

# 生物化学仪器指南

第一册

## 光谱仪

郭尧君 主编



50 600 650

括上述任何五种微球  
球标准盒，将给  
惠

DARDS CORPORATION™

学出版

PO Box 12621  
Research Triangle Park  
North Carolina 27709

1988

Q5-3  
GYJ-1

112387

# 生物化学仪器指南

第一册

光谱仪器

郭尧君 主编

科学出版社

## 内 容 简 介

本书是《生物化学仪器指南》的第一册。介绍常应用于生物化学的10种光谱仪器。分别地描述每种仪器的简单原理、结构、种类、订货须知、安装要求、验收方法、附件配置以及应用范围。每章后还附有国内外部分厂商的仪器照片和性能介绍。可供大专院校有关专业师生、科研单位和器材部门的工作人员、进出口公司的外贸人员参考。

## 生物化学仪器指南

第 一 册

光谱仪器

郭尧君 主编

责任编辑 赵甘泉 吴铁双

科学出版社出版

北京朝阳门内大街137号

北京黄坎印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

1988年8月 第一版 开本: 787×1092 1/16

1988年8月第一次印刷 印张: 11 1/4 插页: 8

0001 150 字数: 252,000

ISBN 7-03-000485-2/Q.117

定价: 6.50元

## 序 言

自1982年《生物化学实验技术》丛书问世以来，深受同行的欢迎。但是这套丛书在描述各种生化实验技术时，由于篇幅所限，对通常使用的各类仪器只作粗浅的介绍。为了弥补这方面的不足，使生化工作者在从事实验研究时，更好地了解和操作这些仪器，我们决定主编这套《生物化学仪器指南》书，作为前套丛书的姊妹篇。

近代生物学的长足进步，主要是与测度和观察以及制备技术的进步平行发展着的。而这一方面的进步又是和仪器与仪器的构筑(instrument and instrumentation)分不开的。人们常常说科学已进入生物学的世纪，这正是由于上述两种进步促成的。在生物学发展过程中进步表现在两个方面：即一些新概念的提出，及一些存在的观念在实验上的体现。只要想一想50至60年代里Watson和Crick的关于核酸分子的双螺旋模型的提出、DNA分子的半保留复制方式的证明和X射线衍射及超离心实验技术的关系，就可以明白技术的进步是怎样地推动了本世纪下半叶的生物学的进步。

我国目前在实验室工作中困难很大的一部分来自生物学工作者常常不熟悉仪器，而许多技术工作者又常常不了解生物学工作者的思路。其结果是常常产生一些方法学的错误与解释上的讹谬，甚至在实验技术上无从着手。解决这种困难的办法一方面应该是加强不同训练背景之间的人员合作，另一方面则应使两种工作人员在知识上及训练上做一定程度的相互渗透。渗透可以保证两种工作人员产生共同语言以进行概念及实验上的交换。我们这套书正是朝着这一方向努力，希望它既有益于“纯粹的”生物学工作者，也有助于“纯粹的”技术工作者。

近年来，我国大量进口与引进了国外的先进实验仪器以作为实验中的工作手段。但是只要到一些科研与教学单位去看一下，便知道这些仪器的使用常常远非是合理的，有的“大才小用”，有的搁置不用，有的则物非其用。其结果是外汇已经用了，实验室空间也占满了，但未能明显地推动研究工作。

仪器随着其自动化程度、精度以及用途的多样性，其价格差别也很大。对于一个购置仪器的人来说，首先要明白自己需要什么，能付的预算款有多少。对于仪器来说绝非按钮愈多愈好，它和使用者的目的是一致的。仪器的最佳选择应该是对研究工作者的工作完成有所裨益。

这套书介绍了仪器的原理、使用及其应用范围。在我们的书中登了一些厂家产品介绍，主要是作为例证式的介绍，当然它们不一定是唯一的选择。在仪器的选择中技术以外的因素，例如价格、伺服的简便性、实验人员使用仪器的频度也常常是选型所必不可少的考虑因素。

这套书定名为《生物化学仪器指南》，但考虑其内涵则并不局限于生化仪器，或者说它涉及的是在近代生物学中与生化方法一同使用着的仪器。全书分四册，依仪器使用者的宽度(popularity)，而定其先后次序予以介绍。读者可以由本书目录中看到被介绍的仪器中有的在发展阶段上已较成熟，但有的尚在其襁褓阶段。总的说来，成熟的

FDS6/35

仪器易于使用，但难于得到非常理想的结果；研制中的仪器，使用者的技巧要高、投资风险要大，但开拓的可能也大些，这一些细心的读者当能心领神会。

这套书初步分为《光谱仪器》，《色谱仪器》，《波谱仪器、离心机、放射性测量仪器、X射线衍射仪》及《显微镜、电子显微镜及其附属设备》四册，它既可以分册使用，又互相配合，成为一个有机整体。近代的信息爆炸 (information explosion) 造成出版泛滥，有的书卷帙浩繁，不胜阅读之苦。我们的书以图释文，以电报式的语句，言简意赅地说明问题。我们力求使读者获得有用信息的同时能在金钱、时间及判断的花费上付出最低值。我们希望这些目的能够达到，并欢迎广大读者指正。

徐 浩

## 前 言

光谱仪器作为一种定性、定量分析的有效工具已被广泛应用在各个领域中。它主要是通过电磁波（光是一种电磁波）与物质的相互作用后，测量物质对电磁辐射的吸收或再发射而得到的信息来对物质加以分析研究的。按照研究对象是分子还是原子可分为分子光谱和原子光谱。按照物质对电磁波的作用可分为吸收光谱和发射光谱。测定吸收光谱的仪器有紫外-可见-近红外分光光度计、红外分光光度计、圆二色仪、原子吸收分光光度计、停流仪。测定发射光谱的仪器有荧光分光光度计、时间分辨纳秒荧光计、流动式细胞光度计、激光喇曼光谱仪。兼而有之的如显微分光光度计。本册对这些光谱仪器的简单原理、仪器结构、种类、进展、安装要求、性能检查、附件及简单的应用作一概略介绍，并附录了一些仪器的性能。希望您能从中找到适合于您的仪器。既节省经费、外汇，又保证您的实验需要。如果我们有限的知识和经验能为您提供有价值的信息，这就是我们的心愿，这就是我们这本书的经济效益和社会效益。

郭尧君

1987年10月

# 目 录

|                          |                |
|--------------------------|----------------|
| 序言 .....                 | ( i )          |
| 前言 .....                 | ( iii )        |
| 第一章 紫外-可见-近红外分光光度计 ..... | 郭尧君 ( 1 )      |
| 一、基本概念 .....             | ( 1 )          |
| (一) 定性分析的依据 .....        | ( 1 )          |
| (二) 定量分析的依据 .....        | ( 2 )          |
| (三) 影响定量分析的一些仪器因素 .....  | ( 2 )          |
| 二、仪器 .....               | ( 4 )          |
| (一) 仪器的结构 .....          | ( 4 )          |
| (二) 仪器的种类 .....          | ( 7 )          |
| (三) 不同型号仪器的性能比较 .....    | ( 10 )         |
| (四) 仪器的安装要求 .....        | ( 10 )         |
| (五) 仪器的性能检查 .....        | ( 11 )         |
| (六) 常见附件及其使用 .....       | ( 23 )         |
| 三、应用 .....               | ( 25 )         |
| (一) 应用范围 .....           | ( 26 )         |
| (二) 应用实例 .....           | ( 26 )         |
| 参考文献 .....               | ( 27 )         |
| 第二章 荧光分光光度计 .....        | 郭尧君 ( 28 )     |
| 一、基本概念 .....             | ( 28 )         |
| (一) 荧光的产生 .....          | ( 28 )         |
| (二) 荧光分析的基本参数 .....      | ( 29 )         |
| 二、仪器 .....               | ( 30 )         |
| (一) 荧光仪器的基本结构 .....      | ( 30 )         |
| (二) 几种类型的荧光测定装置 .....    | ( 31 )         |
| (三) 仪器的进展 .....          | ( 34 )         |
| (四) 仪器的安装要求 .....        | ( 35 )         |
| (五) 仪器的性能检查 .....        | ( 35 )         |
| (六) 常见附件及其使用 .....       | ( 35 )         |
| 三、应用 .....               | ( 36 )         |
| 参考文献 .....               | ( 37 )         |
| 第三章 圆二色仪 .....           | 郭尧君、王敖金 ( 38 ) |
| 一、基本概念 .....             | ( 38 )         |
| (一) 圆偏振光 .....           | ( 38 )         |
| (二) 旋光性和光学活性 .....       | ( 39 )         |
| (三) 圆二色性 .....           | ( 39 )         |
| 二、仪器 .....               | ( 39 )         |

|                            |            |
|----------------------------|------------|
| (一) 紫外-可见圆二色仪的结构 .....     | ( 39 )     |
| (二) 订货须知 .....             | ( 42 )     |
| (三) 安装与验收 .....            | ( 42 )     |
| (四) 圆二色调制器与仪器进展 .....      | ( 45 )     |
| (五) 附件选购 .....             | ( 47 )     |
| 三、应用 .....                 | ( 48 )     |
| (一) 小分子结构分析 .....          | ( 48 )     |
| (二) 测定生物大分子的空间结构 .....     | ( 48 )     |
| 参考文献 .....                 | ( 49 )     |
| <b>第四章 红外分光光度计</b> .....   | 张 瑜 ( 50 ) |
| 一、原理简述 .....               | ( 50 )     |
| 二、仪器的结构 .....              | ( 51 )     |
| (一) 仪器的类型及基本结构 .....       | ( 51 )     |
| (二) 基本部件 .....             | ( 54 )     |
| (三) 附件 .....               | ( 58 )     |
| (四) 订货须知 .....             | ( 61 )     |
| (五) 安装要求 .....             | ( 62 )     |
| 三、应用 .....                 | ( 63 )     |
| 参考文献 .....                 | ( 64 )     |
| <b>第五章 激光喇曼光谱仪</b> .....   | 许以明 ( 69 ) |
| 一、基本原理 .....               | ( 69 )     |
| (一) 喇曼散射 .....             | ( 69 )     |
| (二) 退偏振度 .....             | ( 71 )     |
| (三) 共振喇曼散射 .....           | ( 71 )     |
| 二、仪器 .....                 | ( 72 )     |
| (一) 仪器的类型 .....            | ( 72 )     |
| (二) 仪器的组成 .....            | ( 72 )     |
| (三) 仪器的数据采集和处理系统 .....     | ( 74 )     |
| (四) 附件 .....               | ( 77 )     |
| (五) 生物样品及样品池 .....         | ( 78 )     |
| 三、仪器的安装和验收 .....           | ( 79 )     |
| (一) 安装前的准备 .....           | ( 79 )     |
| (二) 安装和验收 .....            | ( 79 )     |
| 四、应用 .....                 | ( 80 )     |
| 参考文献 .....                 | ( 85 )     |
| <b>第六章 原子吸收分光光度计</b> ..... | 沈泽清 ( 86 ) |
| 一、发展概述 .....               | ( 86 )     |
| (一) 发展历史及其特点 .....         | ( 86 )     |
| (二) 发展前景及趋势 .....          | ( 88 )     |
| 二、仪器的结构及工作原理 .....         | ( 88 )     |
| (一) 基本结构 .....             | ( 88 )     |
| (二) 工作原理 .....             | ( 90 )     |

|                               |                        |
|-------------------------------|------------------------|
| 三、光度系统的主要形式 .....             | ( 90 )                 |
| 四、工作方法 .....                  | ( 92 )                 |
| (一) 火焰原子化器 .....              | ( 93 )                 |
| (二) 无火焰原子化器 .....             | ( 93 )                 |
| (三) 氢化物原子化器 .....             | ( 94 )                 |
| 五、无火焰法的背景校正 .....             | ( 94 )                 |
| (一) 氘灯背景校正方法 .....            | ( 95 )                 |
| (二) 塞曼效应背景校正方法 .....          | ( 96 )                 |
| (三) 自吸收效应背景校正法 .....          | ( 97 )                 |
| 六、我国的原子吸收分光光度计水平浅析 .....      | ( 98 )                 |
| 七、选购须知 .....                  | ( 99 )                 |
| 八、仪器的安装和验收 .....              | ( 100 )                |
| (一) 对实验室环境的要求 .....           | ( 100 )                |
| (二) 验货 .....                  | ( 101 )                |
| (三) 开箱 .....                  | ( 101 )                |
| (四) 安装与验收 .....               | ( 101 )                |
| 九、配套件与附件 .....                | ( 102 )                |
| <b>第七章 停流仪及快速反应动力学仪 .....</b> | <b>居 鸣 ( 105 )</b>     |
| 一、基本原理 .....                  | ( 106 )                |
| (一) 动力学测量的基本概念 .....          | ( 106 )                |
| (二) 流动法 .....                 | ( 106 )                |
| (三) 弛豫法 .....                 | ( 109 )                |
| 二、仪器 .....                    | ( 112 )                |
| (一) 结构 .....                  | ( 112 )                |
| (二) 种类 .....                  | ( 116 )                |
| (三) 几家公司的产品介绍 .....           | ( 116 )                |
| (四) 进展 .....                  | ( 117 )                |
| (五) 订货 .....                  | ( 118 )                |
| (六) 安装要求 .....                | ( 118 )                |
| (七) 影响测定的一些仪器因素及性能检查 .....    | ( 118 )                |
| 三、应用 .....                    | ( 120 )                |
| (一) 应用范围 .....                | ( 120 )                |
| (二) 实例 .....                  | ( 121 )                |
| 参考文献 .....                    | ( 121 )                |
| <b>第八章 时间分辨纳秒荧光计 .....</b>    | <b>林波海、郭尧君 ( 122 )</b> |
| 一、仪器的原理与分类 .....              | ( 122 )                |
| 二、仪器的结构 .....                 | ( 126 )                |
| 三、仪器订购与使用 .....               | ( 130 )                |
| 四、应用 .....                    | ( 132 )                |
| 参考文献 .....                    | ( 135 )                |
| <b>第九章 流动式细胞光度计 .....</b>     | <b>林波海 ( 136 )</b>     |

|                         |                    |
|-------------------------|--------------------|
| 一、原理与方法.....            | ( 137 )            |
| 二、仪器的结构.....            | ( 139 )            |
| 三、仪器的订购与使用.....         | ( 144 )            |
| 四、应用.....               | ( 148 )            |
| 参考文献.....               | ( 150 )            |
| <b>第十章 显微分光光度计.....</b> | <b>胡匡祐 ( 151 )</b> |
| 一、基本原理.....             | ( 151 )            |
| 二、显微光度测量方法.....         | ( 152 )            |
| 三、MSP 光能量传递的特点.....     | ( 154 )            |
| 四、仪器的基本结构与性能.....       | ( 156 )            |
| 五、仪器的校正与生物学指标的测定.....   | ( 164 )            |
| 六、仪器测量误差的来源及误差分析.....   | ( 166 )            |
| 七、应用.....               | ( 168 )            |

# 第一章 紫外-可见-近红外分光光度计

郭 尧 君

紫外-可见-近红外分光光度计可以称得上是光谱仪器中的元老，它经过长期使用和不断的发展已经成为很多基础理论和生产实践中所不可缺少的基本手段。尽管随着光谱技术的发展和各种课题的实际需要，光谱仪器正向着更专门化的方向发展，为一些目的而专门设计的新型光谱仪器正不断出现，如荧光和磷光分光光度计、原子吸收分光光度计、圆二色仪、停-流分光光度计等。但这些仪器都是在紫外-可见-近红外分光光度计的基础上发展起来的。

近年来，由于一些新材料、新元件、新工艺、新技术的渗透使分光光度计的发展进入了新的阶段。如新光源的使用，全息光栅，端窗光电倍增管，光电二极管矩阵的出现，特别是计算机技术的引入，使各种类型的紫外-可见-近红外分光光度计发生了革命性的变革。新型的分光光度计不但操作简便、稳定性能好、精确度和分辨率高，而且促使分光光度技术各个领域中得到更加广泛的应用。这种仪器、技术和应用的互相促进使得紫外-可见-近红外分光光度计和技术在生产、科研、教育领域中永葆它应有的位置。

紫外-可见-近红外分光光度计虽是经典仪器，也是光谱仪器和技术中较为简单的一种，但是由于仪器和技术的漫长历史以及飞速发展，使仪器种类、名目繁多，可以说是光谱仪器中最为繁杂的一种。每种仪器都有它自己的特点及适用范围，希望通过这有限篇幅的介绍能给您提供有用的选购信息，另外对仪器的安装、验收、附件和应用实例也作一简略介绍，以供使用仪器时参考。

## 一、基本概念

紫外-可见-近红外分光光度计是测定由于物质对紫外(190—340nm)，可见(340—750nm)，或近红外(750—2500nm)区波长的选择性吸收而产生的吸收光谱的仪器。借助于吸收光谱可对被测物质进行定性或定量分析。

### (一) 定性分析的依据

当光进入一种物质后，可以有两种情况发生：一种是进入物质后，能量几乎不被吸收；另一种是能量被全部或被部分吸收。在后一种情况下，在吸收光的过程中，光能被转移给分子。但是吸收本身是一种高度专一的现象，即一定结构的分子只吸收一定能量的辐射。原子或分子吸收光能后就发生能量的改变。每个分子具有一系列严格分立的能级。未受光照时，分子处于基态，当受到光能激发时，它可以吸收特征波长的能量跃迁到较高的能级——激发态。特定波长的光被吸收，就产生了吸收光谱。如果物质分子吸收的能量越多，跃迁到的激发态就越高，产生的吸收光谱其波长就越短。据此，我们就可以根据吸收光谱的形状，特别是吸收峰的波长位置来对物质进行定性分析。但是紫

可见-近红外区的分子吸收光谱常常不是线光谱，而是宽光谱。线光谱中一定的谱线相对于特定的结构（如红外、远红外谱），所以也称为指纹图谱，是定性分析的理想方法。但宽光谱中常包含有复杂的谱带系，一个谱带系可能有若干个谱带，一个谱带又由若干谱线组成，情况复杂，难以根据吸收峰的位置来确定是某种物质。所以紫外-可见吸收光谱虽然可以用来作定性分析，但不是理想的定性分析工具。

## （二）定量分析的依据

紫外-可见吸收光谱作为定量分析的基本依据是比尔定律。这是由布给、朗伯和比尔分别于1729年和1852年提出的。他们根据一系列的实验证明当一束单色光透过介质时，吸收的比值（透射光/入射光）和入射光的强度无关，但和介质的厚度以及介质中分子的数目（即浓度）有关。把它写成公式就是：

$$A = \lg \frac{1}{T} = abc \quad (1-1)$$

式中A和T分别是吸光度和透光度，在仪器扫描图中常用作纵坐标。a是吸光系数，是物质的特征常数，可以通过这个公式来计算。b是介质厚度，也即光径。c是浓度。从公式中可以看出，吸光度是与介质的厚度和浓度成正比的。如果固定光径，如用常规的10 mm光径的吸收池盛溶液，那么吸光度就与浓度成正比。这就很容易在紫外-可见分光光度计上通过测定吸光度来进行定量。透光度T因为与浓度c成指数关系，计算不便，所以在生化分析中不常使用。

## （三）影响定量分析的一些仪器因素

公式1-1说明了吸光度与光径和浓度之间的线性关系。但在实际测量中常观察到有偏离直线的情况，如图1-1。这常常是由于一些物理的、化学的以及仪器的原因造成的。

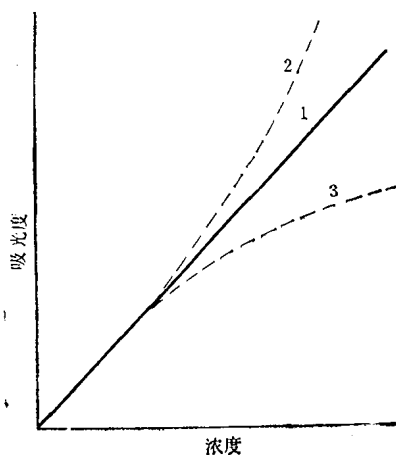


图1-1 比尔定律

1. 服从比尔定律；
2. 正偏差；
3. 负偏差。

物理和化学的原因如溶剂和溶液对光的反射有较大的差异，溶液浓度太大引起分子的缔合、pH、互变异构、光分解、样品有荧光、样品混浊有散射、溶剂选择不当、温度、压力的影响等等。下面分析一些仪器因素的影响，以了解仪器的质量与性能对定量分析的重要性。

### 1. 谱带半宽度的影响

在比尔定律中，首先假定是采用单色辐射，但实际上不可能得到如此纯的单色光。目前紫外-可见分光光度计均采用发射连续光谱的光源，用单色器来分离单色光，从射出狭缝出来的单色光的纯度将由狭缝宽度来决定。为了保证检测光的强度，狭缝必须要有足够的宽度。因此得到的单色光常常是包含一定波长范围（波长a和波长b之间）的谱带。这时测得的溶液的吸光度是在 $\lambda_a$ 和 $\lambda_b$ 之间的一个值，而不是 $\lambda_a$ 和 $\lambda_b$ 之间的吸光度的平均值。这个值与溶液的光谱曲线的形状、光源和单色器的光谱特性以及检测器的响应

特性有关。在保证一定光强的情况下,狭缝(谱带半宽度)越小,所得的吸收光谱越与实际相符,标准曲线的直线关系也越好。反之宽的狭缝常常导致吸收光谱的畸变和标准曲线的弯曲,由图1-2可看到,随着狭缝宽度的增大,记录的振动带〔图1-2(1b)〕渐渐混在一起而不能分辨〔图1-2(3b)〕,同时谱带的吸光度值减小〔图1-2(1b)、(2b)、(3b)〕。标准曲线的斜率也减小而且变弯〔图1-2(1a)、(2a)、(3a)〕。

## 2. 杂散光的影响

理想的单色器只从出射狭缝中透射出所需波长的谱带,但实际上常常还有所需谱带外的辐射——杂散光从出射狭缝中出来。当样品的透光度较大时,杂散光的影响相对地比较小,但当样品的透光度十分小时,杂散光的影响就不能不考虑。因此对一些高吸光度的样品,杂散光的影响就不可忽视。特别是在接近紫外极限时,因为在短波长时光源强度和检测器的灵敏度均减弱,杂散光就可能变成入射光的一个比较大的分数而干扰测定,见图1-3和1-4。

## 3. 光度计精度不够所引起的浓度测定的误差

吸光度(透光度)读数的误差所引起的浓度测定的误差还决定于浓度。被测溶液过浓、吸光度过大或溶液过稀、吸光度过小时,测定的准确

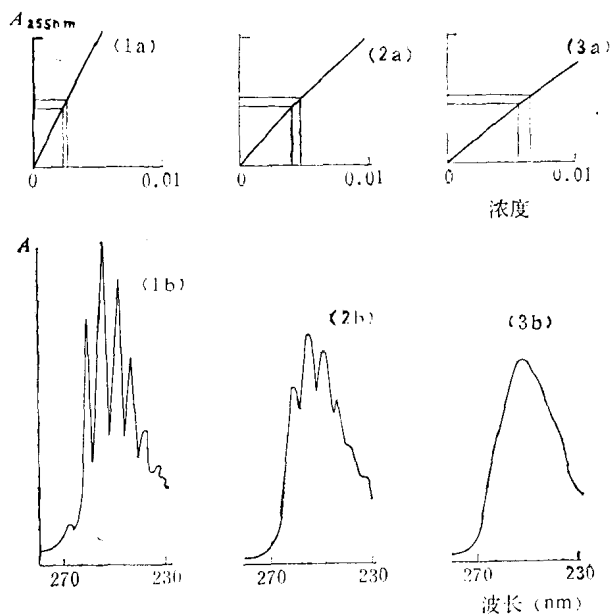


图1-2 狭缝宽度对吸收光谱和标准曲线的影响

(1a)、(2a)、(3a),在不同谱带半宽度时,苯在环己烷中的标准曲线;

(1b)、(2b)、(3b),在不同谱带半宽度时,苯在环己烷中的吸收光谱;

(1a)和(1b)  $S=1.6\text{nm}$ ; (2a)和(2b),  $S=4\text{nm}$ ;  
(3a)和(3b)  $S=10\text{nm}$ 。

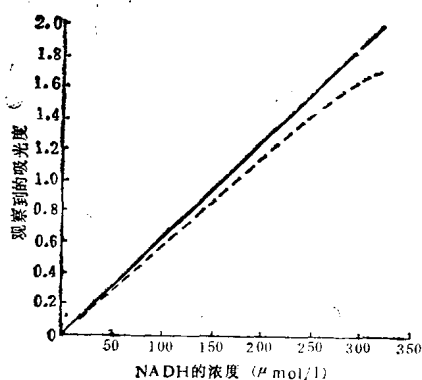


图1-3 谱带半宽度和杂散光对

原辅酶在340nm吸光度的影响

——2nm谱带宽度,0.1%T杂散光

.....20nm谱带宽度,0.5%T杂散光

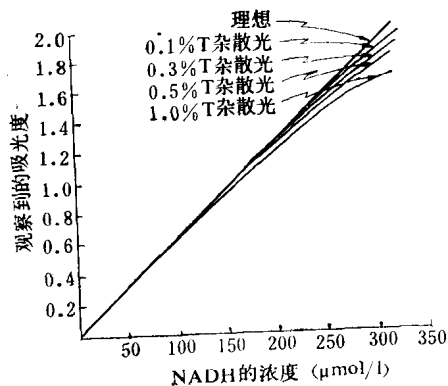


图1-4 杂散光对高浓度样品的影响

确度较差。当溶液的透光度为36.8%（吸光度为0.456）时，由光度计读数误差所引起的浓度测定误差最小，这可由比尔定律推算得到。

4. 检测器的非线性响应

对比尔定律的偏离有时也可能是由于检测器（光电管、光电倍增管）对入射辐射的响应线性不好而引起的。这种情况常在低质量的紫外-可见分光光度计中见到。

二、仪 器

（一）仪器的结构

紫外-可见-近红外分光光度计一般由六部分组成，它们以直线结构排列，如图 1-5 所示。

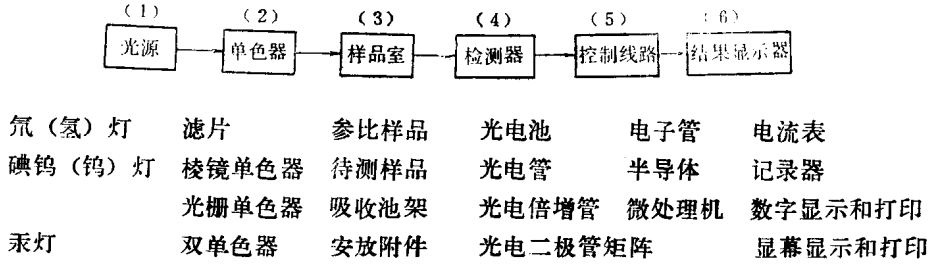


图1-5 紫外-可见-近红外分光光度计结构图

图1-5为紫外-可见-近红外分光光度计的组成排列方框图。不管仪器外形如何变化，设计如何巧妙，发展如何迅速，但其设计排列方式未见有任何变异。只是各组成部分在不断的发展和变化。现将各部分分别介绍如下：

1. 光源

分光光度计中单色光在单色化以前来源于符合一定要求的灯，这种灯统称为光源。理想的辐射光源应具备以下一些特性：

- (1) 在所使用的波长范围内提供连续辐射，即光源应发射连续光谱。
- (2) 辐射能量随波长的变化尽可能小，且有足够的强度。
- (3) 使用寿命较长。
- (4) 要有良好的稳定性，特别是对单光束仪器。

根据光源发射的是连续光谱还是线光谱，可将光源分成两类——连续光源和线光源。

钨灯常用作可见和近红外范围的光源，可使用的波长范围约为 320—3200nm。如在钨灯中充入少量碘蒸气时，可以增大发光强度，并延长使用寿命。故近十多年来，紫外-可见分光光度计都改用碘钨灯作为可见范围的辐射光源。为了在高温时耐用，用硅玻璃罩代替玻璃罩，所以也称石英碘灯。它的缺点是可使用的波长范围不如 灯的宽，约为340—1200nm。

紫外范围的光源早期常用氢灯，现在则常用氘灯。使用波长范围约在 180—360nm 之间。但后者在发射强度和灯的寿命方面都比前者要大2—3倍。且氢灯在 300nm 以后能量已很低，但氘灯可使用到500nm。

在一些市售的紫外-可见分光光度计中有时也提供发射线光谱的汞灯，大多作为附

件供选购。它主要在紫外和可见范围用于波长的精确校正。汞灯发射强度大，稳定，并且不需要复杂的电源。带有玻璃外套者，发射谱线均在可见范围。带有石英外套者才给出紫外区的谱线。前者主要谱线是365nm，后者主要谱线是254nm。

在结构简单的紫外检测仪中常用无电极放电灯作为光源。无电极放电灯虽然只消耗很少的能量（如LKB公司紫外检测器上的灯只有3W），但在紫外-可见范围有很大的能量输出。由于功率低，灯只产生很少的热，有利于保持样品室温度的恒定。而且这种灯的寿命可长达6000小时。

分光光度计的光源系统由光源和一系列反射镜组成。光源系统中反射镜的作用是把光源发出的光线集中到单色器并充满单色器的光径，同时能均匀照明狭缝。

## 2. 单色器

单色器是紫外-可见分光光度计的核心部分。它的作用是将光源发出的白光色散成各种波长的单色光，从出射狭缝中导出，照于样品上。比色计中用滤光片作为单色器，是最简单的一种。分光光度计中的单色器是一个完整的色散系统，除了色散元件——棱镜或光栅外，还有入射和出射狭缝以及一组反射镜。

### (1) 滤光片

滤光片是最简单、最廉价的单色装置，常在比色计中使用。由于它的单色性不好，使测定精度大大受到限制。它的特性可以用最大透光波长（或称中心波长）和谱带半宽度（有效带宽）来表示，见图1-6。最大透光波长即在此波长光源的辐射最强。有效带宽是指最大透光度值的一半处的谱带宽度。在比色计中，滤光片被用来作为单色器。但在分光光度计中，滤光片只是用来消除单色器的杂散光。滤光片可分为几种：中性滤光片，截止滤光片，通带滤光片，干涉滤光片以及校正滤光片（标准滤光片）。

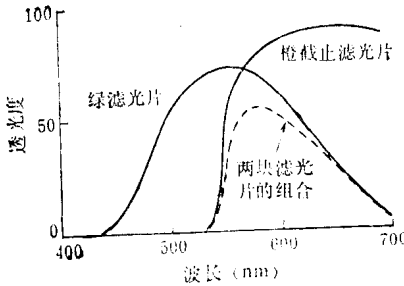
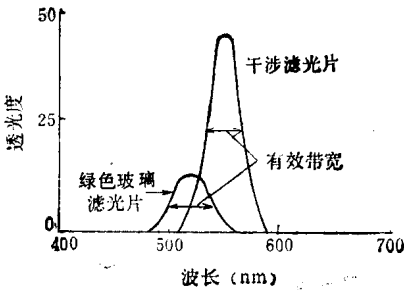


图1-6 滤光片的光谱特性

### (2) 单色器

从波长范围宽广的光源辐射中分出波长单一的单色光的光学装置称为单色器。在扫描吸收光谱时，需要自动或手动改变波长来得到欲要的单色光，此时必须借助于由入射狭缝、准直元件、色散元件（常用棱镜或光栅，见图1-7）、和出射狭缝组成的单色器。

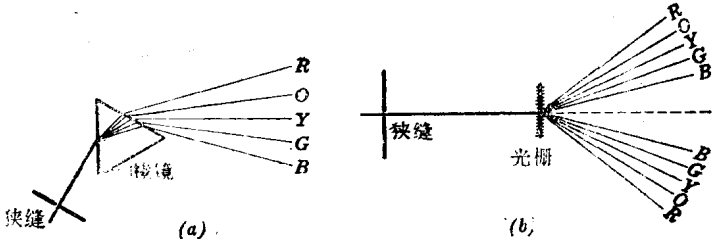


图1 7 白光由棱镜 (a) 或透射光栅 (b) 的色散

棱镜是从紫外到中红外区的合适的色散元件。在紫外范围，常用的材料是硅、砷土和人造蓝宝石。砷土和人造蓝宝石能用于200到4000nm，但昂贵，所以常用熔融石英作棱镜材料。在可见范围，硅的色散次于光学玻璃，所以可见分光光度计常用廉价的光学玻璃作棱镜材料。

棱镜单色器的光谱纯度主要决定于棱镜的色散特性和光学设计。通常使用两种形式的棱镜单色器——巴什（Bunsen）单色器和立特罗（Littrow）单色器。

紫外、可见、近红外范围的色散除了用棱镜外，还可以用透射光栅和反射光栅来进行。透射光栅是在一块玻璃上或其它透明材料上刻一系列平行的和紧紧相靠的凹槽。生产这样的母光栅需要精密的装置，比较昂贵。复制光栅比较便宜，虽在性能上次于母光栅，但能满足应用。反射光栅是在复制光栅的表面上喷涂铝的薄膜制成的。也可在抛光的玻璃表面或金属表面镀铝，然后在铝表面上刻大量的平行线制成的。光栅的刻线越多，分辨率越高。每单位长度的刻线越多，它的色散就越大。闪耀波长是光栅的另一个重要的参数，在闪耀波长，光栅有最大的能量输出。光栅的主要缺点是有次级光谱干扰分析，棱镜的主要缺点是色散波长的非线性分布。

光栅单色器有几种排列方式，一种是立特罗式，另一种是埃勃特（Ebert）式。后由采尼（Czerny）和脱纳（Turner）加以改进后为现代仪器所常采用。

现在大部分分光光度计的单色器都用全息光栅来代替刻制光栅。全息光栅是基于双光束干涉原理，记录的是干涉条纹，不存在周期误差。所以全息光栅无“鬼线”，杂散光也低。此外，全息光栅的制造周期短，一般说来曝光时间不到一小时。这不仅提高了生产效率，减少因环境温度变化和振动所造成的误差。并且能制造高精密度和大面积的平面和凹面光栅。特制的凹面全息光栅还具有消像差的特性。

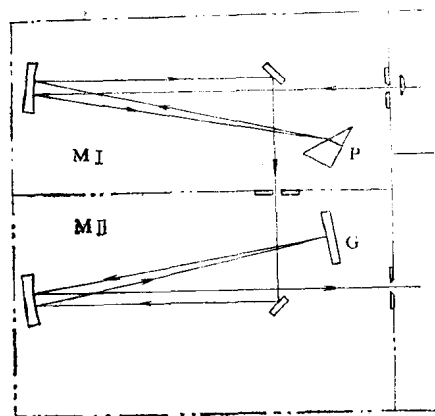


图1-8 双单色器MI和MII分别为第一和第二单色器

P，棱镜；G，光栅。

### 3. 样品室

样品室应比较宽大，以容纳各种光径的吸收池和附件，如恒温、低温、积分球等。测定用的吸收池一般分石英和玻璃二种。紫外区一定要用石英池，可见区和近红外区最好用玻璃的，也可用石英的。近年来也有用塑料的。

### 4. 检测器

高级的紫外-可见分光光度计常采用双单色器，即在一个单色器中使用两个色散元件，进行二次分光。图1-8是棱镜-光栅单色器，还常用光栅-光栅单色器。这样可以大大提高仪器的分辨率，减少杂散光，从而提高仪器的性能。

狭缝是单器的重要组成部分之一，关系到分辨率的优劣。它是由具有很锐刀口的两片金属片精密加工制成的。刀口相互之间是严格平行的，并且是在相同的平面上。狭缝宽度有两种表示方法：一是用狭缝的两刀口之间的实际宽度表示，单位是毫米。另一是用从单色器出来的有效带宽表示，单位是纳米。

设计一个高灵敏度、稳定可靠的紫外-可见分光光度计关键之一在于要有一个好的检测器，常用的有光电池、光电管和光电倍增管，近年又发展了光电二极管矩阵检测器。

早期的比色计和光度计常用硒光电池作检测器，仅适用于可见范围，最灵敏的范围在500—600nm。硒光电池虽然简单、价廉，但容易疲劳、信号难以放大。在紫外-可见-近红外分光光度计的近红外范围有时使用硫化铅光电池。

光电管是由密封在抽真空的玻璃或石英罩内的两个金属电极组成的。常用的光电管有“蓝敏”和“红敏”两种。前者系在镍阴极表面上沉积铯和铯。应用范围为210—625 nm。后者系在阴极表面上沉积银和氧化铯，应用范围为625—1000nm。

上述两种检测器现在已被灵敏度大、光谱响应范围宽的光电倍增管代替。它实际上是配有两次发射电极的光电管，这些两次发射电极使得光电流得到放大。选择光电倍增管有三个重要的指标：波长响应范围、灵敏度和噪音水平。现在大多数紫外-可见分光光度计已采用端窗光电倍增管代替侧窗光电倍增管。因为端窗型的管子机械位置好，光束容易聚焦在阴极上，阴极面大且容易被冷却。而其最重要的优点是它较高的量子效率和增益。端窗型的这些优点对混浊样品的测量是极为有利的。

光电二极管矩阵 (Photodiode Array, 简称PDA) 作为紫外-可见分光光度计的多道检测器是近几年来发展的新技术。PDA是由很多光电二极管组成的，它们同时分别接收一定波长间隔的光信号。其响应时间是可变的，可为百分之几秒。光电二极管的数目决定了仪器的分辨率。二极管数目越多，则仪器分辨率就越高。

#### 5. 放大、操作、控制线路

单光束分光光度计通常采用光-电转换方法。但经过样品吸收后到达光电转换器上的光能量是很微弱的，因此必须用微电流放大器将微弱的信号电流加以放大。

双光束分光光度计中样品光束和参比光束分别通过样品池和参比池，然后交替地投射到检测器上，控制系统的任务是将获得的样品信号和参比信号分别加以放大，然后把两者进行比较，最终获得样品相对于参比的透光度或吸光度。常见的双光束分光光度计多采用光学零平衡式光-电系统或电学比例记录式系统。

近年来随着计算机技术的发展和引入，现代分光光度计的电子系统已变得更完善。不但提高了仪器的性能指标，并能完成数据处理，全自动操作等功能。

#### 6. 结果显示

结果显示的方式在不断发展。过去单光束分光光度计多用电流表指示，双光束则用记录器扫描。近年来单光束分光光度计已改用数字显示并连接打印装置。双光束分光光度计除了用记录器外，还兼有数字显示和打印装置。这不仅使观察结果客观、可靠，而且结果记录也方便、准确。80年代后，结果显示又发展为屏幕化。光谱图、操作条件和数据均可在屏幕上显示。并且利用计算机还可以将数据进一步处理。

### (二) 仪器的种类

比色计是各种分光光度计的雏形，也是分光光度计发展的基础。它们的区别在于前者是用滤光片来实现光的单色性，后者是用单色器来进行分光。现在各种类型的分光光度计的发展可以说是日新月异，按它们的波长范围，可分为可见分光光度计（比色计），