

微机控制多功能荧光分光计的研制^①

李耀群 黄贤智

(化学系)

摘要 报道一种微机控制带恒能量同步扫描和可变角同步扫描的多功能荧光分光计。本仪器可测绘激发光谱、发射光谱、三种同步光谱(包括固定波长法、恒能量法、可变角法)、一、二阶导数光谱及同步一阶导数光谱等。

关键词 微机控制, 荧光分光计, 光谱

荧光分析法灵敏度高、选择性好,已成为现代分析化学、尤其是超微量和痕量分析领域中不可缺少的测试工具。同步荧光法是多组分荧光物质同时分析的有效手段。恒能量同步荧光法^[1,2]和可变角同步荧光法^[3]具有比固定波长同步荧光法更加优越的特点,可惜国内外尚无现成的商品化仪器,致使该法未能得到广泛的研究和应用。目前国外仅有少数几个小组进行实验室研究,国内尚未见开展这方面的工作。为此,我们在本实验室研制荧光分光计的基础上^[4],设计出多功能荧光分光计。该仪器采用微机控制,可测绘荧光激发谱、发射谱、各种同步谱(固定波长法、可变角法和恒能量法)、一、二阶导数光谱及同步一阶导数谱。所设计的软件系统使各种功能的选择非常方便,仪器可用于多方面的荧光分析研究工作,其中可变角同步一阶导数荧光法、恒能量同步一阶导数荧光法国内外未见报道。

1 基本原理

在经典的荧光分析法中,利用固定激发单色仪出射波长,扫描发射单色仪出射波长而测绘得荧光体的发射光谱;利用固定发射单色仪出射波长,扫描激发单色仪的出射波长得荧光体的激发谱。同步荧光分析在实验技术上与前者的差别在于同时扫描激发波长(λ_{ex})与发射波长(λ_{em}),并检测相应的荧光信号,测绘得的谱图即为同步谱。根据扫描方式的不同,同步荧光分析法又可分为固定波长法、可变角法和恒能量法。固定波长同步荧光法已较为成熟,该法系让激发和发射单色仪的波长差 $\Delta\lambda$ ($\Delta\lambda = \lambda_{em} - \lambda_{ex}$) 保持固定地进行同时扫描,所得谱图称为固定波长同步谱。可变角同步荧光法则让两单色仪波长分别以固定速度扫描,但两单色仪波长扫描速度不同,从而得波长差 $\Delta\lambda$ 对波长的线性变化,以便达到最佳的光谱分辨,所得谱图即为可变角同步谱。顾名思义,恒能量同步荧光法是激发和发射同时扫描过程中,保持两者具有固定的能量差,也即保持一恒定的波数差 $\Delta\bar{\nu}$ 关系。有关恒能量同步荧光法详见另文^[5]。

2 仪器设计

2.1 仪器结构

仪器方框图见 Fig.1,工作原理如下:由光源发射出的光束经透镜组聚焦和单色仪色散后照射于液池,液池中的荧光物质受激发而发射出荧光,荧光经单色仪色散后照射于光电倍增管 PMT, PMT 把荧光信号转化为电信号后于记录仪记录或数字电压表显示。

① 1989-10-09收到,中国科学院自然科学基金资助项目

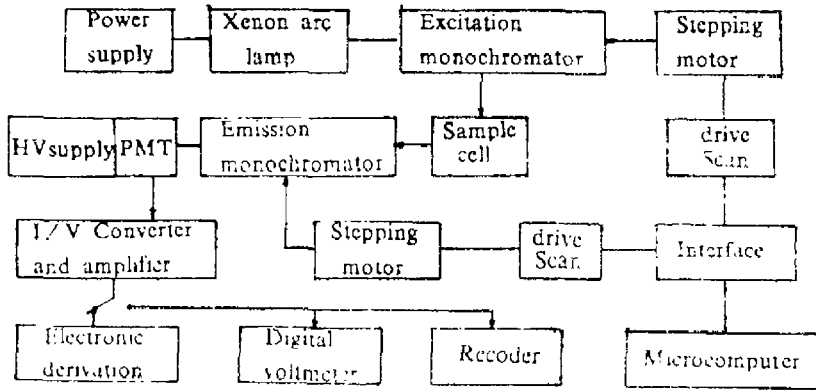


Fig.1 Schematic diagram of the instrument

本仪器的光源采用 XQ-500 W 氙灯;激发单色仪和发射单色仪为 WYF 平面光栅单色仪,1 200 线/mm,波长精度为 ± 1 nm,激发和发射单色仪波长范围均为 220~800 nm.狭缝为插片形式,有 0.5, 1.0, 2.0 mm 等规格.

一般荧光分光计采用同步电机带动单色仪扫描,难以进行各种扫描速度变换,为满足恒能量和可变角扫描需要,我们改用步进电机,并且采用微机控制.微机通过接口电路送出脉冲信号给驱动电路,驱动电路输出按一定相位分配方式的放大脉冲信号驱动步进电机运转,从而带动单色仪波长扫描.

采用荔枝 II 微型机,它与 Apple II plus 微机完全兼容.接口电路由 PG-065 I/O 卡和 74 LS05 集电极开路输出的反相器组成.步进电机驱动电路由 CH250 环形脉冲分配器和二级功放电路组成,步进电机为 45BF3/3B 型.根据光谱扫描方式的不同,充分利用 I/O 卡的 SY 6522 多功能接口适配器内部二个定时器 T1 和 T2 的不同功能进行脉冲控制.在恒能量同步光谱扫描中,利用 T2 对 T1 产生的方波脉冲进行计数,以控制 T1 发出的脉冲个数. T1 通过引脚 PB7 输出连续脉冲信号驱动激发单色仪扫描.而发射单色仪则由输出口的高低电平软件延时形成连续脉冲信号而得到扫描驱动.

2.2 光谱扫描软件系统

恒能量同步扫描软件的设计基于如下方式:在扫描过程中,固定激发单色仪的扫描速度,不断改变发射单色仪扫描速度,而发射单色仪扫描速度的变化大小就由恒能量扫描要求决定.

软件以模块形式组合而成,便于调试和扩展功能.程序采用高级语言(BASIC)和汇编语言

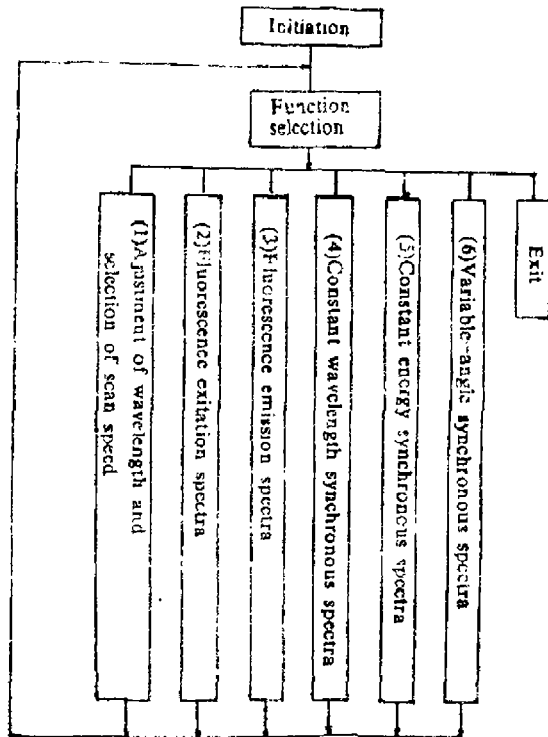


Fig.2 Total block diagram of the program

(6502)混编而成. Fig.2 为程序总框图. BASIC 程序完成实验参数键盘输入、处理及显示等功能,汇编语言程序完成脉冲信号输出实现光谱扫描. 设有四段汇编语言子程序,即激发单色仪扫描程序,发射单色仪同时固定速度扫描程序,以及激发和发射单色仪恒能量同步扫描程序. BASIC 语言程序根据设定要求调用汇编语言子程序.

各种光谱模块均可改变波长扫描范围 D,重复扫描和反向扫描. 做重扫和改变 D 试验时计算机自动判断是否经过反扫,若不必反扫,计算机控制单色仪返回扫描起始位置,等待. 每次扫描后微机响铃提示实验者光谱扫描完毕,显示屏上指示出当前单色仪波长位置等仪器状况.

恒能量同步光谱模块增设了改变恒能量差值 $\Delta\bar{\nu}$, 显示及打印激发和发射波长对应表等功能. 当选择改变 $\Delta\bar{\nu}$ 项时,微机控制单色仪回到发射单色仪的波长和激发单色仪的波长相同位置,当输入新的 $\Delta\bar{\nu}$ 后,单色仪自动调开一定波长间隔,等待开始扫描光谱.

可变角同步光谱模块增设了选择和改变发射单色仪扫描速度,显示及打印激发与发射波长对应表功能. 发射单色仪扫描速度可输入正或负值. 若其值为负,作出的谱图为“相向扫描”可变角同步光谱.

3 性能测试

3.1 仪器灵敏度、稳定度的测试

灵敏度 以水溶剂拉曼光信噪比 S/N 作为仪器灵敏度衡量标准. 经测试,其 $S/N \geq 25$ (激发波长 350 nm),接近于一般商品荧光分光计.

稳定度 用 0.5 ppm 奎宁(0.05 mol/l H_2SO_4)为检测液,以 350 nm 光激发,读取 450 nm 处的荧光信号,反复试验 11 次,其荧光信号波动值在 $\pm 1\%$ 之内.

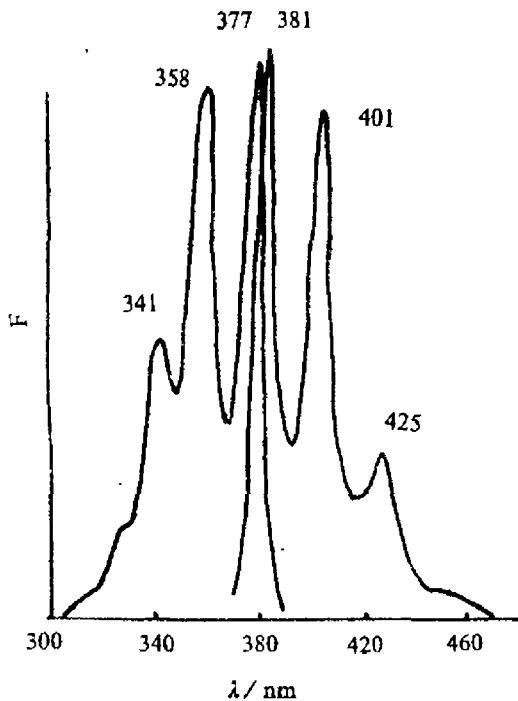


Fig.3 Fluorescence excitation and emission spectra of anthracene

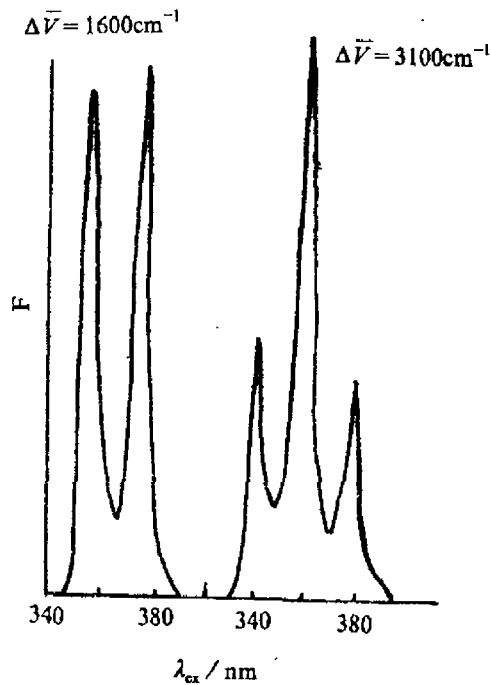


Fig.4 Constant energy synchronous spectra of anthracene

3.2 激发光谱、发射光谱及固定波长同步光谱的测绘

绘制了多种多核芳香烃如葱、萘、芘等以及维生素 B₂、B₆ 的激发光谱、发射光谱和固定波长同步光谱。经和日立 850 型荧光分光计对照实验,其光谱均基本吻合。Fig.3 为本机绘出的葱的激发和发射光谱。由图可见仪器分辨性能良好。

3.3 恒能量同步光谱的测绘

以葱为例,取葱标准溶液,用恒能量差为 1 600 cm⁻¹ 和 3 100 cm⁻¹ 进行恒能量同步扫描,记录其光谱。Fig.4 即为葱恒能量同步光谱,其谱图与文献[2]基本一致。利用本仪器绘制芘、吡啶的恒能量同步光谱,亦收到满意效果。

本仪器已成功地用于葱、萘、芘三组分混合物的恒能量同步荧光分析。

3.4 可变角同步荧光光谱的测绘

以维生素 B₂ 和 B₆ 进行可变角同步谱的扫描试验。以 λ_{ex} 、 λ_{em} 扫描速度分别为 120 nm/min 及 110.57 nm/min,和以 λ_{ex} 、 λ_{em} 扫描速度分别为 60 nm/min 及 164.68 nm/min 进行同步扫描。部分光谱测绘结果见 Fig.5。由于 850 型荧光分光计不具备此功能,文献中未见记载而无法比较。但按所定的激发和发射单色仪扫描速度进行可变角同步扫描,光谱能选择性地出现荧光峰来判断,可知其可变角同步扫描是可行的。

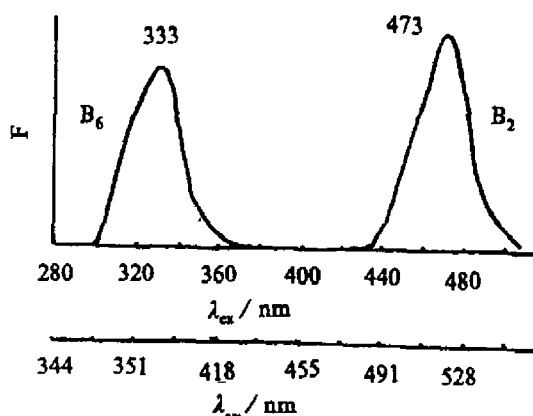


Fig.5 Variable-angle synchronous spectra of vitamin

B₂ and B₆ (a) λ_{ex} 120 nm/min, λ_{em} 110.57 nm/min

3.5 导数光谱的测绘

把电子微分器串接于荧光信号输出和记录仪之间,而后扫描光谱,即可获得各种导数光谱。本仪器除了能象日立 850 型或 650 型荧光分光计一样进行导数激发光谱、导数发射光谱和固定波长同步-导数光谱的测绘外,还可进行可变角同步-导数光谱、恒能量同步导数光谱的测绘。经试验,结果均达到要求。

本工作曾得到化学系卓向东老师和校精密仪器厂郑元、吴尊水、吴易明等同志的支持和帮助,谨致谢意。

参 考 文 献

- 1 Inmam E L and Winefordner J D. *Anal. Chem. Acta*, 1982, 138: 245~252
- 2 Inmam E L and Winefordner J D. *Anal. Chem.*, 1982, 54: 2 018~2 022
- 3 Miller J N. *Analyst*, 1984, 109: 191~198
- 4 黄贤智等. 光学与光谱技术, 1986, (7): 43~47
- 5 李耀群, 黄贤智. 分析化学, 1989, 17: 1 149~1 158

Microcomputer-controlled Versatile Spectrofluorometer

Li Yaoqun Huang Xianzhi

(Dept. of Chem.)

Abstract A new microcomputer-controlled versatile spectrofluorometer with the function of constant energy and variable-angle synchronous scanning has been developed. LiChi-II microcomputer was used to control the scan system of the instrument. Various spectra including excitation spectra, emission spectra, all kinds of synchronous fluorescence spectra (constant energy, constant wavelength, variable-angle) and their derivative spectra can be gained from it.

Key words Computer control, Spectrofluorometer, Spectra