

# 铽-环丙沙星与罗丹明 B 间稀土敏化荧光能量转移机理研究

刘保生<sup>1</sup>, 王云科<sup>1</sup>, 张彦青<sup>1</sup>, 傅 丽<sup>2</sup>, 吕运开<sup>1</sup>

1. 河北大学理化分析中心, 河北省分析科学技术重点实验室, 河北 保定 071002
2. 廊坊师范学院化学系, 河北 廊坊 065000

**摘 要** 利用荧光光谱法及紫外光谱法研究发现 pH 6.2 醋酸-醋酸钠 (HAc-NaAc) 水溶液中铽与环丙沙星形成络合物使铽在 490, 545, 590 nm 处出现  $Tb^{3+}$  的特征发射峰即荧光被强烈的敏化增强, 且在 545 nm 处的荧光强度最大, 铽离子的锐线发射光谱的特征最强峰 545 nm 与罗丹明 B 的最大吸收峰波长 552 nm 十分接近, 能够发生能量转移反应。因此, 随着碱性染料罗丹明 B 的加入铽-环丙沙星的特征荧光呈现有规律降低, 表明罗丹明 B 对铽-环丙沙星荧光有猝灭作用, 研究结果表明其猝灭类型主要为静态猝灭。又根据 Förster 理论, 测得了罗丹明 B 对铽-环丙沙星的能量转移效率, 相互结合距离等参数。从而进一步证明了该反应是单一静态猝灭过程, 阐述了其荧光猝灭机理是通过能量转移产生的。

**关键词** 环丙沙星; 铽; 罗丹明 B; 能量转移

中图分类号: O657.3 文献标识码: A 文章编号: 1000-0593(2008)01-0153-03

## 引 言

镧系离子与某些有荧光或无荧光的有机化合物配位后, 有机配体能吸收紫外光并将能量传递给稀土离子。然后发出镧系稀土离子的特征荧光, 即人们所熟知的“稀土敏化荧光”。这种敏化荧光具有 Stokes 位移大、发射镧系稀土离子的锐线发射光谱、荧光寿命长、稳定、背景干扰小等优良性能, 因此得到了广泛应用<sup>[1, 2]</sup>。新一代氟喹诺酮抗菌药物均含有  $\beta$ -酮酸, 能与铽离子配位发出铽离子的特征荧光<sup>[3-5]</sup>。环丙沙星 (Ciprofloxacin, CPFX) 是第三代氟喹诺酮抗菌药物中抗菌作用较强的药物, 与铽离子反应敏化铽离子荧光。据此定量测定环丙沙星的报道较多<sup>[6, 7]</sup>, 但将环丙沙星与铽离子的配合物作为能量给体, 有机染料作为能量受体的能量转移的研究尚未见报道。试验发现铽离子锐线发射光谱强的特征发射峰与罗丹明 B 的最大吸收峰波长接近, 罗丹明 B 的加入使铽离子的锐线发射光谱强的特征发射峰强度降低, 即两者间能够发生有效的能量转移。并对其能量转移效率、转移距离、荧光猝灭机理等进行了研究。该研究对“稀土敏化荧光”的应用具有一定的理论意义。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

RF-540 荧光分光光度计 (日本岛津); F-4500 荧光分光光度计 (日本日立); UV-265 紫外-可见分光光度计 (日本岛津); pH-3C 型酸度计 (上海雷磁分析仪器厂)。

准确称取一定量的 CPFX 标准品 (中国药品生物制品检定所, 含量 > 99.0%) 溶于蒸馏水中, 配成  $3.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  标准储备液, 用时适当稀释;  $Tb^{3+}$  标准溶液 ( $0.12 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ): 准确称取 2.2431 g  $Tb_4O_7$  (光谱纯或含量大于 99.9%) 粉末置于烧杯中, 加入 1:1 的盐酸少量, 并加几滴  $H_2O_2$ , 小心加热使其溶解, 待蒸发近干, 任其自然冷却至结晶析出, 再用蒸馏水将结晶溶解, 转移至 100 mL 容量瓶中定容至刻度,  $Tb^{3+}$  工作溶液 ( $1.2 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 每天临用时取标准溶液稀释; 罗丹明 B (RB) 水溶液:  $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 用时稀释至所需浓度。醋酸-醋酸钠 (HAc-NaAc) 缓冲溶液 (pH 6.2): 由  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 HAc 和  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 NaAc 溶液在 pH 计上调节得到。所用试剂均为分析纯, 实验用水为二次蒸馏水。

### 1.2 实验方法

于 10 mL 比色管中依次加入  $3.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 CPFX 溶液 1.0 mL,  $1.5 \text{ mL } Tb^{3+}$  ( $1.2 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 溶液,  $1.5 \text{ mL pH } 6.2$  缓冲溶液, 不同量的 RB 溶液 ( $5.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 用二次水稀释至刻度后摇匀, 放置 10 min, 在室温条件下, 用 1 cm 的石英比色池, 入射和出射狭缝均为 10 nm, 荧光激发波长为 330 nm, 记录 490, 545, 580 nm 处

收稿日期: 2006-05-10, 修订日期: 2006-08-20

基金项目: 国家自然科学基金项目 (20675024) 资助

作者简介: 刘保生, 1963 年生, 河北大学理化分析中心研究员 e-mail: lbs@mail.hbu.edu.cn

的荧光强度或扫描荧光光谱。

## 2 结果与讨论

### 2.1 荧光光谱

按照实验方法分别扫描 CPFX,  $Tb^{3+}$ -CPFX, RB 及三元体系  $Tb^{3+}$ -CPFX, RB 的荧光光谱图(见图 1)。可知 CPFX 在 435 nm 处发射峰最大,  $Tb^{3+}$ -CPFX 体系在 435 nm 处峰的位置不变, 但荧光强度显著降低。在此过程中  $Tb^{3+}$  与 CPFX 形成 1:2 的络合物<sup>[8]</sup>,  $Tb^{3+}$ -CPFX 体系在 490, 545, 590 nm 等处出现  $Tb^{3+}$  的特征峰且在 545 nm 处的峰值最大, 590 nm 处最弱。这些特征峰是由于  $Tb^{3+}$  的  $^5D_4 \rightarrow ^7F_n$  ( $n=6, 5, 4, 3$ ) 跃迁引起的。较强的峰在 490 nm 处 ( $^5D_4 \rightarrow ^7F_6$  跃迁) 和 545 nm 处 ( $^5D_4 \rightarrow ^7F_5$  跃迁)。 $Tb^{3+}$ -CPFX 荧光最强峰 545 nm 与 RB 最大吸收波长 552 nm 相差 7 nm, 这样就为  $Tb^{3+}$ -CPFX 作为能量给予体, RB 作为能量接受体的能量转移提供了前提条件。固定  $Tb^{3+}$ , CPFX 的量, 改变 RB 的量对混合体系的荧光光谱进行扫描(见图 1), 发现随着 RB 量的不断增加,  $Tb^{3+}$ -CPFX 体系在 490 和 545 nm 处荧光强度依次下降, RB 的 580 nm 处荧光强度不断增加。表明:  $Tb^{3+}$ -CPFX 与 RB 间发生了有效的能量转移, 体系中  $Tb^{3+}$ -CPFX 作为能量给体将能量转移给能量受体 RB, 而  $Tb^{3+}$  的特征峰则随着罗丹明 B 的量的增加发生了荧光猝灭。

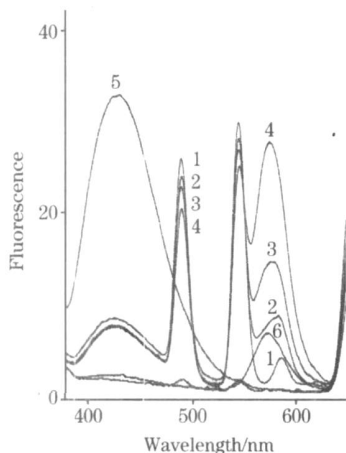


Fig 1 The fluorescence spectra of  $Tb^{3+}$ -CPFX-RB

1~4:  $Tb^{3+}$ -CPFX-RB ( $c_{RB} = 0; 2.5; 5.0; 10.0$ )  $\times 10^{-7}$  mol  $\cdot$  L $^{-1}$ ;  
5. CPFX; 6. RB ( $c_{RB} = 5.0 \times 10^{-7}$  mol  $\cdot$  L $^{-1}$ )

### 2.2 反应条件选择

据文献<sup>[8]</sup>报道  $Tb^{3+}$  与 CPFX 反应在 pH 在 5.5~6.5 醋酸-醋酸钠缓冲体系中反应最好。缓冲溶液适宜用量在 1.5~2.5 mL 之间。当 CPFX 的浓度为  $3.0 \times 10^{-7}$  mol  $\cdot$  L $^{-1}$  时,  $Tb^{3+}$  与 CPFX 的浓度比值达到 500:1 时,  $Tb^{3+}$  在 545 nm 处的相对荧光强度达到最大值, 而在 435 nm 处 CPFX 的相对荧光强度降到最低。再增加  $Tb^{3+}$  的浓度, CPFX 的猝灭程度趋于稳定。 $Tb^{3+}$ -CPFX 体系在室温条件下 2 min 即可反应完全, 放置 24 h 以上荧光强度未发生变化。与本试验结果一致, 所以本实验选用 pH 6.2 的 0.1 mol  $\cdot$  L $^{-1}$  醋酸-醋酸钠缓

冲溶液 2.0 mL,  $Tb^{3+}$  的用量为  $1.2 \times 10^{-3}$  mol  $\cdot$  L $^{-1}$  1.5 mL, 放置时间 10 min 的试验条件。

### 2.3 $Tb^{3+}$ -CPFX-RB 体系猝灭类型

根据  $Tb^{3+}$ -CPFX 在 490 和 545 nm 处猝灭程度做 Stern-Volmer 图可以看出, 曲线具有良好的线性关系, 故初步判断是静态猝灭。为了进一步证实此猝灭过程, 按动态过程处理, 其方程为<sup>[9]</sup>

$$F_0/F = 1 + K_s[Q] = 1 + K_q \tau_0[Q]$$

$K_s$  为动态猝灭常数,  $K_q$  为双分子猝灭过程速率常数,  $\tau_0$  为猝灭剂不存在时荧光分子平均寿命,  $[Q]$  为猝灭剂浓度。由上式可知  $K_s = K_q \tau_0$ ,  $K_q = K_s/\tau_0$ 。由于荧光分子寿命约为  $10^{-8}$  s, 故由猝灭曲线斜率可求得不同波长时的猝灭常数, 490 和 545 nm 处  $K_q$  分别为  $1.84 \times 10^{13}$  L  $\cdot$  mol $^{-1}$ ,  $7.97 \times 10^{12}$  L  $\cdot$  mol $^{-1}$ , 远远大于各类猝灭剂对分子的最大扩散碰撞猝灭常数  $2.0 \times 10^{10}$  L  $\cdot$  mol $^{-1}$ , 因此进一步反证以上猝灭为静态猝灭。

### 2.4 $Tb^{3+}$ -CPFX 与 RB 作用距离的计算

根据 Förster 非辐射能量转移机制, 其转移效率与给体-受体间距离 ( $r$ ) 及临界能量转移距离 ( $R_0$ ) 有关, 且给体与受体间能量转移效率<sup>[9]</sup>  $E = R_0^6 / (R_0^6 + r^6)$  式中:  $R_0$  是能量转移效率为 50% 时的临界距离。 $R_0^6 = 8.8 \times 10^{-25} K^2 N^{-4} J$  式中,  $K^2$  为偶极空间取向因子,  $N$  为介质的折射指数,  $\phi$  为给体的荧光量子产率,  $J$  为给体的荧光发射光谱与受体吸收光谱间的光谱重叠积分见图 2, 即:  $J = \int F(\lambda) \epsilon(\lambda) d\lambda / \int F(\lambda) d\lambda$ ,  $F(\lambda)$  为荧光给体在波长  $\lambda$  处的荧光强度,  $\epsilon(\lambda)$  为受体在波长  $\lambda$  处的摩尔吸收系数, 能量转移效率  $E$  通过实验可由下式求出:  $E = 1 - F/F_0$ 。其中  $F$  和  $F_0$  分别为有受体与无受体时, 给体的荧光强度。

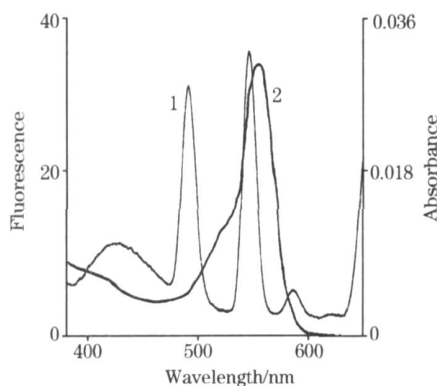


Fig 2 Absorbance spectra of RB and fluorescence spectra of  $Tb^{3+}$ -CPFX

1: Fluorescence spectra; 2: Absorbance spectra;  
 $c_{CPFX} = c_{RB} = 3.0 \times 10^{-7}$  mol  $\cdot$  L $^{-1}$

Table 1 The energy transfer coefficients  $J$ ,  $E$ ,  $R_0$  and  $r$  for  $Tb^{3+}$ -CPFX with RB

波长/nm	$R_0$ /nm	$E$ /%	$r$ /nm	$J$ /( $cm^3 \cdot L \cdot mol^{-1}$ )
490	5.2	8.1	7.79	$9.13 \times 10^{13}$
545	5.2	4.8	8.56	$9.13 \times 10^{13}$

在上述实验条件下, 取  $K^2 = 2/3$ ,  $N = 1.45$ ,  $\tau = 0.45$ , 由表 1 数据进一步证明给体  $Tb^{3+}$ -CPFX 的荧光猝灭是通过能量转移过程发生的, 其猝灭为静态猝灭。将上述数值代入求出不同波长下的能量转移参数见表 1。

### 参 考 文 献

- [1] Arnaud N, Georges J. *Analyst*, 1997, 122(2): 143.
- [2] Diamandis P. *Analyst*, 1992, 117(12): 1879.
- [3] WANG Lei, HAN Benzheng, SANG Li-hong, et al (王磊, 韩本政, 桑立红, 等). *Chinese Journal of Pharmaceuticals* (中国医药工业杂志), 2000, 31(11): 508.
- [4] LU Yan, ZHAO Hui-chun, SUN Cun-yan, et al (陆燕, 赵慧春, 孙春燕, 等). *Acta Pharmaceutica Sinica* (药学学报), 2002, 37(11): 876.
- [5] WANG Jing-ping, DU Li-ming, DUAN Ya-li (王静萍, 杜黎明, 段亚丽). *Chinese Journal of Analytical Chemistry* (分析化学), 2004, 32(1): 50.
- [6] QI Xue-yong, HE Hua, GU Fei, et al (戚雪勇, 何华, 顾飞, 等). *Chinese Pharmaceutical Journal* (中国药学杂志), 2005, 40(10): 1500.
- [7] TONG Shang-lun, XIANG Guang-hong, LIU Wei-ping (童裳伦, 项光宏, 刘维屏). *Spectroscopy and Spectral Analysis* (光谱学与光谱分析), 2005, 25(12): 2061.
- [8] WU Shu-qing, CAO Qiu-re, ZHAO Yun-kun, et al (吴淑清, 曹秋娥, 赵云昆, 等). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), 2000, 28(12): 1462.
- [9] LIU Bao-sheng, ZHANG Hong-yi, WANG Fu-li (刘保生, 张红医, 王甫丽). *Spectroscopy and Spectral Analysis* (光谱学与光谱分析), 2003, 23(3): 539.

## Study on Mechanism of Lanthanide Sensitized Fluorescence Energy Transfer between Terbium( )-Ciprofloxacin and Rhodamine B

LIU Bao-sheng<sup>1</sup>, WANG Yur-ke<sup>1</sup>, ZHANG Yan-qing<sup>1</sup>, FU Li<sup>2</sup>, LÜ Yun-kai<sup>1</sup>

1. Center of Physics and Chemistry, Hebei University, Baoding 071002, China

2. Department of Chemistry, Langfang Teachers College, Langfang 065000, China

**Abstract** A complex composed of ciprofloxacin and terbium ( $Tb^{3+}$ ) in the solution of acetic acid-sodium acetate buffer (pH 6.2) was studied by fluorescence spectroscopy and ultra-violet absorption spectroscopy. The emission peak of  $Tb^{3+}$  appeared at 490, 545, 590 nm, (the sensitized fluorescence was enforced mightily) and the intensity of 545 nm emission peak was increased obviously. In its acute emission spectrum, the strongest emission peak of  $Tb^{3+}$  was at 545 nm, which was close to the wavelength of the biggest absorption peak of RB, 552 nm. Therefore, as the basic dye rhodamine B (RB) was added, the fluorescence intensity of 545 nm emission peak decreased regularly, indicating that there was a great quenching process. The result showed that the course was statistic. Based on the mechanism of the Förster energy transfer, the efficiency of energy transfer and the distance between the acceptor RB and the complex were found. Thereby, it was indicated that the course of action was single static quenching and the mechanism of quenching was based on energy transfer.

**Keywords** Ciprofloxacin; Terbium; Rhodamine B; Fluorescence resonance; Energy transfer

(Received May 10, 2006; accepted Aug. 20, 2006)