

牛奶水溶液荧光光谱影响因素的研究

顾春峰¹ 兰秀凤¹ 于银山¹ 卢礼萍²

(¹ 南京航空航天大学理学院, 江苏 南京 211106; ² 南京农业大学理学院, 江苏 南京 210095)

摘要 研究了纯牛奶、高钙奶、高钙低脂奶和过期约 10 天的纯牛奶水溶液的三维荧光光谱特征。实验结果表明, 牛奶水溶液的荧光峰随着激发波长的增长而红移; 当激发波长大于 340 nm 时, 荧光光谱上出现次级荧光峰, 且该峰也随激发波长的增加而红移。通过对比研究发现, 牛奶的浓度对牛奶水溶液荧光光谱的影响不大, 而牛奶品种对其荧光光谱影响较大, 尤其是高钙低脂奶。过期的牛奶水溶液在较长或者较短波长激发光激励下, 荧光峰强度高于未过期的同类牛奶。初步分析了在一定激发波长下高钙低脂奶、过期牛奶的荧光强度比其他样品荧光强度强的原因。研究结果可为利用荧光光谱技术检测牛奶品质提供参考。

关键词 生物技术; 三维荧光光谱; 发射光谱; 牛奶水溶液

中图分类号 O433.4 **文献标识码** A **doi**: 10.3788/LOP49.031702

Research on Influencing Factors of Milk Aqueous Solution Fluorescence Spectrum

Gu Chunfeng¹ Lan Xiufeng¹ Yu Yinshan¹ Lu Liping²

(¹ College of Science, Nanjing University of Aeronautics and Astronautics, Nanjing, Jiangsu 211106, China)
(² College of Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, China)

Abstract Three-dimensional fluorescence spectra of pure milk, milk with high calcium, milk with high calcium and low fat, and pure milk expiring by about 10 days are researched. The experiment indicates that the fluorescence peak of milk aqueous solution shows red shift with the increase of stimulation wavelength. When the stimulation wavelength is longer than 340 nm, a secondary fluorescence peak appears in the fluorescence spectrum, and it also shows red shift with the increase of stimulation wavelength. By comparison it is found that the concentration has little effect on fluorescence spectrum of milk aqueous solution, while the species of milk has greater impact, especially the milk with high calcium and low fat. The reason why the fluorescence intensities of the milk with high calcium and low fat and the expired milk are stronger under certain stimulation wavelength is analyzed preliminary. The findings may provide reference when using the fluorescence spectrum to identify milk quality.

Key words Biotechnology; three-dimensional fluorescence spectrum; emission spectrum; milk aqueous solution

OCIS codes 170.6280; 300.6170; 300.6190

1 引言

牛奶作为一种历史悠久的天然饮品, 一直深受人们的喜爱。由于不同人群的年龄、体质有较大区别, 市场上随之出现了适应不同人群的各种牛奶, 如纯牛奶、高钙奶、高钙低脂奶等。牛奶的品质一直备受关注。

光谱分析法较传统化学分析法有采样方式灵活、测试速率高、分析速度较快等诸多优点^[1], 适合实时在线测定, 逐渐受到人们的青睐。利用光谱技术快速、准确地测定牛奶中的成分和品质也得到了不断的探索和研究^[2]。目前采用荧光光谱法^[3]和近红外光谱法^[4]检测牛奶中的三聚氰胺都已有报道。利用红外光谱技术定量测定牛奶成分已经研究得比较多^[5,6], 且从数据预处理^[7]、分析到后期的建模预测^[8,9]都已有较深入的

收稿日期: 2011-07-15; **收到修改稿日期**: 2011-08-31

基金项目: 国家自然科学基金青年基金(11004103)和瞬态光学与光子技术国家重点实验室项目(SKLST201004)资助课题。

作者简介: 顾春峰(1987—), 男, 硕士研究生, 主要从事光与生物大分子相互作用方面的研究。

E-mail: guchunfeng@163.com

导师简介: 兰秀凤(1976—), 女, 博士, 副教授, 硕士生导师, 主要从事生物医学光子学方面的研究。

E-mail: orchidxf@yahoo.com.cn(通信联系人)

研究。但对于光谱上各荧光峰的产生原因及变化规律,报道并不多见。

自 20 世纪 60 年代以来,荧光技术由于其灵敏度高、选择性强、样品用量少、方法简单、能提供较多的物理参数等特点^[10,11],在分析行业中得到广泛的应用^[12,13],在生命科学领域可以利用荧光光谱技术研究^[14]、诊断^[15]、监测^[16]各种疾病。近年来已有研究指出鲜牛奶和酸牛奶的变质过程与荧光光谱联系密切^[17];含三聚氰胺的牛奶光谱也会有变化^[18]。但是,与人们生活密切相关的市售各品牌不同系列的牛奶,却未见对其进行荧光光谱的研究与分析。

本文采用荧光光谱法,对市售的纯牛奶、高钙奶、高钙低脂奶以及过期约 10 天的纯牛奶的水溶液进行了测试,比较了浓度、激发波长、牛奶种类等因素对光谱的影响,并简要分析了各光谱的特征及其形成的原因。

2 实验过程和方法

2.1 实验仪器

实验采用日立 F-4600 荧光光谱仪,光源为 150 W 氙灯,光源光谱范围为 200~750 nm,样品池为 10 mm 石英比色皿,激发狭缝 5 nm,发射狭缝 5 nm,扫描速度 1200 nm/min。激发波长为 280~360 nm,波长间隔为 1 nm;扫描范围为 380~520 nm,扫描波长间隔为 1 nm。

2.2 实验方法

实验样品选用市售国内某两种品牌(A 和 B)的纯牛奶、高钙奶、高钙低脂奶以及在实验室存放至过期约 10 天的品牌 A 纯牛奶。实验中用微量移液器向 5 mL 去离子水中分别加入 0.20、0.29 mL 的牛奶样品,每种样品配置成 2 种不同浓度的牛奶水溶液。

2.3 实验数据预处理

实验结束后得到各种牛奶水溶液的三维荧光光谱,利用 Origin 8.0 软件,从三维荧光光谱中提取出指定激发波长下的发射光谱。首先对所得的二维荧光光谱数据进行快速傅里叶变换(FFT)低通滤波,再进行 5 点 Savitzky-Golay 平滑处理,取二阶导数后得到二阶导数光谱图,分辨出重叠的荧光峰。

3 实验结果与分析

3.1 激发波长对荧光光谱的影响

图 1 为 0.20 mL 品牌 A 纯牛奶的三维荧光光谱,光谱表面的线条为在波长不同的激励光激发下所对应的发射光谱。

从图 1 可以看出,激发光波长在 285 nm 左右时,发射光谱在 380 nm 左右有半个荧光峰(该荧光峰的位置小于 380 nm,在本实验所扫描的波长范围内可以看到一半),该峰随着激发波长的增加而减小直至消失,而其位置不随激发波长的增加而改变。该荧光峰由牛奶中的色氨酸产生。已有文献报道色氨酸的最大激发和发射波长分别为 281 nm 和 355 nm^[19]。在波长为 280 nm 的激发光激励下,三维荧光光谱上 380 nm 处的高峰是色氨酸的荧光峰。

当激发光波长大于 300 nm 时,首先发射光谱在 420 nm 左右出现一个荧光峰,该峰随着激发波长的增加而红移,且其强度也随着激发波长的增加而增强。在激发波长大于 340 nm 时,发射光谱上出现次级荧光峰,峰位随激发波长的增加而红移,强度也随着激发波长的增加而增强,此现象出现的物理机理还需进一步研究。

3.2 牛奶品种对荧光光谱的影响

图 2 为 0.20 mL 各种品牌 A 牛奶水溶液在波长为 325 nm 激发光激励下的二阶导数荧光光谱。

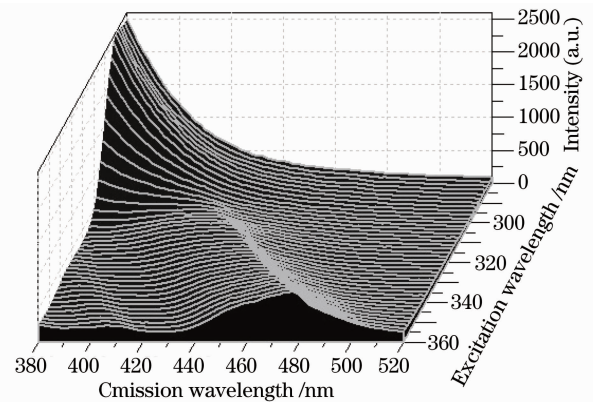


图 1 品牌 A 的纯牛奶三维荧光光谱
Fig. 1 Three-dimensional fluorescence spectra of pure milk A

由图 2 可知,在相同波长的激发光激励下,发射光谱上各个荧光峰的位置基本相同,说明各种牛奶中的发光基团基本一致,但由于发光团所处的环境不同,造成总光谱形状出现差别。

图 3 和图 4 分别是波长为 315、345 nm 激发光激励下的品牌 B 牛奶荧光光谱。通过比较可知,在相同波长的激发光激励下,各种牛奶发射光谱的荧光峰位置相同,说明各种牛奶发光的物理机理相同。在较短波长的激发光激励下,其荧光光谱基本相似;在较长波长的激发光激励下,高钙奶和纯牛奶的荧光光谱相似,而高钙低脂奶的荧光强度比前两种的荧光强度高。这是由于牛奶中的脂肪对荧光有散射作用^[20],且脂肪对长波长的荧光散射效果较明显,光的散射作用使得荧光在溶液中通过的光程较长,增加了被吸收的概率。在较短激发光激励下,发射的荧光波长较短,脂肪的散射作用不明显,所以在 315 nm 激发光下,三种牛奶样品的荧光光谱几乎重合。随着激发光波长的增加,样品发射荧光的波长增加,脂肪的散射作用较明显,使得纯牛奶、高钙奶荧光峰强度弱于高钙低脂奶。

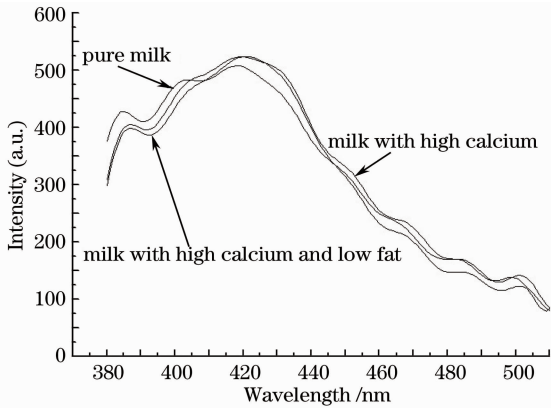


图 3 波长为 315 nm 激发光激励下的品牌 B 的牛奶荧光光谱

Fig. 3 Fluorescence spectra of milk B excited by light with wavelength of 315 nm

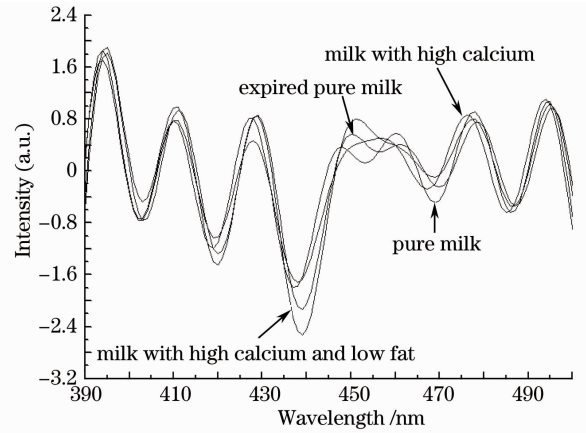


图 2 品牌 A 的牛奶水溶液的二阶导数荧光光谱
Fig. 2 Second derivative fluorescence spectra of milk A aqueous solutions

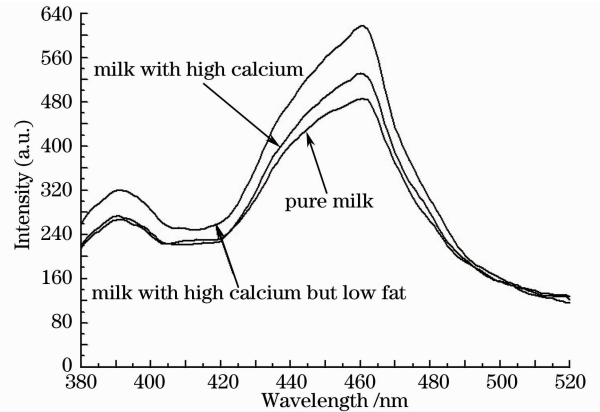


图 4 波长为 345 nm 激发光激励下的品牌 B 的牛奶荧光光谱

Fig. 4 Fluorescence spectra of milk B excited by light with wavelength of 345 nm

3.3 牛奶浓度对荧光光谱的影响

图 5(a), (b) 分别是 0.20、0.29 mL 的品牌 A 纯牛奶三维荧光光谱等高线,图 6(a), (b) 分别是 0.20、0.29 mL 的品牌 A 高钙奶三维荧光光谱等高线。

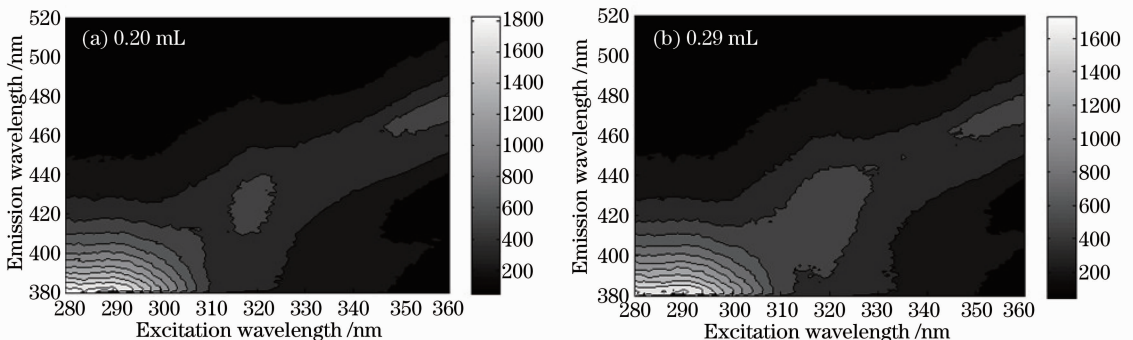


图 5 品牌 A 的纯牛奶三维荧光光谱等高线

Fig. 5 Three-dimensional fluorescence contour of pure milk A

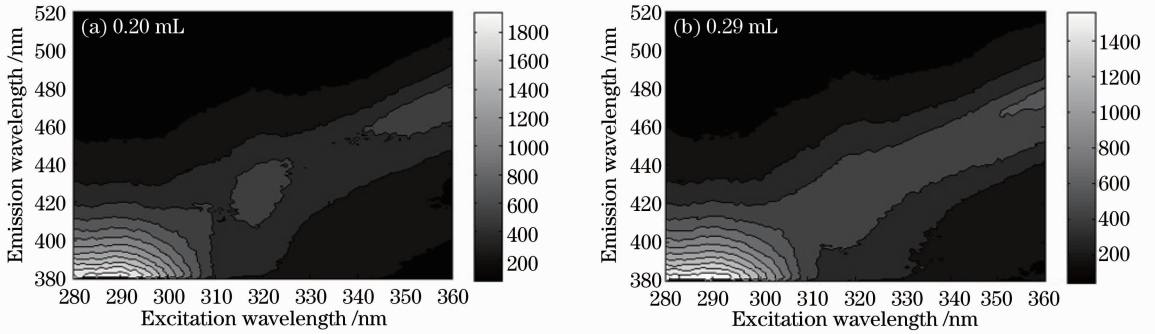


图6 品牌A的高钙奶三维荧光光谱等高线

Fig. 6 Three-dimensional fluorescence contour of milk with high calcium A

比较不同浓度的纯牛奶、高钙奶水溶液的三维荧光光谱等高线图,其等高线轮廓大致相同,说明浓度对三维荧光光谱的影响不大。但在波长为310~320 nm的激发光激励下,高浓度样品发射光谱上380~430 nm之间的荧光峰强度高于低浓度的样品,在其他激发波长下,不同浓度的样品,荧光强度大致相同。其原因在于溶液浓度的改变会引起发光团浓度的改变,发射的荧光强度也相应改变,但由于牛奶中的其他物质成分对荧光有灭作用,且这种灭作用对波长较长的光明显,因此当发光物质浓度、湮灭剂浓度同时增加或减少时,它们的联合作用导致原始光谱在380~430 nm波段光谱强度随溶液浓度的增加而增强,而其他波段的光谱强度没有明显变化。

3.4 过期牛奶与未过期牛奶荧光光谱差异

图7所示为过期10天左右和未过期的0.20 mL品牌A纯牛奶在波长为295、315、340、360 nm的激发光激励下的发射光谱。

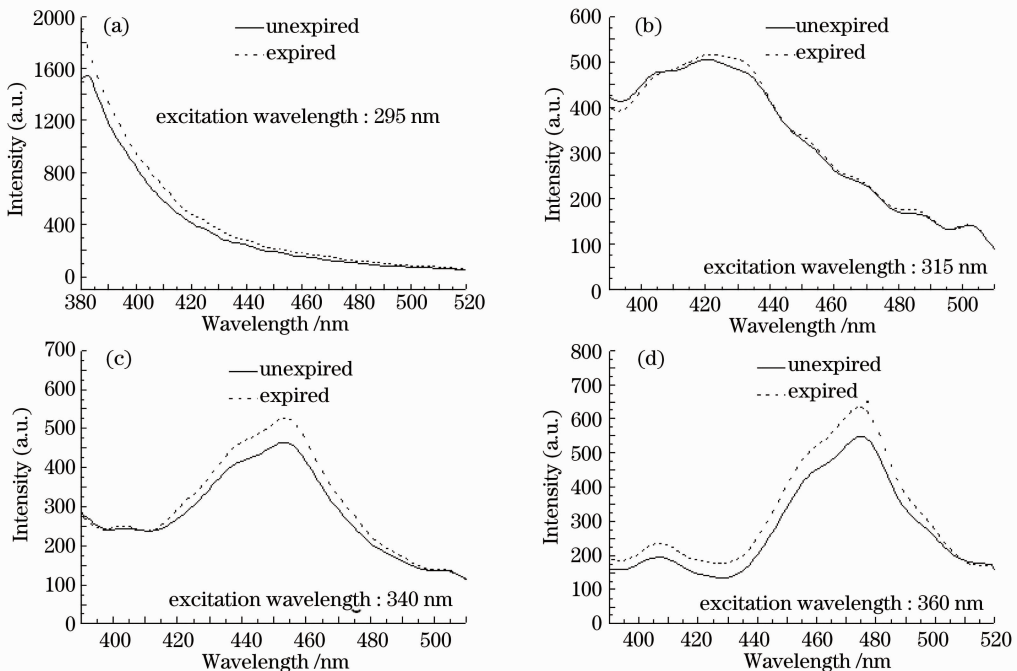


图7 过期与未过期的品牌A的纯牛奶荧光光谱

Fig. 7 Fluorescence of expired and unexpired pure milk A

通过比较各个发射光谱,可知在不同波长的激发光激励下,发射光谱荧光峰的位置一致,其变化规律也相同。在较短或者较长波长的激发光激励下,过期牛奶的荧光强度较大,而在310~325 nm波长的激发光激励下,这两种牛奶的荧光强度一致。这是由于牛奶过期后,其中所含的蛋白质、脂肪会分解,而蛋白质的分解产物中含有色氨酸,由上文的分析可知,在280 nm处的荧光峰是由色氨酸引起的。因为生色团的浓度增

加,所以对应的荧光峰强度也相应增强。当激发光波长增加至超过色氨酸的最大激发波长时,色氨酸对总荧光光谱的影响很小,所以在 310~325 nm 波长的激发光激励下,过期和未过期牛奶的荧光峰强度一致。而随着激发光波长继续增加,样品发射荧光的波长也增加,此时脂肪的散射作用开始影响总荧光,由于过期牛奶的脂肪含量有所下降,所以对荧光的散射作用较小,使得过期牛奶的荧光强度比未过期牛奶的高。

4 结 论

实验测得纯牛奶、高钙奶、高钙低脂奶、过期 10 天左右的纯牛奶水溶液的三维荧光光谱。结果表明发射光谱的峰位随激发波长的增加而红移。样品浓度对谱峰强度有不同程度的影响。高钙低脂奶在波长较长的激发光诱导下,荧光峰强度大于纯牛奶和高钙奶。过期牛奶水溶液在较长或者较短波长激发光激励下,荧光峰强度高于未过期的同类牛奶。结合荧光光谱特征变化进行了讨论并简要地分析了变化原因,但对于各谱峰产生的物理机制需结合生物化学知识做进一步的研究,以期为牛奶质量检测提供一种方便快捷的新技术。

参 考 文 献

- 1 邹 鑫. 近红外光谱分析法预测欧美杨材性的研究[M]. 北京:北京林业大学硕士论文, 2010
- 2 常 敏. 牛奶质量光学检测的作用机理及影响因素研究[M]. 天津:天津大学博士论文, 2008
- 3 Liu Jinyan, Liu Cuicui, Feng Pan. Determination of melamine in milk products by fluorimetry[J]. *Chinese J. Analysis Laboratory*, 2010, **29**(9): 26~28
刘金彦, 刘翠翠, 冯 攀. 荧光光谱法测定奶制品中的三聚氰胺[J]. *分析试验室*, 2010, **29**(9): 26~28
- 4 Xu Yun, Wang Yiming, Wu Jingzhu *et al.*. Detecting the melamine of pure milk by near infrared spectra[J]. *J. Infrared and Millimeter Waves*, 2010, **29**(1): 53~56
徐 云, 王一鸣, 吴静珠 等. 用近红外光谱检测牛奶中的三聚氰胺[J]. *红外与毫米波学报*, 2010, **29**(1): 53~56
- 5 Li Liang, Ding Wu. Discriminant analysis of raw milk adulterated with botanical filling material using near infrared spectroscopy[J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2010, **30**(5): 1238~1242
李 亮, 丁 武. 掺有植物性填充物牛奶的近红外光谱判别分析[J]. *光谱学与光谱分析*, 2010, **30**(5): 1238~1242
- 6 Pi Fuwei, Wang Yanling, Lu Chao *et al.*. Analysis and study in components of milk by CCD near infrared spectrometer[J]. *Modern Scientific Instruments*, 2006, (4): 32~34
皮付伟, 王燕岭, 鲁 超 等. CCD 短波近红外光谱仪测定牛奶成分的可行性研究[J]. *现代科学仪器*, 2006, (4): 32~34
- 7 Wang Shuo, Xu Kexin. Study of preprocessing of near infrared spectral data of milk constituent[J]. *Infrared*, 2006, **27**(11): 27~30
王 硕, 徐可欣. 牛奶成分近红外光谱数据的预处理研究[J]. *红外*, 2006, **27**(11): 27~30
- 8 A. Kulmyrzaev, E. Dufour. Determination of lactulose and furosine in milk using front-face fluorescence spectroscopy[J]. *Lait*, 2002, **82**(6): 725~735
- 9 Bi Weihong, Li Chao, Miao Yujie *et al.*. Quantitative analysis of milk protein content by near infrared spectroscopy[J]. *Measurement Technique*, 2005, (8): 34~36
毕卫红, 李 超, 苗玉洁 等. 利用近红外光谱技术对牛奶中蛋白质含量进行定量分析[J]. *计量技术*, 2005, (8): 34~36
- 10 Lan Xiufeng, Liu Ying, Liu Jianguang *et al.*. Fluorometric determination of ethanol solution[J]. *Acta Photonica Sinica*, 2003, **32**(11): 1371~1374
兰秀风, 刘 莹, 刘建刚 等. 乙醇溶液的荧光光谱研究[J]. *光子学报*, 2003, **32**(11): 1371~1374
- 11 许金钧, 王尊本. 荧光分析法[M]. 北京:科学出版社, 2006
- 12 Lan Xiufeng, Liu Ying, Zhu Tuo *et al.*. Spectroscopy analysis of total cholesterol in human serum[J]. *Acta Photonica Sinica*, 2008, **37**(3): 548~551
兰秀风, 刘 莹, 朱 拓 等. 人血清中总胆固醇的光谱学研究[J]. *光子学报*, 2008, **37**(3): 548~551
- 13 Li Rongqing, Liu Ying, Ge Lixin *et al.*. Study on blood cells disintegration by laser included fluorescence spectrometry[J]. *Acta Photonica Sinica*, 2006, **35**(3): 398~401
李荣青, 刘 莹, 葛立新 等. 激光诱导荧光光谱法研究血细胞衰变规律[J]. *光子学报*, 2006, **35**(3): 398~401
- 14 Li Jing, Zeng Hongjuan, Pang Xiaofeng. Study of autofluorescence spectrum between hepatic carcinoma cell and hepatic cell [J]. *Acta Optica Sinica*, 2009, **29**(8): 2261~2263
李 静, 曾红娟, 庞小峰. 肝癌细胞和正常肝细胞的自体荧光光谱研究[J]. *光学学报*, 2009, **29**(8): 2261~2263
- 15 Tang Jing, Liu Li, Li Songzhan. A new method of caries diagnosis based on fluorescence spectrum[J]. *Acta Optica Sinica*, 2009, **29**(2): 454~458
唐 静, 刘 莉, 李颂战. 基于荧光特征光谱的龋齿诊断新技术[J]. *光学学报*, 2009, **29**(2): 454~458

- 16 Wei Yanchun, Wu Baoyan, Yang Liyong *et al.*. Upconversion fluorescence monitoring near-infrared during tumor photothermal therapy[J]. *Chinese J. Lasers*, 2010, **37**(11): 2719~2724
魏言春, 吴宝艳, 杨利勇 等. 上转换荧光实时监测近红外实现肿瘤热疗[J]. 中国激光, 2010, **37**(11): 2719~2724
- 17 Liu Jie, Yu Changqing, Li Jiase *et al.*. Study on the deteriorating course of fresh milk by laser-induced fluorescence spectra [J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2001, **21**(6): 769~771
刘 杰, 于常青, 李家泽 等. 鲜牛奶变质过程的激光诱导荧光光谱研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2001, **21**(6): 769~771
- 18 Han Caiqin, Liu Ying, Zhao Wenyan *et al.*. Experimental research on fluorescence spectra of melamine solution[J]. *Acta Optica Sinica*, 2009, **29**(11): 3163~3167
韩彩芹, 刘 莹, 赵文艳 等. 三聚氰胺溶液的荧光光谱实验研究[J]. 光学学报, 2009, **29**(11): 3163~3167
- 19 Hou Dongyan, Hui Ruihua. Dual-wavelength fluorescence spectra of tryptophan and tyrosine[J]. *Analytical Laboratory*, 2001, **20**(6): 88~89
侯冬岩, 回瑞华. 色氨酸和酪氨酸的双波长荧光光谱的研究[J]. 分析实验室, 2001, **20**(6): 88~89
- 20 王惠英. 光散射技术及其在药物生物大分子分析中的应用研究[D]. 重庆: 西南大学博士论文, 2007