

一种 pH 荧光特性物质的合成及其特性研究

马永山*, 吴俊森, 刘 雷, 张 超 (山东建筑大学市政与环境工程学院, 山东 济南 250101)

摘要: 合成并表征了化合物: N,N'-二苯丙氨酸胺-3,4,9,10-花四羧酸二酰亚胺(PDCDA)。研究了 pH 值变化对其水溶液可见吸收光谱和荧光发射光谱的影响, 探讨了荧光强度变化的机理, 并利用 PDCDA 构建了具有“开-关”特性的 pH 荧光传感器。结果表明, PDCDA 化合物水溶性好、荧光量子产率高, 荧光强度与 pH 值间有着强烈的依赖关系, 在碱性及中性溶液中荧光强度较强且稳定, 而在酸性溶液中荧光被淬灭, PDCDA 在一个非常窄的 pH 范围内荧光强度发生了明显的变化, pH 值的改变对发光团 $\pi-\pi$ 堆积产生影响进而导致其荧光发射光谱和可见吸收光谱发生改变。PDCDA 可用作水溶液的 pH 荧光传感器, 检测 pH 值范围为 3.8~6.3。

关键词: 花二酰亚胺; 水溶性; pH 荧光传感器; 吸收光谱; 荧光光谱

中图分类号: X830 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-6923(2012)01-0168-05

Synthesis and characterization of a pH fluorescence compound. MA Yong-shan*, WU Jun-sen, LIU Lei, ZHANG Chao (School of Municipal and Environmental Engineering, Shandong Jianzhu University, Jinan 250101, China). *China Environmental Science*, 2012,32(1): 168~172

Abstract: N, N'-bi(L-phenylalanine amine)-perylene-3,4; 9,10-dicarboxylic diimide(PDCDA) was synthesized and characterized. The absorbance and fluorescence of PDCDA (10^{-5} mol/L) in aqueous solution were studied by varied pH values. The mechanism of the fluorescence intensity change was also discussed. And a fluorescent pH sensor was designed with PDCDA. It was water-soluble and had high fluorescent quantum yield. The fluorescence intensity of PDCDA was strongly dependent on pH, which was strong and stable in alkaline or neutral solution and was weakened in acid solution. The fluorescence intensity of PDCDA changed obviously even in a small pH range. The $\pi-\pi$ stacking caused by pH led to the change of fluorescence spectrum and absorption spectrum. The PDCDA can be used as a fluorescent pH sensor and the pH detection range was 3.8~6.3.

Key words: perylene diimide derivative; water-soluble; fluorescence pH sensor; absorption spectrum; fluorescence spectrum

近年来, pH 荧光探针广泛应用于分析化学、生物分析化学、细胞生物学(量度细胞内的 pH 值)和医学(监控血液中的 pH 值)领域^[1-2]。花及其衍生物具有优异的化学、热和光化学稳定性^[3-4], 对从可见区到红外区的光有很强的吸收, 而且其荧光量子产率接近 1, 单线态的荧光寿命大约为 4ns^[5], 在分子电子学材料、激光材料、液晶显示材料、电致发光器件、感光体及太阳能电池方面应用广泛^[6], 是一类性能优异的分子荧光探针^[7]。

带有羧基的花酰亚胺型荧光染料具有显著的优点: 花骨架使其具备亲脂性; 羧基兼具亲水性, 使其能渗透到细胞内, 可用于活体组织内 pH 值的测定; 斯托克斯位移较大可避免吸收光谱干扰发射光谱, 从而提高测试的灵敏度与准确性^[8]。因

此将带有胺基的花酰亚胺类荧光染料开发作为 pH 荧光探针具有重要的应用价值和广阔的发展前景。花二酰亚胺衍生物的合成方法已有报道^[9-10], 作者参考文献^[9-10]自行设计合成了含有 2 个羧基亲水性基团的花二酰亚胺衍生物, 并研究了它作为 pH 荧光探针的光谱特性。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

氢氧化钾、二甲基亚砷、浓硫酸、无水乙醇、

收稿日期: 2011-04-13

基金项目: 水体污染控制与治理科技重大专项资助项目(2008ZX07422-001); 山东建筑大学开放实验资助项目(2009030)

* 责任作者, 实验师, mlosh@sdjzu.edu.cn

氢氧化钠、盐酸等均为市售分析纯;茚四酸酐与 L-苯丙氨酸购于 Aldrich 公司,为分析纯;水为二次蒸馏水.测试仪器主要有:瓦里安 Inova 400MHz 核磁共振氢谱仪;布鲁克 TENSOR27 型傅里叶变换红外光谱仪;CARY50 紫外可见分光光度计;日立 F-4500 型荧光分光光度计;上海雷磁 PHS-3C 精密 pH 计.

1.2 N,N'-二苯丙氨酸铵-3,4;9,10-茚四酸二酞亚胺(PDCDA)的合成

PDCDA 的合成路线见文献[9-10].首先合成 N,N'-二苯丙氨酸基-3,4;9,10-茚四酸二酞亚胺:将 3.3g(0.02mol) 苯丙氨酸和 1.12g (0.02mol)KOH 溶于 20mL 水中,室温磁力搅拌 12h,蒸发至干,得 4.06g 苯丙氨酸钾盐晶体.将苯丙氨酸钾盐超声分散在 40mL DMSO(二甲基亚砜)溶液中,磁力搅拌下加热回流 0.5h,再加入 0.8g 精制的茚四酸酐继续搅拌、回流,每隔 0.5h 取少量样品溶解在浓硫酸中测可见吸收光谱,直到 500,546nm 左右茚酞的特征吸收峰消失,560,600nm 左右出现对称茚四酸二酞亚胺的特征吸收峰,且 560,600nm 特征峰的相对强度基本不变时停止反应.将反应后体系 3000r/min 离心,沉淀用无水乙醇洗至滤液基本无色,加水用稀盐酸酸化至 pH=1,水洗 3 次,得到目标固体化合物.将其溶于 20mL15%的氨水,磁力搅拌 5min,过滤得滤液,蒸发除去溶剂得红棕色固体,80℃真空干燥得 0.75g 产物 PDCDA,产率约 40%.

2 结果与讨论

2.1 PDCDA 的结构表征

图 1 为 PDCDA 的核磁共振氢谱图,化学位移 8.12×10^{-6} 和 7.61×10^{-6} 处出现了 2 组双重峰,分别为茚环上的 4 个内侧氢和 4 个外侧氢, 7.12×10^{-6} 和 7.02×10^{-6} 处的 2 组双重峰,分别为 2 个苯环上的 4 个邻位氢和 4 个间位氢, 6.98×10^{-6} 处的双重峰为 2 个苯环的对位氢, 3.46×10^{-6} 处的单重峰为 2 个羧基氢.

图 2 为 PDCDA 的红外光谱图, $3443, 3163\text{cm}^{-1}$ 处为酰胺 N—H 的伸缩振动峰, 3052cm^{-1} 处为茚环上的 C—H 伸缩振动峰, 2846cm^{-1} 处为饱和 C—

H 伸缩振动峰, 1690cm^{-1} 处为羧酸 C=O 键的伸缩振动峰, 1592cm^{-1} 处出现了茚环 C=C 的伸缩振动峰, $1399, 1361\text{cm}^{-1}$ 处为 C—N 伸缩振动峰, 1273, 1183, 1114, 1021, 951cm^{-1} 为羧酸中 C—O 伸缩振动峰, 853, 809, 793, 737, 659, 461, 432cm^{-1} 处为 C—H 非平面摇摆峰.

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱测得其分子量为 624.2.

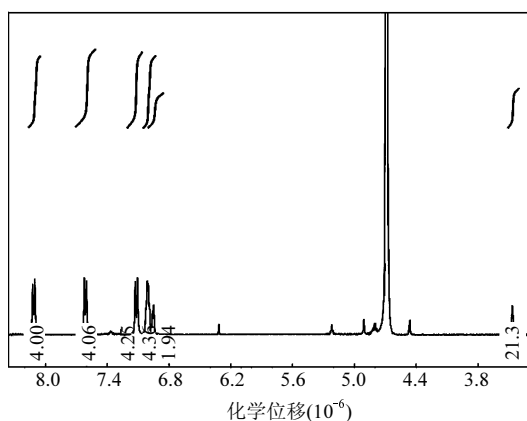


图 1 PDCDA 的 ^1H -NMR 图谱

Fig.1 ^1H -NMR spectrum of compound PDCDA

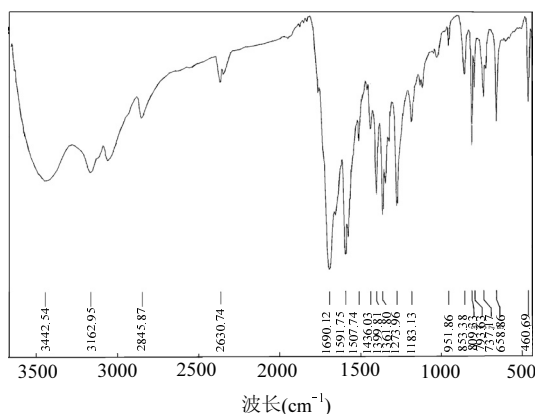


图 2 PDCDA 的 FTIR 图谱

Fig.2 FTIR spectrum of compound PDCDA

2.2 UV-vis 吸收光谱

10^{-5}mol/L 的 PDCDA 水溶液的 pH 值,用标准的 KOH 或 HCl 水溶液滴定时,CARY50 紫外可见分光光度计测得可见吸收曲线如图 3 所示.可见, PDCDA 的最大吸收波长为 541nm,当溶液 pH

值由 12.01 降低到 3.22 时,吸收峰强度逐渐降低,且在酸性区域吸收峰红移。

对于花系衍生物来说,电子振动吸收具有自身的特点,电子振动能级存在从 $v=0 \rightarrow v'=0$ 和 1 的跃迁, v 和 v' 分别对应于基态和激发态.在自由单体状态下,弗兰克-康顿(Franck-Condon)效应系数为 $A^{0 \rightarrow 0} > A^{0 \rightarrow 1}$,而当单体开始聚集时,电子从 $0 \rightarrow 1$ 跃迁的几率会增加^[11-12].从 pH 12.01 到 6.28, $0 \rightarrow 1$ 与 $0 \rightarrow 0$ 相比跃迁的几率变化不大,说明在这个 pH 值范围花四羧酸根以单体形式存在;从 6.28 到 3.86,吸收峰强度急剧降低,且 $0 \rightarrow 1$ 跃迁的几率明显增大,说明在这个 pH 值范围的 $\pi-\pi$ 作用较强;而当 pH 值降到 3.86 以下,峰形不再改变,初始的吸收峰发生红移,最终在整个检测波段内出现吸收,这是因为伴随 pH 值降低, PDCDA 的花四羧酸单体发生 $\pi-\pi$ 作用而聚集,从而阻止了光的通过。

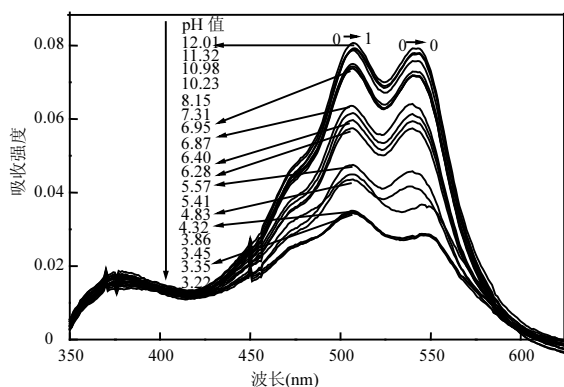


图3 pH 值对水溶液中 PDCDA 吸收光谱的影响

Fig.3 The absorption spectra of PDCDA in aqueous solution with varied pH

2.3 荧光发射光谱

2.3.1 PDCDA 与 H^+ 作用, 荧光 ON-OFF 用 NaOH 调节 PDCDA 水溶液至碱性后再滴加 H^+ , 用日立 F-4500 型荧光分光光度计测得激发波长为 533nm 时, 不同 pH 值的荧光发射光谱如图 4 所示. 从图 4 看出, PDCDA 的最大发射波长为 547nm, 当溶液 pH 值由 12.01 降低到 3.22 时, 荧光发射强度逐渐降低, 直至荧光淬灭. 原因是在碱性溶液中 PDCDA 以羧酸根的形式存在, 羧酸根阴离子为富电子特征, 使整个化合物分子具

有较高的电子密度, 花核平面之间存在的斥力阻止了它们的聚集, 从而获得高的荧光量子产率; 随着羧酸根不断的质子化, 共轭体系的电子云密度不断下降, 荧光强度呈现持续下降的趋势. 荧光强度下降全过程根据其下降的快慢程度分为 3 个阶段: 前一阶段(对应 pH 值由 12.01 降低到 6.28)荧光强度缓慢降低, 是因为在碱性溶液中羧酸根未结合质子, 电子云密度较高, 发光物种比较稳定; 中间阶段(对应 pH 值由 6.28 降低到 3.86)荧光强度迅速降低直至淬灭, 此过程对应于 PDCDA 一端的羧酸根结合氢质子, 另一端仍保持未质子化状态, 质子化过程中未质子化的羧酸根对整个共轭体系仍表现为供电子性, 至溶液 pH 值达 3.86, PDCDA 另一端的羧酸根也结合了氢质子, 整个化合物分子从主要以碱式形式存在变为主要以酸式形式存在, 分子负电势减弱, 花分子间发生聚集作用和光诱导电子转移现象使荧光淬灭; 后一阶段(pH 值降到 3.86 以下)荧光完全淬灭, 峰形不再改变. 根据图 4 荧光强度变化与 pH 值的对应关系, 通过 Sigmoidal 拟合, 得到荧光强度随 pH 值变化的改变趋势. 由图 5 可以看出, 伴随溶液 pH 值降低, 荧光发射强度逐渐降低, 整个荧光减弱阶段荧光强度衰减快慢不一样. 当 pH 值从 12.01 减小到 6.28 这一阶段时, 荧光强度降低缓慢, 当 pH 值由 6.28 降低到 3.86, 荧光强度急剧降低, 当 pH 值继续减小到 3.86 以下这一阶段时, 荧光淬灭. 与本化合物的吸收和荧光光谱的变化趋势相反, 曾有文献报道了一类吡啶 N 原子上没有取代基的菁染料, 可以产生质子化和脱质子的作用, 这种作用可以引起吸收光谱和荧光光谱的峰值随着 pH 值的升高而降低从而被用于检测 pH 值^[13-14]. 此类探针的吸收和荧光光谱的变化机理可以理解为是由于酸碱对 NH^+/N 具有不同的推拉电子能力, 从而引起共振效应导致的。

2.3.2 PDCDA 与 OH^- 作用, 荧光 OFF-ON 图 6 是 10^{-5} mol/L 的 PDCDA 的水溶液, 在加入 H^+ 使荧光完全淬灭后, 引入不同量的 NaOH 水溶液时, 荧光的变化. 从图 6 可以看出, OH^- 引入后, 荧光逐渐恢复, 荧光强度出现递增的趋势, 而且荧光光谱的

曲线与之前的 PDCDA 引入 H^+ 的形状是一致的, 这说明 OH^- 不断地将已质子化的 PDCDA 去质子化, 将整个化合物分子主要以酸式形式存在恢复为以羧酸根阴离子存在的阶段, 从而发出荧光. 而且在 pH 值相同的不同水溶液中, 浓度相同的 PDCDA 的荧光强度几乎相等, 说明该化合物可应用于定量分析水体的 PH 值.

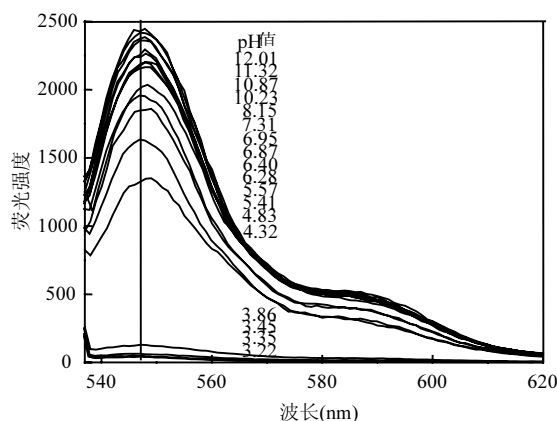


图4 pH 值对水溶液中 PDCDA 荧光光谱的影响

Fig.4 The emission spectra of PDCDA in aqueous solution with varied pH

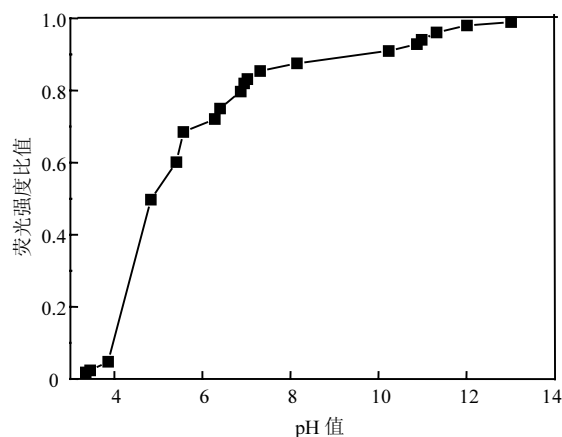


图5 PDCDA 最大荧光强度值与 pH 值的关系

Fig.5 The corresponding graph with maximum fluorescence intensity and different pH

2.4 pH 荧光传感器的构建

从以上分析可以看出, PDCDA 的荧光对 pH 值具有强烈的依赖性, 并可以在 pH 值从 6.28 降低到 3.86 非常窄的范围内发生明显的变化, 据此, 可以利

用 PDCDA 构建具有“开-关”特性的 pH 荧光探针. 图 7 为 PDCDA 在 pH6.3 和 3.8 时的荧光光谱图, 在 pH6.3 时荧光处在“开”的状态, 而 pH3.8 时, 荧光“关”, 可以看出, 该体系的荧光强度变化大, 荧光开启时的强度大约是关闭时的 30 倍以上. 这个过程可以很明显的用肉眼观测, pH6.3 时, 有强的黄色荧光, pH3.8 时, 几乎没有荧光. 图 8 则说明该荧光传感器可以可逆调节, 当 pH 值在 3.8 和 6.3 之间进行调节时, 荧光强度发生可逆的变化, 每次调节荧光团的荧光强度几乎都可以回到原来的位置, 而且几乎是瞬间实现荧光的开启和关闭. 这一结果对于深入研究花二酰亚胺衍生物的基础光物理性质和 pH 荧光传感体系的设计具有理论和应用意义.

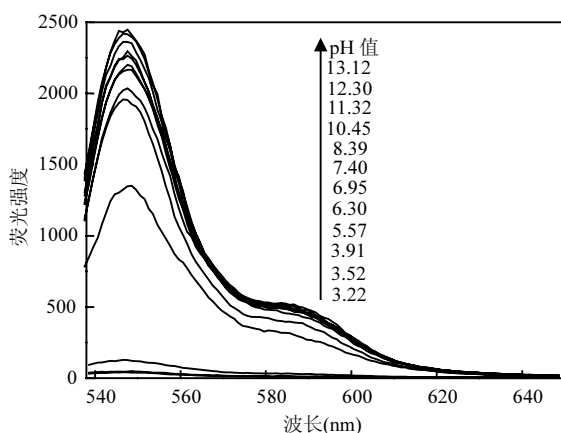


图6 pH 值对水溶液中 PDCDA 荧光光谱的影响

Fig.6 The emission spectra of PDCDA in aqueous solution with varied pH

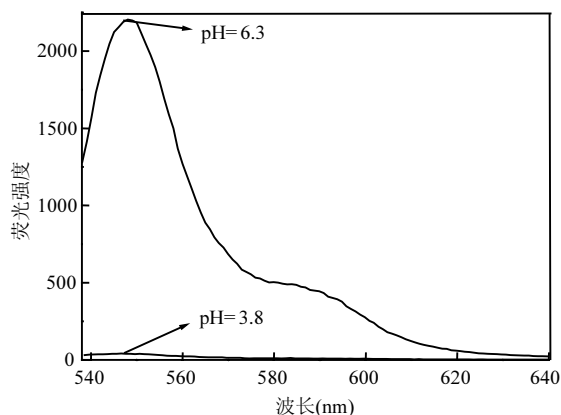


图7 PDCDA 在 pH 值为 6.3 和 3.8 时的荧光

Fig.7 Fluorescence spectra of PDCDA with pH 6.3 and 3.8

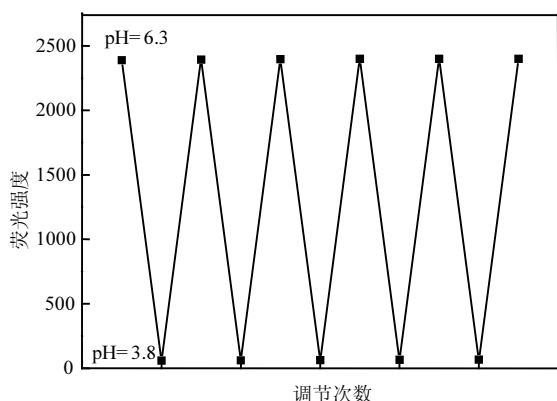


图8 PDCDA 在 pH 值为 6.3 和 3.8 之间调节时的荧光强度的可逆变化

Fig.8 Fluorescence intensity reversible change of PDCDA between pH 6.3 and 3.8

3 结论

3.1 合成了一种水溶性的花二酰亚胺类衍生物:N,N'-二苯丙氨酸胺-3,4;9,10-花四羧酸二酰亚胺(PDCDA).采用核磁氢谱、红外光谱和基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱表征,谱图上出现了花环上的 8 个氢和苯环上的 10 个氢及 2 个羧基氢,酰胺 N—H 的伸缩振动峰,花环上的 C—H 伸缩振动峰、饱和 C—H 伸缩振动峰、羧酸 C=O 键的伸缩振动峰及 C—N 伸缩振动峰,分子量为 624.2,证实了其结构正确。

3.2 化合物PDCDA的荧光强度与pH值间有着强烈的依赖关系,当 pH 值从 12.01 降到 3.22 时, $c(\text{PDCDA}) = 10^{-5} \text{ mol/L}$ 水溶液的紫外-可见吸收强度减弱,且变化灵敏.当该溶液的 pH 值从 12.01 减小到 6.28 时,荧光强度降低缓慢,当 pH 值从 6.28 继续减小到 3.86 时,荧光强度急剧降低,当 pH 值降低到 3.86 以下,荧光淬灭.而当 pH 值升高时,荧光强度可逆恢复到相应强度。

3.3 利用 PDCDA 构建了具有“开-关”特性的 pH 荧光传感器.pH6.3 时荧光“开”, pH3.8 时,荧光“关”,荧光和颜色变化明显,响应快,具有较高的灵敏性。

参考文献:

[1] Roy I, Gupta M N. Smart polymeric materials: Emerging

biochemical applications [J]. Chem. Biol., 2003,10(12):1161-1171.

[2] Gil E S, Hudson M. Stimuli responsive polymers and their bioconjugates [J]. Prog. Polym. Sci., 2004,29(12):1173-1222.

[3] Xiao S Q, El-Khouly M E, Li Y L, et al. Dyads and triads containing perylenetetracarboxylic diimide and porphyrin: efficient photoinduced electron transfer elicited via both excited singlet states [J]. J. Phys. Chem. B, 2005,109(8):3658-3667.

[4] Grabowski Z R, Rotkiewicz K. Structural changes accompanying intramolecular electron transfer: focus on twisted intramolecular charge transfer states and structures [J]. Chem. Rev., 2003, 103(10):3899-4031.

[5] Li Y J, Hao L, Li Y L, et al. Energy transfer switching in a bistable molecular machine [J]. Org. Lett., 2005,7(22):4835-4838.

[6] 罗艳,林崔昆,王振领,等.二(正丁基)花四酞二亚胺微纤的制备及其发光性质 [J]. 发光学报, 2007,28(6):923-929.

[7] Gronheid R, Hofkens J, Kohn F, et al. Intramolecular fomter energy transfer in a dendritic system at the single molecule level [J]. J. Am. Chem. Soc., 2002,124:2418-2419.

[8] 洪心进,罗倩,王春祥,等.可溶性的含羧基花酰亚胺类化合物的合成及其光谱性质研究 [J]. 感光科学与光化学, 2006,24(3): 167-172.

[9] 马永山,张凤霞,孙友敏,等.水溶性花二酰亚胺类衍生物 pH 荧光探针的合成及表征 [J]. 发光学报, 2011,32(3):251-255.

[10] Sean M M, Wang Z Y. Synthesis and characterization of poly (aryl ether imide)s containing electroactive perylene diimide and naphthalene diimide units [J]. Journal of Polymer Science A: Polymerchemistry, 2000,38:3467-3475.

[11] Wang W, Han J J, Wang L Q, et al. Dynamic π - π stacked molecular assemblies emit from green to red colors [J]. Nano. Lett., 2003,3(4):455-458.

[12] Ma Y S, Wang C H, Zhao Y J, et al. Perylene diimide dyes aggregates: optical properties and packing behavior in solution and solid state [J]. Supramolecular Chemistry, 2007,19(3):141-149.

[13] 宋波,张茜,彭孝军,等.新型水溶性荧光标示剂喹啉方酸菁染料的合成及光谱性能 [J]. 高等学校化学学报, 2008,29(5): 932-935.

[14] 王炳帅,王丽,吴彤,等.苯乙烯类菁染料 pH 探针的合成与活细胞成像 [J]. 高等学校化学学报, 2010,31(6):1148-1151.

致谢: 感谢山东建筑大学环境学院母锐敏副教授对本文在写作方面的帮助。

作者简介: 马永山(1979-),男,山东临清人,实验师,硕士,从事分子荧光探针研究.发表论文 16 篇。