

# 不同波长激发光对血清荧光光谱影响的实验研究

王乐新<sup>1, 2</sup>, 赵志敏<sup>1\*</sup>, 辛玉军<sup>1</sup>, 郭林峰<sup>1</sup>, 陈 会<sup>1</sup>

1. 南京航空航天大学, 江苏 南京 210016

2. 黑龙江八一农垦大学, 黑龙江 大庆 163319

**摘 要** 采用日本岛津荧光光度计 RF5301, 研究了血清的荧光光谱与激发光波长的关系。实验结果表明: 在不同波长的紫外光激励下, 血清产生的荧光光谱线型及峰值波长基本相同, 与激励光波长无关, 但荧光峰强度随激励光波长变化而变化。血清的荧光光谱有两个较强的荧光发射区, 其中第一个发射区处于 300~410 nm, 第二个发射区处于 410~530 nm。当激发光波长小于 310 nm, 荧光主要集中在第一发射区, 荧光峰位于 330 和 370 nm 处, 并产生竞争现象。当激发光波长大于 250 nm 时, 只出现 330 nm 处的荧光峰, 其最佳激励光波长为 300 nm; 当激发光波长大于 320 nm, 第一发射区的荧光变弱, 在第二发射区的荧光变强, 荧光峰位于 452 nm。此研究为血液的光谱特性研究提供了实验依据, 对光诱导荧光光谱诊断技术中激发光波长的选择具有一定的参考价值。

**关键词** 血清; 荧光光谱; 激发光

中图分类号: O433.4; Q63 文献标识码: A

DOI: 10.3964/j.issn.1000-0593(2008)10-2360-05

究血清荧光光谱时激发光波长的选择提供实验依据。

## 引 言

随着科学技术的发展, 生命科学成为当前科学技术领域中发展十分迅速、活跃的边缘学科, 是当今世界科技发展的热点之一。近年来, 随着光谱技术以及微弱信号检测技术的完善, 将光谱分析技术应用于生物组织的医学诊断, 成为一种应运而生的具有良好应用前景的技术。荧光光谱分析法由于其灵敏度高、选择性强、样品用量少, 并能提供较多的物理参数, 在研究中被大多数学者采用。正常组织和异常组织在一定的激发光作用下会发出不同的荧光, 这些荧光是生物组织更为本质的反映, 引起了各国生物医学光子学工作者的重视。由于血液在人体中的地位非常重要, 其状态的变化直接反映了人的生理状态, 光谱技术应用于血液诊断成为众多学者研究的热点。很多学者通过光谱诊断技术对生物组织进行了研究, 包括体液(如血液、唾液、尿液、汗液等)、皮肤、指甲等人体组织的光谱特性<sup>[1-9]</sup>, 采用的光谱方法也很多, 并且取得了一定成果。虽然国内外关于血液光谱研究报道较多, 但系统地研究不同激发光波长对血液荧光影响的报道并不多。本文选取不同波长的激发光作为激发光源, 对血清的荧光光谱随激发光波长的变化规律进行了探索, 为进一步研

## 1 荧光光谱的原理

荧光是一种光致发光现象, 当物质分子吸收了特征频率的光子, 就由原来的基态能级跃迁至电子激发态的各个不同振动能级。激发态分子与周围分子撞击消耗了部分能量, 迅速下降至第一电子激发态的最低振动能级, 并停留约  $10^{-9}$  s 之后, 直接以光的形式释放出多余的能量, 下降至电子基态的各个不同振动能级, 此时所发射的光即是荧光。产生荧光的必要条件是物质的分子必须具有能吸收激发光的结构, 通常是共轭双键结构, 而且该分子必须具有一定程度的荧光效率, 即荧光物质吸光后所发射的荧光量子数与吸收的激发光的量子数的比值。分子荧光辐射都是从第一电子激发态的最低振动能级向基态中各能级跃迁而产生的, 与分子受激时跃迁到哪一个高能级无关, 所以分子荧光光谱与激发入射光的波长无关。分子荧光光谱直接反映分子的结构信息。由于每种物质的能级结构不同, 因此, 在相同的激励条件下其发射荧光的特性也不同。任何发荧光的分子都具有两个特征光谱, 荧光激发光谱(Excitation spectrum)和荧光发射光谱(Emission spectrum), 它们是荧光分析法进行定性和定量分析

收稿日期: 2007-06-26, 修订日期: 2007-09-29

基金项目: 国家自然科学基金项目(10172043)和黑龙江省教育厅项目(10541155)资助

作者简介: 王乐新, 1967年生, 黑龙江八一农垦大学教授 e-mail: wanglexin@126.com

\* 通讯联系人 e-mail: zhaozhimin@nuaa.edu.cn

的基本参数和依据。

### 1.1 荧光激发光谱

固定合适的发射波长与狭缝宽度, 改变激发光的波长, 测量荧光强度的变化。以激发光波长为横坐标, 荧光强度为纵坐标作图, 即可得到荧光物质的激发光谱。激发光谱是不同激发波长的辐射引起物质发射某一波长的荧光的相对效率。激发光谱的形状与测量时选择的发射波长无关, 但其相对强度则与所选择的发射波长有关。发射波长固定在其峰位时, 所得激发光谱强度最大。荧光测定中, 通常选用激发光谱中最大的峰值波长来激发样品, 因为这可避免较短波长由于光子能量较大, 而使样品产生光分解。

### 1.2 荧光发射光谱(荧光光谱)

与激发光谱密切相关的是荧光光谱。保持激发光的波长和强度不变, 然后扫描发射波长, 以荧光强度对应着荧光波长画成的曲线称为该物质的荧光光谱, 即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。荧光光谱的形状与激发波长的选择无关(个别化合物例外)。但当激发波长选在远离激发峰的地方, 荧光强度低。

## 2 实验样品与方法

实验样品为血清样品, 由 30 岁健康男性受试者(各项生化指标正常)清晨空腹后静脉采血, 离心分离后得到, 用纯净水混合稀释后用于实验。采用日本岛津荧光光度计 RF5301 进行检测, 检测时用比色皿取被测样品 3 mL 进行测试。激发波长范围选用 220~385 nm, 采样间隔 0.5 nm, 中速自动扫描, 每隔 5 nm 扫描一次。

## 2 实验结果与分析

图 1 是 220~250 nm 波长的光激发产生的荧光光谱, 扫描缝宽均为 5 nm, 接收范围为 220~500 nm。图中 245 和 250 nm 的峰为激发光的倍频峰。

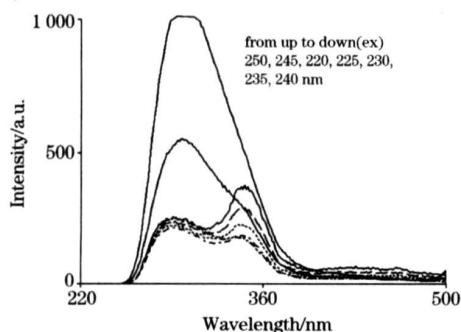


Fig 1 Fluorescence spectrum excited with 220~250 nm light wavelength

从图中可以看出: 血清的荧光主要分布在一个明显的区域, 波长范围是 300~410 nm。在 220~240 nm 范围内, 分别用不同波长的激发光照射血清, 可以看出 330 和 370 nm 处的光谱峰不随激发光波长的变化而改变, 根据荧光峰值不

会随激发光不同而改变, 可以确定 330 和 370 nm 处为荧光峰。

在 220~235 nm 范围内, 随着激发光波长的增加, 荧光强度减弱, 330 nm 处的荧光峰值  $I_{330}$  和 370 nm 处的荧光峰值  $I_{370}$  都减小且出现竞争, 370 nm 处的荧光峰值  $I_{370}$  减小比 330 nm 处的荧光峰值  $I_{330}$  要快, 在 240 nm 波长激发时 330 nm 处的荧光峰值超过了 370 nm 处的荧光峰值; 而在 240 nm 以后, 随着激发光波长的增大, 由于光源的激发能量的增加, 荧光强度有所增加, 但是  $I_{330}/I_{370}$  的值一直增大, 即 370 nm 处荧光相对 330 nm 处的荧光强度越来越低, 这导致了用 245 和 250 nm 波长的光激发血清只检测到一个荧光峰, 而随着它们相对强度的变化, 此荧光峰也发生了不同程度的移动, 245 nm 波长的光激发时荧光峰位于 329 nm, 250 nm 波长的光激发时荧光峰位于 331 nm。对 220~245 nm 波长激发的荧光光谱做  $I_{330}/I_{370}$  峰值比,  $I_{330}/I_{370}$  的值随激发波长的关系如图 2 所示, 图中连线为经过二次拟合后的曲线。

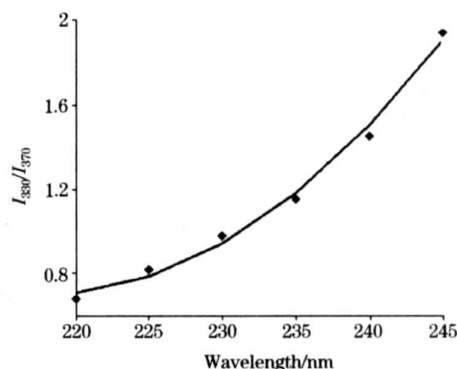


Fig 2 Ratio and the relationship between the excitation wavelength

图 3 是 250~290 nm 波长的光激发产生的荧光光谱, 激发缝宽为 5 nm, 发射缝宽为 3 nm, 接收范围为 265~500 nm。图中 300 nm 以下的小峰为激发光的倍频峰。比较图 1 和图 3 可以看出: 与 220~240 nm 波长的光激发的荧光光谱图相比较, 血清的荧光主要仍然分布在波长范围为 300~410 nm 的区域。用波长大于 250 nm 的光激发血清, 只能观察到一个荧光峰, 可能是由于随着激发波长的增加, 370 nm 处的荧光峰强度降低, 激发光波长大于 250 nm 时, 各波长处的

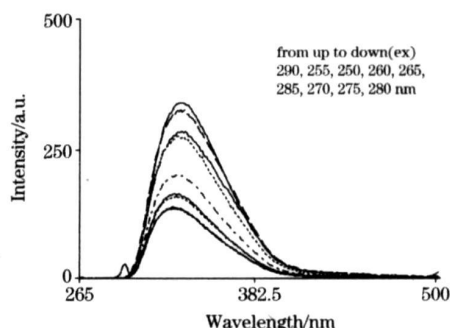


Fig 3 Fluorescence spectra excited with 250~290 nm light wavelength

荧光对总荧光的贡献基本稳定, 所以只能在 330 nm 附近观察到一个荧光峰值。

图 4 是 290~315 nm 波长的光激发产生的荧光光谱, 激发缝宽为 3 nm, 发射缝宽为 3 nm, 接收范围为 220~550 nm。图中几个中心波长在 290, 300, 305, 310 和 315 nm 处的强峰为激发光的倍频峰。从图 4 可以看出: 产生的荧光波长分布的范围基本没变, 用 300 nm 的光激发的荧光强度最大。但当用波长大于 315 nm 的光激发时荧光强度已经变得相对较弱。随着激发波长的增加, 荧光强度峰值产生了一定程度的红移, 从 290~315 nm 波长的激发光对应的荧光光谱的荧光峰分别位于 332, 336, 337, 340 和 352 nm 处。为了获得最佳荧光发射波长, 实验中对峰值为 330 和 370 nm 的荧光进行了多波段激发光谱扫描, 图 5 是 330 和 370 nm 波长的荧光激发光谱, 激发缝宽为 3 nm, 发射缝宽为 3 nm, 激发光范围为 220~500 nm。图中中心波长在 330 和 370 nm 处的强峰为激发光的倍频峰。

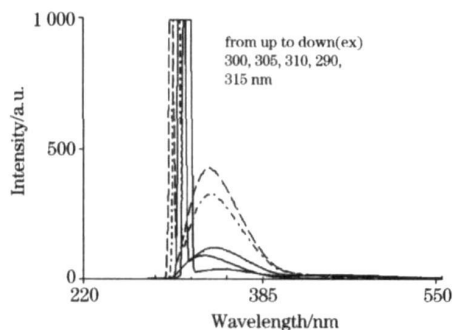


Fig 4 Fluorescence spectra excited with 290~315 nm light wavelength

从图 5 的荧光激发光谱可以得到: 在 220~320 nm 波长内的光均可以激发出荧光, 强度较大的范围为 220~230 nm, 240~270 nm 和 285~315 nm, 其中激发光谱峰值在 255 和 300 nm 处。从 220~320 nm 之间的大部分范围内, 荧光激发光谱在 330 nm 时的强度比 370 nm 时的强度大, 只有当激发波长处于 220~230 nm 之间时, 激发出的荧光在 370 nm 处的强度值比 330 nm 处的强度值大, 这个结论也验证了前面的实验结果。结果显示在 300 nm 出现吸收最大值, 可知波长为 330 nm 的荧光发射对应的最佳激发光波长为 300 nm。

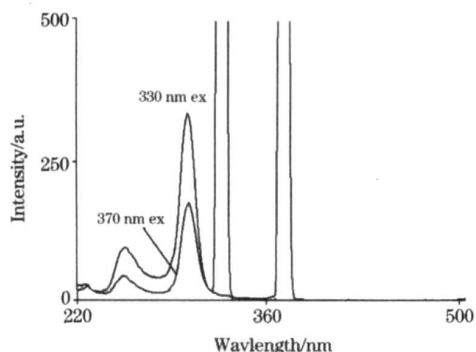


Fig 5 Fluorescence excitation spectra at 330 and 370 nm

图 6 是 320~335 nm 波长的光激发产生的荧光光谱, 激发缝宽为 5 nm, 发射缝宽为 5 nm, 接收范围为 220~600 nm。图中几个中心波长在 320, 325, 330, 335 nm 处的强峰为激发光的倍频峰。从图 6 中可以看出: 用 320~335 nm 的光激发血清, 在 410~530 nm 的波长范围内也存在一个明显的荧光区域。分别用不同波长的激发光(320, 325, 330, 335 nm)照射血清, 发现 452 nm 处的光谱峰不随激发光波长的改变而改变, 可以确定 452 nm 处的峰是荧光峰。当激发波长由 320 nm 逐渐改变为 335 nm, 在 356 nm 附近的峰向长波长方向移动, 依次变为 365, 372 和 378 nm, 根据拉曼光谱理论, 这种发射光谱线随激发光波长移动的峰是拉曼峰。

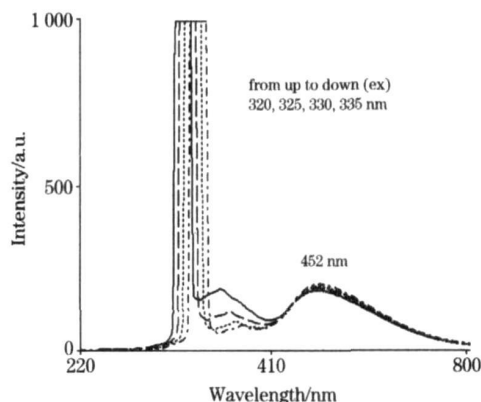


Fig 6 Fluorescence spectra excited with 320~335 nm light wavelength

图 7 是 425 nm 波长的荧光激发光谱, 激发缝宽为 5 nm, 发射缝宽为 5 nm, 激发光范围为 220~550 nm。图中中心波长在 425 nm 处的强峰为激发光的倍频峰。从荧光激发光谱可以看出: 在 220~230 nm 和 290~400 nm 范围内均可以激发出 452 nm 的荧光, 强度较大的激发光范围为 295~390 nm, 其中激发光谱峰值在 332 nm 处。

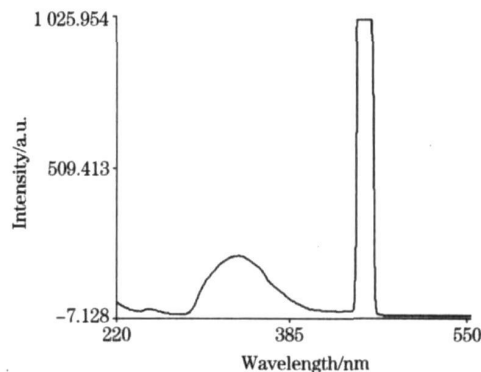


Fig 7 Fluorescence excitation spectra at 425 nm

图 8 是 340~385 nm 波长的光激发产生的荧光光谱, 激发缝宽为 5 nm, 发射缝宽为 5 nm, 接收范围为 400~650 nm。从图中可以看到: 用 340~385 nm 范围内波长的光激发血清, 依然可以检测到 452 nm 处荧光峰的存在。随着激发光波长的增加, 产生的荧光强度降低, 452 nm 处荧光峰峰值

也越来越小, 这点可以从 452 nm 荧光激发光谱图 7 中看出。当使用激发光的波长大于 370 nm 时, 可以观察到 Raman 峰的存在, 并且当激发光波长大于 380 nm 时相当明显。进一步研究发现: 当激发光的波长大于 390 nm, 血清的荧光越来越弱, 荧光峰和 Raman 峰的峰值也越来越低。

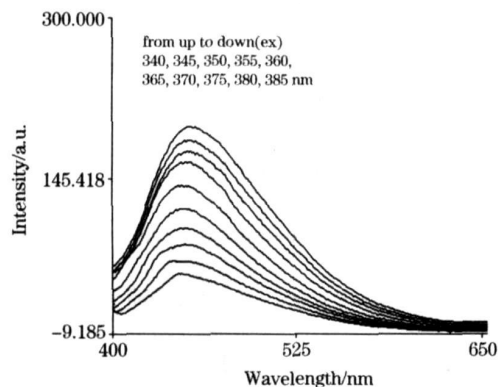


Fig 8 Fluorescence spectra excited with 340~ 385 nm light wavelength

由上述实验结果可知, 用 220~ 315 nm(最佳激发光波长为 300 nm)波长的紫外光激励下, 血清能够吸收激励光的能量并发出荧光, 荧光峰值波长分布在 300~ 410 nm 的波长区域, 荧光峰值波长为 330 nm; 用 320~ 385 nm 的紫外光激发血清, 血清能够吸收激励光的能量并发出在 410~ 530 nm 的波长范围内的荧光, 荧光峰值波长为 452 nm。根据物质吸收紫外光理论<sup>[10]</sup>, 当分子吸收一定的能量时, 就发生相应能级间的电子跃迁, 由于激发态不稳定, 电子先以非辐射跃迁的形式返回到第一激发态的最低振动能级, 继而以辐射跃迁的形式回到基态, 并发出荧光。荧光是分子从最低激发单重态的最低振转能级向基态跃迁产生的, 与分子被激发到那个振转能级无关, 所以在 220~ 385 nm 不同波长紫外光激励下,

血清产生的荧光光谱除强度外其线型及峰值波长基本相同, 与激励光波长无关。当电子从激发单重态的最低振转能级跃迁会基态时, 由于同一电子能级上又存在许多不同的振动能级和转动能级, 也就发出不同波长的荧光, 形成 330 和 452 nm 处的展峰。同时由于热辐射等效应, 也会影响荧光的波长, 这就形成了 300~ 530 nm 的荧光宽谱带。

### 3 结 论

通过采用不同波长的紫外光照射血清, 初步得出了血清发射荧光的结论如下。

(1) 血清的激发荧光强度与激发光波长紧密相关, 当激发光波长位于紫外光波段时, 血清会产生很强的荧光, 而当激发光波长接近可见光波段时, 血清的荧光现象不明显。

(2) 血清在不同波长的激发光激励下产生不同的荧光光谱。由实验结果可以发现血清的荧光光谱主要有两个较强的区域, 可以称为血清的荧光发射区, 其中第一个发射区处于 300~ 410 nm, 第二个发射区处于 410~ 530 nm。当激发光波长小于 310 nm, 荧光主要集中在第一发射区, 荧光峰位于 330 和 370 nm 处, 随着激发光波长的增加, 370 nm 处的荧光相对于 330 nm 处的荧光强度逐渐减小, 以致当激发光波长大于 250 nm 时只能看到 330 nm 处的一个荧光峰; 当激发光波长大于 320 nm, 第一发射区的荧光变弱, 在第二发射区的荧光已经非常明显, 荧光峰位于 452 nm。

(3) 血清能吸收紫外光并发射荧光, 荧光中心波长在 330 和 452 nm 处, 其最佳激励光波长为 300 nm。不同波长紫外光激励下, 血清产生的荧光光谱线型及峰值波长基本相同, 与激励光波长无关, 但荧光峰强度随激励光波长变化而变化。

以上只是初步的实验性工作, 其微观机制和理论解释有待进一步探索。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] ZHAO Zhǐ mǐn, CHEN Yǔ mǐng, YU Xiǎo lěi( 赵志敏, 陈玉明, 俞晓磊). Spectroscopy and Spectral Analysis( 光谱学与光谱分析), 2003, 23( 5): 922.
- [ 2 ] WANG Lě xīn, ZHAO Zhǐ mǐn, XIN Yǔ jūn, et al( 王乐新, 赵志敏, 辛玉军, 等). Journal of Luminescence( 发光学报), 2004, 25( 4): 425.
- [ 3 ] Kollias Nikiforos, Zonios George, Stamatas Georgios N. Vibrational Spectroscopy, 2002, 28: 17.
- [ 4 ] ZHAO Zhǐ mǐn, GUO Lǐ fēng, YU Xiǎo lěi, et al( 赵志敏, 郭林峰, 俞晓磊, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis( 光谱学与光谱分析), 2005, 25( 12): 2056.
- [ 5 ] ZHAO Zhǐ mǐn, XIN Yǔ jūn, WANG Lě xīn, et al( 赵志敏, 辛玉军, 王乐新, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis( 光谱学与光谱分析), 2008, 28( 1): 138.
- [ 6 ] ZHU Wēi huá, ZHAO Zhǐ mǐn, ZHENG Mǐn, et al( 朱卫华, 赵志敏, 郑 敏, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis( 光谱学与光谱分析), 2007, 27( 12): 2531.
- [ 7 ] WANG Lě xīn, ZHAO Zhǐ mǐn, YAO Hōng bīng, et al( 王乐新, 赵志敏, 姚红兵, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis( 光谱学与光谱分析), 2002, 22( 6): 980.
- [ 8 ] Digambara Patra, Mishra A K. Trends in Analytical Chemistry, 2002, 21( 12): 787.
- [ 9 ] Dubayova Katarina, Kusnir Jaroslav, Podracka Ludmila. Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 2003, 55: 111.
- [ 10 ] WANG Yǎn jī, SONG Zēng fú( 王彦吉, 宋增福). Spectra Analysis and Chromatogram Analysis( 光谱分析和色谱分析). Beijing: Peking University Press( 北京: 北京大学出版社), 1995. 107

## Experimental Investigation of Fluorescence Spectra of Serum Excited with Different Wavelength Light

WANG Lě xīn<sup>1, 2</sup>, ZHAO Zhǐ mǐn<sup>1\*</sup>, XIN Yǔ jūn<sup>1</sup>, GUO Lǐ fēng<sup>1</sup>, CHEN Huǐ<sup>1</sup>

1. Nanjing University of Aeronautics and Astronautics, Nanjing 210016, China

2. Heilongjiang August First Land Reclamation University, Daqing 163319, China

**Abstract** In the present paper the fluorescence spectra of the blood serum excited with different wavelength were measured with the fluorescence photometer RF5301 (SHIMADZU) made in Japan. The relationship between the fluorescence spectra of the serum and the wavelength of the excitation light was studied during the experiment. The experimental results show that the linetype and peak wavelength of the fluorescence spectra of serum excited by ultraviolet radiation with different wavelength are almost the same, and they do not depend on the excitation wavelength. But the fluorescence peak value changes with the excitation wavelength. There are two high intensity emission intervals in the fluorescence spectra. One of these is from about 300 nm to 410 nm, and the other is below 310 nm. The fluorescence spectra are mostly centralized in the first interval, and the wavelengths of fluorescence peaks were found around two locations: one is near 330 nm and the other is near 370 nm. At this time the strife phenomena occur. When the excitation wavelength is about 250 nm or higher, the fluorescence peak only occurs at 330 nm, and the optimal excitation wavelength is 300 nm. While the wavelength is greater than 320 nm, the fluorescence intensity of the first interval begins to fall, while that of the other augments. And at this time the peak of wavelength of fluorescence is 452 nm. This study provides the experimental foundations for advanced study and applications of the characteristics of fluorescence spectrum of blood serum, and also offers the references to the wavelength selection of excitation light in the application of the photo induced fluorescence spectra diagnostic technology.

**Keywords** Serum; Fluorescence spectrum; Excitation light

( Received Jun. 26, 2007; accepted Sep. 29, 2007)

\* Corresponding author