

荧光光谱校正的原理和方法(上)

李 治 湘

(中国科学院生物物理研究所)

已校正过光谱的荧光分光光度计测绘的是荧光化合物的真实光谱。如果荧光化合物的吸光度为已知,由真实发射光谱的荧光面积可以求出该荧光化合物的相对量子产率或绝对量子产率。已校正过光谱曲线的纵座标能够直接以光量子数表示。因为光量子能量与频率 ν 或波数 μ^{-1} 成直线关系,如果以频率或波数作光谱曲线的横座标,还可以观察荧光化合物荧光发射光谱同荧光激发光谱或吸收光谱的镜像对称。同一种荧光化合物在不同工厂、不同型号的已校正光谱的荧光分光光度计上,测绘的光谱不仅能得到荧光峰值的重合,还能得到形状一致的光谱曲线。

早年出产的荧光分光光度计都是未经校正的。虽也能对荧光化合物作定性定量分析,由于测绘的是荧光表观光谱,同一种荧光化合物在不同工厂、不同型号的仪器上得不到形状一致的光谱。用这种仪器求荧光化合物的量子产率,手续非常繁琐,需首先测出仪器的校正曲线,根据表观光谱逐点描绘出荧光化合物的真实光谱,然后再进行计算。

本文介绍如何测定未校正荧光分光光度计的校正曲线和已校正荧光分光光度计的光谱校正的原理和方法。

一、荧光分析灵敏度

克分子消光系数 ϵ 的大小标志该物质的吸光能力。因而,在分光光度法中,分析灵敏度常以所测定的吸光物质的克分子消光系数 ϵ 来衡量。因为吸光能力强的物质其发射荧光的能力也强。所以,荧光分析灵敏度决定于所测定荧光物质对于选定频率的激发光的吸收程度。不同荧光物质在吸光之后,发生荧光的效能不同。因此荧光分析灵敏度以所测定的荧光物质的克分子消光系数 $\epsilon(\lambda)$ 与荧光量子产率 $\phi(\lambda)$ 的乘积为标志。除此以外,荧光分析灵敏度还取决于使用的仪器,包括:

$K(\lambda)$ ——探测效率 单色器集光能力愈强,探测器的灵敏度愈高,则探测效率愈大。在不同波段上,仪器的探测效率不同,探测效率是波长的函数。

$I(\lambda)$ ——激发光强度 不同型式、不同功率的光源其辐射能力不一。不同激发单色器的集光能力也不一。激发光强度随波长而异,是波长的函数。

$H(\lambda)$ ——荧光峰的半谱带宽度 由于受单色器谱带宽度所限,用荧光分光光度计测出的只是靠近荧光峰的一个狭窄的频带,而不是整个荧光光谱。单色器的频带宽度随波长而变化,所以荧光峰值的半谱带宽度是波长的函数。

荧光分析灵敏度可由下式。

$$F(\lambda) = \frac{\epsilon(\lambda)K(\lambda)\phi(\lambda)}{H(\lambda)} \quad (1)$$

表示。从(1)式看出:荧光分析灵敏度不仅由被测物质决定,还取决于所使用的仪器。因此,同一被测物质在不同仪器上的分析灵敏度不同,为了使荧光分析灵敏度不取决于仪器,必须设法克服仪器因素的影响。

二、影响荧光分析灵敏度的仪器因素

影响荧光分析灵敏度的仪器因素主要是荧光分光光度计中具有光谱特性的三个重要部件:光源、单色器和光电倍增管。

(一) 光源

荧光分光光度计大都采用氙灯作光源。这是由于氙灯近似于点光源,氙灯所发出的光能强度大、谱带宽,而且是连续光谱。这些射线连续分布在2,500—7,000埃的光域内,在3,000—4,000埃的波段内强度几乎相等。氙灯的缺点是紫外区的辐射光能较弱,只有采用大功率的氙灯,在紫外区才有较大的输出。氙灯需直流供电才稳定,功率愈小,愈需要稳定性高的电源。氙灯的使用受电源要求所限,电源波动造成光强波动。稳定性极高的电源供电也不能完全克服弧光通过电极时产生的“弧光波动”。虽然,良好的灯的结构和稳定的电源供电可使“弧光波动”趋向好转,但“弧光波动”终将引起激发光谱的轻微漂移。通常采用椭圆形聚焦,光电倍增管打拿极负反馈或自动调节狭缝宽度等办法加以克服。氙灯是光谱元件,其输出光能随波长而改变,光能最强的峰值波长为4,500埃,所以可用氙灯的峰值波长来校正仪器波长精度。氙灯用作荧光分光光度计的光源,通常适应的波长范围为2,400—6,100埃。

(二) 光电倍增管

荧光分光光度计用光电倍增管作为探测器,以提高仪器灵敏度。当化合物的荧光很微弱或当狭缝开启很小时仍能探测到信号。因而,在单色器线色散一定的情况下,相应提高了仪器的实际分辨率。

光电倍增管是具有光谱特性的器件,其灵敏度随波长而变。光电倍增管的光谱特性取决于光阴极的材料。对于“兰敏”的光电倍增管,其波长范围为 2,100—6,300 埃,最佳灵敏波长为 4,000 埃附近。国产的 GDB-151 光电倍增管其波长范围可达,1,850—8,500 埃。

(三) 单色器

1. 平面衍射光栅

荧光分光光度计有采用棱镜作色散元件的,但目前多用平面衍射光栅作色散元件,我们以平面衍射光栅的色散元件为例来说明。

平面衍射光栅是在极光洁的金属平面上,以很细密的间隔刻划很多的平行道沟构成。

光栅有个基本公式,称光栅方程式

$$m\lambda = d(\sin \alpha + \sin \beta) \quad (2)$$

式中:

- m ——光谱级数,
- λ ——辐射波长,
- α ——入射角,
- β ——衍射角,
- d ——每两条道沟间的距离(光栅常数)。

当入射光垂直照射于光栅时,入射角与衍射角相等。是 0 级光谱。当 $m = 1$ 时为一级光谱。当 $m = 2$ 时,为二级光谱……。

光栅分辨率系指将波长相近的两条光谱线分开的能力,光栅的分辨率取决于每单位长度内刻划平行道沟的数量。刻划数愈多,分辨率愈高。光栅的分辨率可由下式表示:

$$R = \frac{\lambda}{\Delta\lambda} = mn \quad (3)$$

式中:

- λ ——分开的两条谱线的平均波长;
- $\Delta\lambda$ ——两条谱线的波长差;
- m ——以厘米表示的光栅长度;
- n ——光栅的总沟数。

从(3)式可见:光栅在全光谱范围内具有同样的分辨率和线性色散,这是比之棱镜的优点。此外,一级光谱闪耀波长的集光效率非常高,光栅对光能的损耗较少。

2. 狭缝

在确定单色器的分辨率时狭缝宽度是一个重要的参数。有两种表征狭缝宽度的方法,一种是实际狭缝宽度,以 mm(毫米)为单位,表示狭缝的实际宽度。一

种是光谱狭缝宽度,以 $m\mu$ (毫微米)为单位,表示通过狭缝的光谱带宽度。荧光分光光度计通常采用两狭缝同时等宽度调节的对称狭缝。其狭缝宽度与透过单色器光谱的纯度及光能大小可由图 1 所示等腰三角形表示。中心波长即荧光分光光度计波长盘上读到的波长。峰值透射比一半的谱宽称半谱带宽,即出射狭缝的谱带宽度。从出射狭缝出来的光谱,即出光谱带全宽度两倍于出射狭缝谱带宽度。对称狭缝在光谱狭缝宽度内包含有 $3/4$ 的透射光能,而不纯的光只占 $1/4$ (见图 1 阴影部分)。从下面的分析可以看到,衍射光栅单色器,对于给定的狭缝宽度,出光谱带宽度是

相对透射比

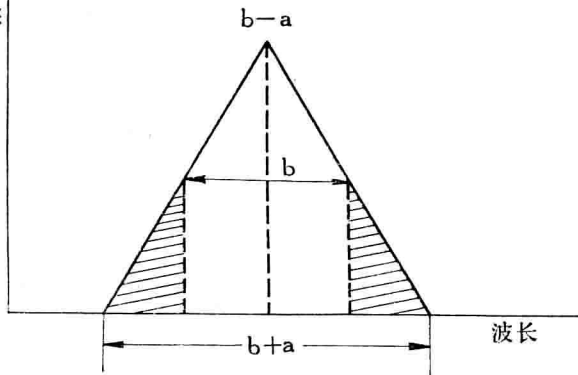


图 1 狭缝与光能的关系

- a ——入射狭缝宽度; b ——出射狭缝宽度;
- $a + b$ ——出光谱带宽度。

一个常数值,这一常数值仅仅取决于光栅参数和单色器的焦距。

若光栅方程式(2)中入射角 α 一定,将衍射角 β 对波长 λ 微分,得到

$$\frac{d\beta}{d\lambda} = \frac{m}{d \cos \beta} = D$$

D 称角色散。角色散与光栅常数 d 成反比,光栅道沟数愈多,角色散愈大。虽然角色散可以衡量衍射光栅的色散能力,但为单色器光路设计方便,常采用线色散的倒数来衡量。线色散是角色散 D 与单色器焦距 F 的乘积,线色散的倒数是

$$l_D = \frac{d \cos \beta}{Fm}$$

狭缝谱带宽度 B 与角色散 D 、焦距 F 、狭缝实际宽度 W 的关系为:

$$B = \frac{W}{FD} = I_D W = \frac{d \cos \beta}{Fm} W \quad (4)$$

从(4)式可得出结论:衍射光栅单色器的狭缝谱带宽度不是波长的函数,在任何波长上都是常数值。

三、校正系数与校正曲线

(一) 表观光谱与真实光谱

荧光分光光度计的光谱特性未加校正而测绘的光谱称表观光谱。表观荧光激发光谱的荧光强度与激发光强度 $I(\lambda)$ 、荧光物质的克分子消光系数 $\varepsilon(\lambda)$ 、以及量子产率 $\phi(\lambda)$ 成正比。表观荧光发射光谱的荧光强度与探测效率 $K(\lambda)$ 、克分子消光系数 $\varepsilon(\lambda)$ 、以及量子产率 $\phi(\lambda)$ 成正比。

荧光分光光度计的光谱特性加以校正后测绘的光谱称真实光谱。真实荧光激发光谱和真实荧光发射光谱的荧光强度都只与荧光物质的克分子消光系数和量子产率有关。

表观光谱与真实光谱的区别在于前者受仪器自身光谱特性的影响,而后者则不受这种影响。

若以 Q 表示单位时间,全部波数范围内荧光发射的总量子数, $\frac{dQ}{d\mu^{-1}}$ 表示某任意波数下的荧光强度,则 $\frac{dQ}{d\mu^{-1}}$ 对波数作图便是真实的荧光发射光谱。

若以同一波数下灵敏度不变的探测器输出 $A(\mu^{-1})$ 表示表观光谱,则可以得到表观发射光谱与真实发射光谱的关系式:

$$S(\mu^{-1}) = \frac{A(\mu^{-1})}{\frac{dQ}{d\mu^{-1}}} \quad (5)$$

式中: $S(\mu^{-1})$ ——用波数表示的校正系数。

(二) 校正系数

影响荧光分析灵敏度的仪器因素是光源,光电倍增管和单色器。因此,荧光发射光谱的校正系数可以表示成:

$$S(\mu^{-1}) = B(\mu^{-1})P(\mu^{-1})L(\mu^{-1})$$

式中:

$B(\mu^{-1})$ ——在波数 μ^{-1} 时,以波数表示的出光谱带宽度,

$P(\mu^{-1})$ ——在波数 μ^{-1} 时,探测器每接收一个光量子的输出。

$L(\mu^{-1})$ ——单色器对波数 μ^{-1} 的光透射比。

由(4)式已知,衍射光栅单色器出光谱带宽度不是波长的函数,在任何波长下都为常值,因此对衍射光栅型单色器的荧光分光光度计, $B(\mu^{-1})$ 是常数,上式可简化为:

$$S(\mu^{-1}) = P(\mu^{-1})L(\mu^{-1}) \quad (6)$$

如果分别以波长 λ , 频率 ν 作自变数,也可得到波长、频率表示的校正系数 $S(\lambda)$ 和 $S(\nu)$ 。

因为 $\nu = \frac{c}{\lambda}$ (c 是光速), $\mu^{-1} = \frac{1}{\lambda}$ 。根据复合函

数微分:

$$S(\nu) = \frac{A(\nu)}{\frac{dQ}{d\nu}} = \frac{A(\lambda)}{\frac{dQ}{d\lambda} \cdot \frac{d\lambda}{d\nu}} = \frac{A(\lambda)}{\frac{dQ}{d\lambda}} \cdot \frac{c}{\lambda^2} \quad (7)$$

$$S(\mu^{-1}) = \frac{A(\mu^{-1})}{\frac{dQ}{d\mu^{-1}}} = \frac{A(\lambda)}{\frac{dQ}{d\lambda} \cdot \frac{d\lambda}{d\mu^{-1}}} = \frac{A(\lambda)}{\frac{dQ}{d\lambda}} \cdot \frac{1}{\lambda^2} \quad (8)$$

所以,以波数、波长和频率表示的校正系数三者间的关系为: $S(\mu^{-1}) = S(\nu) = S(\lambda)/\lambda^2$ (9)

(三) 校正曲线

以 μ^{-1} 作横座标, $S(\mu^{-1})$ 作纵座标描绘出每一个 μ^{-1} 时的 $S(\mu^{-1})$ 曲线,称为 $S(\mu^{-1})$ 对波数 μ^{-1} 的校正曲线。同样,校正曲线也可用 $S(\lambda)$ 对波长 λ , 或用 $S(\nu)$ 对频率 ν 作图表示。仪器的校正曲线反映了仪器的光谱特性,采用不同单色器、不同光电倍增管的不同型号仪器,校正曲线的形状不一样,若需在没有校正装置的荧光分光光度计上测绘出真实光谱,首先必需设法找到该仪器的校正曲线 $S(\mu^{-1})-\mu^{-1}$, 然后,由该仪器绘出样品的表观光谱 $A(\mu^{-1})-\mu^{-1}$, 最后根据(5)式逐点计算出真实光谱。

(待续)

科技消息

一种简单、快速的 DNA 微量测定法

由于 DAPI (4, 6-二脒基- α -苯甲噻唑 $\cdot 2\text{HCl}$) 可以和 DNA 形成特异复合物,因此可用荧光法对 DNA 进行定量测定。DNA 测定的最低浓度可达 5×10^{-10} 克/毫升,即使含 RNA 杂质高达 20 倍,测量也不受影响。复合物的形成取决于 DNA 与 DAPI 的比例、DNA 的结构、离子强度以及重要二价阴、阳离子的存在。DNA 与 DAPI 的比例不要使荧光达到最大强度。溶液的离子强度太大会减弱复合物的荧光强度,因此最好低于 0.1。DNA 的天然聚合状态愈高,荧光也愈强,解聚的或变性的 DNA,荧光变弱。

摘自 *Anal. Biochem.*, **83**, 1, 1978.