

微弱发光技术在农产品检测中的应用研究进展

李富军, 张新华

(山东理工大学轻工与农业工程学院, 淄博 255049)

摘要: 微弱发光分析技术灵敏度高、操作简单, 作为一门新兴的技术已受到普遍关注。该文综述了近年来国内外微弱发光分析技术在农产品检测中的应用研究现状、微弱发光的检测原理和检测系统, 指出了该方法在农产品检测的应用中需要解决的问题, 并在此基础上指出探索生物微弱发光的机制, 寻找更优良的发光试剂及新的发光体系, 多功能光子检测系统的开发及光子信号分析模型的建立是今后主要的研究方向。

关键词: 微弱发光; 农产品; 检测; 研究进展

中图分类号: TS207; O432.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6819(2006)12-0260-05

李富军, 张新华. 微弱发光技术在农产品检测中的应用研究进展[J]. 农业工程学报, 2006, 22(12): 260-264.

Li Fujun, Zhang Xinhua. Application and research advances of low luminescence technology in detection of agricultural products[J]. Transactions of the CSAE, 2006, 22(12): 260-264. (in Chinese with English abstract)

0 引言

微弱发光是指光信号的功率在 10^{-10} W 以下的发光, 其中功率在 10^{-15} W 以下的光信号称之为超微弱发光^[1]。目前在农产品检测中研究比较多的微弱发光技术包括化学发光和生物发光^[2,3]。化学发光是物质分子通过化学反应吸收反应体系放出的能量, 从基态跃迁到激发态, 由激发态回到基态发生光辐射的现象^[4]。国内对化学发光分析的研究起步于 20 世纪 60 年代, 90 年代达到高峰, 主要工作是检测无机物和无机离子。近年来, 化学发光与流动注射技术相结合使化学发光分析技术广泛地应用于生物、医药、农业、食品等科学领域^[5-8]。

生物发光是发生于生物活体中的一种超微弱发光, 是自然界中的一种普遍现象, 其与生物系统的氧化代谢、细胞的分裂和死亡、光合作用以及生长的调控等许多基本的生命过程有着内在的联系^[9-12]。所以通过检测生物系统的超微弱发光可以较早的了解生物机体的生理和病理状态。随着现代光子计数技术的发展, 此项技术已开始应用于医学、农业以及生命科学等领域。

微弱发光分析技术与传统的检测方法相比具有费用低、灵敏度高、操作简便、检验速度快等优点。目前, 虽然微弱发光分析技术在农业中的应用还不广泛, 但作为一种极其灵敏的检测手段已成为农产品检测的重要发展方向^[13-15]。本文对近几年微弱发光技术在农产品检测方面的应用研究进展做了概述, 分析其在应用中存在的问题, 并对今后的发展提出一些看法。

1 微弱发光检测原理与检测系统

一般弱光的测量属于模拟量的情况: 多光子同时入

射到光电倍增管阴极, 阴极也同时释放出许多光电子, 光电倍增管输出的不是离散脉冲信号而是模拟量——电压或电流。在这种一般弱光检测中, 可以用锁相技术和取样积分技术从噪声中提取信号。

在超微弱光的情况下, 光信号明显表现出光的量子性, 入射到光电倍增管的光是一个个不连续的光子, 光电倍增管输出的电信号是一个个离散脉冲信号。在这种情况下, 无法使用锁相技术和取样积分技术。锁相技术是靠压缩带宽的方法来滤去噪声的, 而现在信号也是宽频谱甚至信号与噪声具有同样宽的频谱, 这时锁相放大器便无能为力了。同样在取样积分技术中, 由于模拟积分电路存在漂移, 使积分时间受到限制, 而对这种极微弱的光又需要进行长时间的积累, 所以取样积分技术也不适合使用。因此必须使用背景噪声极低和探测灵敏度极高的光电探测仪器才能进行有效的探测。微弱发光测量原理就是将发光的生物或化学样品置于黑暗的环境中, 用灵敏度极高的光探测器接收来自样品的微弱光, 将其转换成电信号, 再用电路放大, 用微机分析处理, 从而获得样品系统的发光信息^[16]。

目前, 用于微弱发光的探测仪器按照结构和性能可以归为两大类: 一类是以光电倍增管为主的光子计数探测系统, 可提供微弱发光总强度的时域信息; 另一类是以微通道板像增强器为主的超微弱发光图像探测系统, 具有二维光子计数成像功能, 可同时获得检测样品微弱发光强度的时间和空间信息^[16]。

1.1 光子计数探测系统

光子计数技术通过分辨单个光子在光电倍增管中激发出来的光电子脉冲, 把光信号从噪声中以数字化的方式提取出来, 因此具有极高的探测灵敏度、分辨率和长时间稳定性。目前, 光子计数器已广泛应用于多种领域中微弱光、超微弱光的研究和分析测试工作。

图 1 是同步单光子计数探测系统结构简图。样品放在样品池中, 小盒放在暗室里, 彩色滤光片用来选择性地让样品发射的某些光通过, 斩波器(遮光片)用来分隔

收稿日期: 2005-08-22 修订日期: 2006-05-05

基金项目: 山东理工大学博士基金(404008)

作者简介: 李富军(1977-), 男, 山东潍坊人, 博士, 副教授, 主要从事农产品贮藏、检测与微弱发光的研究。淄博 山东理工大学轻工与农业工程学院, 255049。Email: lifujun@sdut.edu.cn

由光电倍增管本底噪声引起的暗计数率和由信号引起的真实计数率, 以便实现噪声自动滤除, 这样可大大提高测量系统的信噪比和灵敏度。由光电倍增管输出的脉冲经三级快脉冲放大器放大, 用恒比定时甄别器将小于单光子脉冲的噪声小脉冲过滤掉, 再送入计算机进行数据分析和记录。

微弱发光的测定主要是基于光电倍增管的检测方法, 共有测量输出电流(DC 法)、测量输出电流中的交流成分(AC 法)、单光子计数(SPC 法)和同步单光子计数(SSPC 法)等四种方法, 其优越性为 DC 法 < AC 法 < SPC 法 < SSPC 法, 现在常用的主要是后两种。目前光电倍增管是唯一适合在光子计数方法中使用的光信号探测器件, 其响应时间短、灵敏度高, 能够输出适合光子计数的离散脉冲信号。

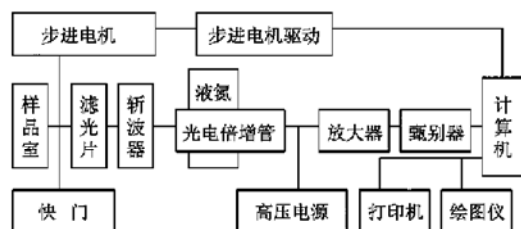


图 1 同步单光子计数探测系统示意图

Fig. 1 Schematic diagram of simultaneous single photon counting detecting system

1.2 超微弱发光图像探测系统

超高灵敏度的弱光图像探测是 20 世纪 80 年代末发展起来的一项高技术, 目前只有少数发达国家将这种超高灵敏度的图像探测器应用于生物超微弱发光的研究中。最近国内采用微通道板像增强器研制出具有较高灵敏度的光电探测系统, 该系统主要由样品暗箱、变焦物镜、光纤微通道板像增强器、等倍中继透镜、制冷电荷耦合元件(Charge Coupled Device, CCD)探测器以及计算机控制系统所组成(系统装置如图 2 所示)。生物样品经过变焦物镜成像后通过像增强器的光放大, 在出射荧光屏上的图像由中继透镜投射在制冷 CCD 探测器像面上, 再经数据采集系统进入计算机图像处理, 利用计算机软件和数据采集系统以及电子快门实现实时记录, 可

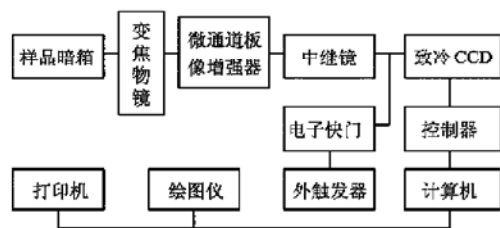


图 2 超微弱发光图像探测系统示意图

Fig. 2 Schematic diagram of ultraweak luminescent image detecting system

获得样品超微弱发光强度的二维和三维分布, 任意发光点的坐标和发光强度以及图像任意某一截面的光强分布等。由于被探测的信号极其微弱, 要求探测系统必须

具有极高的灵敏度和非常低的噪声。一般通过像面增益修正、背景噪声扣除并结合图像处理等技术, 可提高测量系统的成像质量, 使所获得的微弱发光图像具有较低的噪声和较高的空间分辨率。

2 微弱发光技术在农产品检测中的应用进展

2.1 食品新鲜度的检测

超弱发光是活体生物的一种生物物理现象, 是生命活动状况的一种反映, 它提供了有机体代谢及能量转化的重要信息。研究表明, 这种发光可以通过对生物大分子、细胞、亚细胞组份或生物活体、器官及体液的直接测量探测出来^[9, 17]。例如, 有研究表明苹果、桃等果实在采后贮藏过程中, 超弱发光的变化能反映果实成熟过程中代谢的变化, 所以, 其可用于检测果实的品质变化和成熟状况^[18, 19]。

2.2 种子活力与抗性的检测

种子超弱发光强度的高低能在一定程度上反映种子活力的大小。Chen 等观测到水稻种子吸胀初期超弱发光强度与其老化程度呈负相关, 水稻种子贮藏时间越长, 萌发率越低, 发光强度越弱^[20, 21]。用超弱发光鉴定种子的活力, 样品量少又不破坏种子, 对于种子量少的珍贵品种极其有益。

植物的超弱发光与环境密切相关, 在不同植物、不同的环境条件下超弱发光均有所不同。所以, 人们试图用超弱发光来检测不同品种农作物的抗盐碱、抗旱、抗热、抗寒乃至抗病性大小^[22, 23]。这方面的研究已取得了可喜的进展。研究表明, 对于同一植物, 不同抗性的种子的超弱发光各有一定的变化范围, 在此范围内, 一般抗性越强, 发光值越高^[24, 25]。根据各种植物材料在环境胁迫下的超弱发光值进行比较, 可将它们对逆境胁迫的抗性进行排序。利用植物本身的超弱发光表现来筛选不同抗性的品种, 可为品种抗性的评价提供一种简便、快捷、灵敏的物理方法。

2.3 食品中抗氧化成分的检测

由超弱发光研究发展起来的化学发光检测技术, 在发光增强剂或发光抑制剂存在的情况下, 与流动注射相结合, 可广泛应用于食品中抗氧化成分的检测。如, 在碱性条件下, 银杏黄酮对 H_2O_2 -鲁米诺体系有显著的抑制作用, 银杏黄酮质量浓度在 0.2~20.0 $\mu g/mL$ 范围与相对发光强度呈线性关系。依据此原理可测定银杏提取物中的银杏黄酮的含量^[26]。其它的一些存在于水果、蔬菜中的抗氧化成分如番茄中的类胡萝卜素等可分别利用不同的发光体系, 结合流动注射技术建立高灵敏的检测技术^[27]。这对食品分析、生物的研究具有十分重要的意义。

2.4 重金属与农药残留的检测

利用某些有机物、无机物以及金属离子对鲁米诺化学发光反应的增强或抑制作用可以用测定果蔬、谷物等农作物及其加工制品中的农药残留及某些金属离子的含量。例, 基于铝置换 $Fe(II)$ -EDTA(乙二胺四乙酸)配合物中 $Fe(II)$, 可与鲁米诺- O_2 反应体系产生化学发光

而建立的置换偶合反应流动注射化学发光法,用来检测大米、面粉以及玉米面中铝的含量具有较好效果^[28]。Sarter 等指出化学发光法也是测定毒枝菌素对食品与动物饲料污染程度的良好方法之一^[29]。

2.5 辐照食品的检测

食品辐照时,高能射线在食品中进行能量传递,引起电离和激发,产生自由基等,使食品贮存了部分辐射能量。这些能量释放出来时会引起微弱发光。用加热的方法,则称热致发光;用加水的方法,光以短脉冲的形式放射出来,称化学发光^[30]。目前,热致发光分析法已被成功地用于检测 20 多种辐照过的调味品,因为食品调料中污染的矿物质与热致发光有关,热致发光分析也可能应用于田间作物的检测,如蔬菜、水果、谷物等,因为它们都含有某些矿物质^[30]。张世民等发现干燥蔗糖在测量过程中加水会产生超微弱发光峰,且发光量与辐照剂量密切相关^[31]。根据此原理可有效地检测辐照后含蔗糖的食品。

3 微弱发光技术应用中需解决的问题

3.1 温度控制

温度对于微弱发光强度有明显的影响。在一定的范围内,发光强度会随着温度的变化而变化^[1]。室内温度升高,也容易引起测定样品温度的升高,从而导致发光强度的变化。在测试仪器的反应池四周应配备冷却套或恒温装置。

3.2 消除光致发光与伴生元素的影响

超弱发光通常包括光致发光和自发发光,但光致发光比自发发光强得多,因此在测试蛋类、植物的果实、种子等生物的超弱发光时,必须消除光致发光的影响。消除光致发光有多种方法,通常是测量前暗避光处理,测量时避光。暗避光时间的长短,因试材而异。

化学发光法测定金属元素虽然灵敏度高,但最大弱点是选择性差,与其共存的其它元素,存在着不同程度的增强或抑制发光的信号^[32,33]。为了提高方法的选择性、灵敏度和实用性,除选用掩蔽剂外,合成和寻找新的选择性高的有机发光剂是提高化学发光选择性的一个研究方向。

3.3 发光试剂与发光体系的选择

金属元素催化不同的化学反应发光体系,产生的化学反应发光强度随反应介质的性质和酸度(pH 值)的变化呈明显的增强或减弱。例在鲁米诺-SF-H₂O₂-Cu(II) 体系中,分别选用 H₃BO₃-KOH 及 NH₃·H₂O-NH₄Cl 溶液配制不同 pH 值的缓冲溶液,结果表明,选择 H₃BO₃-KOH 缓冲体系,控制 pH 值为 12.0 时,发光强度最^[32]。选择最佳反应介质溶液及适当的 pH 值是获得较大发光信号的必不可少的因素。另外,为了提高体系反应的灵敏度和选择性,常加入一些增敏剂^[34]。所以,为提高化学发光分析方法的选择性,需选择优良的发光试剂、发光体系及合适的辅助试剂。

3.4 明确检测对象的存在状态

植物感染疾病、逆境胁迫、辐射等处理时,都会导致

超弱发光值的变化^[24,35]。而用化学发光法测定某些金属离子时,金属离子在溶液中的存在形态、介质溶液和酸度的变化等对催化发光影响较大。如化学发光测定铜时,常用的有 Cu(NO₃)₂、CuSO₄、CuCl₂、Cu₃(PO₄)₂ 等形态,其中以磷酸铜的催化活性最弱^[32]。

3.5 确定试剂浓度与加入顺序

化学发光法测定样品时,参与反应的各种试剂浓度对发光强度有影响。试剂浓度低时,发光信号也较弱;随着溶液浓度增加,发光强度增大,当浓度增加到一定范围时,发光达到峰值后反而下降,大于或小于该浓度体系发光强度都会减弱^[32,33]。可见,加入试剂的浓度无规律可循,但它对测定的影响较大,所以应该通过试验选择最佳浓度范围。当选择适当的试剂溶液浓度后,应考虑试剂加入反应池中的顺序。所用试剂加入的先后顺序不同,获得的化学发光信号的强弱也各不相同。在鲁米诺-H₂O₂-Cr(III) 体系应以鲁米诺溶液、H₂O₂ 溶液于反应池内混匀,再加入 Cr(III) 溶液,可得到较大的化学发光信号,其他加入顺序均不会达到较大的发光信号^[33]。

3.6 生物微弱发光信息的分析技术

从量子学的角度看,微弱发光的光子统计应该包含着丰富的生物学信息^[36]。如何通过微弱发光的光子统计测量获得有实用价值的生物学信息是一个尚待解决的重要的理论和实际问题。例如关于农作物抗逆性研究中,目前仅限于发光与农作物抗逆性之间定性关系的研究,没有量化。每种作物都应测量尽可能多的不同抗逆性的品种,然后在发光指标与抗逆性之间建立定量关系,即数学模型。有了这样的模型,对于一个抗逆性未知的样品,只要测出它的发光指标,即可得出其抗逆性大小。另外,将微弱发光与其它检测技术,特别是当前最热门的微型化测定装置相结合,并将研究思维从传统的无机、有机、分析化学拓展到生物化学、分子生物学乃至机械装置动力学和计算机科学,无疑会给这一灵敏的检测技术带来更广阔的应用前景。

4 结 语

微弱发光技术与传统的农产品检测技术相比具有灵敏度高、速度快、简便等特点。对于一个有生命的个体(如果蔬、蛋类等)是结合生命有机体的生物物理和生物化学过程,检测的对象是处于环境中的生物,提供的是一个综合的整体指标,因此对其质量的评价比传统的检验方法更迅速、更准确。微弱发光与流动注射技术相结合而产生的化学发光技术,又为农产品检测开辟了一种新型有效的自动微量分析技术。进一步加强微弱发光信号分析技术的研究,寻找更适宜的发光体系,会使其在农产品领域中的应用范围越来越广。

[参 考 文 献]

- [1] Abeles F B. Plant chemiluminescence[J]. Ann Rev Plant Physiol, 1986, 37: 49- 72.
- [2] Triglia A, Lamalfa G, Musumeci F, et al. Delayed luminescence as an indicator of tomato fruit quality[J].

- Journal of Food Science, 1998, 63(3): 512– 515.
- [3] 范顺利, 李薇, 张磊, 等. 流动注射化学发光法测定氧乐果[J]. 分析实验室, 2005, 24(1): 14– 17.
- [4] Cilento G, Adam W. Photochemistry and Photobiology without light[J]. Photochem Photobiol, 1988, 48(3): 361– 368.
- [5] Liu W, Zhang ZH J, Liu H SH. Droplet-based micro-flow chemiluminescence system for in vivo glucose determination by microdialysis sampling[J]. Analytical Sciences, 2005, 21(2): 413– 416.
- [6] 朱粉霞, 杨德玉, 张小燕, 等. 流动注射化学发光法测定食品营养添加剂中铅[J]. 食品科学, 2003, 24(8): 119– 121.
- [7] Wang Z, Zhang Z, Fu Z, et al. Flow injection chemiluminescence detection for studying protein binding of terbutaline sulfate with on-line microdialysis sampling[J]. J Pharm Biomed Anal, 2003, 33(4): 765– 773.
- [8] Pan J, Huang Y M. Chemiluminescence Determination of Phentolamine Based on Potassium Permanganate Sensitized by Formaldehyde[J]. Analytical Letters, 2004, 37(11): 2321– 2335.
- [9] Yan Y, Popp F A, Rothe G M. Correlation between germination capacity and biophoton emission of barley seeds (*Hordeum vulgare L.*) [J]. Seed Science and Techn, 2003, 31(2): 249– 258.
- [10] Maccarrone M, Fantini C, Agro A F, et al. Kinetics of ultraweak light emission from human erythroleukemia K562 cells upon electroporation[J]. Biochim Biophys Acta, 1998, 1414(1– 2): 43– 50.
- [11] Bajpai R P. Coherent nature of the radiation emitted in delayed luminescence of leaves [J]. J Theor Biology, 1999, 198(3): 287– 299.
- [12] Triglia A, Musumeci F, Scordino A. The spontaneous ultraweak luminescence of living systems[J]. Riv Biol, 1997, 90(2): 267– 80.
- [13] 李光浩, 田文杰, 李立源, 等. 流动注射化学发光法分析食品中的Vc[J]. 福州大学学报(自然科学版), 1999, 27(增刊): 41– 42.
- [14] 赵红霞, 张守勤, 周丰昆, 等. 鸡蛋超弱发光与其新鲜程度的相关分析[J]. 农业工程学报, 2004, 20(2): 177– 180.
- [15] 徐树来. 不同成熟期番茄及其储藏过程中超弱发光特性的研究[J]. 食品科学, 2005, 26(9): 539– 541.
- [16] 张仲伦. 微弱发光分析技术原理及应用实例(一)[J]. 生物化学与生物物理进展, 1999, 26(3): 100– 101.
- [17] Tudisco S, Scordino A, Privitera G, et al. ARETUSA— advanced research equipment for fast ultraweak luminescence analysis: new developments[J]. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A 2004, 518(1): 463– 464.
- [18] 张新华, 李富军, 杨洪强, 等. 苹果成熟过程中超弱发光强度与果实跃变的关系[J]. 农业机械学报, 2004, 35(6): 215– 217.
- [19] 张新华, 杨洪强, 李富军. 肥城佛桃果实软化过程中的超弱发光及其与乙烯释放的关系[J]. 植物生理与分子生物学报, 2003, 29(4): 353– 356.
- [20] Chen W L, Xing D, He Y H. Rapid determination of rice seed vigor by ultraweak chemiluminescence during early imbibition [J]. Journal of Plant Physiology and Molecular Biology, 2002, 28(5): 357– 362.
- [21] Chen W L, Xing D, He Y H. Determination the vigor of rice seed with different degrees of aging with ultraweak chemiluminescence during early imbibition [J]. Acta Botanica Sinica, 2002, 44(11): 1376– 1379.
- [22] 张新华, 杨洪强. 植物的超微弱发光[J]. 山东农业大学学报, 2003, 34(4): 605– 608.
- [23] Lilius E M, Marnila P. Photon emission of phagocytes in relation to stress and disease[J]. Experientia, 1992, 48(12): 1082– 1091.
- [24] Ohya T, Yoshida S, Kawabata R, et al. Biophoton emission due to drought injury in red beans: Possibility of early detection of drought injury[J]. Jpn J Appl Phys, 2002, 41(7): 4766– 4771.
- [25] 张新华, 杨洪强, 李富军. 水分胁迫下苹果幼苗超弱发光及一些生理特性的变化[J]. 西北植物学报, 2004, 24(4): 720– 724.
- [26] 上官小东, 郎惠云. H₂O₂-Luminol 流动注射- 抑制化学发光法测定银杏黄酮[J]. 分析实验室, 2004, 23(11): 10– 13.
- [27] 田云, 卢向阳, 易克, 等. 化学发光法检测番茄提取物清除自由基的能力[J]. 生命科学仪器, 2003, 6: 15– 16.
- [28] 李卫华, 张楠楠, 王国强. 偶合反应流动注射化学发光法测定铝[J]. 黑龙江医药科学, 2003, 26(2): 29– 30.
- [29] Sarter S, Zakhia N. Chemiluminescent and bioluminescent assays as innovative prospects for mycotoxin determination in food and feed[J]. Luminescence, 2004, 19(6): 345– 351.
- [30] Heide L, Bogl K W. Detection methods for irradiated food luminescence and viscosity measurements[J]. Int J Radiat Biol, 1990, 57(1): 201– 219.
- [31] 张世民, 傅俊杰, 包劲松. 超微弱发光分析法在辐照糖类检测中的应用(I) [J]. 核农学报, 2003, 17(3): 231– 232.
- [32] 王莉平, 李绍卿. 化学发光法测定铜的进展[J]. 长安大学学报(建筑与环境科学版), 2003, 20(4): 75– 78.
- [33] 李绍卿, 刘洪敏, 高小红, 等. 化学发光法测定铬的进展[J]. 分析测试技术与仪, 2003, 9(3): 141– 146.
- [34] Yoshinaga T, Tanaka Y, Ichimura T, et al. Solid surface enhancement effects on chemiluminescence II. Diaryloxalate and polymers as media solids[J]. Journal of Luminescence, 1998, 78(3): 221– 229.
- [35] Chen W L, Xing D, Tan S C, et al. Imaging of ultraweak bio-chemiluminescence and singlet oxygen generation in germination soybean in response to wounding[J]. Luminescence, 2003, 18(1): 37– 41.
- [36] Kobayashi M, Inaba H. Photon statistics and correlation analysis of ultraweak light originating from living organisms for extraction of biological information[J]. Applied Optics, 2000, 39(1): 183– 192.

Application and research advances of low luminescence technology in detection of agricultural products

Li Fujun, Zhang Xinhua

(School of Agriculture and Light Industry Engineering, Shandong University of Technology, Zibo 255049, China)

Abstract: As a new technology, the low luminescence has received comprehensive attention for the advantages of high sensitivity and simplicity. This paper reviews the research and application advances of the low luminescence technology in the detection of agricultural products. Meanwhile, the detecting principles and systems are introduced. The problems existing in the application of detecting agricultural products were reviewed and analyzed in this paper. Furthermore, it is pointed out that the research and development on the mechanisms of low bioluminescence, the better luminescence reagents and systems, the multifunctional photon-detecting system and the establishment analytical models for photonic signals may be the developmental trend carried out in the future.

Key words: low luminescence; agricultural products; detection; research advances