

双波长分光光度测定

唐 海 伦

(中国科学院上海生化所)

双波长分光光度测定,即差分光光度测定,比常用的分光光度测定具有更高的灵敏度和选择性,一些混浊的完整细胞悬浮液和光吸收峰互相重叠的多组分样品,用一般分光光度法难以测定,但若用双波长分光光度测定,就有可能排除干扰而进行测定。目前,双波长分光光度测定在生物化学、有机化学、无机化学和分析化学等领域中,正得到日益广泛的重视和应用。国内这一技术应用还不普遍,本文将对双波长分光光度测定的原理、方法和应用作一简单的介绍。

一、概 况

早在 1937 年, Millikan^[1] 考虑到血红蛋白(或肌红蛋白)的还原型在红光谱区吸收较大,其氧化型在黄绿光谱区吸收较大,就设计了一种装置——差分比色计(differential colorimeter),在两个硒光电池前分别放置红色和黄绿色两块滤光片,将两个硒光电池的输出生背而接,以得到两者的差输出,根据检流计偏转的方向和大小来判断色素的氧饱和度。1951 年 Chance^[2,3] 首先采用了双波长分光光度测定方法,测定混浊生物样品。他用二个单色器产生二种不同波长的单色光,借助于扇形调制器,交替照射透过肝线粒体悬浮液,从测量其不同波长的吸收差值来研究呼吸链的组分——各种细胞色素的氧化还原性质,从此,双波长分光光度测定法逐渐在各领域中得到日益广泛的应用。

二、原 理 简 介

高稳定的光源——卤素钨灯或氘灯发出的光经过两个单色器后,按需要给出二束不同波

长的光束(λ_1 和 λ_2),它们以时间分割方式($\lambda_1; 0; \lambda_2; 0 \cdots$)等时间地交替循环通过装有样品的同一个比色杯,如图 1 所示^[4],通过测量二个波长(λ_1 和 λ_2)的差吸收值 ΔA ,对样品进行精确的定性和定量分析。

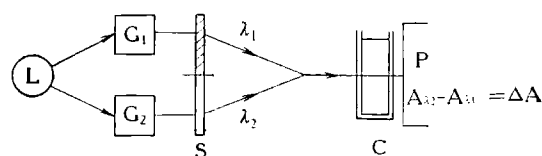


图 1 双波长分光光度计原理

L——光源; G_1 、 G_2 ——单色光器; P——光电池;
S——旋转调制器; C——比色杯

因为两束单色光通过同一个比色杯的同一位置,这样在普通分光光度测定中常会发生的,由于比色杯常数偏差和位置偏移引起的误差,由于样品和对照溶液浓度不同,混浊度的稳定性不同而引起的误差以及在化学反应过程中由于氧化还原状态不同而引起散射不同的误差都几乎能够避免,同时它是测定二种波长的差吸收,所以由于散射和其它背景吸收所造成的影响,也能通过选择适当的一对波长来消除。总的说来,双波长分光光度测定有下面几个优点:

1. 样品本身虽有很大的光吸收,但光吸收变化却很小,或有明显光散射,仍不必稀释和过滤,就可用双波长方法进行测定。
2. 对于光吸收弱的样品,测定时不需使用对比液。
3. 可以同时测定混合物中的各个组分。
4. 可以同时记录样品中同时发生的几个反应的动力学变化。
5. 这类仪器一般既可作双波长分光光度测

定,也可作常规双光束分光光度测定。

三、对 λ_1 和 λ_2 一对波长的选择

1. 等吸收法

假定一个样品含有 X 和 Y 两个组分,它们相应的吸收光谱如图 2 所示。

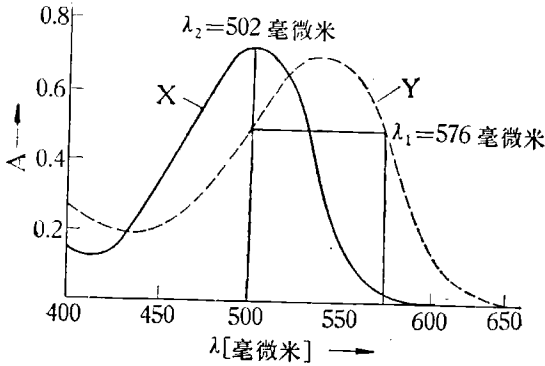


图 2 作图选择 λ_1 和 λ_2 (等吸收法)

选 X 组分的最大吸收波长作为分析波长 λ_2 ,从峰尖对横轴作垂线,它与 Y 组分的吸收光谱曲线相交,再从交点作横轴平行线,与 Y 组分的吸收光谱曲线再度相交,此交点的波长即为参照波长 λ_1 ,这样的一对波长 (λ_1 和 λ_2) 相结合时,我们就得到相应的光吸收为:

$$A_{\lambda_1} = \varepsilon_X c_X + \varepsilon_Y c_Y \quad (1)$$

$$A_{\lambda_2} = \varepsilon'_X c_X + \varepsilon'_Y c_Y \quad (2)$$

差吸收

$$\begin{aligned} \Delta A = A_{\lambda_1} - A_{\lambda_2} &= (\varepsilon'_X c_X + \varepsilon'_Y c_Y) \\ &\quad - (\varepsilon_X c_X + \varepsilon_Y c_Y) \end{aligned} \quad (3)$$

因为在波长 λ_1 和 λ_2 处的 Y 组分的光吸收相等,即

$$\begin{aligned} \varepsilon_Y c_Y &= \varepsilon'_Y c_Y \\ \Delta A &= \varepsilon'_X c_X - \varepsilon_X c_X \end{aligned} \quad (4)$$

2. 信号倍增法

如果组分 Y 在波长 λ_1 和 λ_2 的光吸收值不同时,如图 3 所示,则可用函数发生器分别倍增 λ_1 和 λ_2 的信号,使组分 Y 在二个波长上的光吸收值相等,即

$$\varepsilon_Y c_Y = K \varepsilon'_Y c_Y \quad (5)$$

则

$$\Delta A = A_{\lambda_2} - A_{\lambda_1} = K(\varepsilon'_X c_X + \varepsilon'_Y c_Y)$$

$$-(\varepsilon_X c_X + \varepsilon_Y c_Y) = K \varepsilon'_X c_X - \varepsilon_X c_X \quad (6)$$

因此,组分 X 在二个波长上的差吸收 ΔA 就与组分 Y 的浓度无关,从而可正确测定组分 X 的量。

3. 完整肝线粒体呼吸链组分细胞色素的测定

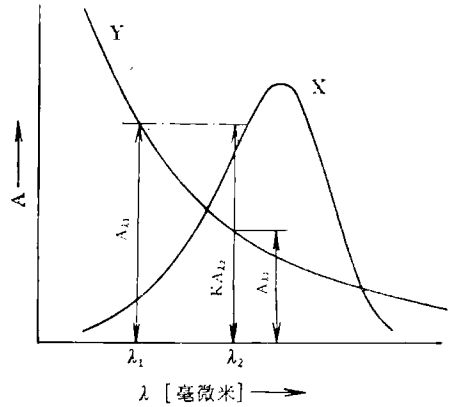


图 3 信号倍增法原理

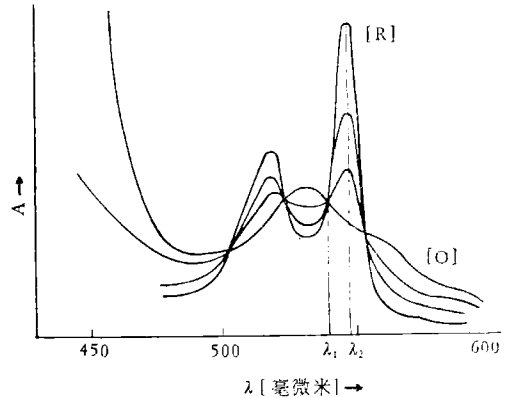


图 4 氧化型 [O] 和还原型 [R] 细胞色素 c 的吸收光谱

图 4 是氧化型和还原型细胞色素 c 的吸收光谱。测定时,选择还原型最大吸收处的波长 550 毫微米作为分析波长 λ_2 ,为了保证散射相似性,选择接近 λ_2 的等吸收点的波长 540 毫微米作为参照波长 λ_1 。通过这样一对波长的结合,我们可以不必考虑样品因膨胀、收缩和老化以及氧化还原状态不同而引起的颗粒变化,方便地跟踪观察各种实验条件下细胞色素的氧化还原程度,所以差光谱测定对研究线粒体悬液是非常合适的。表 1 是哺乳类呼吸酶活力测

表 1

呼吸链组分	NADH $\longleftrightarrow$ rfp $\longleftrightarrow$ Q $\longleftrightarrow$ b $\longleftrightarrow$ c $\longleftrightarrow$ a $\longleftrightarrow$ a ₃ $\longrightarrow$ O ₂						
分析波长(毫微米)	340	465	275	564	550	605	445
参照波长(毫微米)	375	510	290	575	540	630	455
克分子消光系数 (mM ⁻¹ 厘米 ⁻¹)	6	11	12.2	20	19	(16)	91

定中常用的波长对。

四、微分光谱测定

用相互分隔约 1—2 毫微米的一对波长进行扫描得一次微分光谱,也可直接用微分光谱光度计测定也可得到一次微分光谱,此外还可进行两次微分光谱测定。微分光谱测定具有更进一步的优点:

1. 当几个组分的吸收峰几乎完全重叠时,仍可以分辨出每个组分的吸收带。
2. 常规测定的吸收光谱线斜坡上的小吸收带或肩,可以明确地分辨出来。
3. 样品中混有掩盖样品吸收的杂质时,常规法往往无法测定,而微分光谱可以较好地消除杂质的干扰。
4. 对较宽的吸收带能精确地定位。

五、应 用

Chance 用双波长差光谱测定为研究完整线粒体悬浮液开创了一条新途径^[5]。起初,他将两个同样的线粒体稀释液,分别进行各种不同的化学处理,用差光度计测量相应的差光谱,发现完整肝线粒体悬浮液的性质与 Keilin and Hartree 的非磷酸化制剂的性质有很大不同,后者丢失了大量的 NADH、一部分的黄素蛋白和细胞色素 c。他确定了恒态时五种细胞色素的相对含量是 1:0.9:1.7:3.6:19 = a:b:c+:e: 黄素蛋白:NADH。后来,他进一步改进装置^[6],用两束波长不同的光照射同一个线粒体悬浮液,进行双波长分光光度测定,同时又将一根振动铂微电极插入液面下 5 毫米处,测定样品的呼吸变化。当在线粒体悬浮液里加入底物时,引起 340/374 毫微米光密度增加,如图 5,这表示内源 NAD 被底物还原,但是电流变化却表

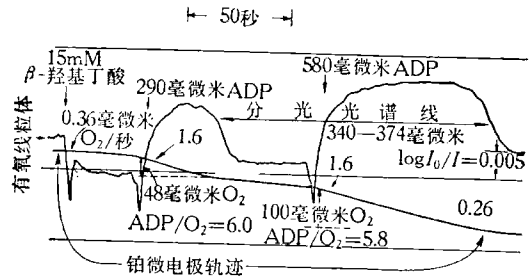


图 5 ADP 的加入和消耗引起的 NADH 恒态水平变化和呼吸速度变化之间的关系

示呼吸无明显增加,这时若加入 ADP, 340/374 毫微米光密度立即降低,但呼吸速度却增加了 4 倍,经过 1 分钟后,ADP 耗尽,NAD 又被底物渐渐还原恢复到 ADP 加入前水平,同时呼吸速度相应减慢,假如再加入两倍的 ADP 量,光谱变化同前一样,只是作用时间延长了两倍。

为了研究 ADP 对呼吸酶的作用,Chance

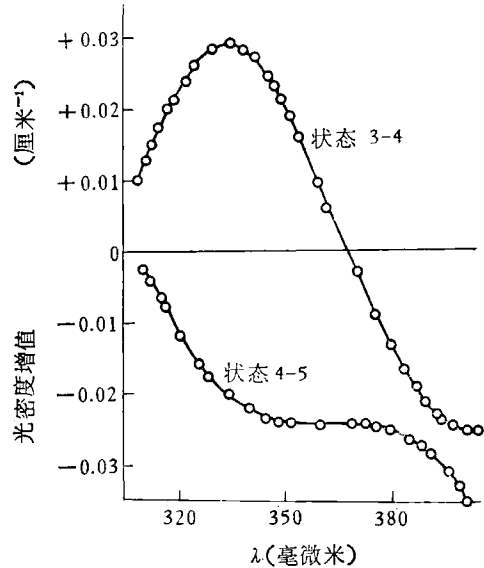


图 6 状态 4 时 NAD 已完全还原的证据特征峰出现,由此估计在状态 4 时,约有 99%的 NAD⁺被还原

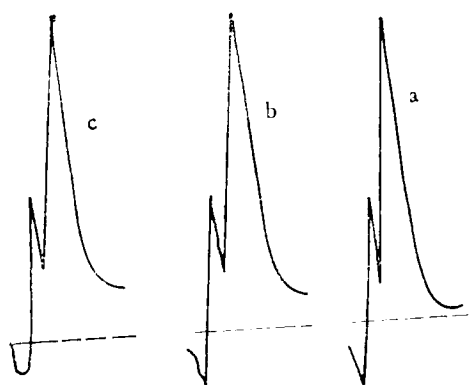


图 7 (a) 酚的吸收光谱

a——水溶液中的酚；b——没有酚的混浊工业废物；c——酚在混浊废物中

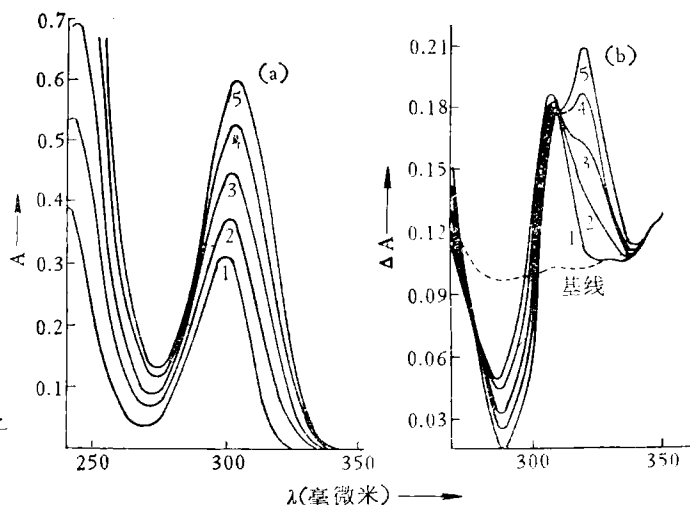


图 8 酚混合物分析

a) 吸收光谱 b) 微分光谱 ($\Delta\lambda = 2$ 微米, $S = 0.25$ 毫米)
(1) 2, 4-二硝基酚 10ppm; (2) 1 加 5ppm 2, 4, 6-三氯酚 (TCP);
(3) 1 加上 10ppm TCP; (4) 1 加上 15ppm TCP; (5) 1 加上 20ppm TCP

用差光谱测定肝线粒体有氧时状态转变中的光密度变化^[6]。在有氧的肝线粒体中(状态 2)加入 β -羟基丁酸, 可使它转变成状态 4, 即呼吸链各组分的还原状态, 这时再加入 ADP 又可使线粒体从状态 4 回到状态 3 同时全部光谱线消失, 这种光谱变化说明 ADP 能解除磷酸化对呼吸链的抑制启动氧化磷酸化。

Chance 还用差光谱测定了呼吸链组分在各

种状态下的还原程度^[6]。例如, 当线粒体从状态 4 转变到状态 5 时, 在 310—400 毫微米范围里记录 NADH 的差光谱变化, 如图 6 所示, 从图上可以看出, 并没有出现 340 毫微米上 NADH 的特征峰, 而在状态 3 转变到状态 4 时, 却有此特征峰出现, 由此估计在状态 4 时, 约有 99% 的 NAD^+ 被还原。

五十年代末期发现在线粒体中有泛醌^[7], 即辅酶 Q 存在, 并对辅酶 Q 在呼吸链电子传递中的作用开展了研究。由于当时的常规测定需先停止整个系统的化学反应, 然后将 Q 从系统中抽提出来, 再测定其氧化还原程度, 步骤繁多, 误差也大, 所得结果往往不能反映实际状况。Chance 又首先利用差光谱直接测定心肌制剂中内源 Q 的氧化还原动力学过程^[8], 后来 Klingenberg 也利用差光谱定量研究解偶联线粒体中 Q 的恒态水平和 Q 在呼吸链中的作用^[9], 发现当用抑制剂浓度来滴定呼吸速度时, Q 的氧化还原速度在动力学上符合整个链的呼吸速度, 认为 Q 是呼吸链上必不可少的组成成员之一。

Ernster 利用差光谱研究去 Q 亚线粒体颗粒中细胞色素 b 的氧化还原作用^[10]。发现去 Q 后, 一部分细胞色素 b 能为底物琥珀酸直接还

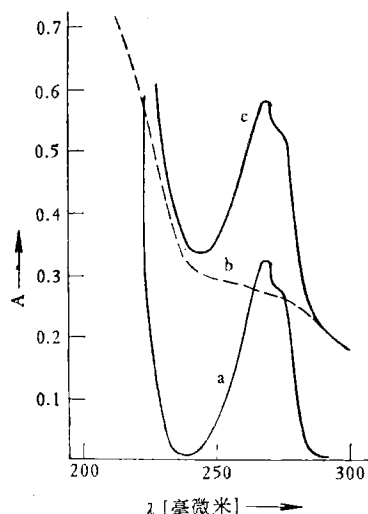


图 7 (b) 不同浓度混浊物中酚的一次微分光谱

混浊度 $a < b < c$

原,并且这部分 b 在有氧时不能被重新氧化,说明去 Q 使一部分 b 发生修改。

Kato^[11] 用 330 毫微米和 360 毫微米波长对测定血清和组织中的多巴胺- β -水解酶活力,由于这种酶活力极低,酶反应引起的光密度变化太小,以致用常规光谱测不出,现在用差光谱测定,其空白值很低,约为 0.01,使测定变得非常灵敏,可精确测出 500 pmoles 浓度的产物。

图 7(a) 是工业废物中酚的吸收光谱,由于混浊物质的作用,使酚的吸收光谱大大增加,以致常规测定无法进行;图 7(b) 是工业废物中酚的一次微分光谱^[12],可以看到,尽管混浊物质的浓度不同,酚微分光谱中的最大值和最小值之间距离不变,即通过一次微分消除了干扰的背景。

图 8(a) 是一个酚混合物的吸收光谱,由于几个组分的吸收峰重叠,无法进行精确的定性和定量分析。图 8(b) 是它的一次微分光谱^[13],清楚地表明有二个组分存在。

此外,这个技术还能应用于稀有金属的分析^[14]。例如,铈和铈这二个元素的吸收光谱部分重叠,由于铈的严重干扰,用常规法测定铈较困难,见图 9(a),但是若用一次微分分光光度法对含有高浓度杂质铈(2,000ppm)的钆溶液进行测量,结果如图 9(b),将 ΔA 对钆浓度作图,得到一根直线,完全符合比耳定律,消除了铈的干扰。

从上面的例子可以看到,双波长分光光度法为我们提供了新的有效的研究手段,特别是在关于呼吸链组成、排列及其作用方式的研究中,在关于氧化磷酸化和光合磷酸化的研究中成为必不可少的工具。目前,北京第二光学仪器厂和生化所协作正在进行这种仪器的试制。随着该仪器的试制投产,必将促进国内把这项技术应用到各种研究工作,工业生产的定量控制,药品和食品添加剂质量的鉴定,以及工业废

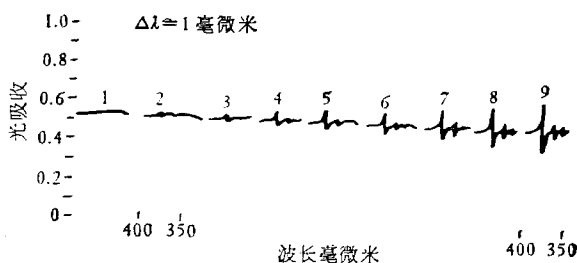


图 9 (a) 混有铈的钆盐溶液

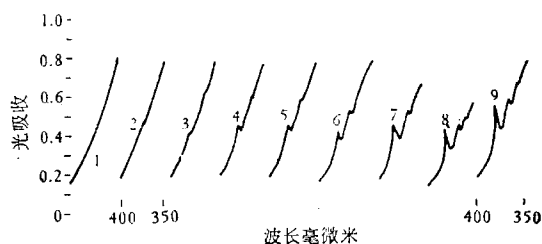


图 9 (b) 上图的一次微分光谱
物的测定等领域中去。

参 考 文 献

- [1] Millikan, G. A.: *Proc. Roy. Soc. (London)*, B123, 218, 1937.
- [2] Chance, B.: *Rev. Sci. Instrum.*, **22**, 634, 1951.
- [3] Chance, B.: *Science*, **120**, 767, 1954.
- [4] Shibata, S.: *Angew. Chem.*, **15**, 11, 673, 1976.
- [5] Chance, B. and Williams, G. R.: *J. B. C.* **217**, 395, 1955.
- [6] Chance, B. and Williams, G. R.: *J. B. C.*, **217**, 409, 1955.
- [7] Crane J. L. et al.: *Biochem. Biophys. Acta.*, **25**, 220, 1957.
- [8] Chance, B. and Redfearn, E. R.: *Biochem. Journ.*, **80**, 632, 1961.
- [9] Achim Kröger and Martin Klingenberg: *Eur. J. Biochem.*, **34**, 358—368, 1973.
- [10] Ernster, L. et al.: *Eur. J. Biochem.*, **9**, 299—310, 1969.
- [11] Kato, T. et al.: *Biochem. Med.*, **10**, 320, 1974.
- [12] Shibata, S. et al.: *Anal. Chim. Acta.* **81**, 206, 1976.
- [13] Shibata, S. et al.: *Anal. Chim. Acta*, **65**, 49, 1973.
- [14] Porro, T. J.: *Anal. Chem.* **44**, 4, 93A, 1972.

[本文于 1979 年 3 月 27 日收到]