

胆红素二甲酯与铜离子配合物的激发态光谱特性研究

闫姝君, 刘阳依, 和晓晓, 郑名, 曹潇丹, 徐建华, 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 胆红素二甲酯(bilirubin dimethyl ester, BRE)是一种线性四吡咯, 是胆红素(Bilirubin, BR)的类似物^[1-3]。用UV, IR, MS等光谱表征BR与BRE, 结果并无明显差别。BR/BRE可与多种金属离子形成配合物。BR与金属离子的配位点主要是吡咯氮和丙酸侧链, 用甲基取代BR丙酸侧链羧基上的氢得到BRE, 使金属离子只与吡咯氮配位。因此本文采用酯化的胆红素BRE研究其与金属离子的作用, 优点是可以减少与金属的配位点, 降低产物复杂程度, 有助于光谱分析。

关键词 胆红素二甲酯; 铜离子; 瞬态吸收光谱; 配体金属电荷转移

中图分类号: O657.3 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2020)06-1674-05

引言

金属离子会对BR/BRE的荧光特性产生影响, 不同于Zn²⁺的荧光增强作用, Cu²⁺对BRE有明显的荧光猝灭。研究表明, 高胆红素血症和胆结石等疾病与BR和Cu²⁺有关^[3-5], 研究胆红素及其类似物与Cu²⁺的相互作用对这些疾病的防治有重要意义。线性四吡咯分子为适应与中心离子的配合, 一般从原来的链式结构转变成类似卟啉的环状结构, 一个Cu²⁺与一个BR/BRE分子的四个中心吡咯氮配位, 形成金属中心的方形平面结构(图1)。BRE本身荧光量子产率较低, 原因是吡咯环的振动使大部分激发态分子以无辐射方式弛豫回基态^[6]。BRE与Cu²⁺配位后可能发生能级耦合产生新的非辐射退激发通路导致荧光减弱, 但是有关Cu²⁺对

BRE荧光的猝灭机制, 还需进一步的研究。

激发态分子的退激发过程一般发生在超快时间尺度内, 传统稳态光谱技术无法观测。本文采用可见和近红外波段飞秒瞬态吸收光谱技术研究了BRE与Cu²⁺配合物的激发态光谱特性, 不仅对其可见光波段的光谱进行了分析, 还结合红外区域的光谱发现了Cu²⁺对BRE的荧光猝灭机制, 首次提出并证实了荧光猝灭的原因是配体到金属的电荷转移(ligand-to-metal charge transfer, LMCT)。与BRE本身相比, 这个电荷转移态为BRE-Cu²⁺配合物增加了一条非辐射退激发通路, 使其荧光量子产率减小为BRE的~5%。通过拟合配合物激发态光谱的动力学曲线得到两个寿命, 分别为11 ps和186 ps。其中11 ps为LMCT态的建立过程, 186 ps为分子由此中间态弛豫回基态的时间。

1 实验部分

1.1 试剂和仪器

BRE, 百灵威科技有限公司; 无水醋酸铜, 99.99%, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; DMSO, 光谱级, >99.9%, 上海麦克林生化科技有限公司; 荧光素, 西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司。

紫外-可见分光光度计(TU1901, Beijing Purkinje General Instrument Co. Ltd)用于测紫外可见吸收光谱, 可探测波长范围为190~900 nm, 波长准确度为±0.3 nm。稳态荧光发射光谱数据的采集使用的是Horiba公司生产的FluoroMax-

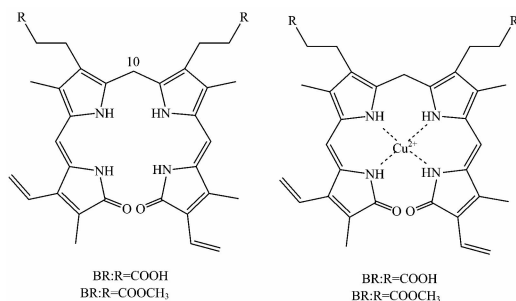


图1 BR, BRE及其与Cu²⁺配合物的分子结构示意图

Fig.1 Schematic structures of BR, BRE and Cu²⁺ complex

收稿日期: 2019-03-15, 修订日期: 2019-07-21

基金项目: 国家自然科学基金面上基金项目(11674101, 21873030)资助

作者简介: 闫姝君, 1994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: 583520922@qq.com

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

4 型荧光光谱仪, 由于不同的波长下光源的功率和探测器的探测效率都有所不同, 所以我们选用 S1c/R1c 信号作为样品的荧光发射光谱。飞秒瞬态吸收系统的激光器是 Coherent 公司生产的 Astrella, 输出波长为 800 nm, 重复频率 1 kHz, 单脉冲能量 > 7 mJ, 脉冲宽度 100 fs; OPA 是 Coherent 公司生产的 OperA Solo, 可产生 240~2 600 nm 内任意波长的光作为激发样品的泵浦光; 光谱仪是 Ultrafast System 公司生产的 Helios-EOS fire, 由激光器产生的 800 nm 光束经过延迟线后打在氟化钙/蓝宝石晶体上, 产生用于检测的白光脉冲, 延迟线可达到的最长时间窗口为 8 ns。

1.2 方法

胆红素是难溶于水的脂溶性物质, 常用溶剂有二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO); 由于羧基的存在, BR 也可溶解于碱性溶液中^[7]。BRE 比 BR 有更强的亲脂性, 考虑到金属离子可能与碱性物质发生反应, 一般选用 DMSO 作为溶剂。配制 BRE, BRE-Cu²⁺ 溶液(其中 BRE 和 Cu²⁺ 的浓度比为 1:4, 过量的 Cu²⁺ 是为了使 BRE 与 Cu²⁺ 充分结合), 溶剂为 DMSO。用于测紫外-可见吸收光谱和荧光发射光谱的 BRE 溶液浓度为 10 μmol · L⁻¹, BRE-Cu²⁺ 溶液中 BRE 浓度固定为 10 μmol · L⁻¹, 改变 Cu²⁺ 的浓度配制不同配比的 BRE-Cu²⁺ 溶液, Cu²⁺ 浓度分别为 10, 40, 100, 200 和 400 μmol · L⁻¹; 用于测瞬态吸收光谱的 BRE 溶液浓度为 50 μmol · L⁻¹, BRE-Cu²⁺ 溶液中 BRE 和 Cu²⁺ 浓度分别为 50 μmol · L⁻¹ 和 200 μmol · L⁻¹, 配好的样品注意避光保存。

紫外-可见分光光度计测量光谱范围设置为 300~900 nm, 避免短波长的光损坏样品; 稳态荧光光谱的激发波长 430 nm, 狭缝宽度为 3/3 mm; 飞秒瞬态吸收光谱系统中选择波长 450 nm 的脉冲作泵浦光, 功率约为 0.15 mW, 探测光波长范围有 340~740 和 750~850 nm 两个波段, 测量的时间窗口为 500 ps(BRE)和 3 ns(BRE-Cu²⁺)。

2 结果与讨论

BRE 和 Cu²⁺ 混合后, 生成了稳定的配合物, 如图 2 为 BRE 和不同浓度配比的 BRE-Cu²⁺ 在 DMSO 中的紫外可见吸收光谱和荧光发射光谱。BRE 与 Cu²⁺ 浓度比为 1:1 时光谱发生明显改变, 1:4 时已充分结合完全。BRE 吸收峰和发射峰分别位于 453 和 525 nm 左右, 可以看出, 与 Cu²⁺ 配位后, 吸收峰蓝移约 23 nm, 且在 815 nm 附近出现了一个新的吸收带。从稳态荧光光谱可以看出, BRE-Cu²⁺ 的荧光发生了明显猝灭。我们以荧光素作为标准物, 用相对法测定了 BRE 和 BRE-Cu²⁺ 在 DMSO 中的荧光量子产率, 发现 BRE 与 Cu²⁺ 配合之后荧光量子产率降低为原来的 5%。

为了探究 Cu²⁺ 使 BRE 荧光猝灭的机理, 我们用飞秒分辨的激光泵浦-探测技术对 BRE-Cu²⁺ 进行分析。BRE 和 BRE-Cu²⁺ 配合物的瞬态吸收光谱如图 3 所示。BRE 在 380~490 nm 范围内显现出明显的基态漂白(ground state bleaching, GSB)^[8] 信号。对于峰值位于 350 nm 附近和 490~740 nm 的宽谱正信号, 是分子被泵浦到激发态后的激发态吸收(excited state absorption, ESA)。对于 350 和 510 nm 附近的

ESA 信号来说, 在光谱的初期(仪器响应函数 IRF ≈ 120 fs)就达到信号的最大值, 这说明二者均是 BRE 分子在接受光激发后所达到的初始激发态。而对于在 550~650 nm 左右、0~5 ps 内逐渐上升的 ESA 信号, 我们认为这是 BRE 分子退激发过程中经历的中间态, 可能是因为 BRE 分子的扭转形成的。

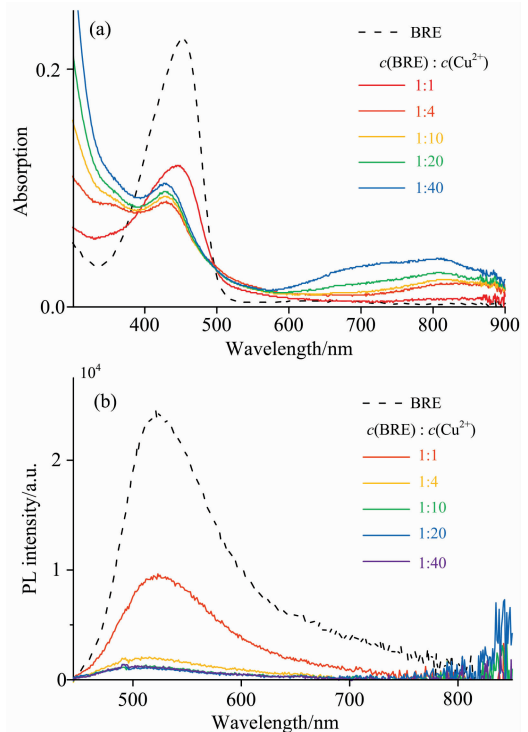


图 2 BRE(浓度为 10 μmol · L⁻¹) 与 BRE-Cu²⁺ 配合物(BRE 浓度为 10 μmol · L⁻¹; Cu²⁺ 浓度分别为 10, 40, 100, 200, 400 μmol · L⁻¹) 的紫外可见吸收光谱(a)和荧光发射光谱(b)

Fig. 2 UV-Vis absorption (a) and fluorescence emission spectra (b) of BRE (concentration: 10 μmol · L⁻¹) and BRE-Cu²⁺ complex (concentration of BRE: 10 μmol · L⁻¹; concentration of Cu²⁺: 10, 40, 100, 200, 400 μmol · L⁻¹)

表 1 BRE 与 BRE-Cu²⁺ 的吸收、发射峰和荧光量子产率
Table 1 Absorption, emission peak wavelength and fluorescence quantum yield of BRE and BRE-Cu²⁺ complex

样品	吸收峰/nm	发射峰/nm	荧光量子产率
BRE	453	525	1.3 × 10 ⁻³
BRE-Cu ²⁺	430, 815	525	6.8 × 10 ⁻⁵

当 BRE 分子与 Cu²⁺ 形成配合物后, 其瞬态吸收光谱信号发生明显变化。峰值为 430 nm 左右的负信号是典型的 GSB 信号, 与紫外可见吸收光谱的吸收峰波长一致。峰值在 480 nm 附近且随时间推移逐渐蓝移(在 200 ps 时, 峰值处波长约为 475 nm)的是 ESA 信号, 伴随着短寿命的激发态弛豫过程。从整体上看, 500~600 nm 之间 BRE-Cu²⁺ 比 BRE 少

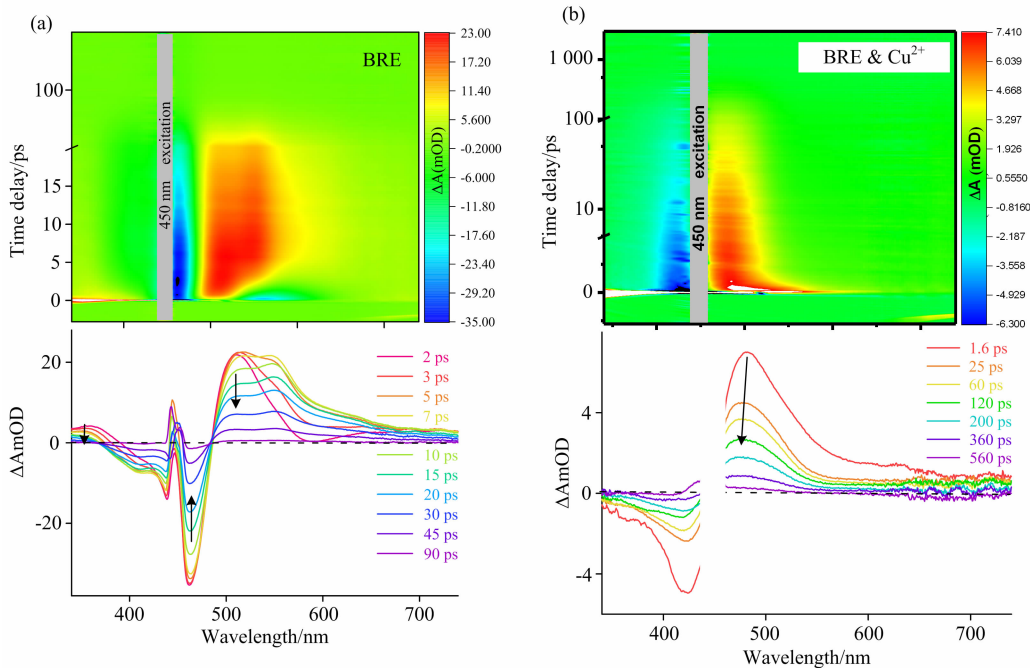


图 3 BRE 和 BRE-Cu²⁺ 的瞬态吸收光谱

Fig. 3 Transient absorption spectra of BRE and BRE-Cu²⁺ complex

了一个 ESA 峰。选取 515 和 550 nm 处的动力学曲线进行对比, 如图 4(a), 可以看出, BRE 在 515 和 550 nm 附近有明显的中间态建立过程, 而且两处上升趋势不同。而 BRE-Cu²⁺ 则是直接到达激发态。光物理过程的明显区别说明 BRE 与 Cu²⁺ 配位之后发生了能级耦合, 我们猜想 BRE 的荧光猝灭可能是由于配体到金属的电荷转移 (ligand-to-metal charge transfer, LMCT) 导致辐射跃迁速率变低。

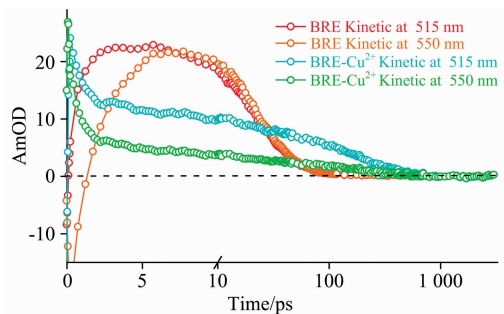


图 4 BRE 和 BRE-Cu²⁺ 在 515 和 550 nm 处的动力学曲线

Fig. 4 Kinetics of BRE and BRE-Cu²⁺ complex at 515 nm, 550 nm

为了验证上述理论, 我们探测了红外区域的瞬态吸收光谱, 如图 5 所示。由图 2 的紫外可见吸收光谱知 BRE-Cu²⁺ 在 815 nm 附近产生了新的吸收带, 而图 5 显示样品在 805~840 nm 处有正的 ESA 信号, 而不是负的 GSB 信号, 信号强度在十几皮秒时达到了最大, 然后随时间减弱, 说明此处的能态是样品分子被激发后的一定时间内生成的 LMCT 态, 而不是分子本身的初始激发态。我们对数据进行全局拟合, 得到两个寿命 11 和 186 ps, 如图 6 为 839 nm 处的动力学曲

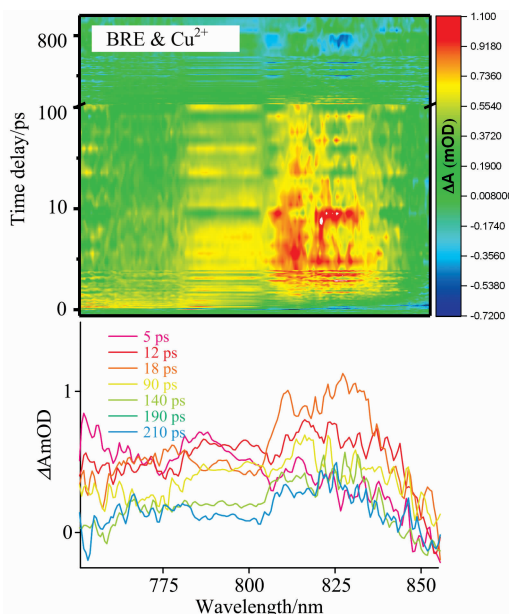


图 5 BRE-Cu²⁺ 的红外区域的瞬态吸收光谱

Fig. 5 Transient absorption spectra of BRE-Cu²⁺ complex in infrared region

线, 可以看出, 这个中间态有一个建立的过程, 因此我们认为 11 ps 的寿命就是 LMCT 态, 即被激发的分子存在一个 11 ps 的配体到金属的电荷转移过程, 然后以 186 ps 弛豫回基态。因此, Cu²⁺ 与 BRE 的配位导致 BRE 荧光猝灭的原因是发生了配体到金属的电荷转移, 增加了一个激发态的非辐射弛豫通路, 从而减小了辐射跃迁速率。此外, 铜离子对胆红素、胆绿素等线性四吡咯分子的荧光也有猝灭作用, 我们可

以推测在这些结构类似的分子中,也存在吡咯环到铜离子,即配体到金属的电荷转移,这个激发态的电荷转移过程使配体分子发生荧光猝灭。

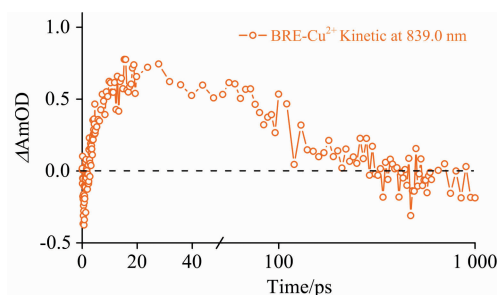


图 6 BRE-Cu²⁺ 在 839 nm 处的动力学曲线
Fig. 6 Kinetic of BRE-Cu²⁺ complex at 839 nm

3 结 论

以胆红素二甲酯与铜离子的配合物为研究对象,用紫外可见分光光度法、稳态荧光发射光谱和飞秒瞬态吸收光谱等技术对其进行了分析。Cu²⁺对BRE有明显的荧光猝灭作用,使BRE-Cu²⁺的荧光量子产率降低为BRE的5%。配合物分子在吸收光子到达激发态后会伴随着振动弛豫、内转换、系间穿越、荧光发射以及电荷转移、质子转移等过程,它们通常发生在超快时间尺度内。瞬态吸收光谱技术是研究在液相中分子超快动力学的一种理想方法。BRE和BRE-Cu²⁺的瞬态吸收光谱表明,BRE与Cu²⁺发生了能级耦合,激发态的BRE-Cu²⁺出现了与BRE不同的光物理过程,荧光猝灭可能是由于配体到金属的电荷转移。然后我们在红外探测的瞬态吸收光谱中看到了LMCT态的信号,这个中间态有11 ps的建立过程,然后激发态分子以186 ps弛豫回基态。

References

- [1] Kaplan M, Bromiker R, Hammerman C. *Seminars in Perinatology*, 2014, 38(7): 429.
- [2] Raimondi F, Borrelli A C, Ferrara T, et al. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, 2017, 30(17): 2078.
- [3] Mancuso C. *Neuropharmacology*, 2017, 118: 113.
- [4] Ramos P, Santos A, Pinto N R, et al. *Biological Trace Element Research*, 2014, 161(2): 190.
- [5] Hulzebos C V, Dijk P H. *Seminars in Perinatology*, 2014, 38(7): 412.
- [6] Braslavsky S E, Holzwarth A R, Schaffner K. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 1983, 22(9): 656.
- [7] Overbeek J T G, Vink C L J, Deenstra H. *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas*, 1955, 74(1): 81.
- [8] Berera R, van Grondelle R, Kennis J T. *Photosynth Res.*, 2009, 101(2-3): 105.

Excited State Dynamics of Bilirubin Dimethyl Ester-Copper Ions Complex

YAN Shu-jun, LIU Yang-yi, HE Xiao-xiao, ZHENG Ming, CAO Xiao-dan, XU Jian-hua, CHEN Jin-quan*
State Key Laboratory of Precision Spectroscopy, East China Normal University, Shanghai 200062, China

Abstract Bilirubin dimethyl ester (BRE) is a linear tetrapyrrole which is an analogue of bilirubin (BR)^[1-3]. There is no significant difference between the UV, IR and MS spectra of BR and BRE. BR/BRE can form complexes with a variety of metal ions. The coordination sites of BR and metal ions are mainly the pyrrole nitrogen, and propionic acid side chains, and the hydroxyl groups of the BR propionic acid side chains could be substituted with methyl groups to obtain BRE so that the metal ions only coordinate with the nitrogen on the pyrrole ring. Therefore, we have used esterified bilirubin BRE to study its interaction with metal ions, which has the advantages of reducing the coordination point with the metal, as well as the complexity of the product, and contributing to the spectral analysis. Metal ions have an effect on the fluorescence characteristics of BR/BRE. Unlike the fluorescence enhancement of Zn²⁺, Cu²⁺ has an obvious fluorescence quenching on BRE. Studies have shown that hyperbilirubinemia and gallstones are related to BR and copper ions^[4-7]. Therefore, studying the interaction of bilirubin and its analogues with Cu²⁺ is of great significance for the prevention and treatment of these diseases. When linear tetrapyrrole molecules coordinate with metal ions, they generally transform from the original chain structure to a porphyrin-like ring structure to suit the coordination with the central ion, a copper ion and the four central pyrrole nitrogens on a BR/BRE molecule coordinate to form a metal-centre square planar structure (Fig. 1). BRE itself has a relatively low fluorescence quantum yield because the vibration of the pyrrole ring causes some excited molecules to decay to the ground state in a non-radiative manner^[8]. Coordination of Cu²⁺ with BRE may cause their energy levels to couple to generate a new non-radiative de-excitation pathway leading to a decrease in fluorescence, but further research is needed on the quenching mechanism of Cu²⁺ on BRE fluorescence. The de-excitation processes of the excited state molecules generally occur on the ultra-fast time scale, which cannot be observed by the traditional steady-

state spectroscopy. The visible and infrared-band femtosecond transient absorption spectroscopy techniques were used to study the excited state spectral properties of BRE-Cu²⁺ complex in this paper. A new quenching mechanism of Cu²⁺ on the BRE fluorescence was discovered by the transient absorption spectrain the visible and infrared region. We have proposed and confirmed the Ligand-to-metal charge transfer (LMCT) as a result of the fluorescence quenching. Compared with the spectral properties of BRE, the charge transfer state would provide a non-radiative decay pathway to BRE-Cu²⁺ complex, reducing the fluorescence quantum yield of BRE to 5% of its original value. Moreover, two lifetimes (11 ps and 186 ps) were obtained by fitting the kinetic curves of the transient absorption spectra of the complex. We assign the 11 ps component to the build-up process of the LMCT state, while the 186 ps is the lifetime of the charge transfer state.

Keywords Bilirubin dimethyl ester; Copper ion; Transient absorption spectrum; Ligand-to-metal charge transfer

* Corresponding author

(Received Mar. 15, 2019; accepted Jul. 21, 2019)

第 21 届全国分子光谱学学术会议暨 2020 年光谱年会 (第二轮通知)

由中国光学学会和中国化学会主办的“第 21 届全国分子光谱学学术会议”暨由中国光学会光谱专业委员会主办的“2020 年光谱年会”将于 2020 年 10 月 30—11 月 2 日在成都召开,会议由四川大学分析测试中心承办。本次大会将秉承前 20 届分子光谱学学术会议之宗旨,以期形成自由研讨的学术氛围,让光谱相关或相近的思想撞击出火花,期待颠覆性创新创造力泉涌。

一、会议简要日程安排

2020 年 10 月 30 日

全天注册报到

16:00—18:00 组织委员会和学术委员会会议;《光谱学与光谱分析》编委会会议

2020 年 10 月 31 日

08:30—12:00 开幕式、大会报告

14:00—18:00 大会报告

2020 年 11 月 1 日

08:30—12:00 分组邀请报告和口头报告

14:00—18:00 分组邀请报告和口头报告

2020 年 11 月 2 日

08:00—12:00 大会报告及闭幕式

二、学术报告

本次会议将采用邀请报告和申请口头报告相结合的形式,同时也将开设青年论坛和墙报展示。组委会对青年学者、博士和硕士研究生等设立优秀论文奖(包括优秀口头报告和墙报),届时将组织专家进行评选。

2.1 邀请报告

已经确认参加会议并作大会报告的院士及国内外著名学者:

李 灿 院士 中国科学院大连化学物理研究所

陈洪渊 院士 南京大学

田中群 院士 厦门大学

孙世刚 院士 厦门大学

谭蔚泓 院士 湖南大学

张 锦 院士 北京大学

邀请报告信息将持续更新,请大家关注会议主页浏览相关信息:

<http://www.sinospectroscopy.org.cn/meeting/index.php?mid=24>

(下转 1684 页)

light path and the collection light path only overlap on the focal plane by the inclined incident. Therefore, threedimensional point spread function is compressed in the z -axis, and the interference between the defocused plane and the focal plane is effectively removed. The full width at half maximum and a full maximum of the axial spectral intensity response curve reduce, thereby the spectral axial resolution and tomography ability of the CBM are improved. Experiments show that DDACBM improves the anti-elastic scattering ability and tomographic capability of the CBM. And by optimizing the pupil parameter, the spectral axial resolution is improved by more than 30%, which can effectively reduce the spectral crosstalk in multi-layer samples. DDACBM provides a guarantee for further applications of Brillouin spectrum technology in the modern basic research fields.

Keywords Confocal Brillouin; Tomographic measurement; Anti-elastic scattering

* Corresponding author

(Received May 4, 2019; accepted Sep. 22, 2019)

(上接 1678 页)

2.2 口头报告

会议将开放一定数量的口头报告,大家可以自由申请,申请方式为在会议注册系统中提交口头报告题目(在口头报告栏目),并在会议截稿日期前通过会议稿件提交系统按要求提交论文摘要,申请截止日期为 2020 年 6 月 30 日。

2.3 青年论坛

对于青年学者,博士和硕士研究生可以申请青年论坛报告,申请办法和截止日期与口头报告相同,组委会将组织专家进行优秀报告评选,并颁发优秀论文证书和奖金。

2.4 墙报展示

墙报展示作为本次会议的一种主要形式。墙报要求制作规范,内容体现研究工作的创新点。在准备墙报时注意以下几个方面:

1. 墙报尺寸:高 110 公分×宽 80 公分;
2. 墙报内容不包括中英文摘要和参考文献;
3. 墙报内容以图文为主,层次分明,主要体现研究工作的创新性,主要结果和结论;
4. 墙报右上侧写上论文编号;

拟作墙报展示的代表,在会议注册系统中提交墙报题目和编号。组委会将组织专家对青年学者、博硕士研究生墙报进行评审,并对优秀墙报颁发优秀论文证书和奖金。

三、会议稿件

会议截稿日期为 2020 年 6 月 30 日,请大家按照会议第一轮通知的要求继续投稿。

<http://www.sinospectroscopy.org.cn/readnews.php?nid=94098>

四、会议注册

4.1 会议注册费

2020 年 9 月 20 日以前缴纳注册费:正式代表:1600 元/人;学生代表:1000 元/人;2020 年 9 月 20 日后及现场缴纳注册费:正式代表:1800 元/人;学生代表:1200 元/人,现场缴费将邮寄发票。由于酒店房间是预留,2020 年 9 月 20 日后及现场缴纳注册费的代表将不能保证房间;陪同家属 1000 元/人(没有发票)。

会议注册费收缴方式:

银行汇款,如网银、手机银行、支付宝、微信转账、银行柜台等。

收款单位:四川大学(请注明:2020 光谱+姓名);

帐号:5100 1870 4690 5988 8666;

开户行:建行成都川大支行;

汇款成功后请务必将姓名、参会编号、单位发票抬头、单位税号、汇款金额通过邮箱(atcpubs@scu.edu.cn)告知会务组,以便核实会议注册费发票信息。(如果需要开具增值税发票,请注明并提供单位名称、纳税人识别号、地址、电话、开户行及账号)

发票联系人:张亮 联系邮箱:zhang.liang@scu.edu.cn 联系方式:15902844473

4.2 会议注册系统

请登陆光谱网会议主页:<http://www.sinospectroscopy.org.cn/meeting/index.php?mid=24>

注册并提交您的参会信息,包括个人信息、报告题目、墙报题目、住房预定等信息。

(下转 1689 页)