

分光光度技术 及其在生物化学中的应用

(紫外-可见-近红外)

郭尧君 编著

科学出版社

分光光度技术 及其在生物化学中的应用

(紫外-可见-近红外)

郭尧君 编著

科学出版社

1987

内 容 简 介

紫外-可见-近红外分光光度技术是实验室中普遍应用的一项成熟的实验技术。

本书系作者参考国内外资料，结合自己的工作经验编写成的。全书共分五章，第一章介绍有关的基本概念，包括吸收光谱的产生及定性、定量分析的依据。第二、三章介绍仪器的结构、种类、维护、进展、性能测试，并附国内、外仪器的性能比较表。第四章介绍十二种测定方法，包括差光谱、双波长、导数光谱等新方法。第五章介绍分光光度法在一些重要生命物质测定中的应用。

本书可供生物、化学、医学、农林、食品、环保、冶金、地质等科技工作者和大专院校有关专业的师生参考。

分光光度技术 及其在生物化学中的应用

(紫外-可见-近红外)

郭尧君 编著

责任编辑 马素卿

科 学 出 版 社 出 版

北京朝田门内大街137号

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

1987年9月第1版 开本：787×1092 1/32

1987年9月第一次印刷 印张：9

印数：0001—7,100 字数：205,000

统一书号：13031·3686

本社书号：5121·13-10

定价：2.15元

引 言

紫外-可见-近红外分光光度技术经过长期使用和不断改进, 已经成为很多基础理论研究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需要, 光谱仪器正向着更专门化的方向发展, 为不同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、激光喇曼光谱仪、圆二色仪和原子吸收分光光度计等. 但这些仪器都是在紫外-可见分光光度技术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、端窗光电倍增管的出现, 光电二极管矩阵的引入, 特别是计算机技术的引入, 使各种类型的紫外-可见分光光度计发生了革命性的变化. 新型的分光光度计不但操作简便、稳定性能好、精确度和灵敏度高, 而且促使分光光度技术在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-可见分光光度计和技术在生产、科研、教育领域中长久保持着重要地位.

从紫外-可见分光光度技术发展看, 着眼点正有所改变. 过去光谱方法都用于常规的定性和定量分析, 而现在人们正将着眼点转向研究一些生物化学过程的原发反应、快速动力学及大分子的溶液构象等. 这种着眼点的改变, 对仪器、技术本身都有更进一步的要求, 并将使分光光度技术更加充实, 在分析化学和分析生物化学中占有更重要的地位.

目 录

引言.....	(iii)
第一章 分光光度法基础	(1)
一、光的本性.....	(1)
二、电磁波的表示.....	(3)
三、电磁波谱的分区.....	(5)
四、分子的电子、振动、转动吸收光谱.....	(8)
五、紫外-可见吸收光谱与分子轨道.....	(15)
六、生色团和助色团.....	(21)
七、测定原理——比尔-朗伯定律.....	(29)
八、影响比尔定律的因素.....	(36)
九、分光光度法的符号和术语.....	(48)
参考文献.....	(53)
第二章 仪器	(55)
一、紫外-可见分光光度计的结构.....	(55)
二、比色计和单光束、双光束、双波长/双光束分光光度计.....	(85)
三、不同型号仪器的性能比较.....	(95)
四、常见附件及其使用.....	(95)
五、紫外-可见-近红外分光光度计的进展.....	(133)
参考文献.....	(137)
第三章 仪器技术	(139)
一、分光光度计的安装.....	(139)
二、分光光度计的性能检查和调试.....	(141)

三、测量参数的选择	(162)
四、仪器的维护和保养	(166)
参考文献	(169)
第四章 分光光度方法	(170)
一、定性分析	(170)
二、标准曲线法	(175)
三、浓度直读法	(177)
四、多组分分析法	(178)
五、光谱光度滴定法	(181)
六、反射测量	(184)
七、动力学研究方法	(185)
八、等吸光点的测定	(185)
九、差示光度法	(187)
十、差光谱技术	(188)
十一、导数光谱法	(206)
十二、双波长法	(215)
参考文献	(220)
第五章 分光光度法的应用	(223)
一、氨基酸、蛋白质的吸收特性	(223)
二、核酸的吸收特性	(253)
三、维生素的吸收特性	(267)
四、辅酶的吸收特性	(277)
参考文献	(278)

第一章 分光光度法基础

一、光的本性

关于光的本性的学说，很早就有两种说法：一是牛顿的微粒说（1680年），一是惠更斯的波动说（1690年）。但在那时，这两个学说的正确与否无法证明。因为在那个时候，仅仅知道光的反射和折射定律，而这两个定律用波动说和微粒说都能解释。

到了19世纪，发现了许多新的物理光学现象，如光的干涉、衍射和偏振等。干涉和衍射是一切波动所共有的现象，无法由微粒运动来解释。如干涉现象，两条光线有时候互相加强，有时候相互抵消，而微粒是不能抵消的。再如偏振证明了光波不是纵波，而是横波。后来麦克斯韦创立了光的电磁波学说，证明电磁也有波动，而且这种波动和光波一样，于是波动说占了上峰。

19世纪末年，发现光的电磁波学说不能解释黑体辐射现象。为了解释这个现象，普朗克在1900年发表了量子论。接着爱因斯坦推广普朗克的量子论，在1905年发表了光子学说，圆满地解释了光电效应。爱因斯坦认为，光的能量不是连续地分布在空间中，而是集中在光子上的。这个学说因康普顿效应发现再一次得到了实验证明。

事实上凡是与光的传播有关的各种现象，如衍射、干涉和偏振，必须用波动说来解释。另一方面，凡是与光和实物相互作用有关的各种现象，即实物发射、吸收和散射光的诸

现象，如原子谱、光电效应、康普顿效应等，必须用光子学说来解释。因此对于光学现象的解释，在物理概念中引入了“二象性”。就是说，光同时具有微粒和波动的性质。光的这种二象性可以分别用表示光子的能量和动量的二个公式来说明：

$$E = hf \quad (1-1)$$

$$p = h/\lambda \quad (1-2)$$

在以上两式中，等号的左边表示微粒的性质，即光子的能量 E 和动量 p ；等号的右边则表示波动的性质，即电磁波的频率 f 和波长 λ 。因此这两种性质通过普朗克常数 h ($6.67 \times 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{S}$) 定量地联系了起来。

总之，如今对光的本性的认识如下：光和实物一样，是物质的一种，它同时具有波的性质和微粒（量子）的性质，而从整体来说，它既不是波，亦不是微粒，亦不是这样或那样的混合物。对这种辩证关系，现在人们还缺乏一目了然的形象。这反映出即使在今天人们对光的本性的认识也还远远没有达到最完善的境地，研究光的本性的工作尚须人们做持久的努力。

尽管对光的本性的认识还没有得到满意的结果，但是光学本身的发展并没有停止，特别是20世纪50年代以来，人们把数学技术和通讯理论跟光学结合起来，形成了所谓“傅里叶光学”。60年代引入了计算机技术，为复杂光学系统的设计和提高光学设计的质量创造了条件，大大地提高了仪器的性能指标，并增加了仪器功能，使光学仪器发生了革命性的变革。近十多年来，纤维光学得到了突飞猛进的发展。它可以作为纤维传象和传光束，还可以用来代替传统上沿用的电缆。特别是1960年做成第一只红宝石激光器以来，激光科学技术的发展使光学开始了一个新的发展时期。它的发展有力

地促进了物理学、化学和生物学的发展。它将对深入研究物质微观结构、运动规律和转换机制提供前所未有的方法。

二、电磁波的表示

光是一种电磁波。电磁波是一种横波，即光的传播方向和波的振动方向相互垂直。电磁波可以用它的电场和磁场的振幅和方向来表征它的特性。如果电场的电矢量用 E 表示，磁场的磁矢量用 H 表示，则从图1-1中可以看到，电场和磁场的矢量方向总是互相垂直的，且它们均与光的传播方向垂直。表征电场和磁场的两个波总是同时存在的，且它们的位相相同。在光学分析中为简化问题起见，我们可以只考虑电矢量。

电磁波可以借助于频率、波长（波数）、光速等几个特性参数来表示，它们之间的相互关系为：

$$f = \frac{c}{\lambda} = c\nu \quad (1-3)$$

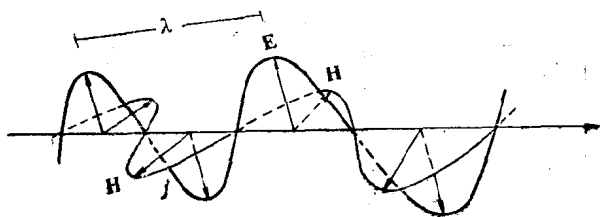


图1-1 电磁波

式中， λ 是波长，即电磁波每振动一次所走的距离。不同的波段范围常用不同的单位表示。在紫外-可见波段现在常用纳米表示。纳米现在写作 nm (nanometer)，早期文献中写作 $\text{m}\mu$ 。过去则多用 $\text{\AA}$ 表示。红外

表1-1 电磁辐射的特性参数换算

x 的单位	频 率 Hz	波 数 cm ⁻¹	能 量		波 长	
			kcal ²⁾ /mol	eV	cm	nm
Hz	1.00x ¹⁾	3.33 × 10 ⁻¹¹ x	9.54 × 10 ⁻¹⁴ x	4.14 × 10 ⁻¹⁵ x	$\frac{3.00 \times 10^{10}}{x}$	$\frac{3.00 \times 10^{17}}{x}$
cm ⁻¹	3.00 × 10 ¹⁰ x	1.00x	2.86 × 10 ⁻³ x	1.24 × 10 ⁻⁴ x	$\frac{1.00}{x}$	$\frac{1.00 \times 10^7}{x}$
kcal/mol	1.05 × 10 ¹³ x	3.50 × 10 ² x	1.00x	4.34 × 10 ⁻² x	$\frac{2.86 \times 10^{-3}}{x}$	$\frac{2.86 \times 10^4}{x}$
eV	2.42 × 10 ¹⁴ x	8.07 × 10 ³ x	2.31 × 10 ¹ x	1.00x	$\frac{1.24 \times 10^{-4}}{x}$	$\frac{1.24 \times 10^3}{x}$
cm	$\frac{3.00 \times 10^{10}}{x}$	$\frac{1.00}{x}$	$\frac{2.86 \times 10^{-3}}{x}$	$\frac{1.24 \times 10^{-4}}{x}$	1.00x	$\frac{1.00 \times 10^7}{x}$
nm	$\frac{3.00 \times 10^{17}}{x}$	$\frac{1.00 \times 10^7}{x}$	$\frac{2.86 \times 10^4}{x}$	$\frac{1.24 \times 10^3}{x}$	$\frac{1.00 \times 10^{-7}}{x}$	1.00x

1) 将在第一行中x的单位表示的数据换算成其余行中所示的单位时, 则按表中所示的那样乘或除。

2) |ca| = 4.1868J。

光谱中则大多用微米为单位(现在写作 μm ,过去写作 μ)。

$$\begin{aligned} 1\text{m} &= 10^2\text{cm} = 10^3\text{mm} = 10^6\mu\text{m} \\ &= 10^9\text{nm} = 10^{10}\text{\AA} \end{aligned}$$

式中, γ 是波数, 即一厘米长度中电磁波的数目。单位为厘米 $^{-1}$ (cm^{-1})。如 $200\text{nm} = 50,000\text{cm}^{-1}$ 。式中, c 是光速, 其值为 $2,9979 \times 10^8\text{m/s}$ 。式中, f 是频率, 即电磁波每秒钟振动的次数, 或定义为每秒钟内经过某一点的波数。单位是赫兹 (Hz)。1Hz = 1周/s。频率和波数在紫外-可见分光光度法中很少用。光波是一种频率很大的电磁波。电磁辐射的特性参数换算见表1-1。

三、电磁波谱的分区

电磁波的分区及特性见图1-2、表1-2和表1-3。我们肉眼能够感觉到的光波仅是电磁波谱的可见区(380—780nm)。波长短于380nm的称为紫外区, 短于200nm的为远紫外区, 再短就是各种射线了。长于780nm的则为各种红外区, 再长则为微波和无线电波了。对于电磁波谱分区的波长界限并没有严格规定, 大致如表1-2所示。它们各自的特性见表1-3。

根据光的波动理论, 可见区的颜色是由光波的频率(波长)决定的。白光照射在物质上, 物质如果完全吸收则呈现黑色; 如果对所有波长的吸收程度相差不多, 则呈现灰色; 如果只吸收某些波长的光, 而对另外一些波长有强烈的散射, 那么它就呈现相应的颜色。例如HgS吸收紫光和蓝光, 强烈地散射橙黄色的光, 所以HgS是橙黄色的。Cr₂O₃在白光的照射下散射绿光, 所以是绿色的。物质吸收光的波长与呈现的颜色的关系如表1-4所示;

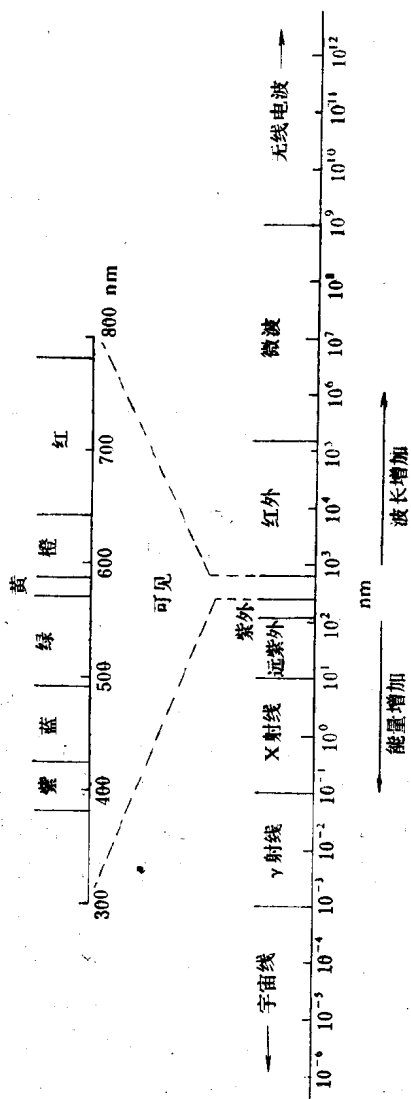


图1-2 电磁波谱的分区

表1-2 电磁波谱的分区

分 区	波 长 (nm)
宇宙射线	10^{-3}
γ 射线	$10^{-3} - 10^{-1}$
X 射线	$10^{-1} - 10$
远紫外区	10—200
近紫外区	200—380
可见区	380—780
近红外区	780—3,000
中红外区	3,000—30,000
远红外区	30,000—300,000
微波区	$3 \times 10^5 - 10^9$
无线电波	$10^9 -$

表1-3 电磁波谱的分区及特性

$\lambda(4.1\text{eV})$ 能量	10^7	10^5	10^3	10	10^{-1}	10^{-3}	10^{-5}	10^{-9}
$(\times 3.3\text{cm}^{-1})$ 波数	10^{10}	10^8	10^6	10^4	10^2	10^0	10^{-2}	10^{-6}
(Hz) 频率	10^{21}	10^{19}	10^{17}	10^{15}	10^{13}	10^{11}	10^9	10^7
$(\times 3\text{cm})$ 波长	10^{-11}	10^{-9}	10^{-7}	10^{-5}	10^{-3}	10^{-1}	10	10^9
谱区	γ 射线	X 射线	紫外光	可见光	红外光	微波	无线电	
量子跃迁类型	原子核	内层电子	外层电子	分子振动	分子转动	电子自旋态	核自旋态	
光学方法	γ 谱学 Mössbauer 谱学	X 射线法	真空紫外	紫外可见光的吸收发射荧光	红外吸收喇曼散射	电子顺磁共振 微波吸收	核磁共振	

从表中可见，凡是能吸收可见光的物质，都能呈现出颜色

表1-4 滤光片颜色(吸收光颜色)及溶液颜色(观察到的颜色的)互补关系

滤光片透过波长 (nm)	滤光片颜色	溶液颜色
400—450	紫	黄绿
450—480	蓝	黄
480—490	绿蓝	橙
490—500	蓝绿	红
500—560	绿	紫
560—580	黄绿	紫
580—600	黄	蓝
600—650	橙	绿蓝
650—750	红	蓝绿

色, 吸收光的波长愈短, 呈现的颜色愈浅; 吸收光的波长愈长, 呈现的颜色愈深. 物质吸收光时, 它就从基态跃迁到激发态, 所以只要基态和激发态的能量差等于可见光的能量, 它就呈现颜色. 基态与激发态的能量差愈小, 呈现的颜色就愈深; 基态与激发态的能量差小于400nm时, 就没有颜色.

四、分子的电子、振动、转动吸收光谱

当光进入某种物质以后, 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. 根据量子理论, 分子从光波中吸收能量必定是以不连续的、整份单位的形式发生, 这些

不连续的微小能量单位被称为量子。这也就是说频率为 f 的单色光的能量必定是 hf 的整数倍。每个量子的能量是与它的频率成正比的。

$$E = hf = h \frac{c}{\lambda} = hc\gamma \quad (1-4)$$

这里 h 是普朗克常数。从公式中可以看出，能量 E 与波长 λ 成反比。波长越长，能量越小。反之，波长越短，能量越大，所以紫外区光的能量比可见区的要大。

根据光的波动说和微粒说，吸收光谱是物质分子吸收了与其某一运动方式的能级变化能量相符的电磁波，使相应的运动方式的能级提高而产生的。即光的吸收和发射是由于原子或分子中能量的改变。每个分子具有一系列严格分立的能级。处于基态的分子，当受到光的能量激发时，它可以吸收特征频率的能量而跃迁到较高的能级——激发态。一定频率（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。这个过程大约在 10^{-18} s 内完成。反之，如果处于激发态的分子由激发态回到基态，就要释放能量。如果它不是以热或其他方式消耗能量，那么就产生发射光谱，即荧光或磷光，见图1-3。图1-3表示一个分子的各种能级。基态用 G 表示，第一电子单线激发态用 S^* 表示，第二电子单线激发态用 S^{**} 表示，第一电子三线激发态用 T^* 表示。基态和激发态都有几个不同的振动能级，图中用 $V = 0, 1, 2, 3$ 表示。每个振动能级又有几个转动能级组成。为简化起见，图中未示出。

紫外-可见区的分子吸收光谱常常不是线状光谱，而是宽的带状光谱。这是因为一般分子具有如下五种运动类型。

(1) 整个分子在空间的移动，即分子体系质量中心的

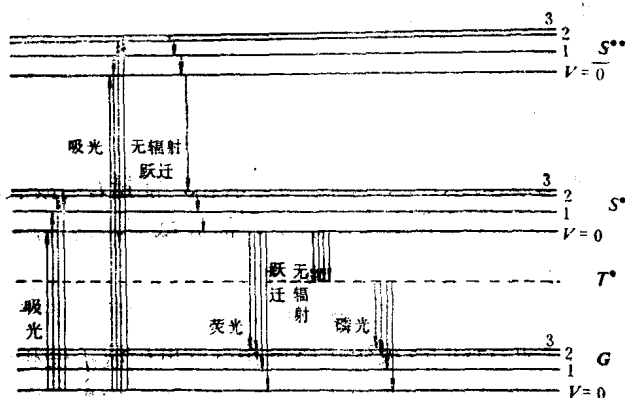


图1-3 吸收光谱和荧光、磷光光谱能级跃迁示意图

移动，也称分子的平移运动。

(2) 分子的转动，组成分子的原子作为整体的转动。

(8) 分子的振动，组成分子的原子核及其内层电子整体由于相互作用，在平衡位置附近振动。

(4) 分子中的电子定态运动，主要是外层电子绕着原子核形成分子定态运动。

(5) 分子中电子、原子核的自旋运动。

在这五种运动中，平移运动的能量变化是连续的作热运动，并不产生光谱。而分子中电子和原子核的自旋的相互作用是属于磁的相互作用，一般较小。因此我们在讨论分子内部的运动、分子能级和分子光谱时，主要考虑分子的转动、振动和分子中电子的定态运动这三种运动形式。量子力学已经证明这三种运动的能量都是量子化的，这和单个原子的能量的量子化是一样的。每个分子都有它自己特定的分子能级。图1-4是双原子分子能级的示意图，图中A和B是电子能级，在

同一电子能级A, 分子的能量还要因振动能量的不同分为若干

“支级”, 称为振动能级. 图中 $\nu'' = 0$,

1, 2, ……等即为电子能级A的各振动能级, 而 $\nu' = 0$,

1, 2, ……等即为电子能级B的各振动能级. 当分子在同一

电子能级和同一振动能级时, 它的能量还要因转动能量的不同

分为若干“分级”, 称为转动能级. 图

中 $J'' = 0, 1, 2,$

……等即为A电子能级和 $\nu'' = 0$ 振动能级的各转动能级. 所以分子的能量 E 等于下列三项之和,

$$E = E_e + E_v + E_r$$

式中, E_e 、 E_v 和 E_r 分别为电子能量、振动能量和转动能量.

上述三项能量中, 电子能量最大, 振动能量次之, 转动能量最小. 如果一个分子只有转动能级的跃迁, 而没有振动能级和电子能级的跃迁, 其能量的改变是很小的. 如用能量很低的远红外线 (λ 为25至350 μm , 相应能量约为0.05至0.0035eV) 照射分子, 就能引起某些分子的转动能级的跃

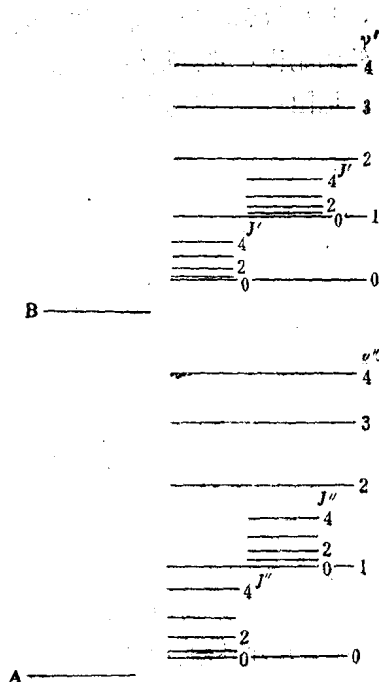


图1-4 双原子分子电子、振动、转动能级示意图