

荧光分光光度计

中国科学院生物物理研究所四室五组

一、前言

早在三百多年前,人们就知道了某些液体和固体的荧光现象。利用荧光分析法进行物质的定性和定量分析已有几十年的历史,由于近年来仪器研制的迅速发展,使荧光分析法获得愈来愈广泛的应用。

荧光分析法是一种灵敏度很高的定量测定法,它比一般分光光度法灵敏度可高2—3个数量级,能检测低至 10^{-11} — 10^{-12} 克的痕量物质,是现有各种分析方法中灵敏度较高的一种。另外,荧光分析法还具有实验方法简单,取样容易,试样用量少等优点。荧光分析法的缺点是影响荧光测定的因素较多,对操作要求较严格等。

荧光分析法广泛应用于工农业生产,医药卫生和科学研究中,可以用荧光分析法鉴别和测定的有机、无机化合物和生物物质也愈来愈多。据不完全统计,可用荧光分析法测定的元素达60余种,可用荧光分析法测定的有机和无机化合物数量更多。

随着环境保护、石油化工、医药卫生、肿瘤研究、生物化学和超纯物质分析等工作的深入开展,要求分析极微量的有害物质和致癌物质,在这些工作中,荧光分析法是不可缺少的分析方法。例如在食品和自来水的检验中,对致癌物质——3,4苯并芘的测定;对农作物施用农药后某些残毒物质的分析;在生物化学分析中对核酸、蛋白质和酶等进行测定,如利用荧光染料菲啶溴红与核酸结合后荧光显著增强的特点,可对生物体内核酸的含量与变化情况进行定量

分析;在生物学、医学和有机分析中荧光分析法得到广泛的应用。

随着工农业和科学技术的迅速发展,迫切需要荧光分光光度计,而国内目前在这方面还是空白,长期依靠进口,每年花费国家大量外汇。我所在科研工作中,也急需这种仪器。我们遵照毛主席“独立自主、自力更生”的教导,开展了荧光分光光度计的试制工作,在无产阶级文化大革命和批林批孔运动的推动下,在兄弟单位的大力支持下,于1974年底完成了仪器的试制工作。经过考核和鉴定,仪器的性能达到了原设计要求,初步满足了使用单位的需要。

二、荧光分析的原理

某些物质在一定波段光线的照射下,其原子中的某些电子吸收了其中一部分能量,发生能级跃迁,离开了原来的能级,由基态跃迁到较高的能级,这就是原子的吸收;但是某些具有一定结构的荧光物质在获得了一定波段的光能,由基态跃迁到较高的能级(激发态)后,通过内转换,返回最低电子激发态的最低振动能级,再从这个状态回到基态,所发出的光叫做荧光。

当溶液浓度很低时,荧光强度 F 由下式表示:

$$F = 2.303\phi KAI_0$$

式中 ϕ ——量子产率,随所测物质的不同而异, $\phi = 0 \sim 1$, ϕ 越大,荧光强度越大, $\phi = 0$ 表示非荧光物质。

A ——消光度, $A = I_0 \epsilon c$,其中 l 是样品池厚度, ϵ 是克分子消光系数, c

是待测样品的浓度。

I_0 ——照射光强度。

K ——检测效率,由仪器结构决定。

由上式可以看出:

1. 对于同一种溶液,当 KI_0l 不变时,荧光强度 F 与样品浓度成正比,这就是荧光测定的基础,即通过测定溶液的荧光强度可以对所测样品进行定量分析。

2. 当 Kcl 不变时,荧光强度 F 与照射光强度成正比,即增加光源的发光强度 I_0 , 荧光强度也随着增加,则提高光源发光强度可以提高仪器的灵敏度,所以荧光分光光度计多采用强光源如氙灯,汞灯等,这是和吸收光谱不同之点,在吸收光谱中 $Kcl = \lg \frac{I_0}{I}$, 增加光源的发

光强度,并不能提高仪器的灵敏度,因为入射光 I_0 增强了,而透射光 I 也随之增强。

3. 当 KI_0l 不变时,荧光强度与检测效率成正比,所以采用高灵敏度,低噪声的光电倍增管以及优良的测试线路可以提高仪器的灵敏度,这也是和吸收光谱所不同之点,是荧光分析法灵敏度特别高的原因。

随着科学技术的发展,可以采用越来越强的光源和高灵敏度的检测器,使荧光测定的灵敏度进一步提高,如采用激光做光源的荧光分光光度计可以用来测定空气中极微量的污染物。然而,光源的强度也有一定的限度,太强了,则容易产生光分解等。

荧光测定可应用于:

1. 物质本身有生色团,在激发光照射下能发荧光的。

2. 物质本身没有生色团,需要经过一定的化学反应才能产生荧光的;或直接标记上一个生色团,例如荧光染料(荧光探针)。

3. 因为某些物质能使荧光猝灭,所以测定猝灭后的荧光强度,可以测出猝灭物质的含量。

不同的物质具有不同的荧光激发光谱和发射光谱,根据光谱曲线的形状可以对物质进行定性分析,以判断未知物是何种化合物,即利用所测得的光谱曲线与已知物质的标准曲线比

较,可以鉴定化合物的组分。

所谓激发光谱,就是选择好适当的发射光波长及谱带宽度并使它们固定不变,而让激发光单色器的波长连续扫描,所记录的光谱图称为激发光谱,它反映了不同激发光波长对荧光强度的影响。所谓发射光谱也叫做荧光光谱,则是选择好适当的激发光波长及谱带宽度并使它们固定不变,而让发射光单色器的波长连续扫描,所记录的光谱图称为发射光谱,它反映了荧光强度随波长变化的情况。

荧光分析法的缺点是影响荧光测定的因素较多,实验时应注意,以提高测定精确度。主要影响因素有内滤光效应、荧光猝灭效应、光分解、散射光、杂质、溶剂、pH 值和温度等^[1,2]。

三、样机的原理与结构

样机由光源,聚光系统,分光系统,探测器,讯号处理系统和记录仪等部分组成。

从光源发出的光线经过聚光镜,会聚于入射狭缝,而后进入激发光单色器,由此分光而形成的单色光,通过半反射镜分为两路光束,即测量光束和鉴别光束。鉴别光束照射参考样品后由光电倍增管接收;测量光束通过聚光镜会聚于待测样品。由样品产生的荧光经过荧光单色器分光之后由光电倍增管接收。鉴别光路为了补偿由于氙灯的不稳定而引起的误差。光电倍增管输出的讯号经过前置放大器,主放大器,灵敏度自动补偿,同步整流和双 T 滤波等系统后由自动记录仪记录。斩光器的作用是把光线变为断续的,使光电倍增管接收到的讯号为交变讯号,便于进行交流放大。仪器主要由光路和电子学线路两部分组成,图 1 是荧光分光光度计方框图。下面把各部分作一简要介绍。

(一) 光 路

1. 光源

我们采用 SQ150 超高压直流氙灯作为激发光源,它发射从紫外到近红外的强连续光谱,可见光与日光相似。氙灯发光强度大而且光谱分布较均匀,其发光面积小,近似于点光源。

2. 聚光镜和狭缝

单色器的分辨率和光谱亮度由单色器本身

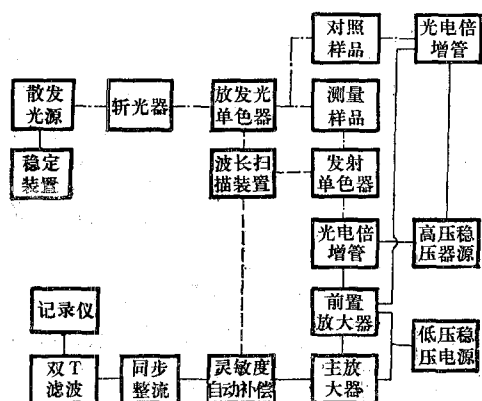


图1 荧光分光光度计方框图

的构造所决定,但是只有优良的聚光系统和适当地调整入射和出射狭缝才能够充分地发挥其性能。聚光镜的作用是尽量把更多的光线送进入射狭缝里,使氙灯的发光点成像于入射狭缝上,并使聚光器的相对孔径与单色器的相对孔径一致。聚光镜的好坏,关系到单色器的分辨率。

狭缝采用靠精密螺杆推动的燕尾板结构,缝片对称开启,狭缝宽度 0.3 毫米,连续可调。

一般按常识考虑的话可能认为,狭缝越窄,光谱宽度越窄,且能得到高的分辨率。其实并非如此。狭缝宽度窄到一定限度以后,即使再缩小狭缝宽度,光谱线的宽度不变,然而它的亮度却下降了。设狭缝宽度为 D , 准直镜的直径为 d , 其焦距为 f , 入射光的波长为 λ 时, 最合适的狭缝宽度是:

$$D = \frac{f\lambda}{d}$$

当: $\lambda = 5000$ 埃, $f = 270$ 毫米, $d = 90$ 毫米时, $D = 1.5$ 微米,但实际上只有在光源很亮,探测器的灵敏度又很高的情况下,才能用这样小的狭缝。所以一般宁可把狭缝宽度加宽到一定程度,给予探测器所需要的光量。

3. 单色器

单色器由准直镜,色散元件和会聚镜组成。我们采用 Czerny-Turner 型,此系统完全采用反

射镜,所以不存在色差问题。由于结构接近对称,所以有些象差相互抵消。

平面光栅是国产的 1,200 线/毫米的复制光栅,刻划面积 40×60 毫米²,闪耀波长是 3,000 埃。

衍射光栅与同样大小的棱镜相比,其色散和分辨率都高,分光的波长范围宽,色散基本上不随波长而变化,所以狭缝可以按光谱宽度来刻划,使用方便,而它的缺点是光谱的重叠和杂散光多,但是采用适当的滤光片可以消除之。

图 2 是荧光分光光度计光路图,发射单色器的结构与激发光单色器一样。为了通过紫外线,聚光镜由熔融石英制成,准直镜、会聚镜和反射镜表面为真空镀铝后加氟化镁保护膜。

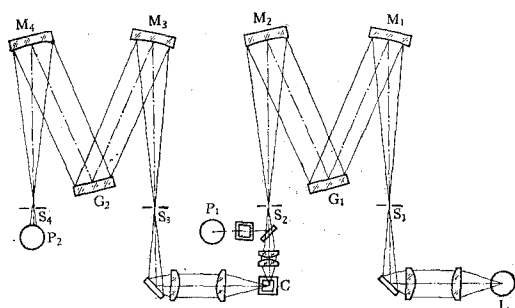


图2 荧光分光光度计光路图

准直镜、会聚镜的球面半径由单色器焦距决定,而单色器的结构安排,一方面要考虑使单色器的象差最小,另一方面则应考虑消除二次反射光^[3](图 3),以减少不必要的杂散光。

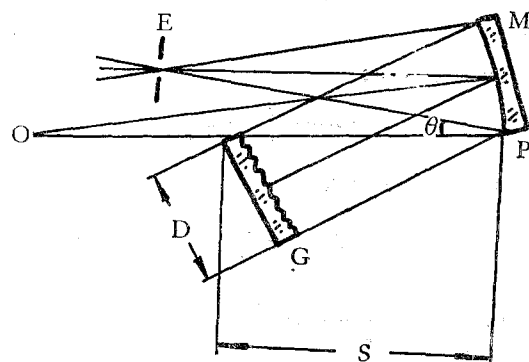


图3 二次反射光的消除

当满足下式要求时,则可消除二次反射光

于缓冲液时),由于杂散光,光电倍增管噪声,线路噪声造成的噪声信号。

双T电路是滤除由斩光器形成的300周的纹波电压,供给响应电路一个稳定的直流信号。

记录仪的响应电路,是记录仪的响应时间,通过转换响应电路的时间常数,可以控制记录仪的响应时间,这样使得光谱曲线为陡峭峰时,记录曲线不至于失真太大,而光谱曲线为平滑峰时又可减小噪声。

2. 高压电源

采用自激振荡闭环电路。由差分放大器,射极输出器,控制调整和振荡器等部分组成。高压可在-700—1,200伏范围内任意调节;最大输出电流2毫安;长期稳定性为8小时内漂移 $<0.3\%$ 。

3. 氙灯电源

由高频高压发生器(起动机)和稳流电源组成。由于要求光源比较稳定,因此采用了晶体管稳流装置,稳定度 $<0.1\%$ 。输出电压20伏(无负载时为50伏),输出电流6.5—9.5安,连续可调。

4. 低压电源

供给测试线路和高压电源以稳定的低压。输出电压为 ± 12 伏,稳定度8小时内 $<0.03\%$ 。

仪器可以测定激发光谱和发射光谱,当选择好激发光和发射波长后,可以作定量分析。为了测定全荧光(即不同单色器分光),可以把波长调到0毫微米,即零级光谱。为了测定吸收光谱(即做可见—紫外分光光度计用),可以换一个测吸收用的样品架,同时使激发与发射单色器置于同一波长后同时扫描,而对照光路则放参考样品。

四、指标与测试结果

1. 波长范围

激发光:220—650毫微米及0级。

发射光:250—700毫微米及0级。

2. 狭缝光谱宽度

激发光与发射光都是0—10毫微米连续可调。

3. 激发光与发射光单色器

$f = 270$ 毫米, $F = 4.5$

线色散3.3毫微米/毫米

4. 波长精度 优于8埃。

5. 分辨率 优于6埃。

6. 扫描方式 自动,手动。

7. 扫描速度 130; 260; 520毫微米/分钟

8. 灵敏度 分10挡 最高灵敏度为 2.5×10^{-9} 克/毫升 硫酸奎宁(0.1 N H_2SO_4 溶液)。

9. 整机稳定性 连续工作半小时变化 $<1\%$ 。

10. 重复性 $<1\%$ 。

五、试用情况

荧光分光光度计调试完成后,即投入试用。经半年多来的试用表明,仪器性能符合原设计要求,现将几个有代表性的实验结果,列于下面:

1. 线性性实验

样品:硫酸奎宁在0.1 N H_2SO_4 溶液

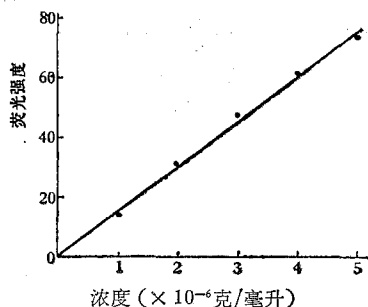


图5 线性性实验

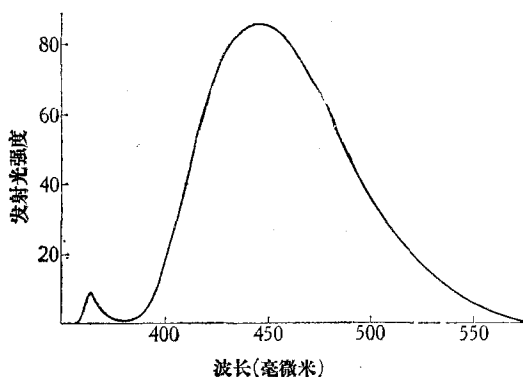


图6 硫酸奎宁的发射光谱

浓度: $1-5 \times 10^{-6}$ 克/毫升

激发光波长: 350 毫微米

发射光波长: 447 毫微米

狭缝谱带宽度: 2 毫微米

2. 硫酸奎宁的发射光谱

浓度: 5×10^{-6} 克/毫升

激发光波长: 363 毫微米

狭缝谱带宽度: 2.4 毫微米

3. 葱的发射光谱

浓度: 5×10^{-5} 克/毫升乙醇溶液

激发光波长: 296 毫微米

狭缝谱带宽度: 2.4 毫微米

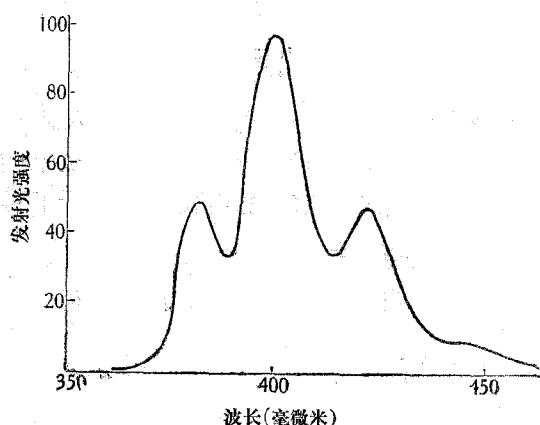


图 7 葱的发射光谱

4. Rhodamine 6 G 的发射光谱

浓度: 2×10^{-5} 克/毫升乙醇溶液

激发光波长: 544 毫微米

狭缝谱带宽度: 1.6 毫微米

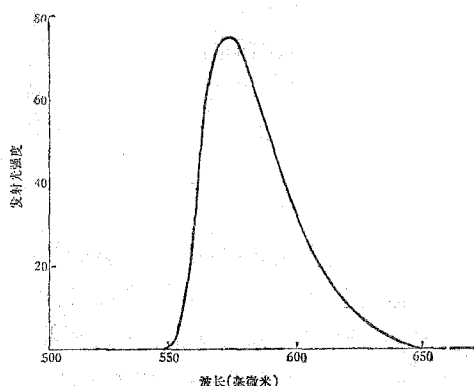


图 8 Rhodamine 6 G 的发射光谱

参 考 资 料

- [1] Udenfriend, S.: Fluorescence Assay in Biology and Medicine, Academic Press, New York (1962).
- [2] Guilbault, G. G. ed., Fluorescence, Theory, Instrumentation and Practice (1967).
- [3] 山鳥村輝郎, 分光研究, 第21卷第6号, 1972.
- [4] 瀬谷正男, 分光研究, 第19卷第1号, 1970.
- [5] Electronics, 36, 67, 1963.
- [6] Rev. Sci. Instr., 36, 809, 1965.
- [7] Electrical Design News, 4, 34, 1961.

[本文于 1975 年 8 月 25 日收到]

(上接第 24 页)

60℃水浴中略保温以除去少量乙醚, 最后将体积补充至 4 毫升。在 340 毫微米处测得光密度值为 0.79。由图 2 ϵ -TNP-赖氨酸的标准曲线查得为 0.24 微克分子氨基, 这样折算至每克脱脂面粉中赖氨酸的含量应为:

$0.24 \text{ 微克分子} \times 11.5 \times 1,000 / 400 = 6.9 \text{ 微克分子/克}$, 若以重量计算则为 6.9×145.2 (赖氨酸分子量), 也即每克脱脂面粉在碱可溶

性蛋白质中约含 1 毫克赖氨酸。

取同样样品另行测定为 6.6 微克分子/克, 两次实验间的误差低于 5%, 为了证实此方法的可靠性, 将上述蛋白抽提液在 110℃5.7N HCl 中水解 24 小时, 然后在柴田 A. A-600 型氨基酸自动分析仪上分析, 测得每克脱脂面粉中赖氨酸的含量为 6.7 微克分子, 与 TNBS 法所测得的颇为一致。