

瓦里安 Cary Eclipse 荧光分光光度计的功能和应用介绍

陈 猛

(厦门大学环境科学研究中心 厦门 361005)

由于灵敏度比紫外-可见分光光度法高出 2~3 个数量级,并且具有良好的选择性和较多的测量参数,近年来,荧光分析法的应用与日俱增。美国瓦里安公司集各种台式荧光分光光度计之长,于 2000 年推出了设计新颖、性能出众的 Cary Eclipse 多功能荧光分光光度计,除荧光外,还可用于磷光、生物/化学发光的测量。

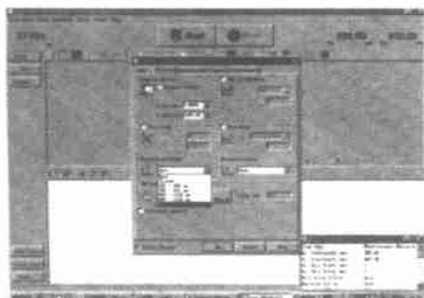
一、硬件设计上的主要特点

1. 高能闪烁光源

由于荧光物质的荧光强度与激发光源的强度成正比, Eclipse 采用了不需要预热、脉冲输出能量相当于 75KW 的闪烁 Xe 灯,并利用电子技术控制其只在发出测量指令后才闪烁。这一设计给荧光分析者带来极大的方便: 1) 可以开着样品室测量。由于室内光线的强度不足激发光源的千分之一,不会对测定造成干扰,因此省去了不停开盖、关盖的繁琐。这一特点尤其在反应动力学测量过程中往液池中添加反应试剂。2) 有效避免光敏物质的降解。传统的连续 Xe 灯光源开机后一直处于发射状态,许多荧光物质在其长时间的照射下会发生光降解,引起测量误差。而 Eclipse 通过自定义闪烁次数或闪烁时间,既保证了足够的激发,又避免了光降解作用。3) 大大延长了 Xe 灯光源的使用寿命,可连续工作 20,000 小时,远长于连续 Xe 灯的 2,000 小时,基本上终生不用更换光源。

2. 多波长范围的滤光片

由于荧光分析测量的是分子的绝对发光强度,背景荧光和散射光的干扰越低,灵敏度就越高, Eclipse 为有效克服这些背景干扰,在其激发和发射单色器上都标准配置了多个波长范围的滤光片,一旦选定测量波长,软件可自动调用合适的滤光片。

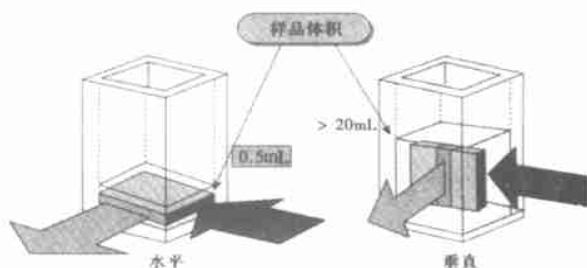


3. 两支 R928 型光电倍增管

一支用于样品信号的测量,一支用于参比信号。这种红敏的光电倍增管在紫外至近红外 1100nm 的波长范围内都具有良好的灵敏度(参见 350nm 和 500nm 处水的拉曼峰的信噪比指标),同时还可通过软件调整检测电压(强荧光测量用低电压,弱荧光用高电压),在保证合理灵敏度的同时,最大限度地延长其使用寿命,并与长寿命光源相匹配,共同确保 Eclipse 的整机使用寿命。

4. 水平狭缝

减少了测量所需的样品体积(0.5mL, 10mm 液池),同时,由于检测到的样品体积比垂直狭缝大得多,因此,同等条件下,灵敏度高出 5~30 倍。



5. 完备的测量附件

Eclipse 在其宽大的样品室内预留了多种测量附件的插口,如可接温度低至 77K 的牛津低温冷阱、电热恒温水浴、液池内精确测温的温度探头以及偏振附件等。尤其值得注意的是,拆卸方便的多孔板附件 30 秒内即可将 Eclipse 由荧光分光光度计变成一台荧光多孔板读数器,能对每一孔进行扫描、浓度测量、动力学测量等操作。

二、软件应用上的主要功能

1. 扫描

在指定所用溶剂后, Eclipse 的预扫描功能可自动识别出该溶剂的拉曼、瑞利以及二级散射峰,并在扫描结束后自动给出最佳的激发/发射波长,方便初学者确定多吸收/发射化合物的荧光测量参数。除激发、发射和同步扫描外, Eclipse 还具备固定波长间隔(0.15~30nm)和三维谱图的扫描功能,以获取最佳的

分辨率和最丰富的光谱信息,并具备对谱图进行加、减、1~4阶导数等的运算功能。

2. 浓度测量

操作者仅需准备标准溶液和样品,数据读取、工作曲线方程、回归系数、多次测量的标准偏差和相对标准偏差的运算都由 Eclipse 自动完成,并最终生成标准报告。

3. 动力学测量

80 点/秒的数据采集速度满足快反应的测量要求,对于慢反应,数据采集时间长达 20,000 分钟,并可针对反应速度的不同区段,程序设定数据采集间隔。

4. 时间分辨测量

Eclipse 能够测量延迟荧光和磷光的时间寿命,内置的数据分析功能可以对数据进行单指数和双指数拟合。

5. 仪器性能认证

该功能是瓦里安 UV、荧光等光谱软件的一个独特功能。用户可根据所遵守规范的要求随时对诸如杂散光水平、波长准确性、灵敏度等多项性能指标进行检验。

三、应用

原理上,分子结构中含有 1) 共轭 π 键结构。2) 刚性平面结构。3) 给电子取代基的化合物都可以尝试用直接荧光法测定。间接荧光法测定是指目标分析物本身不具备荧光发射能力,但具备使某种荧光物质荧光猝灭的能力,或者可以通过氧化—还原、偶联、酶催化反应等手段将其转化为荧光物质,进行间接测量。荧光分析法目前在环境检测、药物分析、临床检验以及生命科学研究中正在被广泛应用,以下略作介绍。

1. 环境检测领域

石油及石油产品是水环境常见的污染源之一,不同产地,不同类型油的主要组分各不相同,其荧光光谱也有着显著差别,利用油标可在激发 310nm、发射

365nm 处测量水样品中总油含量,利用 Eclipse 的同步扫描功能还可对重油、轻柴油、机油、液压油以及原油进行初步鉴定。

其他如阴离子表面活性剂作为洗涤剂污染的主要成分、叶绿素作为水环境浮游植物生物量和水体富营养化的重要指标以及多环芳烃等都可以用荧光分析法进行测量。

2. 食品和药物分析

已报道的可用荧光或化学方法分析的食品、医药中的化合物包括:维生素 A、维生素 B1、B2、维生素 Bc (叶酸)、维生素 C、维生素 E(生育酚)、维生素 P(芦丁),抗菌药物中的青霉素、金霉素、四环素等,抗疟疾药物中的奎宁、疟涤平,利凡诺等,麻醉药中的大麻醇,吗啡,可待因,罂粟碱等,镇静药物中的氨基比林、苯并二氮杂卓、巴比妥、苯丙胺等,以及吩噻嗪类药物、奎诺酮类药物、利血平、异烟肼、6-巯基嘌呤等。

3. 生命科学及其相关研究领域

荧光分析法在这一领域的发展和应用是现在和将来的一大热点,主要集中在:1) 多种氨基酸的分析、在肌肉和心脏疾病研究中非常重要细胞内离子浓度测定;2) DNA/RNA 的相关研究,如 DNA、RNA 的检测和定量,用以鉴别病毒、细菌等的 DNA/酶相互作用研究、DNA 密码的改变导致的癌症病因研究、能断裂 DNA 的限制酶 (Restriction enzymes) 测试,荧光 PCR (DNA 的放大) 的研究等;3) 蛋白质和酶的作用研究,如 DNA 的表达、细胞膜流动性和细胞膜内蛋白质研究、涉及抗体、蛋白质和酶的 ELISA 测试研究、酶活性的测定等。

尤其是各种新型蛋白、核酸荧光标记物的引入,各种荧光酶联免疫分析技术、偏振荧光测量技术以及为克服生物样品紫外区背景荧光和散射光的严重干扰而提出的近红外区荧光测定技术的发展,为生命科学领域提供了丰富的研究手段,而瓦里安的 Cary Eclipse 荧光分光光度计则以其杰出的多功能、长寿命设计及紫外、近红外区较高的灵敏度性能,为该领域的研究提供了完美的仪器平台。