

# 稀土离子电子振动光谱高灵敏检测技术 ——稀溶液中氨基酸与稀土的配位研究\*

李润华 孟建新 曾学然 周达君 周建英\*\*

(中山大学超快速激光光谱学国家重点实验室 广州 510275)

**提要** 叙述了稀土离子电子振动光谱的时间分辨高灵敏检测技术,并利用该技术研究了铽离子与精氨酸在稀溶液中的配位,定量地确定了水配位随溶液 pH 值的改变而发生的变化。结果表明,当  $\text{pH} > 1$  时,精氨酸可以参与铽离子配位,随着 pH 值的增加配位逐渐加强。

**关键词** 电子振动光谱,配位研究,高灵敏检测

## 1 引 言

稀土元素具有重要的生物功能,因而在农业、养殖业以及医学中获得了越来越广泛的应用<sup>[1]</sup>,这些应用使得稀土元素通过食物链或者药物进入人体而对人类健康产生直接的影响。因而有必要对稀土元素的生物功能、与生物体系相互作用的机理及其毒性进行深入研究,为稀土农用和医用的安全性、有效性提供科学的依据。

目前有关稀土生物功能的研究主要是从宏观角度进行的,只能提供有关稀土宏观生物效应的一些实验数据,从细胞水平和分子水平进行的研究较少,也不够深入。而要从分子水平深入研究稀土元素的生物功能、机理及毒性,就必须了解稀土离子在生物分子中的结合部位,也就是它的局部配位结构,从而了解稀土对生物分子功能的影响。

在生物体中,水占很大的比例,而且发挥着重要的生物功能,很多的生物效应都是在水溶液中发生的;另一方面,生物体中稀土的含量是很小的,为了更接近于生物体中的真实情形,在稀溶液中研究稀土与生物分子的相互作用就显得极为重要。然而受样品形态和检测灵敏度的限制,以前还没有一种方法能够很好地用于研究稀溶液中稀土离子与生物分子的配位。光谱学的方法具有不受样品形态限制和检测灵敏度高的优点,因此,发展稀土离子的光谱探针技术对于研究稀土元素的生物功能、机理及毒性,促进稀土农用和医用,回答其安全性等问题都具有非常重要的意义。

电子振动光谱是由稀土离子与它的第一配位层的基团通过电子间库仑相互作用而产生的一种协同跃迁。表现在它们两者能够同时吸收或者发射一个光子,稀土离子在电子能级之间发

\* 国家自然科学基金、广东省自然科学基金以及国家教委跨世纪优秀人才基金资助项目。

\*\* 通讯联系人。

收稿日期: 1998-01-07; 收到修改稿日期: 1998-04-13

生跃迁而配体则在振动能级之间发生跃迁<sup>[2]</sup>。由电子振动光谱的特征可以确定稀土离子第一配位层配体的种类和数目,从而确定其局部的配位结构<sup>[3~5]</sup>。

由于稀土离子的  $f-f$  电子跃迁是宇称禁阻的<sup>[6,7]</sup>,因此,其振子强度相比于那些宇称允许跃迁的是很小的,而电子振动光谱的振子强度又要比稀土离子电子跃迁的振子强度弱两到三个数量级。因此,探测电子振动光谱是比较困难的,要求检测系统具有很高的灵敏度。特别是在生物样品中,由于有些生物分子(或基团)本身就具有很强的荧光,再加上杂质的荧光和样品的散射光,会形成一个很强的本底,因此有必要采取一些必要的措施来消除本底光信号的干扰,得到清晰的电子振动光谱信号。

## 2 实 验

### 2.1 实验装置

实验由一台脉冲准分子激光器泵浦的染料激光器作为激发光源,染料激光脉冲的脉宽和光谱宽度(FWHM,全半高宽)分别为 10 ns 和  $0.18 \text{ cm}^{-1}$ ,单脉冲能量一般在 0.2 mJ 左右,激光能量由经过校准的一台能量计监测。样品荧光由两个  $f/0.8$  和  $f/3.5$  的石英透镜收集并准直到一台光栅单色仪的入射狭缝上,在两个石英透镜之间放置有一块截止波长为 510 nm 的高通滤光片。光电倍增管(PMT)(R928 型)产生的信号经一台光子计数器处理并由计算机采样和作数据处理。考虑到发射光谱的频率分辨能力取决于实验所用单色仪的分辨能力,而要得到较高的分辨能力,单色仪的入射和出射狭缝必须开得足够小,这样将限制整个系统的探测灵敏度,因此我们选择用激发光谱来进行研究。

### 2.2 热噪声和杂散光的降低

为了提高系统的检测灵敏度,必须降低杂散光和 PMT 的热噪声。为此将激光的入射方向设为垂直方向,使其与单色仪的狭缝平行,以提高荧光的收集效率;特别设计了一个长的样品池以减小杂散光;用 EMI 公司生产的磁屏蔽套对 PMT 进行屏蔽以减小空间的电磁干扰;用液氮冷却 PMT 至  $-50^\circ\text{C}$  降低其热噪声,较用电热方式致冷的商品化 PMT 冷却装置( $-20^\circ\text{C}$ )时降低了 60 倍。

### 2.3 非稀土荧光本底的扣除——时间分辨技术

为了消除非稀土荧光和散射光的干扰,我们采取了时间分辨技术,利用稀土离子荧光寿命较长(一般都能够达到微秒甚至毫秒量级<sup>[8]</sup>),而非稀土荧光寿命较短的特点,以纳秒脉冲激光作为激发光源,对施加在 PMT 上的高压实现延时控制,即在非稀土荧光维持的时间内(微秒量级),PMT 上不加高压,直至其完全消失以后,再在 PMT 上加上高压,以消除其背景干扰。由于技术上的原因,太高的电压的开关容易引起较大的电冲击,而且开关管的耐压值也必须很高,因此实际上,我们仅仅控制 PMT 的第一、第二倍增级上的电压(与阴极的电压差为 200 V)来实现对 PMT 增益的控制。具体控制电路示意图如图 1 所示。图中所用开关管可耐压 300 V, PMT 通常处于低增益状态,直到激光脉冲到来 20  $\mu\text{s}$  之后再处于正常工作(即高增益)状态 2 ms(可调),然后再次处于低增益状态。采用这一技术之后在很大程度上克服了非稀土荧光和杂散光造成的本底,同时还能够减小对样品纯度的限制。

实验对比了采用和不采用这一高压控制电路时记录到的稀土离子荧光信号和染料荧光本底的强度之比。我们在  $2.5 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$  的铽溶液样品中人为地加入微量的染料溶液,记录的

实验结果如图 2 所示, 图 2 (a) 为没有采用电路时记录的电子峰, 在 487 nm 处信号与本底的比大约为 95/62, 而图 2 (b) 则是采用了这一电路之后记录的结果。可以看到, 本底降低了 8.2 倍, 而信号则没有发生明显的降低, 在 487 nm 处, 信号与本底之比为 91/7.5, 较原来提高了 8 倍左右。

采取这些措施之后, 我们目前能够探测到浓度为  $2.5 \times 10^{-7}$  mol/L 的水溶液中铽离子的  ${}^7F_6-{}^5D_4$  电子跃迁, 能够探测到浓度为  $2.5 \times 10^{-5}$  mol/L 的水溶液样品中的电子振动跃迁。基本上能够满足研究简单的生物分子与稀土离子配位的需要。如果采取进一步的措施, 样品的浓度还可以降低两到三个数量级, 以满足研究更大的稀土生物分子体系的要求。

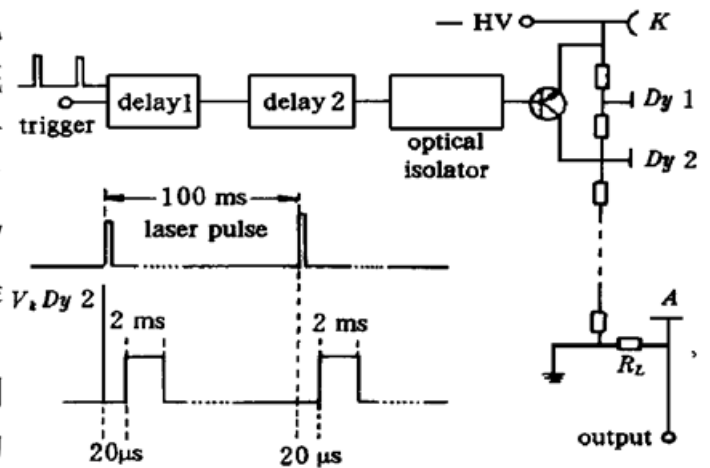


图 1 光电倍增管第二倍增级与光阴极之间的电压与时间的关系

Fig. 1 Time-dependence of the voltage between the second dynode and the cathode of a PMT

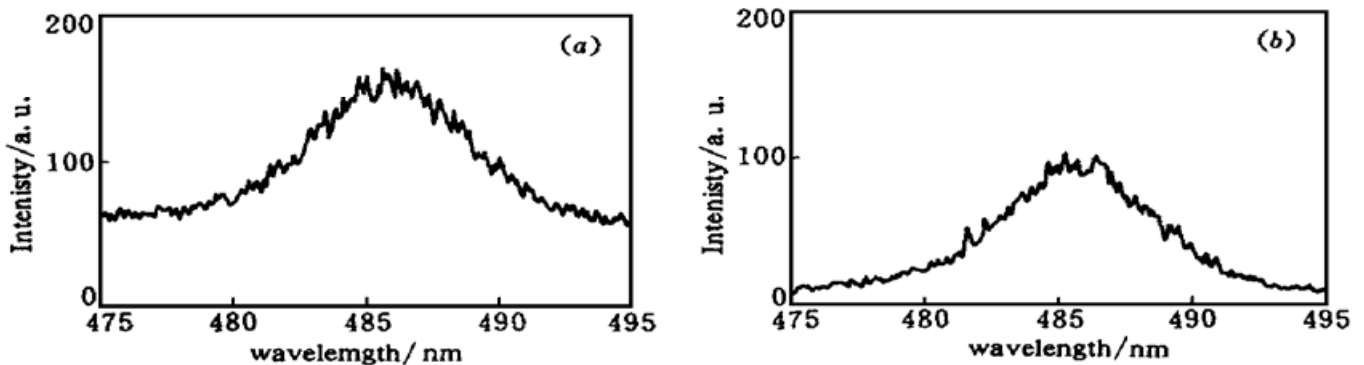


图 2 含染料杂质的  $\text{TbCl}_3$  水溶液的激发光谱。激发铽离子的  ${}^7F_6-{}^5D_4$  跃迁, 探测  ${}^5D_4-{}^7F_5$  跃迁

(a) 没有采用 PMT 高压控制电路, 可以看出明显的由染料荧光造成的本底;

(b) 采用 PMT 高压控制电路, 本底基本上被扣除了

Fig. 2 Excitation spectrum of the  $\text{TbCl}_3$  aqueous solution with dye impurity, the  ${}^7F_6-{}^5D_4$  transition of  $\text{Tb}^{3+}$  is excited and the  ${}^5D_4-{}^7F_5$  transition is probed

(a) Without using a time-delayed PMT high voltage controlling circuit. There existing a significant background introduced by dye fluorescence; (b) Using a time-delayed PMT high voltage controlling circuit, the background is subtracted

### 3 结果和讨论

氨基酸是最简单的一类生物分子, 在生物体内大量存在, 它不仅具有重要的生物功能, 而且也是蛋白质、酶等生物大分子的结构单元, 并参与组成其活性部分。以稀土氨基酸配合物作为研究稀土与蛋白质、酶等生物大分子作用的模型化合物还可进一步阐明生物大分子的结构和功能。为此我们首先选择氨基酸稀土配合物来进行研究。

研究了氨基酸中的精氨酸与铽的配合物的水溶液(溶液浓度为  $2 \times 10^{-5}$  mol/L) 中铽离子的配位随溶液 pH 值的变化而发生的变化。

图 3 示出了实验记录的三种不同 pH 值的溶液的激发光谱, 410 nm 到 430 nm 的谱峰为

水的电子振动谱(放大 50 倍); 430 nm 到 470 nm 的谱峰为氨基酸中羧基的电子振动谱(放大 100 倍)。可以看出, 在酸性条件下, 随着 pH 值的增加, 水的电子振动谱逐渐减弱, 而羧基的电子振动谱逐渐增强。

某一类配体导致的电子振动跃迁的振子强度与该类配体的配位数以及对应的电子跃迁的振子强度成正比, 因此该配体的配位数可由下式确定

$$n = \frac{\sigma_{CV}/\sigma_{ele}}{C}$$

式中  $\sigma_{CV}$  为电子振动光谱的振子强度,  $\sigma_{ele}$  为电子跃迁的振子强度,  $C$  为常数, 其意义为单个配体导致的电子振动跃迁的振子强度与电子跃迁振子强度之比。我们以前的实验数据表明, 对于  $Tb^{3+} - H_2O$ ,  $C = 0.00111^{[5]}$ 。因此记录出电子振动光谱与对应的电子跃迁光谱, 由光谱的积分强度计算出两者的振子强度之比, 就可以确定配位数  $n$ 。

$Tb^{3+}$  第一配位层配位水的数目与溶液 pH 值的关系示于图 4。可以看出, 在酸性环境下(pH <

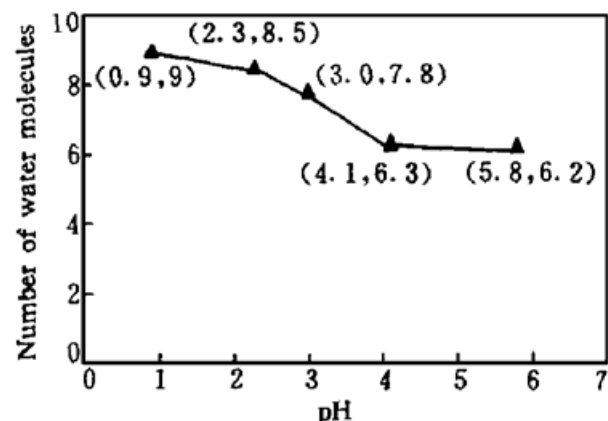


图 4 精氨酸铽配合物水溶液中水的配位数与溶液 pH 值的关系

Fig. 4 Variation of coordination  $H_2O$  with pH value of the arginine-terbium solutions

$COO^-$  离子与  $Tb^{3+}$  离子的相互作用力不同, 在我们研究的该类体系中, 不能直接由电子振动谱的振子强度确定其配位的数目, 但可以由水配位数的减小反映出羧基配位数的增加。

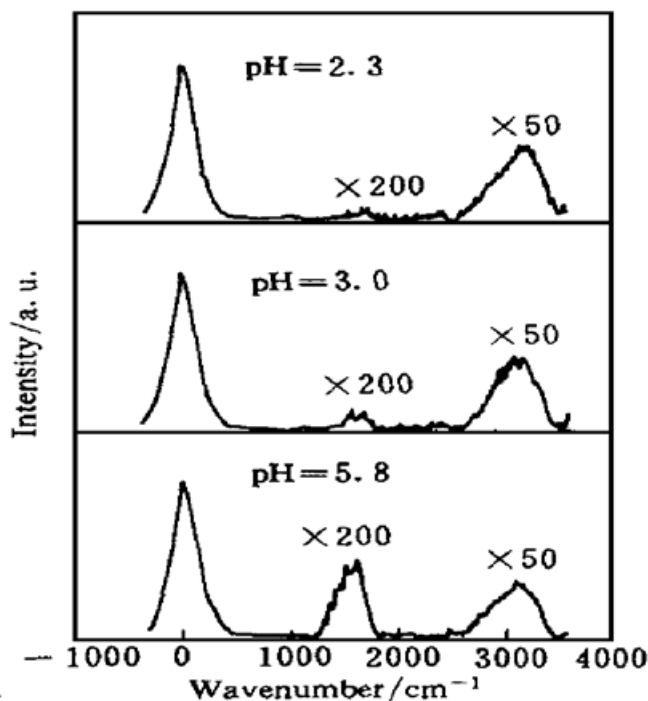


图 3 三种不同 pH 值的  $2 \times 10^{-5}$  mol/L 的精氨酸铽配合物水溶液的激发光谱

Fig. 3 Excitation spectra of three pH value-specific aqueous solutions ( $2 \times 10^{-5}$  mol/L) of terbium-arginine complex

7) 与铽离子配位的水分子的数目随着溶液 pH 值的减小而增大。由于  $Tb^{3+}$  离子的配位数为 9, 当  $pH < 1$  时, 实验确定的水配位数达到 9, 并且实验中也观测不到羧基的电子振动谱, 因而可以肯定精氨酸没有参与稀土配位。当溶液的 pH 值增加时, 水的配位数开始减小。这意味着精氨酸逐渐开始参与稀土配位。当  $pH = 5.8$  时, 有 2.8 个配位的水分子被精氨酸所替代。这一结果主要是由于溶液酸性的增强减小精氨酸的水解而造成的。即当溶液的 pH 值增加时, 精氨酸中的羧基的电离逐渐加强, 因而离解出越来越多的  $COO^-$  离子。由于  $COO^-$  离子带有一个负电荷, 加强了与  $Tb^{3+}$  离子的配位, 挤走了部分原来与  $Tb^{3+}$  离子配位的水分子。值得说明的是, 由于  $COO$  和

## 参 考 文 献

- 1 P. H. Brown. Handbook on the Physics and Chemistry of Rare Earths, Vol. 13, 1st ed., Berlin: Elsevier Science Publishers B V, 1990. 423~ 452
- 2 M. Stavola, L. Isganitis, M. G. Sceats. Cooperative vibronic spectra involving rare earth ions and water molecules in hydrated salts and dilute aqueous solutions. *J. Chem. Phys.*, 1981, **74**(8): 4228~ 4241

- 3 J. Y. Zhou, R. H. Li, D. J. Zhou *et al.*. Probing the microstructures of trivalent rare earth compounds with time-resolved two-center cooperative vibronic spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A*, 1995, **51** (14): 2511~ 2516
- 4 Li Runhua, Zhou Dajun, Zhou Jianying *et al.*. Probing molecular coordination groups with cooperative vibronic spectra of rare-earth ions. *Progress in Natural Science* (自然科学进展), 1996, **6**(3): 366~ 368 (in Chinese)
- 5 Li Runhua, Meng Jianxin, Zhou Jianying *et al.*. Determination of coordination environment of rare earth ions with cooperative vibronic spectroscopy. *Chinese Science Bulletin* (科学通报), 1997, **42**(1): 34~ 37 (in Chinese)
- 6 B. R. Judd. Optical absorption intensities of rare-earth ions. *Phys. Rev.*, 1962, **127**(3): 750~ 761
- 7 G. S. Ofelt. Optical absorption intensities of rare-earth ions. *J. Chem. Phys.*, 1979, **37**(3): 511~ 520
- 11 G. H. Dieke, L. A. Hall. Fluorescent lifetimes of rare earth salts and ruby. *J. Chem. Phys.*, 1957, **27** (2): 465~ 467

## Ultrasensitive Detection for Vibronic Spectroscopy of Rare Earth Ions ——Study on Coordination of Terbium with Aminoacid in Low Concentration Solutions

Li Runhua Meng Jianxin Zeng Xueran Zhou Dajun Zhou Jianying  
(State Key Laboratory of Ultrafast Laser Spectroscopy, Zhongshan University, Guangzhou 510275)

**Abstract** A time-resolved ultrasensitive detection technique of probing cooperative vibronic spectra of rare earth ions is described. Coordination of terbium ion with arginine in low concentration solutions is studied and the coordination number variation of water molecules with pH value in these solutions is determined quantitatively with this technique. It is concluded that arginine can coordinate with terbium ion when  $\text{pH} > 1$ , with the pH value of the solutions increasing, the coordination number of arginine increases.

**Key words** cooperative vibronic spectroscopy, determination of coordination, ultrasensitive detection