

现代仪器 在食品分析中的应用

下册

赵 静 主编



化学工业出版社

现代仪器在食品分析中的应用

下册

赵 静 主 编



化学工业出版社

· 北 京 ·

本书详尽地介绍了食品质量与安全分析中常用分析仪器的基本原理、基本结构、特点和适用范围；书中介绍了一些资深色谱与光谱分析专家解决实际问题的方法。通过此书，仪器使用者可以初步具有使用一般分析仪器的能力，并可以通过此书解决一些简单的仪器分析中出现的问题。此书可以作为从事食品质量与安全检测的科研人员、学生的工具书。

图书在版编目 (CIP) 数据

现代仪器在食品分析中的应用 (上、下册) / 赵静主编. —北京: 化学工业出版社, 2012. 6
ISBN 978-7-122-14156-9

I. 现… II. 赵… III. 分析仪器-应用-食品分析-研究 IV. TS207.3

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2012) 第 082721 号

责任编辑: 刘亚军
责任校对: 吴 静

文字编辑: 咎景岩
装帧设计: 韩 飞

出版发行: 化学工业出版社 (北京市东城区青年湖南街 13 号 邮政编码 100011)
印 刷: 北京永鑫印刷有限责任公司
装 订: 三河市万龙印装有限公司
787mm×1092mm 1/16 印张 19 字数 510 千字 2013 年 1 月北京第 1 版第 1 次印刷

购书咨询: 010-64518888 (传真: 010-64519686) 售后服务: 010-64518899
网 址: <http://www.cip.com.cn>
凡购买本书, 如有缺损质量问题, 本社销售中心负责调换。

定 价: 120.00 元 (上、下册)

版权所有 违者必究

本册编写人员

主 编 赵 静

副主编 张金振 周金慧 陈兰珍 邱 静 李 熠

编 者 赵 静 张金振 周金慧 陈兰珍 邱 静

李 熠 刘蓉蓉 赵 岳 赵秀振 王 鹏

黄京平 李桂芬 王 强 周 玲 王 勇

目 录

第 I 部分 光谱

第 1 章 分光光度计	2
1.1 原理	2
1.1.1 光的基本特性	2
1.1.2 物质的颜色	2
1.1.3 朗伯-比尔定律 (Lambert-Beer)	3
1.1.4 朗伯-比尔定律的应用	3
1.1.5 分光光度计的原理	4
1.2 主要结构	6
1.2.1 紫外分光光度计的基本结构	6
1.2.2 荧光分光光度计基本结构	7
1.3 仪器类型	8
1.3.1 紫外分光光度计类型	8
1.3.2 荧光分光光度计类型	11
1.4 适用范围	12
1.4.1 紫外-可见分光光度计适用范围	12
1.4.2 荧光分光光度计适用范围	14
1.5 使用方法	14
1.5.1 紫外分光光度计的使用实例	14
1.5.2 荧光分光光度计使用实例	19
1.5.3 仪器使用注意事项	21
1.6 一般问题诊断方法	22
1.7 仪器维护与保养	25
1.8 在食品分析中的应用举例	26
1.8.1 紫外-可见分光光度计在食品分析中的应用实例	26
1.8.2 荧光分光光度计在食品分析中的应用实例	46
参考文献	59
第 2 章 原子吸收光谱法	61
2.1 原理	61
2.2 仪器类型	61
2.2.1 火焰式原子吸收光谱法 (FLAA)	61
2.2.2 石墨炉式原子吸收光谱法 (GFAA)	62
2.2.3 氢化式原子吸收光谱法 (HGAA)	62
2.2.4 冷蒸气原子吸收光谱法 (CVAA)	62
2.3 主要结构	67
2.3.1 光源	67
2.3.2 原子化器	68
2.3.3 单色器	69
2.3.4 检测与控制系统	69
2.3.5 数据处理系统	70
2.4 适应范围	71

2.5 使用方法	71
2.5.1 定量分析方法	71
2.5.2 以 PE-800 原子吸收光谱仪为例介绍其使用方法	72
2.6 一般问题诊断方法	73
2.7 一般的维护与保养	74
2.8 在食品分析中的应用举例	74
参考文献	79
第 3 章 原子发射光谱法	80
3.1 原理	80
3.2 仪器类型	80
3.2.1 Lab Spark 1000 型火花源光谱仪	80
3.2.2 Plasma1000 型电感耦合等离子体发射光谱仪	82
3.2.3 HK-2000 型等离子体单道扫描光谱仪	83
3.2.4 700 系列 ICP-OES 电感耦合等离子原子发射光谱仪	84
3.3 主要结构	85
3.3.1 激发光源	85
3.3.2 光谱仪	87
3.3.3 观测设备	89
3.4 适应范围	90
3.5 使用方法	90
3.5.1 光谱定性分析的方法	90
3.5.2 光谱定量分析	91
3.5.3 MPT 原子发射光谱仪的使用方法	91
3.6 一般问题诊断方法	92
3.7 一般的维护与保养	93
3.8 在食品分析中的应用举例	93
3.8.1 食品中营养元素的分析	93
3.8.2 食品中有害元素的监控	93
3.8.3 食品行业标准中原子吸收的应用	94
参考文献	101
第 4 章 原子荧光光谱法	102
4.1 原理	102
4.2 仪器类型	103
4.2.1 960MC/960CRT 型荧光分光光度计	103
4.2.2 930A 荧光分光光度计	104
4.2.3 AFS-9700 全自动注射泵原子荧光光度计	105
4.2.4 LC-AFS9800 液相色谱原子荧光联用仪	106
4.3 主要结构	107
4.3.1 激发光源	108
4.3.2 原子化器	108
4.3.3 单色器	108
4.3.4 检测系统	108
4.3.5 显示装置	108
4.4 适用范围	109
4.5 使用方法	109
4.5.1 F900 稳态、瞬态荧光光谱仪操作规程	110
4.5.2 RoHS X 荧光光谱仪操作规程	111

4.6 一般问题诊断方法	113
4.7 一般的维护与保养	114
4.8 在食品分析中的应用举例	114
4.8.1 蜂王浆中砷的原子荧光分光光度计检测方法	114
4.8.2 全血中铅的原子荧光分光光度计检测方法	117
4.8.3 高效液相色谱-氢化物发生-原子荧光光谱测定蔬菜水果中砷的化学形态	121
4.8.4 水质 硒的测定——原子荧光光度法	122
参考文献	124

第 5 章 红外光谱和拉曼光谱 126

5.1 近红外光谱	126
5.1.1 原理	126
5.1.2 仪器类型	126
5.1.3 主要结构	127
5.1.4 适用范围	128
5.1.5 使用方法	128
5.1.6 仪器维护与保养	129
5.1.7 在食品分析中的应用举例	129
5.2 中红外光谱	131
5.2.1 原理	131
5.2.2 仪器类型	131
5.2.3 主要结构	132
5.2.4 适用范围	133
5.2.5 使用方法	133
5.2.6 仪器维护与保养	133
5.2.7 在食品分析中的应用举例	134
5.3 拉曼光谱	137
5.3.1 原理	137
5.3.2 仪器类型	137
5.3.3 主要结构	138
5.3.4 适用范围	139
5.3.5 使用方法	139
5.3.6 仪器维护与保养	140
5.3.7 在食品分析中的应用举例	140
参考文献	140

第Ⅱ部分 核磁共振

第 6 章 核磁共振	142
6.1 原理	142
6.1.1 核磁共振谱仪	142
6.1.2 主要参数	143
6.2 仪器类型	144
6.2.1 续波核磁共振波谱仪 (CW-NMR)	144
6.2.2 脉冲傅里叶核磁共振波谱仪 (FT-NMR)	146
6.3 主要结构	150
6.4 适应范围	152
6.5 核磁共振技术使用方法	153
6.5.1 NMR 一般操作	153

6.5.2 Varian 核磁共振基本 1D NMR 实验的设定、采样、数据处理及绘图	153
6.6 一般问题诊断方法	158
6.7 一般的维护与保养	159
6.8 在食品分析中的应用举例	160
6.8.1 植物油料含油量的测定	160
6.8.2 变性淀粉中羟丙基含量的测定	162
6.8.3 大豆含油量测定	164
6.8.4 NMR 在乳制品中的应用	165
参考文献	165

第Ⅲ部分 生物分析类仪器

第 7 章 氨基酸分析仪	168
7.1 原理	168
7.2 仪器类型	168
7.3 主要结构	170
7.4 应用范围	171
7.5 使用方法	171
7.6 一般问题诊断方法	173
7.7 仪器维护与保养	175
7.7.1 更换泵密封圈和清洗密封圈	175
7.7.2 更换排出阀密封圈	175
7.7.3 清洗流路过滤器	175
7.7.4 清洗溶剂过滤器	175
7.7.5 清洗排出阀和吸入阀	175
7.7.6 更换光度计光源灯	176
7.7.7 拆卸和清洗流槽	176
7.7.8 设备长时间不使用	176
7.7.9 使用反应柱时的注意事项	176
7.8 在食品分析中的应用举例	176
7.8.1 食品中氨基酸的测定	176
7.8.2 食品营养评价分析	197
7.8.3 在水解蛋白方面的应用	203
7.8.4 其他方面的应用	205
参考文献	208
第 8 章 PCR 仪分析原理及其应用	210
8.1 聚合酶链式反应	210
8.1.1 PCR 反应的基本成分	210
8.1.2 标准 PCR 反应条件	211
8.1.3 PCR 反应条件的选择	211
8.2 PCR 技术	212
8.2.1 反转录 PCR (reverse transcriptase-PCR, RT-PCR)	212
8.2.2 cDNA 末端快速扩增技术 (rapid amplification of cDNA ends, RACE)	212
8.2.3 不对称 PCR (asymmetric PCR)	212
8.2.4 反向 PCR (inverse PCR)	212
8.2.5 多重 PCR (multiplex PCR)	212
8.2.6 差异显示 PCR (differential display-PCR, DD-PCR)	213
8.2.7 荧光定量 PCR (FQ-PCR)	213

8.2.8 免疫-PCR (immuno-PCR)	213
8.3 PCR 仪	213
8.3.1 PCR 仪的分类	214
8.3.2 PCR 仪的组成	214
8.3.3 使用方法	216
8.4 在食品分析中的应用举例	220
8.4.1 蜂蜜中转基因成分检测方法——普通 PCR 方法和实时荧光 PCR 方法	220
8.4.2 食品中腰果过敏原成分 PCR 检测方法建立	225
8.4.3 快速鉴定猪肉和牛肉多重 PCR 方法的建立及初步应用	228
8.4.4 食品中 3 种致病菌的 Taqman 多重荧光定量 PCR 检测	231
8.4.5 应用 PCR-DGGE 指纹图谱技术分析盐水鸭储藏过程中的细菌多样性	236
参考文献	239

第 9 章 凝胶电泳仪及其凝胶成像系统

9.1 凝胶电泳仪	240
9.1.1 凝胶电泳仪原理	240
9.1.2 凝胶电泳技术的类型	240
9.1.3 凝胶电泳仪主要结构	243
9.1.4 凝胶电泳仪适用范围	244
9.1.5 经典凝胶电泳仪介绍及使用	245
9.1.6 凝胶电泳仪问题诊断及解决方法	248
9.1.7 凝胶电泳仪的维护与保养	250
9.2 凝胶成像系统	251
9.2.1 凝胶成像系统原理	251
9.2.2 凝胶成像系统主要结构	251
9.2.3 凝胶成像系统适应范围	251
9.2.4 凝胶成像系统介绍及使用	252
9.2.5 凝胶成像系统方法优化	253
9.2.6 凝胶成像系统问题诊断方法	253
9.2.7 凝胶成像系统的维护与保养	253
9.2.8 凝胶电泳以及凝胶成像系统在食品分析中的应用举例	253
参考文献	267

第Ⅳ部分 其他仪器

第 10 章 表面等离子共振	270
10.1 原理	270
10.1.1 消逝波	270
10.1.2 金属表面等离子波	270
10.1.3 SPR 光学原理	271
10.2 主要结构	272
10.3 适用范围	274
10.4 经典仪器介绍	275
10.5 一般的维护与保养	277
10.6 在食品分析中的应用举例	277
10.6.1 在食品中抗生素残留分析中的应用	277
10.6.2 在食品蛋白分析中的应用	284
10.6.3 在食品维生素分析中的应用	287
10.6.4 在食品中微生物检测方面的应用	288
参考文献	296

第 I 部分 光谱

第 1 章 分光光度计

1.1 原 理

分光光度计是理化分析中最常用的仪器。它的基本原理是建立在光与物质相互作用的基础上,因此首先了解一下有关光和物质的基本知识。

1.1.1 光的基本特性

光是能的一种表现形式,是电磁波的一种,光在真空中是以直线方式传播的,在不同的介质中发生反射、折射、衍射、色散、干涉和偏振等现象;可用波长、频率、传播速度等参量来描述。光有波动性,光的颜色就是由光的波长决定的,人眼能感觉到的光称可见光,其波长在 400~750nm 之间,在可见光之外的是红外光和紫外光。光速 (c) 与波长 (λ) 的关系可用下面的公式来表示:

$$c = \lambda \nu \quad (1-1)$$

式中 c ——光速, 2997700km/s;

λ ——波长 (具有相同振动相位的相邻两点间的距离), 常用单位有 m、cm、 μm 、nm;

ν ——频率 (光波每秒钟振动的次数), Hz 或 s^{-1} 。

同时光又有粒子性,光电效应就是一个很好的例子。光的粒子性理论认为,光是由光子组成的,在辐射能量时,光是以一份一份的能量 E 的形式辐射的,同时光被吸收时,能量也是一份一份被吸收的。每个光子所具有的能量 E 与波长、频率之间的关系为:

$$E = h\nu = hc/\lambda \quad (1-2)$$

式中 h ——普朗克常数,其值为 $6.626 \times 10^{-34} \text{J} \cdot \text{s}$ 或 $40135 \times 10^{-15} \text{eV} \cdot \text{s}$;

E ——光子的能量, J;

ν ——频率;

c ——光速;

λ ——光的波长。

因此不同波长的光,其能量不同,由式(1-2)可知,光子所具有的能量与光的频率成正比,与光的波长成反比,当辐射光的频率一定时,光子的能量就确定。频率越高或波长越短,光子的能量就越高,同时光子的能量与光线的强弱无关,光的强度与光子的数量有关,光子的数量越多则光的强度越大。

1.1.2 物质的颜色

首先来阐明几个有关光的名词概念。

① 单色光:是指波长范围较窄的光。

② 复合光:是指波长范围较宽的光。

③ 光的互补:日常生活中,我们看到的白光是各种颜色的光按一定的比例混合后形成的,事实上两种颜色的光以一定的比例混合后也能形成白光。人们就把两种颜色的光称为互补光,把这两种颜色称为互补色。如黄色与蓝色互补,紫色与黄绿色互补,红色与蓝绿色互补等。

不同的物质有不同的颜色,如水、乙醇、硫酸都是无色透明的,说明它们不吸收任何颜

色的光。如果物质对日光中的各种波长的光都产生一定程度的吸收,则该物质呈灰色。硫氰酸铁溶液呈橙红色,是因为它吸收了日光中的绿蓝光,而让其他颜色的光透过;硫酸铜溶液呈蓝色,是因为它吸收了蓝色的互补光黄色,所以呈现蓝色。

光的选择性吸收:为什么物质会对光吸收有选择性呢?因为构成物质的分子、原子或离子具有确定的组成和结构,这些分子、原子自身处于不停的运动之中,因此就产生了一系列的不连续的量子化的特征能级,当被光照射时,如果某种光子的能量恰好等于某两个特征能级差时,该光子的能量就可能转移到该物质上,该物质会吸收该光子,并从能量较低的状态(基态)跃迁到能量较高的状态——激发态。激发态不稳定,通常会以光、热、荧光或磷光的形式释放所吸收的能量,而回到基态。这说明物质只能吸收能量等于其特征能级差的光。每种物质的组成结构不同,能级差也不同,因此它们对光的吸收也不一样。各种物质都有自己的吸收光带,根据这种特性可以对不同物质进行鉴定。

1.1.3 朗伯-比尔定律 (Lambert-Beer)

当一束平行的单色光照射到一定浓度且均匀的溶液时,入射光被溶液吸收的程度与溶液厚度的关系见式(1-3):

$$\lg(I_0/I) = kb \quad (1-3)$$

式中 I ——透射光的强度;

I_0 ——入射光的强度;

b ——溶液的厚度;

k ——常数。

这就是朗伯定律 (S. H. Lambert)。

当入射光通过同一溶液的不同浓度时,入射光与溶液的关系为:

$$\lg(I_0/I) = k'c \quad (1-4)$$

式中 c ——溶液的浓度;

k' ——另一常数。

这就是比尔定律 (Beer)。

当溶液的厚度、浓度都可以改变时,就要考虑两者同时对透射光的影响,则有:

$$A = \lg(I_0/I) = \lg(1/T) = \epsilon bc \quad (1-5)$$

式中 A ——吸光度;

T ——透射率, %;

ϵ ——摩尔吸光系数,它是物质在一定波长下的特征常数。

这种单色光与有色溶液的关系就是著名的朗伯-比尔定律 (Lambert-Beer)。根据朗伯-比尔定律,当入射光的波长、溶质、溶剂以及溶液的温度一定时,溶液的光密度和溶液层的厚度及溶液的浓度成正比,当溶液层的厚度一定时,溶液的光密度只与溶液的浓度有关,吸光度与被测物质的浓度成正比,这是光度法定量分析的依据。

1.1.4 朗伯-比尔定律的应用

(1) 等吸光度法 从朗伯-比尔定律可知,当用同一光源照射同一物质的不同浓度溶液时,若吸光度相等,则两溶液各自的浓度和透光液层厚度的乘积也相等。利用此关系在可见光区用眼做检测器及比色法,就可以求出待测溶液的浓度。

(2) 计算法 根据被测溶液浓度的大致范围,先配制一已知浓度的标准溶液。用同样的方法处理标准溶液和被测溶液,使其成色后,在同样的实验条件下使用同一台仪器分别测定它们的吸光度。由于仪器的性能和实验环境在不断地变化,所以采用计算法时,必须每次都要对标准液和被测液进行测量。

(3) 标准曲线法 这种方法分以下几步:

① 先配制五种以上标准浓度的溶液；

② 测出每种溶液的吸光度 A ；

③ 做 A-C 标准曲线图（A 为吸光度，C 为溶液浓度），有了标准工作曲线便可以对溶液进行测量；在同样条件下，用仪器测量出 A 后，查标准曲线即可得到被测溶液的浓度值。

1.1.5 分光光度计的原理

分光光度计原理的理论依据就是朗伯-比尔定律。当一束复合光通过分光系统时，会被分成一系列波长的单色光，任意选取某一波长的单色光，根据被测物质对光吸收的强弱，进而对物质进行定性和定量分析，这种分析方法称为分光光度法。分光光度法所使用的仪器称为分光光度计。

分光光度计根据波长及检测的范围不同分为如下几种类型：

① 可见分光光度计，测定波长范围为 400~760nm 的可见光区；

② 紫外分光光度计，测定波长范围为 200~400nm 的紫外光区；

③ 红外分光光度计，测定波长大于 760nm 的红外光区；

④ 荧光分光光度计，用于扫描液相荧光标记物所发出的荧光光谱；

⑤ 原子吸收分光光度计，光源发出被测的特征光谱辐射，被经过原子化器后的样品蒸气中的待测元素基态原子所吸收，通过测定特征辐射被吸收的大小，来求出被测元素的含量。

分光光度计按自动化程度分手动、半自动和自动分光光度计。分光光度计按软件可分为带扫描和不带扫描。本章主要介绍紫外-可见分光光度计和荧光分光光度计。

1.1.5.1 紫外-可见分光光度计工作原理

紫外-可见分光光度计是用于测量和记录待测物质分子对紫外光、可见光的吸光度及紫外-可见吸收光谱，并进行定性定量以及结构分析的仪器。它的基本原理是溶液中的物质在一定频率的紫外-可见光照射下，发生了对光的特定吸收效应。各种不同物质具有各自的吸收光谱，因此当某一频率的光透过溶液时，能量就会被吸收而减弱，光能减弱的程度和物质的浓度有一定的比例关系，即符合 Lambert-Beer 定律的基本原理，在其他条件保持一致的情况下，被测溶液的吸光度与被测溶液的浓度成正比，因此测量光谱可以对物质进行定性分析，而且根据吸收与已知浓度的样本的比较，还能进行定量分析。

1.1.5.2 荧光分光光度计工作原理

荧光分光光度计是用于扫描液相荧光标记物所发出的荧光光谱的一种仪器。它能提供激发光谱、发射光谱、荧光强度、量子产率、荧光寿命、荧光偏振等许多物理参数，从各种角度反映了分子的成键和结构情况。通过对这些参数的测定，不但可以做一般的定量分析，而且还可以推断分子在各种环境下的构象变化，从而阐明分子结构与功能之间的关系。荧光分光光度计的激发波长扫描范围一般是 190~650nm，发射波长扫描范围是 200~800nm。可用于液体、固体样品（如凝胶条）的光谱扫描。

荧光产生的机理：每一个分子具有一系列分离的电子能级，每一个电子能级中又有一系列的振动能级和转动能级。室温下，大多数分子处于基态的最低能层，处于基态的分子选择性地吸收光能后，分子内的电子跃迁到较高能级而变成激发态，处于激发态的分子不稳定，它首先通过内转换将部分能量转移给周围的分子，回到最低电子激发态振动能级，如果这时分子通过发射相应的光量子来释放剩余的能量而回到基态的各个不同振动能级，就产生了荧光。因此，最低第一级电子激发态振动能级是产生荧光的基础。由于分子发射荧光前已有一部分能量被消耗，所以荧光能量要比物质吸收的光能量小，所以荧光的发射波长总比激发波长长。

常用的荧光参数有荧光的激发光谱、发射光谱、荧光强度、量子产率、荧光寿命等，它们是物质的基本特征。

(1) 激发光谱 荧光是光致光, 因此需要选择合适的激发光波长, 这可以从它们的激发光谱来确定。绘制激发光谱曲线时, 通常是将观测的发射波长固定在荧光强度的最强的波长处 (λ_{em}), 然后改变激发光的波长, 测量不同激发光波长所产生的荧光强度的变化, 以激发光波长为横坐标, 荧光强度为纵坐标, 可得荧光物质的激发光谱。荧光强度最大处所对应的激发光波长即为最适激发波长, 称为最大激发波长, 用 λ_{ex} 表示。它表示在此波长处的分子的能量最大, 处于激发点分子数目最多, 因而能产生最强的荧光。荧光物质的激发光谱的形状和吸收光谱的形状极为相似, 经校正后的真实的激发光谱与吸收光谱不仅形状相同, 而且波长位置也一样, 这是因为物质分子吸收能量的过程就是激发过程, 不同的是吸收光谱的纵坐标是吸光强度, 而激发光谱的纵坐标为荧光强度。

(2) 发射光谱 荧光发射光谱称为荧光光谱。如果把激发光波长固定在最大激发波长 λ_{ex} 处, 然后扫描发射波长, 测定不同波长处的荧光强度, 以荧光波长为横坐标, 荧光强度为纵坐标作图, 便得到荧光光谱。

(3) 荧光强度 荧光强度是最常用的参数, 与很多因素有关, 可用下面公式表示:

$$F = K\phi I_0(1 - e^{-\epsilon bc})$$

式中 F ——荧光强度;

K ——仪器常数;

ϕ ——量子产率;

I_0 ——激发强度;

ϵ ——摩尔吸收系数;

b ——荧光池的光径;

c ——荧光物质溶液的浓度。

当溶液很稀时, 上式可简化为:

$$F = KI_0\phi\epsilon bc = KI_0\phi A$$

式中 A ——光吸收值, $A = \epsilon bc$ 。

由上式可知, 在低浓度下, 样品浓度和荧光强度成线性关系。利用此公式可用荧光光谱法测定荧光物质。

(4) 量子产率 量子产率表示荧光物质发射荧光的本领, 用 ϕ 表示。其定义为发射的光量子数与吸收的光量子之比, 又称荧光效率或量子效率。若两种溶液测量条件完全相同, 则可用相对法测定 ϕ :

$$\phi_1/\phi_2 = F_1 A_2 / F_2 A_1$$

式中 F ——荧光强度;

A ——光吸收值。

量子产率的改变必然会引起荧光强度的改变。因此, 如果要研究量子产率的相对值, 只要测量荧光强度就可以了。

荧光光谱的特性如下。

① 斯托克斯 (Stokes) 位移。在溶液中所观察到的物质的荧光光谱总是位于物质激发光谱波长一侧, 及荧光波长, 一般大于激发光波长的这种现象称斯托克斯位移。这是因为激发态分子是经无辐射跃迁到第一激发单重态的最低振动能量层, 然后再回到基态各振动能量层而发射荧光, 无辐射跃迁时损失了部分能量, 因此荧光吸收波长一般比激发光波更长。

② 荧光光谱的形状与激发光波长无关。分子吸收光谱可能有好几个吸收带, 但荧光光谱只有一个发射带, 因为分子吸收不同能量的光子可以从基态跃迁到不同能级的激发点, 具有几个吸收带。由于以较高激发态通过振动回到第一电子激发态的概率很高, 远大于由高级激发态直接发射的光子而回到基态。所以在荧光发射时, 不论用哪种波长的光激发, 电子都

从第一电子激发态返回到基态的各振动能层，所以荧光光谱与激发光波长无关。

③ 镜像对称。通常荧光光源和它的吸收光谱呈镜像对称。吸收光谱是物质分子由基态激发到第一电子激发点与各振动能层所致，其形状取决于第一电子激发态中各振动能层的分布情况。荧光光谱是激发态分子从第一电子激发点的最低振动能层回到基态中各不同的振动能层引起的，荧光光谱的形状取决于基态各振动能层的分布情况。而基态中振动能层的分布于第一电子激发点中振动能层的分布情况类似，因此荧光光谱和吸收光谱的形状相似。由基态最低振动能层跃迁到第一电子激发态各个振动能层而显示的吸收峰中，第一电子激发态的振动能层越高，两个能层之间的能量差就越大；即激发所需要的能量越高，吸收峰的波长越短。与此相反，由第一电子激发态的最低振动能层降落到基态各个振动能层的荧光发射过程中，基态振动能层越高两个能层之间的能量差越小，荧光峰的波长越长，所以，荧光光谱和吸收光谱不仅形状相似，而且互为镜像。

荧光分光光度计工作的基本原理是：由高压汞灯或氙灯发出的紫外光和蓝紫光经第一单色器射到样品池中，样品中的荧光物质吸收激发光后发生能量跃迁，变为激发态；激发态的分子不稳定，在返回基态的过程中发出荧光，荧光再经过第二单色器分光色散后，被光电倍增管所接受，将光信号转换成电信号；电信号经放大和显示系统进行相关的计算就可以获取物质的荧光度。

当仪器的有关参数选定，并且被测物质和介质条件确定后，所测定的荧光相对强度仅与荧光物质的吸收光度 A 成正比，因而可以进行定性测试。不同物质由于分子结构不同，其激发态能级的分布具有各自不同的特征，这种特征反映在荧光上表现为各种物质都有其特征荧光激发和发射光谱，因此可以用荧光激发和发射光谱的不同来定性地进行物质的鉴定。

在溶液中，当荧光物质的浓度较低时，其荧光强度与该物质的浓度通常有良好的正比关系，利用这种关系可以进行荧光物质的定量分析，与紫外-可见分光光度法类似，荧光分析通常也采用标准曲线法进行。

1.2 主要结构

1.2.1 紫外分光光度计的基本结构

无论哪种类型的分光光度计的基本结构都相同，主要由光源、单色器、样品室、检测器、信号处理及显示系统五部分组成。分光光度计各部件的次序见图 1-1。

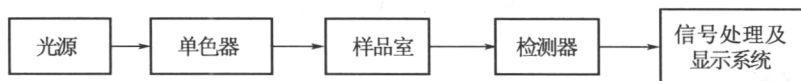


图 1-1 分光光度计各部分次序图

(1) 光源 光源的作用就是提供激发能，使待测分子产生光吸收。理想的光源的条件是：

- ① 能提供连续的辐射；
- ② 光强度足够大；
- ③ 在整个光谱区内光谱强度不随波长有明显变化；
- ④ 光谱范围宽；
- ⑤ 使用寿命长，价格低。

分光光度计上常用的光源有钨丝灯或碘钨灯（能发出 320~2500nm 的可见光谱，为可见光和近红外区），氢灯或氘灯（有效波长范围为 185~375nm，为紫外波长区）；在可见光区、近紫外光区和近红外光区常用钨丝灯作为光源；在紫外光区多使用氢弧灯。

(2) 单色器 单色器是分光光度计的核心，它是将来自于光源的复合光分解为可调的单

色光的一种光学装置,直接影响入射光的单色性,从而影响测定的灵敏度、选择性及准确性。主要组成部件有:

- ① 入射狭缝 (限制杂散光进入);
- ② 准光器 (透镜或凹面反射镜使入射光变成平行光);
- ③ 色散元件 (是核心元件,包括棱镜或光栅,可将混合光分解为单色光);
- ④ 聚焦元件;
- ⑤ 出射狭缝。

在单色器中,色散元件是核心元件,由棱镜或光栅组成。

由于不同波长的光折射率不同,棱镜能将通过的光波根据不同的波长分开。玻璃棱镜色散力强,对紫外线吸收力强,多用于可见分光光度计;石英棱镜工作波长范围为 185~4000nm,不仅在紫外-可见分光光度计中使用,也适用于近红外区。棱镜对光波的色散是非线性的,分辨率较低,波长精确度较差。

光栅是一种十分重要、应用范围很广的色散元件,可以用于紫外-可见、荧光、近红外分光光度计。有透射光栅和反射光栅,实际应用的都是反射光栅,它又可分为平面反射光栅(即通称的反射光栅或闪烁光栅)和凹面反射光栅两类,凹面反射光栅可以起色散元件和准直镜两个作用,使色散后的光束聚焦于出射狭缝,得到锐线光谱。光栅对光波的色散近似线性,分辨率较高,波长精度较高。

(3) 样品室 样品室由池架、吸收池(比色杯)以及各种可更换附件组成。池架有普通池架和恒温池架。吸收池主要用来盛放样品溶液,是光与物质发生作用的场所。吸收池有玻璃池和石英池两种,普通的光学玻璃池能吸收紫外光,只能用于测量 340nm 以上可见光区;石英池可透过紫外光、可见光和红外光,由于石英池价格贵,主要用于测量紫外区。吸收池的形状有长方形、方形和圆筒形,吸收池的放置必须与光束方向垂直。

(4) 检测器 检测器是利用光电效应将透过吸收池的光信号转变成电信号的元件,现今多采用光电管或光电倍增管作为检测器。

光电管由一个半圆柱形阴极和一个丝阳极组成,封装在真空透明密封套里。阴极的凹面上涂有一层光电发射材料,光照射这种物质后可发射电子,当在两极间加有电位时,发射出来的电子就流向丝阳极而产生光电流。对于相同的辐射强度,它所产生的电流约为光电池所产生电流的 $1/4$ 。由于光电管具有很高的电阻,所以产生的电流容易放大。用铯、铷做阴极的紫敏光电管,适用范围为 200~625nm;用银、氧化铯作阴极的红敏光电管;适用范围为 625~1000nm。

光电倍增管原理与光电管相似,结构上有差异,但比普通的光电管优越,它可将第一次发射出的电子数目放大到数百万倍。当电子打在兼性阳极上时,能引起更多的电子从表面射出,这些射出的电子又被第二个兼性阳极所吸引,同样再产生更多的电子。具有增益范围宽、响应快的优点,缺点是噪声大,波长相应范围窄(截止波长为 900nm)。

(5) 信号处理及显示系统 常用的信号显示系统有检流计、数字显示、微机等进行仪器自动控制和结果处理。现代的仪器通常都附有自动记录器,可自动描出吸收曲线,有的还连有打印机,许多高性能的分光光度计可以与电脑连接,使处理数据、存取数据更加方便。

1.2.2 荧光分光光度计基本结构

荧光分光光度计主要由光源、激发单色器、发射单色器、样品室、检测装置、显示系统等组成,如图 1-2 所示。

(1) 激发光源 荧光分光光度计的激发光源应具有足够的强度、适用波长范围宽、稳定等特点。常用的光源有连续的氙灯、高压汞蒸气灯、脉冲氙灯、单波长的 LED 灯、碘钨灯,特殊专用时也可以使用氘灯。目前市场上常用的荧光分光光度计光源有高压汞灯和氙弧灯。

高压汞灯是以汞蒸气放电发光的光源，主要有 365nm、405nm、436nm 三条谱线，尤其以 365nm 谱线最强，一般滤光片式的荧光计多采用它作为激发光源。氙弧灯是目前荧光分光光度计中最常用的一种光源。它是一种短弧气体放电灯，外套为石英，内冲氙气，室温时压力为 506625Pa，工作时压力为 2026500Pa，具有光强大、在 200~800nm 范围内是连续光源的特点。另外，高功率的可调谐染料激光器是一种新型的荧光激发光源。这种光源不需要单色器和滤光片，具有单色性好、强度大、脉冲激光时间短而减少光敏物质分解的优点，但是仪器设备复杂，所以一般应用很少。

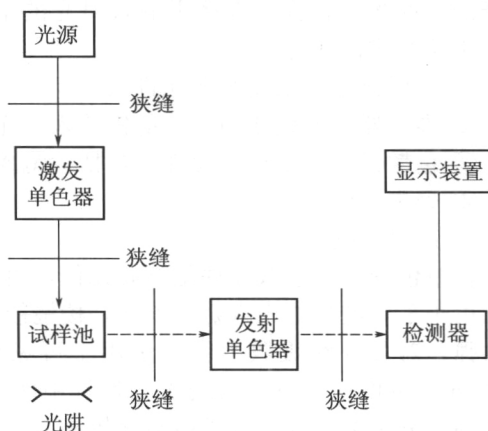


图 1-2 荧光分光光度计结构图

(2) 单色器 荧光分光光度计有两个单色器。置于光源和样品之间的为激发单色器或第一单色器，它的作用是分离出所需要的激发光谱。激发单色器主要有滤光片模式和光栅模式：用滤光片作单色器的结构比较简单，可选用的激发光源也很少；使用光栅模式的单色器结构复杂，可选的激发光也比较多。

置于样品室和检测器之间的为发射单色器或第二单色器，常用光栅为单色器，它的作用是用来分析样品发射出来的荧光，可以滤去杂散光、瑞利光、拉曼光和杂质所发射的荧光，筛选出特定的发射光谱。发射单色器也有滤光片模式和光栅模式。使用滤光片模式的仪器可检测的样品单一，一般用于专用的荧光仪；使用光栅模式的仪器一般是通用仪器，可以根据不同样品发出的荧光做出相应的分光。光栅结构的仪器结构复杂，无论是激发单色器还是发射单色器，都要求有比较高的精度。

(3) 样品室 荧光分析的样品池通常采用石英池（液体样品用）或固体样品架（粉末或片状样品）组成。测量液体时，光源与检测器要互成直角；测量固体时，光源与检测器成锐角。

(4) 检测器 简易型荧光计可用目视检测，或用硒光电池，光电管检测。现在的荧光计多采用光电倍增管进行检测。检测器的方向应与激发光的方向成直角，以消除样品池中透射光和杂散光的干扰。在现代的高级仪器中，光导摄像管用来作为光学多道分析器的检测器。它具有检测效率高、动态范围宽、线性响应好、坚固耐用和寿命长等特点。

(5) 显示装置 以前的显示装置包括数字电压表、记录仪和阴极示波器，现在的荧光分光光度计的显示装置通常与计算机连用，进行自动控制和显示荧光光谱及各种参数，使数据处理和存储更快捷、方便。

1.3 仪器类型

1.3.1 紫外分光光度计类型

根据光路设计的不同，紫外-可见分光光度计可分为单光束紫外-可见分光光度计和双光束紫外-可见分光光度计；根据测量时提供的波长不同，分为单波长紫外-可见分光光度计和双波长紫外-可见分光光度计。

单光束紫外-可见分光光度计是指光源发出的光经单色器分光后，得到一束平行光，轮流通过参比溶液和样品溶液，进行吸光度的测定。一般适于给定波长吸光度的测量，不能进行全波段光谱扫描，并且要求光源和检测器具有很高的稳定性。常用的单光束紫外-可见分光