

荧光分析及其应用

陈逸诗

(中国科学院生物物理研究所)

由于六十年代后期荧光仪器技术的发展,使荧光分析方法日趋完善。目前荧光分析方法已广泛地应用到工农业、环境保护、粮食保存、临床化验、药物分析、食品分析、医学和生物学基础研究等各个领域,分析对象有无机离子和化合物、有机化合物、氨基酸、蛋白质、酶、核酸、糖、维生素和甾族化合物等等。近年来,我国各个研究领域对荧光分析法比较重视,在这方面做了不少工作,取得一定的成绩。本文就荧光分析法和它的应用作一简单的介绍。

一、荧光

荧光是一种自然的现象。在我们日常生活中到处都可以看到荧光,例如,电视机的荧光屏,房内挂的日光灯,商店摆设的荧光颜色等等。傍晚我们看到萤火虫发出黄绿色的光,也是一种荧光,它是属于生物发光现象,发光过程需要体内提供能量ATP。

荧光究竟是怎样产生的呢?某些荧光物质的分子吸收外界能量,由基态跃迁到较高的能级(激发态)后,通过内转换损耗部分能量,返回到最低电子激发态的最低振动能级,再从这个能级返回基态,所发出的光称为荧光。整个过程是在单线态之间进行的。由此可见,所发射光的能量比吸收的能量要小,而且产生荧光过程很快,大约 10^{-8} 秒内完成,一旦外界能源断绝,荧光也随之消失。

外界提供能量的方式很多,例如,加热、光照、化学反应、生物代谢和射线照射等都能提供能量,当荧光物质吸收这些能量后就能发出荧光,荧光的光谱范围比较宽,可从X光到红外

谱区。实际上应用较广的是由光照提供能量,即所谓光致发光;一般涉及荧光光谱范围在紫外到可见区内。本文主要介绍这个光谱范围的荧光分析。

二、分子结构和环境对荧光的影响

一种物质能不能发出荧光,主要取决于它本身分子结构和它所在的环境条件。处于电子激发态的分子返回基态时,能以几种方式将能量释放,如光辐射、无辐射衰减和光分解。但是,能发出荧光的物质本身应该具有较大的吸光能力,较高的荧光量子效率(发射光能量与吸收光能量之比)和适宜的环境。

对内因来说,我们把分子中含有能发射荧光的基团称为荧光基,可以认为荧光基必定是生色团(具有吸光能力),但具有生色团的分子,如果它的量子效率等于零的话,那么就不能发出荧光。荧光物质的分子一般都含有共轭双键体系,随着 π 电子共轭度的增大,量子效率也随之增高,荧光的激发光谱和发射光谱向长波位移。例如,苯、萘、蒽、丁省和戊省都是线型多核芳烃化合物,随化合物中苯环的增多,它们的量子效率从苯的0.11增到戊省的0.52,激发波长(λ_{ex})和发射波长(λ_{em})也顺次向红谱区位移。实际上许多荧光物质都含有芳烃环或杂环。一般结构为 $\text{Ph}-(\text{CH}=\text{CH})_n-\text{Ph}$ 不饱和的多烯系统也具有较高的量子效率。此外,某些基团能增加分子的荧光强度,如 $-\text{OH}$ 、 $-\text{OR}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHR}$;相反某些荧光分子置换上卤

素基团,则会使荧光减弱。

就外因而论,分子的环境因素可以强烈影响荧光发射,但是也可以利用某些环境因素来提高荧光测定的灵敏度和选择性。这些环境因素有溶剂、酸碱度、温度、猝熄效应等。例如,提高环境温度会使荧光减弱;溶剂中有重金属离子会使荧光猝灭。

由上可见,许多有机化合物和生物大分子都含有这种荧光基的结构,因此用荧光方法测定它们是有利的。

三、荧光分析的特点

荧光分析具有一定的优点,如灵敏度高、选择性强、试样量少和方法简便。另外,它能提供较多的物理参数,如荧光光谱、量子效率和偏振度等。

对很稀的溶液来说,荧光强度 $F \propto \Phi \epsilon c I_0$, 也就是说荧光强度 F 正比于被测物质的量子效率 Φ 、吸收系数 ϵ 和浓度 c , 并正比于入射光强度 I_0 。 Φ 和 ϵ 对被测物质是常数;在一定范围内,荧光强度 F 与浓度 c 呈线性关系,而增加仪器入射光强度 I_0 , 就能增加被测物质的荧光强度,如果仪器的检测系统灵敏度较高,那末测定的灵敏度也会提高,因此,荧光分析比一般分光光度法灵敏 1000 倍左右,某些量子效率比较高的物质可以检测到微微克水平。不过入射光强度 I_0 不能过大,否则会引起被测物质的光分解,所以一般采用适中强度的光源,如汞灯和氙灯。

荧光物质的特征荧光光谱包括有激发光谱和发射光谱两种。激发光谱是指不同激发波长的辐射引起物质发射某一荧光波长的相对效率。发射光谱(也有称为荧光光谱)是指某一激发波长引起物质发射不同波长荧光的相对强度。前者是发射波长固定,记录扫描激发波长,后者是激发波长固定,记录扫描发射波长。在分光光度法中,被测物质仅有一个特征的吸收光谱,而荧光分析法能测出两个特征光谱,因此它在鉴定物质时选择性更强,例如,尽管某几种物质的发射光谱相似,但是可以从激发光谱的差异把它们区分开。一般来说,一种物质的发

射光谱与它本身的吸收光谱呈镜像对称关系,激发光谱(经过校正)与吸收光谱相类似。

荧光分析不足之处是能产生荧光的物质并不广泛,其次是环境干扰因素比较多,但是只要我们通过实践掌握规律,亦不难予以克服。

四、荧光分析的手段

近年来,报道各种新型的荧光分析仪器,工作比较深入。一般用途最多的还是荧光计,荧光分光光度计和荧光显微镜等。

最简单观测荧光的方法,在暗室用紫外灯照射被测物质,可以用肉眼看到耀眼的荧光。荧光计,一般是用滤片取得单色光,由于光路系统比较短,所以测定的灵敏度较高。但是,选择性较差,不能记录光谱图。这类仪器作定量测定比较合适,价格较便宜。荧光分光光度计,采用棱镜或光栅作单色器,一般设有激发单包器和发射单色器。这种仪器分光效果好,选择性强,能记录激发光谱和发射光谱。但是,这类仪器光程较长,灵敏度一般比荧光计低 1 到 2 个数量级。荧光显微镜与普通显微镜的区别在于有一个较强的紫外光源,用以激发被观察的物质,它是用滤片取得单色光。观察荧光时要在目镜部分插入适当滤片,滤去非荧光的人射光线。也可以采用暗视场方法观察荧光,由于入射光线在载玻片上全反射,物质发出荧光直接被观察。

荧光分光光度计若设有较多的附件,可以测定稀溶液、浓溶液(表面荧光测定)、固体和薄层色层样品等。

除仪器条件外,根据荧光发生和分子结构的关系,我们初步了解哪些物质能发出荧光;这对一些本身不能产生荧光的物质,通过一定条件的转化,也可以进行荧光测定,因此,荧光测定基本采用两种方法:

直接测定荧光物质。只要选择适宜的激发波长和发射波长,就能直接测出被测物质的荧光。例如,作为荧光标准的硫酸奎宁溶液,在酸性条件下,用 λ_{ex} 350 毫微米和 λ_{em} 450 毫微米,就能观察到很强的荧光。有些荧光物质在

常温条件下不发荧光、在低温条件可以测出荧光。

间接测定方法。把非荧光物质转变为荧光物质,进行荧光测定。也可以利用某些具有荧光基的有机试剂与非荧光物质形成较强的荧光络合物。例如,研究生物大分子的含有荧光基的有机试剂(一般称为荧光探针)比较多,像核酸的荧光探针有菲啉溴红 Eth Br,吖啶橙 AO 和异硫氰酸奎吖因二盐酸盐 QM,蛋白质的荧光探针有 1-氨基苯-8-萘磺酸 ANS 和 2,6-对氨基甲苯磺酸 2, 6-TNS 等。也可利用荧光猝熄效应来测定,例如,通过氧对荧光的猝熄来测定氧本身的含量。

五、荧光分析的应用

荧光分析法可以对被测物质进行定性和定量的分析。在自然界里能直接用荧光方法测定的无机化合物很少,一般采用与有机试剂络合或荧光猝熄方法间接测定,可测元素大概有六十余种。有机化合物大约有几千种可以用荧光方法来测定,涉及的范围较广。下面结合国内外应用的情况列举一些例子,简单介绍它应用的一些方面。

1. 农业应用

培育新品种的作物和粮食贮存都需要对其营养成分进行分析,譬如分析粮食中蛋白质和维生素的含量。由于蛋白质中一般存在具有荧光基的色氨酸和酪氨酸,它们的激发波长在280毫微米左右,和蛋白质的吸收波长相近,如果用这个波长激发,就能测到两个荧光发射峰 313 毫微米和 350 毫微米,用此法可对蛋白质进行定量测定。亦可采用荧光探针 ANS,它与蛋白质结合后荧光强度增强,荧光强度与溶液中蛋白质浓度呈线性关系,一般可测到微克水平。许多维生素是含有芳烃环的化合物,一些不能发荧光的维生素可以转化成荧光物质来测定。例如,维生素A,可用 λ_{ex} 345 毫微米和 λ_{em} 490 毫微米测定;维生素B₂(核黄素)在中性条件下,用 λ_{ex} 270, 或 370 或 440 毫微米和 λ_{em} 520 毫微米,可测灵敏度达 2×10^{-4} 微克/毫升。而维生素C

(抗坏血酸),可以经过简单的转化方法进行测定,首先用 2,6 二氯酚将抗坏血酸转化为脱氢抗坏血酸,然后与邻苯二胺缩合成荧光化合物,这个方法在纸层析上,能检测样品浓度 2 到 25 微克水平,如果在溶液中测定,可用 λ_{ex} 350 毫微米和 λ_{em} 430 毫微米,最低可测到 0.15 微克/毫升。

农药中的氨基甲酸酯除莠剂和尿素除莠剂,经过化学处理后就能产生荧光,用 λ_{ex} 350 毫微米和 λ_{em} 512 毫微米作定量测定。农药 1605 也可以用荧光方法测定。测定赤霉素用荧光方法比较准确可靠,赤霉素与浓硫酸作用生成能发荧光的三环芳烃衍生物,用紫外激发,观测蓝光强度。

2. 环境保护

在我国国民经济发展中,很重视环境保护工作,这对于保护自然环境和人民健康是很重要的。环境污染可包括空气、水源和食物的污染。就空气污染而言,污染物质大多数属于多核芳烃化合物,其中有些是致癌物质,对人体健康是有害的。这类物质大多数能发荧光,用荧光方法定量测定,一般能检测到 10^{-8} 克的水平。

例如,苯并芘是一种强的致癌物质,存在比较普遍,它吸收紫外光后能发出荧光。据报道,摩托车废气在 90 分钟内能排出 130 微克苯并芘;对香烟烟雾的分析,用薄层色谱结合荧光光谱鉴定表明,有苯并芘的特征荧光光谱,同时也有另一种致癌物质二苯并蒽。又如,3,4 苯并芘和苯并荧蒽都是强荧光物质,经常共存于自然界,前者是强致癌物质,后者是非致癌物质,它们的发射光谱很相近,甚至连发射峰数目也相同,但是用它们的激发光谱来比较差别就很明显,就可以把它们区分开。通常由于煤、焦油和沥青燃烧造成空气的污染,其中产生的致癌物质苯并吡唑可以在碱性的DMF溶液中(29%的甲醇和四乙胺的氢氧化合,配比 5:1),用 λ_{ex} 291 毫微米和 λ_{em} 377 毫微米对它进行定量测定。

污水中一些有害的重金属离子,可以通过间接方法测定其含量。例如,铅可检测到 5×10^{-8} 克,银 1×10^{-10} 克和汞 1×10^{-9} 克。

又如发霉的花生和烟叶中的黄曲霉，它的强毒性代谢产物也可以用荧光方法来测定。

3. 临床化验

荧光方法应用到医院化验工作比较早，由于此法灵敏度较高，因此对血液、尿液和组织的取样量很少。测定的对象比较多，如蛋白质、酶、糖、激素和维生素等。

例如，用一滴血就能测定血液中葡萄糖的含量，方法是含有己糖的多糖类与5-羟基-1-萘满酮在硫酸条件下缩合成发荧光的苯并萘二酮，用 λ_{ex} 365毫微米和 λ_{em} 535毫微米，可测灵敏度达1微克/毫升；如果改用 λ_{ex} 470毫微米和 λ_{em} 550毫微米，则取血量可少到2微升。

酶一般采用间接方法测定。一些酶反应过程与菸酰胺腺嘌呤核甙酸 NAD（还原型为 NADH）和菸酰胺腺嘌呤核甙酸磷酸盐 NADP（还原型为 NADPH）的氧化还原体系有关，利用还原型 NADH 和 NADPH 具有很强的荧光来测定，这种方法的灵敏度比比色法高2到3个数量级。对酶的荧光测定过程，往往开始时观察不到荧光，当加入酶后荧光才增加，定量测定是通过单位时间内荧光强度增加率与酶浓度成正比关系来确定的。脱氢酶和转氨酶均可采用此法测定。如果在 NAD-NADH 或 NADP-NADPH 系统内，将无荧光的刃天青(resazurin)转化为产生强荧光的试卤灵(resorufin)，用 λ_{ex} 540毫微米和 λ_{em} 580毫微米，测定的灵敏度更高，例如，乳酸脱氢酶 LDH，葡萄糖6磷酸脱氢酶 G6PD 能测到 10^{-4} 单位/毫升。萘酚-AS 的衍生物都具有荧光，利用它相应的萘酚-磷酸脂（无荧光）为磷酸酶的底物，此法对碱性磷酸酶能测 5×10^{-4} 到0.5单位，酸性磷酸酶能测 2×10^{-4} 到 2×10^{-2} 单位。

甾族化合物包括胆固醇、雌、雄激素，肾上腺素和胆酸等。雌激素含有芳烃环和酚的衍生物，具有荧光性。其他甾族化合物，若用硫酸或硫酸-氯仿-乙醛混合液处理，能形成高度比色和荧光物质，一般可以测到 10^{-9} 克范围。例如雌酮，用 λ_{ex} 440毫微米和 λ_{em} 480毫微米，能测到 1×10^{-11} 克；皮质甾酮能测 1×10^{-10} 克，孕

甾酮能测 1×10^{-10} 克。

4. 医药品和食物添加剂的分析

药物学要求分析方法能鉴别出各类药物和它的代谢产物，而许多药物所采用的注射剂量很小，有时低到100微克/日水平，用荧光方法能灵敏地检验出它自体内的排泄量。例如，阿斯匹林，在 HOAC-CHCl₃ 条件下，用 λ_{ex} 280毫微米和 λ_{em} 335毫微米，可测到 10^{-8} 克；青霉素与一种氮杂蒽的化合物缩合后，可用于它在尿液和血液中的测定，用 λ_{ex} 365毫微米和 λ_{em} 540毫微米，能测到 5×10^{-8} 克，广谱青霉素，水解后用 λ_{ex} 346毫微米和 λ_{em} 422毫微米，可测到 5×10^{-8} 克；链霉素在 pH13， λ_{ex} 366毫微米和 λ_{em} 445毫微米，可测到 1×10^{-9} 克。

医用脱脂棉，生理用纸制品，大都掺有荧光增白剂，用以提高它的洁白程度。因为一般纤维本身往往显得发黄，这是由于它强烈地减弱兰谱区反射的缘故，而荧光增白剂吸收紫外光后，在兰谱区发射荧光，所以它的增白效果和加入兰色染料相似。对它的测定，可用 λ_{ex} 360~390毫微米， λ_{em} 410~440毫微米。

食物中的防腐剂大多是羟基安息香酸和对羟基安息香酸，可用 λ_{ex} 314毫微米和 λ_{em} 420毫微米来检验它的合格量。

5. 医学基础研究

医学有很多重要课题需要深入探讨，例如肿瘤诊断，计划生育和针麻原理等。荧光分析可能在一些方面能提供有用的信息。

例如，染色体组型，某些荧光探针能与染色体中的 DNA 结合，从而把染色体分成明显的荧光区带，如果用高分辨率的微量荧光计，可以记录每条染色体荧光区带强度的分布图。目前已经取得正常人染色体组型的荧光区带分布图。其中以荧光探针 QM 用于染色体荧光分带效果比较好，对它可用 λ_{ex} 415毫微米和 λ_{em} 500毫微米来观测。又如免疫荧光分析，可以定性和定量测定人体淋巴细胞膜上的免疫球蛋白，其方法是通过免疫学的特异反应，将结合上荧光素的抗血清对免疫球蛋白进行染色，然后测定荧光值。此外，还有某些癌变细胞对有些药物有特异

的聚集能力,如四环素,而四环素经酸性介质处理变成脱水四环素,在 pH11, 用 λ_{ex} 390 毫微米和 λ_{em} 515 毫微米,可测 2×10^{-9} 克。

吖啶橙 AO 能和 DNA 结合,在很稀的吖啶橙溶液中,吖啶橙的单体发射峰在 540 毫微米(绿色),当溶液浓度增加,吖啶橙分子形成二聚体,发射峰位移到 660 毫微米(红色)。因此,若细胞核的 DNA 聚集发生变化,那末 AO~DNA 络合物的发射光谱随之也会改变。例如,在一般显微镜中我们很容易观察到:活精子的头部是绿色的,而死亡的精子为红色。如果应用荧光分光光度计可能会提供这个变化的详细过程。

神经末梢释放的乙酰胆碱,也可以通过间接的方法进行荧光测定。

6. 分子生物学的研究

荧光探针非啶溴红 EthBr 与核酸有特异的结合能力,它对核酸的双链区结合是专一的,所形成的非啶溴红和核酸络合物其量子效率明显增强,如果利用它与各种构型核酸结合比率不同所产生荧光强度的变化,可以把各种构型核酸区分。例如,它能鉴别天然核酸和变性核酸;区分线状 DNA、环状 DNA 和超级线团 DNA;利用它来研究多聚核苷酸之间的聚合反应等。EthBr~核酸的络合物可用 λ_{ex} 360 毫微米或 546 毫微米和 λ_{em} 600 毫微米测定。

利用荧光探针可以研究生物大分子的某些构型。例如,对去五肽胰岛素的疏水表面结构分析,采用荧光探针 1,8-对甲苯氨基萘磺酸

1,8 TNS, 由于它与疏水表面结合后,荧光量子效率增加和发射波长位移的特点,探测疏水表面的变化。荧光分析结果表明,去五肽胰岛素和胰岛素相似,有一个小而确定的疏水区,提示 B 链羧端五肽去除未严重改变其疏水表面结构,但分子构象有一定程度扭动。

对生物膜的研究也可用各种荧光探针,如 ANS、TNS 和 AS 等。

7. 其他

地下水源的调查,应用荧光染料有其优点,因为染料用量较少。在 2000 多种有机染料中,大约有 200 种染料在溶液条件下可以发荧光。

法医学中,荧光分析有它特殊的用处,如检测组织中的药物和毒物,从组织和器官的荧光推测躯体的年龄,测定血液、精子和枪弹油脂等。例如,头发外表的特殊结构,可用硫酸小檗碱溶液(1:1000)荧光染色处理后检验。血液与浓硫酸反应,引起血卟啉微量凝聚,发出橙红色荧光,可用荧光显微镜观察。

参 考 资 料

- [1] 中国科学院生物物理研究所四室五组: 生物化学与生物物理进展, 1976 年, 第 3 期, 第 13 页。
- [2] 中国科学院生物物理研究所一室二组: 生物化学与生物物理进展, 1975 年, 第 2 期, 第 47 页。
- [3] 中国科学院生物物理研究所六室溶液构象组: 中国科学, 1976 年, 第 4 期, 第 437 页。
- [4] 陈国珍: 荧光分析法, 1975 年。
- [5] Guilbault, G. G.: Practical Fluorescence. Theory, Methods, and Techniques, 1973.
- [6] Thaer, A. A. et al.: Fluorescence Techniques in Cell Biology, 1973.
- [7] 田村善藏等: 荧光分析, 1973。