

生化分析仪器

理论及应用

李开国 王龙祥 编著

SHENG HUA
FEN XI YI QI
LI LUN JI
YING YONG

上海科学技术文献出版社

79.971
269

生化分析仪器理论及应用

李开国 王龙祥 编著

上海科学技术文献出版社

生化分析仪器理论及应用

李开国 王龙祥 编著

*

上海科学技术文献出版社出版发行

(上海市武康路2号 邮政编码 200031)

全国新华书店经销

东方出版中心海峰印务公司

*

开本 787×1092 1/16 印张 9 字数 224,000

1996年11月第1版 1996年11月第1次印刷

印数:1,500

ISBN 7-5439-0964-2/R·272

定 价:14.80 元

前 言

近年来,随着生物化学,特别是分子生物学的迅速发展,生化仪器作为生物化学研究中不可缺少的工具,愈来愈显示出它的重要性。生化仪器已作为生物化学领域中一个专门的学科——生化仪器学(Biochemical Instrumentation)日益得到人们的重视和研究。

为适应高等院校特别是医药院校生化专业研究生学习和掌握生化分析仪器理论和实践的需要,本书以上海医科大学生化中心实验室现有仪器为基础,选择了八类常用仪器,系统地介绍了它们的结构、原理,使用注意事项以及在基础医学、生物化学等领域中的应用。几年来教学和科研的实践,证明了本书具有较高的理论性和较强的实用性,它不仅可供研究生、进修生和本科生选读,而且对有关专业课教师、实验室技术人员都具有一定的参考价值。

本书在编写过程中承蒙顾天爵、陈惠黎两位教授多方关心并予以指导,上海申风电子仪器厂对本书出版给予大力的支持,在此一并表示诚挚的谢意。

由于水平所限和时间仓促,资料收集欠缺及不妥之处在所难免,敬请各位读者提出宝贵意见,以便今后不断改进。

编者

1996年5月

目 录

第一章 紫外—可见分光光度计	(1)
第一节 光与光谱的基本概念.....	(1)
第二节 光的吸收定律.....	(3)
第三节 紫外—可见分光光度计的结构原理及组成.....	(6)
第四节 常见分光光度计	(17)
第五节 影响分光光度计正确读数的因素及提高的方法	(34)
第六节 紫外—可见分光光度计的发展动向	(36)
第七节 紫外—可见分光光度法的应用	(37)
第二章 荧光分析法仪器	(40)
第一节 荧光的概述	(40)
第二节 荧光的产生	(40)
第三节 荧光分析的特点及常用方法	(42)
第四节 荧光分析测量上注意的问题	(43)
第五节 荧光仪器	(45)
第三章 柱层析仪器	(58)
第一节 梯度发生器	(58)
第二节 微量泵	(62)
第三节 检测仪	(64)
第四节 自动部分收集器	(68)
第五节 程序控制器和其他部件	(70)
第四章 高效液相色谱仪简介	(72)
第一节 高效液相色谱概述	(72)
第二节 高效液相色谱仪的基本装置	(72)
第三节 高效液相色谱技术的应用简述	(77)
第五章 电位分析法的分析仪器	(78)
第一节 电位分析法及电极	(78)
第二节 电位分析法的分析仪器概述	(83)
第六章 酶免疫测定仪器	(94)
第一节 酶免疫测定法	(94)
第二节 酶免疫测定仪介绍	(95)
第三节 酶免疫荧光仪.....	(101)
第七章 电泳技术和电泳仪	(105)
第一节 电泳技术简介.....	(105)
第二节 电泳仪.....	(107)

第八章 离心机(设备和方法)	(116)
第一节 离心技术概论.....	(116)
第二节 基本原理和计算.....	(116)
第三节 离心设备概论.....	(119)
第四节 离心方法概述.....	(122)
第五节 离心技术进展展望.....	(124)
第六节 离心操作和维护技术要点.....	(125)
第九章 计算机在分析仪器中的应用	(128)
第一节 计算机在分析仪器中应用的方法、概况和功能	(128)
第二节 计算机在分析仪器中的应用举例.....	(130)
参考书目	(136)

第一章 紫外—可见分光光度计

紫外—可见—近红外分光光度法是一种灵敏、快速、准确、简单和具有较好选择性的分析方法。它在分析领域中的应用已有 30 多年的历史,虽然在这段时期内,各种其他的分析方法有很大发展,但紫外—可见分光光度法仍是今日分析领域中应用最广泛的方法之一。许多新型光谱仪器的诞生,如激光拉曼光谱仪、圆二色仪、荧光和磷光分光光度计、原子吸收分光光度计等都是在紫外—可见分光光度法的基础上发展起来的。随着新技术、新材料、新元件、新工艺的发展和渗透,特别是电子计算机的引入,使各种紫外—可见分光光度计的性能有了很大的提高,从而促使紫外—可见分光光度计的技术和方法在各种领域中得到更加广泛的应用。紫外—可见分光光度法和分光光度技术与仪器,在分析化学、分析生化和医学检验中占有更加重要的地位。

第一节 光与光谱的基本概念

一、光的波粒二象性

光是能的一种表现形式,是电磁波的一种。光以直线传播方式从空间的一处传播到另一处,并在不同的介质处发生反射、折射、衍射、色散、干涉和偏振等现象。可用波长、频率、传播速度等参量来描述,即光具有“波动性”。同时光也是由“光子”或称“光量子”所组成,表现为电磁辐射的发射过程和吸收过程,即光具有“粒子性”,这就是光的波粒二象性。根据量子理论:分子从光波中吸收能量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称为“光量子”。每一个光量子的能量与光的频率成正比。即

$$E = h\nu = \frac{hc}{\lambda} \quad (1-1)$$

式中: E 代表光子的能量; ν 为光的频率; h 为普朗克常数; c 为光速; λ 为光波的波长。

由(1-1)式可看出,不同波长的光具有不同的能量;波长越长(频率越低),能量越小;反之,则能量越大。紫外光的波长小于可见光的波长、小于红外光的波长,因此,紫外光的能量大于可见光的能量、大于红外光的能量。

二、光谱

光谱就是按照波长或频率的顺序排列的电磁辐射,电磁波谱如表 1-1 所示。

对于电磁波分区的波长界限并没有严格规定。在光学光谱范围内,光的不同波长,在可见光范围内表现为不同的颜色。人眼不能感受波长大于 760nm 和小于 400nm 的光线,通常前者称为红外线,后者称为紫外线。光谱一般分为两大类:发射光谱和吸收光谱。发射光谱是指构成物质的分子、原子或离子受到热能、电能或化学能的激发而产生的光谱。吸收光谱是物质吸收光源辐射所产生的光谱。

吸收光谱有原子吸收光谱和分子吸收光谱。原子吸收光谱是由原子中电子能级跃迁所产生的,是由一条条明锐的彼此分立的谱线组成的线状光谱,每一条光谱线对应于一定的波

表 1-1 电 磁 波 谱

光谱名称	波长范围	原子或分子运动形式
X-射线	10^{-1} — 10nm	原子内层电子的跃迁
远紫外光	10 — 200nm	分子中原子外层电子的跃迁
近紫外光	200 — 400nm	同上
可见光	400 — 760nm	同上
近红外光	0.76 — $2.5\mu\text{m}$	分子中原子的振动与转动
红外	2.5 — $50\mu\text{m}$	分子振动与转动
远红外	50 — $300\mu\text{m}$	分子转动
微波	0.3mm — 1m	同上
无线电波	1 — 1000m	电磁共振

长。原子吸收分光光度法就是根据原子的这种性质建立起来的。分子吸收光谱比较复杂,这是因为在分子中除了有电子的运动之外,还有组成分子各原子间的振动以及分子作为整体的转动。也就是说一个分子的能量包括三部分,即分子的电子能量、振动能量和转动能量,且它们都是量子化的。三项能量中,电子能量最大,转动能量最小。如果一个分子只有转动能级的跃迁,其能量改变是很小的。如用能量很低的远红外线照射分子就能引起某些分子的转动能级的跃迁,这样得到的光谱称为转动光谱或远红外光谱。有些分子的转动光谱只要吸收能量更低的微波就能产生,称为微波谱。转动光谱一般也是线光谱。如果用红外线激发分子,则能引起分子的振动和转动能级的跃迁,这样得到的吸收光谱称为振动—转动光谱或红外光谱。通常它由许多相隔很近的谱线或窄带所组成。

紫外—可见区的分子吸收光谱一般不是线状光谱,而是宽的带状光谱(即由许多波长非常接近的线状光谱聚集而成)。它是由于电子能级跃迁而产生的光谱,因此这种分子光谱又称为电子光谱。在它的光谱中有若干不同的谱带系,其相当于不同的电子能级跃迁。每个谱带系又可能含有若干个谱带,不同的谱带相当于不同的振动能级跃迁。同一谱带内包含有若干个光谱线,每一根谱线又相当于不同的转动能级跃迁。概括如下:

分子光谱 { 电子光谱(紫外—可见光谱):在紫外可见区, E_e 、 E_v 和 E_r 都改变;
 振动光谱(红外光谱):在红外区,只有 E_v 和 E_r 改变;
 转动光谱(远红外光谱、微波谱):在远红外区或微波区,只有 E_r 改变。

注: E_e 、 E_v 、 E_r 分别为电子能级、振动能级、转动能级的能量。

由于光与物质相互作用所产生的对光的选择性吸收与物质本身的结构有关(化合物的吸收带是由于分子中某些特有吸收带的化学功能基团——生色团的存在),也就是说,由于各种物质的分子具有不同的结构,因而具有特殊的频率,当所照射的光线和被照射物质的分子具有相同的频率时,就会发生共振现象,即光被该物质的分子所吸收,在该物质分子特征频率处将出现吸收带。我们利用吸收光谱的形状和吸收程度的大小即可对物质进行定性和定量的分析。

第二节 光的吸收定律

紫外和可见吸收光谱用于定量分析的基本方法是：用选定波长的光照射被测物质溶液，测量它的吸光度，再根据吸光度计算被测组分的含量。计算的理论根据就是“吸收定律”。它是由朗伯定律和比耳定律相结合而成的，所以又叫朗伯—比耳定律。该定律同样适用于红外线吸收光谱法和原子吸收光谱法。

一、几个定义

当一束强度为 I_0 的平行单色光照射溶液时，一部分光被溶液吸收（设强度为 I_a ），一部分光被界面散射（设总强度为 I_r ），其余的光则透过（设强度为 I_t ）。如图 1.1 所示。则有

$$I_0 = I_a + I_r + I_t \quad (1-2)$$

通常由于 I_r 很小可忽略不计，故上式可简化为：

$$I_0 = I_a + I_t \quad (1-3)$$

透过光强度 I_t 与入射光强度 I_0 之比称为透光度或透光率。用 T 表示：

$$T = \frac{I_t}{I_0} \quad (1-4)$$

透光度的负对数称为吸光度、光密度或消光度。用 A 表示：

$$A = -\lg T = \lg \frac{1}{T} = \lg \frac{I_0}{I_t} \quad (1-5)$$

吸光度越大，表示该物质对光的吸收越强。透光度和吸光度都是用来表示入射光被吸收的程度，它们之间可依据式(1—5)相互换算，如表 1-2 和图 1.2 所示。

由于透光度和浓度之间的反指数关系对定量分析很不方便，故引入吸光度 A ，利用吸光度和浓度的正比关系测定样品的浓度，可带来更大的方便，如图 1.3 所示。

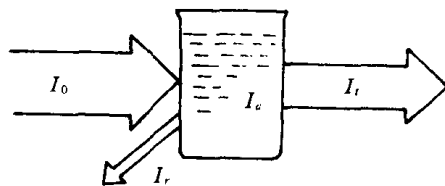


图 1.1 溶液对光的吸收

表 1-2 几种表示对光的吸收程度的量度之间的关系

入射光强度 I_0	透过光强度 I_t	吸收光强度 I_a	透光度 T	百分透光度 $T\%$	吸光度 A	吸光程度
100	100	0	1.00	100%	$\lg \frac{100}{100} = \lg 1 = 0$	增 加
100	75	25	0.75	75%	$\lg \frac{100}{75} = \lg 1.333 = 0.1249$	
100	50	50	0.50	50%	$\lg \frac{100}{50} = \lg 2 = 0.3010$	
100	25	75	0.25	25%	$\lg \frac{100}{25} = \lg 4 = 0.6021$	
100	0	100	0	0%	$\lg \frac{100}{0} = \lg \infty = \infty$	

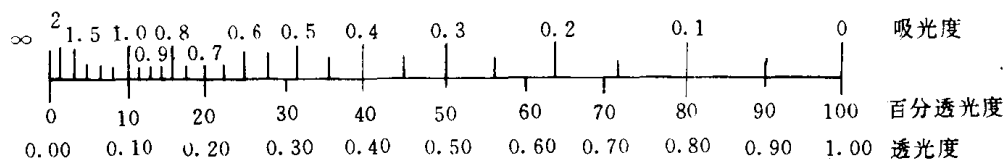
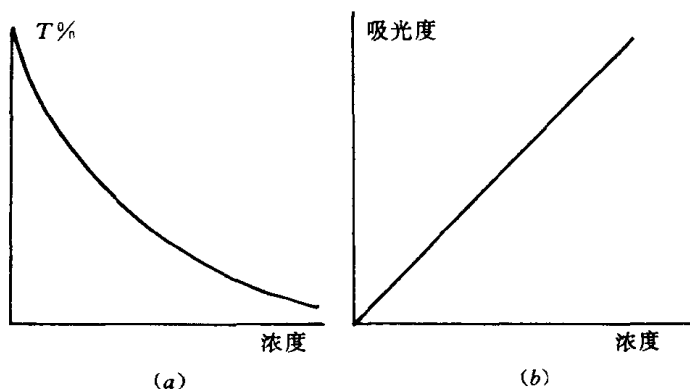


图 1.2 吸光度 A 、透光度 T 及百分透光度 $T\%$ 的换算关系



(a) 浓度 C 与透光度 T 的反指数关系 (b) 浓度 C 与吸光度 A 的直线关系

图 1.3 透光度、吸光度与浓度直线关系

二、朗伯定律

设一浓度固定的溶液，置于厚度为 b 的玻璃器皿中，用一束单色光照射时，入射光强度为 I_0 ，透过光强度为 I_t ，取溶液一极薄层 db ，当光透过 db 层时，其强度改变了 $-dI$ （因光被吸收，强度减小故为负值）， $-dI$ 与入射光强度成正比，与 db 成正比，则有：

$$-dI \propto I db$$

$$-dI \propto a I db$$

$$\frac{dI}{I} = -a db$$

积分

$$\int_{I_0}^{I_t} \frac{dI}{I} = -a \int_0^b db$$

得

$$\ln \frac{I_t}{I_0} = -ab \quad (1-6)$$

改用常用对数，则

$$\lg \frac{I_t}{I_0} = -0.4343ab \quad (1-7)$$

令 $K' = 0.4343a$ ，则

$$\lg \frac{I_t}{I_0} = -K' b \quad (1-8)$$

即

$$\lg \frac{I_0}{I_t} = A = K' b \quad (1-9)$$

其中 K' 为比例常数，它与入射光波长、溶液性质和浓度及温度有关。

上式即为朗伯定律。它的意义是：当用一束单色光照射一定浓度的溶液时，其吸光度与

透过的液层厚度(光程)成正比。该定律对于均匀吸收介质(溶液、气体和固体)都适用。

三、比耳定律

比耳定律其数学表达式为:

$$A = K''C \quad (1-10)$$

式中: A 为吸光度, C 为溶液浓度, K'' 为比例常数, 与入射光波长, 溶液性质、厚度和温度有关。

它的意义是: 用一束单色光照射溶液时, 若液层厚度不变, 则吸光度与溶液浓度成正比。

注意: 与朗伯定律不同, 比耳定律只在一定浓度范围内(浓度 $< 0.01 \text{ mol/L}$) 适用, 因为当浓度大到一定程度时, 溶质的电离或聚合程度就会产生改变, 并导致吸光度不能严格地与溶液浓度成正比。故严格地说, 它是一个适用于稀溶液的定律。

四、朗伯—比耳定律

如果溶液浓度 C 和透光液层厚度 b 都不固定, 就必须同时考虑 C 和 b 对光吸收的影响。为此, 可将朗伯定律和比耳定律联合起来使用。便得到:

$$A = Kbc \quad (1-11)$$

这即为朗伯—比耳定律的数学表达式。它的意义是: 当用一束单色光照射吸收物质的溶液时, 其吸光度与溶液浓度和透光液层厚度的乘积成正比。

必须指出: 此定律是在溶液中邻近分子的存在不改变每一给定分子特性的条件下才成立的。当溶液浓度很大时, 表现出分子之间的相互影响, 该定律就不再成立。

比例常数 K 称为“吸收系数”或“消光系数”。它与多种因素有关, 包括入射光波长、温度、溶剂性质及吸收物质的性质等。如果上述因素中除吸收物质外, 其他因素皆固定不变时, 则 K 值只与吸收物质的性质有关, 可作为该物质吸光能力大小的特征数据。当溶液浓度和透光液层厚度都为 1 时, 溶液的吸光度 A 即为 K 值。 K 可有两种表示方法:

第一种: “摩尔吸收系数”。当溶液浓度以摩尔浓度 (mol/L) 为单位, 透光厚度以 cm 为单位时, K 用“ ϵ ”表示。吸收定律表示为:

$$A = \epsilon bC \quad (1-12)$$

ϵ 表示溶液浓度为 1 mol/L , 透光层厚度为 1 cm 时该物质的吸光度。 ϵ 值越大, 表示该物质吸光能力越强, 用吸收光度分析法测定时灵敏度越高。

第二种: “比吸收系数 a ”。当溶液浓度以 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 为单位, 透光液层厚度以 cm 为单位时, K 用“ a ”表示。吸收定律表示为:

$$A = abC \quad (1-13)$$

表明 a 与 ϵ 相似: 即当浓度 $C = 1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 透光层厚度 $b = 1 \text{ cm}$ 时的吸光度。

ϵ 和 a 的换算关系为:

$$\epsilon = a \cdot F_w \quad (1-14)$$

F_w 表示吸收物质的式量。

五、吸收定律的应用

一般分为两大类型: “等吸光度法”和“测定吸光度法”。本书着重介绍后者。

1. 等吸光度法 它是将标准溶液和待测溶液调整到吸光度相等而进行分析的方法。从吸收定律可知: 当用同一光源照射同一物质的两种不同浓度的溶液时, 若吸光度相等, 则两溶液各自的浓度和透光液层厚度的乘积也相等。利用此关系可在可见光区用眼作检测器(目

视比色法),即可求出待测溶液的浓度。

2. 测定吸光度(A 值)法 设同一种物质的两种不同浓度的溶液,其浓度分别为 C_1 和 C_2 ,盛在相同厚度的比色皿中,透光厚度 b 相同,用同一个单色光源测得其吸光度分别为 A_1 和 A_2 ,由公式(1—12)可得:

$$C_1 = \frac{A_1}{A_2} C_2 \quad (1-15)$$

式(1—15)表明:用同一单色光照射盛于相同厚度比色皿中的同一物质的两种不同浓度的溶液时,两溶液的吸光度之比与两溶液的浓度之比相等。 A_1 和 A_2 都为实验数据, C_2 为标准溶液的浓度,故可求得待测溶液的浓度 C_1 。光电比色法和分光光度法都是利用此种原理进行分析的。

应用上述公式的具体方法有“比例法”和“标准曲线法”两种。在实际工作中常应用后一种方法。

标准曲线就是用几种(一般需要 5 种以上)已知浓度的标准溶液(设其浓度分别为 C_1 、 C_2 、 C_3 、 C_4 及 C_5),分别测定其吸光度(设分别为 A_1 、 A_2 、 A_3 、 A_4 及 A_5),然后以吸光度

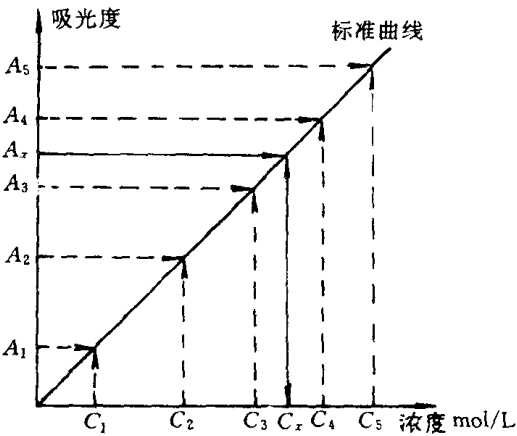


图 1.4 标准曲线(工作曲线)的作法和应用

为纵坐标,浓度为横坐标作图。若该溶液遵守吸收定律,且实验和操作正确,那应得到一条直线,即“标准曲线”或“工作曲线”。 C - A 曲线如图 1.4 所示。

在测定一未知浓度的溶液时,若测得其吸光度为 A_x ,即可由标准曲线查得待测溶液的浓度 C_x 。

第三节 紫外—可见分光光度计的结构原理及组成

紫外—可见分光光度计基本组成有六个部分,即光源、分光系统(单色器)、样品吸收池、检测器、放大线路和测量信号显示系统。一般排列成直线结构,如图 1.5 所示。现将各部分分别介绍如下:

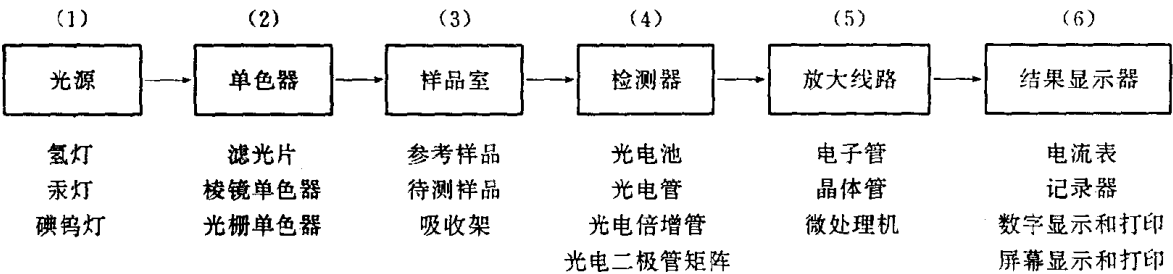


图 1.5 紫外—可见分光光度计的结构框图

一、光源

对光源基本要求是:在广泛的光谱区域内发射连续光谱;有足够的辐射强度;光源有良

好的稳定性;辐射能量随波长没有明显的变化。实际上,这种理想光源不存在。尤其是辐射能量实际上是随波长而变化的,为了弥补这个缺陷,常在分光光度计内装有能量补偿凸轮,该凸轮与狭缝联动,使狭缝大小随波长改变,以便补偿辐射能量随波长的变化。

分光光度计常用光源大致分热光源(包括钨灯和卤钨灯)和气体放电光源(包括氢弧灯、氘灯和汞灯)两类。在紫外—可见分光光度计上常用的光源是钨丝灯和氢灯(或重氢灯)。

1. 钨灯 适用波长范围为 320—2 500nm 之间。辐射能量随温度升高而增大。灯的发射系数对电压变化非常敏感,能量输出在可见光区与工作电压的 4 次方成正比。故为使钨灯发光强度稳定,一台高稳定度的供电电源是绝对必须的(在双光束仪器中可放低要求)。

2. 氢灯 它是紫外区常用光源,适用波长范围为 185—375nm 左右。氢灯有两种类型:一种是在含有一定气压的氢气的管中,在铝电极之间用 2 000—6 000V 电压放电的高压灯。使用时需用水使灯冷却,应用不方便。另一种是低压氢灯,在涂有氧化物的热灯丝与金属电极之间形成电弧,并用 40V 直流电压维持电弧。两种氢灯都能产生 160—375nm 的连续光谱。氘灯光谱分布类似于氢灯,但发光强度要比氢弧灯强 3—5 倍,是目前紫外光谱区常用光源。氢弧灯和氘灯均采用直流稳压电源供电,灯管须采用石英窗。

3. 汞灯 汞灯光谱是离散光谱,在 254—734nm 范围内产生一系列谱线,汞灯属于线光源。一般不作分光光度计的光源,而多用作特殊波长需要的紫外检测器光源。但可用汞灯的几根特征谱线来校正分光光度计单色器的波长刻度。

二、单色器

单色器是一种用来把光源发出的复色光分解为单色光并能任意改变所需波长的装置。它是分光光度计的“心脏”部分。主要由入口狭缝、出口狭缝、分光元件和准直镜等组成。而其中分光元件又为关键性部件,常用的有棱镜或光栅。转动棱镜和光栅的波长盘就改变了单色器出射光束的波长。单色器质量好坏,主要决定于分光元件的质量。

1. 棱镜单色器 棱镜是能把复色光分解成单色光的色散元件。其原理系基于透明物质(玻璃或石英)的折射率和光的波长有关。波长越长,传播速度越快,折射率越小;波长愈短,传播速度越慢,折射率也越大。因而棱镜能将不同波长的光分开。由棱镜作色散元件的棱镜单色器的结构原理如图 1.6 所示。

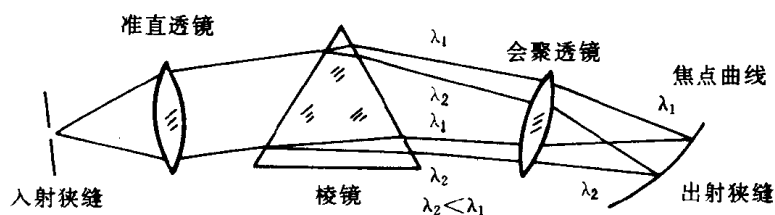


图 1.6 棱镜单色器的结构原理示意图

当然,棱镜的色散特性与棱镜的材料、几何形状也有关系。一般采用 60°棱镜,以增大色散和减少反射损失。如用石英作棱镜,则为消除石英的旋光性,采用一个左旋的,一个右旋的 30°棱镜组合成一个 60°棱镜(称为科尔钮棱镜)。也可用一个 30°棱镜,在其纵轴上镀银(或镀铝),入射光进入棱镜并经银面反射后,再从入射表面离开棱镜(称为利特罗棱镜)。玻璃棱镜,因它对紫外线吸收强,故多用在可见分光光度计上,而石英棱镜则可用于紫外—可见光谱区。

无论哪种棱镜,它们的色散都是非线性的。长波长,色散率小;短波长,色散率高。为此,欲得到相同的光谱强度,狭缝宽度要随波长而改变,其光谱系非匀排光谱。而光栅单色器的光谱系匀排光谱。三种单色器的光谱线分布比较如图 1.7。

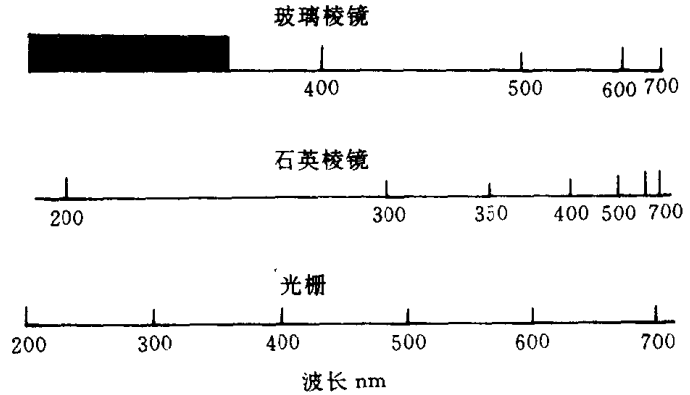
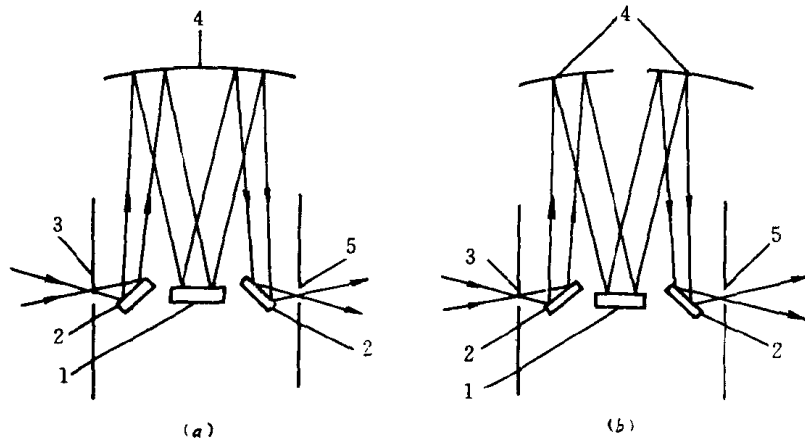


图 1.7 三种类型单色器的光谱线分布比较

2. 光栅单色器 常用光栅单色器为反射光栅单色器。反射光栅又可分为平面反射光栅和凹面反射光栅两种。其中最常用的是平面反射光栅。由它构成的光栅单色器的典型结构如图 1.8 所示。两种装置的基本原理相同,但 C-T 装置更易于制作和调整。



(a)艾伯特装置 (b)却尼尔-特纳装置(C-T 装置)

1. 光栅 2. 反射镜 3. 入射狭缝 4. 准光镜 5. 出射狭缝

图 1.8 光栅单色器的典型结构示意图

光栅单色器的工作原理或光学路线如下:光源经入射狭缝进入并射到凹面反射镜上,经凹面反射镜使光准直并射到平面反射光栅上,经过平面反射光栅的衍射,得到按波长顺序排列的光谱,再射到凹面反射镜上经过凹面反射镜准直射到出射狭缝中。转动光栅,便可使所需波长的单色光从出射狭缝中射出。

由于平面反射光栅是在一块抛光的金属或镀有金属膜的玻璃表面上刻线制成的,刻线是许多紧挨着的平行线,一般 600—1200 条/mm 或更多,每条刻线起着—个狭缝作用,光在未刻部分发生反射,形成衍射光谱。若入射光为复色光,则衍射光谱为不同色光所组成,因此光栅是一个很好的分光元件。光栅光谱的谱线分布随着两平行线间的距离的减小而增大,即随着单位长度内刻线的数目增多而增大。光栅作为分光元件其独特优点就是线性好,谱线分布与入射光的波长无关,如图 1.7 所示,故狭缝不必随波长而变。狭缝宽度固定时,在整个光谱范围内得到的单色光的纯度相同。另外,它的可用波长范围很宽,从紫外光到红外光都可使用,从而简化了仪器结构,其应用日益广泛。

从上述可见,棱镜和光栅各有优缺点。棱镜节省材料,但色散不均匀,是非匀排光谱;而光栅光谱是匀排光谱,谱线分布效果可超过棱镜,都具有相同的分辨率。光栅也可以复制,比棱镜便宜,但不如棱镜坚固。光栅的主要缺点是有次级光谱干扰分析,且杂散光的影响比棱镜大,故常配用滤色片以去掉杂散光。

3. 透镜和狭缝系统 透镜和狭缝系统的作用是控制光的方向,调节光的强度和取出所需单色光。透镜和狭缝系统对单色器性能及所获单色光的纯度和强度有很大影响。对于透镜,要求它透光和聚光性能良好,以减少光强度损失;而对于狭缝,它由两片经过精密加工而有锐利边缘的金属片组成,狭缝两边必须保证准确地平行,并处于同一平面上,如图 1.9 所示。

狭缝宽度可固定,也可微调。入射狭缝好似一个光源,其象被聚焦在出射狭缝上。入射狭缝的作用是限制杂散光进入单色器,出射狭缝的作用是把一定波长的光射出单色器。狭缝越宽,光强度越大,而单色光纯度降低;狭缝越窄,单色光纯度越高,但强度将明显下降。狭缝过窄超过瑞利(Rayleigh)绕射极限,将不

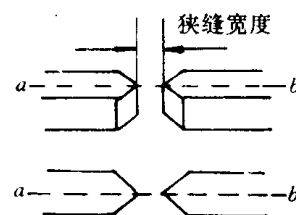


图 1.9 狭缝的构造

但会引起光强度损失,而且不能再增加单色光纯度。因此,狭缝需保持一定的宽度。狭缝宽度对单色光纯度的影响还与所用分光元件和入射光波长有关。由于棱镜的色散是非线性的,对短波长的光的色散率高,对长波长的光的色散率低,故为得到相同纯度的出射光,所需狭缝宽度各不相同。有关石英棱镜单色器所需狭缝宽度与光的波长的关系见图 1.10 所示。而对光栅单色器,由于谱线分布线性好,故其单色光的纯度仅与狭缝宽度有关,而与入射光波长无关。

单色器质量好坏的主要指标是它所产生的单色光的纯度的高低。任何单色器产生的单色光都不可能是绝对纯的,仍然是一定波长范围的光,如图 1.11 所示。单色光的纯度常用有效带宽来表示。

有效带宽定义是:透光度(或辐射能量)为其最大透光度(辐射能量)一半时所含的波长范围。有效带宽又称“对称带宽”或“通带”。有效带宽越小,表示单色光越纯或单色器质量越高。有效带宽由单色器的分光元件的特性和狭缝宽度共同决定,其关系为:

有效带宽 = 线性色散倒数 $\times$ 狭缝宽度

其中线性色散率 $dl/d\lambda$ 是表示两条纯数学的光谱线在光谱成象焦面上的距离。采用线性色散率的倒数 $d\lambda/dl = 1/dl/d\lambda$ (μ/mm) 是为了方便计算。所以通过改变狭缝宽度,就可改变有效带宽,当然也可改变单色光的强度。

分光光度计对光谱的分辨率即分辨两条邻近谱线的能力,取决于棱镜和光栅的分辨能力。常用“分辨率”来表示:

棱镜的分辨率

$$R = \frac{\lambda}{\Delta\lambda} = b \frac{dn}{d\lambda} \quad (1-16)$$

式中: λ 为可分辨紧邻两条谱线的平均波长,即 $\lambda = \frac{\lambda_1 + \lambda_2}{2}$, $\Delta\lambda$ 为两根谱线的波长差,即 $\Delta\lambda = \lambda_2 - \lambda_1$ 。 b 为棱镜的有效底边长。 $dn/d\lambda$ 为棱镜材料的色散率。 n 为棱镜所用材料的折射率。

光栅的分辨率

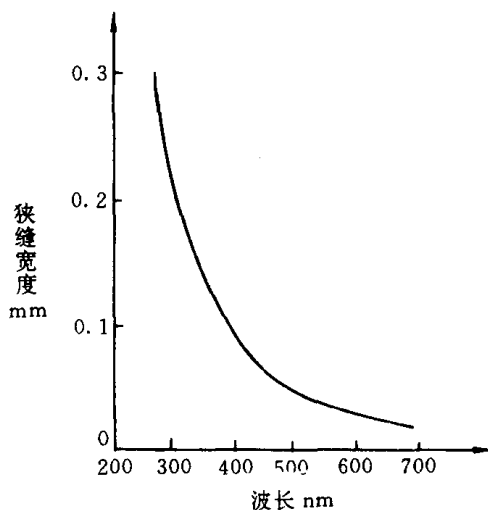


图 1.10 保持石英棱镜单色器的有效带宽为 1mm 时所需狭缝宽度与光的波长的关系

大气或光学部件表面上尘埃的散射等。因此,为减除杂散光,单色器是用罩壳封闭起来的,且内壁涂以黑色吸收杂散光,通常不允许随意打开罩壳,以避免尘埃与烟雾进入或划伤黑体。

4. 滤光片(滤色片) 滤光片也是用于从连续光谱中获得有限波长范围的光学器件。但严格地说并不是真正的单色器,因为它所获得的单色光的波长范围通常较棱镜或光栅单色器的要大几十到数百倍。

滤光片根据其作用原理可分为吸收滤光片和干涉滤光片两种。

(1) 吸收滤光片 这种滤光片通常由有色玻璃制成,也有的是将染色的明胶夹在赛璐珞板或玻璃板之间制成,甚至将有色溶液盛装在玻璃皿中也可应用。

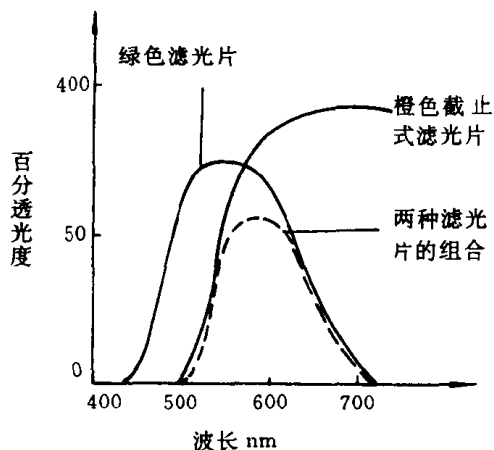


图 1.12 组合滤光片的透过曲线

$$R = \frac{\lambda}{\Delta\lambda} = mN \quad (1-17)$$

式中: m 为光谱的级数, N 为光栅总刻线数。 R 越大,表示分辨率越高,将相邻谱线分辨开的能力越强。

现代高级分光光度计采用双单色器,即包含两个光栅或两个棱镜;或一个棱镜与一个光栅,以用来减少杂散光,提高仪器的分辨能力。

在讨论各种单色器中,还要提及的一点是杂散光的影响及消除问题。在单色器出射光束中往往会混有少量与仪器指示的波长十分不同的光波,这些异常波长的光称为“杂散光”。杂散光极为有害,严重影响吸光度的正确测量。它产生的主要原因是:各光学部件和单色器的外壳内壁的反射;

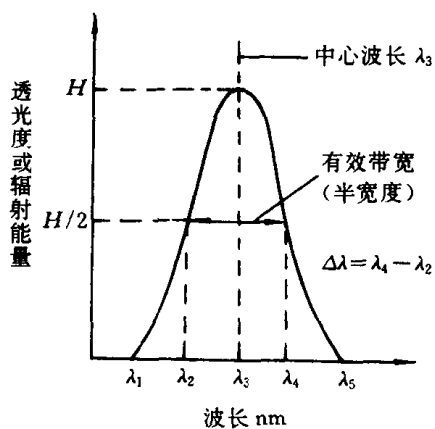


图 1.11 单色器产生的单色光的波长范围和能量分布

吸收滤光片的作用原理是:它能有选择性吸收某些波长的光,而只允许某一定波长范围的光透过,因此可将连续光谱“过滤”得到具有一定纯度的“单色光”。滤光片的这种特性可由它的“透过曲线”来描述,如图 1.12 所示。

透过曲线是滤光片性能和质量的表征。有效带宽越小,表示该滤光片获得的光的单色性能越好,质量越好。滤光片一般用其透光中心波长来命名,如:“520”或“S₅₂”表示透光中心在 520nm。滤光片有效带宽常在 30—250nm 之间。为提高滤光片的单色光的纯度可将两种滤光片(如一个滤光片与另一个“截止滤光片”)组合起来使用以减小其有效带宽,但同

时其透光率也减少了,见图 1.12 所示。

所谓“截止滤光片”就是对某一波长以上(或以下)的所有波长的光几乎百分之百的透过,而对其余部分的波长光的透光率迅速减小并趋于零。

“透光率”为滤光片的另一性能指标。每一个滤光片都有光强损失。滤光片的透光率越大,光强损失越小则滤光片质量越高。

另外还要注意滤光片的均一问题,要求尽量均匀一致最理想。选择滤光片的原则是“互补色原则”,即滤光片颜色应是待测溶液的互补色。波长与颜色及其互补色的关系见表1-3。

表 1-3 波长与颜色及其互补色的关系

(a)较精密的分法					
近似波长范围 nm	颜 色	互补色	近似波长范围 nm	颜 色	互补色
400—465	紫	黄—绿	559—571	黄—绿	红 紫
465—480	蓝	黄	571—576	黄中带绿	紫
480—487	蓝中带绿	橙	576—580	黄	蓝
487—493	蓝—绿	红—橙	580—587	橙中带黄	蓝
493—498	绿中带蓝	红	587—597	橙	蓝中带绿
498—530	绿	红—红紫	597—617	橙中带红	蓝—绿
530—559	绿中带黄	红紫带红	617—780	红	蓝—绿
(b) 一般分法					
近似波长范围 nm	颜 色	互补色	近似波长范围 nm	颜 色	互补色
400—435	紫	黄—绿	560—580	黄—绿	紫
435—480	蓝	黄	580—595	黄	蓝
480—490	绿—蓝	橙	595—610	橙	绿—蓝
490—500	蓝 绿	红	610—780	红	蓝—绿
500—560	绿	红 紫			
(c) 简单分法					
近似波长范围 nm	颜 色	互补色	近似波长范围 nm	颜 色	互补色
400—430	紫	绿	570—600	黄	蓝
430—460	蓝	黄	600—630	橙	青(绿蓝)
460—490	青(蓝绿)	橙 红	630—780	红	蓝 绿
490—570	绿	红 紫			

吸收滤光片简单且价廉,但只能用于可见光区的一般定量分析工作。

(2) 干涉滤光片 它是将一层透明电解质(通常为氟化铝或氟化镁)夹在两块内侧涂有