

doi: 10.3788/gzxb20124101.0107

牛奶水溶液的荧光光谱研究

顾春峰¹, 兰秀凤^{1,3}, 于银山¹, 卢礼萍²

(1 南京航空航天大学 理学院, 南京 211106)

(2 南京农业大学 理学院, 南京 210095)

(3 中国科学院西安光学精密机械研究所 瞬态光学与光学技术国家重点实验室, 西安 710119)

摘 要:采集伊利、蒙牛公司生产的纯牛奶、高钙奶、高钙低脂奶, 向 5 mL 去离子水中分别加入 0.17 mL、0.20 mL、0.23 mL、0.26 mL、0.29 mL、0.32 mL、0.35 mL 这 6 种牛奶样品, 得到 42 份牛奶水溶液. 采用日立 F-4600 荧光光谱仪测定样品在波长为 315 nm、320 nm、325 nm、330 nm、335 nm、340 nm、345 nm 激发光诱导下的荧光发射光谱, 对所得荧光光谱进行 Savitzky-Golay 平滑、FFT 低通滤波后, 利用高斯分解法对荧光谱线进行分解, 将每个荧光光谱分解为 5 个基元高斯峰. 讨论了各种牛奶发射光谱的规律和变化趋势, 结果表明: 所有牛奶水溶液的各个基元高斯峰, 在相同激发波长下, 其峰值位基本不变, 当激发波长变化时, 所有基元高斯峰会随激发波长的增加而红移; 高钙低脂奶在波长较长的激发光照射下, 各个基元高斯峰强度均大于纯牛奶和高钙奶; 牛奶的浓度对总荧光光谱的影响较小.

关键词:光生物学; 荧光光谱; 牛奶水溶液; 高斯多峰拟合

中图分类号: O433.4

文献标识码: A

文章编号: 1004-4213(2012)01-0107-5

0 引言

随着经济的发展, 人们生活水平逐步提高, 牛奶作为一种古老的天然营养品, 越来越受到人们的喜爱. 针对不同人群, 出现了加工过的各种牛奶, 如纯牛奶、高钙奶、高钙低脂奶, 但是加工过程会对牛奶的品质产生不同程度的影响. 牛奶的品质一直深受人们的关注, 尤其是三聚氰胺事件之后人们对牛奶的品质更加重视.

利用光谱技术研究牛奶中的成分及品质不断的被人们探索、研究. 采用荧光光谱法^[1]、喇曼光谱法^[2]、近红外光谱法^[3-4]检测牛奶中的三聚氰胺已有报道. 其中利用红外光谱技术定量测定牛奶成份研究的比较多^[5], 且从数据预处理^[6]分析到后期的建模预测^[7-8]都研究得比较全面. 目前研究的比较深入的是的中红外光谱法, 通过具有代表性的模型可以预测乳制品中蛋白质、乳糖、非脂固形物和干物质的含量. 市场上已经出现基于该分析法的成熟仪器, 如丹麦福斯的 MilkScan 系列, 瑞典的 DMA 中红外牛奶分析仪等. 但对光谱图上各谱峰产生的原因及变化规律方面的报道并不多.

荧光技术自 20 世纪 60 年代后, 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量等诸多特点^[9-10], 在很多行业中得到了广泛的应用^[11-12]. 近年来已有学者报道鲜牛奶和酸牛奶的变质过程与荧光光谱联系密切^[13]; 含三聚氰胺的牛奶光谱也会有变化^[14]. 但对市售各品牌不同系列的牛奶进行荧光光谱研究与分析却鲜见报道.

本文采用荧光光谱法, 对市售的伊利、蒙牛生产的纯牛奶、高钙奶、高钙低脂奶水溶液进行了测试, 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.

1 实验过程和方法

1.1 实验仪器

本实验采用的荧光光谱仪为日立 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 1 200 nm/min, 扫描范围为 350~550 nm, 激发波长从 315~345 nm, 波长间隔为 5 nm.

基金项目:国家自然科学基金青年基金(No. 11004103)和瞬态光学与光学技术国家重点实验室项目(No. SKLST201004)资助

第一作者:顾春峰(1987-), 男, 硕士研究生, 主要研究方向为光与生物大分子相互作用. Email: guchunfeng@163.com

导师(通讯作者):兰秀凤(1976-), 女, 副教授, 主要研究方向为生物医学光子学. Email: orchidxf@yahoo.com.cn

收稿日期: 2011-06-27; **修回日期:** 2011-10-03

1.2 实验方法

实验样品选用伊利、蒙牛生产的纯牛奶、高钙奶、高钙低脂奶,其生产日期均为2011年1月左右.实验中用微量移液器向5 mL去离子水中,分别加入0.17 mL、0.20 mL、0.23 mL、0.26 mL、0.29 mL、0.32 mL、0.35 mL的牛奶样品,配置成7种不同浓度的牛奶水溶液(本文中用0.17 mL,代替5 mL去离子水加0.17 mL牛奶的水溶液).

1.3 实验数据预处理

实验结束后得到各种牛奶水溶液的荧光光谱后,利用Origin 7.5软件,首先对光谱数据进行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.对经FFT低通滤波后的光谱进行高斯多峰拟合,分辨出各个基元高斯峰.

2 实验结果与分析

2.1 牛奶品种对荧光光谱的影响

图1为0.26 mL各种牛奶水溶液在波长为325 nm的激发光诱导下的二阶导数荧光光谱图.

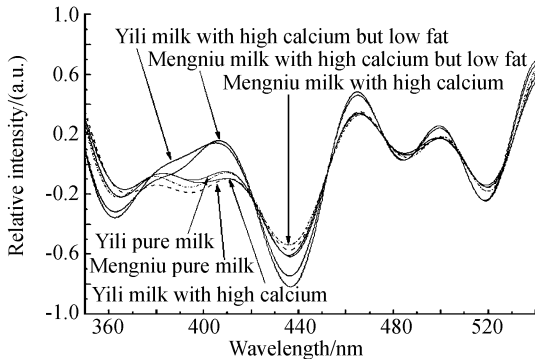


图1 各种牛奶二阶导数荧光光谱

Fig. 1 Second derivative fluorescence spectrum of each kind of milk

由图1可知,当激发光波长相同时,荧光发射光谱的各峰位基本一致,但高钙低脂奶的光谱形状和其他品种牛奶的光谱有较大区别.说明各种牛奶中的发光基团大致相同,只是发光团所处环境的差异使总光谱形状出现差别.

原始荧光光谱是多种发光团的总荧光光谱之和,由多个荧光光谱叠加而成,有些肩峰很难直接分辨,利用高斯分解法能有效地将相互叠加的光谱分解开^[15],在Origin中自带高斯多峰拟合工具.在使用二阶导数法获得光谱的峰位后,利用高斯多峰拟合,将总光谱分解为多个高斯峰的叠加^[16-17].

对0.26 mL,在波长为345 nm的激发光激励下

的伊利高钙奶、伊利高钙低脂奶的原始荧光光谱滤波、基线校正后,进行高斯多峰拟合.结果如图2、图3所示,参量如表1、表2所示.比较原始光谱和拟合后光谱,它们几乎重合,说明拟合效果较好.

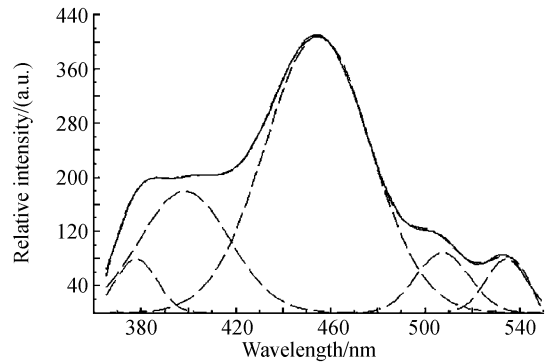


图2 伊利高钙奶高斯多峰拟合

Fig. 2 Gauss multi-peak fitting of YiLi milk with high calcium

表1 伊利高钙奶高斯多峰拟合参量

Table 1 Gauss multi-peak fitting parameter of YiLi milk with high calcium

Peak	Area	Center	Width	Height
1	1 718.8	377.97	17.166	79.889
2	8 521.5	398.54	37.822	179.77
3	22 698	454.66	44.354	408.31
4	2 496.8	507.48	22.433	88.807
5	1 725.0	534.41	17.204	80.005

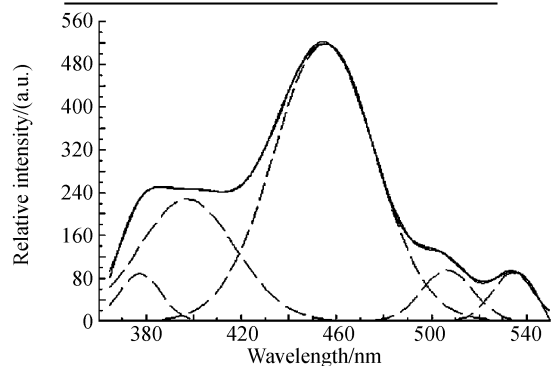


图3 伊利高钙奶低脂奶高斯多峰拟合

Fig. 3 Gauss multi-peak fitting of YiLi milk with high calcium but low fat

表2 伊利高钙低脂奶高斯多峰拟合参量
Table 2 Gauss multi-peak fitting parameter of YiLi milk with high calcium but low fat

Peak	Area	Center	Width	Height
1	1 907.1	377.51	17.158	88.686
2	11 507	397.38	40.313	227.76
3	27 618	454.98	42.438	519.25
4	2 546.7	506.67	21.184	95.922
5	1 977.2	534.22	17.355	90.902

通过以上的分析可知,将牛奶光谱分解成5个高斯峰后,各个峰所在的位置基本相同,从强度上

看, 伊利高钙低脂奶的各个峰的强度均比伊利高钙奶的强度高, 尤其是 3 号峰. 出现这一实验结果的原因是脂肪对荧光的散射作用. 荧光团受激发射出的荧光受到牛奶中脂肪的散射作用, 荧光在牛奶溶液中行走的光程较长^[18], 被牛奶中其他成份吸收的概率增加, 因而荧光强度衰减较多. 而脂肪对波长在 450 nm 左右的光散射效应最强, 所以该波长的荧光衰减最多.

2.2 牛奶浓度对荧光光谱的影响

利用同样的数据处理方法, 对不同浓度下的荧光光谱进行拟合. 图 4 为不同浓度的伊利纯牛奶水溶液在波长为 335 nm 的激发光激励下的荧光光谱. 利用高斯多峰拟合后的参量见表 3.

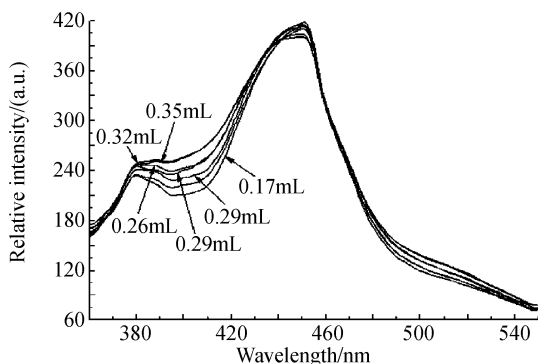


图 4 伊利纯牛奶不同浓度下的荧光光谱
Fig. 4 Fluorescence spectrum of various concentrations Yili pure milk

表 3 伊利纯牛奶高斯多峰拟合参量
Table 3 Gauss multi-peak fitting parameter of Yili pure milk

0.17 mL Yili pure milk, Excitation wavelength at 335 nm				
Peak	Area	Center	Width	Height
1	3 175.5	370.97	21.422	118.27
2	6 070	393.5	34.601	139.97
3	19 950	445.08	42.993	370.24
4	2 702.9	499.89	30.235	71.327
5	1 203	529.55	17.594	54.557

0.23 mL Yili pure milk, Excitation wavelength at 335 nm				
Peak	Area	Center	Width	Height
1	3 190.1	371.09	21.358	119.18
2	6 162.9	394.18	34.035	144.48
3	20 218	444.82	43.932	367.2
4	2 905.8	500.3	31.242	74.211
5	1 176.2	529.87	17.448	53.787

0.29 mL Yili pure milk, Excitation wavelength at 335 nm				
Peak	Area	Center	Width	Height
1	3 282.7	371.36	21.315	122.88
2	6 352.7	394.79	33.345	152.01
3	21 197	444.37	45.451	372.11
4	3 158.7	500.97	32.068	78.591
5	1 149.1	530.27	17.265	53.104

0.35 mL Yili pure milk, Excitation wavelength at 335 nm				
Peak	Area	Center	Width	Height
1	3 389.3	371.92	21.176	127.7
2	6 226.6	395.49	31.961	155.45
3	21 332	443.77	47.151	360.98
4	3 365.7	502.43	32.88	81.675
5	1 143.1	530.91	17.058	53.468

通过观察图 4 和表 3 中的高斯拟合参量可知, 不同浓度的牛奶水溶液的 5 个高斯峰的中心位置基本一致, 说明浓度的改变对高斯峰的中心位置基本无影响. 但是各个峰的强度有变化, 尤其是 1、2 号高斯峰变化较大. 从而使得原始光谱在 360 nm 到 430 nm 之间的光谱由较大的区别. 分析其原因在于溶液浓度的改变会引起发光团浓度改变, 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淬灭作用且这种淬灭作用对波长较长的光明显. 因此当发光物质浓度、淬灭剂浓度同时增加或减少, 它们联合作用造成了原始光谱在 360 nm 到 430 nm 波段光谱强度随溶液浓度的增加而增强, 大于 430 nm 波段的光谱强度没有较大的改变.

2.3 激发光波长对荧光光谱的影响

对于不同激发波长下的牛奶溶液的荧光光谱如图 5、图 6 所示.

由图 5、6 可知, 随着激发波长的增加, 纯牛奶和低脂高钙奶的主荧光峰均出现不同程度的红移. 其变化规律为在波长为 315 nm、320 nm、325 nm 的激发光激励下, 主荧光峰位变化较小, 且低脂奶的光谱强度低于高钙奶强度. 可见在 315~325 nm 激发波长下, 对总荧光光谱起主要贡献的是脂肪大分子中的生色团, 生色团浓度降低引起荧光峰强度下降. 而这些生色团在波长为 325~345 nm 的激发光激励下, 发射荧光较弱, 对总荧光影响较小. 在波长为 325~345 nm 的激发光激励下牛奶中的其他物质成分发射荧光较强, 对总光谱起主导作用, 而脂肪对这

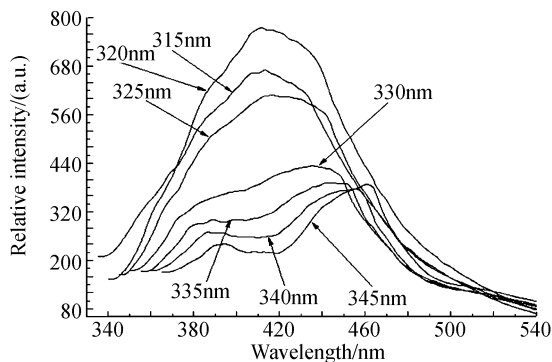


图 5 浓度为 0.32 mL 蒙牛纯牛奶荧光光谱
Fig. 5 Fluorescence spectrum of MengNiu pure milk whose density is 0.32 mL

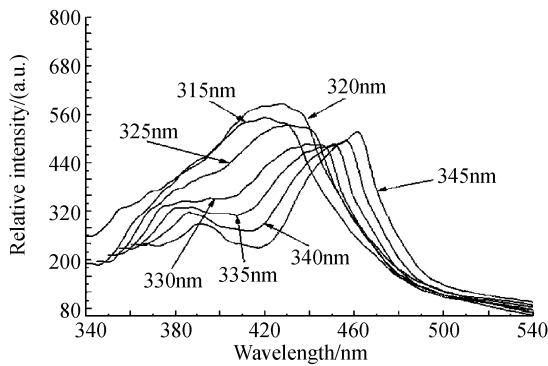


图6 浓度为0.32 mL蒙牛高钙低脂奶荧光光谱
Fig. 6 Fluorescence spectrum of MengNiu milk with high calcium whose density is 0.32 mL

些荧光的散射作用较明显,所以高钙低脂奶在325~345 nm激发波长下,其主荧光峰较强。

3 结论

实验测得伊利、蒙牛两大厂商的纯牛奶、高钙奶、高钙低脂奶的不同浓度水溶液在不同波长的激发光诱导下的荧光光谱。利用二阶导数法、高斯多峰拟合法分析,发现所有牛奶水溶液的各个基元高斯峰峰位基本一致,且随激发波长的增加而红移。样品浓度对基元高斯峰的峰位几乎没有影响,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,各个基元高斯峰强度均大于纯牛奶和高钙奶。以上研究结果主要就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作进一步的研究,以期对牛奶质量检测提供一种方便快捷的新技术。

参考文献

- [1] LIU Jin-yan, LIU Cui-cui, FENG Pan. Determination of melamine in milk products by fluorimetry[J]. *Chinese Journal of 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.
- [2] XIAO Hai-ling. Rapid detection method of melamine in dairy products by Raman spectra[D]. Beijing: Beijing University of Industry, 2009.
肖海玲. 奶制品中三聚氰胺的喇曼光谱快速检测方法研究[D]. 北京: 北京工业大学, 2009.
- [3] XU Yun, WANG Yi-ming, WU Jing-zhu, et al. Detecting the melamine of pure milk by near infrared spectra[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.
- [4] 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.
- [5] PI Fu-wei, WANG Yan-ling, 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.
- [6] WANG Shuo, XU Ke-xin. 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.
- [7] KULMYRZAEV A; DUFOUR E. Determination of lactulose and furosine in milk using front-face fluorescence spectroscopy [J]. *LAIT*, 2002, **82**(6): 725-735.
- [8] BI Wei-hong, LI Chao, MIAO Yu-jie, et al. Quantitative analysis of the 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.
- [9] 徐金钩, 王尊本. 荧光分析法[M]. 北京: 科学出版社, 2006.
- [10] LAN Xiu-feng, LIU Ying, LIU Jian-gang, et al. Fluorometric determination of ethanol solution[J]. *Acta Photonica Sinica*, 2003, **32**(11): 1371-1374.
- [11] LAN Xiu-feng, LIU Ying, ZHU Tuo, et al. Spectroscopy analysis of total cholesterol in human serum [J]. *Acta Photonica Sinica*, 2008, **37**(3): 547-551.
- [12] LI Rong-qing, LIU Ying, GE Li-xin, et al. Study on blood cells disintegration by laser induced fluorescence spectrometry[J]. *Acta Photonica Sinica*, 2006, **35**(3): 398-401.
- [13] LIU Jie, YU Chang-qing, LI Jia-ze, 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.
- [14] HAN Cai-qin, LIU Ying, ZHAO Wen-yan, 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.
- [15] WANG Li-jie, XU Ke-xin, GUO Jian-ying. Compositional analysis of fat, protein and lactose in raw milk by using near-infrared spectroscopy[J]. *Journal of Optoelectronics · Laser*, 2004, **15**(4): 468-471.
王丽杰, 徐可欣, 郭建英. 采用近红外光谱技术检测牛奶中脂肪、蛋白质及乳糖含量[J]. *光电子·激光*, 2004, **15**(4): 468-471.
- [16] CAO Run-tong. Study the spectrum of rmophilic xylose isomerase and two kinds of mutation by Gaussian fitting[D]. Nanjing: Nanjing University of Science and Technology, 2008.
曹润通. 嗜热木糖异构酶及其两种突变型荧光光谱的高斯法研究[D]. 南京: 南京理工大学, 2008.
- [17] WU Bin, LIU Ying, HAN Cai-qin, et al. Study on the elements of the fluorescence spectra emitted from ethanol-water mixture [J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2010, **30**(5): 1285-1289.
吴斌, 刘莹, 韩彩芹, 等. 乙醇-水溶液中团簇分子的基元荧光光谱研究[J]. *光谱学与光谱分析*, 2010, **30**(5): 1285-1289.
- [18] WANG Hun-yin. Light scattering technique and its application in analysis of biological macromolecules [D]. Chongqing: Southwestern University, 2007.
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, 2007.

Fluorescence Spectrum of Milk Solution

GU Chun-feng¹, LAN Xiu-feng^{1,3}, YU Yin-shan¹, LU Li-ping²

(1 *College of Science, Nanjing University of Aeronautics and Astronautics, Nanjing 211106, China*)

(2 *College of Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China*)

(3 *State Key Laboratory of Transient Optics and Photonics, Xi'an Institute of Optics and Precision Mechanics, Chinese Academy of Sciences, Xi'an 710019, China*)

Abstract: Six kinds of samples are collected including pure milk, milk with high calcium and milk with high calcium but low fat produced by Inner Mongolia Yili Industrial Group Co., Ltd. and Inner Mongolia Mengniu Dairy (Group) Co., Ltd. respectively. 0.17 mL, 0.20 mL, 0.23 mL, 0.26 mL, 0.29 mL, 0.32 mL, 0.35 mL of the six kinds of samples are added into 5 mL deionized water, and 42 pieces of milk solution are obtained. Hitachi F-4600 fluorescence spectrophotometer is used to obtain the fluorescence spectra of the samples under excitation wavelength at 315 nm, 320 nm, 325 nm, 330 nm, 335 nm, 340 nm, 345 nm respectively. After Savitzky-Golay smoothing and FFT low-pass filtered, each fluorescence spectrum is decomposed by Gauss multi-dimensional fitting, then 5 element Gauss peak appeared. Each element Gauss peak position of all milk peroxide solution is invariable under the same stimulation wave length. All element Gauss peaks are red shifted along with the stimulation wave length increasing. Under the long stimulation wave length, each element Gauss peak of milk with high calcium but low fat is bigger than the others. Milk density plays an unimportant role to the total fluorescence spectrum.

Key words: Bio-optics; Fluorescence spectrum; Milk solution; Gauss multi-peak fitting