

二维荧光光谱与多道光检测器

江丕栋

(中国科学院生物物理研究所,北京)

荧光光谱技术有很高的灵敏度和特异性,被广泛用于物质成份分析,发展很快。对荧光光谱术的要求是不断提高灵敏度、准确度和分析速度,特别是增强荧光分析法的选择性,提高对多成份复杂物质的分析能力。在使用激光器作为激发光后,灵敏度大为提高。但是在室温下荧光谱比质谱或红外谱的谱带要宽,在分析复杂的混合物中某一成份、尤其是含量比例较低的成份时,苦于荧光谱带之重叠,常需要用化学或物理方法预先将样品分离或提纯。

为减少样品预处理的麻烦,将荧光技术用于多成份分析,发展了导数光谱术、同步激发、低温荧光测定、位置选择光谱术、毫微秒时间分辨光谱术等。七十年代后期,采用了不断发展的光电图像检测器,可同时记录许多波长的发光强度。再加上采用表现整个光谱的激发-发射矩阵(Excitation-Emission Matrix)(EEM)方法,可以同时得到荧光的激发光谱和发射光谱,即二维荧光光谱,并可覆盖相当宽的波长范围。

光电图像检测器作为一种多道光检测器,不仅是获得二维荧光光谱的关键部件,而且还具有广泛的用途。在介绍二维荧光光谱之前,先谈一下多道光检测器。

一、多道光检测器

1. 多道的优点 一般的荧光谱仪用光电倍增管作为光检测器,每一时刻只能测量一个光信号,必须依次改变波长逐个测量光强。设想有 N 个检测器排成一行,就可以测量 N 个不同的光信号,形成一个多道光检测器。显然,多道比单道有优越性。当多道检测器的每一道与单

道检测器相同时,对同样的总测量时间, N 道同时观测 N 个信号比单道依次观测 N 个信号来说,信噪比高到 $N^{1/2}$ 倍;为达到相同的信噪比, N 道检测器只用 $1/N$ 的时间。

2. 二维多道检测器 许多光检测器排成阵列,就形成二维的多道检测器。感光乳胶板和电视摄像管都是常用的二维多道光检测器,乳胶的灵敏度较低,电视摄像管应用最广、发展最好。

3. 光电图像检测器 这种光电成像器件的结构,主要可分为四个部分

① 光电转换部分 是将光学图像转换成电的模拟图像的换能器,由光电阴极或光电导体来实现。

② 移像倍增系统 将像由光阴极移至“靶”上,通过光电子聚焦、加速来实现。其作用一是使靶与光阴极分开,二是使光电子倍增,成为增强级。

③ 潜像储存 通过光电导体的“靶”来实现。光学像的光子直接打到靶上,或是光阴极发出的光电子经移像或倍增打到靶上。靶释放光电子或产生电子-空穴对,每一点所储存的电荷正比于光学图像相应点的光强。

④ 视频读出 靠电子束扫描来实现,包括电子束的产生、(加速)、聚焦、偏转、(减速)。电子束在二维阵列上扫描选址,读取贮存电荷多少的信号。

一般工业电视所用的光电导摄像管(或称视像管,vidicon),换能器是光电导体,不包含第②部分。广播黑白电视常用的超正析像管(superorthicon)或移像式正析像管,不是在第②部分实现光电子倍增,而是扫描电子束取回信号

时电子经百页窗式二次电子倍增电极而倍增。

微光检测最常用的是硅增强靶视像管(SIT Vidicon),见图1。光电子经6—9千伏加速,静电聚焦到硅靶上。硅靶直径16毫米,是在 α 型硅片上沉积 $1,000 \times 1,000$ 阵列的P型硅岛;每个岛形成一个二极管,阳极连到一起,阴极由电子束选址。例如美国RCA公司的4804型,以及Princeton Applied Research Corporation的1205D及1254型。

一种全固体化的二维光检测器,称作“自扫描二极管阵列”,由很多25微米的光电二极管排成二维阵列,每个光电二极管各有一个MOSFET多重开关,用数字移位寄存器来选址。如Reticon Corporation的RL 1024 S型。

为进一步提高测量微光的灵敏度,发展了一种电子轰击型的自扫描二极管阵列,国外商品名称为Digicon,光电子经25—30千伏加速,倍增4,000—5,000倍,再打到二极管阵列上。提高灵敏度除用电子轰击法,还可用微通道板像增强器来使光电子倍增。这种像增强系统也在不断改进。

4. 应用 美国化学会在1978年召开了一个关于“多道图像检测器”的学术讨论会,讨论内容涉及到各方面的应用。在化学反应动力学的停流实验中,需快速测量光谱从而决定中间产物的数目和类型,或要同时测量在几个波长处的吸收随时间的变化,多道光检测器可以满足这种要求。在进行时间分辨光谱分析(动态光谱分析)时,用一维的多道光检测器,可得到每一瞬时的不同波长的光强数据,即得到整个光谱,就可以快速地观察整个光谱的动态变化。在

微微秒激光光谱术中,可测量三维(波长、时间、强度)微微秒光谱。在分析超离心中用于快速获取光谱。在质谱分析中用作离子检测器。二维的检测器相当于一个摄影机,在荧光显微分光光度术中可用以观察活细胞。

曾有人用一维的增强二极管阵列作化学发光的动态分析,二维光电检测器记录被均匀光照所激发的薄层色谱的荧光。在流式细胞荧光术中,可将荧光色散到二维检测器的光敏表面,同时记录不同波长的荧光。由于细胞流速太大,不能记录单个细胞的谱,但可得到在一分钟内流过的几千个细胞的平均谱。

二、二维荧光光谱

1. 原理 物质的荧光强度 F 与激发光的波长(λ_x)和所测量发射光的波长(λ_m)有关, $F = f(\lambda_x, \lambda_m)$ 。如在溶液中只有一种发荧光的分子,通常固定一个波长,扫描改变另一个波长,可分别得到激发光谱 $F = f_x(\lambda_x)$ 或发射光谱 $F = f_m(\lambda_m)$,二者相互独立。即对于不同的 λ_x ,荧光发射谱 $f_m(\lambda_m)$ 的形状相同,只是强度改变;对于不同的 λ_m ,荧光激发谱 $f_x(\lambda_x)$ 的形状相同,只是强度改变。因此对于只含有单一一种类荧光分子的稀溶液,只需分别对两个波长扫描就可得到两个独立的光谱。

若溶液中含有两种独立的发荧光物质,两个谱就不会互相独立。即对于不同的 λ_x ,发射谱 $f_m(\lambda_m)$ 的形状不同,反之亦然。 $f(\lambda_x, \lambda_m)$ 较为复杂,对一系列不同的 λ_m 、 λ_x 测量荧光强度。最先进行这样测量的可能是Weber(1961)。他提出将 F 的数据表示为矩阵形式,行和列分别对应于不同的 λ_x 和 λ_m ,每个矩阵元分别为在该 λ_x 、 λ_m 的荧光强度 F ,并称之为“激发-发射矩阵”。

分别对应于不同的 λ_x 和 λ_m ,每个矩阵元分别为在该 λ_x 、 λ_m 的荧光强度 F ,并称之为“激发-发射矩阵”。

2. EEM 的构成 含有两种荧光团的混合物,其荧光光谱分别见图2A和2B,是一维形式。如将光谱表示为二维形式的EEM,在纸面上可用等高线表示,见图

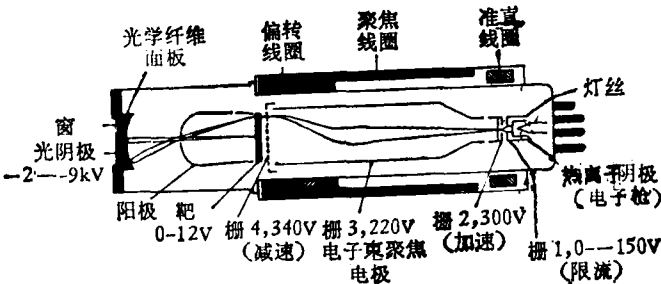


图1 硅增强靶视像管

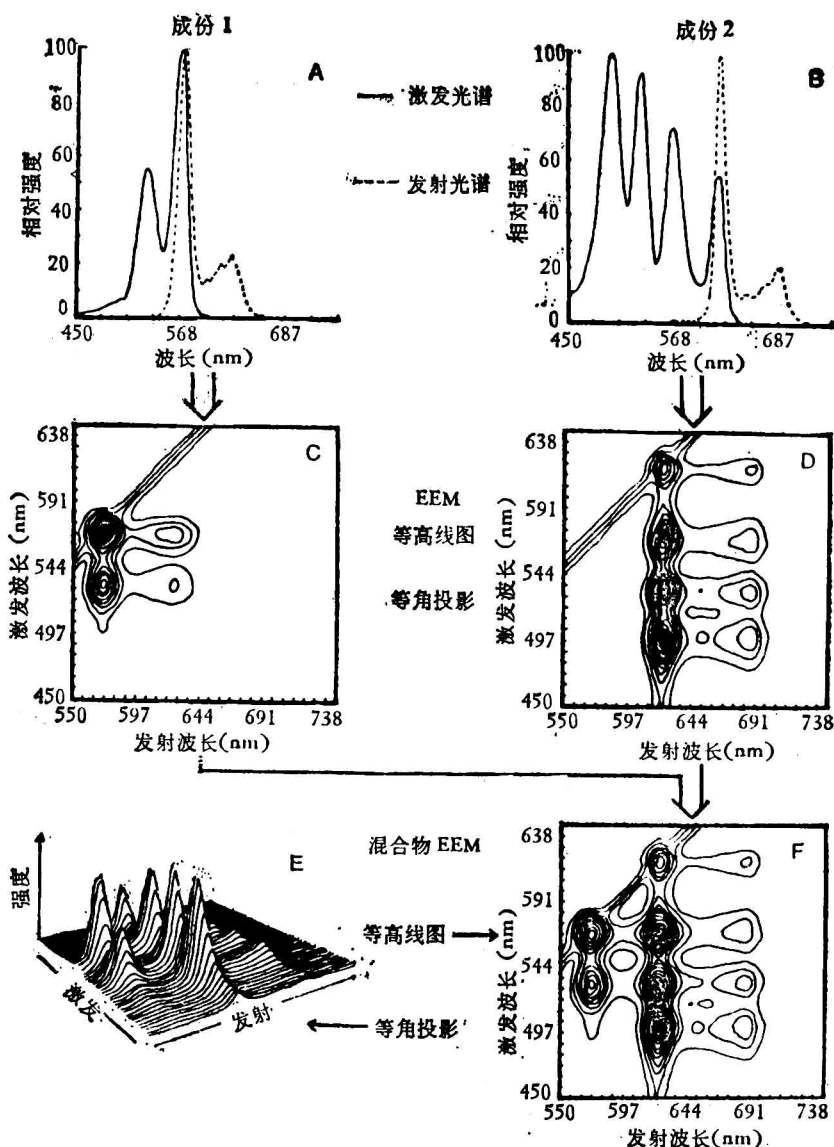


图2 EEM 与化合物或混合物的激发、发射光谱的关系

2C、2D。激发光源的散射光在 $\lambda_x = \lambda_m$ 处最强 (即 Rayleigh 散射), 表现为等高线图的对角斜线。由于荧光比激发光向长波方向移动, 所有的荧光都在这斜线的下方, 被称为 Stokes 定律。与横轴相平行的截面, 给出不同的发射谱, 彼此都相似, 只是在激发峰的 λ_x 处得到的谱最强。与纵轴相平行的截面则给出不同 λ_m 的激发谱。

两种荧光团按 1:1 混合, 得到的荧光光谱 (EEM) 见图 2F, 也可表示为等角投影形式 (图 2E)。此时显然激发谱与发射谱不再相互独立,

即对不同的 λ_x , 发射光谱形状是不同的, 不同的 λ_m 也得到不同的激发光谱。这里假定了二种荧光物质之间没有能量转换 (样品是稀溶液), 图 2F 中的 EEM 就只是图 2C 和 2D 的简单叠加。

3. EEM 的特征 由 EEM 可以清楚地看出某些荧光测量方法的特征。

选择激发和发射。在 EEM 上可找到只有单个成份独立地吸收或发射的光谱区域, 即可以找到特定的 λ_x 与 λ_m , 只有一种成份发出荧光。如图 3 中的峰 2a 即是, 在 $\lambda_x = 568\text{nm}$,

$\lambda_m = 574\text{nm}$ 即可监测成份 1 的荧光。取 $\lambda_m = 574\text{nm}$ ，可得到成份 1 的激发光谱（纵切）。但是扫描 λ_m 所得到的谱（固定 $\lambda_x = 568\text{nm}$ ）却与成份 2 有重叠。要定量测量成份 2 就稍有困难，只能测量它在较大波长处的较弱峰。峰 4C 最好。

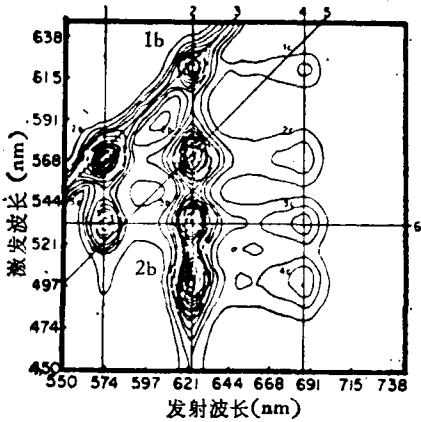


图 3 EEM 与常规的荧光光谱扫描之间的关系

同步激发。可使每一成份的荧光谱形状简化、谱带变窄，从而减少不同成份的光谱发生重叠的现象，使选择性大为提高，这可用于混合物的定量或定性分析。同步激发时，将荧光分光光度计的两个单色仪的驱动器彼此锁住， λ_x 与 λ_m 同时扫描，并保持一个固定的差值 $\Delta\lambda$ 。在同一次扫描中同时改变 λ_x 和 λ_m ，就可考察 EEM 的不同区域。在 EEM 上，沿着与散射光所对应的斜线相平行，并距离 $\Delta\lambda$ 的一条直线（图 3 中斜线 5），可得到同步扫描光谱。

4. EEM 的获得 Weber 在 1961 年是对几个 λ_x ，用手选几个 λ_m ，得到低分辨的 3×3 或 4×4 的 EEM。有了自动化的仪器之后，可以用计算机控制单色仪的步进电机，对 50 个 λ_x 的每一个，得到 50 个点的发射谱，从而获得 50×50 的 EEM。有的仪器可得到 1000×1000 的 EEM。光电倍增管的数据被数字化，以矩阵形式打印出来，或画出等高线图或三维等角投影图。

三、图像荧光计

通常的荧光谱仪采用光电倍增管作为光检

测器，只能测量单个信号。为得到 EEM，就要作波长扫描，依次测量每个波长的荧光强度，耗费时间较长。波长的快速机械扫描也存在波长的重复性问题，而且由于在每一波长处测量的时间很短暂，记录的光子数很少，信噪比低。这就促使人们改变获得信号数据的方法。1975 年 Warner 等人采用阵列检测器同时获得整个 EEM，不是用单色光而是用多色光照射样品。

1. 用多色仪和光电图像检测器系统获得 EEM 氙灯之连续谱辐射进入激发单色仪而被色散。由于出口狭缝被除去，使单色仪变为多色仪，出射光成为多色光（跨 260nm）。多色光聚焦在样品杯上，并沿其高度方向色散开（图 4A, 4B），使样品产生荧光。对应于某假定物质激发谱的三个峰（图 5A），有三个荧光带，颜色

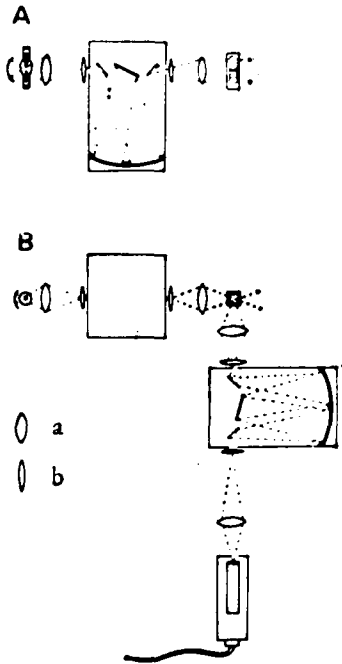


图 4 图像荧光计的光路图

(A) 激发光侧视图。(B) 发射光路顶视图
a. 成像透镜 b. 场透镜

相同；上部的带最强，对应于 500nm 处的最强激发峰。荧光又聚焦到分析单色仪的进口狭缝上，狭缝与通常荧光谱仪一样，平行于样品杯。分析单色仪与激发单色仪垂直安放（图 4B），也除去出口狭缝而成为多色仪。沿样品杯高度方向的三个荧光带，又分别被分析多色仪在水平

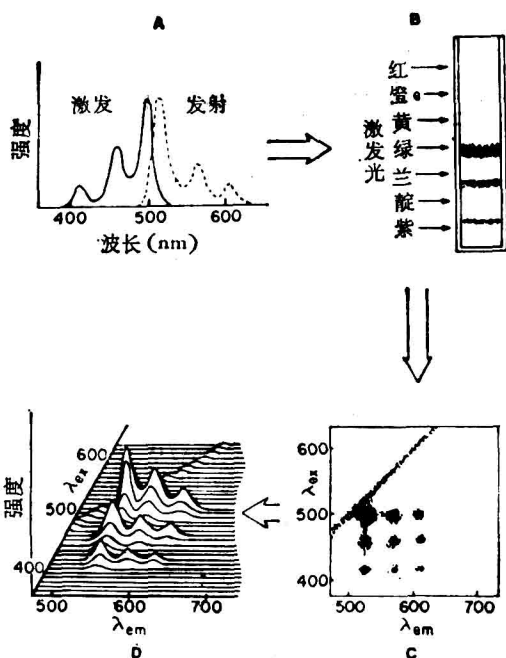


图5 同时产生 EEM、假想的化合物

(A) 激发光谱和发射光谱 (B) 多色光束照射到样品杯上 (C) SIT 照相机看到的 EEM (D) EEM 的等角投影图,可由示波器或图形终端得到

方向色散,于是在其出口平面上就形成了二维的 EEM (图 5C)。

通常所用的光电倍增管只能记录单个信号。用一个二维的多道光检测器,例如 SIT 视像管就可以同时把整个 EEM 记录下来。

这样的多色仪和图像检测器系统就组成了一个“图像荧光计”(videofluorometer, imaging fluorometer)。

用图像荧光计得到 芘 和 蒽 的混合物的 EEM,见图 6。芘的谱在右下方,蒽的谱在左上方,实际上完全分开了。

2. 数据获取系统 仪器配上计算机和相应的接口及软件,可以采集数据并进行简化。例如相加、自动校正暗场、空白溶剂信号的扣除、EEM 差分光谱等等。还可以显示出发射光谱、激发光谱、导数光谱、差分光谱、同步扫描谱、等高线 EEM、三维等角投影 EEM 等。

3. EEM 数据处理 数据可以用联立方程

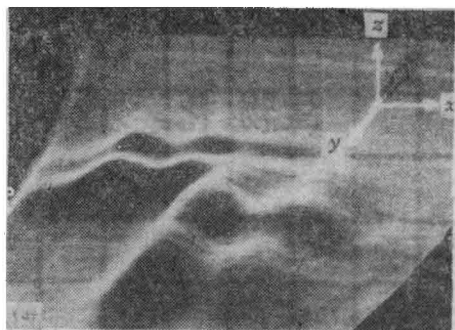


图6 芘与蒽混合物的 EEM 三维显示

的最小二乘法来作定量分析。由矩阵的秩,决定样品中所包含荧光物质成分的数目,作定性分析。

四、EEM 应用于多成份分析

EEM 可以用作所谓“指纹”分析,如鉴定漏油。荧光光谱技术对于石油中的天然荧光成份极灵敏,油中的多核芳香烃不挥发、不溶解,荧光光谱相当稳定。由 EEM 的等高线图可以得到油的特征“指纹”。

对于像石油这样的复杂混合物,要作定量分析是分辨不开的。要么用低温的方法来改进分辨率,要么在分析中加入第三维,例如用液相色谱法使不同成份按时间先后分开。用这样的三维方法可以定量分析页岩油中的苯并[a]芘,其结果与气相色谱-质谱联用所得的相符。

EEM 作为时间、温度、pH 等的函数所得到的三维数据,对于分析更复杂的混合物将会是有力的手段。

参 考 文 献

- [1] 《电子工业技术词典》编辑委员会:《电子工业技术词典》,第12章,103—104页,国防工业出版社(1977)。
- [2] Wehry, E. L.: *Modern Fluorescence Spectroscopy*, Vol. 4, Plenum Press, 1981.
- [3] Tolmi, Y.: *Multichannel Imaging Detectors*, ACS Symposium Series, Vol. 102, American Chemical Society, 1979.
- [4] OMA Vidicon Detectors, Princeton Applied Research Corporation, 1978.

[本文于1983年12月26日收到]