 Zn^{2+} 浓度的增加, 胆红素的 450 nm 特征吸收峰强度逐渐减弱, 同时在 ~ 526 nm 处出

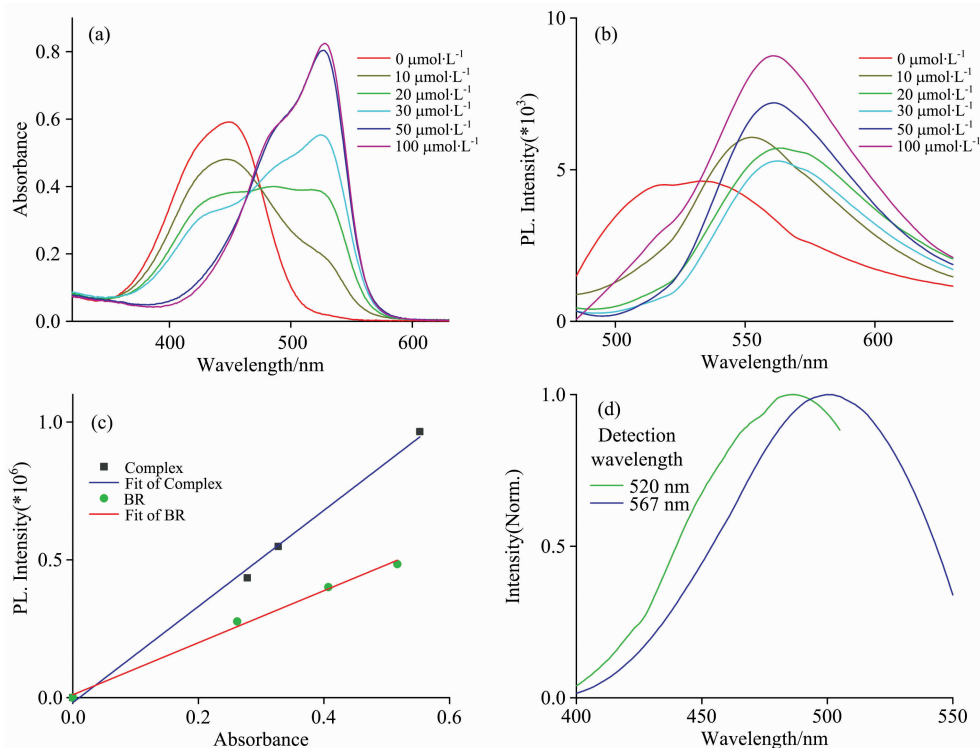


图 1 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 胆红素在不同 Zn^{2+} 浓度下, 溶液的 (a) 紫外-可见吸收光谱与 (b) 荧光光谱, (c) 胆红素和络合物的荧光强度-吸光度, (d) 络合物在不同探测波长下的激发谱

Fig. 1 (a) UV-Vis and (b) Fluorescence of $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ BR with different concentration of zinc ions, (c) Plot of fluorescence intensity vs absorbance for BR and the complex, (d) Fluorescence excitation spectra of the complex at different detection wavelength

现新吸收峰并逐渐增强,说明胆红素与 Zn^{2+} 的络合物的形成。研究发现,当 Zn^{2+} 浓度为 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 及以上时,吸收光谱不再有明显变化。除此之外,研究发现在高浓度 Zn^{2+} 加入时,络合物的吸收谱与胆红素和 UnaG 结合物的吸收谱形状相似。

图 1(b)为胆红素溶液中加入不同浓度 Zn^{2+} 后的荧光光谱。 Zn^{2+} 浓度为零时,胆红素在溶液中的荧光发射峰位于 530 nm 处,与文献报道一致^[16]。随着 Zn^{2+} 浓度的增加,荧光光谱逐渐红移,荧光峰从 530 nm 逐渐位移到约 567 nm 后只有强度上的增加。从图中可以直接观察到所有荧光的峰值在相同数量级,表明 Zn^{2+} 的加入对胆红素的荧光并没有明显增强。

表 1 不同 Zn^{2+} 与胆红素比例下,物质的荧光量子产率
Table 1 Fluorescence Quantum Yield of different rate of BR and Zinc ions

$c_{Zn^{2+}} : c_{BR}$	$QY/(\times 10^{-4})$
0	3.3
1	3.6
2	3.4
3	3.0
5	3.8
10	6.1

为量化 Zn^{2+} 的加入对荧光增强的效果,测量了在不同 Zn^{2+} 与胆红素浓度比例下物质的荧光量子产率,如表 1 所示。从表 1 中可以看出, Zn^{2+} 的加入引起了胆红素荧光增强,但是荧光量子产率增强效果并不显著。图 1(c)为单纯胆红素溶液和 Zn^{2+} -胆红素络合物溶液(对应溶液中 $c_{Zn^{2+}} : c_{BR} = 10 : 1$)的荧光强度随物质吸光度的数值变化和对这些数值进行线性拟合的结果,单纯胆红素的拟合斜率为 $\text{Slope}_{BR} = 0.94 \times 10^6$,络合物的拟合斜率为 $\text{Slope}_{Complex} = 1.74 \times 10^6$,络合物的荧光量子产率约为胆红素的 1.85 倍。图 1(d)为络合物在不同探测波长下的激发谱,其激发峰的位置与胆红素的特征吸收峰不重合,这进一步证明了络合物溶液中已经几乎

不存在游离的胆红素分子。同时,研究发现络合物在不同探测波长下的激发谱峰值位置不重合。据文献报道,胆红素可以看成由两个二吡咯酮丙酸子基团通过亚甲基连接而成,两个子基团具有相似却不完全相同的光学性质,可以看成两个发光基团^[6]。我们推断络合物也具有两个发光基团。

2.2 瞬态吸收光谱

为了验证络合物具有两个发光基团推断的正确性以及了解络合物更多的性质,研究使用飞秒瞬态吸收(transient absorption, TA)光谱技术进一步研究了 Zn^{2+} -胆红素络合物的光学特性。

图 2 为络合物在 DMF 中紫外-可见波段的瞬态吸收光谱。图 2(a)和图 2(b)分别为络合物在前 5 ps 和 5~80 ps 内随时间演变的光谱。430 nm 对应着强烈的激发态吸收(excited state absorption, ESA)信号,545 nm 对应激发态发射(stimulated emission, SE)和基态漂白(ground state bleaching, GSB)信号的叠加,580 nm 对应 ESA 和 SE 信号的叠加。通过对 430, 545 和 580 nm 等单波长动力学曲线拟合(图 3 为单波长拟合结果,表 2 为拟合所用参数),得到了络合物的三个动力学时间常数,分别是 $\tau_1 = 0.3 \text{ ps}$, $\tau_2 = 1.1 \text{ ps}$, $\tau_3 = 12.0 \text{ ps}$,这些时间常数与之前报道的胆红素在 DMF 中的飞秒频率上转换和飞秒瞬态吸收测得的结果相近^[6]。580 nm 的负信号部分需要用两个指数进行拟合,表明该动力学中有两个 SE 过程。同时研究发现 430 nm 处信号初始时有增长并且需要相同数值的两个指数拟合。580 nm 信号由负到正的变化和 430 nm 最初有信号增强的现象都表明分子在激发态衰退后到达了某中间态。考虑到 580 nm 附近的 ESA 信号在衰退过程中峰值有蓝移的现象,并且 580 nm 的 ESA 信号(正信号)和 545 nm 长寿命的信号具有镜像对称关系,研究推断该中间态为热基态。络合物的动力学过程可以总结为:络合物在受到光激发到达激发态后,通过两个发射过程衰退到热基态,最终通过驰豫振荡回到基态。图 2(b)中插图飞秒瞬态吸收的衰减相关光谱(decay associated spectrum, DAS)。两个较小的时间常数对应的光谱形状相似,研究认为这两个时间常数分别对应两个发光基团的激发态。

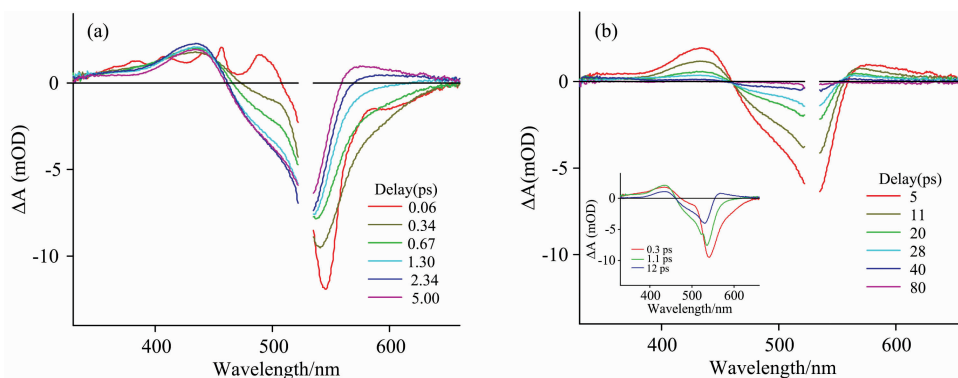


图 2 530 nm 激发,络合物的 DMF 溶液在紫外-可见波段的瞬态吸收光谱

(a): 前 5 ps 的光谱演变; (b): 5~80 ps 内的光谱演变

Fig. 2 TA spectra of complex in DMF in the UV-Vis spectral window after 530 nm excitation

(a): Spectral evolution during the earliest 5 ps; (b): Spectral evolution in the 5~80 ps

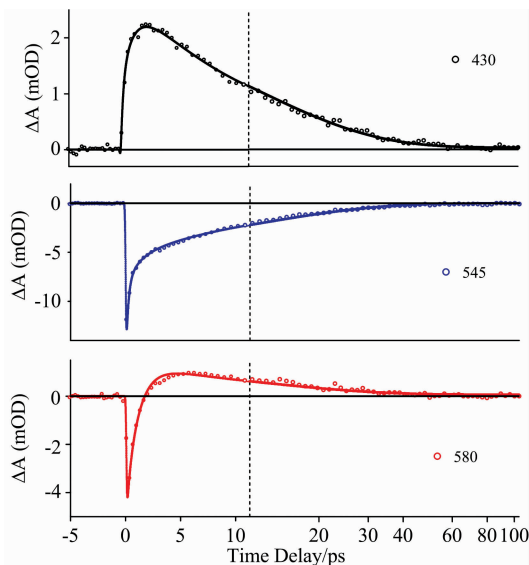


图 3 络合物单波长动力学及拟合

Fig. 3 Single-wavelength TA kinetics and fit of the complex

表 2 单波长动力学拟合参数

Table 2 Single-wavelength TA kinetics fit parameter of the complex

Wavelength /nm	τ_1 /ps	A_1 /%	τ_2 /ps	A_2 /%	τ_3 /ps	A_3 /%
430		-22.4		-27.6		50.0
545	0.3	-42.2	1.1	-17.6	12.0	-40.2
580		-5.2		-76.6		18.2

2.3 胆红素和 Zn^{2+} 的结合

图 4 为 John 等^[17]曾经提出的胆红素和 Zn^{2+} 的配位方式,两个 Zn^{2+} 分别与胆红素两个双吡咯酮丙酸子基团上的 N 进行配位。这种配位方式可以用于解释上文中所述的实验现象。上文提到两个双吡咯酮丙酸子基团的光学性质并不相同,研究认为两个子基团分别和 Zn^{2+} 配位后,其光学性质仍

然不相同,可以看成两个发光基团。所以络合物在不同探测波长下的激发谱中的峰值位置不重合,瞬态吸收实验中发现络合物有两个激发态,以及 DAS 图中两个较小的时间常数对应的光谱形状相似的现象都有了很好的解释,这些现象都是络合物存在两个发光基团导致的。

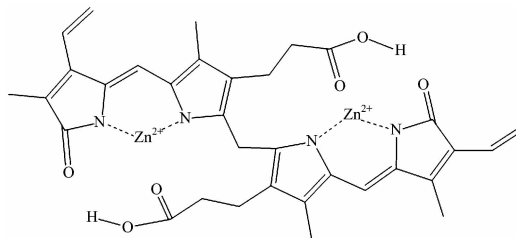
图 4 Zn^{2+} -胆红素络合物的结构示意图

Fig. 4 Proposed Structure of zinc-BR complex

2.4 辐射跃迁速率与非辐射跃迁速率

根据上述的分析,可以计算出胆红素和络合物的平均激发态寿命和激发态衰退速率。结合表 1 中的量子产率,进一步计算出了胆红素与络合物的辐射跃迁速率和非辐射跃迁速率,如表 3 所示。

通过上文对图 1(a)吸收光谱和图 1(d)络合物激发谱的分析,当溶液中 Zn^{2+} 与胆红素的浓度为 10 : 1 时,溶液中将几乎不存在游离的胆红素分子。通过吸收光谱计算出络合物的消光系数,其数值约为单纯胆红素的 1.6 倍。Strickler 等^[18]报道物质消光系数的增加有利于提高其辐射跃迁速率,表 3 所示络合物的辐射跃迁速率相对胆红素增强了约 4.6 倍,符合 Strickler 等提出的理论。

Carrera 等^[6, 19]曾经提出胆红素在受到光激发后存在高效的非辐射衰退途径,并且该非辐射途径为激发态与基态的锥型交叉引起。表 3 所示络合物具有更短的激发态寿命,可以认为 Zn^{2+} 与胆红素的这种配位方式进一步提高了分子以锥型交叉方式退激发态的效率,最终引起络合物的非辐射跃迁速率相对胆红素增加。

表 3 胆红素和络合物在 DMF 溶液中的辐射跃迁速率与非辐射跃迁速率

Table 3 Radiative and non-radiative decay rates of BP and the complex in DMF

Sample	τ_1 /ps	τ_2 /ps	$\overline{\tau_{EXC}}$ /ps	k_{EXC} /ps ⁻¹	k_{RAD} /ps ⁻¹	k_{NR} /ps ⁻¹
Complex/DMF	0.3	1.1	0.66	1.51×10^{12}	9.21×10^8	1.51×10^{12}
BR/DMF	0.5	2.4	1.61	0.62×10^{12}	2.02×10^8	0.62×10^{12}

References

- [1] Perlstein T S, Pande R L, Creager M A, et al. American Journal of Medicine, 2008, 121(9): 781.
- [2] Vitek L. Frontiers in Pharmacology, 2012, 3: 55.
- [3] Gazzin S, Vitek L, Watchko J, et al. Trends in Molecular Medicine, 2016, 22(9): 758.
- [4] Santhosh M, Chinnadayala S R, Kakoti A, et al. Biosensors & Bioelectronics, 2014, 59: 370.
- [5] Anjana R R, Devi J S A, Jayasree M, et al. Microchimica Acta, 2018, 185(1). doi: 10.1007/s00604-017-2574-8.
- [6] Zietz B, Gillbro T. The Journal of Physical Chemistry B, 2007, 111(41): 11997.
- [7] Wabaidur S M, Eldesoky G E, Alotman Z A. Luminescence; the Journal of Biological and Chemical Luminescence, 2018, 33: 625.
- [8] Aparna R S, Anjali Devi J S, John N, et al. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2018, 199: 123.

- [9] Iwatani S, Nakamura H, Kurokawa D, et al. *Scientific Reports*, 2016, 6: 28489.
- [10] Kumagai A, Ando R, Miyatake H, et al. *Cell*, 2013, 153(7): 1602.
- [11] Yeh J T H, Nam K, Yeh J T H, et al. *Scientific Reports*, 2017, 7: 41619.
- [12] YANG Fang, ZHENG Wen-jie, HU Xue-wang, et al(杨芳, 郑文杰, 胡学旺, 等). *Journal of Jinan University(暨南大学学报)*, 2000, 21(3): 85.
- [13] Kotal P, Fevery J. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 1991, 202(1-2): 1.
- [14] Brannon J H, Madge D. *Journal of Physical Chemistry*, 1978, 82(6): 705.
- [15] Broichhagen J, Trauner D. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2013, 52(52): 13868.
- [16] Maity M, Das S, Maiti N C. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2014, 16(37): 20013.
- [17] John D V N, Edward T Y. *Bioinorganic Chemistry*, 1978, 9(4): 349.
- [18] Strickler S J, Berg R A. *The Journal of Chemical Physics*, 1962, 37(4): 814.
- [19] Carreira B C, Singer P, Diller R, et al. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2016, 18(10): 7148.

Ultrafast Excited State Dynamics of Zinc-Bilirubin Complex

CHEN Qi-chen, LIU Yang-yi, CAO Xiao-dan, CHEN Zhuang, CAO Si-min, PAN Hai-feng, CHEN Jin-quan*
State Key Laboratory of Precision Spectroscopy, East China Normal University, Shanghai 200062, China

Abstract Bilirubin (BR) is one of the final products of heme catabolism, which has functions of anti-oxidation and anti-inflammatory. Normal content of bilirubin in human body plays an indispensable role in human health, which has been confirmed to be protective against diseases such as cancer, stroke, diabetes and cardiovascular diseases etc.^[1-2]. However, excess bilirubin has been long recognized as a sign of liver dysfunction as well as a potential toxic factor causing severe brain damage in newborns^[3]. Thus, the analysis of bilirubin in body fluids is very important, speeding up the development of a cheap and accurate analytical method. Generally a lot of techniques have been used to detect bilirubin in serum samples, include diazo methods, peroxidase methods, fiber optic sensors, fluorometric methods etc.^[4]. Fluorometric methods have the advantages of quick response and simple operation^[5], attracting more and more researchers' attention. However, the fluorescence quantum yield of bilirubin itself is quite low, which is on the order of 10^{-4} ^[6], resulting in the difficulty in direct measurement of its content, so it is usually measured indirectly. Wabaidur et al. measured the content of bilirubin by using bilirubin to quench the fluorescence of Ru(bipy)₃²⁺^[7]; Aparna et al. measured that by using bilirubin to quench the fluorescence of copper nanocluster^[8]; Iwatani et al. measured that by using protein UnaG to conjugate bilirubin for its fluorescence enhancement^[9]. UnaG has a high affinity with bilirubin and UnaG itself is almost non-fluorescent. When combined with UnaG, the fluorescence of bilirubin would be increased by three orders of magnitude^[10] and thus it can be used as a fluorescent sensor in human body^[11]. However, the cost of protein production and preservation is pretty high, and researchers prefer to use organic small molecules or inorganic molecules to increase the fluorescence of bilirubin. For example, Yanget al. found that the zinc ions were helpful to significantly enhance the fluorescence of bilirubin^[12]. Kotal et al. proposed the use of zinc ions for the measurement of bilirubin metabolite (urobilinogen) content^[13]. Basing on using zinc ions to enhance the fluorescence of bilirubin for its content measurement, we applied the steady-state fluorescence and UV-visible absorption spectroscopy to characterize bilirubin with different concentration of zinc ions, and the fluorescence quantum yield was measured by using the relative method. By analyzing the excitation spectra of zinc-bilirubin complex at different emission wavelengths, we proposed a hypothesis that the complex has two fluorescence subunits. Besides, the femtosecond transient absorption spectroscopy was used to explore the photodynamic process of the complex and the hypothesis was confirmed. The experimental data was in a good agreement with previous studies of bilirubin and zinc ions complex. Moreover, combining together with the transient absorption spectra, steady-state spectra and the proposed hypothesis, we calculated the average excited-state lifetime of bilirubin with/without zinc ions, and obtained its theoretical value of radiative and non-radiative decay rate. Compared with bilirubin itself, the complex has a larger value of extinction coefficient, which caused a greater radiative decay rate. We believe the coordination of zinc ions and bilirubin has increased its deactivation efficiency by internal conversion.

Keywords Zinc ions; Bilirubin; Fluorescence enhancement; Femtosecond transient absorption

* Corresponding author

(Received Apr. 13, 2018; accepted Sep. 12, 2018)