

# 膜上样品光声光度特点及其应用研究

刘国卿 陈少英 何金兰\*

(湛江师范学院化学系 广东湛江 524048)

**摘 要** 本文用半导体激光器作为膜上样品反射光声光度分析的光源,详细研究了聚焦与非聚焦光学构型分析特征;推导了吸收系数  $b$  与入射光功率  $I_0$  之间的数学模式;分析了激光反射光声光度法的干扰抑制特征;在优化的装置下,方法用于血清尿素和血清葡萄糖的测定,测定结果与医院提供的数据完全一致,但样品和试剂的用量却减少了 1000 倍。

**关键词** 膜上样品 光声光度测定 血清尿素 血清葡萄糖

## Reflection Photoacoustic Determination of the Trace Samples on Membranes and Its Application

LIU Guoqing, CHEN Shaoying, HE Jinlan

(Department of Chemistry, Zhanjiang Normal College, Zhanjiang 524048)

**Abstract** In order to determine the trace samples on a non-transparent membranes, we proposed a laser reflection photoacoustic determination set-up in which a semiconductor laser was used as the light source. According to the facula size, the optical arrangement was investigated; the function relation between the absorption coefficient and laser power was deduced; the restraint effects on the interference in the reflection photoacoustic determination was analyzed in detail. Under our optimized condition, the urea and the glucose in human serum was quantified, a good agreement between the reflection photoacoustic and the spectrophotometric determinations was obtained.

**Key words** Samples on membranes, Reflection photoacoustic determination, Serum urea, Serum glucose

用于光吸收物质定量分析的朗伯-比尔定律已经提出 100 多年了,但因其建立在透射光监测的基础上,所以对非透明光吸收物质的光度分析,无能为力了;而且,膜上样品因其吸收光程趋于零,其吸收检测灵敏度也趋于零,传统的光度分析无法用于非透明膜上光吸收物质的定量分析。

近年来,激光反射光声光度技术成功地解决了非透明膜上样品的光度分析问题<sup>[1,2]</sup>。入射激光因被膜上光吸收物质的吸收而使反射光强下降,导致反射光声池中反射光声信号  $S_i$  下降;若样品膜空载时信号为  $S_0$ ,则相对反射光声信号  $(S_0 - S_i)/S_0$  或  $\Delta S/S_0$  与膜上光吸收物质存在着如下定量关系:

$$\log \Delta S/S_0 = b \log C + a \quad (1)$$

式中,  $b$  为样品吸收系数;  $C$  为膜上样品浓度,  $a$  为与实验条件有关的系数。

文献<sup>[1,2]</sup>已详细研究了调制频率、激光入射角度及载样膜的位置等对反射光声信号的影响。

本文在上述工作基础上, 改用半导体激光光源, 讨论了不同光斑的光学构型特征; 推导了吸收系数  $b$  与入射光功率  $I_0$  之间的数学模式; 分析了激光反射光声光度法的干扰抑制特征。在优化的装置下, 将方法用于实际医学样品分析, 发现, 反射光声光度分析结果与传统的光度分析结果完全一致, 但样品和试剂的用量却减少了 1000 倍。

## 1 实验

### 1.1 实验装置

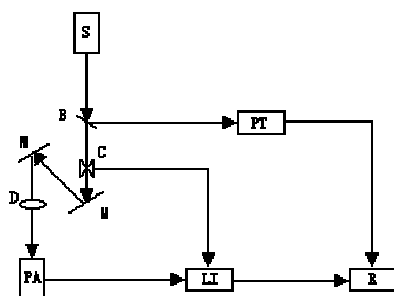


图1 反射光声测定装置图

S: 半导体激光器, B: 分束镜, C: 斩波器, M: 反射镜, D: 聚焦透镜,  
PT: 光三极管, PA: 光声池, LI: 锁定放大器, R: 记录仪

实验装置与文献<sup>[1,2]</sup>基本相同。不同之处在于, 当激光光斑比较大时, 必须在光声池前加一聚焦透镜, 如图1所示。半导体激光器S(当波长 $\lambda=532\text{nm}$ 时, 激光器最大功率为 $3\text{mW}$ ; 当 $\lambda=670\text{nm}$ 时, 激光器最大功率为 $5\text{mW}$ ; 均为 $\text{TEM}_{00}$ 模, 由广东测试所提供)发出的光束经分束镜B分成两束, 一束光(约30%)用光三极管PT探测, 监测光源变化; 另一束经机械斩波器C(ND-4型, 南京大学微弱信号检测中心生产)调制后, 经过透镜D(焦距 $f=4\text{cm}$ )聚焦, 入射到自制的光声池PA中的载样膜上(光声池PA结构参见文献<sup>[1,2]</sup>)。光声池输出信号经锁定放大器LI(ND-204型, 南京大学微弱信号检测中心)放大后, 由记录仪R(3057型, 四川仪表厂)记录。

### 1.2 试剂

磷酸(广州化学试剂厂), 硫酸(广州市东江化工厂), 二乙酰一肟(上海试剂三厂), 尿素(广东汕头市红卫化工厂), 刚果红(广州化学试剂厂), 罗丹明B(上海试剂三厂), 乙醇(汕头市光华化学厂), 品红(上海化学试剂厂, 进口分装), 血清葡萄糖测定标准试剂I, II(宁波市慈城生化试剂厂)均为国产分析纯。实验用水为石英亚沸蒸馏水。

### 1.3 操作

1.3.1 测定操作 用微量进样器取 $2\mu\text{L}$ 待测试液沉积到载样膜上, 干后, 用专用的进样装置将载样膜置于反射光声池内一固定位置, 测定其反射光声信号。

1.3.2 尿素标准液及血清尿素的显色 取 $17.5\text{mL}$ 磷酸加入约 $300\text{mL}$ 水中, 摇匀后加入硫酸 $40\text{mL}$ , 冷后, 定容至 $500\text{mL}$ 。取出 $4\text{mL}$ 混合酸, 加入 $6\text{mg/L}$ 的二乙酰一肟 $0.5\text{mL}$ 和 $3.2\times 10^{-3}\text{mmol/L}$ 的尿素标准液 $20\mu\text{L}$ 或 $20\mu\text{L}$ 的血清样品, 混匀, 在沸水中加热 $10\text{min}$ 后冷却 $5\text{min}$ , 待测。

1.3.3 葡萄糖标准液及血清葡萄糖的显色 将血清葡萄糖测定标准试剂I和试剂II以9:1的比例

混匀后取出 2mL 加入 20 $\mu$ L  $1.1 \times 10^{-3}$  mmol/L 葡萄糖标准液或 20 $\mu$ L 血清样品, 混匀, 置于 37 $^{\circ}$ C 水浴中加热 10min 后取出, 待测。

## 2 结果与讨论

### 2.1 聚焦与非聚焦光学构型分析特征

激光光源不同, 光斑大小不同。对于光斑面积相对大的半导体激光光源(如 670nm 的半导体激光器), 在激光入射到光声池之前, 必须加一聚焦透镜, 将激光束聚焦成光斑面积小于光声池的内径。光束聚焦后, 光密度增大, 导致相对反射光声信号增大, 检测灵敏度提高。但相对反射光声信号随光声池与焦点位置的变化十分敏感, 实验结果如图 2 所示(负值表示焦距以内)。从图 2 可知, 光声池最佳位置恰好落在透镜焦点附近, 此时, 相对反射光声信号最大, 灵敏度最高。

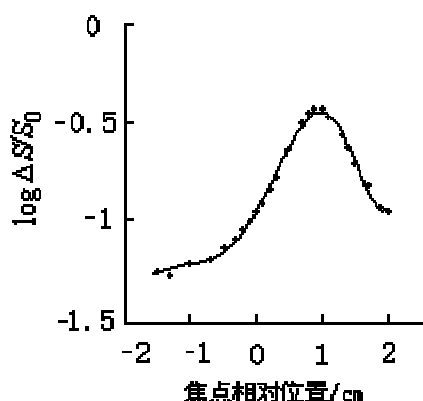


图 2 载样膜与聚焦透镜焦点的相对位置对光声信号的影响

+: 实验数据 - : 模拟曲线

当光斑明显小于光声池内径时, 可采用非聚焦光学构型, 即去掉光声池前的聚焦透镜。此时相对反射光声信号对非聚焦光束的位置变化比较稳定, 虽然测定灵敏度有所下降, 但测定的重复性好, 对于半导体激光器(532nm)可选择非聚焦构型。

实际上, 无论光斑大小如何, 聚焦构型均能提高测定灵敏度, 但是光路调节困难, 重复性差。所以, 当光斑小于光声池内径时, 而且灵敏度足够时, 采用非聚焦构型更好。

### 2.2 吸收系数与入射功率的关系

实验表明, 在一定范围入射功率下, 相对反射光声信号随着激光功率的增加而下降<sup>[1]</sup>。为找出物质吸收系数  $b$  与入射光功率  $I_0$  的数学关系, 我们用半导体激光器(532nm)作为光源, 对罗丹明 B, 刚果红及品红绘制不同功率下的工作曲线。从而求出吸收系数  $b$  与功率  $I_0$  之间的关系, 如图 3 所示。图 3 表明: 吸收系数  $b$  不仅与物质的最大吸收波

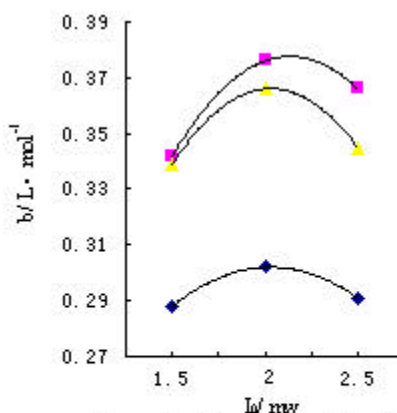


图 3 吸收系数  $b$  与入射功率  $I_0$  关系

- ◆ 刚果红 ( $b = -0.024I_0^2 + 0.099I_0 + 0.264$ )
- 品红 ( $b = -0.022I_0^2 + 0.100I_0 + 0.264$ )
- ▲ 罗丹明 B ( $b = -0.0125I_0^2 + 0.052I_0 + 0.249$ )

收系数  $b$  与功率  $I_0$  之间的关系, 如图 3 所示。图 3 表明: 吸收系数  $b$  不仅与物质的最大吸收波

长有关,还与入射功率  $I_0$  呈二次函数关系。低功率时,  $b$  随  $I_0$  增加而增加,当功率达到一定值后,  $b$  反而随  $I_0$  的增加而下降,这就是文献<sup>[1]</sup>中入射功率增加导致相对反射光声信号下降的原因。

吸收系数  $b$  与入射光功率  $I_0$  的非线性关系来自两个方面:吸收物质的饱和效应和样品膜对入射光的散射效应。当入射功率  $I_0$  很小时,散射光强度很弱,散射光声信号很小,其干扰作用可于忽略。所以低功率时,吸收系数  $b$  与功率  $I_0$  存在线性关系:  $I_0$  增加,物质光热吸收增加,反射光强度下降,反射光声信号  $S_i$  下降,相对反射光声信号( $\Delta S/S_0$ )增加。但  $I_0$  增加到一定程度后,样品光热吸收达到饱和,此时  $I_0$  增加,反射光和散射光强度将同时增加,使反射光声信号  $S_i$  迅速增加,使相对反射光声信号( $\Delta S/S_0$ )反而下降,所以,表现在图 3 中吸收系数  $b$  随  $I_0$  增加而变小的现象。

饱和效应和散射效应,使膜上样品反射光声光度分析时不必采用大功率激光器,一般,激光功率在 2mW 以左右较好。

### 2.3 相对反射光声信号干扰抑制特点

一般,光声信号的产生是物质光吸收后的无辐射弛豫加热作用引起的热膨胀。所以,光声信号不仅与物质的光吸收有关,还与物质的热学性质有关。受物质的吸收辐射厚度和热扩散长度的制约,不仅光声定量的对象有限,而且物质的光声信号与吸收系数的线性关系很容易受到破坏,使光声定量分析的线性范围有限<sup>[3,4]</sup>。其次,散射干扰是固体光声定量分析的最大干扰之一<sup>[5~7]</sup>。

但是,反射光声池产生的光声信号直接来自于反射光与光声池壁和光声池中压电传感器之间的作用,而反射光强度的变化是来自膜上样品对入射辐射的吸收<sup>[1, 2]</sup>。这里的反射光声信号并不是直接来自样品的光吸收后的热膨胀,光吸收过程和热传递过程不是源于同一物体,物质的吸收辐射厚度和热扩散长度的制约对反射光声信号没有影响。这就是反射光声信号定量线性范围较宽的原因之一。另外,膜上样品光度分析采集的是相对反射光声信号  $\Delta S/S_0$ ,这种相对测量方式,散射干扰在  $S_0$  与  $\Delta S$  的比值中得到了最大的抑制,这又是本方法定量线性范围可达 2 个数量级的另一主要原因。

可见,相对反射光声信号是将光吸收过程与热传递过程分开并用的一种巧妙的结合,联合相对测量方式,将传统光声测量干扰抑制到最小。

### 2.4 定量分析特征

按 1.3.1 的测定操作,对品红、刚果红、罗丹明 B 及尿素和葡萄糖不同浓度的标准液进行测定,按公式(1)绘制工作曲线,工作曲线的特征参数列于表 1。

表 1 工作曲线的特征参数

| 编号 | 样品    | 回归方程               | 校正因子  | 线性范围/mol·L <sup>-1</sup>                  | 检出限<br>pmol ( $k=3$ ) | RSD/%<br>( $n=11$ ) |
|----|-------|--------------------|-------|---|-----------------------|---------------------|
| 1  | 品红    | $Y=0.31\lg c-0.09$ | 0.993 | $1.0\times 10^{-4}\sim 1.0\times 10^{-6}$ | 0.22                  | 4.67                |
| 2  | 罗丹明 B | $Y=0.38\lg c+0.10$ | 0.993 | $2.5\times 10^{-4}\sim 2.5\times 10^{-6}$ | 0.50                  | 6.99                |
| 3  | 刚果红   | $Y=0.31\lg c-0.23$ | 0.994 | $5.0\times 10^{-4}\sim 5.0\times 10^{-6}$ | 2.17                  | 2.60                |
| 4  | 尿素    | $Y=0.38\lg c+0.32$ | 0.990 | $3.2\times 10^{-4}\sim 3.2\times 10^{-6}$ | 1.85                  | 1.00                |
| 5  | 葡萄糖   | $Y=0.29\lg c-0.38$ | 0.995 | $1.1\times 10^{-4}\sim 1.1\times 10^{-6}$ | 0.48                  | 6.12                |

## 2.5 医学实样分析

2.5.1 血清尿素的测定 医院提供 30 个血清样品, 按 1.3.1 的测定操作, 测定其反射光射光声信号, 依据工作曲线 4 求出血清尿素的含量, 分析结果与医院测定结果经统计分析求得值 0.44, 小于临界值( $I_{0.05, 58}=2.000$ ), 即两种分析结果完全一致。为更具体直观, 部分对照结果列于表 2。

表 2 血清尿素分析结果对照

| 样本号 | 本方法  | 分析结果/ mmol·L <sup>-1</sup> |        |
|-----|------|----------------------------|--------|
|     |      | 方法 1*                      | 方法 2** |
| 1   | 1.85 | 1.8                        | 1.96   |
| 2   | 6.72 | 6.7                        | 6.85   |
| 3   | 7.49 | 7.9                        | 7.40   |
| 4   | 3.79 | 3.8                        | 4.07   |
| 5   | 11.6 | 11.6                       | 10.28  |
| 6   | 23.0 | 23.6                       | 19.28  |

\*尿酸波氏比色法(自动生化仪, HITACHI 7150 Automatic Analyzer).数据由湛江市人民医院提供。

\*\* 二乙酰-脲显色法(手工操作)。数据由湛江市人民医院提供。

2.5.2 血清葡萄糖的测定 医院提供 8 个血清样品进行检测, 按 1.3.1 操作, 根据工作曲线 5 求出血清葡萄糖的含量, 测定对照结果见表 3。

表 3 血清葡萄糖分析结果对照 (单位:mmol/L)

| 编号 | 本方法  | 对照值* |
|----|------|------|
| 1  | 5.49 | 5.71 |
| 2  | 6.53 | 6.52 |
| 3  | 7.05 | 6.85 |
| 4  | 4.52 | 4.43 |
| 5  | 4.66 | 4.81 |
| 6  | 4.59 | 4.68 |
| 7  | 5.37 | 5.19 |
| 8  | 7.24 | 7.16 |

\*数据由湛江市儿童妇女保健医院提供。

医院提供的血清尿素和血清葡萄糖的分析数据均是采用传统的光度分析方法。上面的分析对照表明: 反射光声光度分析结果与传统的光度分析结果完全一致。可见, 膜上样品反射光声光度分析技术不仅成功的解决了非透明膜上光吸收物质的定量分析, 而且实现了光程趋于零时的高灵敏度检测。该方法用量少(约 1-2 $\mu$ L), 灵敏度高(绝对检出限在 pmol 水平), 线性范围宽(2 个数量级), 应用对象广泛; 将在生命科学, 环境科学, 法学等领域有广阔的应用前景。

## 参考文献

- [1] He J, Yu B, Analyst, 1998, 123, 2197~2200.
- [2] 沈 戮, 黄锦敏, 李小戈 等. 分析测试学报, 1998, 17(2): 17~19.
- [3] Rosencwaig A, Gersho A. J. Appl. Phys., 1976, 47, 64~69.
- [4] Rosencwaig A, Themes B L. Appl. Phys. Lett., 1980, 36(8), 667~669.
- [5] Davidson R S, King D. Anal. Chem., 1984, 56(8), 1409~1411.
- [6] Freeman J J, Friedman R M, Reichard H S. J. Phys. Chem., 1980, 84(3), 315~319.
- [7] Hsueh Y M, Harata A, Kitamori T et al. Anal. Sci., 1990(6): 67~70.