

# 核黄素在不同极性溶剂中的光谱特性研究

方梓秋<sup>1,2</sup>, 陈国庆<sup>1,2\*</sup>, 吴亚敏<sup>1,2</sup>

1. 江南大学理学院, 江苏 无锡 214122

2. 江苏省轻工光电工程技术研究中心, 江苏 无锡 214122

**摘要** 实验测得核黄素在水、二甲基亚砜(DMSO)和三氯甲烷三种不同极性溶剂中的稳态吸收光谱、荧光光谱和时间分辨荧光光谱,研究了溶剂对核黄素光谱性质的影响。实验结果表明,在不同极性的溶剂中,核黄素的吸收峰位置几乎不变,而荧光光谱峰值随着溶剂极性的增大而出现红移。这是由于溶质分子的电子激发及溶剂化效应引起的电子重新分布导致它在极性溶剂中第一激发单重态能级的变化。在时间分辨荧光光谱实验中,核黄素在水溶液中荧光寿命也高于在其他两种溶剂中,荧光寿命的延长可归因于核黄素与氢键对体溶剂之间的分子间氢键相互作用。应用 Gaussian09 软件,采用密度泛函理论和含时密度泛函理论,结合基于密度的溶剂化模型,对不同极性溶剂中的核黄素分子进行基态和激发态优化和计算。通过前线分子轨道分析,核黄素的受激跃迁属于苯环和含氮杂环上的  $\pi$  电子向苯环及 C=N, C=O 共轭双键的反键轨道  $\pi^*$  的跃迁。分子偶极矩的计算结果表明,核黄素分子的第一激发态偶极矩大于基态偶极矩,偶极矩的增大,导致溶质与溶剂分子之间的相互作用的增大。而溶剂分子与溶质分子基态和激发态的相互作用程度不同,使得吸收峰和荧光峰出现不同变化情况。极性越大的溶剂越有利于对激发态的稳定作用,使激发态能量降低,相应的发射波长发生红移。最后,通过分子表面静电势和弱相互作用分析,在水溶剂中考虑氢键作用对核黄素分子光谱的影响。多聚体结构的理论吸收和发射峰值更接近实验结果,说明多聚体结构合理。水分子二聚体与核黄素形成的环状结构,有利于提高核黄素分子的刚性,有利于荧光的发射,减少非辐射跃迁的几率,荧光寿命延长。

**关键词** 核黄素; 光谱特性; 溶剂效应; 氢键作用; 密度泛函理论

**中图分类号:** O433.4 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2020)04-1132-05

## 引言

核黄素,是一种具有核糖醇侧链的异咯嗪类衍生物,是人体中重要的氧化还原酶的辅酶。越来越多的临床研究表明,核黄素对肝脏和肾脏组织损伤有着显著的恢复作用<sup>[1]</sup>。同时在肿瘤治疗的过程,核黄素也起到关键作用<sup>[2]</sup>。所以,核黄素对人体的重要性不可忽视。近年来,国内外学者对核黄素的光物理和光化学性质做了大量的研究。如环境因素对核黄素荧光特性的影响、黄素中发色团的电子转移活性问题<sup>[3]</sup>以及在 BLUF(blue light sensing using flavin)发光材料领域的应用<sup>[4]</sup>都受到人们的广泛关注。此外,对于黄素类物质的量子化学计算也已得到初步研究<sup>[5]</sup>。

在实验的基础上,结合量子化学计算,研究溶剂对核黄素光谱特性的影响。理论计算得到吸收峰和发射峰值,与实验结果吻合较好;分析核黄素前线分子轨道,了解受激跃迁方式;计算不同溶剂中核黄素分子偶极矩值,从理论上阐明光谱变化与偶极矩之间的关系。最后,考虑分子间氢键作用对核黄素光谱性质的影响。从实验和理论两方面进一步了解核黄素的光学特性,其结果对核黄素在药理学及发光材料等领域的研究提供一定的帮助。

## 1 实验部分

核黄素( $\geq 97.5\%$ )购买于天津光复精细化工研究所;溶剂分别为超纯水、二甲基亚砜和三氯甲烷,有机溶剂均为国

收稿日期: 2019-03-19, 修订日期: 2019-07-02

基金项目: 国家自然科学基金项目(61378037), 国家食品科学与工程一流学科建设项目(JUFSTR20180302), 中央高校基本科研业务费专项资金项目(JUSRP51628B)资助

作者简介: 方梓秋, 1993年生, 江南大学理学院硕士研究生 e-mail: 1807535072@qq.com

\* 通讯联系人 e-mail: cgq2098@163.com

药化学试剂有限公司提供的分析纯试剂, 分别配制浓度为  $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的核黄素溶液。实验采用英国 Edinburgh FLS920P 型稳态和时间分辨荧光光谱仪, 测量核黄素在上述三种溶剂中的稳态吸收光谱、荧光光谱及时间分辨荧光光谱。其中, 测量荧光光谱时, 激发波长为 444 nm, 光源为氙灯; 时间分辨荧光的测量利用系统中时间相关单光子计数技术, 激发光源为中心波长 374 nm 的半导体激光器。所有实验均在室温下完成。

## 2 量子化学计算

采用密度泛函理论中的 B3LYP 泛函, 在 6-31G(d, p) 基组水平上对核黄素分子的基态几何结构优化, 并通过频率分析, 优化结构无虚频, 确认优化的结构处于势能面的能量最低点。利用优化好的结构, 采用含时密度泛函理论, 结合基于密度的溶剂化模型 (the solvation model based on density, SMD)<sup>[7]</sup>, 在 B3LYP/6-311+G(d, p) 水平上计算核黄素分子表面静电势及在不同溶剂中吸收和发射光谱。全部计算均采用 Gaussian 09 程序完成。分子表面静电势分析和弱相互作用分析均采用 Multiwfn 程序<sup>[8]</sup>完成。结构相互作用的等值面图使用 VMD 程序<sup>[9]</sup>绘制。

## 3 结果与讨论

### 3.1 稳态吸收和荧光光谱

图 1 为核黄素在三种不同极性溶剂中的稳态吸收光谱和归一化荧光光谱。可以发现, 核黄素的主吸收峰几乎不随溶剂极性的改变而变化, 峰值波长在 443~445 nm 范围内; 而次级吸收峰随溶剂变化的位移程度较大, 表明核黄素次级吸收跃迁对溶剂极性更加敏感, 与前人研究结果一致<sup>[10]</sup>。同时, 核黄素的荧光峰随着溶剂极性的增大产生明显的红移现象。这可能是由于溶剂与基态和激发态核黄素分子的相互作用程度不同引起。表 1 中列出了核黄素在三种溶剂中主吸收峰和荧光峰的理论计算数据, 与实验值吻合较好。

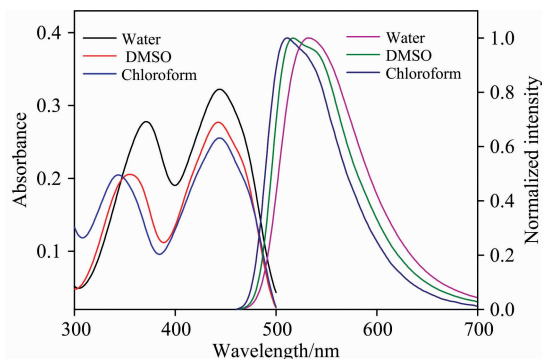


图 1 核黄素在水、DMSO 和三氯甲烷中的吸收光谱和归一化荧光光谱

Fig. 1 Absorption spectra and normalized fluorescence spectra of riboflavin in water, DMSO and chloroform

表 1 核黄素在三种溶剂中的光谱信息

Table 1 Spectral information of riboflavin in three solvents

溶剂	吸收峰实验值/nm	吸收峰理论值/nm	荧光峰实验值/nm	荧光峰理论值/nm
水	445	438.52	533	531.52
DMSO	443	435.84	517	523.64
三氯甲烷	444	435.08	514	517.17

图 2(a) 和 (b) 分别是核黄素前线分子轨道 HOMO 和 LUMO 示意图。由图可知, HOMO 电子云集中分布于整个异咯嗪环结构上, 苯环和含氮杂环的共轭  $\pi$  电子为主要特征; 共轭体系的电子被激发至 LUMO 后, 苯环上及 C=N 和 C=O 共轭双键区域电子云密度增大, 该跃迁属于  $\pi \rightarrow \pi^*$  跃迁; 处于反键轨道的  $\pi^*$  电子非常不稳定, 会从高能级迅速弛豫到第一激发态的最低振动能级。经过辐射跃迁, 伴随荧光的产生返回基态, 该过程属于  $\pi^* \rightarrow \pi$  跃迁, 对应 LUMO  $\rightarrow$  HOMO 轨道跃迁<sup>[11]</sup>。

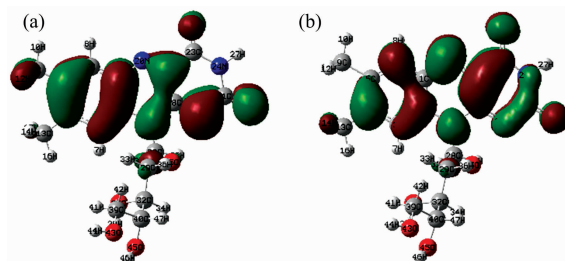


图 2 核黄素前线分子轨道 (a)HOMO 和 (b)LUMO 示意图  
Fig. 2 View of the frontier molecular orbitals (HOMO and LUMO) for riboflavin structure

通过分子偶极矩解释吸收光谱和荧光光谱位移程度不同的原因。通过基态和激发态偶极矩的计算, 说明溶质分子的电子激发和溶剂化作用引起电荷的重新分布, 同时影响着溶质分子的偶极矩。表 2 中列出核黄素在三种溶剂的基态和激发态偶极矩值计算结果。由计算结果可知, 激发态核黄素分子的偶极矩高于基态, 溶剂与激发态分子之间的相互作用也强于与基态分子的相互作用, 使得吸收峰与荧光峰出现不同程度的变化。随着溶剂极性的增加, 激发态偶极矩增大, 溶剂与溶质的相互作用的增强, 使得核黄素分子能级降低。核黄素荧光发射跃迁对应于 LUMO  $\rightarrow$  HOMO 轨道跃迁, HOMO 和 LUMO 之间的能级间隙的  $\Delta E$  直接影响着跃迁

表 2 核黄素在三种溶剂中的偶极矩 (Debye) 和能级间隙 ( $\Delta E$ ) 计算值

Table 2 Dipole moments (Debye) and difference between HOMO and LUMO of riboflavin in three solvents

溶剂	基态偶极矩/D	第一激发态偶极矩/D	$\Delta E/\text{eV}$
水	18.61	21.65	3.296 8
DMSO	16.24	19.03	3.307 8
三氯甲烷	14.95	17.29	3.319 7

能。核黄素在三种溶剂中的能带间隙值  $\Delta E$  列于表 2 中。相比于非极性溶剂, 激发态核黄素分子更容易被极性溶剂所稳定, 跃迁能量降低, 荧光峰会随溶剂极性增大发生红移。

### 3.2 时间分辨荧光光谱

图 3 是核黄素在三种溶剂中的时间分辨荧光衰减曲线及仪器响应函数 (instrument response function, IRF) 曲线。图 3 中, 每个荧光衰减曲线可以通过双指数函数  $I(\lambda, t) = \sum_{i=1}^2 \alpha_i(\lambda) e^{-t/\tau_i}$  进行拟合, 拟合效果通过  $\chi^2$  的值来衡量。拟合

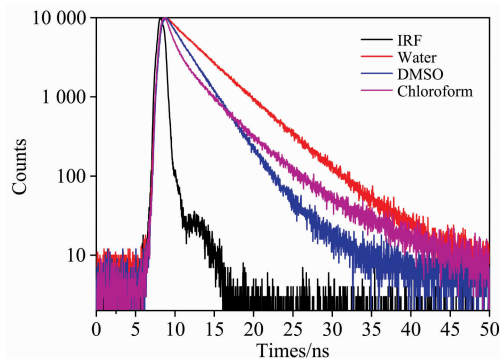


图 3 核黄素在 374 nm 激发下三种溶剂中的荧光衰减曲线

Fig. 3 The decay curves of riboflavin in three solvents when excited at 374 nm

后, 可利用荧光平均寿命公式  $\bar{\tau} = (\sum_{i=1}^2 \alpha_i \tau_i^2) / (\sum_{i=1}^2 \alpha_i \tau_i)$  计算得到核黄素在不同溶剂中对应荧光发射峰处的荧光寿命。

表 3 中列出了核黄素在水、DMSO 和三氯甲烷中的荧光寿命。由表 3 可以看出, 核黄素最低激发态的寿命明显地依赖溶剂极性, 且核黄素在氢键给体溶剂中的荧光寿命要长于在非氢键给体溶剂中的荧光寿命。寿命的延长可归因于核黄素与氢键给体溶剂(水)之间的分子间氢键相互作用, 阻碍了分子的运动, 减少了分子在激发态的非辐射跃迁, 从而荧光寿命得到延长。

表 3 核黄素在三种溶剂中时间分辨荧光衰减信息

Table 3 Fluorescence decay data of riboflavin in three solvents

溶剂	$\tau_1/\text{ns}$	$\alpha_1/\%$	$\tau_2/\text{ns}$	$\alpha_2/\%$	$\tau/\text{ns}$	$\chi^2$
水	3.42	29.92	5.25	70.08	4.85	1.056
DMSO	1.75	14.87	3.00	85.13	2.88	1.019
三氯甲烷	1.02	33.36	4.32	66.64	3.97	1.225

### 3.3 氢键作用

由 3.2 节时间分辨荧光光谱结果可知, 核黄素分子在氢键给体溶剂中, 不仅存在由溶剂参数引起的一般溶剂作用, 还存在溶质和溶剂分子之间特殊的相互作用, 如氢键。因此在隐式溶剂模型的基础上, 在核黄素分子周围引入水分子来研究它们之间的氢键相互作用及其对光谱的影响。

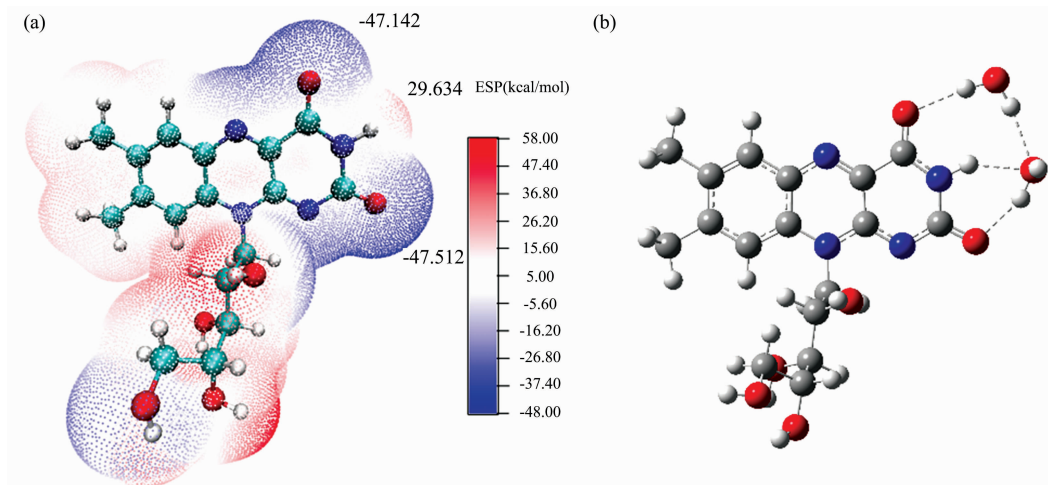


图 4 (a) 核黄素分子表面静电势分布; (b) 核黄素与水分子相互作用分析模型

Fig. 4 (a) The electrostatic potential distribution map of riboflavin molecule surface; (b) The cluster model for studying hydrogen bond between riboflavin and water

核黄素分子表面含氧官能团能够作为主要的吸附中心与水分子形成氢键, 因此研究分子表面静电势<sup>[12]</sup>对于预测氢键形成位点具有重要的意义。核黄素分子表面静电势分布如图 4(a)所示。可以看出, 异咯嗪环上的两处羰基和核糖醇侧链尾端的羟基等主要含氧官能团的氧原子由于孤对电子的存在, 使得周围呈现较大的负电势, 而氢原子周围呈现较大的

正电势。从上述吸收跃迁分析可知, 电荷分布几乎不涉及核糖醇侧链, 且静电势的极小值点出现在两个羰基处, 分别为  $-47.142$  和  $-47.512 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。说明两羰基处更易与水分子发生以静电力为主的氢键作用, 因此基于之前的分析和对计算效率的考虑, 构建了如图 4(b)所示的分子模型。通过含时密度泛函理论, 对该团簇模型的吸收光谱和荧光发射光

谱进行计算。吸收峰值和荧光峰值分别为 439.23 和 532.92 nm, 计算结果均比仅通过隐式溶剂模型得到的结果更接近实验值, 说明在水中考虑氢键作用更加合理。

基于约化密度梯度函数(reduced density gradient, RDG)和电子密度( $\rho$ )之间的关系, 有研究开发出一种有效而便捷的方法来研究弱相互作用, 称为 RDG 方法<sup>[13-14]</sup>。通过绘制 RDG 和  $\rho$  乘以电子密度 Hessian 矩阵的第二大本征值函数

$\text{sign}(\lambda_2)$  之间的散点图, 并将  $\rho$  与本征值函数的乘积函数投影到 RDG 等值面上, 可以在实空间中表征各种类型和强度的弱相互作用, 研究对象主要是氢键(蓝色)、范德华力(绿色)和位阻作用(红色)。散点图上也出现若干垂直于横坐标的“尖钉”(原文中称为 spike), spike 上的点正对应于弱相互作用区域。图 5(a) 和 (b) 分别为核黄素与水分子相互作用的填色散点图以及颜色对应的 RDG 填色等值面图。

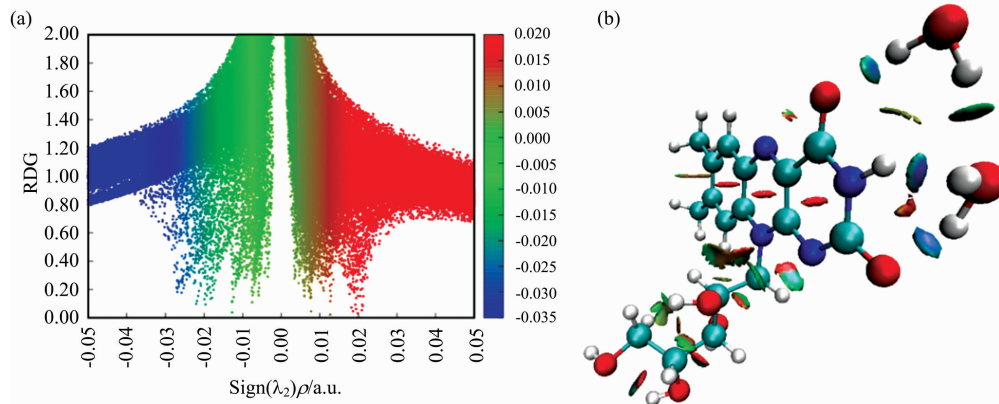


图 5 (a) 核黄素与水分子填色散点图; (b) 团簇模型 RDG 填色等值面图

Fig. 5 (a) The color-filled scatter plots of riboflavin and water; (b) The color-filled RDG isosurfaces depicting interactions regions for the cluster

RDG 填色等值面图可以清晰地呈现出核黄素分子与水分子的相互作用区域。核黄素两处羰基的氧原子和水分子的氢原子之间, 氨基上氢原子与水分子的氧原子之间均存在蓝色等值面, 表明存在氢键相互作用; 在散点图中对应最左侧蓝色 spike, 横坐标为  $-0.028$  a. u.。同时, 两个水分子之间存在淡蓝、偏绿色的等值面, 说明水分子二聚体以范德华作用和弱氢键的形式结合, 对应散点图中横坐标为  $-0.022$  a. u. 的 spike。此外, 两处羰基与两个水分子之间构成的环状结构中还会出现小片段的棕色、淡红色等值面, 表明分子间存在一定的位阻作用。分析认为每个原子都会占据一定的空间, 在以较强的相互吸引作用构成带张力的结构时, 会导致能量升高并产生斥力, 所以体系需在位阻效应存在的情况下保持状态稳定。由氢键为主导, 与部分范德华力和位阻效应共同作用下所形成的环状结构使得核黄素刚性得到增强, 减小化学键的振动和转动, 降低非辐射跃迁的概率, 荧光寿命

因此延长。

## 4 结 论

通过实验结合理论计算的方法, 研究了溶剂对核黄素稳态吸收光谱、荧光光谱及时间分辨荧光光谱的影响。应用密度泛函理论, 计算了核黄素在三种溶剂中的理论吸收和发射光谱, 并与实验测得光谱对比, 吻合结果较好。核黄素分子的电子激发及溶剂化作用影响分子偶极矩, 从而导致吸收峰和荧光峰在不同溶剂中位移不同和荧光峰红移; 并氢键供体溶剂中考虑分子间氢键作用的影响, 氢键作用所形成的环状结构提高核黄素分子的刚性, 降低非辐射跃迁的几率, 荧光寿命延长。该工作为研究其他黄素类物质在溶剂环境中的光学性质提供了思路。

## References

- [1] Alam M M, Iqbal S, Naseem I. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2015, 584: 10.
- [2] Yuan Y, Zhao Y Y, Chen L Q, et al. Nucleic Acids Research, 2017, 45(15): 8676.
- [3] Gong Y, Fan Z. Journal of Fluorescence, 2016, 26(2): 385.
- [4] Rieff B, Bauer S, Mathias G. The Journal of Physical Chemistry B, 2011, 115(38): 11239.
- [5] Zanetti-Polzi L, Aschi M, Daidone I. Chemical Physics Letters, 2017, 669: 119.
- [6] Stephens P J, Devlin F J, Chabalowski C F. The Journal of Physical Chemistry, 1994, 98(45): 11623.
- [7] Marenich A V, Cramer C J, Truhlar D G. Journal of Physical Chemistry B, 2009, 113(18): 6378.
- [8] Lu T, Chen F W. Journal of Computational Chemistry, 2010, 33: 580.
- [9] Humphrey W, Dalke A, Schulten K. Journal of Molecular Graphics, 1996, 14(1): 33.
- [10] Weigel A, Dobryakov AL, Veiga M, et al. The Journal of Physical Chemistry, 2008, 112(47): 12054.

- [11] Klauminzer B, Kröner D, Saalfrank P. *The Journal of Physical Chemistry*, 2010, 114(33): 10826.
- [12] Lu T, Chen FW. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 2012, 38: 314.
- [13] Johnson E R, Keinan S, Mori-Sanchez P. *Journal of the American Chemical Society*, 2010, 132(18): 6498.
- [14] Taniguchi T, Nakano K, Baba R. *Organic Letters*, 2017, 19(2): 404.

## Study on the Spectral Properties of Riboflavin in Different Polar Solvents

FANG Zi-qiu<sup>1,2</sup>, CHEN Guo-qing<sup>1,2\*</sup>, WU Ya-min<sup>1,2</sup>

1. School of Science, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

2. Jiangsu Provincial Research Center of Light Industrial Optoelectronic Engineering and Technology, Wuxi 214122, China

**Abstract** The steady-state absorption and fluorescence spectra and time-resolved fluorescence spectra of riboflavin in water, DMSO and chloroform were measured by British Edinburgh FLS920P spectrometer. It was found that the absorption peaks hardly change in different solvents, and the fluorescence peaks show a significant red shift with the increase of the polarity of solvents, because the charge distribution of the excited state leads to the difference between the absorption and fluorescence spectra. Besides, the fluorescence lifetime of riboflavin in water is also longer than that in the other two solvents, which can be attributed to the hydrogen bond interaction between riboflavin and water. Furthermore, the ground and excited states of riboflavin molecules in different solvents were calculated by using Gaussian 09 software. Through frontier molecular orbital analysis, the stimulated transition of riboflavin is the transition of  $\pi$  electrons on benzene ring and nitrogen heterocycle ring to the antibonding orbital  $\pi^*$  of benzene ring and C=N, C=O conjugated double bond. The results show that the charge distribution of riboflavin increases the dipole moment and the solute-solvent intermolecular interaction, which leads to spectral variation and a red shift in fluorescence spectra. Finally, the effect of H-bond on the spectra of riboflavin was considered by the molecular electrostatic potential and noncovalent interaction analysis. The theoretical absorption and emission peaks of the polymer structure are closer to the experimental results, which shows that the results of the polymer are reasonable. The ring structure formed by water dimer and riboflavin can increase the rigidity of riboflavin molecule, which is beneficial to the fluorescence emission, thus decreasing the probability of non-radiative transition and prolonging the fluorescence lifetime.

**Keywords** Riboflavin; Spectral properties; Solvent effect; Hydrogen bonding; Density functional theory

(Received Mar. 19, 2019; accepted Jul. 2, 2019)

\* Corresponding author