

1003 - 7713/2000/05 - 0576 - 05

# 照相明胶荧光特性的研究

徐绪国\*，王 娟，孙崇敏，闫天堂

(中国科学技术大学应用化学系, 合肥 230026)

摘 要：利用荧光分析法研究了照像明胶的荧光特性。结果表明，除了公认的苯丙氨酸和酪氨酸两种荧光物质外，还存在一种未知的荧光杂质，其最大激发峰为 240 nm，荧光峰为 395 nm。性能试验表明，该荧光杂质可能为卟啉类络合物或某种色素物质。

关键词：照相明胶；荧光杂质；卟啉

中图分类号：PQ571 文献标识码：A

## 1 前 言

分子生物学中，荧光分析常用来进行大分子构象、体积以及电荷转移机理的测定，并可利用能量转移测量分子内(间)两基团的距离<sup>[1]</sup>。荧光法用于蛋白质分析，主要是研究其在水溶液中的构象。此外，还可以考察色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸所处的微环境、酶的活性部位结构以及蛋白质变性等。组成蛋白质的 20 种  $\alpha$ -氨基酸中，已知只有上述三种氨基酸(或残基)具有荧光，且相对荧光强度之比为 100:90:5。他们在中性水溶液中的基本荧光参数见文献 [2] 和 [3]。

由于明胶蛋白中不含色氨酸，且酪氨酸和苯丙氨酸含量又低，因此，明胶水溶液的荧光较弱。但由于荧光分析的高灵敏性及荧光强度对外界条件的敏感性，利用荧光分析来推断明胶大分子在水溶液中的构象变化及考察明胶—AgX 荧光的相互作用仍具有重要意义。

我们选择了不同产地、不同原料、品种的照相明胶，对其内源荧光进行了研究，探讨了荧光法用于明胶检测分析的可行性。研究中意外地发现明胶中存在一种非  $\alpha$ -氨基酸的荧光物质，由于它不为明胶大分子组成部分，故称为荧光杂质，并对其有关性质进行了研究。

## 2 试验部分

### 2.1 主要仪器

RF-540 荧光分光光度计，参数设置：激发分光器狭缝 10 nm，灵敏度 HIGH，荧光分光器狭缝 10 nm，扫描速度 FAST。

### 2.2 主要试剂及样品

酪氨酸、苯丙氨酸、蛋氨酸、组氨酸等均为生物试剂；多种照相明胶样品。

## 3 结果与讨论

### 3.1 明胶中存在的荧光物质

\* 通讯联系人。

所研究的三种胶样(西宁胶、开平胶和法国分散胶)的荧光谱非常相似。在 285、305 及 395 nm 处均有一个荧光峰(图 1),他们相对应的最大激发波长分别在 260、275 及 240 nm 附近(图 2),在大于 50 mg/L 的浓度下,各峰均敏锐清晰。

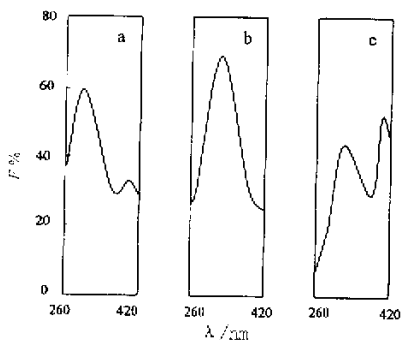


图 1 西宁胶的荧光光谱(11℃)

Ex: a. 260 nm, b. 275 nm, c. 240 nm

Fig.1 Fluorescence spectra of Xining gelatin (11℃)

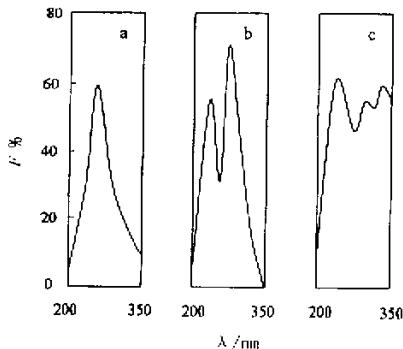


图 2 西宁胶的激发光谱(11℃)

Em: a. 285 nm, b. 305 nm, c. 395 nm

Fig.2 Excitation spectra of Xining gelatin (11℃)

由文献<sup>[2,3]</sup>数据和试验中纯组分的特性光谱,可断定上述荧光谱图中,位于 280 和 305 nm 附近的两个峰,分别为明胶中苯丙氨酸和酪氨酸的荧光峰。

但 395 nm 处的荧光峰却是出乎意料的。虽然另一种能产生荧光的氨基酸—色氨酸可能以某种形式存在于明胶中<sup>[4]</sup>,但基于以下事实可以排除这种可能性。① 色氨酸的激发峰和荧光峰分别位于 287 和 348 nm 处(见表 1),这与试验值 240 和 395 nm 相差甚远;② 浓盐酸水解蛋白质,将会破坏全部色氨酸<sup>[5]</sup>。但试验中,经 6 mol/L HCl 水解后的明胶溶液,其 395 nm 处的荧光依然存在。

表 1 商品明胶中的荧光物质

Table 1 Fluorescence substance in commercial gelatin

Characteristic	Phenylalanine	Tyrosine	Impure substance
Fluorescence peak/ nm	285	305	395
Excitation peak/ nm	260*	275	240

\* The excitation light was selected at 250 nm for fear of the disturbance of Raman spectrum of water

我们还考察了明胶中可能产生荧光的其他氨基酸。结果表明,蛋氨酸及其氧化产物、胱氨酸、组氨酸等都不产生荧光。由此推断,明胶中存在着一种尚未见报道的非 α-氨基酸类的荧光杂质。这样,明胶中存在着三种荧光物质,他们的基本参数<sup>[2,3]</sup>列于表 1。

### 3.2 胶液浓度与荧光强度的关系

在一定温度和 pH 值下,胶液浓度(C)与其荧光强度(F)呈很好的线性关系:

$$F = I_0 \Phi [1 - \exp(-2.3\epsilon CL)]^{61}$$

试验表明,在低于 1.5 g/L 的明胶浓度下,这一线性关系良好,相关系数在 0.9996 以上,检测灵敏度为 50 mg/L。试验还利用纯组分苯丙氨酸的相对荧光强度(F)与其浓度的关系曲线方程:

$$F = 1.24C + 0.0048 \quad (\text{pH} = 7.0, 17^\circ\text{C}, C = 150 \text{ mg/L})$$

测得不同明胶中的苯丙氨酸(残基)含量,与氨基酸分析仪所测结果基本一致。而荧光法更为经济、快捷、简便。

试验结果表明,明胶中未知的荧光杂质,其荧光强度与明胶浓度的关系,可在更低浓度下呈直线关系。

### 3.3 pH 值对荧光性质的影响

介质 pH 对明胶水溶液荧光有显著影响,且对不同荧光物质的影响力度也不相同。图 3 表明,当 pH 在已知的两种荧光物质等电点附近 ( $\text{pH} = 5 \sim 6$ ),这时明胶分子呈偶极结构,处于紧缩的线团构象,荧光最强;而在其两侧,荧光强度都显著降低,但在  $\text{pH} = 5 \sim 9$  内,荧光都较显著。有趣的是,荧光杂质的荧光强度随 pH 变化规律与上述两种荧光物质类似,只是最大荧光峰在  $\text{pH} = 8.5$  附近。这表明该杂质具有与氨基酸相类似的两性性质。在其 pH 值下,其分子也表现为同时带有相同量正负电荷的偶极结构,即该杂质的等电点在  $\text{pH} = 8.5$  附近。

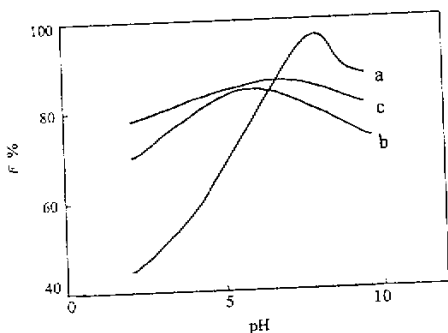


图 3 pH 值对明胶溶液荧光强度的影响

a. 395nm (Ex240 nm), b. 305 nm (Ex275 nm), c. 285 nm (Ex250 nm)

Fig.3 Affection of pH value on fluorescence intensity of gelatin solution (Xining gelatin, 10 °C)

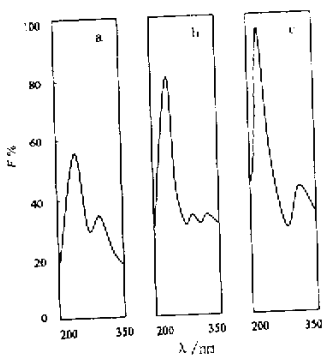


图 4 pH 值对明胶激发光谱的影响(荧光波长 395 nm)

a. pH 4.3, b. pH 6, c. pH 10

Fig.4 Affection of pH value on excitation spectrum of the impure substance in gelatin sample (Em395 nm)

介质的 pH 不仅影响荧光物质的荧光强度,还对其激发光谱强度、峰位及形状产生极大影响,特别是对荧光杂质的激发光谱影响较大。图 4 表明,在近中性水溶液中,同时有三个激发峰,分别位于 240、298 及 328 nm 处;在酸性水溶液中,只有 240 和 298 nm 附近的两个峰;在碱性条件下,只有 240 和 328 nm 附近的两个峰。由此可以推断该杂质为一弱电解质。若假定该杂质分子结构简式为  $\text{R}-\text{X}-\text{H}$ ,则在水溶液中存在下列离解平衡:

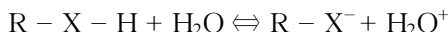


图 4 数据还表明,随着溶液酸度增加,240 nm 附近的激发峰不断减弱,但在所测的几种 pH 条件下,该峰一直是最强的激发峰。根据该峰的位置和形状尖窄的特征,可以推断该峰属于未知物分子中基团 R 的  $\pi-\pi^*$  电子的跃迁<sup>[7]</sup>。因此,该物质分子中具有不饱和结构特征,它不可能为明胶的无机盐份。而且由于明胶中核酸及其降解产物天然碱基等杂质的荧光量子效率又很低,一般观察不到荧光<sup>[8]</sup>,所以明胶中的未知荧光杂质也不能为核酸及其降解产物。更不可能为碳水化合物或脂类,因为它们没有产生荧基团。

由于明胶中的未知荧光杂质荧光特性显著,且荧光峰与激发峰又相距较远,可以避免水的

拉曼峰的干扰 因此对明胶的荧光分析有重要意义。实验还表明,该杂质具有比氨基酸还强的还原性,所以其存在必对感光性能有重要影响。

### 3.4 氧化-还原物质对杂质荧光的影响

在一定温度及 pH 值下,分别向一定浓度的明胶溶液中加入  $H_2O_2$  (0.2%) 和  $Na_2SO_3$  (0.01 mol/L),并分别测定其荧光强度,结果见图 5。实验结果表明,明胶中此荧光杂质具有一定的氧化、还原能力。且当加入的氧化或还原性物质达到一定浓度时,都可能改变杂质分子结构,因而荧光强度降低。但在低浓度下却表现了不同特征,特别是加入少量  $Na_2SO_3$  时,可能仅改变溶液 pH,而没有与该杂质发生反应。

### 3.5 明胶色泽与荧光杂质的关系

如上所述,明胶中未知的荧光杂质存在于各种明胶中。但它既不是  $\alpha$ -氨基酸类,也非核酸及其降解产物,更不是无机盐类。那么该杂质与明胶中存在的色素物质是否有关?初步实验表明,它们之间的确存在着某种关联。

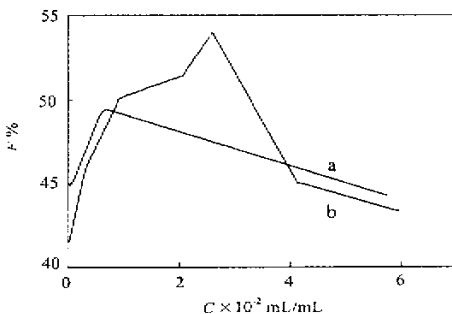


图 5  $H_2O_2$  和  $Na_2SO_3$  对明胶 395 nm 处荧光强度的影响  
a.  $H_2O_2$  (0.2%), b.  $Na_2SO_3$  (0.01 mol/L)

Fig. 5 Affection of  $H_2O_2$  and  $Na_2SO_3$  amount on fluorescence intensity of gelatin at nearly 395 nm

表 2 不同胶样在 450 nm 的吸收值及 395 nm 处荧光强度

Table 2 Spectral absorption at 450 nm and Fluorescence intensity at 395 nm of different gelatins

Sample	Inert gelatin ( Bengbu )	Disperse gelatin ( France )	Skin gelatin ( Shanghai )	Kai ping gelatin
Abs.	0.347	0.096	0.302	0.066
F %	60.8	59.1	33.7	57.0

表 2 中数据表明,除皮明胶外,胶液在 450 nm 处的光吸收值(通常作为胶样色泽深浅的表征)和 395 nm 处的荧光强度有某种关联。上述结果也表明,皮明胶即使色泽较深,但其杂质荧光却较弱。试验还表明,对于骨胶,虽然色泽很深,但其杂质荧光与骨明胶相近。这些都说明,明胶中的荧光杂质含量主要与原料有关,而生产工艺影响次之。骨明胶中荧光杂质含量较皮明胶高,这可能与骨明胶中含有一定量色素物质有关,其中血红素即为卟啉与铁的络合物(亚铁原卟啉)。卟啉及某些金属络合物都有强的荧光<sup>[9]</sup>,如钾、钠、钙、镁与卟啉的络合物都有荧光。依此,我们推测该荧光杂质分子中具有类似卟啉的吡咯环结构,并含有价态可变的原子或基团。即该杂质可能为卟啉类络合物或某种色素物质。最终结构的确定,还须试验证实。

## 4 结 论

1. 明胶中存在着三种荧光物质,即苯丙氨酸(残基)、酪氨酸(残基)和一种尚未知结构的荧光杂质。相对应的荧光峰分别为 260、275 和 240 nm 处。

2. 明胶中的荧光杂质在水溶液中表现出两性性质和一定的氧化、还原能力,它可能为卟啉络合物或某种色素物质。

3. 荧光法用于明胶浓度分析是可行的。在浓度低于 1.5 g/L, 荧光强度与浓度有良好的线性关系, 检出量为 50 mg/L。温度升高, 荧光强度降低, pH 值影响荧光强度, 但 pH = 5~9 内影响不大。

### 参 考 文 献

- [1] Guo Yaojun(郭尧君). Fluorescent Experimental Technique and its Application in Molecular Biology(荧光试验技术及其在分子生物学中的应用), Science Press(科学出版社), Beijing(北京), 1979: 147
- [2] Lu Zixian(鲁子贤). Proteinic Chemistry(蛋白质化学), Science Press(科学出版社), Beijing(北京), 1981
- [3] Guo Yaojun(郭尧君). Fluorescent Experimental Technique and its Application in Molecular Biology(荧光试验技术及其在分子生物学中的应用), Science Press(科学出版社), Beijing(北京), 1979: 102
- [4] Ward A G(沃德 A G), Coutts A(考茨 A). The Sci. & Tech. of Gelatin(明胶的科学和工艺学), Light Industry Press(轻工业出版社), Beijing(北京), 1982
- [5] Zhang Longxiang(张龙翔), Zhang Tingfang(张庭芳), Li Lingyuan(李令媛). Experimental Methods and Techniques in Biological Chemistry(现代光学仪器分析与选编), People Education Press(人民教育出版社), Beijing(北京), 1981
- [6] Yan Fengxia(严凤霞), Wang Xiaomin(王筱敏). Selection of Modern Optical Instrumental Analysis(现代光学仪器分析选编), Normal University of East China in Shanghai Press(上海华东师范大学出版社), Shanghai(上海), 1992
- [7] Li Shanjun(李善君), Ji Caigu(纪才圭). Theory and Application of Macromolecular Chemistry(高分子化学原理及应用), Fudan University Press(复旦大学出版社), Shanghai(上海), 1993
- [8] Guo Yaojun(郭尧君). Fluorescent Experimental Technique and its Application in Molecular Biology(荧光试验技术及其在分子生物学中的应用), Science Press(科学出版社), Beijing(北京), 1979: 175
- [9] David. Dolphin, The Porphyrins, Vol. III, Physical Chemistry A, 1978

## Research of Fluorescence Characteristic of Photographic Gelatin

Xu Xuguo\*, Wang Juan, Sun Chongmin, Yan Tiantang

(Department of Applied Chemistry, University of Science and Technology of China, Hefei 230026)

**Abstract** The fluorescence characteristic of photographic gelatin have been researched with fluorescence analysis. Beside the 2 well-known fluorescence substance, phenylalanine and tyrosine, an unknown fluorescence impure substance has been found. Its maximum excitation wavelength is 240 nm and fluorescence peak is 395 nm. It have been inferred that this fluorescence substance in gelatin is one of metal porphyrins or other pigment substance.

**Key words** Photographic gelatin, Fluorescence impure substance, Porphyrin

\* To whom correspondence should be addressed.