

•知识介绍•

doi: 10.3866/PKU.DXHX201809028

www.dxxh.pku.edu.cn

光致发光与荧光传感 ——光化学基本原理的应用

李悦, 郭东升, 阮文娟*

南开大学化学学院, 天津 300071

摘要: 在物理化学课程教学中融入科学前沿实例可以帮助学生掌握基本原理、提高学习兴趣。光化学是物理化学课程中的重要学习内容, 但该部分内容因为涉及到激发态的能量衰减过程而抽象难懂。如果在学习这部分知识时, 将该部分原理在指导荧光传感探针设计和研究作用机理方面的应用作为知识灵活运用的实例引入, 则对理解和掌握所学内容大有裨益。教学时可通过对荧光传感探针的结构及作用机制、各种光物理过程对荧光发射的影响, 以及基于荧光传感原理的科研成果的介绍, 使学生体会到物理化学的基本原理在科学前沿中的实际应用。

关键词: 光致发光; 光物理过程; 荧光传感; 作用机制

中图分类号: G64; O6

Photoluminescence and Fluorescent Sensing: Application of the Fundamental Principles of Photochemistry

LI Yue, GUO Dongsheng, RUAN Wenjuan *

College of Chemistry, Nankai University, Tianjin 300071, P. R. China.

Abstract: The incorporation of the examples of scientific frontiers to course teaching is helpful for the students to accept fundamental knowledge and inspire learning interest. Photochemistry is an important content of the course of physical chemistry. However, the involvement of the relaxation of excited state makes this part of knowledge very abstract and difficult to understand. If the teachers could incorporate the application of photochemical principles in the design and mechanical investigation of fluorescent probes as the examples of the flexible application of basic knowledge, the students would get a better understanding of this part of knowledge. By the introduction about the structure and interaction mechanism of fluorescent probes, discussion about the effect of photophysical processes on fluorescent emission and overview about the research frontier based on the mechanism of fluorescent sensing, the teacher could make the students realize the practical application of the fundamental principles of physical chemistry in scientific research.

Key Words: Photoluminescence; Photophysical processes; Fluorescent sensing; Interaction mechanism

物理化学课程对于化学以及相关专业的学生而言是一门非常重要的课程。物理化学主要是研究物质体系的化学行为的原理、规律和方法。相对其他化学课程而言, 具有理论性强、逻辑紧密的特点。而且, 物理化学知识的应用更偏重于对物质体系的化学现象的解释和机理的探究。因此, 在学习了一些基本原理之后如果能进一步了解其能解决的实际问题, 则对于提高分析问题和解决问题的

收稿: 2018-09-25; 录用: 2018-10-15; 网络发表: 2018-10-24

*通讯作者, Email: wjruan@nankai.edu.cn

基金资助: 天津市物理化学系列课程教学团队建设项目; 南开大学教育教学改革项目

能力大有裨益。

对于物质受光激发后发生的行为,物理化学课程在特殊反应动力学中的光化学反应部分一般都会有较为详细的介绍。分子在光的照射下,吸收光子/光能,其电子跃迁至高能态,产生电子激发态分子。激发态分子具有较高的能量,处于不稳定状态,需要通过一系列光物理以及光化学过程实现能量衰减,使其回复到稳定的基态状态。光化学过程是通过发生化学反应使能量衰减,进而生成新的产物。而光物理过程是通过辐射跃迁、非辐射跃迁、能量传递和电子转移等形式使能量衰减。能量的衰减既可以是分子内的,也可以是分子间的。分子内的光物理过程根据是否发射光子可分为辐射跃迁和非辐射跃迁,两者也可根据跃迁前后电子自旋多重度是否发生改变进一步划分。例如,荧光和磷光均为辐射跃迁,但荧光为电子自旋多重度不变的辐射跃迁,而磷光为电子自旋多重度改变的辐射跃迁。内转换和系间窜越均为非辐射跃迁,但内转换为电子自旋多重度不变的非辐射跃迁,而系间窜越则为电子自旋多重度改变的非辐射跃迁。分子间的失能过程则包括能量传递和电子转移。

在能量衰减过程中,光化学过程和光物理过程中的非辐射跃迁均不会出现发光现象,只有通过光物理过程的辐射跃迁形式衰减能量才能出现发光现象。这种物质受光激发后又将能量以光的形式发射出来的现象就是光致发光。

根据物质的光致发光原理可以研究很多实际问题,例如目前备受关注的科学前沿课题——荧光传感,就是基于激发态分子通过光物理过程进行能量衰减的基本原理,将经过特殊设计的光致发光物质用于识别我们肉眼看不到的微观世界中发生的事件,并通过识别过程影响宏观的荧光信号。该领域的研究不仅可以对环境污染物进行高灵敏度的检测,而且在生物分析以及临床诊断领域都具有广阔的应用前景。

1 荧光传感和荧光传感探针

荧光传感由于具有灵敏度高、操作简便、设备低廉等特点而成为近期化学和生物分析领域的研究热点。荧光传感就是将分子间相互作用的化学信息转变为对荧光信号的影响(如荧光增强或者猝灭、荧光特征峰位置的移动、荧光寿命的变更和荧光偏振的改变等),从而实现特定分子或者离子的选择性识别。执行这种转变过程的物质被称为荧光传感探针,其可以是分子,也可以是聚集体、配位聚合物、纳米粒子等。因为荧光传感涉及到荧光传感探针与被分析物结合前后的激发态不同的发光行为,因此可以成为理解光物理过程的典型例子。那么,怎样将与光物理过程相关的知识和荧光传感探针的设计联系起来呢?这首先需要了解荧光传感探针的基本结构。

2 荧光传感探针的基本结构

一个典型的荧光传感探针一般由报告基团(亦称荧光基团)、连接体和识别基团三个部分组成(图1)^[1]。但实际设计荧光传感探针时会根据实际应用需要进行调整。比如,有的荧光传感探针直接把报告基团和识别基团相连,省略了连接体部分。有的荧光传感探针的报告基团和识别基团甚至是共轭在一起的,使两者难以准确划分。

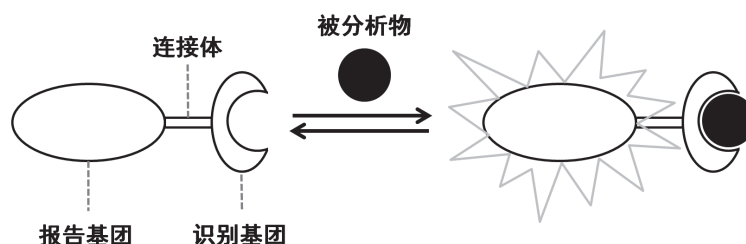


图1 荧光传感探针的结构

报告基团用于光能的吸收和荧光的发射；识别基团用于(共价/非共价)结合待检测物；连接体用来连接荧光基团和识别基团。荧光传感探针的识别过程主要包含两个方面：首先，识别基团同目标分析物产生选择性相互作用；然后，被分析物与识别基团结合后的相互作用使报告基团的荧光信号发生改变，具体表现为荧光强度的猝灭、增强或荧光特征峰蓝/红移等。因此，荧光传感探针的选择性主要由识别基团所决定，其灵敏性则主要由报告基团所决定，而报告基团的荧光发射会受哪些因素影响呢？

3 影响荧光发射的因素

绝大多数荧光传感探针都是通过荧光强度的变化来反映其与被分析物的作用。荧光强度(I)与吸收的光强度(I_a)和荧光量子产率(Φ_F)成正比。

$$I = \Phi_F \cdot I_a \quad (1)$$

在使用荧光光谱仪进行测量时，通常仪器只观测与入射光方向垂直的一小部分发射光。因此需要将总的荧光强度 I 乘以一个比例系数，才能得到实际被仪器测量得到的荧光强度($I_{\text{测}}$)。

$$I_{\text{测}} = I \cdot Z = \Phi_F \cdot I_a \cdot Z \quad (2)$$

其中， Z 为仪器因子。结合朗伯比尔定律，可推导得到荧光强度与入射光强度 I_0 之间的关系^[2]。

$$I = 2.3 \Phi_F \cdot I_0 \cdot \varepsilon \cdot l \cdot c \quad (3)$$

其中， ε 、 l 、 c 分别为消光系数、入射光的光程以及探针浓度。对于同一组测量， ε 、 l 、 c 都不发生变化，因此荧光强度可以用荧光量子产率表示。荧光量子产率是指荧光分子发射的光子数占吸收的光子数的分数。显然，荧光量子产率越高，则荧光强度越强。

光激发分子形成单重态的激发态分子，其可能参与发射荧光、内转换、系间窜越以及分子间作用的失活过程。因此总的失活速率就是其所参与的各个失活过程速率的加和。

$$k_{\text{总}} = k_F + k_{\text{IC}} + k_{\text{ISC}} + k_q \cdot [Q] \quad (4)$$

其中， k_F 、 k_{IC} 、 k_{ISC} 和 k_q 分别为荧光、内转换、系间窜越和分子间作用失活过程的速率常数， $[Q]$ 为猝灭剂的浓度。根据光化学第二定律，体系每吸收一个光子则活化一个分子。另一方面，一个激发态分子如果通过荧光发射的方式失活，也只发射一个光子。因此荧光量子产率就是激发态分子中通过发射荧光而回到基态的分子数目占全部激发态分子数目的分数，可以由荧光失活速率和总失活速率的比值得到^[3]。

$$\Phi_F = \frac{k_F}{k_{\text{总}}} = \frac{k_F}{k_F + k_{\text{IC}} + k_{\text{ISC}} + k_q \cdot [Q]} \quad (5)$$

因此，荧光量子产率不仅受荧光发射的速率所影响，还会受到内转换、系间窜越和分子间失活等其他非辐射光物理过程的影响。除此之外，被分析物也会对荧光量子产率(荧光强度)产生影响。

4 被分析物与荧光传感探针的作用机制

一般而言，在荧光传感过程中，传感探针与被分析物的作用不会直接对荧光发射速率造成很大影响，但与传感探针结合的被分析物可对内转换、系间窜越以及分子间作用失活过程的速率产生影响，从而会间接影响到荧光强度。下面我们就这种影响的作用原理分别进行分析。

4.1 内转换

内转换是多重度不改变的电子态间的无辐射跃迁。内转换过程包括由高阶激发单重态(S_n , $n > 1$)向最低激发单重态(S_1)的非辐射跃迁、 S_1 态向基态(S_0)的非辐射跃迁，以及由高阶激发三重态(T_n)向最低激发三重态(T_1)的非辐射跃迁。内转换的速率可以用能隙定律进行经验判断。该定律指出，内转换的速率随参与跃迁的两个电子态的能隙间隔呈指数下降。对于绝大多数分子， S_n 能级到 S_1 能级的间隔要远小于 S_1 到 S_0 的间隔。光激发分子后，不管激发到哪一个单重激发态，都会快速弛豫到 S_1 态，所以荧光都是从 S_1 态发出的(卡夏规则)^[4]。也正因为如此，通常情况下改变 S_n 到 S_1 态的内转换过程

不会对荧光发射产生影响。同时,三重态之间的内转换过程影响磷光发射而不影响荧光。因此,调节 S_1 到 S_0 的内转换过程是设计荧光传感的一个重要策略。

由于在内转换过程中,电子能量转化为振动能,分子内的振动可看作是内转换的促进剂。分子刚性的提高可以减弱分子内的振动,由此可降低内转换的速率,从而使分子的激发能不易因振动而以热能形式释放。近年来研究较多的基于聚集诱导发光(aggregation-induced emission, AIE)的荧光探针就是根据该原理设计的。AIE 分子除了具有共轭基团外,通常还具有多个可以自由旋转的单键。当其在均相溶液中存在时,激发能会由于沿这些单键旋转的振动而耗散掉,因此没有荧光发射。但是当 AIE 分子以聚集形式存在时,其分子内的转动受到了抑制,内转换过程受阻,因此激发能主要以荧光发射的形式释放,产生强荧光。如果能够通过被检测物改变 AIE 分子的聚集形式,即可得到基于该原理的荧光探针。例如在检测葡萄糖时,在具有 AIE 效应的分子四苯乙烯上引入硼酸基团。该分子在溶解状态下不发光,加入葡萄糖之后,由于葡萄糖上的羟基与硼酸基团反应发生聚合,所以可观察到明显的荧光增强^[5]。

4.2 系间窜越

系间窜越是不同多重度的电子态间的无辐射跃迁,过程当中有电子自旋翻转的发生。温度、重原子效应、能隙以及电子组态等均会对系间窜越的速率造成影响。其中,荧光传感中用到最多的是重原子效应。

在本科结构化学的学习中,一般都是把电子运动近似分解为轨道运动和自旋运动,电子运动波函数是两者波函数的乘积。如果严格按照该近似,系间窜越将不会发生。但电子的轨道运动会产生磁场与磁矩,这个磁矩就会对电子自旋的相位造成影响,这就是旋轨耦合。旋轨耦合可在一定程度上改变电子的自旋相位,导致三重态和单重态波函数发生某种程度的混合。旋轨耦合能与原子序数的四次方成正比。因此如果分子中含有原子序数大的原子时,旋轨耦合能将增大,旋轨耦合对电子自旋相位的影响也将增大,这种作用将使电子的自旋发生翻转。

重原子效应通常用来设计检测重金属离子如 Hg^{2+} 等的荧光猝灭型荧光传感探针。设计这种探针时只需要在荧光基团上连接硫、氮等软碱原子作为识别基团与重金属离子结合即可^[6]。该荧光传感探针本身具有比较强的荧光,结合重金属离子之后,由于重金属离子具有较大的原子序数,可以显著增强系间窜越,因此可使荧光猝灭。因为重原子效应可以促进系间窜越,所形成的三重态有可能发射磷光,所以在设计探针时,如果引入重金属离子(如 Ru^{2+}),则有望得到磷光传感探针^[7,8]。

4.3 分子间作用失活过程

分子间作用的失活过程包括电子转移和能量转移。对于电子转移,我们可以通过前线轨道的能级图来说明激发态和基态电子转移的区别(图 2)^[9]。从图中我们可以看出,对于激发态来说,无论氧化还是还原都比基态要容易。对于荧光传感探针,激发是由于光照所引起的,因此这种电子转移也被称为光诱导电子转移。根据该机理可以设计检测缺电子性或富电子性较强化合物的荧光猝灭型荧光传感探针。在设计时,需要根据被分析物的电性,选择与之电性相反的荧光基团作为报告基团以促进光诱导电子转移的发生,比如配位聚合物。配位聚合物是近年来新兴的一类荧光传感探针。使用配位聚合物检测的最为重要的一类被分析物就是硝基爆炸物^[10]。硝基由于具有强的吸电子能力,因此硝基爆炸物大多为缺电子性质。因此在设计配位聚合物时,常在其荧光基团上引入氨基、羟基等给电子基团,使荧光基团富电子。所设计的配位聚合物荧光传感探针本身具有较强的荧光发射。加入硝基爆炸物之后,配位聚合物中被光激发到 LUMO 轨道上的电子不是重新回到 HOMO 轨道产生荧光发射,而是转移到硝基爆炸物的 LUMO 轨道,由此使荧光猝灭。

在能量转移中,作为能量给体的激发态分子将能量传递给受体分子使其达到激发态,自身回到基态。能量转移的具体机理较为复杂,但一般都要求给体的发射光谱与受体的吸收光谱具有一定程度的重叠。例如在使用配位聚合物检测丙酮时,就可根据丙酮具有比其他挥发性有机物更长的吸收波长这一特点来设计荧光传感探针^[11]。大多数挥发性有机物只在 300 nm 以下具有吸收,而丙酮在

300–330 nm 范围之内有较强的吸收。因此只需要调节配位聚合物的发射光谱的起始位置在 300–330 nm 范围之内, 即可实现对丙酮的选择性响应。

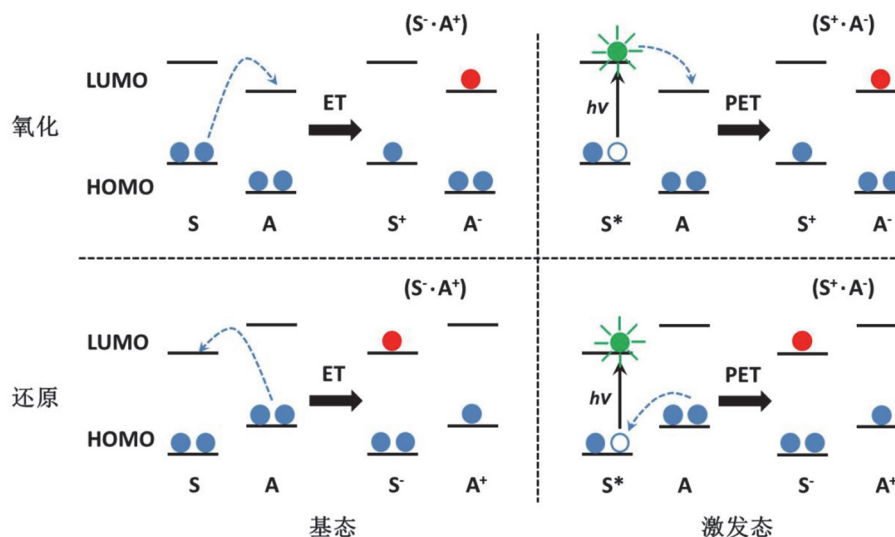


图2 激发态电子转移示意图

5 荧光传感相关科研成果及应用

5.1 荧光传感材料

在荧光传感体系中, 荧光传感材料至关重要。近年来, 为构建新型的荧光传感探针, 大量的有机材料、无机材料以及有机-无机杂化材料已被开发出来。在有机荧光传感材料中, 除最常见的有机小分子化合物之外, 大环受体分子、共轭聚合物和聚集诱导发光材料已展现出独特的优势。大环受体分子以其独特的空腔结构对多种客体分子展现出良好的识别能力, 进而借助指示剂置换检测(indicator displacement assay, IDA)策略, 可以实现生物标志物荧光传感^[12]及酶活性检测^[13]。相对于传统共价修饰荧光探针, IDA 方法具有制备简单、组合多样性和更适合于差分传感等优势^[14]。共轭聚合物是主链上饱和键和不饱和键交替的具有长程 π 电子共轭体系的一类聚合物^[15]。与小分子化合物相比, 共轭聚合物激发后产生的激发态可沿主链高效迁移, 形成一定程度的离域。结合被分析物之后, 即使结合位点与初始的激发位点并不相同, 只要位于激发态的离域范围之内, 就可对荧光产生影响, 由此获得更高的响应灵敏度。聚集诱导发光材料由于只有在形成聚集态时才发光, 因此具有非常低的背景荧光。这种特性尤其适用于生物荧光成像^[16]。无机荧光传感材料主要为各种无机量子点, 其中研究较多的是碳量子点、贵金属量子点以及半导体量子点^[17]。无机量子点不仅荧光强度高, 稳定性好, 并且相对于有机分子而言其具有更宽的激发光谱, 在只使用单一的激发波长时就可对所有种类量子点进行激发。目前, 在荧光传感领域应用较多的有机-无机杂化材料主要为配位聚合物。配位聚合物一般是由有机桥连配体连接金属离子所构成的具有无限网络结构的配位化合物^[18]。配位聚合物组成灵活, 可通过对有机配体和金属离子的选择对其荧光光谱进行调节。此外配位聚合物大多具有丰富的孔道结构, 孔道对被分析物的吸附可起到一定的富集作用, 提高响应灵敏度, 还可通过孔道尺寸和化学环境的控制使其只吸附特定的物质, 提高检测的选择性。

5.2 荧光传感在各领域中的应用

荧光传感检测时间短、操作简单、设备低廉的特点使其特别适合于便携式检测。目前荧光传感已被广泛应用于环境检测以及安全检测领域。在环境检测领域, 通过荧光传感可对水体中的有毒有害的金属离子^[19]以及有机污染物^[20]进行快速分析。在安全检测领域, 荧光传感由于可以对硝基爆炸

物进行灵敏响应,有望成为替代小型质谱的分析方法^[21]。近年来荧光传感探针快速发展,其检测范围已从简单的分子、离子,过渡到生物小分子、生物大分子(如 DNA 链^[22]、酶^[23]等),因此在生物分析以及临床诊断领域具有广阔的应用前景。由于荧光传感探针的尺寸小,具有进入细胞以及组织的能力。因此,将荧光传感和共聚焦荧光显微技术相结合,可以对体内物质进行原位成像^[17],还可对 pH^[24]、缺氧^[25]等生理环境的变化进行实时监测。

致谢: 对南开大学朱志昂教授所提供的帮助表示衷心的感谢!

参 考 文 献

- [1] Basabe-Desmonts, L.; Reinhoudt, D. N.; Crego-Calama, M. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, 36 (6), 993.
- [2] 华中师范大学, 陕西师范大学, 东北师范大学, 华南师范大学, 北京师范大学, 西南大学. 分析化学(下册). 第4版. 北京: 高等教育出版社, 2012: 104-105.
- [3] 樊美公, 姚建年, 佟振合, 等. 分子光化学与光功能材料科学. 北京: 科学出版社, 2009: 37.
- [4] Klán, P.; Wirz, J. *Photochemistry of Organic Compounds: From Concepts to Practice*; Wiley-Blackwell: Chichester, United Kingdom, 2009; pp 36-40.
- [5] Liu, Y.; Deng, C.; Tang, L.; Qin, A.; Hu, R.; Sun, J. Z.; Tang, B. Z. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133 (4), 660.
- [6] Ren, G.; Zhang, Q.; Li, S.; Fu, S.; Chai, F.; Wang, C.; Qu, F. *Sens. Actuators B-Chem.* **2017**, 243, 244.
- [7] Gao, Q.; Zhang, W.; Song, B.; Zhang, R.; Guo, W.; Yuan, J. *Anal. Chem.* **2017**, 89 (8), 4517.
- [8] Barrett, S. M.; Wang, C.; Lin, W. *J. Mater. Chem.* **2012**, 22 (20), 10329.
- [9] Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed.; Springer: New York, USA, 2006; pp 335-336.
- [10] Hu, Z.; Deibert, B. J.; Li, J. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, 43 (16), 5815.
- [11] Li, Y.; Song, H.; Chen, Q.; Liu, K.; Zhao, F. Y.; Ruan, W. J.; Chang, Z. *J. Mater. Chem. A* **2014**, 2 (25), 9469.
- [12] Zheng, Z.; Geng, W. C.; Gao, J.; Wang, Y. Y.; Sun, H.; Guo, D. S. *Chem. Sci.* **2018**, 9 (8), 2087.
- [13] Guo, D. S.; Liu, Y. *Acc. Chem. Res.* **2014**, 47 (7), 1925.
- [14] You, L.; Zha, D.; Anslyn, E. V. *Chem. Rev.* **2015**, 115 (15), 7840.
- [15] Tuncel, D.; Demir, H. V. *Nanoscale* **2010**, 2 (4), 484.
- [16] Mei, J.; Leung, N. L. C.; Kwok, R. T. K.; Lam, J. W. Y.; Tang, B. Z. *Chem. Rev.* **2015**, 115 (21), 11718.
- [17] Ruedas-Rama, M. J.; Walters, J. D.; Orte, A.; Hall, E. A. H. *Anal. Chim. Acta* **2012**, 751, 1.
- [18] Lustig, W. P.; Mukherjee, S.; Rudd, N. D.; Desai, A. V.; Li, J.; Ghosh, S. K. *Chem. Soc. Rev.* **2017**, 46 (11), 3242.
- [19] Chowdhury, S.; Roj, B.; Dutta, A.; Mandal, U. *J. Fluoresc.* **2018**, 28 (4), 999.
- [20] Walekar, L.; Dutta, T.; Kumar, P.; Ok, Y. S.; Pawar, S.; Deep, A.; Kim, K. H. *Trac-Trends Anal. Chem.* **2017**, 97, 458.
- [21] Sun, X.; Wang, Y.; Lei, Y. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, 44 (22), 8019.
- [22] He, S.; Song, B.; Li, D.; Zhu, C.; Qi, W.; Wen, Y.; Wang, L.; Song, S.; Fang, H.; Fan, C. *Adv. Funct. Mater.* **2010**, 20 (3), 453.
- [23] Li, Y.; Guo, A.; Chang, L.; Li, W.-J.; Ruan, W. J. *Chem. Eur. J.* **2017**, 23 (27), 6562.
- [24] Ke, G.; Zhu, Z.; Wang, W.; Zou, Y.; Guan, Z.; Jia, S.; Zhang, H.; Wu, X.; Yang, C. J. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2014**, 6 (17), 15329.
- [25] Iglesias, P.; Costoya, J. A. *Biosens. Bioelectron.* **2009**, 24 (10), 3126.