

(3) 洗脱液 pH 的影响: pH 为 7.2, 9.3, 11.0 的三种 1 M 氯化铵-碳酸铵缓冲液对洗脱的影响证明 pH 9.3 时洗脱效果较佳。

(4) 洗脱温度和洗脱时间的选择: 20℃、25℃ 及 35℃ 的洗脱量基本相同, 说明温度影响不大, 如图 3 所示, 静态搅拌洗脱 1 小时后即可达到最高值。

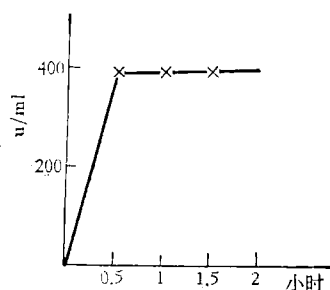


图 3 从 Amberlite CG-50 树脂上洗脱弹性蛋白酶的时间曲线

5. 用 Amberlite CG-50 树脂中制备药用弹性蛋白酶

新鲜胰脏 10 公斤, 绞碎、加入 5 倍量 pH 4.5, 0.1 M 醋酸缓冲液于常温 (20—25℃) 搅拌提取 2 小时, 经滑石粉助滤清, 加入预处理过的 Amberlite CG-50 树脂(待吸液: 树脂 = 30:1), 搅拌吸附 4 小时, 滤出树脂, 用适量 0.1 M, pH 4.5 醋酸缓冲液漂洗树脂 2 次, 除去洗涤液后, 树脂用 1 M, pH 9.3 的氯化铵-碳酸铵缓冲液于常温搅拌洗脱 1 小时, 分离树脂, 用少许洗脱液再洗一次树脂, 合并洗脱液, 以 2 N 醋酸调 pH 近中性, 过滤, 清液冷至 -5℃, 在搅拌下慢慢加入三倍冷工业丙酮, 继续搅拌 10 分钟, 于 -5℃

静置沉淀数小时。虹吸去丙酮, 离心收集沉淀, 以冷丙酮、乙醚洗净, 真空干燥, 即得胰弹性蛋白酶。经配料压片、包肠溶片(每片含弹性蛋白酶 150 单位)即可供临床使用。每 10 公斤胰脏平均可得 48.6 克药用弹性蛋白酶, 活力平均为 25.8 单位/毫克。

三、讨 论

我们的结果证明, 以离子交换树脂法制备弹性蛋白酶, 工艺简单, 生产周期短, 收率和效价都较满意。用 Amberlite CG-50 树脂进行工厂制备, 洗脱液平均收率为提取液的 87%, 比活为 25.6 单位/毫克。成品平均收率为提取液的 55%, 比活力为 26.4 单位/毫克。已采用此工艺路线正式投产, 产品经 206 例临床验证, 本品降低血清胆固醇总有效率达 80% 以上(显效率为 58%), 降低甘油三酯总有效率达 65% 以上(显效率为 57%), 对扩张脑动脉, 改善脑血流图, 缓解心绞痛发作等也有一定疗效。

参 考 文 献

- [1] Hall, D. A. et al.: *Biochem. J.*, **73**, 350 1959.
- [2] 日本公开特许公报 49-66882, 1974.
- [3] Smillie, L. B. et al.: *Biochem. J.*, **101**, 232 1966.
- [4] Nakao, Junko.: *C. A.* **88**, 84994e. 1978.
- [5] Partridge, S. M. et al.: *Biochem. J.*, **61**, 21. 1955.
- [6] Shotton, D. M.: *Methods in Enzymology*. Vol. 19, 113, 1970, Academic Press, New York and London.
- [7] Gertler, A. et al.: *J. Biol. Chem.*, **242**(10), 2522, 1967.

【本文于 1980 年 3 月 24 日收到】

YG-2 型荧光分光光度计的试制

林波海 李治湘 朱粉玉 曹绍梁 刘茹兰

赵 红 石志远 崔承七 贾文英

(中国科学院生物物理研究所)

中国科学院生物物理研究所于 1975 年研制成功我国第一台荧光分光光度计, 并试制了

三台样机, 1978 年底经设计定型会鉴定, 认为接近国外七十年代同类型仪器的水平, 为我国

生产该类仪器填补了空白。本文主要介绍该仪器的光学设计和光谱校正方法。

一、工作原理与主要技术指标

荧光物质吸收了某一波段的光线后,引起能级跃迁,发出波长比激发光波长稍长的荧光。不同物质具有不同的激发光谱和发射光谱,根据光谱的形状和峰位波长与已知物质的标准光谱比较,可判断未知物质是何种化合物。当溶液的浓度很低时,荧光强度与样品浓度成正比,通过测定溶液的荧光强度可以进行样品的定量分析。

荧光分析具有灵敏度高,特异性好,方法简便;分离要求不高等优点。

图1是荧光分光光度计原理图。由150瓦超高压氙灯L发出的光,经聚光镜会聚于入射狭缝 S_1 ,由激发单色器分光后,通过出射狭缝 S_2 和光束分离镜后,分为两束光,一束经聚光镜会聚后照到被测样品上,激发样品产生荧光,再经发射单色器分光,由光电倍增管 P_2 接收,经放大和信号处理后显示于记录仪。另一束光(约占10%)照到量子计数器,产生的荧光由监测光电倍增管 P_1 接收,放大后控制打拿极负反馈高压电源。由高压电源,函数发生器等电子线路完成激发光谱校正及补偿光源的不稳定。

主要技术指标:

1. 光学系统 Czerny-Turner 型

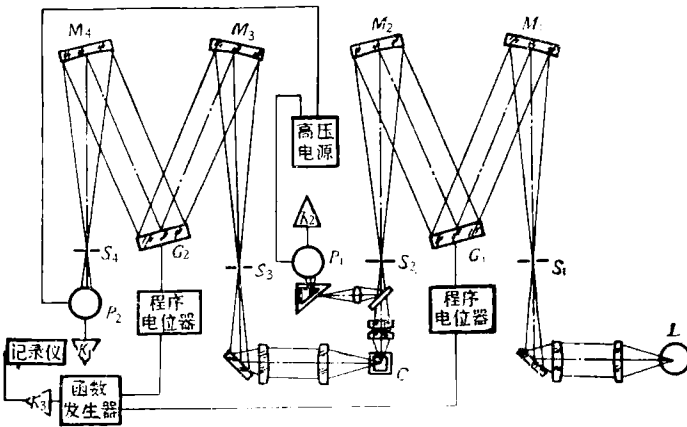


图1 荧光分光光度计原理图

2. 平面衍射光栅 1200线/毫米,闪耀波长300毫微米。

- 3. 波长范围 220—750毫微米及零级。
- 4. 焦距 250毫米,
- 5. 相对孔径 $F \Rightarrow 4$ 。
- 6. 线色散 3.3毫微米/毫米。
- 7. 狭缝光谱宽度 0—20毫微米连续可调。
- 8. 波长精度 ± 0.5 毫微米。
- 9. 波长重复性 ± 0.25 毫微米。
- 10. 分辨率 0.5毫微米。
- 11. 扫描速度 30、60、120、240毫微米/分。
- 12. 激发光谱校正范围 240—600毫微米。
- 13. 发射光谱校正范围 300—600毫微米用标准钨灯校正 350—700毫微米。
- 14. 探测极限 5×10^{-11} 克/毫升硫酸奎宁。
- 15. 稳定性 优于 $\pm 1\%$ 。

二、光学系统的设计

1. 外光路系统

狭缝照明系统:作用是使氙灯发光点在激发单色器入射狭缝上成象及使被测样品受激发后产生的荧光在发射单色器入射狭缝上成象。狭缝照明系统的相对孔径要与单色器的相对孔径匹配。

样品池聚光系统:作用是使由出射狭缝射出的光线会聚到样品池上以提高信噪比。

监控光路: 由光束分离镜和小透镜组成:光束分离镜与入射光束成 45° 角。

为了满足仪器对波长范围(220—750毫微米)的要求,透镜材料均采用石英光学玻璃。

2. 单色器

荧光分光光度计有激发单色器和发射单色器,两者具有相同的结构参数。

根据仪器的指标要求,考虑到象差影响,结构紧凑和仪器成本等因素,我们采用C-T型单色器。准直镜和聚光镜均采用球面反射镜。单色器的设计主要考虑

以下几个问题。

(1) 二次衍射的消除 单色器的结构布局,一方面应使单色器的象差尽量小,另一方面应考虑消除二次衍射光,以减少不必要的杂散

光。

由图 2 可看出: 当光栅在聚光镜 M_2 的曲率中心 O 与聚光镜的边缘的连线之外时,即满足下式时,可避免二次衍射。

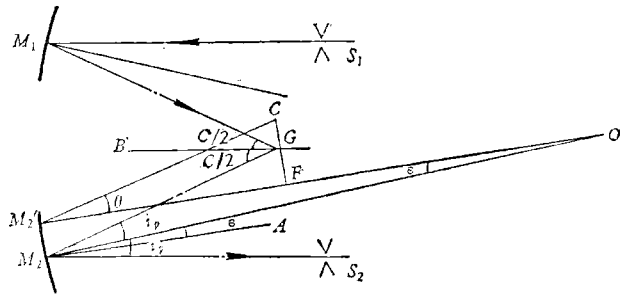


图 2 二次衍射光的消除

$$\theta > \sin^{-1} D/S \dots (D \text{ 为光栅有效宽度, } S = M_2'c) \quad (1)$$

当光栅刻划平面垂直 $M_2'O$ 时, θ 角最大, 即 $\sin \theta = D/M_2'c \approx D/S \quad \therefore BG \parallel M_2S_2$

$$\therefore \frac{c}{2} = i_t + i_p,$$

作 $M_2A \parallel M_2'O \quad \therefore M_2'c \parallel M_2G$

$$\therefore \theta = i_p + \epsilon \quad i_p = \theta - \epsilon$$

$$\text{由(1)式 } \theta = \sin^{-1} D/S = \sin^{-1} \frac{60}{230} \approx 15^\circ$$

$$\epsilon = \frac{M_2M_2'}{R} = \frac{30}{500} = 0.06 \quad \epsilon = 3^\circ 26'$$

$$i_p = \theta - \epsilon = 15^\circ - 3^\circ 26' = 11^\circ 34'$$

$$\frac{c}{2} = i_p + i_p = 2 \times 11^\circ 34' = 23^\circ 8'$$

$$c \approx 46^\circ$$

$$M_1M_2 = 2S \sin \frac{c}{2} = 2 \times 230 \times \sin 23^\circ \approx 180$$

(2) 色散率 衍射光栅的角色散为

$$\frac{d\theta}{d\lambda} = \frac{m}{d \cos \theta}$$

线色散为

$$\frac{dl}{d\lambda} = \frac{d\theta}{d\lambda} \cdot f = \frac{mf'}{d \cos \theta}$$

式中 $d = 1/1200$ 毫米 $f = 250$ 毫米 $m = 1$

$$\frac{dl}{d\lambda} = \frac{mf'}{d \cos \theta} = \frac{1200 \times 250}{\cos \theta}$$

$$= \frac{3}{10 \cos \theta} \text{毫米/毫微米}$$

$$\begin{aligned} \text{每毫米狭缝的谱带宽度为 } & \frac{d\lambda}{dl} \\ &= \frac{10}{3} \cos \theta \text{毫微米/毫米} \end{aligned}$$

由光栅方程式 $d(\sin i \pm \sin \theta) = m\lambda$ 可求出各波长对应的光栅转角和线色散。

图 3 为光栅的转角与波长的关系。设光栅转角为 α ; 入射角为 i ; 衍射角为 θ 。当入射光线和衍射光线都在光栅法线 N 的同侧时, 取“+”号, 当两者分别在 N 两侧时取“-”号。

$$\text{图 3 中 } i = \alpha + \frac{c}{2} \quad \theta = \frac{c}{2} - \alpha$$

$$\sin \left(\alpha + \frac{c}{2} \right) - \sin \left(\frac{c}{2} - \alpha \right) = \frac{m\lambda}{d}$$

$$2 \sin \alpha \cos c/2 = m\lambda/d$$

$$\sin \alpha = m\lambda/2d \cos c/2$$

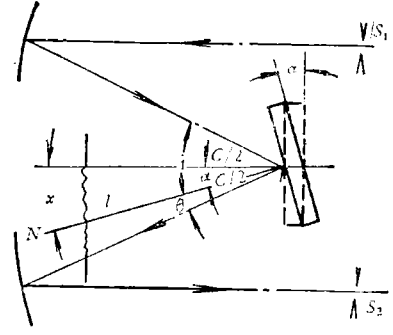


图 3 光栅的转角与波长的关系

把 $\cos c/2$ 代入上式可求出 $\sin \alpha$ 。于是可算出各波长对应的入射角、衍射角、光栅转角和线色散。通过计算可得出: 波长由 220—750

毫微米变化时,最大与最小色散差为 0.121 毫微米。

(3) 闪耀波长的选择 相对效率大于 0.5 的波长范围,一般认为是有用的,有用波长范围可由下式给出:

$$\left(\frac{2}{2m+1}\right)\lambda_m < \lambda < \left(\frac{2}{2m-1}\right)\lambda_m$$

式中 λ_m 为第一级的闪耀波长, m 为光谱级次。

考虑到氙灯在 250 毫微米以下时,能量很弱,为了提高短波段的光能量, λ_m 取 300 毫微米,此时在 200—600 毫微米波长范围内光栅相对效率较高。

为了与激发单色器统一,发射单色器的闪耀波长仍为 300 毫微米。

$$\text{闪耀角 } \alpha = \sin^{-1} \frac{\lambda_m}{2d} = 10^\circ 22'$$

(4) 光通量 由于荧光的强度与激发光的强度成正比,为了提高仪器的灵敏度,要求单色器具有较大的相对孔径,即高光强,所以光通量是荧光分光光度计的重要指标之一。

从单色器出射狭缝射出的单色光光通量为

$$F = B_\lambda T \frac{A}{f'} h \frac{d\theta}{d\lambda} \Delta x^2 \quad (2)$$

式中 B_λ ——光源在某个波长区域的亮度

T ——光学系统透过率

h ——狭缝高度

A ——光栅的刻划面积

$A = DH$ (D 为光栅宽度, H 为高度)

$$\left(\frac{d\theta}{d\lambda}\right)_{\theta \rightarrow 0} = \frac{m}{d} = mN \quad (N \text{ 为每毫米刻线数})$$

$R_0 = ND$ (R_0 为光栅的分辨本领)

根据拉赫不变量 $hH/f' = h \lg u = J$,

公式(2)可改写成:

$$F = B_\lambda T J J_0 R_0 \Delta \lambda^2$$

式中的 $T J J_0 R_0$ 由单色器为光学系统决定。

令 $G = T J J_0 R_0$

则 $G = Thh/f' \quad ND = TNhA/f'$

本仪器采用较大的 A/f' 及 Nh 以获得较大的光通量。

(5) 分辨率 影响单色器分辨率的主要因素有狭缝宽度、谱线弯曲、象差、焦散和衍射等。

单色器的分辨率与狭缝宽度有关,所以狭缝应选择适当的宽度。

由于荧光物质的激发峰和发射峰一般较为平坦,因此仪器对分辨率的要求不很高。本仪器采用直狭缝,用球面反射镜作为准直镜和聚光镜,能满足分辨率要求。

(6) 狭缝 狭缝采用由精密螺杆推动的燕尾板结构,缝片对称开启,缝高为 16 毫米,缝宽为 0—6 毫米,连续可调;其对应的谱带宽度为 0—20 毫微米;入缝和出缝联动;通过伞齿轮传动,把狭缝开启程度显示于狭缝度盘上。

(7) 滤光片 为了清除光谱级次的重迭,备有截止滤光片,由光栅方程式:

$$d(\sin i \pm \sin \theta = m\lambda \quad m = \pm 1, \pm 2, \pm 3 \cdots$$

可以看出,当 $m_1\lambda_1 = m_2\lambda_2 = m_3\lambda_3 \cdots$ 时,各相应波长的衍射角相等,即 $\theta_1 = \theta_2 = \theta_3 = \cdots$,一级光谱的某些谱线和二级、三级……的另一些谱线重迭。例如一级光谱的 600 毫微米谱线和二级光谱的 300 毫微米,三级光谱的 200 毫微米谱线,其衍射角相同,彼此就重迭在一起。

利用只能透过某一波段的截止滤光片,滤去不应有的波段,如在 400—750 毫微米范围内放一块光学玻璃片,即可滤去二级和三级光谱的紫外线。

3. 波长扫描和显示系统

由光栅方程式可推出: $\lambda = 2d \sin \alpha \cos c/2$ 由于 $d, c/2$ 均为常数,则波长的变化与光栅转角的正弦成正比。为此,采用正弦杆机构。

由图 3 $\sin \alpha = x/l$

则 $\lambda = \frac{2d}{l} \cos c/2 \cdot x$ 式中 $d, l, c/2$ 均为常数

$$\therefore \lambda = Kx$$

则波长的变化与精密螺母的移动量 x 成正比。通过一套读数机构,波长用数字形式显示于面板上。

扫描系统由同步电机 TD-96 带动,共有四挡扫描速度,通过电磁离合器变速。

三、光谱校正

1. 激发光谱校正

为了得到某一荧光物质的真实激发光谱,不同波长的激发光应以相同的能量照射荧光物质,但由于氙灯和激发单色器具有光谱特性,事实上做不到这一点。本仪器采用量子计数器进行校正。在一个石英三角池中,盛有高浓度(6克/升)的罗丹明 B (Rhodamine B) 乙二醇溶液,该溶液的特点是在 240—600 毫微米范围内吸收恒定,量子产率不随波长而变化,性能稳定。

从激发单色器来的激发光被光束分离镜分成两路,一路进入量子计数器,激发量子计数器产生荧光,由监测光电倍增管 P_1 接收。另一路激发样品室中的罗丹明 B,它产生的荧光经发射单色器分光后,照在信号光电倍增管 P_2 上。

发射单色器的波长置于 640 毫微米(罗丹明 B 的发射峰),光电倍增管前的红色截止滤光片用以消除 600 毫微米以下的杂散光对测试的干扰。激发单色器在 240—600 毫微米范围内扫描,此时量子计数器测得的是激发光的能量曲线。

打拿极负反馈线路设计:使得激发光强度增大时,量子计数器产生的荧光强度 F_1 增大, P_1 的输出信号 U_1 增大,信号 U_1 经放大后通过负反馈使得高压电源的电压下降。而激发光强度增大时,虽然样品室中罗丹明 B 的荧光强度 F_2 也增大,但这时由于光电倍增管的电压 U_p 下降,从而抵消了 P_2 的输出信号 U_2 的变化,使得 U_2 保持恒定,以达到光谱校正的目的。

但由于光束分离镜的反射光与透射光随波长变化略有不同,实际上还需对光束分离镜的这种光谱特性进行补偿,方法是借助于图1中的程序电位器和函数发生器来完成。

2. 发射光谱校正

方法很多,本仪器采用的是引入法和标准光源法两种。

引入法是将激发光 I_0 引入发射单色器,把激发光作为“标准光源”来对发射单色器和信

号光电倍增管的光谱特性进行校正。在样品架上装置一个量子计数器及红色滤光片。发射单色器波长置于 640 毫微米,激发单色器从 240 毫微米扫描到 600 毫微米,扫出的光谱称为“标准光谱曲线”,然后取走量子计数器和红色滤光片,插入漫散射板,并将发射程序电位器和发射函数发生器接入,从 240 毫微米开始,让两个单色器同步扫描,调节函数发生器中对应于各波长的电位器,使记录仪上测出的光谱曲线与上述的“标准光谱曲线”完全重合。然后取走漫散射板,装入待测样品,所测得的光谱便是真实发射光谱。

标准光源校正法,即利用“能量—波长”曲线已知的标准钨灯作光源,将其放在样品室,调节函数发生器中的电位器,使记录仪记录的曲线与标准钨灯的“能量—波长”曲线复合。

以上两法结合使用,可使校正范围为 240—750 毫微米;常用的是 300—700 毫微米。

四、仪器的调试

1. 波长精度和分辨率

调试时需利用高压汞灯的谱线来检验仪器的波长精度,平常则可利用氙灯的 450.1 毫微米亮线或标准物质的荧光峰进行波长的校准。调试时利用测定汞线半宽度或测定汞三线

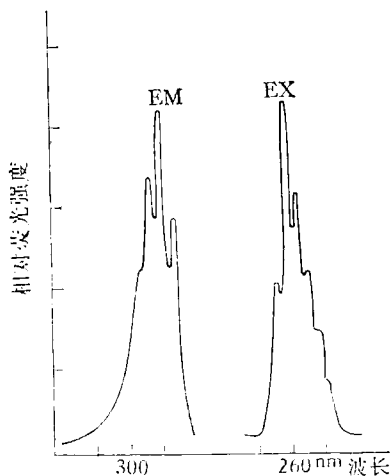


图 4 苯的激发光谱和发射光谱

苯 $1 \mu\text{g/ml}$ (溶液环己烷)

左: $\lambda_{\text{ex}} 250\text{nm}$; $S_{\text{ex}} 11\text{nm}$ $S_{\text{em}} 2\text{nm}$

右: $\lambda_{\text{em}} 270\text{nm}$; $S_{\text{ex}} 2\text{nm}$; $S_{\text{em}} 12\text{nm}$

(365.02, 365.48, 366.29 毫微米)的分辨深度来检验仪器的分辨率。平常则可选择峰形较窄的荧光物质来考核仪器的分辨率。图 4 为苯的激发光谱和发射光谱。图 5 为汞三线的分辨深度。

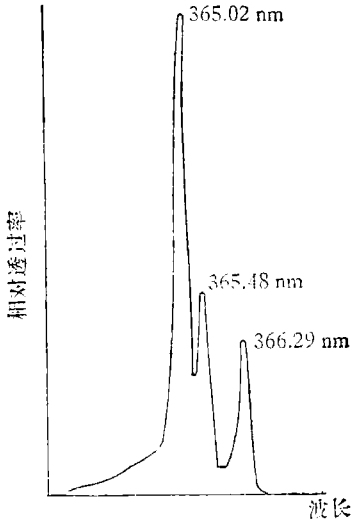


图 5 汞三线的分辨深度

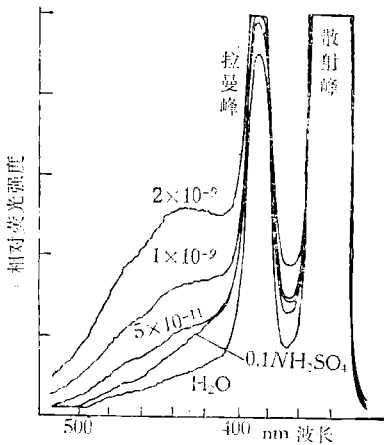


图 6 仪器的灵敏度与探测极限
(硫酸奎宁 0.1N H₂SO₄)

2. 灵敏度和探测极限

国际上通常采用 0.1N H₂SO₄ 中的硫酸奎宁溶液作为标准来检查仪器的灵敏度和探测极限。一般认为能出现荧光峰的最低浓度为仪器的灵敏度；信噪比大于 2 的样品最低浓度为仪器的探测极限。如图 6 所示，本仪器的灵敏度为 2×10^{-9} 克/毫升，探测极限为 5×10^{-11} 克/

毫升。

3. 线性性

不同浓度的溶液的荧光强度随波长变化的情况，可反映仪器各量程为线性性。图 7 是改变硫酸奎宁的浓度测出的仪器的线性性，其相对于满刻度的误差不大于 $\pm 2\%$ 。

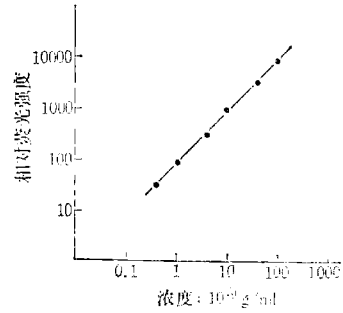


图 7 仪器的线性性

4. 校正光谱

使用两种标准，一种是标准荧光化合物，如硫酸奎宁、核黄素等，一种是固体荧光标准。图 8 为 1 微克/毫升硫酸奎宁溶液的校正光谱，校正后的激发光谱，峰位向短波方向位移约 5 毫微米，校正后的发射光谱峰位向长波方向位移约 10 毫微米，与文献值相近。固体荧光标准的测试结果与 RF-502 型荧光分光光度计给出的标准图谱一致。

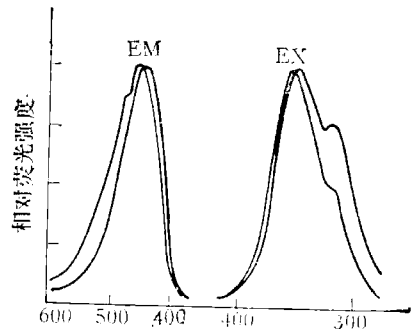


图 8 硫酸奎宁 (1 μ g/ml) 的校正光谱

左：——校正值 未校正值
 $\lambda_{ex} 350nm$ $S_{ex} 10nm$ $S_{em} 10nm$
右：——校正值 未校正值
 $\lambda_{em} 454nm$ $S_{ex} 5nm$ $S_{em} 8nm$

本仪器经过一年多的使用，反复测试其各

项性能指标, 并与国外同类型仪器, 如日本的 MPF-4 型荧光分光光度计进行了对比, 结果表

明, 主要性能指标相近。
[本文于 1979 年 10 月 20 日收到]

毛细管式血液粘度计的自动电子计时装置

梁子钧 水祥炳

(上海第一医学院生物物理教研组) (上海供电局表计工场)

在临床上, 血液粘度是一项重要理化指标。它对中风、心肌梗塞等病因研究、诊断有重要的意义。

目前粘度的测定多采用毛细管式粘度计。流出时间的测量多是依靠肉眼观察和手按停表, 费时费力, 误差又大。我们采用集成电路的数字式电子自动计时线路, 试制了毛细管式粘度计的自动电子计时装置, 测量误差减小一半, 使用效果很好。

自动电子计时是利用血液、血浆或血清等具有导电性, 通过悬挂在粘度计毛细管中的三根电极, 测试样品充满毛细管和从其中流出时所引起的电极间阻值的变化来启动计时装置, 完成自动测量。(见图 1)

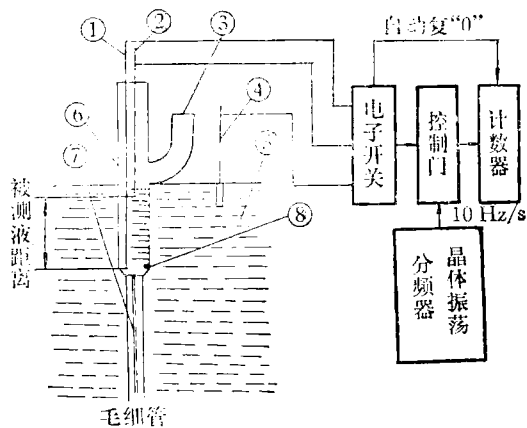


图 1 总框图

- ①关门电极 ②开门电极 ③液体注入管 ④开门电极 ⑤保温密液 ⑥插放电极套管 ⑦玻璃毛细管 ⑧白金丝

自动电子计时装置全部由集成电路器件组成, 组成部分如下:

1. 电子开关 它是由两级射极跟随器 (T_1 、 T_2) 和 RS 触发器组成 (见图 2)。由于射极跟随器输入阻抗很高 ($10 M\Omega$), 保证流经血液的电流小于 2 微安, 这样就避免了电流对血液的不良影响。在电子开关与控制门之间, 用 RS 触发器作隔离极, 可以有效地克服液体在脱离电极的一瞬间所产生的干扰进入计数器。

图 3 是控制门线路, 当测试准备完毕时, 控制门是

处在 0 1 1 关闭状态。当第一组 RS 触发器翻转时, 此时 A 由“0”变“1”, 门控打开。当第二组 RS 触发器翻转后, B 由“1”变“0”, 关闭门控。

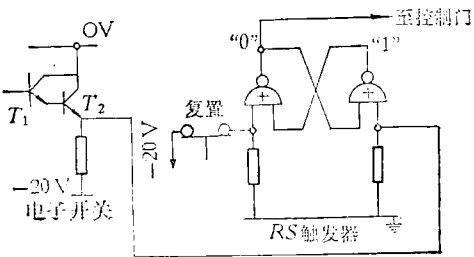


图 2 隔离极

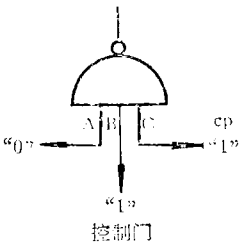


图 3 控制门线路

2. 脉冲发生器 产生标准脉冲, 通过分频取得各种时间标频, 精度很高, 一般可达 10^{-5} 。

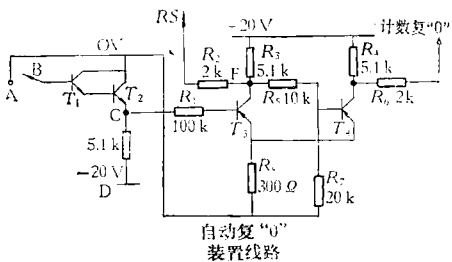


图 4 自动复“0”装置线路

3. 自动复“0”装置 本仪器的一个辅助装置。在电子开关电路中, 将开关讯号“0”或“1”通过耦合去推动 T_1 、 T_2 组成的电路, 由它去控制计数器置“0”端和