

分光光度计的原理与使用

南昌大学生物学实验教学中心 汪艳璐

仪器种类

一、分光光度法

是通过测定被测物质在特定波长处或一定波长范围内光的吸收度，对该物质进行定性和定量分析。常用的波长范围为：(1) 200~400nm的紫外光区 (2) 400~760nm的可见光区, (3) 大于750nm的红外光区。

二、所用仪器为**紫外分光光度计、可见光分光光度计（或比色计）、红外分光光度计或原子吸收分光光度计、荧光光度计等**。在紫外区，一切玻璃元件均采用石英元件，以防止玻璃对紫外线的吸收。

紫外、可见分光光度计

一、原理

1、一定波长的光具有一定的光能量，一定物质只能吸收一定的光能量，表现为对一定波长的光选择性吸收，即各种不同的物质具有其各自的吸收光谱。

2、**Lamber-Beer定律**：一束单色光通过透明溶液介质时，光能被吸收一部分，被吸收的光能量与溶液介质的浓度有一定的比例关系。

$$\lg(I_0/I)=kCL$$

其中， I_0 ：入射光强度

I ：出射光（透射光）强度

k ：消光系数，是常数，对同一物质和同一波长的单色光而言， k 值不变

C ：溶液的浓度

L ：溶液的厚度（cm），即光径。

令 $A=\lg(I_0/I)=kCL$ ， $T=I/I_0$ ，则 $A= kCL$ ， $A=\lg(1/T)=-\lg T$

式中， A ：吸光度

T ：透光度（透过率）

当 k 、 L 一定时，溶液的吸光度（ A ）和浓度成正比。通过测定标准溶液（浓度已知）及待测样品溶液的吸光度，可以求出待测样液的浓度。

紫外、可见分光光度计

二、局限

- 1、只有单色光即单一波长的光辐射吸收，才严格遵循Beer定律。用杂光源照射，吸收度与浓度不成直线关系。
- 2、仅适用于稀释溶液。高浓度溶液里，粒子间相互影响增大，可改变吸光能力，使吸光度与浓度不成直线关系。
- 3、混合物溶液可能相互干扰多种物质共存，其光吸收可能相互干扰，因此，必须尽可能除去引起干扰的物质。
- 4、吸光反应控制在一定的范围。一般A值应控制在0.2-0.8之间，过低或过高测定误差均大大增加，实际测量时，多控制在0.1-0.65之间。

紫外、可见分光光度计

三、仪器构造

(1) 光源：常见的有热辐射光源和气体放电光源两类。前者一般采用钨灯、卤钨灯（350-2500nm，可见光用）和氢灯、氘灯（190-400nm，紫外光用）

(2) 单色器：从光源发射的复合光中分出单色光的光学装置。由入射狭缝、准直元件、色散元件、聚焦元件和出射狭缝组成。常用的色散元件有棱镜和光栅。

(3) 样品室

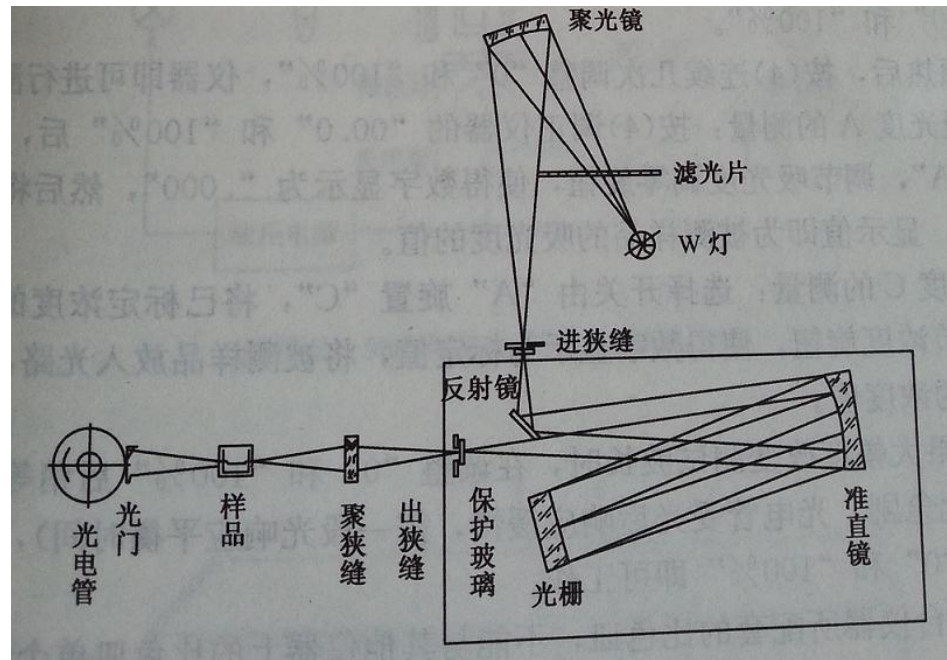
(4) 检测器：是一种光电转换元件，其作用是将透过比色皿的光信号变成可测量的电信号，常用的有光电管和光电倍增管。

(5) 信号检测系统：是放大信号并以适当的方式指示或记录的装置。早期的多采用检流计、微安表作显示装置，直接读出吸光度或透光率。近代的多采用数字电表等显示和用X-Y记录仪直接绘出吸收曲线，并配有计算机数据处理台。

紫外、可见分光光度计

四、光学系统（以722为例）

722型光栅分光光度计能在近紫外、可见光谱区域内对样品物质作定性和定量的分析。采用光栅自准式色散系统和单光束结构光路。



五、使用方法（见教材P287）

仪器维护与保养

一、工作环境

- 1、室温5-35℃，相对湿度80%以下
- 2、置于稳固的工作台上，不应该有强振动源。
- 3、无强电磁干扰源及有害气体
- 4、避开化学腐蚀气体
- 5、避免阳光直射
- 6、电压220V，频率50Hz的单相交流电，使用功率为1000W以上的电子交流稳压器，并保证仪器有良好的接地性。
- 7、电扇不宜直接吹向仪器，以防止光源灯因发光不稳定而影响仪器的正常使用。

仪器维护与保养

二、日常维护和保养

1、光源：在不使用仪器时不开光源灯，尽量减少开关次数，刚关闭的光源灯不能立即重新开启。仪器连续使用不超过3h，长时间使用时中途可间歇30min再使用。光源灯不稳定或亮度明显减弱时应及时更换新灯。

2、单色器：不能随意拆开封闭盒，选择波长时应平衡地轻轻转动。必须定期更换干燥剂。

3、比色皿：液体不能太满，使用前应清洗干净并用擦镜纸吸干。拿取时不能接触光面，不能用硬物接触光面。腐蚀性的溶液不能长时间放在比色皿中，使用后应立即清洗干净。不能再火焰或电炉上进行加热或烘烤。

4、检测器：光电转换元件不能长时间曝光，应避免强光照射或受潮积尘。

仪器维护与保养

- 5、当仪器停止工作时，必须切断电源，盖上防尘罩。
- 6、仪器暂时不用要定期通电，每次不少于20-30min
- 7、每次使用后应去除所有的参比溶液。检查样品室是否积存有溢出溶液，经常擦拭样品室，防止废液对部件或光路系统的腐蚀。
- 8、定期进行性能指标检测。

应用实例

双缩脲法测定蛋白质浓度——标准曲线的绘制

1、取干净试管7支，编号，按下表进行操作。

	0	1	2	3	4	5	6
2mg/ml 卵清蛋 白液/ml	0.0	0.3	0.6	0.9	1.2	1.5	1.8
蒸馏水 /ml	3.0	2.7	2.4	2.1	1.8	1.5	1.2
双缩脲 试剂/ml	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
充分混匀，在540nm比色							
蛋白质 浓度 /(mg/ml)	0.0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2
A_{540nm}							

应用实例

2、以吸光度为纵坐标，各标准蛋白液浓度（mg/ml）为横坐标绘制标准曲线。