

凝聚相中血卟啉分子的激光选择激发

陈述春 戴凤妹

(中国科学院上海光学精密机械研究所)

江寿平 连少辉

(中国科学院上海生物化学研究所)

提 要

用脉冲染料激光器在 77K 对血卟啉在乙醇和 HCl 溶液中的电子振动带和 O—O 跃迁带进行激光选择激发。得到了有振动结构的荧光光谱, 发现其对激发波长有明显的选择性, 并揭示在 77K 时乙醇溶液中四种 HPD 异构体的存在。

一、引 言

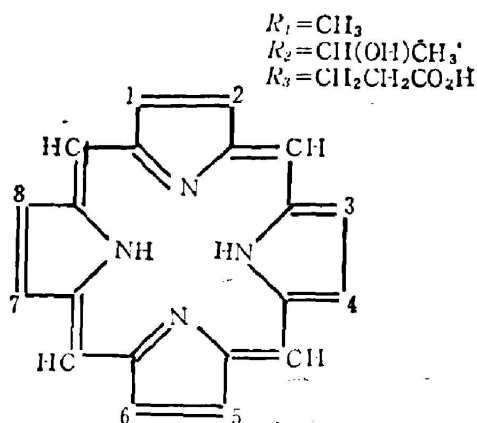
血卟啉是由动物血中提取的生物分子制剂。近年来由于其在癌症的诊断和治疗上的功用, 而引起人们相当的注意。对于血卟啉作为光敏剂的激光化疗机理、高效光敏剂的探讨以及有关的基础研究, 是当前的重大课题之一。特别是卟啉分子在结构上与血红蛋白和叶绿素分子是类似的, 它们在生命体中占有相当重要的地位, 因而血卟啉在分子生物学的研究中也有很重要的意义。

血卟啉是卟吩的一种衍生物($C_{34}H_{38}O_6N_4$)通常可形成多种异构体。常温下这种多原子生物分子的吸收和发光光谱都是由宽带组成的, 这些宽度掩盖了结构上相近的异构体的特征, 更不能提供任何有关电子振动的信息。因而在我们的实验中采用了近年来发展起来的激光选择激发技术^[1~3], 在 77K 研究了血卟啉分子的光谱特征。

二、实 验

血卟啉的结构式在图 1 中给出, 异构体多以 I 和 III 型存在, I 型为交替取代而 III 型为不对称取代。所研究的血卟啉(简称 HPD)样品由上海生化所提供。实验中采用了浓度为 $\sim 2 \times 10^{-4} M$ 的乙醇溶液, 和浓度为 $\sim 1 \times 10^{-4} M$ 的盐酸水溶液(1N HCl)。

利用如图 2 所示的实验装置, 在 77K 利用激光选择激发的方法, 研究了冷凝的乙醇和 1N HCl 固溶体中 HPD 的荧光光谱。图中, DL 为闪光灯泵浦 Rh6G 染料激光器, 它能在 HPD 的 O—O 跃迁带(1N HCl 中)或在较高振动带(在乙醇溶液中)提供有效的可调谐激光输出。其脉冲宽度为 500 ns, 而光谱宽度根据在这一工作中的需要, 可在 0.1~0.5 nm 间调整, 取稍宽的激光线宽, 目的在于分辨血卟啉中不同异构体或衍生物的光谱特征。样品(S)



Type-1 1.3.5.7.--- R_1 2.4--- R_2 6.8--- R_3

Type-3 1.3.5.8.--- R_1 2.4--- R_2 , 6.7--- R_3

Fig. 1 Structural formula of hematoporphrin

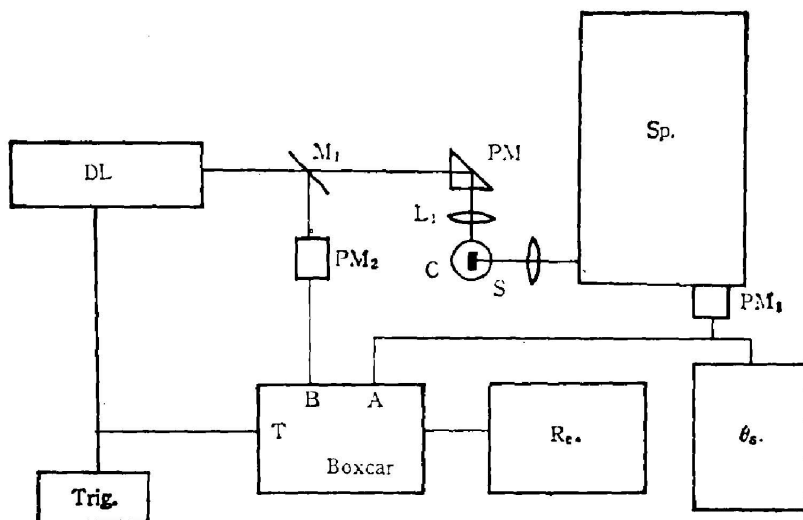


Fig. 2 Experimental setup of laser selective excitation spectroscopy

放在低温杜瓦瓶中(O), 激光激发后产生的荧光经过一米光栅单色光计(Sp.)用光电倍增管(PM_1)接收, 信号用取样积分器(Box.)处理, PM_2 光电管接收激发光的监测信号作为参考输入取样积分器的B通道。取样积分器和激光器的触发是同步的。

常规荧光光谱用白炽灯和宽带滤光片组合作为光源, 通过单色光计用光电倍增管-放大器-记录仪系统测定。也用白炽灯和单色光计组合测定了荧光的激发光谱。

所有在低温下的测量, 样品都是在液氮中骤冷到 77 K, 并保持在这个温度下进行。

三、结果和讨论

1. 在乙醇中血卟啉的常规光谱

图3表明了室温下HPD在乙醇中($\sim 1 \times 10^{-4} M$)的激发光谱。在整个可见光谱区分

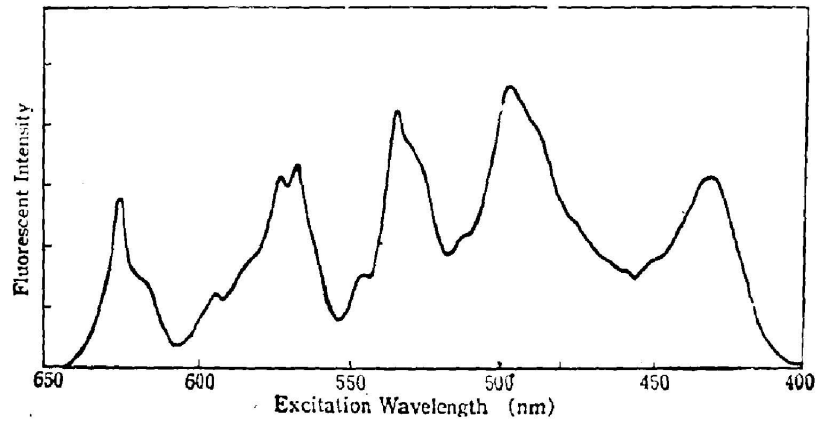


Fig. 3 Excitation spectra of HPD in ethanol at 293 K

布有五个宽激发带,其中心位置分别在 625、570、530、495 和 433 nm 附近。在 200~300 nm 有一个很宽的强激发带在图中未给出。由于分辨优于 1 nm,因而在每个宽带上可见有一些较窄的峰出现。也在 77 K 测定了激发光谱,与室温的激发光谱比较,发现宽带上的某些峰强度产生了相对变化。为清楚起见在图 4 比较了 77 K 和 293 K 的长波激发光谱。可见在低温下,由于线宽变窄增加了分辨,除了 632、627 和 620 nm 附近的三个峰以外,在 616 nm 又

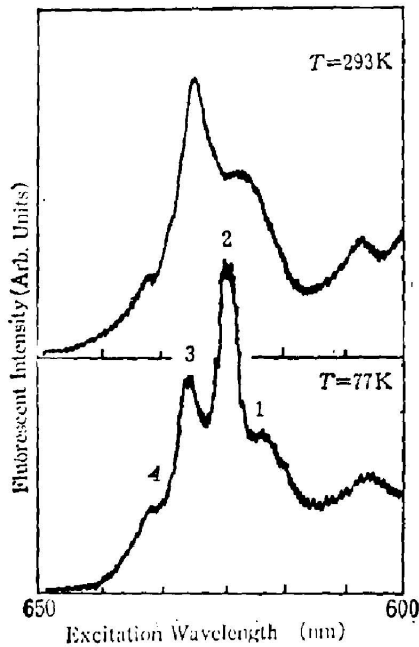


Fig. 4 Excitation spectra of the O—O transition of HPD in ethanol at 293 K and 77 K

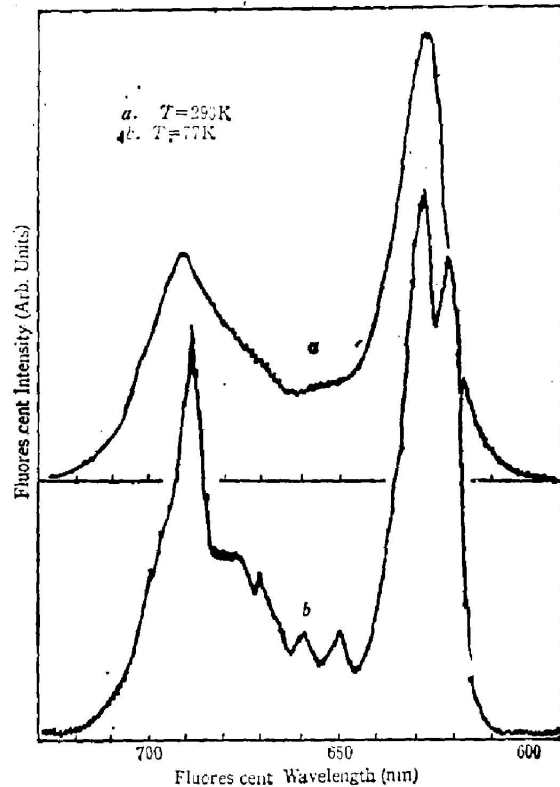


Fig. 5 Fluorescent spectra of HPD in ethanol under broad band excitation (a) $T=293\text{ K}$; (b) $T=77\text{ K}$

出现了一个峰。这些峰的波长位置随温度改变不大,但相对强度变化很明显,低温下短波激发峰显著地增强。类似的趋势也表现在其他几个激发带上。

也在宽带激发下测定了 HPD 在乙醇中($\sim 1 \times 10^{-4} M$)的 $S_1 \rightarrow S_0$ 荧光光谱。结果如图 5 表明。室温下发射光谱为典型的无结构宽带,在 628 nm 和 690 nm 附近有两个极大。在 77 K, 628 nm 的带变窄,峰位置移向 627 nm,并在 620 nm 附近又出现一个峰,这两个峰与 77 K 激发光谱中的二峰相对应,它们可能属于不同的异构体分子的 O—O 跃迁。激光选择激发研究也证明和支持这一点。

在 77 K 激发光谱中,以 1 和 2 为代表的分子可能与基质有稍强的电子-声子耦合,因而强度对温度较为敏感。加之在激发谱中受到长波峰(3、4)的声子边带的影响,所以在室温下分辨较差。相反在荧光光谱中,峰 4 没有出现可能也是这个原因,因为在发射谱中声子边带总在零声子线的长波边出现。

实验表明,在 77 K 不同分子的 O—O 跃迁带表现为不均匀增宽,其半宽度估计为 3 nm 左右。

2. 乙醇中 HPD 振动带的激光选择激发

在乙醇中 HPD 的 O—O 跃迁荧光位于 600~640 nm 光谱区。我们使用的 Rh6G 染料激光器在 570~600 nm 区域内调谐,恰好可以对其电子振动能级进行选择激发。在这种情况下,激发可以选到 S_1 态的不同振动能级,由于振动能级的弛豫极快,因而观测的荧光都是由 S_1 的 O 振动能级到 S_0 的跃迁。这样,由 O—O 跃迁区域内零声子线的峰波长和激光激发波长应能确定 S_1 激发态的振动频率。

但是由于不同分子中心振动能级的重叠,常常会造成几种分子的不同振动能级同时被选择激发的情况(如图 6a),于是在 O—O 跃迁区可观测到多个窄峰。但如果重叠的分子类型太多时,也可能得不到有结构的光谱。

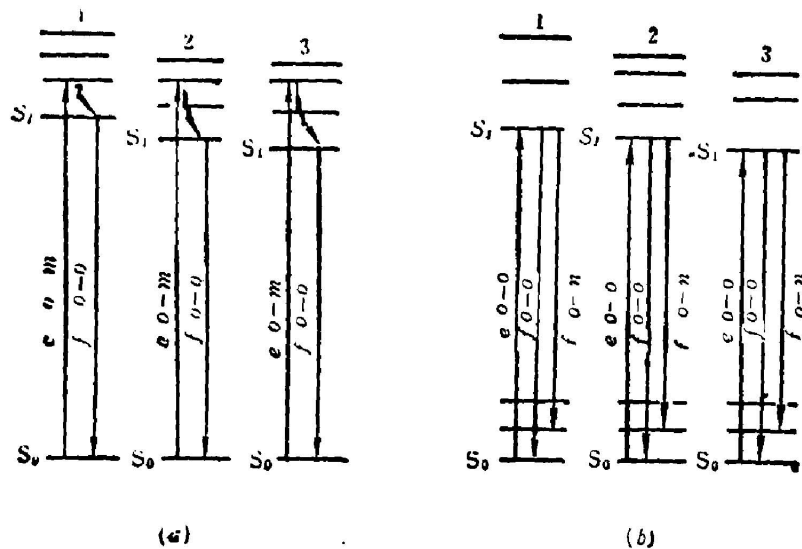


Fig. 6 Diagram of the selective excitation

(a) Selective excitation in the vibronic band

(b) Selective excitation in the O—O transition band

图 7 就是在 77 K 用 $\lambda_e = 575.3 \text{ nm}$ 的激光, 激发 HPD 较高振动带时测定的 O—O 跃迁区的荧光光谱, 出现的窄线与各类中心的纯电子跃迁相当。当然, 所谓的不同分子中心, 也应包括在不均匀介质中处于不同环境的同种分子, 因而它是比较复杂的。

图 8 给出了在 77 K, 对乙醇中 HPD 的某些振动能级, 用激光选择激发得到的几个典型的荧光光谱。实验中选用的激光线宽 $\approx 0.5 \text{ nm}$, 这个宽度小于 77 K 时 O—O 跃迁带的不均匀带宽 ($\sim 3 \text{ nm}$), 但可能大于它的均匀线宽, 因而, 在光谱的 O—O 跃迁区可观测到四个与低温激发光谱相应的峰, 由于声子边带的影响, 波长愈短的峰愈尖锐, 在选择激发下它们时而被增强(相对的)时而被抑制, 初步认为这四个峰可能与四种异构体有关。由于在这种情况下, 不可避免的激发重叠效应不仅使 O—O 跃迁不能更好的分开, 模糊的电子振动谱也难以给出基态的振动频率。

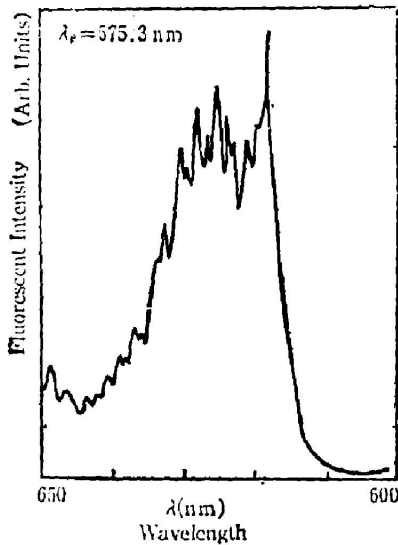


Fig. 7 Fluorescent spectrum of the O—O transition of HPD in ethanol at 77 K under excitation of a dye laser with $\lambda_e = 575.3 \text{ nm}$

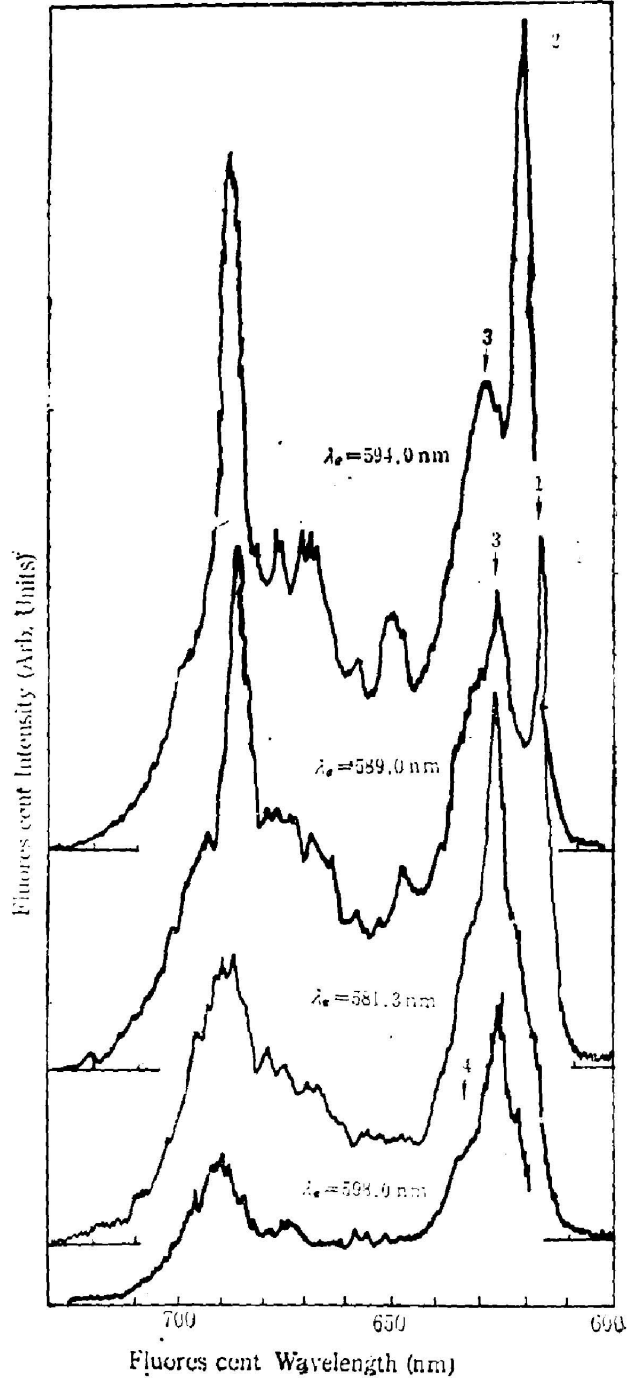


Fig. 8 Typical fluorescent spectra of HPD in ethanol at 77 K under excitation of a dye laser in the vibronic band

3. 在酸性介质中 HPD 的 O—O 跃迁带的激光选择激发

在(1*N*)HCl 溶液中, HPD 的荧光和激发光谱在图 9 给出, 可见其荧光明显蓝移。因为在卟啉环里边的两个自由氮原子与两个质子连接, 环的对称性增加了。在这种情况下 O—O 跃迁带落在 570~600 nm 区域, 恰好与 Rh6G 染料激光器的调谐范围一致。激光选择不同分子中心的纯电子能级激发(见图 6b), 荧光为由它到 S_0 的电子振动能级的跃迁决定, 因而荧光的位置应能反应基态电子振动的频率。

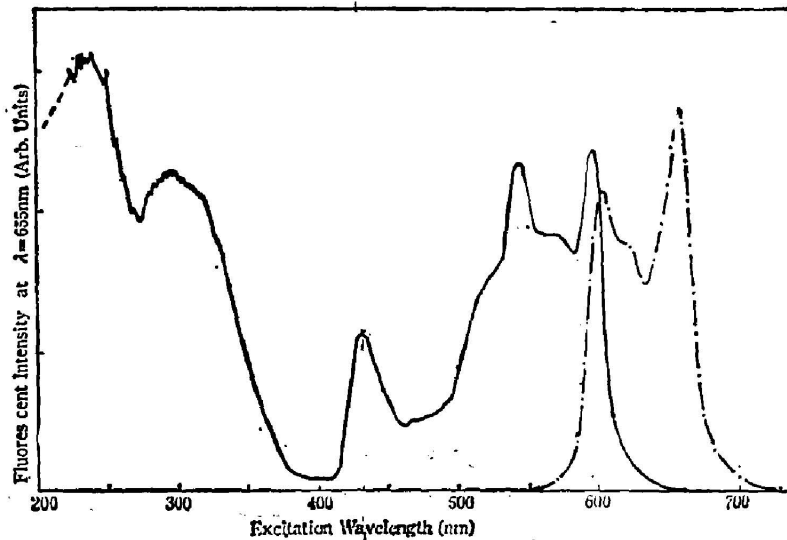


Fig. 9 Excitation and fluorescent spectra of HPD in 1*N* HCl at 293 K

图 10 给出了在 77 K 时(1*N*)HCl 中 HPD 的激光选择激发结果。它是在 O—O 跃迁附近选择激发后测定的荧光光谱。可见其对激发波长的明显选择性。首先, 随着激发波长的改变, 光谱相应于 O—O 跃迁峰有规律地移动, 因为在这种情况下, 只有纯电子跃迁频率与激光频率一致的分子被选择激发, 并可以认为不同分子的振动频率是相差较小的, 这表现在当用较长波长激发时, 在 77 K 光谱中竟能出现较清楚的振动结构上(见图 10 中曲线)。其次, 振动结构的清晰程度与激发波长有明显关系, 例如对激发波长 $\lambda_0 = 591.3$ nm, 荧光光谱中的振动结构是较清楚的, 但随着激发波长减小, 结构逐渐模糊, 并且由于激发偏离 O—O 跃迁的峰波长而引起强度下降。选择性随激发波长的退化, 可能是声子边带与纯电子线的频率重叠所致, 因为在吸收光谱中声子边带位于 0 声子线的短波边。

四、小 结

1. 77 K, 对乙醇中 HPD 的电子振动带的激光选择激发实验表明, 血卟啉分子在乙醇溶剂中可能有四种异构体, 通常大多数可能以 O—O 跃迁峰波长位于 627 和 620 nm 的两种结构型式存在。

2. 在酸性介质中, 由于 HPD 分子卟啉环内两个自由 N 原子与两个质子连接, 增加了对称性, 荧光光谱蓝移。77 K O—O 跃迁带的激光选择激发, 给出了有振动结构的光谱, 并对

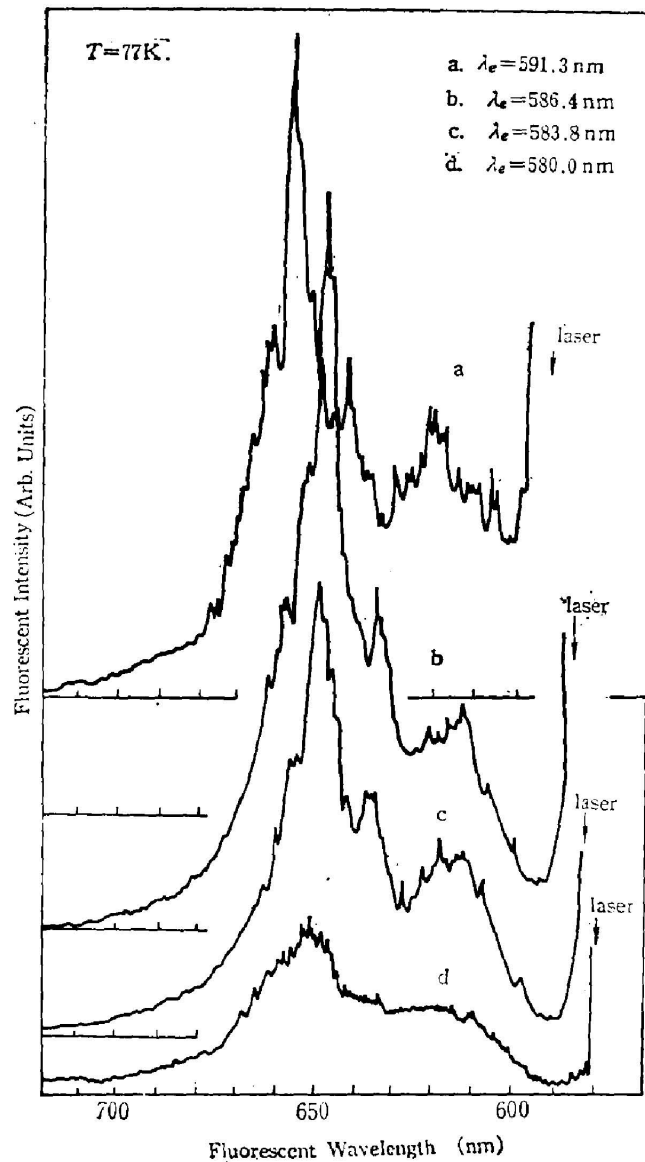


Fig. 10 Fluorescent spectra of HPD in HCl (1N) at 77 K under excitation in the region of O—O transition

激发波长表现出明显的选择性。看来不同分子中心的基态振动频率是相差较小的。

3. 实验证明 77 K HPD 在乙醇和(1N)HCl 溶剂中谱线的不均匀增宽特性, 这种不均匀增宽能用激光选择激发的方法部分消除。明显的激发选择性和有结构光谱的出现, 说明 HPD 分子与其所在基质的电子-声子相互作用不是很强的。

参 考 文 献

- [1] A. Szabo; *Phys. Rev. Lett.*, 1970, **25**, No. 10 (Oct), 924.
- [2] A. Szabo; *Phys. Rev. Lett.*, 1971, **27**, No. 4 (Apr), 323.
- [3] 陈述春等; 《光学学报》, 1985, **5**, No. 4 (Apr), 325.

Study of laser selective excitations of hematoporphyrin in the condensed phase

CHEN SHUCHUN AND DAI FENGMEI

(Shanghai Institute of Optics and Fine Mechanics, Academia Sinica)

JIANG SHOUPING AND LIAN SHAUHUI

(Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica)

(Received 2 July 1985; revised 18 September 1985)

Abstract

Using a tunable pulse dye laser, we have made experiments of laser selective excitations in the vibronic band and O—O transition band for hematoporphyrin in both ethanol and 1 N HCl at 77 K. We have obtained structural fluorescent spectra, which show obvious selectivity for the excitation wavelength. It was found that there are four kinds of isomers of HPD in ethanol at 77 K.