

## 赤藓红荧光激发光谱突变的研究

马超群<sup>1</sup>, 陈国庆<sup>1\*</sup>, 魏柏林<sup>1</sup>, 史院平<sup>1</sup>, 谷玲<sup>1</sup>, 高淑梅<sup>1</sup>, 朱拓<sup>1, 2</sup>

1 江南大学理学院, 江苏 无锡 214122

2 河海大学能源与电气学院, 江苏 南京 210098

**摘要** 实验测量了 10, 20, 30, 40, 50 和 60  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  六种浓度赤藓红溶液的荧光激发光谱和吸收光谱。发现在浓度为 10 和 20  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  时, 其荧光激发光谱在 530 nm 处会出现一个明显的激发峰, 而当溶液浓度超过 30  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  后, 荧光激发光谱线型会发生突变, 530 nm 处成为谷值位置, 并在 530 nm 两侧出现两个新的激发峰。对比各种浓度赤藓红溶液的吸收光谱, 发现其与荧光激发光谱的变化并不一致, 在 530 nm 处均为吸收峰, 无突变现象。通过数学计算及一系列对比实验的验证, 确定是赤藓红的吸收特性以及光谱测量因素共同导致了其激发光谱的突变。研究结果可为进一步探讨赤藓红的理化特性提供指导, 为研究物质荧光激发光谱的突变行为提供参考, 并能够促进对荧光激发光谱的正确认识和光谱测量方式的改进。

**关键词** 赤藓红; 荧光激发光谱; 吸收光谱; 突变

中图分类号: O657.3 文献标识码: A DOI: 10.3964/j.issn.1000-0593(2011)04-1065-04

## 引言

分子荧光光谱分析法作为一种常用的对物质进行定性或定量分析的方法, 具有样品用量少、灵敏度高、快速简便等优点<sup>[1]</sup>。随着实验仪器的发展和新技术的引进, 使其在物质鉴定及测量<sup>[2-4]</sup>、多组分混合物分析<sup>[5-8]</sup>、生物医学分析<sup>[9-11]</sup>等领域得到广泛应用。

荧光光谱通常可分为发射光谱和激发光谱。其中荧光激发光谱是固定发射波长测得的荧光光强随激发波长变化的曲线, 反映了不同激发光对某一波长荧光的相对效率, 可用于鉴别物质, 同时也是荧光实验中选择最佳激发波长的主要依据<sup>[12, 13]</sup>。荧光激发光谱与吸收光谱有着密切的联系, 理论上经校正的荧光激发光谱应与吸收光谱相似。但是由于光源的能量分布、单色器的透射系数和检测器的敏感度都具有波长因素, 使得荧光激发光谱和吸收光谱的形状大多存在差异<sup>[14]</sup>。

赤藓红是一种常用的食用合成色素, 实验中我们发现, 其荧光激发光谱的线型会随浓度的增加产生突变。当溶液浓度大于一定值后, 荧光激发光谱与吸收光谱的变化不一致, 在吸收光谱峰值对应波长位置处, 荧光激发光谱反而呈现谷

值。目前对于荧光激发光谱及其突变现象的研究鲜有报道, 苗笛等曾对萘的正己烷溶液的荧光激发光谱突变行为做出分析, 认为是由于固定槽对荧光的遮挡引起的<sup>[15]</sup>。但我们发现在固定槽并未遮挡光路的情况下, 荧光激发光谱的突变现象依旧会发生。经分析并通过数学计算及对比实验验证, 我们认为这是由于激励光在比色皿前端被强烈吸收, 而探测器主要接收来自比色皿中部的荧光, 从而导致了荧光激发光谱的突变。研究结果一方面促进了对荧光激发光谱的正确认识, 为其他物质荧光激发光谱突变现象的研究提供了参考; 另一方面也可以为赤藓红的鉴别测定、分子结构和发光机理分析以及作为食用合成色素的毒理学研究提供正确指导。

## 1 赤藓红溶液的荧光激发光谱

取国家标准物质研究中心提供的 1  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  赤藓红标准溶液, 用超纯水将其配制成 10, 20, 30, 40, 50 和 60  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  六种浓度溶液。选用一号比色皿 42 mm × 10 mm × 10 mm (高 × 光路长 × 光路宽), 在 Roper Scientific 公司生产的 SP-2558 多功能光谱测量系统上测得样品的荧光发射光谱, 发现赤藓红溶液的峰值发射波长在 555 nm 附近, 因此我们固定发射波长为 555 nm, 测量各种浓度赤藓红溶液的荧光

收稿日期: 2010-07-16, 修订日期: 2010-10-22

基金项目: 江苏省自然科学基金项目(BK2009066), 高等学校博士学科点专项科研基金项目(200802950005)和江苏省教育厅项目(JH08-18, CX08B-088Z)资助

作者简介: 马超群, 1987年生, 江南大学理学院硕士研究生 e-mail: machaoqun0512@163.com

\* 通讯联系人 e-mail: cgq2098@163.com

激发光谱,如图 1 所示。测量示意图如图 2,图中实线为一号比色皿,虚线为比色皿固定槽,固定槽对光线均无遮挡作用。

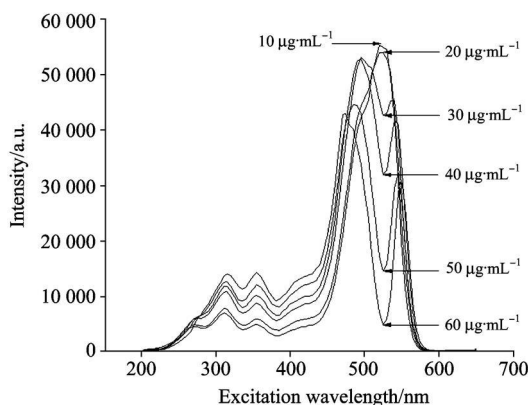


Fig 1 Fluorescence excitation spectra of erythrosine solutions

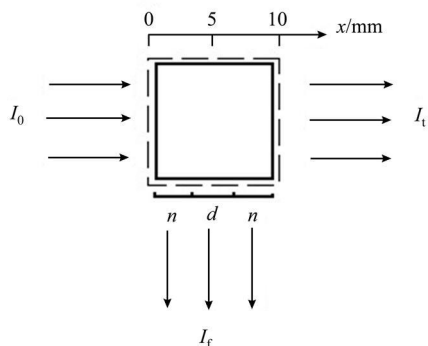


Fig 2 Schematic diagram of fluorescence measurement

由图 1 我们可以看到,在 200~450 nm 波长范围内,各浓度赤藓红溶液的荧光激发光谱线型相互一致,峰值位置相对固定,仅在相对荧光光强上有所差别。对于浓度为 10 和  $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的赤藓红溶液,其荧光激发光谱在 530 nm 处出现一个较强的激发峰;当溶液浓度增大到  $30 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  时,荧光激发光谱线型发生突变,530 nm 处由峰值位置突变为谷值位置,同时在 530 nm 两侧出现两个新的激发峰;随着溶液浓度的进一步增大,谷值位置保持在 530 nm 处不变,新产生的两个激发峰向两侧移动,并且峰谷比不断增大。

## 2 荧光激发光谱突变的研究

### 2.1 赤藓红溶液的吸收光谱

荧光激发光谱和吸收光谱反映的都是物质基态与激发态间能级结构的信息,两者之间存在密切的联系。当激发光波长与物质内部能级差相匹配时将会被强烈吸收,对应吸收光谱的吸收峰;此时处于激发态的电子数最多,发生辐射跃迁所发出的荧光也最强,对应激发光谱的激发峰。理论上,某种化合物的荧光激发光谱的形状应与其吸收光谱相同。因而测得物质的吸收光谱,可对其荧光激发光谱的研究提供帮助。

我们在 Avantes AvaSpec2048 吸收光谱仪上分别测量了上述六种浓度赤藓红溶液的吸收光谱,结果如图 3 所示。

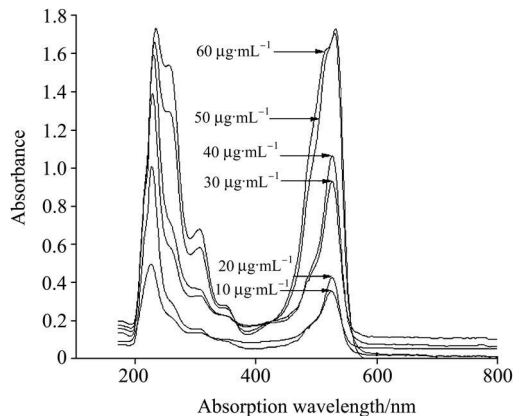


Fig 3 Absorption spectra of erythrosine solutions

由图 3 可以看到,六种浓度溶液的吸收光谱线型基本一致,在 530 nm 处均出现吸收峰,并且吸收峰值随浓度递增,没有突变现象产生。因此可排除其荧光激发光谱是因物质分子结构的改变而引起的突变。

### 2.2 计算及分析

由前述讨论我们知道,荧光激发光谱峰值位置处通常吸收也是最强,另外溶液的吸光度与溶液浓度呈递增关系。当溶液浓度较高时,激励光被比色皿前端的溶液强烈吸收,发出较强荧光;当激励光到达比色皿中部时,光强已较弱,所激发出的荧光也较弱。我们分析认为,可能由于探测器主要只接收来自比色皿中部的的光信号,从而导致了在测量较高浓度溶液时,荧光激发光谱发生突变现象。

为此我们设计了一组实验,选用二号比色皿  $42 \text{ mm} \times 5 \text{ mm} \times 10 \text{ mm}$  (高  $\times$  光路长  $\times$  光路宽),将比色皿改造成仅露一条狭缝透光,将狭缝对准固定槽的不同位置,以 510 nm 为激发波长,分别测得  $60 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  赤藓红溶液的发射光谱,记录其峰值光强,结果如表 1 所示。发现狭缝位于光路正中央 ( $x = 5$ ) 时,探测器接收到的荧光最强;当狭缝位置偏离中心 1 mm ( $x = 4$ ) 时,荧光强度迅速减弱到中央位置时的 2.4%;在狭缝位于固定槽最边缘 ( $x = 0$ ) 时,峰值光强甚至只有中央位置时的 0.9%。

Table 1 Relationship between slit position and fluorescence peak intensity

狭缝位置 $x/\text{mm}$	0	1	2	3	4	5
峰值光强/a.u.	573	644	739	817	1578	65162

由以上分析我们可知,探测器能够接收到的主要是来自比色皿中央区域所发的荧光,设这段区域的宽度为  $d$ ,比色皿宽度为  $2n + d$ ,如图 2 所示。那么距比色皿边缘距离在  $n$  以内区域所发的荧光对探测器的影响可忽略不计,由此我们可以用数学公式表示出荧光激发光谱。

因为吸收光强  $I_a$  等于入射光强  $I_0$  与透射光强  $I_t$  的差值,于是  $I_f = I_0 - I_t$ 。由比尔-郎伯定律  $I_t/I_0 = e^{-abc}$ ,吸收光强

可表示为  $I_a = I_0(1 - e^{-bc})$ , 式中  $a$  为吸光系数,  $b$  为光穿过溶液的厚度,  $c$  为溶液浓度。

探测器主要接收的这段区域所吸收的光强  $I_a$  可表示成

$$I_a = I_0[1 - e^{-a(n+d)c}] - I_0[1 - e^{-ac}] = I_0 e^{-ac} [1 - e^{-adc}] \quad (1)$$

摩尔消光系数  $\epsilon$  与吸光系数  $a$  之间存在关系  $a = 2.303\epsilon$ 。

所以荧光激发光谱可表示为

$$I_f(\lambda) = KY_f I_0 e^{-2.303\epsilon\lambda n} [1 - e^{-2.303\epsilon\lambda(d)c}] \quad (2)$$

其中,  $K$  为与仪器有关的常数,  $Y_f$  为物质的荧光量子产率。

借鉴文献[15]中通过求导讨论激发光谱极值点位置及性质的方法, 我们将(2)式两边同时对  $\lambda$  求导, 得到

$$\frac{dI_f(\lambda)}{d\lambda} = -2.303cK Y_f I_0 n e^{-2.303\epsilon\lambda n} - (n+d)e^{-2.303\epsilon\lambda(n+d)c} \frac{d\epsilon(\lambda)}{d\lambda} \quad (3)$$

令  $\frac{dI_f(\lambda)}{d\lambda} = 0$ , 可得到两类解。

第一类解:  $\frac{d\epsilon(\lambda)}{d\lambda} = 0$ , 表示吸收光谱极值位置处, 荧光激发光谱同样取到极值。

第二类解:  $\epsilon(\lambda) = \frac{\ln(n/n+d)}{-2.303dc}$ , 表示荧光激发光谱出现

一些吸收光谱上并不存在的新的极值点。

设吸收光谱峰值波长为  $\lambda_m$ , 通常在峰值位置处, 摩尔消光系数也最大。于是当  $\epsilon(\lambda_m) < \frac{\ln(n/n+d)}{-2.303dc}$  时, 第二类解不

存在, 当  $\epsilon(\lambda_m) > \frac{\ln(n/n+d)}{-2.303dc}$  时, 第二类解存在。

为讨论第一类解对应极值点的性质, 再将(2)式对  $\lambda$  求二阶导数得到

$$\frac{d^2 I_f(\lambda)}{d\lambda^2} = 5.304c^2 K Y_f I_0 n^2 e^{-2.303\epsilon\lambda n} - (n+d)^2 e^{-2.303\epsilon\lambda(n+d)c} \left[ \frac{d\epsilon(\lambda)}{d\lambda} \right]^2 - 2.303cK Y_f I_0 n e^{-2.303\epsilon\lambda n} \frac{d^2 \epsilon(\lambda)}{d\lambda^2} \quad (4)$$

由于  $\frac{d\epsilon(\lambda)}{d\lambda} \Big|_{\lambda_m} = 0$ , 可得:

当  $\epsilon(\lambda_m) < \frac{\ln(n/n+d)}{-2.303dc}$  时,  $\frac{d^2 I_f(\lambda)}{d\lambda^2} \Big|_{\lambda_m}$  与  $\frac{d^2 \epsilon(\lambda)}{d\lambda^2} \Big|_{\lambda_m}$  同

号, 此时吸收光谱与荧光激发光谱的极值点数目相同, 且极值点性质相同。

当  $\epsilon(\lambda_m) > \frac{\ln(n/n+d)}{-2.303dc}$  时,  $\frac{d^2 I_f(\lambda)}{d\lambda^2} \Big|_{\lambda_m}$  与  $\frac{d^2 \epsilon(\lambda)}{d\lambda^2} \Big|_{\lambda_m}$  异

号, 此时在波长  $\lambda_m$  处, 吸收光谱和荧光激发光谱都取得极值, 但极值点性质相反, 吸收光谱为峰值时, 激发光谱为谷值。

综上所述可知, 存在一个阈值浓度当  $c =$

$\frac{\ln(n/n+d)}{-2.303d\epsilon(\lambda_m)}$ , 当溶液浓度大于阈值浓度时, 荧光激发光谱线型将发生突变。

### 2.3 实验验证

为验证数学计算的正确性, 我们又设计一组实验。首先用一号比色皿, 如图 4(a) 摆放, 测量  $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  赤藓红溶液的荧光激发光谱, 然后用二号比色皿替代一号比色皿, 并将其分别放在固定槽边缘和正中位置处, 如图 4(b) 和图 4(c), 测量相同浓度赤藓红溶液的荧光激发光谱。将三种情况下的激发光谱作对比, 如图 5。

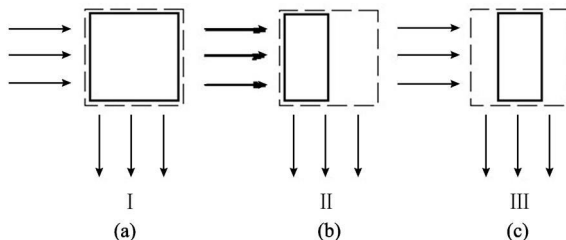


Fig 4 Three different measuring conditions

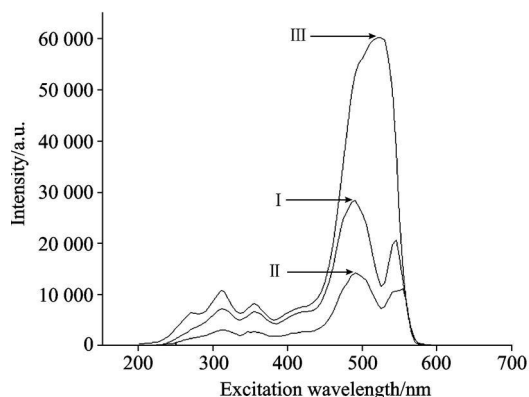


Fig 5 Comparison of excitation spectra of erythrosine under different conditions

将 I 与 II 对比, 在 I 和 II 情况下, 光在到达中心位置时都被强烈吸收, 因而它们的激发光谱都发生突变现象, 在 530 nm 处都取得谷值。因为 I 位于中心区域的面积较 II 大, 所以相对荧光光强也较强。

将 I 与 III 对比, 在 I 和 III 情况下, 比色皿都是沿光轴对称摆放, 但是由于 III 中用到的是二号比色皿, 根据阈值浓度公式, 由于  $n$  值的减小使阈值浓度升高至  $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  以上, 因此其荧光激发光谱并未发生突变, 在 530 nm 处仍为峰值。同时, 根据(2)式, 由于  $n$  值的减小, 使得 III 情况下得到的荧光激发光谱光强也增大。

将 II 与 III 对比, 在 II 与 III 中用到的都是二号比色皿, 它们从侧面发出的荧光的强度应该相同, 但由于摆放位置的不同, 使得 II 情况下, 相对荧光光强较弱, 同时其荧光激发光谱发生突变现象。再次证明探测器主要接收固定槽中央区域所发出的荧光, 并证实这是导致赤藓红溶液的荧光激发光谱发生突变的主要原因。

## 3 结论

赤藓红溶液的荧光激发光谱线型会随着浓度的增加发生

突变, 我们通过数学计算较好地解释了这一现象, 并由一系列实验验证了其正确性。证明在光谱测量因素的影响下, 赤藓红的摩尔消光系数决定了存在一个突变阈值浓度, 当溶液浓度大于阈值浓度时, 赤藓红溶液的荧光激发光谱将发生突变现象。同时我们预测, 摩尔消光系数和浓度满足一定条件

的其他物质, 在同一仪器上测得的荧光激发光谱也会发生类似突变现象; 如果改进光谱仪的设计, 使探测器接收光的范围扩大到整个比色皿, 那么荧光激发光谱随浓度增加而发生突变的现象将随之消失。

## References

- [ 1 ] CHEN Guoqing, WU Yamin, WEI Baolin, et al(陈国庆, 吴亚敏, 魏柏林, 等). Acta Physica Sinica(物理学报), 2010, 59(7): 5100.
- [ 2 ] Wang XM, Wu HL, Nie JF, et al. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2009, 37(6): 811.
- [ 3 ] WEI Baolin, CHEN Guoqing, WANG Jun, et al(魏柏林, 陈国庆, 王 俊, 等). Journal of Optoelectronics • Laser(光电子 • 激光), 2009, 20(12): 1618.
- [ 4 ] Jana S, Jana T, Pavel M. Food Chemistry, 2009, 117(3): 491.
- [ 5 ] Rita Y, Rachad S, Bilal N, et al. Food Chemistry, 2009, 115(1): 304.
- [ 6 ] Marcelo F P, María S D N, Maíra E C, et al. Talanta, 2006, 69(5): 1265.
- [ 7 ] Tohru S, Hiroto I, Masataka H. Talanta, 2009, 79(2): 177.
- [ 8 ] Rodríguez N, Ortiz M C, Sarabia L A, et al. Analytica Chimica Acta, 2010, 657(2): 136.
- [ 9 ] Sahar A, Boubellouta T, Lepetit J, et al. Meat Science, 2009, 83(4): 672.
- [ 10 ] Natalia B, Roman U, Konstantin V, et al. Medical Laser Application, 2009, 24(4): 247.
- [ 11 ] Manisha S, Renu S, Nivedita K G. Analytical Biochemistry, 2009, 394(2): 186.
- [ 12 ] LU Lu, SU Rongguo, HU Xupeng, et al(卢 璐, 苏荣国, 胡序朋, 等). Chinese Journal of Lasers(中国激光), 2007, 34(8): 1115.
- [ 13 ] SHANG Leping, YANG Renjie(尚丽平, 杨仁杰). In Situ Fluorescence Spectrum Technology and Its Application(现场荧光光谱技术及其应用). Beijing: Science Press(北京: 科学出版社), 2009. 6.
- [ 14 ] XU Jirgou, WANG Zuirben(许金钩, 王尊本). Fluorescence Analysis(荧光分析法). Beijing: Science Press(北京: 科学出版社), 2006. 7.

## Study on Saltation of Fluorescence Excitation Spectra of Erythrosine

MA Chaosun<sup>1</sup>, CHEN Guoqing<sup>1\*</sup>, WEI Baolin<sup>1</sup>, SHI Yuanping<sup>1</sup>, GU Ling<sup>1</sup>, GAO Shumei<sup>1</sup>, ZHU Tuo<sup>1, 2</sup>

1. School of Science, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

2. School of Energy and Electric, Hefei University, Nanjing 210098, China

**Abstract** The fluorescence excitation spectra and absorption spectra of six kinds of erythrosine solutions with concentrations of 10, 20, 30, 40, 50 and 60  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  were experimentally measured. It was found that the fluorescence excitation peaks are both located at 530 nm significantly when the concentrations of erythrosine solutions are 10 and 20  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ . However, the linetype saltation of fluorescence excitation spectrum occurs as the concentration of erythrosine solution is above 30  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ . The valley is located at 530 nm and two new peaks appear at both flanks of the valley. Compared with fluorescence excitation spectra, the absorption spectra of erythrosine solutions are without saltation and the peaks are all located at 530 nm. According to calculations and a series of contrast experiments, it was demonstrated that the absorption characteristic of erythrosine and the spectral measurement mode conspire to cause the saltation of fluorescence excitation spectra. The results can provide guidance for further research on physical and chemical properties of erythrosine, and offer help and reference for study on saltation behavior in fluorescence excitation spectra and improvement in spectral measuring mode.

**Keywords** Erythrosine; Fluorescence excitation spectra; Absorption spectra; Saltation

(Received Jul. 16, 2010; accepted Oct. 22, 2010)

\* Corresponding author