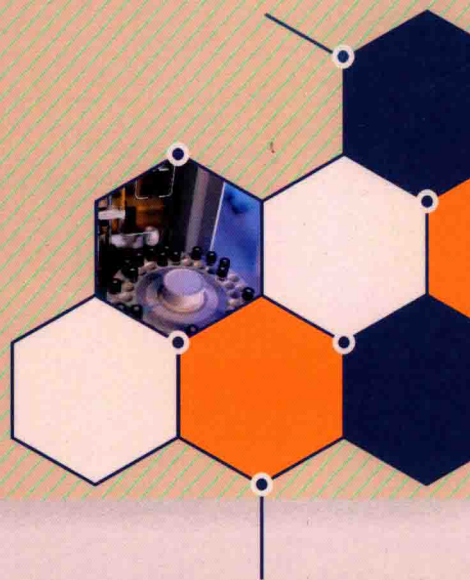
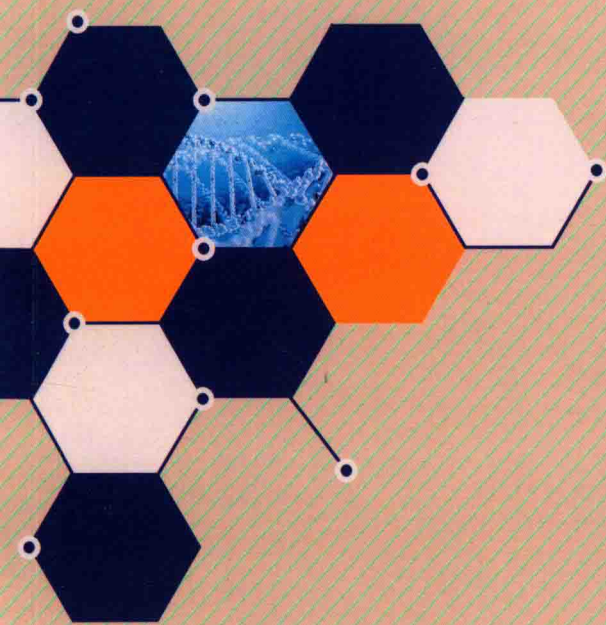


现代食品检测技术 实训教程

主编 史碧波



现代食品检测技术实训教程

主 编 史碧波

副主编 罗晓妙 张 忠



WUHAN UNIVERSITY PRESS

武汉大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

现代食品检测技术实训教程/史碧波主编. —武汉:武汉大学出版社,2016.6
ISBN 978-7-307-17759-8

I. 现… II. 史… III. 食品检测—高等学校—教材 IV. TS207

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2016)第 073461 号

责任编辑:方竞男

责任校对:王小倩

装帧设计:张希玉

出版发行:武汉大学出版社 (430072 武昌 珞珈山)

(电子邮件:whu_publish@163.com 网址:www.stmpress.cn)

印刷:虎彩印艺股份有限公司

开本:787×1092 1/16 印张:11.25 字数:261千字

版次:2016年6月第1版 2016年6月第1次印刷

ISBN 978-7-307-17759-8 定价:30.00元

版权所有,不得翻印;凡购买我社的图书,如有质量问题,请与当地图书销售部门联系调换。

前 言

本书系统地介绍了现代食品检测过程中需要使用的光谱分析技术、色谱分析技术、质谱及联用技术、分子生物学技术、免疫检测技术和无损检测新技术等现代检测技术,以及这些技术在食品检测中的具体应用。在内容上,本书重点突出实际检测中应用广泛的仪器和技术的介绍,如分光光度计、高效液相色谱、气相色谱、气质联用、PCR、酶联免疫等,将其与实际检测的具体项目结合起来,充分体现了实训教程的实用性和可操作性。另外,本书收集了一些尚处于研发阶段的新技术,如计算机视觉技术、力学检测技术、声学检测技术、电学检测技术等,对其在食品检测中的应用做了介绍,体现了本书的前瞻性和新颖性。在内容层次上,每个模块下分设不同的项目,每个项目下又设有知识链接和应用实训,知识链接主要介绍项目中需掌握的知识要点,希望学生掌握这些知识点并在其指导下进行实训;应用实训的设立考虑了全面性和实用性,希望学生通过实训可以切实掌握这些食品检测技术。实训环节包括实训目标、实训内容、实训考核要求,从知识点储备到具体操作,从目标到考核要求,让学生能对自己的实训水平有全面的认知。本书不仅可以作为现代食品检测技术或相关课程理论和实践教学的教材,还可以作为从事食品检测或相关工作的工程技术人员和科研人员的技术参考书。

本书共分为六个模块。模块一为现代光谱分析技术在食品检测中的应用,由张忠和赵旭编写;模块二为现代色谱分析技术在食品检测中的应用,由罗晓妙编写;模块三为质谱及联用技术在食品检测中的应用,由史碧波编写;模块四为分子生物学技术在食品检测中的应用,由花旭斌编写;模块五为免疫检测技术在食品检测中的应用,由巩发永和张谊编写;模块六为无损检测新技术在食品检测中的应用,由史碧波和袁健编写。

本书的编写得到了西昌学院“质量工程”资助,在此表示诚挚的感谢。在本书编写过程中,编者力求融入自己的实验教学心得,建立新的教学体系,希望对学生的食品检测职业技能提高有所帮助。

由于编者学识水平和经验有限,书中难免存在疏漏之处,敬请读者批评指正。

编 者

2016年1月

目 录

模块一 现代光谱分析技术在食品检测中的应用	(1)
项目一 紫外-可见分光光度法	(1)
实训一 肉制品中亚硝酸盐的测定	(10)
实训二 发芽豆类中 β -半乳糖苷酶(乳糖酶)活力的检测	(13)
实训三 两种蛋白酶活力测定方法的比较	(15)
实训四 紫外-可见分光光度法测定二元混合物含量	(18)
实训五 双波长等吸收点法测定银杏果仁中直链淀粉和支链淀粉含量	(20)
项目二 原子吸收分光光度法	(23)
实训一 石墨炉原子吸收法检测水中的铜含量	(29)
实训二 石墨炉原子吸收法检测大米中的镉含量	(30)
实训三 火焰原子吸收法检测奶粉中的钙和镁含量	(33)
实训四 冷原子吸收法检测水中的汞含量	(35)
项目三 荧光分光光度法	(37)
实训一 分子荧光法检测果蔬中的核黄素含量	(40)
实训二 原子荧光法检测茶叶中的硒含量	(42)
模块二 现代色谱分析技术在食品检测中的应用	(45)
项目一 气相色谱技术	(46)
实训一 检测条件对气相色谱图的影响	(51)
实训二 气相色谱法检测白酒中的甲醇含量	(53)
实训三 气相色谱法检测蔬菜中的有机磷农药残留量	(55)
实训四 顶空气相色谱法检测生活用水中的三氯甲烷和四氯化碳含量	(58)
项目二 高效液相色谱技术	(60)
实训一 高效液相色谱条件优化	(64)
实训二 高效液相色谱法检测茶叶中的儿茶素类物质含量	(66)
实训三 高效液相色谱法检测蜂蜜中的果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖含量	(68)
实训四 高效液相色谱法检测水产品中的孔雀石绿和结晶紫残留量	(70)
项目三 毛细管电泳技术	(73)
实训一 高效毛细管电泳法检测酱油中的山梨酸含量	(75)
实训二 毛细管电泳-安培检测法测定苦荞茶中的芦丁含量	(76)

模块三 质谱及联用技术在食品检测中的应用	(79)
项目一 质谱分析技术	(79)
实训 发霉食品中某毒素质谱图解析	(83)
项目二 气质联用技术	(84)
实训一 气质联用技术检测果酒中的香气成分	(87)
实训二 气质联用技术检测饮料中的塑化剂 DEHP	(88)
项目三 液质联用技术	(90)
实训 高效液相色谱串联质谱法检测奶粉中的三聚氰胺含量	(91)
模块四 分子生物学技术在食品检测中的应用	(94)
项目一 PCR 检测技术	(94)
实训一 PCR 快速检测牛奶中的痢疾志贺菌	(96)
实训二 多重 PCR 检测转基因大豆	(98)
实训三 转基因玉米的实时荧光定量 PCR 检测	(100)
项目二 核酸探针检测技术	(102)
实训一 PCR 法制备标记探针	(105)
实训二 原位杂交法鉴定产不耐热肠毒素大肠杆菌	(107)
项目三 生物芯片技术	(108)
实训 基因芯片筛选转基因作物及其产品	(110)
模块五 免疫检测技术在食品检测中的应用	(115)
项目一 荧光免疫技术	(115)
实训 荧光免疫技术检测食品中的沙门氏菌	(117)
项目二 酶联免疫吸附技术	(119)
实训一 酶联免疫吸附技术检测食品中的产肠毒素大肠埃希氏菌	(124)
实训二 酶联免疫吸附技术检测蜂蜜中的四环素族抗生素残留量	(127)
项目三 放射免疫分析技术	(129)
实训 放射免疫分析技术检测鱼肉中的磺胺类药物残留	(131)
项目四 胶体金免疫层析技术	(133)
实训 豆瓣曲中黄曲霉毒素的快速测定	(136)
模块六 无损检测新技术在食品检测中的应用	(138)
项目一 近红外光谱分析技术	(138)
实训一 近红外光谱技术分析大米的常见成分	(141)
实训二 乳品成分分析仪的使用	(143)
项目二 计算机视觉技术	(145)
实训一 计算机视觉技术分析彩色图像颜色特征	(146)
实训二 计算机视觉技术分析图像尺寸和形状特征	(148)

项目三 人工嗅觉技术和人工味觉技术·····	(149)
实训一 电子鼻对猪肉新鲜度的分析·····	(151)
实训二 电子鼻检测数据与果汁中菌落总数的相关性分析·····	(153)
实训三 电子舌区分白酒产品·····	(154)
项目四 力学无损检测技术·····	(156)
实训 利用冲击振动检测西瓜成熟度装置的设计·····	(157)
项目五 声学检测技术·····	(158)
实训 鸡蛋声音信号采集及特性分析·····	(158)
项目六 电学检测技术·····	(160)
实训一 利用谷物电特性检测水分含量·····	(161)
实训二 利用电特性无损检测苹果品质·····	(163)
参考文献·····	(166)

模块一 现代光谱分析技术在食品检测中的应用

光谱是指复色光经过色散系统(如棱镜、光栅)分光后,按波长(或频率)的大小依次排列的图案。例如,太阳光经过三棱镜后形成按红、橙、黄、绿、蓝、靛、紫次序连续分布的彩色光谱。红色到紫色,对应波长 380~780 nm 的区域,是肉眼所能觉察的可见部分。红色端之外为波长更长的红外光,紫色端之外则为波长更短的紫外光,都不能为肉眼所觉察,但能用仪器观测。

光谱分析技术是指利用物质与光作用时,物质内部发生量子化能级跃迁而产生的吸收、发射或散射、辐射等光的强度随波长变化的定性、定量分析技术,属于光学分析技术的一部分。非光谱分析技术是指利用物质与光的相互作用测定光的反射、折射、干涉、衍射和偏振等基本性质变化的分析技术。光谱分析技术和非光谱分析技术之间的差异主要在于物质内部能级是否发生变化。

根据分析原理,光谱分析可分为发射光谱分析与吸收光谱分析;根据被测成分的形态,光谱分析可分为原子光谱分析与分子光谱分析;根据波长区域,光谱分析可分为红外光谱分析、可见光谱分析和紫外光谱分析。

现代食品检测中常用的光谱分析技术包括紫外-可见分光光度法、原子吸收分光光度法、荧光分光光度法、红外光谱分析及近红外光谱分析技术。其中,前面三种光谱分析技术均主要用于物质的定量分析,在定性分析上最多只能作为辅助分析方法,所以在食品检测中多用于已知物质的定量分析。红外光谱分析技术则多用于物质的定性分析,在食品常规检测中应用较少,对未知物质的结构分析较为有用;近红外光谱分析技术则在现代无损检测中应用广泛。因此,将近红外光谱分析技术放在模块六中介绍,本模块主要介绍紫外-可见分光光度法、原子吸收分光光度法和荧光分光光度法。

项目一 紫外-可见分光光度法

知识链接

1. 紫外-可见分光光度法简介

(1) 紫外-可见分光光度法及吸收曲线

紫外-可见分光光度法是指根据物质分子对波长为 200~800 nm 的电磁波的吸收特性所建立起来的一种定性、定量分析方法。

定性分析的主要依据是紫外-可见吸收曲线,也称吸收光谱。

紫外-可见吸收曲线是描述物质分子对辐射吸收的程度随波长变化而变化的函数关系曲线。纵坐标是吸光度,横坐标是波长,如图 1-1 所示。

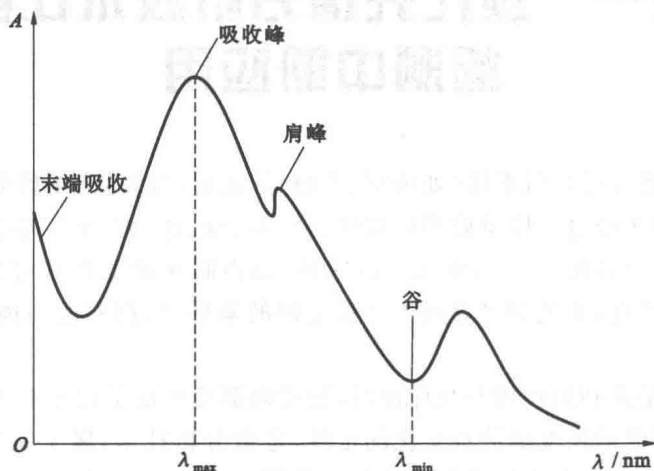


图 1-1 紫外-可见吸收曲线示意图

紫外-可见吸收曲线上每点的数据来源于不同波长或能量的外来辐射作用于待测物质运动的分子外层电子,如果该物质的分子外层电子的能量间隔差正好与外来辐射的能量相同,则会吸收外来辐射而发生电子能级跃迁,此过程使外来辐射强度减弱,产生吸光度。不同物质的结构不同,或者说其分子能级的能量(各种能级能量总和)或能量间隔各异,因此不同物质将选择性地吸收不同波长或能量的外来辐射,使其产生不同的紫外-可见吸收曲线。因此,紫外-可见吸收曲线上的 λ_{\max} 、 λ_{\min} 、肩峰及整个吸收光谱的形状取决于物质的性质,其特征随物质结构而异,所以紫外-可见吸收曲线是物质定性分析的一个依据。特别是紫外吸收曲线,可以通过解吸反映出物质的一些结构特征,对有机物的定性分析帮助很大。但是,有机化合物紫外吸收光谱只能反映结构中生色团和助色团的特性,不完全反映分子特性;紫外吸收光谱只有 2~3 个较宽的吸收峰,具有相同生色团的不同分子结构,有时在较大分子中不影响生色团的紫外吸收峰,导致不同分子结构产生相同的紫外吸收光谱,即紫外吸收光谱相同或相似,两种化合物有时不一定相同。例如,胆甾酮与异亚丙基丙酮分子结构差异很大,但两者却具有相似的紫外吸收峰(图 1-2),因为两种分子中相同的 O—C—C—C 共轭结构是产生紫外吸收的关键基团。

综上所述,紫外吸收曲线可以用于物质的定性分析,但只能起辅助解析的作用,不能完全依靠紫外吸收曲线对物质定性。

(2) 紫外-可见分光光度法定量分析基础

紫外-可见分光光度法对物质定量分析的基础是朗伯-比尔定律和吸光度加和性。

朗伯-比尔定律是光吸收的基本定律,它的含义是当一束发光强度为 I_0 的单体光通过浓度为 C 、厚度为 L 的溶液时,溶液对光的吸光度与溶液浓度及液层厚度成正比,即:

$$A = KLC$$

式中 A ——吸光度;

K ——吸收系数,也常用摩尔吸收系数 ϵ 表示;

L ——光通过的液层厚度;

C ——待测物浓度。

根据朗伯-比尔定律,如果在同一条件下测定同一物质不同浓度的溶液,则 K 为常数, L 也为固定值,待测物浓度与吸光度成正比关系,即 $A-C$ 曲线应为通过原点的直线。但是,在实际工作中直线常常发生弯曲,这称为朗伯-比尔定律的偏离,如图 1-3 所示。

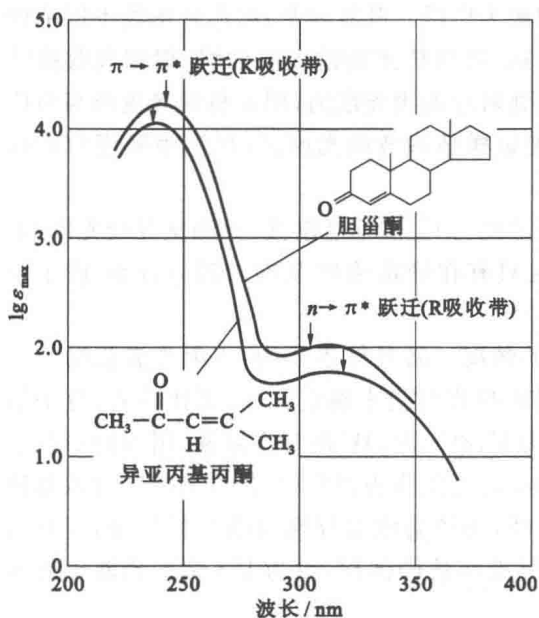


图 1-2 胆甾酮和异亚丙基丙酮的紫外吸收曲线

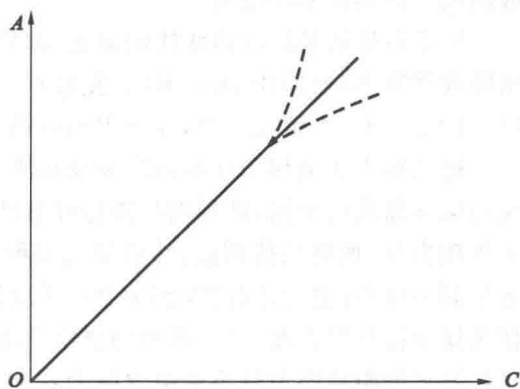


图 1-3 朗伯-比尔定律的偏离

导致朗伯-比尔定律偏离的原因很多,但归纳起来主要的原因如下。

① 吸光物质浓度过高。因为浓度高时,吸光粒子间的平均距离减小,受粒子间电荷分布相互作用的影响,其摩尔吸收系数发生改变,导致朗伯-比尔定律偏离。因此,在紫外-可见分光光度法中应用朗伯-比尔定律进行定量分析时需要注意待测物质浓度的合适范围,若浓度太大,则需要稀释后测定。

② 非单色光引起。严格来说,朗伯-比尔定律只适用于单色光。但由于仪器分辨能力有限,入射光实际为波段很窄的谱带。又由于分光光度计分光系统中的色散元件分光能力差,即在工作波长附近或多或少含有其他杂色光,杂色光(非吸收光)也会对朗伯-比尔定律产生影响,导致其偏离。

③ 介质不均匀性。朗伯-比尔定律是适用于均匀、非散射溶液的一般规律,如果被测试液不均匀,是胶体溶液、乳浊液或悬浮液,则入射光通过溶液后,除了一部分被待测物质吸收,还会有反射、散射使光损失,导致透光率减小,使实际测量吸光度增大,从而导致标准曲线偏离直线,向吸光度轴弯曲,造成对朗伯-比尔定律的偏离。

④ 吸光物质不稳定。离解、缔合、生成络合物或溶剂化等会造成朗伯-比尔定律的偏离。其中离解是导致朗伯-比尔定律偏离的主要化学因素。溶液浓度一旦改变,离解程度也

会发生变化,吸光度与浓度的比例关系便发生变化,导致朗伯-比尔定律偏离。

吸光度加和性是指在多组分共存的溶液体系中,体系的总吸光度等于各组分吸光度之和,在任意波长下,共存的多组分中各组分遵守朗伯-比尔定律。这是多组分定量分析的基础。

(3) 紫外-可见分光光度法定量分析方法

如果溶液体系中的待测物质为单组分,则其定量分析方法可以用标准曲线法、标准对比法、标准加入法等。

标准曲线法适用于测定大批量待测物,应用最为广泛。其步骤是:配制待测物不同浓度的标准溶液;取其中一份标准溶液通过全波段扫描,得到待测物的吸收曲线;根据吸收曲线特征选择入射波长;测定各标准溶液在入射波长处对应的吸光度值;用所得吸光度值与对应的浓度作 A-C 标准曲线;在选定的入射波长处测定样品溶液吸光度值;根据吸光度值在标准曲线上得到待测物浓度。

标准对比法是标准曲线法的简化,即只配制浓度为 C_s 的标准溶液,并测量其吸光度,求出吸收系数 K ,然后由 $A_x = KC_x$ 求出 C_x 。该法只有在测定浓度范围内遵守朗伯-比尔定律,且 C_x 与 C_s 大致相当时,才可得到准确结果。

标准加入法适用于样品批次少及基质复杂的情况。其具体步骤为:入射光波长确定方法与标准曲线法相同,即根据扫描标准溶液得到的吸收曲线来确定;取 4 支比色管,分别加入体积为 V_0 的样品待测液;然后加入体积分别为 V 、 $2V$ 、 $3V$ 、 $4V$ 的标准溶液;用相同溶剂定容至同一体积;混匀,测定得到 4 个吸光度值;用吸光度值作为纵坐标,标准溶液的加入体积作为横坐标作散点图,以 4 点画趋势线并连成直线,将该直线延伸到与横坐标相交,交点到坐标原点的距离即为待测液中的待测物相当于标准溶液的体积,设为 V_p ,则待测液中待测物浓度按如下公式计算:

$$C = \frac{V_p C_s}{V_0}$$

式中 C ——待测液中待测物浓度, mol/L;

V_p ——待测液中的待测物相当于标准溶液的体积, mL;

C_s ——标准溶液浓度, mol/L;

V_0 ——比色管中加入的样品待测液的体积, mL。

如果溶液体系中的待测物质为双组分,可能存在以下情况:双组分的最大吸收波长不重叠且相互不干扰时,可以按两个单一组分处理;双组分在各自的最大吸收波长处相互干扰,则其定量分析要利用吸光度的加和性,解联立方程组来求得。

比如溶液中含有 x 、 y 两个组分,要用紫外-可见分光光度法测定其含量,具体的操作方法如下:首先分别扫描 x 、 y 两个组分的标准溶液得到吸收曲线,分别在 x 、 y 两个组分的最大吸收波长 λ_1 和 λ_2 处测定 x 组分的系列标准溶液和 y 组分的系列标准溶液的吸光度值,作 A-C 标准曲线,强制过坐标原点,可求得摩尔吸收系数 $\epsilon_{\lambda_1}^x$ 、 $\epsilon_{\lambda_1}^y$ 、 $\epsilon_{\lambda_2}^x$ 、 $\epsilon_{\lambda_2}^y$,然后分别在 λ_1 和 λ_2 处测得待测溶液的吸光度值,代入以下方程组即可求得 x 和 y 两个组分的浓度。

$$\begin{cases} A_{\lambda_1}^{\text{总}} = \epsilon_{\lambda_1}^x LC_x + \epsilon_{\lambda_1}^y LC_y \\ A_{\lambda_2}^{\text{总}} = \epsilon_{\lambda_2}^x LC_x + \epsilon_{\lambda_2}^y LC_y \end{cases}$$

式中 $A_{\lambda_1}^x$ ——在 λ_1 处测得待测溶液的吸光度值；

$\epsilon_{\lambda_1}^x, \epsilon_{\lambda_1}^y, \epsilon_{\lambda_2}^x, \epsilon_{\lambda_2}^y$ ——x 组分和 y 组分分别在 λ_1 和 λ_2 波长下的摩尔吸收系数；

L ——光通过的液层厚度, mm；

C_x ——待测液中 x 组分的浓度, mol/L；

C_y ——待测液中 y 组分的浓度, mol/L。

除上述解联立方程组的方法外, 双波长等吸收点法也可用于双组分混合溶液的测定。其具体做法如下。

① 分别配制 x、y 两个组分的标准溶液。

② 波长对的确定。分别扫描 x、y 两个组分的标准溶液, 得到各自的吸收曲线, 再分别在各自的吸收峰处垂直于横坐标作竖线, 以其相交于另一吸收曲线的点平行于横坐标作横线, 确定测定组分 x 的波长对(λ_1, λ_2)和测定组分 y 的波长对(λ_3, λ_4), 如图 1-4 所示。

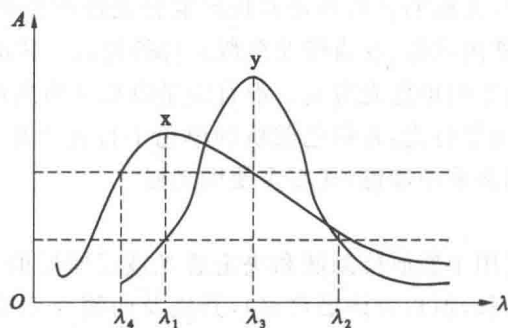


图 1-4 作图法确定测定双组分波长对示意图

③ 建立回归方程。在 λ_1 和 λ_2 处测定组分 x 系列标准溶液的吸光度值, 以吸光度差值 ΔA_x 对标准溶液浓度进行一元线性回归, 得组分 x 的回归方程; 同理, 在 λ_3, λ_4 处测定组分 y 系列标准溶液的吸光度值, 以吸光度差值 ΔA_y 对标准溶液浓度进行一元线性回归, 得组分 y 的回归方程。

④ 样品测定和计算。在 $\lambda_1, \lambda_2, \lambda_3, \lambda_4$ 处测定待测液吸光度值, $\Delta A_{\text{样-x}}$ 为 λ_1 和 λ_2 处测得的吸光度值之差, $\Delta A_{\text{样-y}}$ 为 λ_3 和 λ_4 处测得的吸光度值之差。然后将 $\Delta A_{\text{样-x}}$ 和 $\Delta A_{\text{样-y}}$ 分别代入 x、y 两个组分的回归方程即可求得待测液中 x 和 y 两个组分的浓度。

2. 紫外-可见分光光度计简介

(1) 紫外-可见分光光度计的构成

紫外-可见分光光度计主要由光源、单色器、吸收池、检测器、信号指示系统等几个部分组成。

① 光源。

对光源的基本要求是应在仪器操作所需的光谱区域内能够发射连续辐射, 有足够的辐射强度和良好的稳定性, 而且辐射能量随波长的变化应尽可能小。分光光度计中常用的光源有热辐射光源和气体放电光源两类。热辐射光源用于可见光区, 如钨丝灯和卤钨灯; 气体放电光源用于紫外光区, 如氢灯和氘灯。

钨丝灯和卤钨灯可使用的波长范围为 340~2500 nm。这类光源的辐射能量与施加的

外加电压有关,在可见光区,辐射的能量与工作电压的4次方成正比。光电流也与灯丝电压的 n 次方($n>1$)成正比。因此必须严格控制灯丝电压,仪器必须备有稳压装置。

在近紫外区测定时常用氢灯和氘灯。它们可在160~375 nm波长范围内产生连续光源。氘灯的灯管内充有氢的同位素氘,它是紫外光区应用最广泛的一种光源,其光谱分布与氢灯类似,但光强度比相同功率的氢灯要大3~5倍。

分光光度计的光源决定仪器到底是紫外分光光度计还是可见分光光度计,或者是紫外-可见分光光度计。紫外分光光度计配备的光源是能发射150~400 nm波长电磁辐射的氢灯、氘灯或汞灯,其中以氘灯最为常用;可见分光光度计配备的光源是能发射340~2500 nm波长电磁辐射的碘钨灯或钨灯;紫外-可见分光光度计则是指既配备了紫外光源又配备了可见光源的分光光度计,可提供190~900 nm波长范围内的入射光。

② 单色器。

单色器的作用是将来自光源的含有各种波长的复合光按波长顺序色散,并从中分离出所需波长的单色光。单色器由狭缝、准直镜及色散元件等组成。狭缝为光的进出口,包括入射狭缝和出射狭缝,其直接影响单色光带宽。准直镜是以狭缝为焦点的聚焦镜,其作用是将进入色散元件的发散光变成平行光,并将色散后的单色平行光聚集于出光狭缝。常用的色散元件有棱镜和光栅,早期多采用棱镜,现在多使用光栅。

③ 吸收池。

吸收池也称比色皿,是用于盛放待测液和决定透光液层厚度的器件。吸收池一般为长方体(也有圆鼓形或其他形状,但长方体最普遍),其底及两侧为毛玻璃,另两面为光学透光面。根据光学透光面的材质,吸收池有玻璃吸收池和石英吸收池两种。玻璃吸收池由于对紫外光有吸收,不能用于紫外光区测定,只能用于可见光区测定。石英吸收池则在紫外光区和可见光区都可使用,但因为其价格高,所以一般在可见光区测定时仍用玻璃吸收池。吸收池的规格一般是以光程为标志的,常用的吸收池规格有0.5 cm、1.0 cm、2.0 cm、3.0 cm、5.0 cm等。

由于一般商品吸收池的光程精度往往不是很高,与其标示值有微小误差,即使是同一个厂出品的相同规格的吸收池也不一定能够完全互换使用。因此,仪器出厂前吸收池都经过检验配套,在使用时不应混淆其配套关系。实际工作中,如果要用到两个或两个以上的吸收池,为了消除误差,在测量前还必须对吸收池进行配套性检验,即在相同条件下用不同吸收池盛装相同溶液,测得的吸光度值差异越小越好。

④ 检测器。

检测器的功能是检测光信号,并将光信号转变成电信号。简易分光光度计上使用光电池或光电管作为检测器。目前最常见的检测器是光电倍增管,有的用二极管阵列作为检测器。二极管阵列检测器不使用出口狭缝,在其位置上放一系列二极管的线形阵列,分光后不同波长的单色光同时被检测。二极管阵列检测器的特点是响应速度快,但灵敏度不如光电倍增管。

⑤ 信号指示系统。

信号指示系统的作用是放大信号并以适当方式指示信号或将信号记录下来。常用的信号

指示装置有直读检流计、电位调节指零装置及数字显示或自动记录装置等。很多型号的分光光度计配有微处理机,一方面可对分光光度计进行操作控制,另一方面可进行数据处理。

(2) 紫外-可见分光光度计的类型

从 1945 年美国贝克曼库尔特公司推出世界上第一台成熟的紫外-可见分光光度计商品仪器开始,目前市面上已有多种不同的紫外-可见分光光度计销售,国际上一般按照仪器结构将其分为单光束、双光束和双波长三类。下面简单介绍这几类紫外-可见分光光度计之间的主要区别和各自的特点。

① 单光束紫外-可见分光光度计。

顾名思义,单光束紫外-可见分光光度计只有一束单色光入射到样品上,通过样品后经过一个检测器检测,如图 1-5 所示。

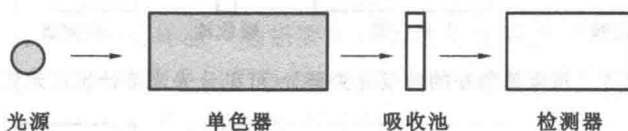


图 1-5 单光束紫外-可见分光光度计组成示意图

单光束紫外-可见分光光度计是最早发展的一类紫外-可见分光光度计,国外的 DU70、PU8700 等及我国生产的 721、722、723、727、751、752、753、754 等紫外-可见分光光度计都是传统的单光束仪器,它们属于低档仪器。其结构简单、价格便宜,但因其杂散光、光源波动、电子学的噪声等都不能抵消,技术指标较差,所以这类单光束紫外-可见分光光度计的光度准确度差,分析误差较大。一些对光度要求较高的制药行业、质量检验行业、科研行业等不宜选用这些传统的单光束紫外-可见分光光度计。目前,通过在光源单色性、分光系统的分辨率、微处理机技术与计算机联机等方面的深入研究,市面上有一些单光束紫外-可见分光光度计不仅在仪器的性能指标上得到了提高,还实现了仪器自动调零功能,同时具有了以往单光束紫外-可见分光光度计不能实现的定量测定、时间扫描及光谱扫描等应用功能。

② 双光束紫外-可见分光光度计。

广义的双光束紫外-可见分光光度计就是有两束光从单色器中出来的紫外-可见分光光度计,其又可根据两束光是否都通过吸收池而区分为真正的双光束紫外-可见分光光度计和准双光束紫外-可见分光光度计。

真正的双光束紫外-可见分光光度计是两束单色光通过两只不同的比色皿,然后由检测器检测。检测器可以是两只光电转换器检测,也可以是一只光电转换器检测,但目前国内外的双光束紫外-可见分光光度计中绝大多数都是一只光电转换器的仪器,特别是高档双光束紫外-可见分光光度计,都是一只光电转换器的仪器,其组成如图 1-6 所示。

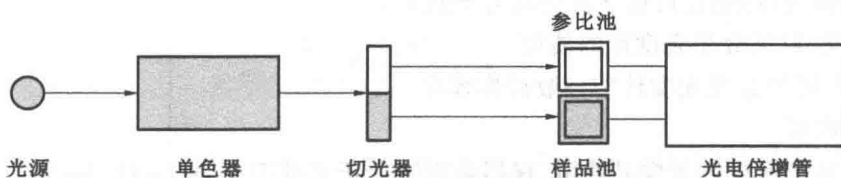


图 1-6 一只光电转换器的双光束紫外-可见分光光度计

准双光束紫外-可见分光光度计是有两束光,但只有一只比色皿的紫外-可见分光光度计。其中,一束光通过比色皿,另一束光不通过比色皿。不通过比色皿的那束光,主要起抵消光源波动对分析误差影响的作用。准双光束紫外-可见分光光度计有两种类型:一种是两束单色光、一只比色皿、两只光电转换器(图 1-7);另一种是一束单色光、一束复合光、一只比色皿、两只光电转换器(图 1-8)。以上两种类型的准双光束紫外-可见分光光度计以两束单色光者居多,我国企业目前正在生产的 TU-1800、TU-1800S、TU-1800PC、TU-1800SPC、UV-762、UV-1600 等紫外-可见分光光度计都属于这种类型的仪器。

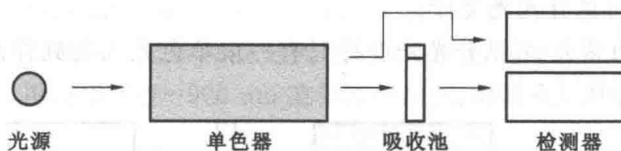


图 1-7 两束单色光的准双光束紫外-可见分光光度计组成示意图

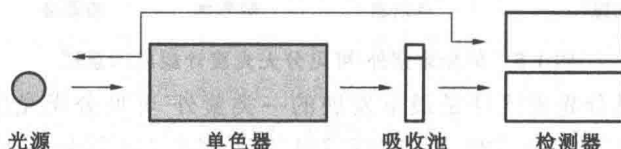


图 1-8 一束单色光、一束复合光的准双光束紫外-可见分光光度计组成示意图

③ 双波长紫外-可见分光光度计。

双波长紫外-可见分光光度计的组成如图 1-9 所示。

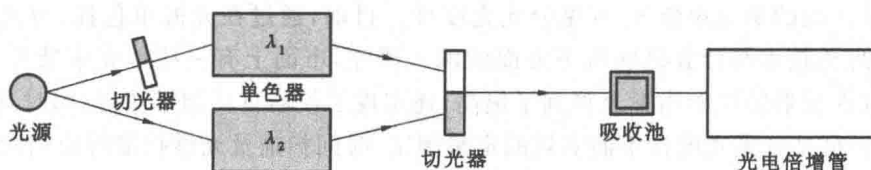


图 1-9 双波长紫外-可见分光光度计组成示意图

由同一光源发出的光被分成两束,分别经过两个单色器,得到两束不同波长(λ_1 和 λ_2) 的单色光;利用切光器使两束光以一定的频率交替照射同一吸收池,然后经过光电倍增管和电子控制系统,最后由显示器显示出两个波长处的吸光度差值 ΔA ($\Delta A = A_{\lambda_1} - A_{\lambda_2}$)。对于多组分混合物、浑浊样品(如生物组织液)分析,以及存在背景干扰或共存组分吸收干扰的情况下,利用双波长分光光度法往往能提高方法的灵敏度和选择性。双波长分光光度计通过光学系统转换能很方便地转化为单波长工作方式。如果能在 λ_1 和 λ_2 处分别记录吸光度随时间变化的曲线,还能进行化学反应动力学研究。

(3) 紫外-可见分光光度计的使用

① 紫外-可见分光光度计的一般操作程序。

a. 开启电源。

在检查样品室内有无样品遗留、仪器是否处于正常状态基础上,接通电源,仪器自动进入初始化状态,开始自检和自动挤线校正等。

b. 调试仪器,设置测试方式。

自检完成后,根据测试需要,结合仪器特点和状态,对仪器进行调试,并设置测试方式。

c. 测量样品。

确保仪器进入正常工作状态后,根据测试需要对样品进行测量。

d. 记录测量结果。

对测量结果进行记录、保存、打印等处理。

e. 关机。

测试完毕后,取出样品室内的吸收池,关机,并填写使用记录。

② 紫外-可见分光光度计检测时的条件设置。

a. 溶剂的选择。

紫外-可见分光光度计分析样品一般需要将样品制备成溶液,即要使用一些溶剂来溶解待测物质。所使用的溶剂需要满足以下条件:能完全溶解样品;在所用的波长范围内有较好的透光性;纯度为“光谱纯”或经检验其空白符合规定。

在实际应用过程中,很多溶剂需要经过处理才能使用,如蒸馏水需要去除气泡,乙醇要去除醛类、苯等杂质,环己烷、正己烷要去除苯,乙醚要去除过氧化物等。

b. 检测波长的选择。

进行定量分析时往往需要测定物质在某一波长条件下的吸光度,根据吸光度与物质含量的关系进行定量。检测波长的选择可以根据文献报道进行,也可以用待测物的标准品配制溶液扫描吸收曲线,根据吸收曲线的具体情况进行选择。根据文献报道选择检测波长时,要注意自己处理样品的方法,特别是使用的溶剂和文献一致才可采用其检测波长。自己扫描待测物的吸收曲线来选择检测波长更为准确,在吸收曲线上选择不易有其他物质干扰的、较高的和较宽的吸收峰处的波长作为检测波长。例如,核黄素在 200~600 nm 波长范围内有 4 个吸收峰(图 1-10),定量分析中常选择 444 nm 波长,因为虽然在 265 nm 波长处吸收强度最大,但它偏向短波长区,易受样品溶液中杂质的干扰,另外,由于 265 nm 波长处吸收峰形状尖窄,不宜选作检测波长;444 nm 波长处吸收峰值虽然不是最大,但该峰符合不易有其他物质干扰、较高、较宽的特点,虽然其灵敏度差些,但杂质干扰少。

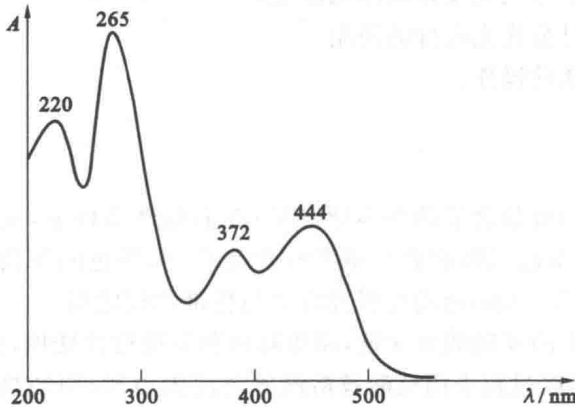


图 1-10 核黄素的吸收曲线

c. 参比溶液的选择。

在分光光度测定中常使用参比溶液,其作用不仅是调节仪器的零点,还可以消除由于比色杯、溶剂、试剂、样品基底和其他组分对于入射光的反射和吸收所带来的影响。因此,正确选用参比溶液,对提高分析的正确性有重要的作用。选择参比溶液的一般原则如下。

(a) 溶剂参比:试样组成简单、共存组分少(基体干扰少)、显色剂不吸收时,直接采用溶剂(多为蒸馏水)作为参比。

(b) 试剂参比:当显色剂或其他试剂在测定波长处有吸收时,采用试剂作为参比(不加待测物)。

(c) 试样参比:如在测定波长处显色剂无吸收而试样基体有吸收,且试样基体不与显色剂反应时,可以试样作为参比(不能加显色剂)。

(d) 褪色参比:显色剂和被测试样均有颜色,则在一份试液中先加掩蔽剂,再按测定方法加入显色剂等其他试剂作为参比。

d. 吸光度读数范围的选择。

在分光光度测定中吸光度读数在 0.16~0.80 范围内可以使浓度测定的相对误差最小。在实际工作中,如果待测液的吸光度读数不在上述范围内,可以通过改变被测液的浓度,或改变比色杯的厚度,或改变入射光的波长来调整。

e. 显色反应条件的选择。

在需要加入显色剂进行显色反应的可见分光光度法中,显色剂用量、溶液酸度、显色温度、显色时间等因素都会影响显色反应的进行,进而影响测定结果的准确性。如果建立一种新的方法,这些条件的最佳值需要通过试验来确定。

应用实训

实训一 肉制品中亚硝酸盐的测定

一、实训目标

- ① 掌握比色法测定亚硝酸盐的原理。
- ② 熟悉单光束可见分光光度计的结构组成。
- ③ 训练单光束可见分光光度计的使用。
- ④ 训练标准曲线法的操作。

二、实训内容

(1) 知识要点准备

① 比色法测定亚硝酸盐含量的基本原理是:在弱酸性条件下,亚硝酸盐与对氨基苯磺酸重氮化后,再与盐酸萘乙二胺耦合生成紫红色化合物,颜色的深浅与亚硝酸盐含量成正比,其最大吸收波长为 538 nm,可测定吸光度并与标准比较定量。

② 要测定肉制品中的亚硝酸盐含量,需要对肉制品进行预处理,预处理方法是:将肉制品绞碎,取样,在热水提取过程中用硫酸锌溶液等沉淀蛋白质,用加热等方法使脂肪上浮除去,提取水相过滤液即得到亚硝酸盐样品提取液。