

分类号 O62

密级

UDC

编号 B978004411

中国科学院 博士学位研究生学位论文

荧光素衍生物的光物理与 β -氨基酸库的合成

宋爱民

指导教师 张曼华 研究员, 中国科学院感光化学研究所

沈 涛 研究员, 中国科学院感光化学研究所

申请学位级别 博士学位 学科专业名称 有机化学

论文提交日期 2000.6.12 论文答辩日期 2000.6.20

学位授予单位 中国科学院感光化学研究所

答辩委员会主席

分类号 O62

密级

UDC

编号 B978004411

中 国 科 学 院

博士学位研究生学位论文

荧光素衍生物的光物理与 β -氨基酸库的合成

宋爱民

江苏工业学院图书馆

指 导 教 师 张曼华 研究员，中国科学院感光化学研究所

沈 涛 研究员，中国科学院感光化学研究所

申请学位级别 博士学位 学科专业名称 有机化学

论文提交日期 2000.6.12 论文答辩日期 2000.6.20

学位授予单位 中国科学院感光化学研究所

答辩委员会主席

目 录

中文摘要.....	1
英文摘要.....	3

第一部分

第一章 前言.....	6
第一节 分子器件.....	6
第二节 荧光素的性质和应用.....	10
第三节 选题设想.....	19
第二章 荧光素与卟啉两亲性二元化合物的合成和光物理性质.....	21
第三章 两亲性二元化合物的成膜性能和光电性质.....	35
第四章 荧光素及其烷基衍生物在胶束中的结构和光谱性质.....	45
参考文献.....	55

第二部分

第一章 前言.....	61
第一节 组合化学简介.....	61
第二节 β -氨基酸在组合化学中的应用.....	77
第三节 固相合成中的连接分子.....	90
第四节 选题设想.....	97
第二章 含有芳香取代基的 β -氨基酸的合成.....	100
第一节 β -苯丙氨酸和卤代 β -苯丙氨酸的合成.....	100
第二节 给电子基团取代的 β -苯丙氨酸的合成.....	104
第三节 吸电子基团取代的 β -苯丙氨酸的合成.....	107
第四节 含有稠环芳香取代基的 β -氨基酸的合成.....	113

第五节 结论.....	114
第三章 含有杂环取代基的 β -氨基酸的合成.....	116
第一节 3-氨基-2-呋喃丙酸的合成.....	116
第二节 其他 β -杂环取代的 β -氨基酸的合成.....	118
第三节 结论.....	119
第四章 含有脂肪取代基的 β -氨基酸的合成.....	121
第一节 异戊醛和环戊甲醛的合成.....	121
第二节 用脂肪醛的 Rodionov 反应制备 β -氨基酸.....	122
第三节 α,β -不饱和酸和氨的加成制备 β -氨基酸.....	124
第四节 结论.....	125
第五章 Fmoc 保护的氨基酸库的合成.....	127
第六章 连接分子的合成.....	135
参考文献.....	140
发表文章目录.....	147
致谢.....	149

荧光素衍生物的光物理与 β -氨基酸库的合成

摘 要

作为人工模拟天然光合作用体系和分子光电二极管的模型，通过共价键连接的含有光敏剂、电子给体和电子受体的多元化合物在过去几十年里吸引了广泛的注意。荧光素是一种重要的占电染料。由于在可见光区有强而宽的吸收，并且具有高的荧光量子产率、合适的单重态能量和氧化还原电位，荧光素在多个领域得到了广泛应用。荧光素分子中含有羟基和羧基两个活性基团，可以方便地对其进行结构修饰。我们设计并合成了一些荧光素的烷基衍生物和二元化合物，研究了它们在溶液中和界面上的光物理行为，目的是发展这些化合物在人工模拟光合作用、分子光电器件和荧光探针等领域的应用。研究取得的主要结果如下：

- 1、设计并合成了八个两亲性二元化合物。当这些二元化合物受光激发时，能够发生高效的分子内电子转移反应。二元化合物分子中两个发色团之间“面对面”的分子构象、柔性的连接基团和极性溶剂有利于分子内的光致电子转移反应。
- 2、首次发现了荧光素衍生物中空间位阻引起的荧光异常增强现象。研究表明，荧光素分子中苯环的扭转运动和激发态的无辐射失活有关。当苯环的扭转运动被空间位阻作用所抑制，荧光素衍生物的荧光得到增强。
- 3、所有合成的八个两亲性二元化合物在气-液界面上均具有较好的成膜性能，较为规则的分子构型对成膜性能有利。所形成的单分子膜能够被转移到玻璃基片上，并且具有较好的稳定性。在对 SnO_2 导电玻璃基片上卟啉和荧光素两亲性二元化合物 LB 膜的光电性能测试中，观察到了单向的光生电流和电势，表明该化合物有望作为分子光电二极管得到应用。
- 4、荧光素的烷基衍生物，即荧光素烷基酯、荧光素烷基醚和荧光素二烷基醚-酯，能够与各种胶束发生结合作用，并且在不同胶束中以不同的结构形式存在，表现出多变的光谱性质，表明它们可以作为荧光探针在非均相体系和生物体系

的研究中得到应用。特别引人注目的是, 荧光素丁基醚在中性水溶液中主要以阴离子型结构存在, 在可见光区有很强的吸收和荧光; 而在胶束的疏水区域则主要以中性内酯型结构存在, 在可见光区既没有吸收也没有荧光。这一发现表明荧光素丁基醚有可能被发展成为生物体系研究中一种性能优良的荧光探针。

二

组合化学被认为是近年来自然科学领域取得的最重要的成就之一。在出现后短短的十年里, 组合化学取得了飞速发展, 给传统的有机合成化学和药物化学带来了革命性变化。它的出现极大地加速了新药的发明进程, 并且在其他领域展现出广泛的应用前景。 β -氨基酸及其衍生物是制药工业中一类重要的化合物, 在多肽的某个位置引入 β -氨基酸能够改善多肽药物的稳定性和生物活性。特别地, 近年来发现含有较少残基的 β -肽也具有与天然的 α -多肽相似二级螺旋结构。由于其独特的性质和重要生物活性, β -氨基酸和 β -肽在组合化学研究具有重要地位。在论文第二部分工作中, 我们进行了一些组合化学的前期研究工作, 设计并合成了数十种 β -氨基酸及连接分子。对这些化合物的生物活性筛选和 β -肽库的合成工作目前正在进行中。本部分工作主要取得了以下结果:

1、利用不同方法合成一个含有 37 种化合物的 β -氨基酸库, 其中 12 种为新化合物。库化合物 3-氨基-(3-氟-4-硝基)-苯丙酸分子中的氟可以在温和的条件下被亲核试剂取代, 在组合化学库合成中可被用作模版。此外利用这个氨基酸, 可以在肽合成结束后向特定的位置引入新的活性基团, 因而具有重要的应用价值。

2、利用氨基保护剂 Fmoc-Osu 对 49 种不同氨基酸进行了保护, 合成了一个 Fmoc-氨基酸库。所有产物经 HPLC 检测纯度大于 97%, 可直接用于固相肽合成。

3、设计并合成了一种 AMEBA 连接分子 4-甲酰基-3-甲氧基苯氧丁酸和它的两种类似化合物, 并且发展了此类化合物的原位合成方法。这一方法产率良好, 操作简便, 中间产物不需要分离和纯化, 并且成本低廉, 具有良好的应用前景。

关键词: 荧光素衍生物, 组合化学, β -氨基酸

Photophysics of Fluorescein's Derivatives and Preparation of β -Amino Acid Library

Aimin Song (Organic Chemistry)

Directed by Professor Manhua Zhang and Professor Tao Shen

Abstract

Part I

Over the past years, significant emphasis has been put on the multicomponent covalently linked multicomponent compounds, consisting of electron acceptor, photosensitizer and electron donor, as the model of artificial photosynthesis system and photodiode. Fluorescein is an important xanthene dye with a large variety of technical application due to its high quantum yield of fluorescence, large absorption in visible range and proper redox potentials. Fluorescein contains two active groups, i.e. the carboxyl and the hydroxyl, through which the structure of fluorescein can be easily modified. In this study, a series of alkyl derivatives of fluorescein, and several dyads containing fluorescein as the photosensitizer, were designed and synthesized. Their photophysics in solutions and at interfaces were investigated. The purpose of this study is to develop the application of the synthesized compounds as the model of artificial photosynthesis system, photodiode and fluorescent probe. The following results are obtained in this study:

1. Eight amphiphilic dyads were designed and synthesized. Effective intramolecular electron transfer occurred in the dyads when they were irradiated. The "face-to-face" mutual orientation of the two chromophores in dyads, flexible spacer and polar solvents are favorable for the photoinduced intramolecular electron transfer.
2. The unusual fluorescence enhanced by steric hindrance was observed for the first time. Experimental data indicated that torsional motion of the phenyl is coupled to the radiationless transition of fluorescein's excited state. When the torsional motion of phenyl was restricted by steric hindrance, the fluorescence of fluorescein's derivatives was enhanced.
3. All eight synthesized amphiphilic dyads can form stable monolayers at the

air/water interface. Regular molecular conformation is favorable for the formation of monolayers. The formed monolayers can be transferred onto glass substrate, and have good stability. The unidirectional photocurrent and photovoltage were observed in the photoelectrochemical measurements of LB films on SnO_2 substrate of dyads, consisting of fluorescein and carbazole, indicating the possible application of the dyads as photodiodes.

4. The alkyl derivatives of fluorescein, i.e. esters, ethers and ether-esters of fluorescein, can bind to different micelles. They exist in different structure, and exhibit varied spectral properties in different micelles, denoting their possible application as fluorescent probes in heterogeneous and biological systems. Noticeably, the butyl ether of fluorescein exists mainly as the anionic form in aqueous solution, which has large absorption and strong fluorescence in visible range, and as the lactonic form in hydrophobic region of the micelles, which has neither visible absorption nor fluorescence. This result shows that the butyl ether of fluorescein may be applied in biological systems as a new and excellent fluorescent probe.

Part II

Combinatorial chemistry is regarded as one of the most important recent developments in science. The field has advanced rapidly over the past decade, and has begun a revolution in organic chemistry and pharmaceutical chemistry. Combinatorial chemistry has greatly facilitated the drug discovery process, and exhibits great potential in other fields. β -amino acids and their derivatives are of great importance in pharmaceutical industry. Introducing a β -amino acid residue to a peptide can improve its oral stability and biological activity. Noticeably, it has been recently found that an oligomer containing a few β -amino acid residues could form a stable helix, which can only be formed in a peptide containing at least 15 to 20 α -amino acid residues. β -amino acids and β -peptides have attracted much attention in combinatorial chemistry because of their special properties and important biological activities. In the present dissertation, some β -amino acids and linkers for combinatorial chemistry uses were designed and synthesized. The obtained results are summarized as follows:

1. A β -amino acid library containing 37 compounds was prepared by various methods. 12 compounds of them are synthesized for the first time. One of the library

compounds, namely, 3-amino-(3-fluoro-4-nitro)-benzenepropionic acid, whose fluor can be easily substituted under mild conditions, can act as a scaffold in library synthesis. In addition, new active substitute can be introduced to a peptide by this amino acid after the peptide synthesis. Thus, this β -amino acid has great potential in the preparation of peptide library.

2. A Fmoc-amino acid library containing 49 compounds was prepared by the reaction of Fmoc-Osu and different amino acids. All of the library compounds show the purity higher than 97% in HPLC, and can be directly applied to solid peptide synthesis.

3. An AMEBA linker 4-formyl-3-methoxyphenoxybutyric acid and two its analogs were designed and synthesized. The *in situ* preparation method of these compounds has been developed. This method has many advantages, including high yield, simple procedure, convenient operation and cheap reagents.

Keywords: Fluorescein's derivatives; Combinatorial chemistry; β -Amino acids.

第一章 前言

第一节 分子器件

随着现代科技的发展, 高新技术给人类生活带来了日新月异的变化。计算机和网络正在进入人们生活的每一个角落, 对于很多人来说, 计算机已经成为生活中不可或缺的组成部分。在过去的半个世纪里, 计算机从无到有, 从最初基于电子管的庞然大物, 到今天基于超大规模集成电路的笔记本电脑, 计算机技术经历了一个惊人的飞速发展过程。但是, 由于加工技术和超微尺寸材料自身物理效应的影响, 大规模集成电路存在尺寸限制, 这意味着计算机芯片的运行速度将在今后几十年内达到物理极限。以目前普遍使用的计算机芯片为例, 基于铝导线的芯片已经达到了其物理极限 $0.25\ \mu\text{m}$; 在美国 Intel 公司最新发布的奔腾 III 处理器中使用的材料为铜, 并使用了 $0.18\ \mu\text{m}$ 的加工技术。和铝相比, 铜具有更好的导电性, 允许被加工成更小的尺寸, 但最终的物理极限仍然无法避免。

为了克服这一传统固体电子学无法解决的困难, 科学家们提出了各种解决方案, 其中分子器件的概念吸引了广泛的注意。所谓分子器件, 就是在有机分子的分子尺寸范围内实现对电子运动的控制, 从而使分子聚集体构成有特殊功能的器件, 其研究内容主要包括分子导线、分子开关、分子整流器、分子存储器乃至分子计算机等。事实上, 科学家们已设计出了几乎所有这些分子器件的相应模型化合物并提出了相应的理论, 有些已进入实验室研制阶段, 有望在不久的将来得到应用。

一、分子导线

在各种分子器件中, 分子导线具有重要作用, 通过它将各种元件连接成分子电路。人们曾推测类胡萝卜素或聚异戊二烯链可能在生物体系内起到传输电子的作用, 这些化合物在结构上具有共同的特征: 具有共轭长链, 允许电子传导; 含有两个极性的、能进行可逆电子交换的活化终端; 具有足够的链长与双层膜的厚度相匹配。为了证实这一推测, Lehn 等合成了一系列终端含有极性基团的长链共轭烯烃分子 (图 1) [1], 结构上采用与天然类胡萝卜素相似的全反式构型。研究表明, 这些化合物可以在分子水平上提供必要的导电能力。在分子导线研究中, Miller 等取得了鼓舞人心的进展 [2]。他们利用多并苯醌为原料, 通过 D-A 反应和芳构化反应, 合成了长度分别为 3.06 、 5.28 和 $7.50\ \text{nm}$

的线型分子导线。

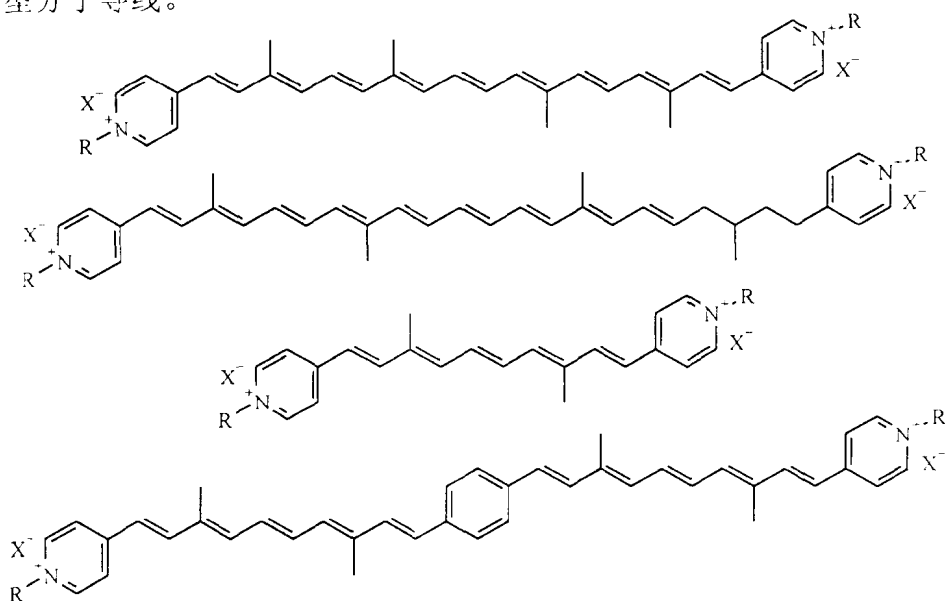


图 1、一些长链共轭烯烃类分子导线

一些导电聚合物，如聚乙炔和聚硫氮化物也可被用作分子导线。这些分子导线在传送信号时是通过这些物质中一种非线型的结构微扰以弧波形沿分子链移动，其信息传播速度与电子导电情况类似，但能耗极低。值得指出的是传统的固体电子学理论并不能完全适用于有机分子导线中载流子的性质和输送，关于分子导线的理论还有待进一步发展。

二、分子整流器

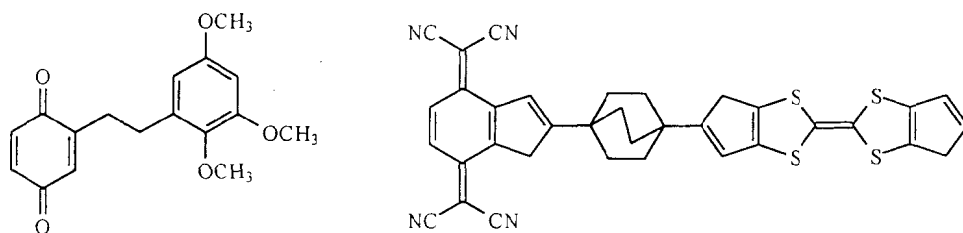


图 2 两个分子整流器的模型

Aviram 和 Ratner 在 1974 年首次提出了分子整流器的概念 [3]。一般固态整流器都是基于半导体的 p-n 结，同样为了在分子水平上实现整流，所选用的有机分子也应包括 p-n 结。一些芳香化合物能较好地满足 n 和 p 型结构要求，只要引入适当的富电子取代基 (n) 和缺电子取代基 (p)，就可以在分子内形成电子给体和电子受体，再用 σ 键使其保持适当的距离。图 2 展示了两个分子整流器的模型，它们的分子结构中均含有一个富电子给体单元和一个缺电子受

体单元，中间被脂肪链分开。当这样的分子被嵌入电路时，只有当缺电子基团与阴极相连，富电子基团与阳极相连时，电子才能从阴极流向受体，再从受体流向给体，最后从给体流向阳极，而反方向的电子传输是禁阻的，从而实现整流功能。

三、分子开关和分子存储器

分子开关和分子存储器在原理上是相似的，它们通常由具有双稳态或多稳态的分子来实现。有些有机化合物分子在外界条件改变时会引起分子结构或电子状态的改变，如果某种分子具有两种可以相互转化又各自相对稳定的状态时，就有可能在一定条件下形成可逆变换的分子阵列，即分子开关。这一原理同样适用于分子存储器。可用于分子开关和分子存储器的化学变化主要包括：分子内或分子间的质子转移；二聚化反应；顺-反异构；电荷转移；苯型-醌型转变 [4]。图 3 展示了一个利用氧化还原反应控制硫酚和二硫化物双稳态体系相互转换的分子开关实例，这一反应在生物化学中是非常重要的。

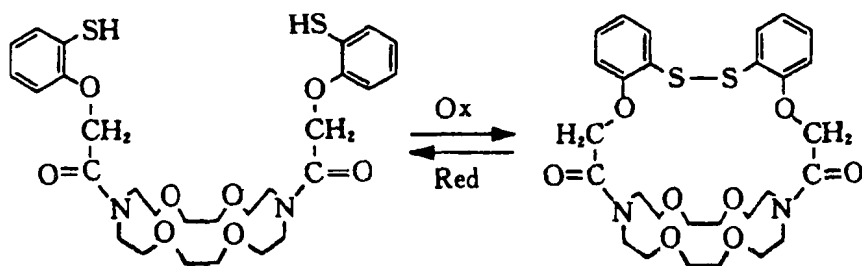


图 3、一个氧化还原控制分子开关的模型

四、分子计算机

分子计算机在设计概念上不同于普通的计算机，目前这一领域的研究热点是基于生物工程和分子器件的生物计算机。其原理是利用生物技术，特别是蛋白质工程，生产某些具有特定结构的蛋白质分子，然后利用有机半导体材料和导电高分子使其连接起来。在酶的作用下，这些蛋白质可以起到类似于电子回路中半导体的作用。由上述材料制成的元件称为生物化学元件，它是制造生物计算机的基本元件。生物化学元件的优点是显著的：首先，它能制成超高密度的线路，以分子水平的线路为目标的生物分子元件的尺寸可以小至几十纳米；其次，它能够成为半永久性的元件，由于生物分子本身具有自我修复的机能，即使元件出了故障，它自身也能修复；再次，生物分子元件是通过生物化学反应的方式进行工作的，所以能耗极低，不存在元件发热问题。目前生物芯片和生物计算机的研究已取得了许多突破性的进展，但距离分子计算机的实际应用仍需科学家们付出更多的努力。

五、分子光电器件

分子光电器件是一类通过光照控制的分子器件，其中研究最多的是分子光电二极管，它可以通过组装形成分子光开关和分子光整流器。和其他分子器件相比较，分子光电器件具有突出的优点：利用光照对器件进行控制不需向体系中引入额外的试剂，光源可以和器件分离，易于操作。

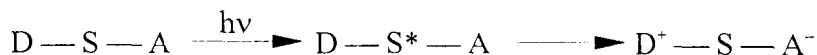


图 4、分子光电二极管的工作原理

图 4 展示了分子光电二极管的工作原理。通过共价键把合适的电子给体 (D)、光敏剂 (S) 和电子受体 (A) 连接起来形成一个多元化合物，当光敏剂受光激发后，在多元化合物分子内发生多步电子转移反应，最后在电子给体一端形成正离子，电子受体一端形成负离子，产生分子内电势。这样的化合物接入电路后，不照光时化合物分子是绝缘的，电路不导通；光照时只有当外电势与分子内电势匹配时电路中才有电流通过，其作用相当于二极管。

Fujihira 等合成了一系列具有 D-S-A 结构的多元化合物 (图 5)，并利用 LB 膜技术将它们进行了组装，研究了它们的光电性能 [5-9]。结果表明这些多元化合物都具有光电二极管的功能，分子内电子给体、光敏剂和电子受体的连接顺序和空间取向对其性能具有重要影响。进一步地，在由多元化合物单分子膜的电子给体一端引入一个更好的电子给体，可以进一步延长电荷分离态的寿命。

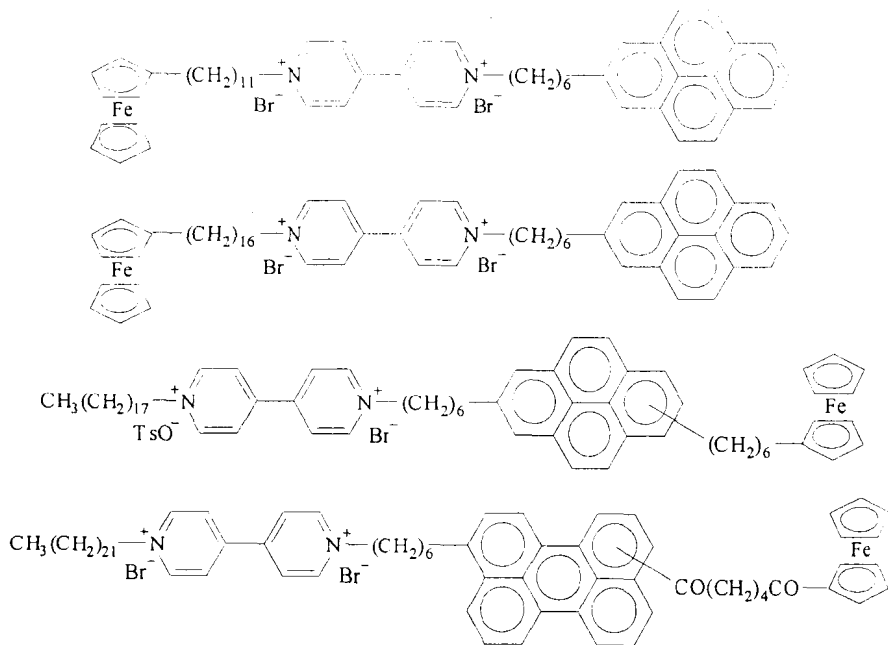


图 5、几个分子光电二极管的模型

最近, Schön 等在有机光电二极管的研究中取得了突破性进展, 这一结果发表在 2000 年 1 月 27 日的《自然》杂志上 [10]。尽管这一工作的研究对象并非分子光电二极管, 但对于分子光电二极管的设计和组装具有重要的启发意义。他们在铝或镁基质上利用气态生长的方法组装上约 $1\ \mu\text{m}$ 厚的并五苯单晶, 然后用碘或溴进行掺杂, 再用阴极真空喷镀法在表面覆盖透明的 ITO 导电层, 最后在 ITO 表面镀上一个银接触点。这一方法制备的光电二极管的太阳能转换效率达到了 2.4%。更为重要的是, 这种有机光电器件完全使用固接, 并且是柔软的, 可以被剪裁和卷曲。这一工作为有效的“塑料”太阳能电池的应用开辟了道路。

第二节 荧光素的性质和应用

一、荧光素的结构与合成

荧光素是一种占屯染料, 具有两种可互变的分子结构 (图 6), 一种被称为醌式 (I), 另一种是内酯式 (II)。X 射线晶体衍射研究表明 [11], 无论在醌式还是内酯式的荧光素分子中, 苯环部分和占屯环部分都几乎垂直, 不参与共轭。

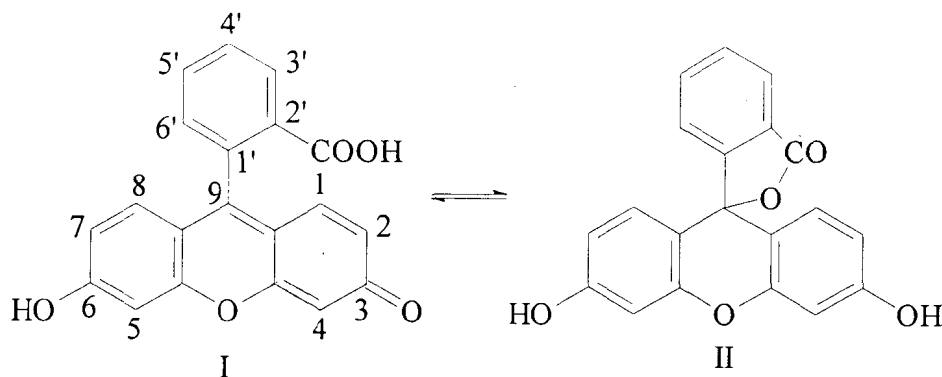


图 6、荧光素的分子结构 (I) 醌式; (II) 内酯式

荧光素的二钠盐 (Uranine) 也被称为“水溶性荧光素”, 其水溶液具有强烈的黄绿色荧光。醌式结构的荧光素在可见光区有很强的吸收和荧光, 而内酯式荧光素只在紫外光区有吸收和相应的荧光。在 Chemical Abstracts 中使用的荧光素名称为 Spiro[isobenzofuran-1(3H),9'-[9H]xanthene]-3-one, 3',6'-dihydroxy-。这一名称来自于荧光素的内酯式结构, 但事实上在大多数情况下, 荧光素主要以醌式结构存在。对应于醌式结构, 荧光素的化学名称为 Benzoic acid, 2-(6-hydroxy-3-oxo-3H-xanthen-9-yl)-, Chemical Abstracts 中使用这一名称

检索荧光素 2'位羧基的衍生物。

荧光素的合成目前仍然沿用 Baeyer 1871 年发明的方法 [12]，邻苯二甲酸酐、间苯二酚和无水氯化锌的混合物熔融后得到内酯式的荧光素 (图 7)。这一方法已被用来制备多种占屯类染料。

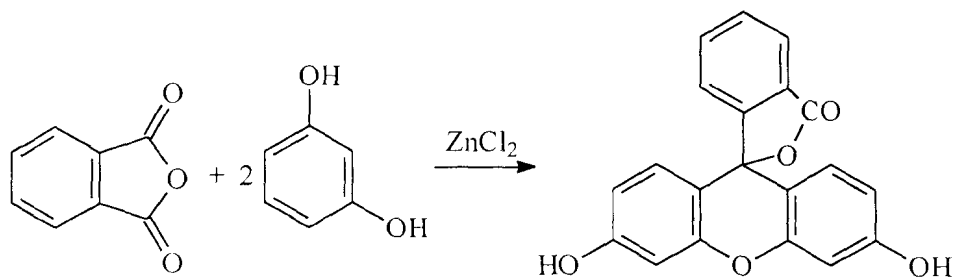


图 7、荧光素的合成

二、荧光素的物理化学性质

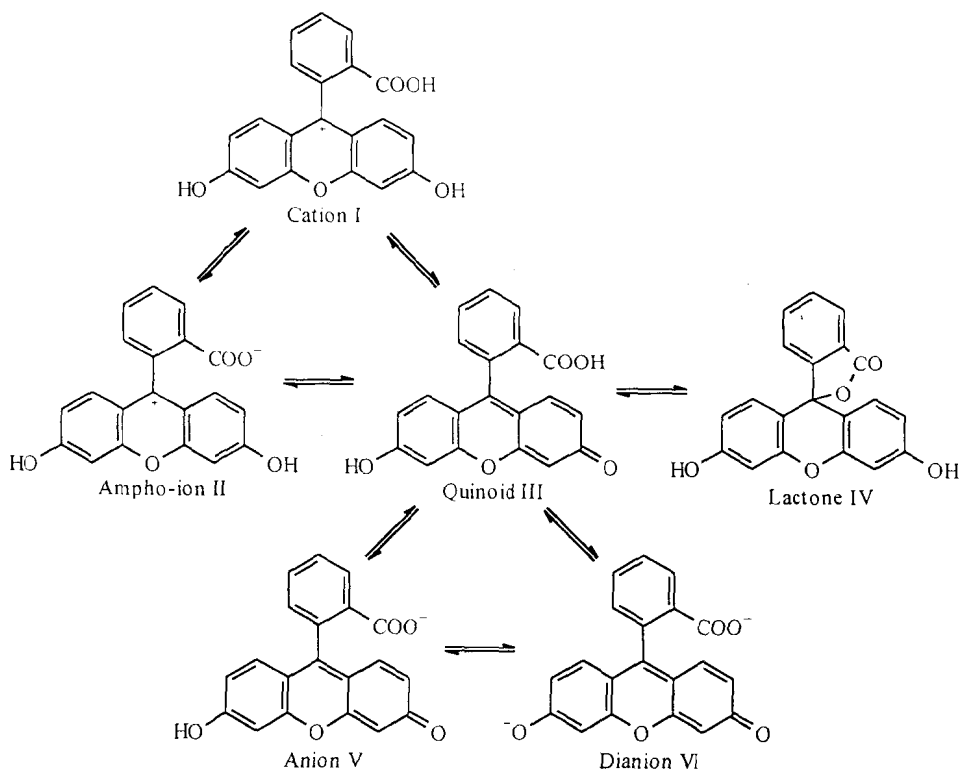


图 8、荧光素在不同环境中的存在形式

在不同的溶剂中和不同的 pH 条件下，荧光素有多种不同的存在形式，并且表现出不同的光谱性质 [13-15]。Zanker 和 Peter 发现 [13]，在不同 pH 的溶

液中，荧光素有六种不同的存在形式：阳离子型 (I)、中性醌型 (III)、中性内酯型 (IV)、单阴离子型 (V) 和双阴离子型 (VI)，以及瞬态存在的两性离子型 (II) (图 8)。Zhao 等的研究表明 [14]，溶剂的极性同样对荧光素的存在形式具有重要影响。在中性溶液中，荧光素主要以双阴离子型 (VI) 存在于极性溶剂中，如水和甲醇，而在非极性溶剂中，如甲苯和环己烷，则主要以中性内酯型 (IV) 存在。

双阴离子型的荧光素具有很强的荧光。在含有 0.1 mol dm^{-3} NaOH 的水溶液中，荧光素的荧光量子产率高达 0.92 [16]。由于荧光素分子中苯环和占屯环不共轭，2'位羧基的离子化和烷基化对荧光素的光谱性质没有明显影响。但是，当 6 位羟基被质子化或烷基化后，中性醌型荧光素的吸收光谱和荧光光谱和双阴离子型相比都发生显著变化，其荧光量子产率大大降低，荧光寿命缩短 [15,17-20]。图 9 给出了水溶液中不同存在形式荧光素的吸收光谱。

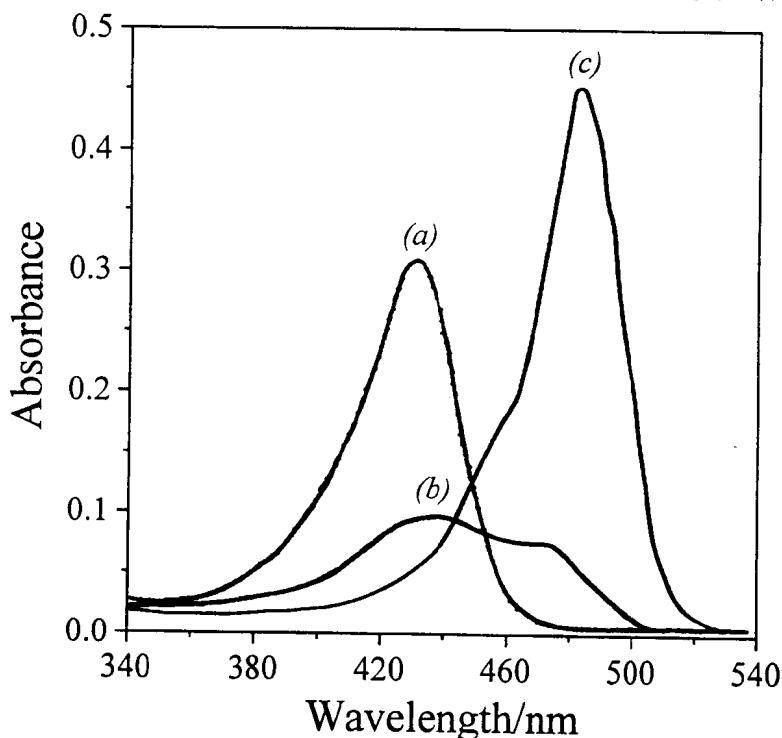


图 9、水溶液中不同存在形式荧光素的吸收光谱 (a) 阳离子型 (I); (b) 中性醌型 (III); (c) 双阴离子型 (VI)。染料浓度: $5 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$

荧光素在碱性水溶液中的主要光谱性质列于表 1。在此条件下荧光素几乎全部以双阴离子型 (VI) 存在。当溶液浓度过高 ($>10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) 时，荧光素的荧光被强烈地自猝灭，溶液的颜色由低浓度时明亮的黄绿色荧光变为暗橙红色。

表 1、碱性水溶液中荧光素的光谱性质

$\lambda_{\max}/\text{nm}$ ($10^{-4}\epsilon/\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)	$\text{p}K_1$	$\text{p}K_2$	λ_F/nm	Φ_F	τ_F/ns	Φ_{IST}	$\lambda_{\text{T-T}}/\text{nm}$	$\tau_T/\mu\text{s}$
490 (8.8)	4.4	6.7	514	0.92	4.9	0.03	560	90

在不同溶剂中，双阴离子型荧光素的吸收光谱和发射光谱均随着溶剂氢键能力的降低而发生红移，同时荧光量子产率下降 [21,22]。这一现象说明，与溶剂间形成氢键对于双阴离子型荧光素基态的稳定作用要强于对激发态的稳定作用 [23]。和其他酚类化合物相似，激发态荧光素的酸性比基态更强 [24,25]。

三、荧光素的应用

荧光素是荧光最强的有机化合物之一，其特征的黄绿色荧光即使在极稀的溶液中也常被观察到。早在 1877 年，Baeyer 就成功地利用荧光素进行了水流的跟踪。在这个有趣的应用实例里，荧光素 (10 公斤!) 被倾入到多瑙河的源头，以证实多瑙河与莱茵河相通的可能性。六小时后，在一条与多瑙河没有明显连接的小河里观察到了荧光素特征的荧光，这条小河最终注入康士坦茨湖，而康士坦茨湖的水恰恰流入莱茵河。实验结果首次证实了多瑙河和莱茵河这两条被阿尔卑斯山隔开的欧洲著名河流实际上是相通的。

尽管荧光素具有鲜艳的颜色和荧光，但它用作纺织染色剂是不理想的，因为它的水溶性太好，很难牢固地附着于纤维上。但是在荧光分析领域，荧光素是一种重要的荧光试剂。它是最广泛使用的吸附指示剂和生物染色剂之一，在生物体系和各种非均相体系被用作荧光探针 [22,26-45]。虽然荧光素本身是亲水的，但它能与膜脂亲和，从而进入细胞。Chen 等 [46] 和 Kim 等 [47] 分别通过测量被细胞捕获的荧光团的荧光强度变化研究了荧光素穿越细胞膜运输的动力学过程。

荧光素的荧光极化能提供有关其分子旋转活动性的有用信息。与大分子的结合将降低荧光团的活动能力，测量由此导致的荧光去极化作用可以区分吸附的和自由的荧光素。因此，荧光素可以被用作大分子结合的探针，这正是荧光去极化免疫分析法的基础。这一诊断技术与其他光学方法相结合，迅速取代了放射免疫分析法在临床上的应用。在这一技术中，利用某一特定药物的配体对荧光素进行修饰后，荧光素的荧光极化可被用来测定血浆中该药物的浓度。这一方法非常灵敏，允许对皮摩尔浓度水平的药物含量进行直接测量。

对荧光素荧光各向异性的稳态测量形成了一种用于测定蛋白 [48]、类固醇 [49-51]、治疗药物和麻醉药物 [52-54] 的灵敏分析技术的基础。在另一种方法中，与生物分子连接的荧光素荧光的各向异性作为介质粘度的函数，被用于测定连接位点上覆盖的分子链的链段流动性 [55-57]。

当荧光素作为荧光探针连接到蛋白质上时，蛋白质分子构象的变化将改变荧光素分子的微环境，从而引起荧光光谱的改变。因此，荧光素的光谱位移、