

赤霉素及竹红菌甲素荧光量子产率的常量化区域

徐 军

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

赫 荣 乔

(中国科学院生物物理研究所, 国家生物大分子重点实验室, 北京 100101)

摘要 通过对赤霉素、竹红菌甲素及苯酚量子产率的测定与比较发现,这三种荧光化合物都具有一个相对于激发波长的量子产率的稳定区域。尽管它们具有多个激发峰,但不同激发峰所激发的荧光量子产率差别较小。竹红菌甲素在室温放置一个月,690nm 荧光光谱有明显的改变。以上结果提示在测定未知荧光化合物的量子产率时,被测溶液的散射较强,同时荧光物的激发与发射波长彼此相接近。量子产率较弱时,可以在最大激发峰的蓝移方向上选择激发波长来避免散射光的干扰,提高量子产率测定的准确度。竹红菌甲素在 690nm 的荧光肩峰,可能是分子空间结构上容易发生化学变化的部位所发射的。

关键词 赤霉素;竹红菌甲素;荧光量子产率

量子产率是荧光化合物的一个重要参数,它代表了荧光化合物的光子发射能力,是研究荧光现象中经常遇到的问题。硫酸奎宁的量子产率较高(在 0.05mol/L 硫酸溶液中为 0.7),光化学性质稳定,加之 Chen 报道了硫酸奎宁

在 250—366nm 范围的量子产率相对稳定^[1]。因此,硫酸奎宁被广泛用来作为其他荧光化合物量子产率测定时的标准样品。另外,在荧光的测定过程中,经常遇到的是瑞利和喇曼散射的干扰问题,由于喇曼散射较弱,可通过减本底

的方法克服。但是,当被测样品溶液的瑞利散射较强,荧光化合物的浓度又很低,不得不放大荧光仪的增益;有时瑞利散射的光谱溢出标尺,荧光化合物的激发与发射波长相互较为接近,造成散射峰与荧光峰的部分重叠。虽然进行减本底扫描,但也造成量子产率测定的较大误差。

竹红菌甲素最大发射波长在 640nm 伴有 690nm 处的一个肩峰,究竟是竹红菌甲素分子聚合的结果还是分子本身的某种特殊结构所发射的还有争论。梁丽等^[2]用 X-Ray 衍射的方法研究竹红菌甲素的晶体结构,他们认为竹红菌甲素分子间形成缔合的可能性较小。本文作者试图在荧光化合物的量子产率的性质上找到一个普遍的规律,为测定荧光化合物的量子产率提供一个方便可靠的方法。

材料与方 法

1. 材料: 1.0mg 赤霉素(购于 Merck 公司)溶解在 100ml 无水乙醇中,再稀释为 20 μ g/ml 的溶液,取 0.5ml 加入 4.5ml 的浓硫酸(1.84),反应 1 小时后进行荧光测定。竹红菌甲素(Hypocrellin A 由中国科学院生物物理研究所王大辉等提供)溶于纯化后的二甲基亚砜(A. R. 北京化工厂生产),避光条件下配制成 10⁻⁶ mol/L 溶液备用。苯酚(5.6ppm)由北京化工厂生产,溶于无水甲醇中备用。奎宁(英国药典试剂)配制成在激发波长处吸收小于 0.03 的溶液(溶剂为 0.05mol/L H₂SO₄)。其他试剂为国产分析纯,没有进一步纯化。

2. 校正光谱的测定: 按 Hitachi-850 荧光分光光度计的程序对仪器进行校正,严格控制荧光测试时的温度(20 $^{\circ}$ C, slits: Ex 5.0nm; Em 5.0nm)。吸收光谱在岛津 UV-250 型分光光度仪上测试,将被测样品配制成在激发波长处的吸收小于 0.03。

对于具有两个激发峰的赤霉素(250nm-460nm)和苯酚(290nm-340nm),每隔 10nm 进行一次荧光激发和发射光谱的扫描,同时在分光光度仪上进行与激发相应波长的吸收测定。将所得到的荧光光谱积分面积和吸收值用

于相对量子产率的计算。并在相同条件下对硫酸奎宁的荧光光谱进行积分面积的扫描和测定相应激发波长处的光吸收。

3. 相对量子产率的计算 荧光化合物的量子产率计算公式可表达为

$$Q_2 = \frac{S_2}{S_1} \cdot \frac{A_1}{A_2} Q_1 \quad (1)$$

A₁, S₁ 和 Q₁ 分别代表已知荧光化合物在激发波长处的吸收值,荧光光谱面积和量子产率。A₂, S₂ 和 Q₂ 分别是未知荧光化合物在激发波长处的吸收值,荧光光谱面积和量子产率。对于同一个荧光化合物在不同激发波长下的量子产率来说,测定其量子产率同样需要与另一个已知量子产率的荧光化合物进行比较,来计算未知量子产率。如果

$$C = \frac{A_1}{S_1} Q_1 \quad (2)$$

则

$$Q_2 = \frac{S_2}{A_2} C \quad (3)$$

所以,同一个荧光化合物在不同波长进行量子产率的比较时,应该有

$$Q_2/Q_1 = \frac{S_1}{A_1} / \frac{S_2}{A_2} \quad (4)$$

Q₁, A₁, S₁, Q₂, A₂ 和 S₂ 分别是同一荧光化合物在不同波长下的相对量子产率,吸收值和荧光光谱面积。式(4)的意义可以描述为,在进行同一荧光化合物的不同波长相对量子产率的比较时,可以省略已知荧光化合物的参数 C。

结 果

(一) 赤霉素的吸收、荧光光谱与量子产率

图 1 是该荧光化合物具有两个激发峰(285 nm, 410nm)。用这两个激发波长激发赤霉素,均可在 460nm 得到发射光谱,但两者所激发的荧光在强度上有一定的差异。如果测定它们的量子产率,可以看到,410nm 激发的荧光量子产率大于 285nm 激发的量子产率。在 Ex340nm—460nm 的范围测定赤霉素的 S/A 比值(图 2), S/A 的绝对变化值(实线)在 Ex 340—370nm 的范围处于迅速上升的趋势,在 380—430nm

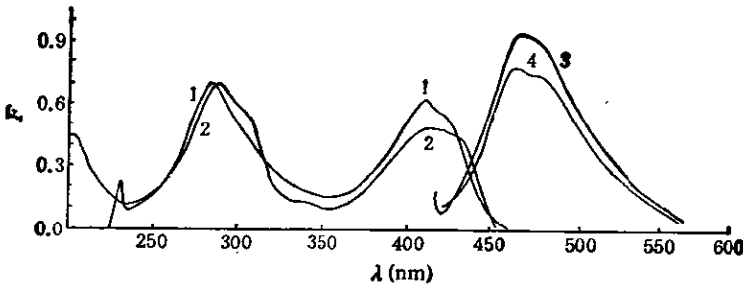


图1 赤霉素的吸收、激发和发射光谱
赤霉素(终浓度 2.0:μg/ml)溶于无水乙醇,加入 9 倍体积的浓磷酸(1.84)反应 1 小时,进行荧光测定 (slits: Ex 5.0nm; Em: 5.0nm, 20°C)。曲线 1-2 分别代表激发谱和吸收谱曲线; 3-4 分别是 410 nm 和 285nm 为激发波长的发射光谱。

的范围相对稳定。也就是说在此波长范围内测定赤霉素的量子产率,误差小于 5%。380—430 nm 波长区域亦是赤霉素的激发与吸收光谱所在的范围,但小于 370nm 和大于 430nm 波长处的 S/A 比值却大于 380—420nm 范围的比值。这可能是前者的吸收值 A 远小于后者的原故。虚线是 S/A 的相对比值,是以 410nm 处的 S/A 比值为 1.0 所做出的曲线。另外,如果在 285nm 周围取不同的波长进行量子产率的测定,也会得到与图 2 相类似的结果。相同的

芳香族化合物的荧光发射的代表。它的量子产率具有相对于激发波长的常量化区域,暗示了其他芳香荧光化合物也具有常量化区域。另有实验证明,酪氨酸、苯丙氨酸和色氨酸也具有相同的常量化量子产率区域。

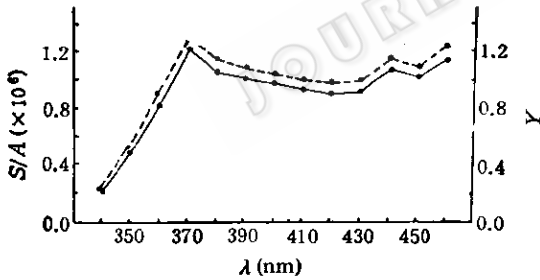


图 2 在不同波长下赤霉素的相对量子产率
实验条件见图 1, 赤霉素在所测定的激发波长的吸收均小于 0.03。荧光光度仪按 Hitachi-850 的校正程序进行校正。

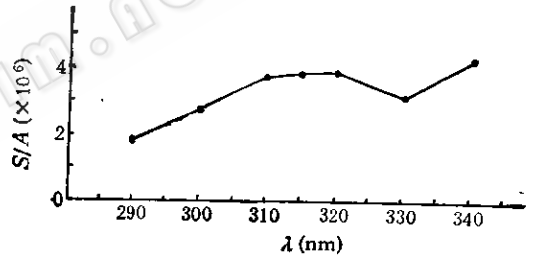


图 3 苯酚在甲醇溶液中的相对量子产率
实验条件见图 1-2, 对苯酚(终浓度 5.6ppm)的甲醇溶液进行量子产率的测定。图中的曲线是 S/A

情况在竹红菌甲素的二甲基亚砷溶液和苯酚的甲醇溶液中见到。

(二) 苯酚的相对量子产率

苯酚的相对量子产率在 310—320nm 的范围内变化很小,但在 290—310nm 范围为逐渐上升的趋势(图 3)。苯酚相对于赤霉素和竹红菌甲素来说,分子量要小。它的发光机制主要是酚基的空间结构为刚性较强的平面,是一类

(三) 竹红菌甲素的相对量子产率

竹红菌甲素有三个激发峰 Ex480、Ex580 和 Ex 625nm。用这些波长去激发竹红菌甲素可在 640nm 得到一个强度不同,发射峰相同的光谱。在 690nm 处均有一个肩峰(图 4)。分别测定由这三个波长激发得到的荧光相对量子产率(表 1),三者的相对量子产率彼此接近。说明这三个激发波长所激发的荧光是竹红菌甲素上的相同化学结构的共轭系统所发出的荧光,只是该系统具有多个激发能级。肩峰的出现可能是竹红菌甲素在物理化学性质上容易变化的空间结构部位所发射的光谱。因为用二甲基亚砷新鲜配制的竹红菌甲素在 690nm 的峰肩十分明显,而在常温(25°C)下放置一个月,肩峰

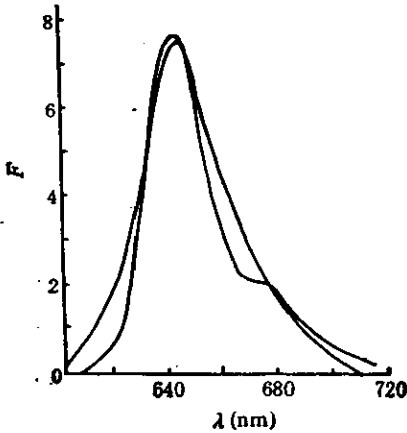


图4 竹红菌甲素的发射光谱

竹红菌甲素(终浓度 $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$)溶于二甲基亚砜, 20°C 进行荧光光谱的测定。峰1是新鲜配制的样品,峰2是在室温下放置了一个月的样品。

可完全消失。但 640nm 的光谱变化不明显。说明决定 640nm 光谱的共轭系统的空间结构没有发生变化,而决定 690nm 肩峰的结构却发生改变。该肩峰可能暗示了竹红菌甲素分子上的某个较为活泼的结构,该结构在常温下不稳定,容易受其他因素的影响而发生变化。

表1 竹红菌甲素相对量子产率

Ex(nm)	480	585	625
Em(S)	932	870	800
A	0.025	0.022	0.021
S/A($\times 10^4$)	3.6	3.9	3.8
平均S/A(%)	92	100	97

如果在竹红菌甲素的第一个激发峰附近选择 $430\text{—}520\text{nm}$ 为激发波长,去测定 640nm 的量子产率,就会发现在 $420\text{—}510\text{nm}$ 范围激发的 640nm 荧光相对量子产率相差很小。这暗示了量子产率的相对稳定区可能是荧光化合物

所具有的普遍性质。

讨 论

赤霉素、竹红菌甲素和苯酚都具有相对于激发波长的量子产率的稳定区。Chen报道了硫酸奎宁在 $250\text{—}366\text{nm}$ 范围量子产率的性质,为测定其他未知荧光化合物的量子产率提供了方便。荧光化合物具有量子产率的稳定区域可能是荧光化合物的性质。如果这一结论成立,那么在测定未知荧光化合物的量子产率时,特别是当荧光化合物的浓度较低,发射强度较弱,本底散射较强和荧光化合物的激发与发射波长较接近时,可以离开最大发射波长一定波长位置,进行量子产率的测定,避免由于散射光造成的误差。

新鲜配制的竹红菌甲素样品 690nm 的肩峰十分明显,但如果将样品在 25°C 下放置一个月,峰消失而 640nm 的发射峰不变。说明决定 640nm 荧光发射峰的结构基团没有发生变化,而决定 690nm 发射的结构却发生了变化。X-Ray 衍射的竹红菌甲素的晶体结构研究提示,竹红菌甲素分子间无明显的缔合,肩峰可能不是分子缔合造成的^[2]。另外,竹红菌甲素在低浓度的情况下 ($1 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$), 690nm 的肩峰依然不消失;而样品放置在室温一个月,肩峰消失。说明分子中有不稳定的结构,在物理或化学因素作用下发生了变化,而这一结构是肩峰的贡献者。

参 考 文 献

1. Chen R F: *Anal. Biochem.*, 12:374—387, 1967.
2. 梁丽等: *中国科学 B 辑*, 12: 1244—1250, 1989.

CONSTANT REGIONS OF QUANTUM YIELDS OF GIBBERELLIN AND HYPOCRELLIN A

Xu Jun

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)

He Rongqiao

(National Laboratory of Macromolecules, Institute of Biophysics Beijing 100101)

Determination of the quantum yields of Gibberellin, Hypocrellin A and phenol showed that there were respectively ranges of excitation wavelengths for the relative constant of quantum yields of them. The quantum yields of Gibberellin excited by its own multiple excitation wavelengths (285 and 410 nm) equaled each other. The quantum yields were similar by excitation of 585 nm and 625 nm with determination of the emission at 640 nm for Hypocrellin A. The emission at 690nm with Hypocrellin A would disappear after it had stood at room temperature for about one month. It suggests that it should be convenient to determine the quantum yield, at a shorter wavelength as for the excitation maximum, of a fluorophore whose concentration was low, weak quantum yield and wavelengths of the excitation and emission locating nearly, with a strong Rayleigh scattering; and that the 690 nm emission of Hypocrellin A should be emitted by the groups which were subjected to the effects of physical or chemical disturbances.

Key words Gibberellin; Hypocrellin A; Fluorescence; Quantum yield