

紫 外—可 见 分 光 光 度 计

郭 尧 君

分光光度法经过长期的研究和不断改进,已成为一种十分成熟的分析手段。又由于它具有操作较简便,灵敏度高等优点,现在用于工农业生产、医疗卫生和科学研究的范围日益广泛。例如,要开展当前人们普遍关心的公害问题的工作,进行环境污染的调查,各种类型的分光光度计就是一种很好的分析工具。如用可变波长激光做光源的分光光度计,通过测定光的吸收、荧光和散射的方法,即可测出空气中极微量的污染物质。又例如肿瘤的普查,应用分光光度法和荧光技术,已引起人们的注意。就生物科学来说,用一般化学分析方法不容易分离测定的某些生物材料的组分,利用其特殊吸收光谱,就能鉴别出来。因此,分光光度计已成为蛋白质、核酸、酶、激素、维生素等分析的基本工具。下面对分光光度计使用知识和应注意的一些事项做一扼要的介绍,供大家参考。

一、分光光度法基础

光的发射和吸收是因为原子或分子中能量的改变。当原子或分子被光激发后,其能量级可以提高一级或数级,而用来激发原子或分子的一定波长的光就被吸收,光谱中就出现一处或几处“暗”的部分,即吸收光谱。人们发现,在紫外光区中,吸收的情况不仅和物质的集团态有关,而且和它们的原子或分子的性质有关。随后在对简单的有机化合物进行系统的研究时看到,化合物的吸收光谱主要是分子中某一基团的特征。如简单的酮类在 270—300 毫微米之间都有一个吸收峰;所有酮类化合物的吸收曲线形状相似,只是随着分子量的递增,吸收峰朝着长波方向移动,其强度也随之增加。

分光光度法的原理以两条定律为基础,即布给定律 (Bouguer's Law 又称朗伯定律或朗伯-布给定律) 和比耳定律 (Beer's Law)。布给定律说明被吸收的比值和吸收介质厚度有关,但与入射光的强度无关。比耳定律是说明吸收比和吸收物质在溶液中的浓度的关系,表明光的吸收和光所通过的吸收分子的数目有关。但是布给-比耳定律只能适用于低浓度的溶液,且只能适用于单色光辐射。化学变化、压力变化、介质漫射、低温等都会产生和布给-比耳定律不相符合的情况。

二、分光光度计的结构与性能

一般分光光度计有:光源、单色器、样品室、检测

器、电源及放大线路等几个部分。

1. 光源 一般用钨灯、氢灯(重氢灯)和汞灯等。钨灯的使用范围为波长 340—3000 毫微米左右。氢灯为 150—400 毫微米左右。汞灯为不连续光谱,作校正波长用。

这些灯都有一定使用时数的限制,当光亮度变弱影响测量时,就应该换用新灯。氢灯和汞灯的寿命为 1000 小时左右。

注意不要去碰灯的窗口,因为手上的油污经紫外线照射后,在窗口上形成的痕迹擦不掉,灯会损坏。

2. 单色器 这是仪器的主体。常常是密封的,不要轻易拆动。里面主要有:

(1) 分光器 常用的分光器为稜镜或光栅。稜镜和光栅各有优缺点:常用的列特罗(Littrow)稜镜,节省材料,色散效果好,但杂散光大,故常须配用滤光片,去掉杂散光。一般来说,光栅分辨率比稜镜大,且波长范围大,谱线排列均匀,但不如稜镜坚固,杂散光的影响也比稜镜大。

(2) 狭缝 分入射狭缝和出射狭缝。常用同一旋钮控制,当入射狭缝和出射狭缝相等时,能得到最好的谱带宽度。谱带宽度越小,单色光越纯,就越符合朗伯-比耳定律。但过窄时,光强度太弱,影响测定灵敏度。所以选择合适的狭缝宽度是很重要的,特别在吸收峰陡的情况下更是如此。

(3) 滤光片 在有些单色器中配有滤光片,主要用于防止某一波段的杂散光的影响。有的单色器中还配有光圈,主要用于控制光的强度,以便根据实验需要,选择合适的强度。

在单色器中一般都有干燥剂室,内装硅胶,应经常更换,以保护稜镜和反射镜不受潮。

3. 样品室 有的具有恒温设备,也有需另加恒温装置的。

吸收池分石英和玻璃两种,形状不同,容量也不同。紫外区一定要用石英池,可见区可用玻璃的,也可用石英的。吸收池要维护好,光学面不能损坏。用后一定要及时洗涤干净。用中性皂液或用 3N HCl 加 45% 酒精等量混合液浸泡,然后用水冲洗。

一组吸收池的透光率可能有误差,所以在精确的定量测定前,应对吸收池进行本底校正。

4. 检测器 常根据不同的波长范围来选用。180—700 毫微米左右,常用各种类型的光电倍增管。

600—3000 毫微米左右,常用硫化铅光电池,铯光电管等。

检测器室中也有干燥剂(硅胶),需要经常更换,以保证光电倍增管绝缘。光电倍增管不要长时间曝光,否则会使噪音增加。光电倍增管通电后,长时间过强的光照会造成永久性损坏,所以绝对不允许通电以后暴露在日光下。在连续测量时,一定要养成随时关闭光闸的习惯,以保护光电倍增管。

硫化铅光电池切忌受紫外线照射,否则会降低其灵敏度。

三、紫外分光光度计的调试

一般分光光度计在使用前需要调整光源和波长的位置,有的还需要调试灵敏度。

如果光源不在最佳位置,就会影响谱带宽度和测定灵敏度。如果波长位置不对,则会引起根本性测定错误。

1. 调光源 将光源位置调好,目的是使光路中有最大的光强度。分粗调和细调两步:

(1) 粗调 先开光源,待稳定后,看光斑是否在关闭的人射狭缝的正中央。或放在一定的波长位置(如 540 毫微米),开大狭缝,用调节螺丝调节灯的位置,使在光闸前出现最大最亮的黄绿色光斑。然后进行细调。

(2) 细调 通过电流表指针指示。即在粗调后,逐步关小狭缝,进一步调节固定光源用的螺丝或板架,使指针指示最大的透率。

2. 波长校正 利用光源的不连续光谱,即辉线(特征谱线)或某些样品的特征吸收光谱,核对波长旋钮指示的波长和从出射狭缝出来的单色光波长是否符合。校正方法比较多,下面介绍几种,供选用。

(1) 用氢灯校正 氢灯为紫外分光光度计最常用的光源,用它校正,比较方便。氢灯辉线在 656.3 毫微米和 486.1 毫微米。待稳定后,选择合适的狭缝大小,在 650 毫微米附近慢慢旋转波长钮,当电流表指针指示最大透过位置时,读出波长读数。如果正好是 656.3 毫微米,说明仪器波长位置无误,否则,表明需要进行校正,一般的仪器,可调节准直镜的位置即可(准直镜的调节螺丝常常位于单色器的左侧)。

(2) 用汞灯校正 氢灯不能用作精密校正,精密校正要用汞灯,因为汞灯辉线多。检查方法与氢灯相同。可先核对 546.1 毫微米的波长,进行校正。然后核对所有辉线波长,再进一步校正。

(3) 用样品校正 查得样品的吸收光谱图后,就可用样品来校正波长。如苯蒸气可用作紫外区的波长校正,高锰酸钾、硫酸钴、铬酸钾或重铬酸钾等可用作可见区波长校正。所用样品最好是光谱纯的,否则会因为样品中杂质的干扰,使校正产生误差。

四、紫外分光光度计的附件及应用

仪器配上不同附件后,用途可以扩大,这样就可以提高仪器的利用率。现在常见的附件有:

1. 长吸收池 用以测量低浓度溶液的吸收。光径有 20 毫米、50 毫米、100 毫米等。

2. 微量池 用于微量试样的分析。种类很多,现在见到的最小微量池光径为 0.1 毫米,容积为 0.03 毫升。

3. 恒温室 有的仪器将它作为标准配件,也有的作为附件。可与恒温水浴连用,使样品保持恒温。有的恒温室还可以通液氮,使吸收峰在低温下强度增加,峰形变窄,使原来交叉的吸收峰分开,便于分析。使恒温室升温,则可作核酸的“熔点”测定等。

4. 流动池 一般分光光度计均有此附件,有的还带有微量流动池。用这个附件测量柱层析的洗脱液,可以节省大量人力。

5. 自动加样装置 随着测量和记录系统自动化,加样工作也在革新。自动加样装置现在一分钟能加 2 个甚至 6 个样品,结构也各式各样。例如有把液体分析室制成垂直的透明管状,里面装着特殊形状的浮子,利用浮子的上下换样。也有把液体室制成试管状,在其内“焊”一根伸到试管底部的细管,此细管借助于多通路阀门系统与真空泵来完成换样的工作。

6. 光度滴定附件 在滴定的同时进行分光光度测定,以便迅速指示滴定终点。它可作络合滴定,氧化还原滴定,荧光光度滴定以及用肉眼难以辨别终点的滴定。

7. 反射和表面色积分计算器 用于测量光谱反射及不透明物质的比色。生化分析不常用。

8. 火焰光度和原子吸收附件 原子吸收分光光度法是一种分析金属元素的新方法,优于火焰光度法。主要用于钢铁、冶金生产,也可用于分析土壤、生物组织中的金属元素及其含量。

9. 旋光分散(ORD)附件 用于测量分子旋光度和物质在不同波长的光学活性,以解析生物大分子的立体结构。如一般氨基酸在通常测量的波长范围内,具有平坦型旋光光谱曲线。除去少数的例外,氨基酸的这种谱线清楚地反映了 α -碳原子的结构。氨基酸(L-脯氨酸例外)和铜离子生成的蓝色复合物的旋光谱在 530 $\pm$ 10 毫微米附近出现高峰。它的 Cotton 效应就是和不对称 α -碳原子的构型有关。

10. 圆二色性(CD)附件 测定某一物质对左旋、右旋圆偏振光的吸收情况的不同,从而研究生物大分子的立体结构。圆二色光谱对于研究螺旋形的大分子

更为合适。如在多肽化合物中,酰胺基 $\text{—}\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C—NH}$ 的 $\pi\rightarrow\pi^*$ 跃迁的吸收峰在 185 毫微米区域内。在此波

长范围中这种化合物的圆二色光谱出现高峰和低谷,据此可以推定多肽分子为不规则的卷曲,或者是规则的 α 螺旋及 β 折迭。

11. 显微分光光度附件 分光光度计配用的显微镜装置。加上此附件就可对组织切片中某一很小的区域(可为几个微米或几十个微米)进行分光光度分析。例如可用来测定以富尔根法染色的单个细胞核的DNA含量。

12. 色层谱及显象密度计 用于测定层析条和电泳条的光密度。随着薄板层析和聚丙烯酰胺凝胶电泳分析技术的发展,这种附件正在逐步变为一种专用的仪器。如双波长薄层层析扫描计就是用于纸层析、薄板层析、凝胶电泳的吸收光谱和荧光光谱的扫描。

13. 测定半透明、不透明样品附件 由于介质漫射不符合布给-比耳定律,所以一般分光光度计要求样品为均匀而透明的溶液。如为混浊样品就需附加测定半透明和不透明样品的附件。为了适应生物学样品中诸如光合磷酸化、氧化磷酸化等混浊样品的需要,近年来已有不少型号的双波长分光光度计可供选用。

14. 荧光附件 某些物质经入射光照射后,吸收了入射光的能量,从而辐射出比入射光波长为长的光线,这种光线称为荧光。一种物质所发射出的荧光的波长和它的化学结构有关。而荧光强度在一定条件下,与该物质的浓度成正比。所以,可以根据测定出的荧光波长、强度进行定性和定量分析。这就是荧光分析法的基本原理。荧光分析法的灵敏度比分光光度法大几个数量级。例如对荧光量子产率很低的DNA,含量只有3毫微克,用灵敏的荧光法也能测出。这比分光光度法高2—3数量级。

五、分光光度计的一些进展

最后再对分光光度计的一些进展情况做一些介绍。近二、三十年来随着科学技术的发展,分光光度计的进展很快。我国生产的WFD-G型等几种紫外—可见分光光度计,性能正在不断改进。它带有荧光、火焰、旋光、浊光、白度及原子吸收等多种附件。同时,国产的还有荧光光度计、火焰光度计、原子吸收分光光度计以及旋光仪等可供研究及生产的需要;还有荧光分光光度计、激光喇曼分光光度计等亦已在研制之中。

近年来由于利用了科学技术领域中的一些新成就,采用了新元件、新工艺、新材料,使近代分光光度计的面貌日新月异,灵敏度、精确度和自动化程度也不断提高,特别是与电子计算机连用,已使分光光度计成为实验室定量和定性分析的更为有力的工具。

在分光光度计的光源和激发源方面,最引人注意的进展是使用激光。例如用可变波长激光做光源的分光光度计,可测定空气中污染物质的含量。用短脉冲激光作光源,可以观察快反应,是研究多种原发反应的

重要手段。

在分光元件方面,原有的光学玻璃、石英人造宝石以及其它材料制成的稜镜仍在应用。但在许多场合下已用较新的元件——光栅来代替。目前先进的是干涉型分光计。其突出优点是对光源能量的利用率高,因而可用来增大光谱的信噪比,缩短记录图谱所需的时间或增大分辨率。同时干涉型分光计的波长应用范围大,可扩展到微波波段。

在滤片装置方面,最近出现了胆甾醇液晶滤光片,它的实用价值有待于进一步研究。

在电子线路与自动化方面,从电子管电路、晶体管电路发展到集成电路化,使仪器更加小巧、坚固,性能可靠。更重要的进展是同数字显示器、打字机、印刷机和小型电子计算机连用,省去了繁杂的数据记录及处理。目前有的自动干涉型分光光度计,它的计算机部分不仅能对分析信号进行数据处理,而且能同时对分析部分的动作进行精确地控制,共同构成一个完善的自动分析系统。关于生物学研究采用的穿孔带记录结果的自动扫描分光光度计,T. Seim曾有介绍。

为了满足不同研究工作的需要,已经有各种适用于特殊要求的分光光度计可供选择。如有用于混浊样品测量的双波长分光光度计,用于薄层层析及凝胶电泳的色层谱扫描装置,用于分析金属元素的原子吸收分光光度计,用于测定分子立体构型的旋光光谱仪,还有可作多种用途的多用途分光光度计以及用于酶动力学研究的快速扫描分光光度计等等。为研究动态变化,进行快速分析和追踪化学反应过程,必须提高时间分辨率,可采用高速度波长扫描型的分光光度计。目前这种分光光度计已能在0.15秒内测出400—700毫微米波段上的吸收光谱。在脉冲激光等技术的推动下,快速反应的测定提高很快,已达 10^{-6} — 10^{-9} 秒。使用激光脉冲光源(亦有使用脉冲氙灯的),不但可以提高灵敏度,而且也是提高波长转换频率的一个有效的方法。因此采用这种光源来作生物混浊样品的快速反应测定是有前途的。

Mayer和Chance等介绍了他们实验室新设计仪器。这种仪器的原理是基于间断性的测量,只要间歇的时间足够短,可以和连续性的测量得到同样的结果。他们利用这个原理,用两种波长的光交替通过样品室,可以用一种波长的光作为参照束,测量样品对另一波长的光的吸收的变化。用这种方法比双波长双光束同时透过样品室的方法优越。因为它可以避免在混浊样品中两种波长的光相互干扰。根据同样的原理,以四种波长的光交替透过样品室,并且交替测量光吸收和荧光,可以在一个混浊样品中,同时测量一种物质的光吸收变化和两种物质的荧光变化。这对于叶绿体和线粒体的研究是一个很有力的工具。