

中华人民共和国教育行业标准

JY/T 0572—2020
代替 JY/T 026—1996

圆二色光谱分析方法通则

General rules for analytical methods for circular dichroism spectroscopy



2020-09-29 发布

2020-12-01 实施

中华人民共和国教育部 发布



目 次

前言	Ⅲ
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 分析方法原理	2
5 分析环境要求	2
6 试剂和材料	2
7 仪器	3
8 样品	3
9 分析测试	4
10 结果报告	6
11 安全注意事项	6
附录 A (资料性附录) 圆二色光谱原理	7
附录 B (资料性附录) 比色皿的选择与清洗	8
附录 C (资料性附录) 旋光光谱原理	9
参考文献	10



前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准代替 JY/T 026—1996《圆二色谱方法通则》，与 JY/T 026—1996 相比，除编辑性修改外主要技术变化如下：

- 标准名称由《圆二色谱方法通则》改为《圆二色光谱分析方法通则》(见标题)；
- 修改了适用范围(见第 1 章)；
- 删除了引用标准(1996 年版第 2 章)，增加了规范性引用文件(见第 2 章)；
- 删除了方法原理中关于波长的定义(1996 年版 3.1)，修改线偏振光为平面偏振光(见 3.1)、增加椭圆偏振光定义(见 3.3)，手性定义(见 3.5)，摩尔吸收系数定义(见 3.6)，修改圆二色为圆二色性(见 3.7)，将圆二色相关公式及圆二色光谱定义放入附录 A 中(见附录 A)；
- 方法原理修改为分析方法原理，并修改了方法原理内容(见第 4 章)；
- 增加了分析环境要求(见第 5 章)；
- 增加了试剂和材料的内容(见 6.1 和 6.2)；
- 修改了仪器组成(见 7.2)，删除了仪器性能(1996 年版 6.2)；
- 增加了粉末样品内容(见 8.2.2)；
- 分析步骤修改为分析测试，并删除了分析步骤中高灵敏度测量内容(1996 年版 8.5)和数据的整理部分内容(1996 年版 8.7)；
- 修改并完善了分析步骤中关于仪器检查(见 9.1.1)，开机预热(见 9.1.2)，测试方法选择内容(见 9.1.3)以及测试条件的选择(见 9.2)；
- 补充了空白样品选择原则(见 9.3.1)，补充了样品具体测试步骤(见 9.3.2~9.3.5)；
- 将测定结果的分析(1996 年版第 9 章)更名为结果报告(见第 10 章)，补充了基本信息(见 10.1)，修改了测试结果的分析(见 10.2 和 10.3)；
- 补充了安全注意事项(见第 11 章)。

本标准由中华人民共和国教育部提出。

本标准由全国教育装备标准化技术委员会化学分技术委员会(SAC/TC 125/SC 5)归口。

本标准起草单位：上海交通大学、南京师范大学、江南大学、扬州大学。

本标准主要起草人：王瑞斌、张林群、张银志、胡茂志。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

- JY/T 026—1996。



圆二色光谱分析方法通则

1 范围

本标准规定了圆二色光谱分析方法的术语和定义、分析方法原理、分析环境要求、试剂和材料、仪器、样品、分析测试、结果报告和安全注意事项。

本标准适用于对紫外、可见波段有吸收的手性分子的圆二色光谱分析。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 9721—2006 化学试剂 分子吸收分光光度法通则(紫外和可见光部分)

3 术语和定义

GB/T 9721—2006 界定的以及下列术语和定义适用于本文件。为了便于使用,以下重复列出了GB/T 9721—2006 中的某些术语和定义。

3.1

平面偏振光 plane polarized light

所有垂直于光传播方向的电矢量均被约束在一个平面上振动的光,即在光的传播方向上,光矢量只沿一个固定的方向振动,这种光称为平面偏振光,由于光矢量端点的轨迹为一直线,又叫做线偏振光(linearly polarized light)。

3.2

圆偏振光 circularly polarized light

垂直于光传播方向的固定平面内,光矢量的大小不变,但随时间以角速度 ω 旋转,电矢量末端在垂直于光传播方向的平面上呈圆形,这种光叫做圆偏振光。在垂直于光传播方向的平面内,若圆偏振光的光矢量随时间变化是顺时针旋转的,则这种圆偏振光叫做右旋圆偏振光;逆时针旋转的,叫做左旋圆偏振光。

3.3

椭圆偏振光 elliptically polarized light

在垂直于光传播方向的固定平面内,光矢量的方向和大小都在随时间改变,光矢量的端点描出一个椭圆,这样的偏振光叫做椭圆偏振光。

3.4

光的折射与吸收 refraction and absorption of light

一束光通过物质后,其电场矢量传播速度的减小称为折射,用折射率 n 表示;其电场矢量振幅的减小称为吸收,可用摩尔吸收系数 ϵ 表示。

3.5

手性 chirality

物体不能与其镜像相重叠,这种性质称为手性。手性分子是指不能与其镜像相重叠的分子(chiral

molecule)。

3.6

摩尔吸收系数 molar absorptivity

ϵ

厚度以厘米(cm)表示,浓度以摩尔每升($\text{mol} \times \text{L}^{-1}$)表示的吸收系数 ϵ ,单位为 $\text{L} \times \text{cm}^{-1} \times \text{mol}^{-1}$ 。

[GB 9721—2006,定义 3.15]

3.7

圆二色性 circular dichroism; CD

如果一个物质对左旋圆偏振光和右旋圆偏振光的吸收不同,使左、右圆偏振光通过该物质后不再是平面偏振光,而是椭圆偏振光,那么称该物质具有圆二色性。

4 分析方法原理

圆二色性使通过物质的平面偏振光变为椭圆偏振光,所形成的椭圆偏振光的椭圆度为 θ ,考虑到比色皿的厚度和物质的浓度,物质对左旋圆偏振光和右旋圆偏振光的摩尔吸收系数是不同的,即 $\epsilon_L \neq \epsilon_R$,其吸收的差值 $\Delta\epsilon = \epsilon_L - \epsilon_R$ 。不同波长下的 θ 或 $\Delta\epsilon$ 值(纵坐标)与波长 λ (横坐标)之间的关系曲线,即圆二色光谱曲线,参见附录 A。

手性分子和很多生物大分子具有圆二色性,对左、右旋圆偏振光的吸收不同,圆二色光谱方法是研究手性分子、生物大分子立体构型的一个重要方法,广泛应用于有机化学、生物化学、配位化学和药物化学等领域。

5 分析环境要求

仪器在使用时,环境(温度、湿度等)和电源的要求应满足仪器说明书的规定,仪器应安放在无腐蚀性气体、无震动、无电磁干扰、干燥和洁净的环境中。温度一般控制在 $20 \pm 5^\circ\text{C}$,湿度 $\leq 75\%$ 。

6 试剂和材料

6.1 试剂

6.1.1 水

实验用水应符合 GB/T 6682 中二级水规格。

6.1.2 有机溶剂

实验用有机溶剂需要分析纯或优于分析纯,需保证在测试波段无干扰吸收;不与待测物发生化学反应,可将待测物配制成透明溶液。

6.1.3 缓冲溶液

缓冲溶液配制用到的化学试剂均为分析纯或优于分析纯,需保证在测试波段,所用试剂无干扰吸收,按缓冲溶液标准规定进行配制。

6.2 材料

6.2.1 比色皿

选用干净、无裂纹、划痕和斑点,透光率高的石英比色皿(参见附录 B)。

6.2.2 石英片

选用干净、无裂纹、划痕和斑点,透光率高的石英片。

6.2.3 氮气

按仪器要求选用纯度 $\leq 99.99\%$ 的氮气进行吹扫。

7 仪器

7.1 仪器类型

主要有光栅型圆二色光谱仪和棱镜型圆二色光谱仪。

7.2 仪器组成

由光源系统、偏振系统、样品室、检测系统以及仪器操控和数据处理系统构成。

7.2.1 光源系统

紫外、可见波段使用的光源为氙灯。

7.2.2 偏振系统

由分光系统(单色器、起偏器)将光变成单色的平面偏振光,然后经过调制解调器将单色的平面偏振光交替地变化为左、右旋圆偏振光。

7.2.3 样品室

样品支架的装配不能干扰仪器的光路。根据需要可在样品室内附加不同的样品支架系统(如积分球样品支架、固体压片样品支架及薄膜样品支架等)、自动滴定、程序变温等装置,外加磁场系统、旋光光谱系统(参见附录 C)等。

7.2.4 检测系统

由光电倍增管检测器或者雪崩二极管检测器收集经过样品吸收的左、右圆偏振光强度,将光信号转换成电信号后,经过调制放大器进一步放大处理后得到圆二色信号。

7.2.5 仪器操控和数据处理系统

控制与数据处理系统由计算机和相应软件组成,通过控制系统实现对圆二色光谱的操作、各种参数调节和控制及数据的测量和处理等。

7.3 检定或校准

仪器的各项性能和指标应按检定规程或校准规范定期进行检定或校准,并符合相应检测要求。必要时在测试前对波长准确度、基线平直度、圆二色准确度以及数据重现性等指标进行校正,校正应按照仪器检定规程或校准规范和仪器说明书进行。

8 样品

8.1 液体样品

液体样品应该均匀、透明、没有气泡,如有悬浮或沉淀,则需过滤或离心予以去除;在测试的波长范围

内,吸光度值宜在 0.5~2.0 范围内,最大不应超出 3.0。

8.2 固体样品

8.2.1 单晶以及薄膜样品

单晶(需要足够大)和薄膜样品可以选用合适样品支架直接测试;在测试的波长范围内,吸光度值在 0.5~3.0 范围内的单晶以及薄膜样品可以使用透射法测试;吸光值过高的样品,可以使用积分球反射法进行测试。

8.2.2 粉末样品

粉末样品可以采用溴化钾(或氯化钾)压片或者石蜡油分散后使用透射法测试,在测试的波长范围内,吸光度值宜在 0.5~2.0 范围内,最大不应超出 3.0;也可以采用纯固体粉末或者加入适量的硫酸钡粉末后使用积分球反射法进行测试。

9 分析测试

9.1 检测前准备工作

9.1.1 仪器检查

启动仪器前检查室内环境(温度和湿度)和仪器是否处于正常状态,并做好检测器更换、气瓶压力检查和开启循环水等准备工作。

9.1.2 开机预热

按仪器说明书中氮气流量要求,进行氮气吹扫 10~15 min 后开机,预热 15~30 min 后进行测试。

9.1.3 测试方法的选择

根据样品特性与不同的测试要求,可选用下述的测试方法或附件进行测试:

- a) 适合液体样品的测试方法;
- b) 适合固体样品的测试方法;
- c) 积分球附件;
- d) 旋光光谱附件;
- e) 磁圆二色光谱附件;
- f) 程序变温附件。

9.2 测试条件的选择

9.2.1 波长范围

根据待测样品的测试要求选择合适的测试波长范围。有机化合物一般选择紫外区和可见光区进行全波长范围扫描,蛋白质测试通常分为远紫外和近紫外两个区域进行扫描。

9.2.2 扫描次数

根据测试和提高图谱信噪比的需要,选择合适的扫描次数。推荐扫描不少于三次,取其平均值。

9.2.3 狭缝

选用较宽狭缝可以提高信噪比,但狭缝过宽将降低光谱准确度和光谱分辨率。通常测定时选用狭缝

为 1~2 nm,对于高吸收样品可以在 2~5 nm 范围内调整,低吸收样品可以在 0.25~2 nm 范围内调整。

9.2.4 数据点步长

根据测试需要,选择合适的数据点步长。一般选用 0.5~1 nm 步长。对于分辨率要求高的样品,应选择较低的数据点步长。

9.3 测试步骤

9.3.1 空白样品选择原则

各类样品在测试前,需选择适当的空白样品,在与样品相同的测试条件下做基线扫描,扣除基线后获得样品本身的圆二色光谱图。按照下列原则选择空白样品:

- 液体样品常用的空白样品一般为溶剂或者缓冲溶液等;
- 经压片制备的固体样品,常选择纯溴化钾(或氯化钾)压片作为空白样品;
- 用反射法测试的样品常选择硫酸钡粉末和特氟龙白板作为空白样品;
- 单晶、薄膜样品常用空气作为空白样品;
- 镀膜样品常选择基底板作为空白样品。

9.3.2 液体样品测试步骤

按照下列步骤测试液体样品:

- 样品进行称量、溶解,配制成样品溶液;
- 准备合适厚度比色皿;
- 选择合适的测试条件;
- 使用溶剂、缓冲溶液进行基线扫描;
- 相同测试条件下进行样品扫描。

9.3.3 单晶、薄膜样品的测试步骤

按照下列步骤测试单晶和薄膜样品:

- 选择合适的测试条件;
- 用空气进行基线扫描;
- 相同测试条件下进行样品扫描。

9.3.4 固体粉末样品透射法的测试步骤

按照下列步骤透射法测试固体粉末样品:

- 采用溴化钾(或氯化钾)作为稀释剂将粉末样品压片;
- 选择合适的测试条件;
- 使用空白溴化钾(或氯化钾)压片进行基线扫描;
- 相同测试条件下进行样品扫描。

9.3.5 固体粉末样品反射法的测试步骤

按照下列步骤反射法测试固体粉末样品:

- 准备积分球附件;
- 更换反射检测附件;
- 使用硫酸钡粉末、特氟龙白板或样品本身的基底板进行基线扫描;
- 相同测试条件下进行样品扫描。

9.3.6 关机

测试完成后,取出样品,依次关闭光源、软件和仪器开关,5 min 后关氮气。

10 结果报告

10.1 基本信息

结果报告中可包括:委托单位信息、样品信息、仪器设备信息、环境条件、制样方法、检测方法(依据标准)、检测结果、检测人、校核人、批准人、检测日期等。

10.2 定性分析

10.2.1 判断样品手性

如果圆二色光谱图上有圆二色信号,可以判断样品有手性。

10.2.2 生物大分子的构象分析

圆二色光谱法对生物大分子(蛋白质、核酸、酶、糖等)的构象变化非常敏感,如果一个生物大分子的构象发生了变化,在圆二色光谱图上可以灵敏地体现出来。

10.3 半定量分析

采用单值法、线性回归法、凸面限制法和多级线性回归等算法对蛋白质远紫外区的圆二色光谱图进行拟合计算,可得到蛋白质的二级结构信息。

11 安全注意事项

应按压力容器安全操作规定使用氮气。

附 录 A

(资料性附录)

圆二色光谱原理

A.1 平面偏振光与椭圆偏振光的关系

平面偏振光可分解为振幅、频率相同,旋转方向相反的两束圆偏振光。两束振幅、频率相同,旋转方向相反的圆偏振光也可以合成为一束平面偏振光。如果两束圆偏振光的振幅(强度)不相同,则合成的将是一束椭圆偏振光。

A.2 圆二色光谱定义

平面偏振光通过物质时,其对组成平面偏振光的左旋圆偏振光和右旋圆偏振光的吸收是不同的,即 A_L 、 A_R 不同,其光吸收的差值 $\Delta A = A_L - A_R$,记录这一光吸收差值随波长的变化就是圆二色光谱。圆二色性的存在使通过该物质的平面偏振光变为椭圆偏振光,所形成的椭圆偏振光的椭圆度为 θ ,考虑到比色皿的厚度和物质的浓度,物质对左旋圆偏振光和右旋圆偏振光的摩尔吸收系数是不同的,即 $\epsilon_L \neq \epsilon_R$,其吸收的差值 $\Delta \epsilon = \epsilon_L - \epsilon_R$,不同波长下的 θ 或 $\Delta \epsilon$ 值(纵坐标)与波长 λ (横坐标)之间的关系曲线,即圆二色光谱曲线。 $\Delta \epsilon$ 和 ΔA 的关系为:

$$\epsilon = \epsilon_L - \epsilon_R = \frac{\Delta A}{c \times l} \quad \text{.....(A.1)}$$

圆二色性的存在使通过该物质传播的平面偏振光变为椭圆偏振光,所形成的椭圆偏振光的椭圆度 θ 和光吸收的差值的关系为:

$$\Delta A = A_L - A_R = \frac{\theta}{32.982} \quad \text{.....(A.2)}$$

也可以用摩尔椭圆度 $[\theta]$ 来表示,它与摩尔吸收系数的关系是:

$$[\theta] = \frac{100 \times \theta}{c \times l} \quad \text{.....(A.3)}$$

$$[\theta] = 3\,298.2 \times \Delta \epsilon \approx 3\,300 \times \Delta \epsilon \quad \text{.....(A.4)}$$

以上公式中:

l ——比色皿厚度,单位为厘米(cm);

c ——为物质的浓度,单位为摩尔每升($L \times mol^{-1}$);

A_L 、 A_R ——分别为物质对左、右圆偏振光的吸收值;

ϵ_L 、 ϵ_R ——分别为物质对左、右圆偏振光的摩尔吸收系数,单位为($L \times cm^{-1} \times mol^{-1}$);

θ ——椭圆度,单位为度(deg 或 $^\circ$),一般仪器测得的椭圆度的单位为毫度(mdeg 或 m°);

$[\theta]$ ——摩尔椭圆度,单位为 $deg \times L \times cm^{-1} \times mol^{-1}$ 。

附 录 B
(资料性附录)
比色皿的选择与清洗

B.1 比色皿的选择

根据具体实验需要选择合适的比色皿,参考条件如下:

- a) 选用石英比色皿;
- b) 选用适合旋光性测试、无双折射现象、透光率高的比色皿;
- c) 比色皿透光面必须非常干净,不得有裂纹、划痕和斑点;
- d) 根据测试样品的不同,选择与溶液、单晶、薄膜、粉末、固体样品相匹配的比色皿;
- e) 在远紫外区(180~250 nm)测试样品多用厚度为 1 mm 或者 0.5 mm 的比色皿,在近紫外区(250~400 nm)测试样品可用厚度 10 mm 及其他厚度的比色皿;
- f) 若样品溶液含有易挥发的有机溶剂时,比色皿应加盖,防止挥发;
- g) 测试含有酸、碱等强腐蚀性溶液时,应尽快测试,测试后迅速洗涤比色皿。

B.2 比色皿的清洗

为了不损坏比色皿、不影响比色皿透光性能,比色皿清洗注意事项如下:

- a) 将比色皿浸泡在含有少量洗洁精(阴离子表面活性剂)的 2%(质量分数)碳酸钠水溶液里约 10 min,必要时可加热至 40 °C~50 °C,用水洗净后,在过氧化氢和硝酸(5:1)混合溶液中浸泡 30 min,再用水冲净,倒放在滤纸上,存放在干燥器中;
- b) 清洗顽固污渍或者残留蛋白质时,可以使用浓硝酸、王水或者其他酸清洗,不能用碱、氢氟酸和磷酸清洗;
- c) 可用市场上可购买的比色皿复合清洗剂按说明进行清洗;
- d) 铬酸洗液不宜用于洗涤比色皿;
- e) 不可使用毛刷、硬布等进行刷洗;
- f) 洗净后的比色皿,避免接触、碰触其表面,指纹可能导致数据的变化。

附 录 C

(资料性附录)

旋光光谱原理

C.1 旋光定义

如果左、右圆偏振光在某种介质中的折射率不同,即 $n_L \neq n_R$,则它们通过介质的速度不同,因而由它们叠加产生的平面偏振光的振动方向也会改变,这样的介质称为光学活性物质(optical activity substance)。

平面偏振光通过光学活性物质时,因为左、右圆偏振光在这种介质中的折射率不同($n_L \neq n_R$),通过这种光学活性物质后平面偏振光振动方向的改变,即平面偏振光原有的振动平面通过物质后旋转了一定的角度 α ,这种现象称为旋光(optical rotation),偏振面旋转的角度 α 称为旋光度。能使偏振光的偏振面按顺时针方向旋转的称为右旋体,用“(+)”表示;反之,称为左旋体,用“(−)”表示。

我国药典规定:偏振光透过长度为 1 dm,且每 1 mL 中含有旋光性物质 1 g 的溶液,使用光谱波长为钠光 D 线(589.3 nm),测试温度为 20 °C 时,测得的旋光度称为该物质的比旋度(specific rotation)。

$$[\alpha]_D^T = \frac{100 \times \alpha}{c \times l} \dots\dots\dots (C.1)$$

公式(C.1)中:

$[\alpha]$ ——比旋度;

D ——钠光谱的 D 线;

T ——测试时的温度,单位为摄氏度(°C);

α ——测得的旋光度,单位为度(°);

l ——旋光管长度,单位为分米(dm);

c ——每 100 mL 溶液中有效组分的质量浓度,单位为克每 100 毫升(g/100 mL)。

C.2 旋光光谱定义

用波长连续变化的平面偏振光来测量光学活性物质的旋光度 α ,并以 α 作纵坐标,波长为横坐标,得到的图谱就叫旋光色射谱(optical rotatory dispersion),亦称为旋光光谱,简称 ORD。

旋光色散谱和圆二色光谱都来源于偏振光与物质的相互作用,在圆二色光谱仪上安装一个旋光色散附件,就可以进行旋光色散谱的测试。

参 考 文 献

- [1] GB/T 26798—2011 单光束紫外可见分光光度计
- [2] GB/T 9721—2006 化学试剂 分子吸收分光光度法通则(紫外和可见光部分)
- [3] GB/T 613—2007 化学试剂 比旋光本领(比旋光度)测定通用方法
- [4] 中华人民共和国药典 2015 版 四部
- [5] 旋光色散和圆二色性,郭尧君,分析测试通报,1985,4(4),53-56
- [6] 圆二色光谱技术应用和实验方法,丁岚,高红旗,实验技术与管理,2008,25(10),48-52
- [7] Calibration and standardization of synchrotron radiation circular dichroism and conventional circular dichroism spectrophotometers, Miles, A. J., Wien, F., Lees, J. G., Rodger, A., Janes, R. W., Wallace, B. A., Spectroscopy, 2003, 17(4), 653-661
- [8] How to study proteins by circular dichroism, Kelly, S. M., Jess, T. J., Price, N. C., Biochimica Et Biophysica Acta Proteins & Proteomics, 2005, 1751(2), 119-139
- [9] Direct determination of absolute circular dichroism data and calibration of commercial instruments, Schippers, P. H., Dekkers, H. P. J. M., Chem, A., Analytical Chemistry, 1981 53(6), 778-782

