

紫外-可见分光光度计性能评价

雷东锋¹, 段淑娥²

(1 西安交通大学 生物工程研究所, 陕西 西安 710049; 2. 西安联合大学 化学与生命科学系, 陕西 西安 710065)

摘 要:紫外-可见分光光度计(以下简称 UVS)是生物、化学和环保领域中非常重要的研究工具, 对 UVS 的性能目前尚没有一个通用的定量评价标准. 本文就国际上几个著名品牌 UVS, 从其波长准确性、波长重复性、测光准确性、扫描速度、光栅性能、软件功能和可选配的附件等方面进行综合评价, 从而为选购和使用 UVS 仪器提供参考.

关键词:UVS, 光栅, 性能

中图分类号:TH744.12⁺2 **文献标识码:**A

UVS 制造厂家很多, 各公司的产品各有特色. 美国 PE 公司生产的 UVS 主要用于分析、生化和环保等领域, 有 Lamda10/Bio 系列、Lamda20/Bio 系列、Lamda40/Bio 系列、Lamda18 等, 其中 Lamda18 为最优型号. Bio 系列属生化系列, 仪器配有独特的实验室信息管理系统软件, 可进行浓度测定、酶活力测定、纯度测定、常规紫外-可见分光光度分析. 有 5 种预设方法供选择: 核酸分析方法、蛋白质分析方法、动力学分析方法、一般定量分析方法和常规紫外-可见分光光度分析法. 有用于仪器校准的 VAL1 trans 方法软件, 有用于 DNA、蛋白质和酶动力学分析的 BIO trans 方法软件, 有用于水质、环保分析的 SPECTRO trans 方法软件.

日本日立公司 HITACHI(简称 HI)生产的 UVS 有 U-100, U-1500, U-2001 和 U-3000 系列等, U-3000 性能最优. 采用独特的濑谷-波冈式光路设计, 在光栅的研制方面历史悠久, 实力雄厚, 因而它的仪器综合指标较好. HI 公司的比色杯采用光胶制作, 解决了微量样品的污染问题. HI 的 UVS 软件从光度计控制, 测量条件的设定和管理, 实现测量、记录和显示数据以及应用等方面来看, 性能优越, 操作极其方便, 并且有丰富的数据处理功能. 在生物化学领域尤其是分子生物学方面, 对于 DNA 和蛋白质有极其全面和可靠的分析功能, 配合 HI 的超速冷冻离心机, 成为一整套基因工程的研究工具, 所有的最新测试技术都包括在核酸分析软件包里. HI 的 UVS 软件中有单波长、双波长和三波长计算功能, 定量分析中, 有一级校准曲线、二级校准曲线、三级校准曲线和 SEGMENT 校准曲线等四种类型的校准曲线.

美国瓦里安公司 VARIAN(以下简称 VR)的 UVS 产品有 Cary 50, Cary 100, Cary 300, Cary 400 等. Cary 400 谱带宽度 0.01 nm, 步进马达驱动连续可调. 采用 Double out-of-plane Littrow 单色器, 与常规的双单色器相比, 杂散光和噪音极低, 此种光栅大多用在紫外-可见-近红外分光光度计中. 如 HI 的 U-3501 和 U-4001, VR 的 Cary 500 就采用了这种光栅. VR Cary 400 是目前 UVS 中各项指标最好的型号, 并具有多种蛋白质和核酸分析功能, 可研究 DNA 的热变性和复性特征.

惠普公司(以下简称 HP)是集仪器、电脑和打印机一体化生产的公司, 在软件开发方面很有特色. HP8450 配有二极管阵列检测器, 工作站可提供 17 种光谱处理数学方法. HP 公司开发了中文工作站, 操作十分简便.

收稿日期:2001-03-08

作者简介:雷东锋(1969—), 男, 陕西合阳人, 西安交通大学生物工程研究所博士生.

UNICAM公司(以下简称UM)的产品系列有UV2系列,UV3系列,UV4系列,还有UV300,UV500,UV5500系列。UV4系列最优。所有产品都使用全息母光栅和石英镀膜光学器件,母光栅比复制光栅的光损失小,保证了分析工作中较宽的线性范围。

美国贝克曼公司BECKMAN(以下简称BM)生产的UVS有DU600和DU7000系列。DU600是内置微机的常规型分光光度计,DU7000系列是由微机控制的具二极管矩阵检测器的型号,波长范围在190~1100 nm,可实现超高速的全波长扫描,提供快速的光谱分析,特别适用于酶动力学研究和新方法的开发。DU系列提供了丰富的生物学软件,包括:(1)蛋白质测定软件;(2)核酸测定软件;(3)DNA/Oligo Quant Analysis软件;(4)酶机理研究软件;(5)单组分定量分析软件;(6)多组分定量分析软件;(7)酶活力软件;(8)凝胶扫描软件;(9)仪器性能测试软件等。

日本岛津公司SHIMADZU(以下简称SU)生产的UVS有UV-1601,UV-1601PC,UV-2401PC和UV-2501PC型等,该公司的产品着重于化学方面的研究,软件在数据处理方面很完善。

1 光栅

光栅是分光光度计中最为重要的部件,它直接决定着仪器的分辨率。目前UVS中有的使用凹面衍射光栅(如HI公司),有的使用全息光栅(如SU公司),有的使用Littrow monochromator(如VR公司),有的使用全息母光栅(如UM公司)。就光栅的性能和制造光栅的能力来看,HI公司实力较为雄厚,制造的光栅普及全世界;日本HI和法国米尔顿公司是世界上唯一两家制作机刻光栅的公司。机刻光栅加工难度大,条件苛刻,制造周期长,成本高,一般只能制造少量母光栅,而实际应用的是质量稍逊于母光栅的复制光栅。机刻光栅虽有鬼线和伴线,但由于使用了激光干涉仪光电控制装置,性能大大提高了一步。机刻光栅的光能量损失小,线性范围广,寿命长,是较为理想的光栅,目前只有HI公司采用机刻凹面衍射光栅。全息光栅的制造基于双光束干涉原理,不需要刻划机,不存在刻刀磨损的影响,它记录的是干涉条纹,不存在周期误差,所以它无鬼线,杂散光也低。全息光栅可以得到三个波长上完全消相散的凹面光栅,但是所使用的波段较窄,并聚焦在非圆曲线上,凹面全息光栅既可以记录平面波,也可以记录球面波,特制的凹面全息光栅还具有消相差的特性。此外全息光栅的制造周期短,一般说曝光时间不到一小时。因此全息光栅被大多数公司所采用。但是,全息光栅的制造需要注意以下问题:激光器的选择问题,感光材料的选择问题,毛坯选择问题,光致抗蚀性的选择问题,曝光时间的问题,槽形控制的问题等,这些都直接关系着光栅的质量。全息光栅由于刻槽呈正弦形,因此它无明显的闪耀方向。直接刻划制造光栅,成本极高,生产周期长,不仅数量上远远不能满足对光栅日益增长的需求,而且也极其昂贵,因而通常采用复制光栅,光栅复制过程中,硅油厚度、真空度和铝层厚度都会影响光栅质量。

2 波长范围、波长准确度和波长重复性

波长范围与光源、单色器及检测器的光谱响应特性有关。一般的波长范围在190~900 nm,大多采用R928光电倍增管。若覆盖至1100 nm,通常外加一个硫化铅光电倍增管,或采用光电二极管。从覆盖的最低波长来看,VR公司的Cary400由于采用了Littrow光栅,最低波长可达到175 nm,PE公司的Lamda18可达到185 nm,其他几个公司均可达到190 nm;波长准确度,Cary400为 ± 0.1 nm,Lamda18为 ± 0.15 nm,BECKMAN 600系列为 ± 0.2 nm,HI U-3310和UM UV4,岛津UV-2501PC为 ± 0.3 nm,HP8450为 ± 0.5 nm;波长重复性是定性分析的重要因素,波长位置若不能准确重复,就不能准确判定吸收峰的位置,甚至引起判断错误。从波长重复性评价,Lamda18>Cary400,HP8450>HI3310>岛津UV-2501PC,BECKMAN600和UM UV4。

3. 杂散光

杂散光可使测量结果偏离比尔定律,产生误差。Cary400由于采用紫外-可见-红外分光光度计中常用的Littrow光栅,杂散光小于0.000 08% T,Lamda18小于0.000 1% T,岛津UV-2501PC小于0.000 3% T,HI3000为0.000 5% T,UM UV4为0.005% T,HP8450和BECKMAN600均小于0.05% T。

4. 光度准确性和重复测量精确度

光度准确性是定量分析的重要指标, Cary400 为 $\pm 0.002 \text{ nm}(0.5 \text{ Abs})$, $\pm 0.003 \text{ nm}(1 \text{ Abs})$; HI3000 为 $\pm 0.002 \text{ nm}(0 \sim 0.5 \text{ A})$; UM UV4 和岛津 UV-2501 皆为 $\pm 0.002 \text{ nm}$; Lamda18 为 0.003 nm ; HP8450 为 $\pm 0.005 \text{ nm}$; BECKMAN600 为 $\pm 0.005 \text{ nm}$. 重复测量精确度, Cary400 1 Abs 处最大偏差 $< 0.0008 \text{ A}$; Lamda18 为 $\pm 0.004 \text{ A}$; HI3000 为 $\pm 0.001 \text{ A}(0 \sim 0.5 \text{ A})$, $\pm 0.002 \text{ A}(0.5 \sim 1 \text{ A})$; UM UV4 为 $\pm 0.001 \text{ A}(1 \text{ A})$; BECKMAN600, 岛津 UV-2501, HP8450 无明确指标.

5 基线稳定性和平坦性

双光束分光光度计在扫描 100%T 或 0 A 线时(样品室中不放任何东西), 基线的稳定性会影响光度准确度. Lamda18 为 $\pm 0.0002 \text{ A/h}$; HI3000, 岛津 UV-2501(340 nm)(电源启动后 2 h)为 $\pm 0.0004 \text{ A/h}$; UM UV4 为 $\pm 0.0005 \text{ A/h}$; HP8450 $< 0.002 \text{ A/h}$; BECKMAN600 $< 0.003 \text{ A/h}$. 双光束分光光度计扫描基线时, 基线倾斜弯曲的程度, 是仪器重要性能指标之一. 平直性不良, 说明光路不平衡, 光学元件位置不准确, 反射镜质量下降或电子和机械系统不良. 基线的平直性还可用来考察噪音和光源或色散元件切换时的谱线衔接情况等. 平直性不良, 会对各个吸收峰值之间的比值产生影响, 给物质结构的分析带来困难.

6 狭缝宽度

狭缝宽度应允许有较多的光能量通过, 以得到较高信噪比. 但过宽的狭缝会降低光度的准确度和光谱细节的分辨率, 甚至使带加宽. 谱带半宽度每增加 10 nm, 基线吸光度值几乎增加 0.1, 且光谱细节的分辨率大大降低, 但过窄可能会增加噪音. 当能量高时, 噪音的影响不明显; 但当能量低时, 例如遇到高吸收样品时, 噪音就明显影响光谱的平滑了. 因此狭缝宽度可调最好, Lamda 18 为 0.5~4.0 nm 连续可调; Cary400 为 0.01~5 nm 每步驱动 0.01 nm 连续可调; HP3000 为 0.1, 0.2, 1, 2, 4, 5 nm 六挡可选; 岛津 UV-2501 为 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5 nm 六挡可选; UM UV4 为 0.2, 0.5, 1, 1.5, 2, 4 nm 六挡可选; HP8450 带宽 1 nm 不可调; BECKMAN600 $\leq 1.8 \text{ nm}$. 在这一指标上 Lamda 18 和 Cary400 调节余地较大, 适合于高要求的研究工作.

7 响应时间的选择

响应时间的选择取决于样品的性质、所选择的狭缝宽度和信噪比. 高吸收样品应选择长的响应时间以减小噪音. 但在扫描光谱时, 特别在快的扫描速度下, 应选用快的响应时间以避免光谱的失真, 除非噪音成为问题时, 方可增加响应时间, 因此仪器的响应速度应可调. HI3000 有快、中、慢三种响应模式. Lamda18, 岛津 UV-2501 自动设置响应速度; Cary400 为 0.033 s; BECKMAN600 为 0.05 s. 从这一指标来看, 用户可根据自己的研究要求, 灵活选用.

8 扫描速度的选择

扫描速度的选择取决于对不同性质样品所选择的谱带宽度和响应时间. 一般对锐的吸收光谱, 应选择慢的扫描速度, 以及与噪音协调的快的响应时间. 而对宽的吸收光谱, 可以采用较快的扫描速度, 从仪器的角度来考虑, 当然扫描速度越快越好, 扫描速度控制的精度越高越好. Lamda18 可达 2880 nm/min; Cary400 可达 2000 nm/min; HI3000 为 0.3, 3, 15, 30, 60, 120, 300, 600, 1200, 1800 nm/min 十挡准确控制. HP8450 和 BM DU7000 为二极管阵列检测器, 全波段扫描时间 0.1 s, 可以观察波长-时间-吸光度的三维立体图; 岛津 UV-2501 为 900~160 nm/min.

由此可见从光栅的质量和耐用性上看, HI 机刻光栅和 UM 公司的母光栅质量较好. HI 制造光栅历史悠久, 技术成熟, 力量雄厚, 因而光栅总体质量可靠, 性能优越; Cary400 由于采用了 Littrow 光栅, 仪器指标较高, Cary400 属于目前各项指标最高的 UVS. 从除杂散光和光路的设计来看, HI3000 和岛津 UV-2501 性能良好. 从软件使用的方便性来看, HP 中文工作站更方便. 从经济和化学反应方面的使用来考虑, SU 实惠. 从生化方面的使用上应考虑 BM, HI 和 VR 的仪器及其选配件. 从动力学和扫描速度

上来考虑,可选择带有二极管阵列检测器的 HP8450 和 BM DU7000.从使用的广泛性和总体实力上来看,应考虑 PE,HI 和 VR 的 UVS.

UVS 还在发展之中,如光电技术的发展带动了 UVS 的发展,阵列 CCD 检测技术的出现,使 UVS 免去了移动部件,有了极高的波长稳定性和重现性. CCD ARRAY 检测器可以在扫描单元中获取单一波长下的全部波谱情况.这种检测器具有高的量子效率,灵敏度极高,因此在吸收测量中只需微弱的光,降低了样品加热和光氧化的可能性.最新的信号处理(DSP)系统被应用于 UVS 中,可以有效地获取数据,不需操作者调节仪器参数.该系统可以根据样品光密度自动调节检测器的积分时间,大大缩短了获取和显示光谱的时间,同时提高了图像的全真性,该种仪器刚刚制造成功.随着研究领域的不断扩大、分析测试条件的不断深入和其他技术的应用,UVS 仍在不断的发展之中.不同商家的 UVS 都有自己的特色,在仪器性能的某一方面各有所长.性能指标上的差异、软件分析功能上的差异、检测器的不同和选配件上的差异都关系着使用者的科研需求.不同的用户强调仪器指标和配置不同,因此全面掌握不同厂家仪器的特色,对于仪器选型、配置,更好地服务于科研具有很重要的作用.

[参 考 文 献]

- [1] HITACHI U-3010 SPECTROPHOTOMETER INSTRUCTION MANUAL[Z].
- [2] BECKMAN DU600 SERIES SPECTROPHOTOMETER INSTRUCTION MANUAL[Z].
- [3] UNICAM UV4 SERIE SPECTROPHOTOMETER INSTRUCTION MANUAL[Z].
- [4] PERKIN-ELMA SPECTROPHOTOMETER PRODUCT[Z].
- [5] SHIMADZU SPECTROPHOTOMETER PRODUCT[Z].
- [6] VARIAN CARY400 SPECTROPHOTOMETER INSTRUCTION MANUAL[Z].
- [7] HP UV-VIS SPECTROPHOTOMETER PRODUCT CATALOG[Z].
- [8] (美)罗伯特 D 布朗.最新仪器分析技术全书[M].北京:化学工业出版社,1990.
- [9] 陈晃明.全息光学设计[M].北京:科学出版社,1987.
- [10] 郭尧君.分光光度技术及其在生物化学中的应用[M].北京:科学出版社,1987.
- [11] 陈国珍,黄贤智,刘文远,等.紫外-可见分光光度法(上册)[M].北京:原子能出版社,1987.

[责任编辑 马云彤]

Evaluation of the Performances of Ultraviolet Spectrometers

LEI Dong-feng¹, DUAN Shu-e²

(1. Bioengineering Research Institute, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China;

2. Department of Chemistry, XUU, Xi'an 710065, China)

Abstract: Ultraviolet spectrometer (UVS) is an important tool of research in the fields of biology, chemistry and environmental protection; there are no quantitative evaluation standards for the performance of UVS so far. The performances of several world-famous brands of UVSs are evaluated comprehensively according to their accuracy of wavelength, repeatability of wavelength, accuracy of measurement, scanning speed, properties of optical grating, function of software and accessories. The results can be referred to in the purchase and use of UVS.

Key words: UVS; Optical Grating; Performance