三种品牌牛奶的荧光光谱特性研究

殷文志[1,2,3]，王婷钰[1,3]，朱　拓[1,3]，马超群[1,3]，辜　姣[1,3]，
朱　纯[1,3]，李　磊[1,3]，陈国庆[1,3*]

1. 江南大学理学院，江苏 无锡　214122
2. 江南大学物联网工程学院，江苏 无锡　214122
3. 江苏省轻工光电工程技术研究中心，江苏 无锡　214122

摘　要　应用FLS920P型稳态和时间分辨荧光光谱仪，对三种品牌不同脂肪含量的纯牛奶和鲜奶(共9种)进行了荧光光谱的测量。9种牛奶样品的三维荧光光谱显示，牛奶的荧光峰值波长为349 nm左右，半高宽为66 nm左右，最佳激发波长为291 nm左右，平均寿命为4.6 ns左右，实验表明9种牛奶的荧光光谱除荧光强度外基本一致。实验测得酪蛋白溶液的荧光峰值波长为344 nm，半高宽为66 nm，最佳激发波长为295 nm，荧光寿命为4.1 ns。酪蛋白的荧光峰值波长和荧光寿命与牛奶基本一致，对比牛奶中其他荧光物质后，推断牛奶的主要荧光物质为酪蛋白。进一步探究9种牛奶荧光强度的差别，对比9种牛奶最佳激发波长下的荧光发射光谱，相同品牌的全脂牛奶荧光强度明显低于脱脂牛奶。对比全脂牛奶、脱脂牛奶和离心处理的全脂牛奶归一化后的荧光光谱，离心后的全脂牛奶荧光强度介于全脂和脱脂之间，离心使得脂肪减少，散射降低，从而导致荧光强度的增强。牛奶的荧光发射全谱显示全脂牛奶的瑞利散射强度明显高于脱脂牛奶，全脂牛奶的脂肪含量高，散射强，激发光入射全脂牛奶后更多地被散射，导致全脂牛奶的瑞利散射强度高于脱脂牛奶。光透过率曲线显示全脂牛奶的透过率都低于脱脂牛奶，入射光通过全脂牛奶时，除了一部分被酪蛋白吸收以外，还有一部分因脂肪的散射而损失，透过率减小，使得全脂牛奶的透过率都低于脱脂牛奶。使用荧光光谱技术在不进行预处理的情况下对牛奶进行检测，确定了牛奶的主要荧光物质，并对全脂牛奶和脱脂牛奶荧光强度存在差别的原因进行了解释。

关键词　牛奶；三维荧光光谱；时间分辨荧光光谱；酪蛋白；散射
中图分类号：O433.5　　**文献标识码**：A　　**DOI**：10.3964/j.issn.1000-0593(2021)02-0535-05

引　言

牛奶中富含蛋白质、脂肪、维生素和无机盐等多种人体需要的营养物质，其中蛋白质是最重要的营养成分之一，牛奶中的蛋白质可以为人体提供20多种氨基酸，其中有8种是人体不能合成的必需氨基酸，且消化率达到90%～100%[1-2]。目前，市场上牛奶的种类很多，质量参差不齐，一些不法商贩在牛奶中添加非法添加物或者掺假物，比如2008年的三聚氰胺事件和2011年的黄曲霉毒素M1超标事件[3]。诸多乳品安全事件的发生，快速准确的检测牛奶已势在必行[4-5]。

目前，国内外牛奶检测领域存在多种方法，比如：酶联免疫吸附法(ELISA)[6]和胶体金免疫层析法(CGIA)[7]是利用免疫学检测技术对牛奶进行检测，具有较高的灵敏度和特异性，但也存在预处理步骤较为繁琐和成本较高的问题；高效液相色谱法(HPLC)[8]、高效液相色谱-串联质谱法(HPLC-MS/MS)[9]和电感耦合等离子体质谱法(ICP-MS)[10]等仪器分析方法具有灵敏度高和精度高的优点，比较适合低浓度目标的检测，但仍存在预处理步骤较多和易受干扰的不足；近红外光谱法(NIR)[11]和拉曼光谱法(RS)[12]是使用光谱方法对目标进行分析检测，具有检测时间短和对目标分子破坏较小等优点，然而近红外光谱的灵敏度较低，拉曼光谱的强度较弱，限制了其应用范围。

收稿日期：2020-01-18，**修订日期**：2020-04-26
基金项目：国家重点研发计划项目(2018YFC1604204-3)，国家食品科学与工程一流学科建设项目(JUFSTR20180302)，2018年度江苏省研究生实践创新计划项目(SJCX18_0632)，国家自然科学基金项目(61378037)资助
作者简介：殷文志，1994年生，江南大学物联网工程学院博士研究生　　e-mail：1797211521@qq.com
*通讯作者　　e-mail：cgq2098@163.com

荧光光谱技术(FS)可以反映目标分子的特性，可对目标分子定性或定量检测。荧光光谱法具有选择性好、灵敏度高、操作简单和用样量少等优点，被应用于诸多复杂混合物体系的精确检测。

本文采用荧光光谱技术，对市场上的三种品牌的不同脂肪含量的纯牛奶(超高温灭菌奶)、鲜奶(巴氏杀菌奶)在不进行预处理的情况下进行测试，研究牛奶的荧光光谱，推断牛奶的主要荧光物质，并分析全脂牛奶和脱脂牛奶荧光光谱的异同及其原因，为牛奶的成分鉴别和混合物的光谱检测提供一定的帮助。

1 实验部分

1.1 仪器

实验采用英国 Edinburg 生产的 FLS920P 型稳态和时间分辨荧光光谱仪。

1.2 样品

实验所用三个品牌牛奶分别记为 A，B 和 C，牛奶的种类包括：全脂纯牛奶、脱脂纯牛奶、全脂鲜奶和脱脂鲜奶，共 9 种。实验所用酪蛋白(干酪素)为国药集团化学试剂有限公司提供。

1.3 方法

测量 9 种牛奶样品和酪蛋白溶液的三维荧光光谱，每次取 350 μL 牛奶样品移入石英微量比色皿中，激发波长范围为 250～450 nm，发射波长范围为 265～550 nm，激发波长步长为 5 nm，发射波长步长为 1 nm，激发和发射狭缝宽度均设置为 5 nm，积分时间为 0.1 s。

测量 9 种牛奶样品和酪蛋白溶液的时间分辨荧光光谱，以波长为 273.7 nm 脉冲光源激发，探测波长为 349 nm。

将全脂纯牛奶 C 以 12 000 r·min^{-1}的速度离心 15 min，去除上层脂肪后，将下层样品震荡 5 min，得到离心后的牛奶样品，测量其荧光发射光谱。

使用超纯水分别将 9 种牛奶稀释至 0.1%浓度，测量得到光透过率曲线。

2 结果与讨论

实验测得 9 种牛奶样品的三维荧光光谱，以品牌 C 为例，图 1(a)和图 1(b)分别为全脂纯牛奶 C 和脱脂纯牛奶 C 的三维荧光光谱，可以看出牛奶在紫外光激发下产生较强的荧光，二者的荧光光谱除荧光强度外基本一致。表 1 为 9 种牛奶的荧光光谱特征参数，峰值波长为 349 nm 左右，最大相差 5 nm，半高宽为 66 nm 左右，最佳激发波长为 291 nm 左右，最大相差 4 nm，表明 9 种牛奶的主要荧光物质是相同的。

牛奶主要由蛋白质、脂肪、碳水化合物和维生素等组成，实验表明脂肪(在牛奶中主要以脂肪球的形式存在)和碳水化合物没有荧光，维生素中的维生素 B2 和维生素 B6 的荧光峰值波长和最佳激发波长分别为 535 和 440 nm，395 和 325 nm。当激发波长为 291 nm 时，两种维生素的荧光较弱。牛奶中酪蛋白占蛋白质的 80%左右，在 300～400 nm 范围有较强的荧光。

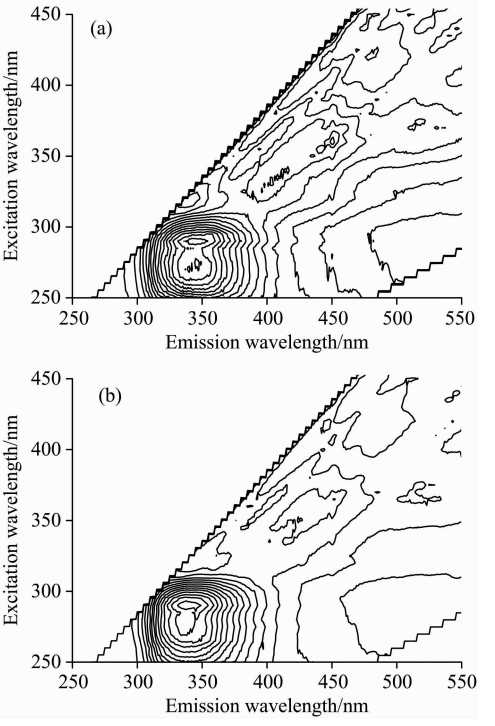

图 1 牛奶的三维荧光光谱

(a)：全脂纯牛奶 C；(b)：脱脂纯牛奶 C

Fig. 1 Three-dimensional fluorescence spectra of milk

(a)：Whole milk C；(b)：Skim milk C

表 1 牛奶的荧光光谱特征参数

Table 1 Fluorescence spectral characteristic parameters of milk

牛奶种类	峰值波长/nm	最佳激发波长/nm	半高宽/nm	光子数
全脂纯牛奶 A	345	289	66	113 585
全脂纯牛奶 B	349	290	68	93 729
全脂纯牛奶 C	349	289	68	86 798
全脂鲜奶 A	345	288	64	109 062
全脂鲜奶 B	348	292	63	85 177
脱脂纯牛奶 B	347	289	68	111 958
脱脂纯牛奶 C	348	291	64	121 435
脱脂鲜奶 A	345	289	64	138 863
脱脂鲜奶 B	350	293	70	111 748

实验得到酪蛋白的荧光光谱，酪蛋白的荧光峰值波长为 344 nm，半高宽为 66 nm，最佳激发波长为 295 nm。激发波长为 291 nm 时酪蛋白溶液和 9 种牛奶的荧光发射光谱如图 2。

从图 2 看出，酪蛋白与牛奶的荧光光谱除荧光强度外基本一致，且谱形相似。推断牛奶在 291 nm 激发波长下产生荧光的主要荧光物质是酪蛋白。

为验证这一推断，测得 9 种牛奶和酪蛋白溶液的时间分辨荧光光谱，如图 3 所示，9 种牛奶的时间分辨荧光光谱无

明显的差别，平均荧光寿命都为 4.6 ns 左右，酪蛋白的平均荧光寿命为 4.1 ns，荧光寿命拟合参数如表 2 所示。

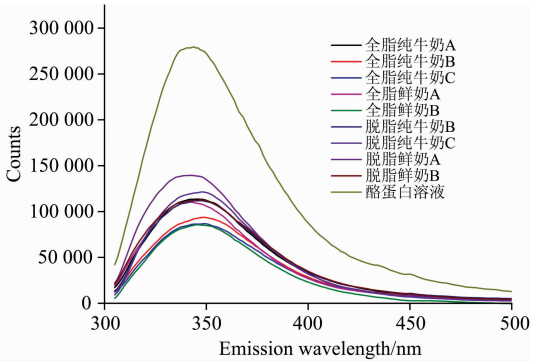

图 2　酪蛋白溶液和 9 种牛奶的荧光发射光谱（激发波长为 291 nm）

Fig. 2　Fluorescence emission spectra of casein solution and 9 kinds of milk (excitation wavelength is 291 nm)

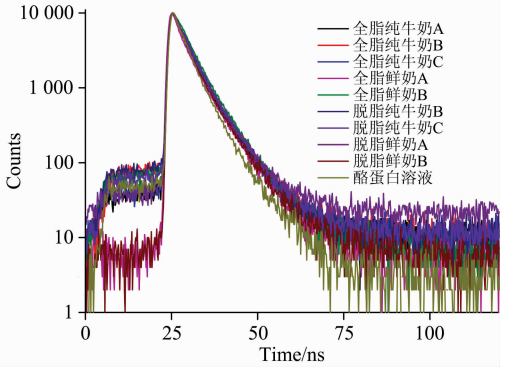

图 3　9 种牛奶和酪蛋白溶液的时间分辨荧光光谱

Fig. 3　Time resolved fluorescence spectra of 9 kinds of milk and casein solution

表 2　9 种牛奶和酪蛋白溶液的荧光寿命拟合参数

Table 2　Fitting parameters of fluorescence lifetime of 9 kinds of milk and casein solution with excited

牛奶种类	τ_1 /ns	τ_1 占比/%	τ_2 /ns	τ_2 占比/%	平均寿命/ns	χ^2
全脂纯牛奶 A	3.2	61.5	6.8	38.5	4.6	1.163
全脂纯牛奶 B	3.8	74.6	7.8	25.4	4.8	1.177
全脂纯牛奶 C	3.4	66.3	7.0	33.7	4.6	1.104
全脂鲜奶 A	3.1	61.8	6.9	36.2	4.4	1.162
全脂鲜奶 B	3.8	68.2	7.5	31.8	5.0	1.251
脱脂纯牛奶 B	3.9	76.0	7.7	24.0	4.8	1.213
脱脂纯牛奶 C	3.6	65.0	7.1	35.0	4.8	1.256
脱脂鲜奶 A	3.0	55.4	6.7	44.6	4.7	1.157
脱脂鲜奶 B	3.0	57.3	6.4	40.7	4.3	1.258
酪蛋白溶液	3.2	74.3	6.7	25.7	4.1	1.194

从时间分辨荧光光谱可以看出牛奶与酪蛋白的荧光寿命基本一致，牛奶的主要荧光物质为酪蛋白，而牛奶的荧光寿命稍大于酪蛋白，这可能是牛奶中其他物质的影响，造成牛奶与酪蛋白的荧光寿命有较小差异。

酪蛋白是由多种氨基酸以肽键组成的高分子化合物，其中色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸是荧光物质。图 4 为色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸的分子结构，这些氨基酸的苯环含有共轭双键，分子被激发后，会发生 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁，此时分子处于激发态，但激发态的分子不稳定，会通过 $S_1 \rightarrow S_0$ 的辐射跃迁发射荧光。实验表明色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸的荧光峰值波长和最佳激发波长分别为 350 和 290 nm，300 和 270 nm，282 和 258 nm，且它们的相对荧光强度为 100∶9∶0.5，所以酪蛋白在激发波长为 291 nm 时产生的荧光更多的是来自色氨酸[13]。

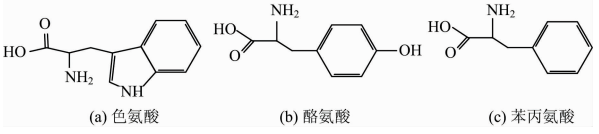

图 4　色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸的分子结构

Fig. 4　Molecular structure of tryptophan, tyrosine and phenylalanine

图 2 中 9 种牛奶样品在激发波长为 291 nm 时的荧光发射光谱，相同品牌的脱脂牛奶荧光强度高于全脂牛奶。全脂牛奶和脱脂牛奶的区别主要是脂肪含量，脂肪的存在对牛奶荧光强度有一定的影响。

为了探究脂肪含量对荧光强度的影响，对全脂纯牛奶 C 进行了离心处理，去除脂肪，图 5 是激发波长为 291 nm 时全脂纯牛奶 C、脱脂纯牛奶 C 和离心后的全脂纯牛奶 C 归一化后的荧光发射光谱。

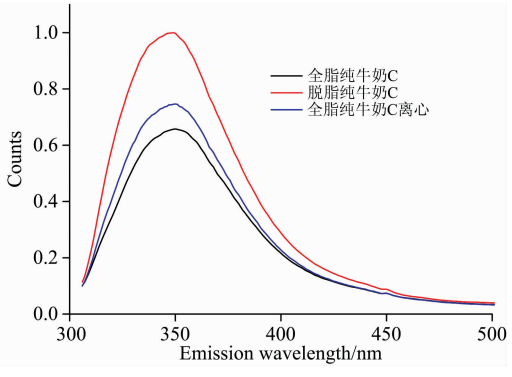

图 5　全脂纯牛奶 C、脱脂纯牛奶 C 和离心后的全脂纯牛奶 C 归一化后的荧光发射光谱（激发波长为 291 nm）

Fig. 5　The normalized fluorescence emission spectra of whole milk C, skim milk and whole milk C after centrifugation (excitation wavelength is 291 nm)

图 5 中离心后的全脂牛奶荧光强度介于全脂和脱脂之间，脂肪的减少使得牛奶的荧光强度有所增加，而离心处理的牛奶脂肪含量高于脱脂牛奶也使得其荧光强度低于脱脂牛奶。

测得 291 nm 激发下全脂纯牛奶 C 和脱脂纯牛奶 C 的荧光发射全谱，如图 6，可以看出全脂牛奶的瑞利散射强度明显高于脱脂牛奶。全脂牛奶的脂肪含量高，散射强，激发光

入射全脂牛奶后更多地被散射，使得其荧光强度低于脱脂牛奶。

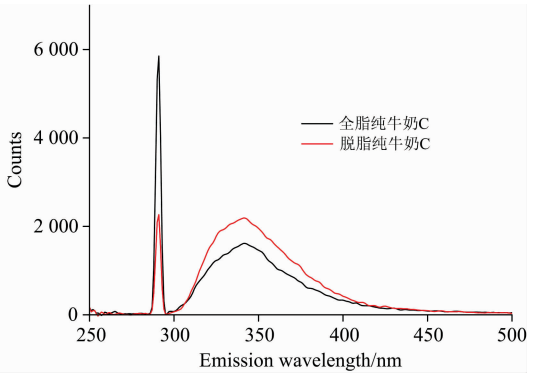

图 6 全脂纯牛奶 C 和脱脂纯牛奶 C 的荧光发射全谱(激发波长为 291 nm)

Fig. 6 Full fluorescence emission spectrum of whole milk C and skimmed milk C (excitation wavelength is 291 nm)

图 7 为 9 种牛奶稀释后的光透过率曲线，全脂牛奶的透过率都低于脱脂牛奶。入射光通过全脂牛奶时，除了一部分被酪蛋白吸收以外，还有一部分因脂肪的散射而损失，透过率减小，使得全脂牛奶的透过率都低于脱脂牛奶。

实验研究表明脂肪的存在会导致散射增加，使得全脂牛奶的荧光强度低于同品牌的脱脂牛奶。

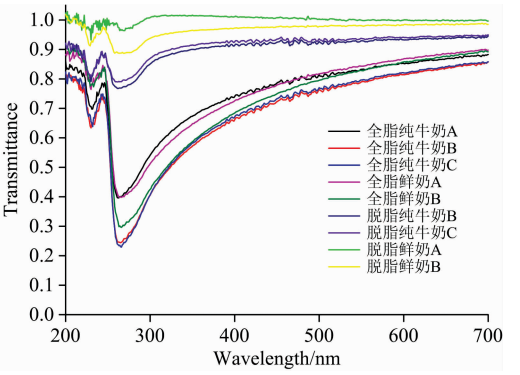

图 7 9 种牛奶的光透过率曲线

Fig. 7 The light transmittance curve of 9 kinds of milk

3 结 论

9 种牛奶的三维荧光光谱和时间分辨荧光光谱显示，牛奶可以在紫外光的激发下产生荧光，荧光峰值波长为 349 nm 左右，半高宽为 66 nm 左右，最佳激发波长为 291 nm 左右，平均荧光寿命为 4.6 ns 左右。实验表明 9 种牛奶荧光光谱除荧光强度外基本一致，牛奶的主要荧光物质相同，并通过对比实验推断牛奶的主要荧光物质是酪蛋白。全脂牛奶的荧光强度低于同品牌的脱脂牛奶，是由于脂肪的存在会使得散射变强。研究工作可对人们健康饮用不同类型的牛奶有所指导，也可为牛奶这种复杂混合物的分析检测提供帮助。

References

[1] FANG Zhong-yi, SHU Chang, LI Jin-lei, et al(方忠意，舒 畅，李金磊，等). China Dairy Cattle(中国奶牛), 2019, (10): 47.
[2] Tunick M H, Van Hekken D L. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2015, 63(43): 9381.
[3] Ishaq M, Li C, Ping Q. Journal of Animal & Veterinary Advances, 2014, 13(12): 719.
[4] MAO Wen-juan, WEI Da-peng, LI Li-jun, et al(毛文娟，魏大鹏，李丽君，等). China Soft Science(中国软科学), 2005, (9): 30.
[5] WANG Jing-yu, ZAN Lin-sen, JIANG Xiang-yang(王晶钰，昝林森，姜向阳). China Dairy Cattle(中国奶牛), 2006, (4): 47.
[6] Nouri A, Ahari H, Shahbazzadeh D. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 107(2): 1732.
[7] Wang C, Li X, Peng T, et al. Food Control, 2017, 77: 1.
[8] Rentschler E, Kuschel B, Krewinkel M, et al. Food Analytical Methods, 2016, 9(8): 2210.
[9] Nebot Carolina, Regal Patricia, Miranda Jose Manuel, et al. Food Chemistry, 2013, 141(3): 2294.
[10] Hernandez F, Jitaru P, Cormant F, et al. Food Chemistry, 2018, 240: 183.
[11] Zhang L, Zhang X, Ni L, et al. Food Chemistry, 2014, 145(4): 342.
[12] Acar-soykut E, Tayyarcan E K, Boyaci I H. Journal of Food Science & Technology, 2018, 55: 82.
[13] ZHAO Nan-ming, ZHOU Hai-meng(赵南明，周海梦). Biophysics(生物物理学). Beijing: Higher Education Press(北京：高等教育出版社), 2000. 300.

The Study on Fluorescence Spectral Characteristics of Three Brands of Milk

YIN Wen-zhi[1,2,3], WANG Ting-yu[1,3], ZHU Tuo[1,3], MA Chao-qun[1,3], GU Jiao[1,3], ZHU Chun[1,3], LI Lei[1,3], CHEN Guo-qing[1,3*]

1. School of Science, Jiangnan University, Wuxi 214122, China
2. School of Internet of Things Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, China
3. Jiangsu Provincial Research Center of Light Industrial Optoelectronic Engineering and Technology, Wuxi 214122, China

Abstract Three-dimensional fluorescence spectra of milk of three brands (9 types) were measured by FLS920P fluorescence spectrometer, including pure milk and fresh milk, whole milk and skim milk. The fluorescence peak wavelength of milk is about 349 nm, the full width at half maximum (FWHM) is about 66 nm, the optimal excitation wavelength is about 291 nm, and the average lifetime is about 4.6 ns, the results show that the fluorescence spectrum of 9 kinds of milk is basically the same except the fluorescence intensity. The fluorescence peak wavelength of the casein solution is 344 nm, the FWHM are 66 nm, the optimal excitation wavelength is 295 nm, and the fluorescence lifetime is 4.1 ns. The fluorescence peak wavelength and fluorescence lifetime of casein are similar to that of milk. After comparing other fluorescent substances in milk, it is inferred that casein is the main fluorescent substance in milk. In order to explore the differences in fluorescence intensity of 9 types of milk, the fluorescence emission spectra under the optimal excitation wavelength of 9 types of milk are compared. The fluorescence intensity of the whole milk of the same brand is significantly lower than that of skim milk. By comparing the normalization fluorescence spectra of whole milk, skim milk and centrifuged whole milk, the fluorescence intensity of centrifuged whole milk is between that of whole milk and that of skim milk. Centrifugation of milk results in less fat and less scattering and increase fluorescence intensity. The full fluorescence emission spectrum of milk shows that the Rayleigh scattering intensity of whole milk is significantly higher than that of skim milk, whole milk has a high-fat content and strong scattering, the excitation light is scattered more after it enters the whole milk, resulting in the Rayleigh scattering intensity of the whole milk being higher than that of skim milk. The light transmittance curve shows that the transmittance of whole milk is lower than that of skimmed milk, when incident light passes through whole milk, in addition to the part of it being absorbed by casein, part of it is lost due to fat scattering, and the transmittance is reduced, so that thetransmittance of whole milk is lower than that of skim milk. In this paper, the main fluorescent substances of milk are determined by using fluorescence spectroscopy without pretreatment. Moreover, the reason for the difference in fluorescence intensity between whole milk and skim milk is explained.

Keywords Milk; Three-dimensional fluorescence spectra; Time-resolved fluorescence spectra; Casein; Scattering

(Received Jan. 18, 2020; accepted Apr. 26, 2020)

* Corresponding author