

淡水无核珍珠荧光光谱的研究*

宋慧春 项苏留 范雁

(苏州大学, 215151)

摘要 对三角帆蚌珍珠、贝壳珍珠层及商品珍珠粉等进行了固体表面荧光测定。荧光图谱显示:在 280 nm 激发波长下,3 种样品都具有 345 nm 和 465 nm 的特征荧光峰,且 345 nm 处荧光强度最大,并伴有荧光淬灭现象。这说明珍珠及其贝壳中含有色氨酸(Trp)。用 5 mmol/L $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 碱法水解处理从珍珠及其贝壳中提取的壳角蛋白,测得水解液的内源荧光光谱和其中 Trp 的含量为 0.04%~0.07%。

关键词 珍珠, 荧光光谱, 色氨酸, 荧光淬灭

珍珠的结构是由几千层碳酸钙霏石晶体与有机物的壳角蛋白隔层交替排列组成的同心球。壳角蛋白被夹在 2 层碳酸钙晶体之间,成为 1 层薄膜,厚度仅有 0.02 μm 左右。过厚过薄都直接影响珍珠的透明度^[4]。贝壳珍珠层具有类似的结构。壳角蛋白是 1 种含有不同糖类辅基的结合蛋白质,糖的种类与珍珠的颜色(白色或黄色)有关^[7]。可见,珍珠的工艺品位与药用保健功能与它的结构和化学组分有密切关系。本文对珍珠、贝壳珍珠层及商品珍珠粉进行了固体表面荧光分析及壳角蛋白碱解液的内源荧光光谱分析,以对珍珠及其贝壳珍珠层的有机成份与结构特征进行深入研究。

1 材料与方法

1.1 样品制备

1.1.1 珍珠、贝壳珍珠层 取 3 龄三角帆蚌贝壳和 4 级三角帆蚌珍珠(由苏州渔牧工商公司赠送)。按门摩西^[1]方法取出珍珠层,将其与珍珠一起洗净、烘干。用不锈钢钳破碎成粗碎末,再用玛瑙研钵研细过筛,细度在 150 目以上。

1.1.2 市售珍珠粉 由常州太湖保健品厂赠送。细度 200 目以上。

1.1.3 壳角蛋白碱解液 将以上处理的珍珠、贝壳珍珠层粗碎末各定量称取 4 份,编号 S_1 ~ S_8 。用 5% 醋酸浸泡、离心,取沉淀用蒸馏水洗至中性。再分别用甲醇、乙醚浸泡,离心,蒸馏水洗数次,冷冻干燥,即为壳角蛋白粗提物。称量,计算提取率。

将提取出的壳角蛋白各取 2 mg 装入安瓿瓶中,加入 10 ml 5 mmol/L $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 溶液后

收稿日期:1997-12-18

* 本研究由江苏省教委自然科学基金资助。编号 JW 970062

封口抽真空。65 ℃ 水解 24 h, 将水解液离心, 取上清液用 5 mmol/L $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 溶液稀释 20 倍, 待荧光测定。

1.2 实验条件

荧光测定在 Shimadzu RF-540 型荧光分光光度计上进行。测定温度 20 ℃, 狭缝 10 nm, 扫描速度 2 (FAST)。所用试剂, 标准 L-Trp, 分析纯, 进口分装, 上海生物化学试剂商店经销。其余试剂均为国产分析纯。

1.3 固体表面荧光测定

参考 Hartubise^[5], 将珍珠、贝壳珍珠层及商品珍珠粉等样品置于固体样品架, 填满、压平, 放入荧光分光光度计内进行反射式扫描。以 280 nm 为激发波长测定荧光发射光谱; 再以荧光强度最强的 345 nm 为发射波长, 测定其激发光谱。

1.4 荧光淬灭现象观察

以 280 nm 为激发波长, 每隔 5 min 对珍珠和商品珍珠粉样品扫描 1 次, 进行荧光发射光谱测定, 连续扫描 10 次, 观察其荧光发射光谱的变化。

1.5 壳角蛋白的内源荧光光谱和 Trp 含量测定

先用 5 mmol/L $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 配制 0.0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 标准 Trp 溶液, 以 280 nm 为激发波长测定标准 Trp 溶液的荧光发射光谱和 λ_{max} 时的荧光强度, 以不同浓度梯度的标准 Trp 为横坐标, 荧光强度为纵坐标作标准曲线。再于 280 nm 处, 分别测定壳角蛋白的内源荧光光谱。对照标准曲线, 求出 Trp 含量。

2 结果

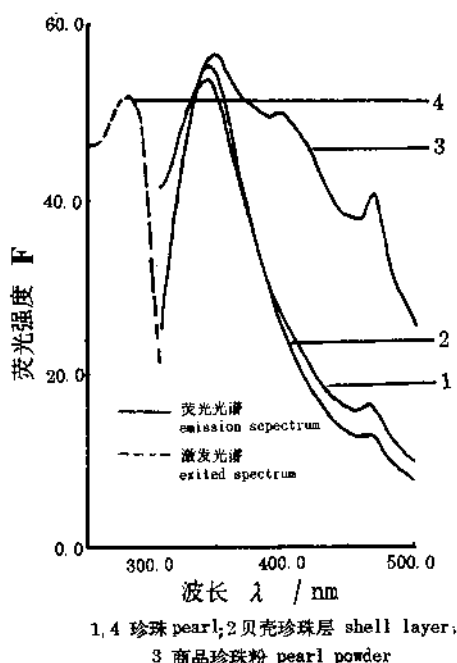


图 1 珍珠、贝壳珍珠层的固体表面荧光光谱

Fig.1 Solid surface fluorometry emission spectrum of pearls and their shell layers

2.1 珍珠、贝壳珍珠层的固体表面荧光光谱

珍珠、贝壳珍珠层及商品珍珠粉在 280 nm 激发波长下的荧光发射光谱见图 1。珍珠和贝壳珍珠层都有 345 nm 和 456 nm 2 个荧光峰, 前者最大。这意味着珍珠中有 Trp 的存在。商品珍珠粉除具有这 2 个特征荧光峰外, 在 395 nm 处还出现了 1 个小的荧光峰。曲线 4(虚线)是珍珠以 345 nm 为固定发射波长的激发光谱。

2.2 荧光淬灭现象

珍珠、商品珍珠粉的荧光淬灭现象见图 2。图 2 左侧曲线示珍珠的固体表面荧光光谱, 随着扫描时间的延续, 在 345 nm 处的荧光强度逐渐下降。这是一种荧光淬灭现象; 随着波长 345 nm 荧光强度下降的同时, 在 395 nm 处渐渐出现了 1 个小的荧光发射峰, 随着扫描时间的延续, 该峰愈趋明显; 465 nm 处的荧光强度基本不变。图 2 右侧曲线示商品珍珠粉的荧光淬灭现象, 在 345 nm 和 465 nm 的荧光强度变化情况与左侧曲线

所示珍珠的荧光淬灭现象基本相同。不同的是商品珍珠粉所独有的 395 nm 处的荧光强度随扫描时间的延续也略有下降,但幅度比 345 nm 处荧光强度下降明显小,以致扫描 30 min 后,该波长处变成了最大的荧光峰。

2.3 壳角蛋白的内源荧光光谱

以 280 nm 为激发波长,扫描壳角蛋白碱解液得到的荧光图谱见图 3。在 352 nm 处有单一的荧光发射峰,此峰与标准 Trp 荧光峰位置完全一致,这一结果证实了壳角蛋白中 Trp 的存在,352 nm 处的荧光峰为 Trp 所提供。

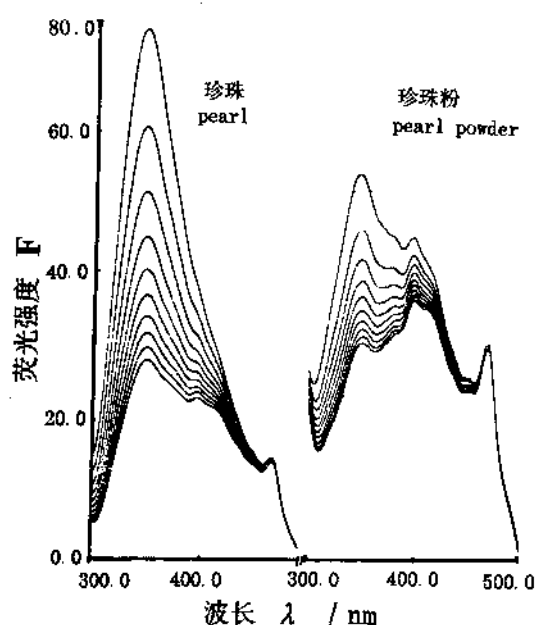


图2 珍珠、商品珍珠粉的荧光淬灭现象

Fig.2 Fluorometry quench atlas of pearl and pearl powder

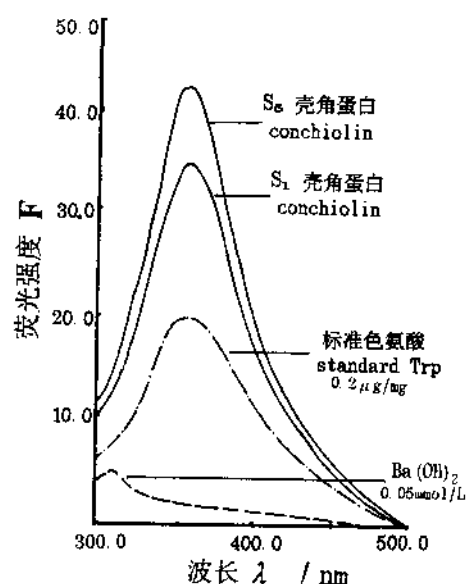


图3 壳角蛋白的内源荧光光谱

Fig.3 Inner fluorometry spectrum of conchiolin

2.4 Trp 含量测定

2.4.1 壳角蛋白的提取 结果见表 1。

表 1 壳角蛋白的提取率

Table 1 Extractive rate for conchiolin

材料种类 kind of sample	贝壳珍珠层 pearl layer of shell					珍珠 pearl		
样品号 sample No.	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	S ₅	S ₆	S ₇	S ₈
样品重/g sample weight	1.042 1	1.003 3	5.047 0	5.007 9	1.011 0	1.006 9	5.067 9	5.109 8
壳角蛋白重/g conchiolin weight	0.015 0	0.014 8	0.084 1	0.084 1	0.022 6	0.024 5	0.110 0	0.117 8
提取率/% extractive rate	1.44	1.48	1.71	1.68	2.24	2.43	2.17	2.31
平均/% average		1.58				2.29		

2.4.2 Trp 的定量分析 绘制 Trp 标准曲线。根据壳角蛋白碱解液的荧光强度,从标准曲线中求出碱解液中 Trp 浓度(图 4)。通过计算即得 Trp 在珍珠或贝壳珍珠层中的百分含量,见表 2。

表 2 珍珠、贝壳珍珠层中 Trp 的荧光分析

Table 2 Fluorometric intensity of Trp in pearls and pearl layer of shell

样品号 sample No.	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	S ₅	S ₆	S ₇	S ₈
材料种类 kind of sample	贝壳珍珠层 pearl layer of shell				珍珠 pearl			
荧光强度 fluorescence density	35.1	37.7	35.8	36.2	41.8	40.2	40.4	39.1
Trp 浓度/($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) Trp concentration	0.29	0.31	0.30	0.30	0.35	0.36	0.34	0.31
Trp 浓度平均值/($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) average concentration of Trp	0.30				0.34			
壳角蛋白 Trp 含量/% content of conchiolin	3.0				3.4			
珍珠贝壳珍珠层中 Trp 含量/% Trp content of pearl and pearl layer of shell	0.047				0.078			

* 壳角蛋白 Trp 含量根据 Trp 浓度平均值乘稀释倍数(20),除壳角蛋白碱解液配制浓度($0.2 \times 10^3 \mu\text{g}/\text{ml}$)计算。

The Trp content of conchiolin is the value of mean Trp concentration value multiplied by dilute times (20), then divided by compound concentration of alkaline hydrolytic liquid of conchiolin ($0.2 \times 10^3 \mu\text{g}/\text{ml}$).

** 根据壳角蛋白 Trp 含量乘壳角蛋白提取率计算。

The value of Trp content in conchiolin multiplied by extractive rate of conchiolin.

3 讨论

珍珠和贝壳珍珠层的固体表面荧光光谱在 280 nm 激发波长下,都有 345 nm 和 465 nm 2 个特征荧光峰,前者的荧光强度最大,显然为 Trp 所提供。此峰有明显的荧光淬灭现象,随着扫描时间的延续,其荧光强度逐渐下降,这可能是因为光化学反应所致。在生物大分子蛋白质核酸中,这种现象多有发生^[3]。这一点也在某种程度上解释了珍珠在长时间日光照射下光泽会渐黯淡的原因。465 nm 的荧光峰可能是非蛋白质物质所提供,它在紫外光的连续照射下,荧光强度基本没有变化。可见,这种未知有机物对光较稳定。商品珍珠粉除具有 2 个特征荧光峰外,还有 1 个明显的 395 nm 的荧

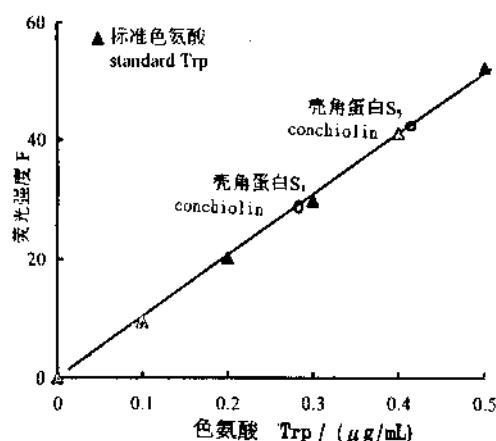


图 4 壳角蛋白中 Trp 含量的测定

Fig.4 Determination of Trp content in conchiolin

峰,这种峰在珍珠和贝壳珍珠层经过紫外激发光扫描一段时间(约 10 min)后也会出现。这种差异可能与商品珍珠粉由珍珠加工成细粉的过程中,经过了粉碎、水飞、紫外消毒等工序有关。或者是珍珠、贝壳珍珠层在荧光分析过程中,经 280 nm 紫外光照射,内部壳角蛋白的氨基酸之间形成氢键的结果。

关于珍珠壳角蛋白氨基酸组分近年国内外学者曾采用高效液相色谱、气相色谱、氨基酸自动分析仪等相继进行过研究,但未见有 Trp 存在的文献报道,这是由于所用的酸解法使 Trp 受破坏之故^[2]。本研究在 280 nm 的激发波长下,无论是珍珠、贝壳珍珠层的固体荧光光谱中出现的 345 nm 荧光峰,还是壳角蛋白碱解液的内源荧光光谱中出现的 352 nm 的荧光峰都应是 Trp 所提供^[3]。二者相差 7 nm,是因前者的荧光测试是在固体刚性介质中进行,而壳角蛋白的内源荧光分析是在碱性水溶液的环境中进行,这种溶剂的松弛作用常常会使荧光光谱向长波方向移动^[6]。

参 考 文 献

- 1 门摩西.淡水珍珠层粉的制取及药用研究.动物学杂志,1979,14(1):40
- 2 张龙翔,等.生化实验方法和技术.北京:人民教育出版社,1981.60
- 3 陈国珍,等.荧光分析法(第二版).北京:科学出版社,1990.133,495
- 4 三轮帮彦.珍珠的奥妙.雷及时译.北京:中国对外经济贸易出版社,1988.72
- 5 Hurlbut R J. Solid Surface Luminescence Analysis. Marcel Dekker(New York). 1981
- 6 Schulman S G, et al. J Amer Chem Soc, 1971. 93, 3179
- 7 Shigeru AKAMATSU, et al. A Comparison of sugar compositions of yellow and white pearls. Bulletin of the Japanese Scientific Fisheries, 1977, 43(6):773~777

Fluorescence spectrum analysis of fresh water pipless pearl

Song Huichun Xiang Suliu Fan Yan

(Suzhou University. 215151)

Abstract A solid surface fluorometric analysis was made for *Hyriopsis cumingii* pearl, pearl layer of shell and pearl powder. The results show that at the exciting wavelength of 280 nm, the characteristic fluorescence peaks of the 3 samples are at 345 nm and 465 nm, and the strongest fluorescence intensity is at 345 nm accompanied with a phenomenon of fluorescence quenching, which means there may exist tryptophan in pearls and their shells. By treating a kind of conchiolin extracted from pearls and pearl layer with 5 mmol/L Ba(OH)₂ alkaline hydrolysis, the inner fluorescence map of hydrolytic liquid and its tryptophan content were acquired, which was 0.04%~0.07%.

Key words pearl, fluorescence spectrum, tryptophan, fluorescence quenching