

荧光探针法研究脲素对 β -环糊精 内腔微环境的影响

江云宝 黄贤智 陈国珍

(厦门大学化学系)

摘 要

用芘作为荧光探针,研究了脲素对 β -环糊精内腔微环境的影响。结果表明脲素的加入使环糊精内腔极性增大,芘- β -环糊精包络物形成常数减小,这说明“疏水相互作用”是环糊精包络物形成动力之一。这一结论并被其它包络物体系所证实。荧光寿命及荧光量子产率估算表明,脲素的引入不仅仅是改变了溶剂的性质,而可能与 β -环糊精分子间有一定的相互作用。

1 引 言

β -环糊精(β -CD)是一种含有七个葡萄糖单体的筒形低聚物,其内腔是疏水性的,可与多种化合物形成包络物,因而在酶模拟研究^[1],催化^[2],光化学和光物理过程研究^[3]及分析化学^[4]中得到了广泛的应用。有关环糊精包络物形成动力的研究已有不少进展,但仍众说纷芸^[5]。“疏水相互作用”被认为是其中的一种。已经知道^[6]脲素可以减小溶剂的疏水效应,因此研究脲素对环糊精包络物性质的影响将有助于了解包络物形成动力。芘是一种强疏水性的稠环芳香烃,它可与 β -CD 形成 1:1 包络物^[7],其荧光光谱中第三振子带($\sim 384\text{nm}$)与第一振子带($\sim 373\text{nm}$)强度之比(I_3/I_1)与其所处环境的极性之间有一定的相关性,在高极性环境中较低的 I_3/I_1 比值^[8]。本文报道用芘作为荧光探针,研究脲素对 β -CD 内腔微环境的影响,旨在进一步了解环糊精包络物形成动力,并为 CD 的应用研究提供新的理论基础。

2 实验部分

芘(Aldrich)使用前未经进一步纯化。 β -CD 购自苏州味精厂,经去离子水重结晶,干燥器中保存备用。其余试剂均为分析纯,用去离子水配制溶液,其中脲素及甲酰胺溶液经检测无荧光杂质。荧光光谱测试在日立 850 和日立 650-10S 荧光光谱仪上进行,激发和发射带通

1990年1月2日收到

分别为 5 和 2nm, 激发波长为 336nm, 扫描速率为 60nm/min. 芘的相对荧光强度通过积分发射光谱面积(350~500nm)得到. 全部实验于室温下(20~22 °C)完成.

3 结果与讨论

3.1 脲素对 β -CD 体系荧光光谱的影响

往芘的溶液(1×10^{-7} mol/l)中加入 β -CD 后其荧光光谱的各个谱带的位置并无变化, 但其强度有不同的变化(Fig 1). 脲素对芘的荧光光谱各谱带的影响基本相同, 但对芘/ β -CD 体系的荧光光谱的振动带则有不同的影响. Fig 2 示出了脲素对芘及芘/ β -CD 体系的荧光光谱的 I_3/I_1 值的影响(Curve 1,2). 结果表明不存在 β -CD 时, 芘的 I_3/I_1 值几乎无变化, 说明脲素并未改变芘所处环境的极性; 但当有 β -CD 存在时, 随着脲素浓度的增大, 芘的 I_3/I_1 值几乎线性减小, 意味着芘所处环境的极性逐渐增大. 环糊精内腔是非极性的, 因此上述结果可能由下列两个因素而致: (1)脲素的加入使得部分芘分子离开 β -CD 内腔进入极性水相, 这实际上也就是芘/ β -CD 包络物形成常数 Kc 值减小; (2)脲素的加入使得 β -CD 内腔极性增大. Fig. 2 还示出了(Curve 3)随着脲素浓度增大, I_f/I_f^0 (I_f 和 I_f^0 分别为不同浓度脲素溶液中存在与不存在 β -CD 时芘的荧光强度)比值逐渐减小, 说明因脲素浓度增大, 芘- β -CD 包络物 Kc 值逐渐减小. 脲素是一种减小溶剂疏水效应的化合物, 因此上述脲素对疏水性的芘与 β -CD 包络物的影响说明“疏水相互作用”是包络物形成动力之一.

进一步研究了在脲素存在下 β -CD 浓度变化对芘的荧光强度 I_f 及 I_3/I_1 比值的影响, 结果示于 Fig. 3. 从中可以看出, 当 β -CD 浓度较低时, I_f 及 I_3/I_1 值均随 β -CD 浓度的增大而逐渐增大; 但当 β -CD 浓度增至一定值后, I_f 及 I_3/I_1 均趋于恒定(脲素的类似物甲酰胺存在下芘/ β -CD 体系也有类似的行为). 表明这时芘与 β -CD 已达到“饱和”包络, 相应的荧光强度可用以表示芘全部与 β -CD 包络时的荧光强度 I_∞ , 而相应的 I_3/I_1 值则表示了 1.0mol/l 脲素存在时 β -CD 内腔极性的大小^[9a]. 利用由此得到的 I_∞ 值及前文报道的方法^[9]测得了脲素和甲酰胺存在时芘- β -CD 包络物的 Kc 值及 β -CD 内腔的极性. 有关结果列于 Table 1. 从 Table 1 可以看出, 在 1.0mol/l 脲素或甲酰胺存在下 β -CD 内腔的极性增大(表现为相应的 I_3/I_1 值减小), 而芘- β -CD 包络物形成常数 Kc 值减小. 从而进一步定量地说明“疏水相互作用”在环糊精包络物形成中的重要作用.

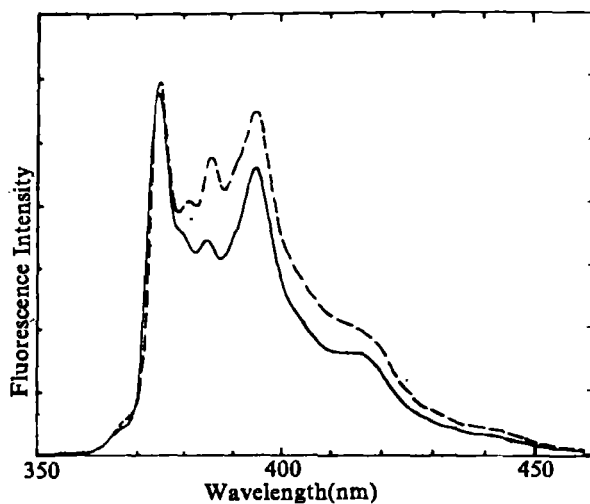


Fig. 1 Fluorescence Spectra of Pyrene in the absence (—) and Presence (.....) of 0.1% (W/V) β -CD
The concentration of pyrene is 1×10^{-7} mol/l

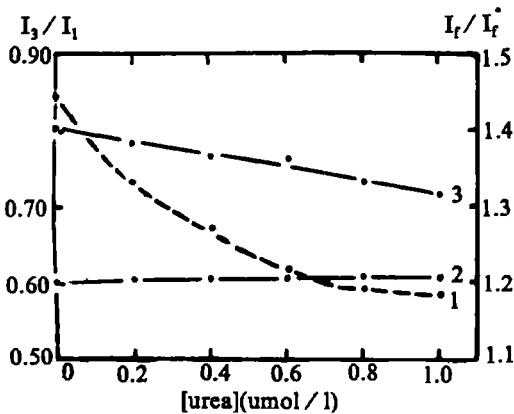


Fig. 2 Variations of I_3/I_1 ratio of pyrene fluorescence spectrum in the presence (1) and absence (2) of 0.1% β -CD, and of the corresponding fluorescence intensity ratio I_f/I_f (3) with the concentration of urea. [pyrene] = 1×10^{-7} mol/l

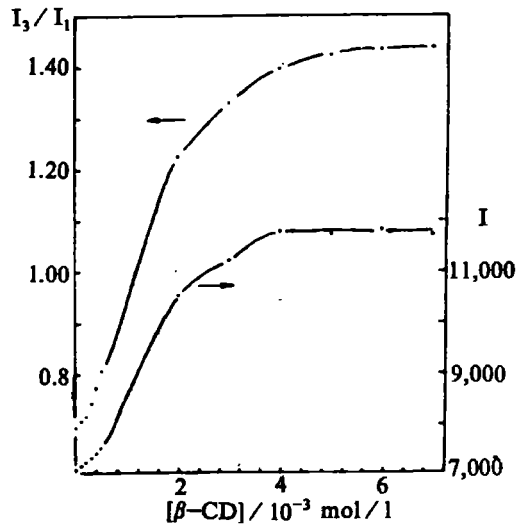


Fig. 3 Variations of I_3/I_1 ratio of pyrene fluorescence spectrum and of pyrene fluorescence intensity I_f with the concentration of β -cyclodextrin in the presence of 1.0 mol/l urea [pyrene] = 1×10^{-7} mol/l

3.2 荧光量子产率及荧光寿命的估算

由 I_∞ 和 I_0 (无 β -CD 时荧光强度) 定义有,

$$\frac{I_\infty}{I_0} = \frac{\varepsilon_{P-CD} \cdot \phi_{P-CD}}{\varepsilon_P \cdot \phi_P} \quad (1)$$

式中 ε 和 ϕ 分别为激发波长处荧光体的摩尔吸光系数和荧光量子产率, P 和 P-CD 分别表示芘和芘- β -CD 包络物. Nakajima^[7] 曾指出在激发波长处(337nm)P- β -CD 和 P 之摩尔吸光系

Table 1 The polarity of β -CD cavity (presented in the form of I_3/I_1 ratio), formation constant Kc of pyrene- β -CD inclusion complex, and the fluorescence quantum yield ratio ϕ_{P-CD}/ϕ_P in the presence of 1.0 mol/l additive

| Additive | | urea | formamide |
|----------------------|-------------------|------|-----------|
| I_3/I_1 | 1.53 ^a | 1.43 | 1.40 |
| Kc(l/mol) | 550 ^a | 210 | 288 |
| ϕ_{P-CD}/ϕ_P | 2.0 | 1.6 | 1.8 |

a. Taken from ref. 9a

数比为 1, 并得到相应的荧光量子产率比为 1.5. Thomas 等^[10] 的结果为 1.7. 利用 $\varepsilon_{P-CD}/\varepsilon_P$ 为 1 的结论及式(1), 则可得到有关量子产率比, 结果见 Table 1 可知在脲素或甲酰胺存在下, ϕ_{P-CD}/ϕ_P 减小, 实际上相应的荧光寿命之比 τ_{P-CD}/τ_P 亦减小.

我们还用 LMA-1 型微量物质分析仪(核工业部北京地质研究院研制, 盒式氮激光器为脉冲光源)配以 100MHz 示波器观察比较了芘/ β -CD 和芘/ β -CD 脲素(1.0 mol/l)体系的荧光

衰减曲线,发现芘/ β -CD/体系的表观荧光寿命长于芘/ β -CD/脲素体系的,在环糊精包络物体系中表观荧光性质是自由的荧光体和包络物两者荧光性质的总和,从3.1节Kc值测量及本节荧光量子产率计算可知,脲素的引入使得体系荧光寿命的变化是由Kc值变化及 φ_{P-CD}/φ_P (抑或 τ_{P-CD}/τ_P)比值变化的结果。

由荧光量子产率和荧光寿命估算结果以及 β -CD内腔极性的变化,我们认为脲素的引入除减小溶剂的疏水效应外,脲素分子与 β -CD分子间可能存在一定的相互作用,其中氢键作用^[11]可能是主要的。

3.3 脲素对若干包络物性质的影响

3.3.1 脲素对类似荧光体- β -CD包络物的影响

上文已经指出,脲素的引入使 β -CD内腔极性增大,“疏水相互作用”是环糊精包络物形成动力之一。为了验证这一结论,我们试验了脲素对萘(N), α -萘酚(N-OH),和

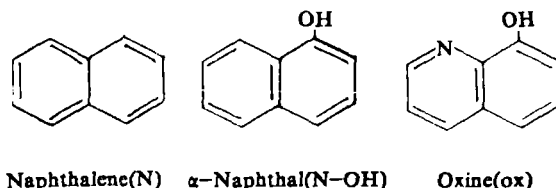


Fig.4 Structures of some fluorophores

8-羟基喹啉(OX)三种客体(Fig 4)的 β -CD包络物性质的影响。由于 β -CD内腔一定的尺寸(内径7.5Å)和疏水性,包络物的形成有两个因素制约,即客体分子的尺寸和极性,我们选择的三种客体分子尺寸相近,但极性是从N到N-OH到OX递增的,按上述结论可以预计脲素对这三种客体的包络物的形成常数的影响是从使N- β -CD包络物Kc减小逐渐变化至使OX- β -CD包络物Kc增大。实验结果列于Table 2。用有或无 β -CD时荧光强度之比

Table 2 The effect of urea on guest- β -CD inclusion complex^a

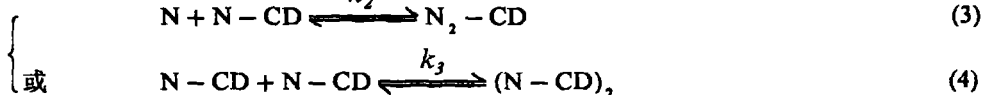
| Guest | N | N-OH | OX |
|-----------------------------------|------|------|------|
| $(I/I_0)_{H_2O}$ | 1.76 | 1.71 | 1.09 |
| $(I/I_0)_{urea}$ | 1.46 | 1.56 | 1.14 |
| $(I/I_0)_{urea} / (I/I_0)_{H_2O}$ | 0.83 | 0.91 | 1.05 |

a. [guest]= 4×10^{-5} mol/l; [β -CD]= 4×10^{-3} mol/l; [urea]=2.5 mol/l. E_x/E_m (nm/nm): 280/338(N); 300/485(N-OH); 290/365(OX).

I/I_0 的变化表示包络物Kc值变化^[9],由表2可知,实验结果与预计结果一致,表明上文的结论是正确的。

3.3.2 脲素对萘/ β -CD体系激基缔合物荧光的影响

由于 β -CD内腔的疏水性微环境效应,当萘的浓度较高时可观察到萘的激基缔合物荧光(式(2)~(4))^[3,10]。Fig 5示出了萘在 β -CD、脲素存在下的荧光光谱。不存在 β -CD时只有萘的



具有振动结构的单体荧光；加入 β -CD 后，除其单体荧光外，在 400nm 处出现了无结构的宽峰，这是萘的激基缔合物荧光(其激发光谱与单体的相同)；进一步加入脲素后激基缔合物荧光强度减小。显然这是由于脲素的引入使 β -CD 内腔极性增大，减小溶剂疏水效应共同作用的结果，因如是对于极性很小的萘，式(2)~(4)所示的向右过程均不利。如我们测得萘- β -CD 之 K_c 值为 2665 l/mol，加入 1.0mol/l 脲素后 K_c 值减小为 2424 l/mol。这一结果再次证实了上文的结论。另外，我们注意到萘



Fig. 5 Fluorescence spectra of naphthalene in the presence of β -Cyclodextrin and urea [naphthalene] = 1.6×10^{-4} mol / l; [β -CD] = 5×10^{-3} mol / l; [urea] = 2.0 mol / l. Excitation wavelength: 280nm. Spectra normalized at 337nm. 1. Naphthalene; 2. Naphthalene / β -CD / urea; 3. Naphthalene / β -CD.

与 β -CD，萘- β -CD 包络物在加入 1.0/1 脲素前后 K_c 值比分别为 2.6 和 1.1，即极性小(疏水性大)的客体与 β -CD 的包络物的 K_c 值因脲素的引入减小得更快，这与表 2 的结果一致。

4 结 论

本文首次报道用萘作为荧光探针研究脲素对 β -CD 内腔微环境的影响，实验证明荧光探针法是研究有序介质(如胶束、环糊精、人工膜等)性质的一种有效手段。文中报道的测定环糊精内腔极性以及萘- β -CD 包络物 K_c 的方法是我们于前文^[9a]中提出的，这是一种可靠的方法。脲素对 β -CD 内腔的微环境影响明显，脲素的引入使 β -CD 内腔极性增大，并显著地影响萘与 β -CD 的包络平衡，使得萘- β -CD 包络物形成常数减小，说明“疏水相互作用”是形成环糊精包络物的一种动力。同时脲素的引入使 $\varphi_{P-CD} / \varphi_P$ 减小，萘 / β -CD 体系表现荧光寿命缩短。上述结果表明脲素不仅是改变溶剂的物理性质，且与 β -CD 分子间有一定的相互作用。

近来环糊精在荧光分析^[12]，室温磷光^[13]，以及色谱分离^[14]等领域中得到了广泛应用。我们认为本文结果对于深入开展环糊精的应用研究将有一定的指导意义。

荧光衰减实验得到了核工业部北京地质研究院张乃昌高级工程师的帮助，谨此特表谢意!

参 考 文 献

- [1] Fendler, J.H., *Membrane Mimetic Chemistry*, John-Wiley & Sons, New York, 1982, 194-201.
- [2] Fendler, J.H. and Fendler, E.J., *Catalysis in Micellar and Macromolecular Systems*, Academic Press, New York, 1975, Chap 11.
- [3] a. Tung, C.H., Zeng, Z. and Xu, H.J., *J. Photochem.*, 32, 311(1986).

- b. 陈尚贤, 章立民, 催化学报, **8**, 379(1987).
- [4] 陈国亮, 章道道, 化学通报, (7), 1(1988).
- [5] Bender, M.L. and Komiyama, M., *Cyclodextrin Chemistry*, Springer-Verlag, Bertlin. 1987.
- [6] Von Hippel, P.H. and Schleich, T., *Acc.Chem.Res.*, **2**, 257(1969).
- [7] Nakajima, A., *Spectrochim. Acta*, **39A**, 913(1983).
- [8] Kalyanasundaram, K. and Thomas, J.K., *J.Am.Chem.Soc.*, **99**, 2309(1977).
- [9] a. 江云宝, 黄贤智, 陈国珍, 科学通报, **35**, 120(1990);
b. 江云宝, 黄贤智, 陈国珍, 中国化学会第二届发光分析学术会议论文集, 1988, B72, 厦门大学学报, **29**, xxx(1990).
- [10] Hashimoto, S. and Thomas, J.K., *J.Am.Chem.Soc.*, **107**, 4655(1985).
- [11] Jiang, Y.B., Huang, X.Z. and Chen, G.Z., *Advances in Photochemistry*, Ed. by Zhang, B.W., Tung, C.H. and Wu, S.K., International Academic Publishers & Pergamon Press, Beijing, 1989, 406.
- [12] Garcia Sanchez, F., Lopez, M.H. and Gomez, J.C.M., *Analyst*, **112**, 1037(1987).
- [13] Scypinshi, S. and Cline Love, L.J., *Anal.Chem.*, **56**, 322(1984)
- [14] a. Hinze, W. L., Pharr, D.Y., Fu, Z.S. and Burkert, W.G., *Anal.Chem.* **61**, 422(1989).
b. Cepeda-Saez, A., Prognon, P., Mahuzier, G. and Blais, J., *Anal.Chim.Acta*, **211**, 333(1988).
c. 旷昌渝, 吴邦桂, 周竟先, 色谱, **7**, 21(1989).

Illumination of the Effect of Urea on the Microenvironment of β -Cyclodextrin Cavity with Fluorescence Probe

Jiang Yunbao Huang Xianzhi Chen Guozhen

(Department of Chemistry, Xiamen University)

Abstract

Pyrene was used as a fluorescent probe to illuminate the effect of urea on the microenvironment of β -cyclodextrin cavity. Addition of urea to the solution of β -cyclodextrin increased the polarity of β -cyclodextrin cavity and decreased the formation constant of pyrene- β -cyclodextrin inclusion complex, proving that "hydrophobic interaction" was one of the binding forces of cyclodextrin inclusion complex. The results in other inclusion complex systems strengthened the conclusions. Connected with the results of fluorescence quantum yield and lifetime estimations, a particular interaction of urea with β -cyclodextrin, other than changing the physical properties of the solvent, mainly hydrogen-bonding interaction, was proposed.