

铝试剂的荧光光谱与荧光量子产率

魏永巨^{a,*} 康志敏^b 戚秀菊^c 张玉平^a 刘翠格^a

(^a 河北师范大学化学系 实验中心, 石家庄 050091)

(^b 河北科技大学理学院, 石家庄 050018)

(^c 石家庄师范专科学校化学系, 石家庄 050801)

摘要 首次研究了铝试剂的荧光光谱和荧光量子产率,发现在 pH 3 至 pH 12 条件下,用紫外光照射铝试剂溶液可以产生荧光,最大激发波长和最大发射波长分别为 297 nm 和 409 nm,荧光强度与铝试剂浓度之间存在良好的线性关系,线性范围为 0.01 ~ 3 $\mu\text{g/mL}$,检测下限为 0.01 $\mu\text{g/mL}$,以硫酸奎宁为参比,测得铝试剂的荧光量子产率为 0.16

关键词 铝试剂,奎宁,荧光光谱,荧光量子产率

Fluorescence Spectra and Fluorescence Quantum Yield of Aurintricarboxylic Acid

WEI Yong - Ju^{a,*} KANG Zhi - Min^b QI Xiu - Ju^c ZHANG Yu - Ping^a LIU Cui - Ge^a

(^a Department of Chemistry, Experimental Center, Hebei Normal University, Shijiazhuang, 050091)

(^b School of Science, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang, 050018)

(^c Department of Chemistry, Shijiazhuang Normal College, Shijiazhuang, 050801)

Abstract Fluorescence spectra and fluorescence quantum yield of aurintricarboxylic acid (ATA) were studied for the first time. It was found that ATA solutions with pH 3 ~ 12 produced fluorescence when irradiated with ultraviolet rays. The maximum excitation wavelength and the maximum emission wavelength are 297 nm and 409 nm, respectively. An excellent linear relationship between fluorescence intensity and ATA concentration was observed. The linear range is 0.01 ~ 3 $\mu\text{g/mL}$, and the detection limit is 0.01 $\mu\text{g/mL}$. Using quinine bisulphate as a reference, fluorescence quantum yield of ATA was measured to be 0.16.

Keywords aurintricarboxylic acid, quinine, fluorescence spectra, fluorescence quantum yield

铝试剂 (Aurintricarboxylic acid, ATA, 又名金精三羧酸, 玫红三羧酸) 是光度法测定 Al^{3+} 、 Ba^{2+} 等金属离子的显色剂, 在生物、医学领域, 铝试剂是一种蛋白质合成的抑制剂^[1], 它能抑制蛋白质 - 核酸之间的相互作用^[2]、抑制细胞凋亡^[3], 可用于检测

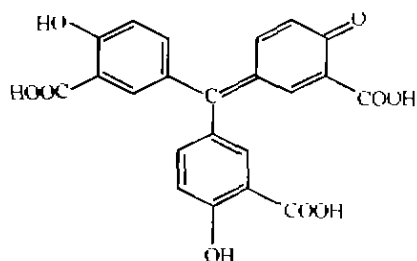
RNA⁺等, 但是, 铝试剂荧光性质迄今未见研究. 从分子结构上看, 铝试剂为不含氧桥的三苯甲烷类酸性染料, 此类试剂一般认为不是荧光物质^[5]. 我们在实验中发现, 铝试剂可以在 pH 3 至 pH 12 的条件下产生荧光, 荧光强度与试剂浓度之间存在良好线性

* E-mail: weiyju@heinfo.net

收稿日期: 2001-06-25, 修回日期: 2001-08-27, 定稿日期: 2001-09-06, 河北省自然科学基金 (200153) 和河北省教育厅博士基金资助课题

(Received June 25, 2001. Revised August 27, 2001. Accepted September 6, 2001.)

关系. 本文研究了铝试剂的荧光光谱, 以硫酸奎宁为参比^[5,6], 测量了铝试剂的荧光量子产率. 实验结果表明, 铝试剂的荧光具有较高的分析应用价值.



图式 1 ATA 的分子结构

Scheme 1 Molecular structure of ATA

1 实验

1.1 仪器与试剂

F-4500 荧光分光光度计 (Hitachi); UV-2501PC 分光光度计 (Shimadzu); 868 型 pH/ISE 测试仪 (ORION).

铝试剂 (玫红三羧酸铵, A.R., 天津市化学试剂一厂, $M_r = 473.45$); 以水配制成 1.00 mg/mL ($2.1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 标准溶液, 使用时适当稀释, 硫酸奎宁 (上海试剂二厂, 生化试剂, $M_r = 782.95$) 以 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫酸溶液配成 $1.00 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 标准溶液, 使用时适当稀释, 其余试剂均为分析纯或优级纯, 实验用水为蒸馏水.

1.2 实验方法

在 25 mL 容量瓶中, 分别加入铝试剂溶液或硫酸奎宁溶液以及 NaCl, HCl 或 NaOH 等辅助试剂, 以水稀释至刻度, 摇匀, 扫描荧光光谱或紫外吸收光谱.

为了准确计算荧光量子产率, 在测量荧光光谱之前, 首先用罗丹明 B 光量子计和散射光板对 F-4500 荧光分光光度计的激发光谱和发射光谱进行校正.

2 结果与讨论

2.1 荧光光谱

图 1 为铝试剂的荧光激发光谱和发射光谱, 最大激发波长在 297 nm, 最大发射波长在 409 nm. 改变激发波长, 发射光谱中的最大发射波长位置基本

不变.

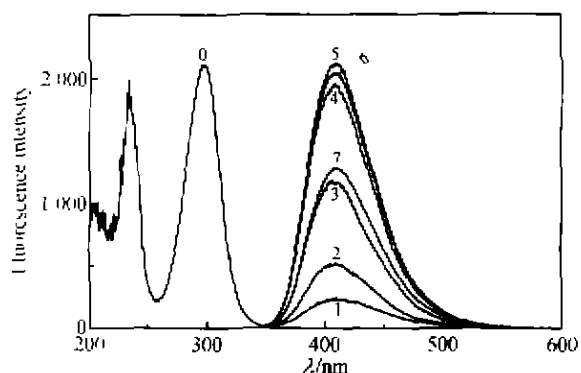


图 1 铝试剂的荧光光谱

Fig. 1 Fluorescence spectra of aurintricarboxylic acid

(ATA: $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (aqueous solution)).

(0: Excitation spectrum ($\lambda_{em} = 409 \text{ nm}$), 1~7: Emission spectra,

λ_{ex} : 1: 260 nm; 2: 270 nm; 3: 280 nm; 4: 290 nm; 5: 297 nm;

6: 300 nm; 7: 310 nm, slit: 5 nm/5 nm

2.2 酸度的影响

试验了溶液酸度对铝试剂荧光强度的影响. 在 pH 3.7 至 pH 11 之间, 铝试剂的最大激发与最大发射波长和荧光强度基本不变 (见图 2); pH < 3.7 时, 荧光强度随 pH 值减小而下降, 最大发射波长不变 (见图 3); pH > 11 时, 荧光强度随 pH 值增大而下降, 最大发射波长蓝移 (见图 4). 从铝试剂的分子结构看, 推测在 pH 3.7 至 pH 11 之间, 可能由于与中心碳原子连接的三个苯环在立体构形上具有一定的平面性与刚性, 使铝试剂具有荧光; 在 pH < 3.7 时, 与苯环连接的羧基发生质子化, 而在 pH > 11 时, 与苯环连接的羟基质子可以离解, 这两种情况都可能破坏分子的平面性与刚性, 使荧光强度降低.

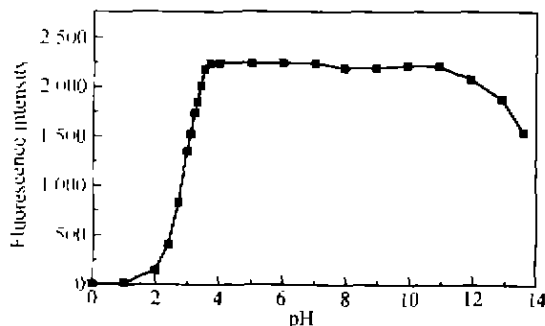


图 2 酸度对荧光强度的影响

Fig. 2 Influence of acidity on the fluorescence intensity of ATA

(ATA: $4.0 \mu\text{g/mL}$, $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl medium,

$\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 297 \text{ nm}/409 \text{ nm}$; slit: 5 nm/5 nm

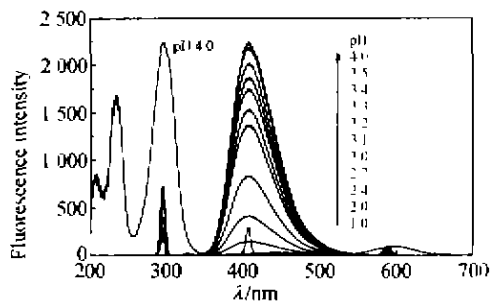


图3 铝试剂在酸性溶液中的荧光光谱

Fig.3 Fluorescence spectra of ATA in acidic solutions

$c_{\text{ATA}}: 4.0 \mu\text{g/mL}$, $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl medium,

$\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 297 \text{ nm}/409 \text{ nm}$; slit: $5 \text{ nm}/5 \text{ nm}$

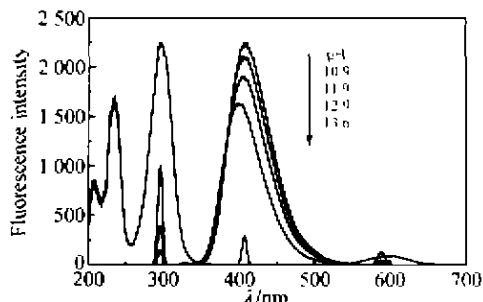


图4 铝试剂在碱性溶液中的荧光光谱

Fig.4 Fluorescence spectra of ATA in alkaline solutions

$c_{\text{ATA}}: 4.0 \mu\text{g/mL}$, $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl medium,

$\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 297 \text{ nm}/409 \text{ nm}$; slit: $5 \text{ nm}/5 \text{ nm}$

2.3 荧光强度与铝试剂浓度的关系

实验结果表明,当铝试剂浓度在 $0.01 \sim 3 \mu\text{g/mL}$ 之间时,荧光强度与试剂浓度之间有良好的线性关系,回归直线的相关系数为 $r = 0.99975$. 铝试剂的检测下限为 $0.01 \mu\text{g/mL}$ (见图5).

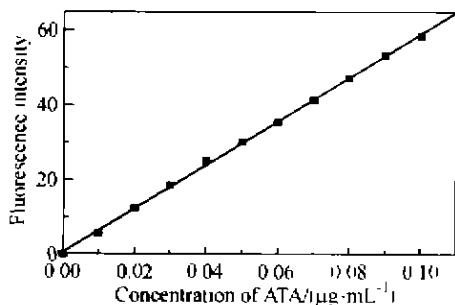


图5 荧光强度与铝试剂浓度的关系

Fig.5 Relationship between fluorescence intensity and concentration of ATA

pH 4.0, $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl medium, $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 297 \text{ nm}/409 \text{ nm}$;

slit: $5 \text{ nm}/5 \text{ nm}$

2.4 荧光量子产率的测量

荧光量子产率(Y)定义为荧光物质吸光后发射的光子数与所吸收的激发光的光子数之比.在实验上,一般用参比法测定物质的荧光量子产率.通过测量待测物质和参比物质的稀溶液在同一激发波长下的积分荧光强度和对该波长激发光的吸光度,然后按下式计算待测物质的荧光量子产率^[5].

$$Y_u = Y_s \cdot \frac{F_u}{F_s} \cdot \frac{A_s}{A_u} \quad (1)$$

式中, F_u 和 Y_s 分别表示待测物质和参比物质的荧光量子产率, F_u 和 F_s 分别表示待测物质和参比物质的积分荧光强度, A_u 和 A_s 分别表示待测物质和参比物质对该波长激发光的吸光度.硫酸奎宁由于化学性质稳定、量子产率高且吸收光谱与发射光谱基本不重叠,因而经常被用来作为参比物.铝试剂与硫酸奎宁的光谱性质相近(见图6),本文用硫酸奎宁为参比,测量铝试剂的荧光量子产率.

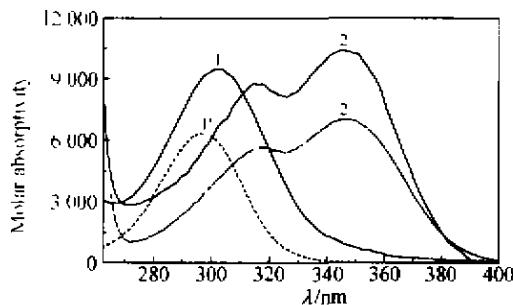


图6 铝试剂与硫酸奎宁的吸收光谱与荧光激发光谱

Fig.6 Absorption and fluorescence spectra of aurintricarboxylic acid and quinine bisulfate

1, 2: absorption spectra; 1', 2': fluorescence excitation spectra;

1, 1': aurintricarboxylic acid; 2, 2': quinine bisulfate

$c_{\text{ATA}}: 1.0 \times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$;

$c(\text{quinine}): 5.0 \times 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}, 0.05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$

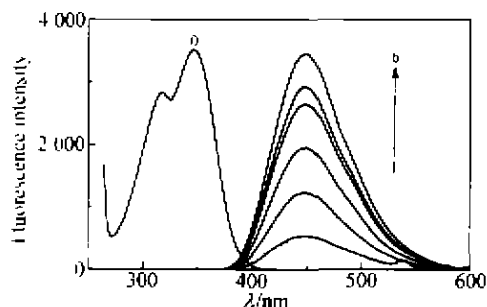


图7 硫酸奎宁的荧光光谱

Fig.7 Fluorescence spectra of quinine bisulfate

$c(\text{quinine}): 5.0 \times 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} (0.05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4)$.

0: Excitation spectrum ($\lambda_{\text{em}} = 452 \text{ nm}$);

1~6: Emission spectra, $\lambda_{\text{ex}}: 1: 270 \text{ nm}; 2: 290 \text{ nm}; 3: 300 \text{ nm};$

4: $310 \text{ nm}; 5: 330 \text{ nm}; 6: 340 \text{ nm}$. Slit: $5 \text{ nm}/5 \text{ nm}$

硫酸奎宁的荧光光谱见图 7. 在不同激发波长下, 硫酸奎宁的荧光发射强度不同, 但最大发射波长基本不变, 均为 452 nm.

以硫酸奎宁的 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫酸溶液在激发波

长 313 nm 的荧光量子产率 0.55 为标准^[5,6], 测得硫酸奎宁和铝试剂在不同激发波长下的荧光量子产率, 列于表 1.

表 1 硫酸奎宁和铝试剂的荧光量子产率(25℃)

Table 1 Fluorescence quantum yield of quinine bisulfate and aurintricarboxylic acid

激发波长 (nm)	硫酸奎宁(quinine bisulfate)				铝试剂(aurintricarboxylic acid)		
	F^a (积分荧光强度)	A (吸光度)	Φ (荧光量子产率)	λ_{ex}	F^b (积分荧光强度)	A (吸光度)	Φ (荧光量子产率)
270	46 541	0.014 3	0.319	0.58	37 269	0.030 7	0.119
280	61 486	0.016 0	0.376	0.68	81 433	0.047 3	0.169
281	66 216	0.016 6	0.391	0.71	87 342	0.049 5	0.173
290	104 528	0.021 4	0.478	0.87	135 452	0.074 7	0.178
297	149 095	0.027 8	0.525	0.95	149 217	0.091 4	0.160
300	164 962	0.030 6	0.528	0.98	144 450	0.094 0	0.150
310	224 188	0.040 9	0.537	0.98	92 946	0.084 6	0.108
313	242 105	0.043 1	0.55	1	72 552	0.077 0	0.092
320	241 197	0.042 3	0.558	1.02	36 127	0.055 7	0.064
330	244 191	0.042 2	0.567	1.03	12 310	0.027 7	0.044
340	288 828	0.050 2	0.563	1.02			
345	304 542	0.052 0	0.573	1.04			
350	295 177	0.051 3	0.563	1.02			
360	239 333	0.039 2	0.598	1.09			
366	183 527	0.028 2	0.637	1.16			
370	140 905	0.021 1	0.654	1.19			
380	60 700	0.007 5	0.792	1.44			

a) 积分范围: 380 ~ 580 nm; b) 积分范围: 340 ~ 540 nm

由表 1 可见, 在激发波长 297 ~ 360 nm 范围内, 硫酸奎宁的荧光量子产率变化不大. 铝试剂在激发波长 280 ~ 300 nm 范围内, 荧光量子产率大致相同. 在最大激发波长 297 nm 的荧光量子产率为 0.16. 一般认为, 有分析应用价值的荧光化合物, 其荧光量子产率的数值在 0.1 ~ 1 之间. 铝试剂的荧光量子产率达 0.16, 有较高的分析应用价值.

本文为“庆祝邢其毅教授九十华诞暨执教六十年”征文

References

- 1 Stewart, M. L.; Grollman, A. P.; Huang, M. T. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1971**, 68(1), 97
- 2 Gonzalez, R. G.; Haxo, R. S.; Schleich, T. *Biochemistry*, **1980**, 19(18), 4299.
- 3 Andrew, D. J.; Hay, A. W.; Evans, S. W. *Immunopharmacology*, **1999**, 41(1), 1.
- 4 Oberhammer, I.; Speth, C. *Anal. Biochem.*, **1990**, 185(1), 77.
- 5 Chen, G. - Z.; Huang, X. - Z.; Zheng, Z. - Z.; Xu, J. - G.; Wang, J. - B. *Fluorometric Analysis*, 2nd Edn., Science Press, Beijing, **1990**, pp. 15 - 17, p. 39 (in Chinese)
- 6 Parker, C. A.; Rees, W. T. *Analyst*, **1960**, 85, 587

(Ed. PAN Bing - Feng)

(ZHENG Guo - Cheng)