

文章编号: 1001-3806(2010)02-0193-04

## 奶粉-三聚氰胺的荧光光谱特性研究

杨成方, 李雷, 张枫, 王道光, 刘诚, 刘莹\*  
(徐州师范大学 物理与电子工程学院, 徐州 221116)

**摘要:** 为了研究奶粉、三聚氰胺、奶粉-三聚氰胺混合水溶液的稳态荧光光谱和同步荧光光谱特征, 采用 280nm 的激励光照射奶粉-水溶液时, 能发射峰值位于 330nm 的荧光。利用恒波长同步荧光分析技术研究了该混合溶液的光谱特性, 分别改变不同的波长差  $\Delta\lambda$ , 当  $\Delta\lambda = 60\text{nm}$  时, 同步荧光强度达到最大; 混合溶液中奶粉的浓度改变时, 其同步荧光强度和浓度间满足线性关系。同时得到了奶粉和三聚氰胺混合溶液的同步荧光光谱, 当  $\Delta\lambda = 38\text{nm}$  时, 奶粉同步荧光峰位于 283nm, 三聚氰胺位于 319nm, 奶粉-三聚氰胺混合溶液中两个峰位均存在。结果表明, 利用同步荧光分析技术可以较好地检验出奶粉中是否含有三聚氰胺。该研究能为三聚氰胺及其衍生物的物质特性研究提供参考, 并为三聚氰胺的含量检测提供帮助。

**关键词:** 光谱学; 同步荧光光谱; 奶粉; 三聚氰胺; 蛋白质

**中图分类号:** O433 **文献标识码:** A **doi:** 10.3969/j.issn.1001-3806.2010.02.014

## Study on the fluorescent spectral characteristics of milk powder and melamine

YANG Cheng-fang, LI Lei, ZHANG Feng, WANG Dao-guang, LIU Cheng, LIU Ying  
(College of Physics & Electronic Engineering, Xuzhou Normal University, Xuzhou 221116, China)

**Abstract:** In order to obtain the steady state fluorescent and synchronous fluorescent spectral characteristics of milk powder, melamine and the mixture of milk powder-melamine respectively, UV light of 280nm was chosen as the excitation light to irradiate milk powder-water solution and the emission peak was at 330nm in the fluorescent spectrum. The constant-wavelength  $\Delta\lambda$  was used in synchronous fluorescence spectrometry. The experiment results reveal while changing the value of  $\Delta\lambda$ , the synchronous fluorescent intensity altered, and it reached maximum when  $\Delta\lambda = 60\text{nm}$ . Scanning the synchronous fluorescence of different milk powder-water solutions with  $\Delta\lambda = 60\text{nm}$ , the fluorescent intensity changed and the relationship between the fluorescence intensity and the concentration of the milk powder-water solution was linear. When  $\Delta\lambda = 38\text{nm}$ , the synchronous fluorescent spectra of milk powder, melamine and the mixture of melamine and milk powder were obtained. The experiment results indicated that the synchronous fluorescent peak of milk powder was at 283nm, for melamine, it was at 319nm. In the milk powder-melamine solutions, there were two peaks of 283nm for milk powder and 319nm for melamine, so that whether there was melamine in the milk powder can be determined. The research may contribute to the research of the characteristics of melamine and its derivatives and the detection of melamine in the milk.

**Key words:** spectroscopy; synchronous fluorescent spectrum; milk; melamine; protein

### 引言

2007年美国宠物食品污染事件和2008年中国婴幼儿奶粉污染事件再次将三聚氰胺(melamine)的毒性引入公众视野<sup>[1]</sup>。由于食品和饲料工业中蛋白质的含量测试方法存在缺陷,三聚氰胺常被不法商人掺入食品中,以提升食品检测中的蛋白质含量指标,因此三

聚氰胺也被人称为“蛋白精”。通用的蛋白质测试方法是“凯氏定氮法”,通过测出含氮量来估算蛋白质的含量<sup>[2]</sup>。蛋白质主要由氨基酸组成,平均含氮量为16%左右,而三聚氰胺的含氮量为66%左右,因此,添加三聚氰胺会使得食品的蛋白质测试含量提高,从而使劣质食品通过食品检验机构的测试。目前已有不少方法可用于蛋白质的测定,如电泳法<sup>[3]</sup>、光度法<sup>[4]</sup>、荧光法<sup>[5]</sup>、共振瑞利散射法<sup>[6]</sup>等。荧光分析法由于其灵敏度高、干扰少、快速准确、实用性强等优点而在蛋白质定量分析中倍受关注<sup>[7-8]</sup>。但国内外测定食物中三聚氰胺含量的方法很少,一般采用气相-质谱法<sup>[9]</sup>、液相质谱法、液相色谱法<sup>[10-11]</sup>等。

三聚氰胺即蜜胺,又称氰尿酸胺,是一种白色晶体,

基金项目:江苏省科技厅基础研究资助项目(BK2007204);江苏省教育厅科研资助项目(07KJD140208)

作者简介:杨成方(1973-),男,硕士研究生,主要研究方向是生物医学光子学。

\* 通讯联系人。E-mail: liuying70@126.com

收稿日期:2009-01-19;收到修改稿日期:2009-03-13

熔点为  $354^{\circ}\text{C}$ <sup>[12]</sup>, 普遍认为三聚氰胺毒性轻微, 基本上没有毒性。但是三聚氰胺的衍生物——三聚氰酸具有毒性, 两者紧密结合会形成不溶于水的网格结构。摄入人体后, 由于胃酸的作用, 三聚氰胺和三聚氰酸相互解离, 分别通过小肠吸收进入血液循环并进入肾脏。在肾细胞中两者再次结合沉积从而形成肾结石, 堵塞肾小管, 最终造成肾衰竭<sup>[1]</sup>。由于三聚氰胺结石微溶于水, 对于成年人, 经常喝水则不容易形成结石。但对于哺乳期的婴儿, 由于喝水很少并且相比成年人肾脏狭小, 更容易形成肾结石。

为此, 国家质量监督检验检疫总局、国家标准化管理委员会于 2008-10-15 批准发布《原料乳中三聚氰胺快速检测液相色谱法》(GB/T22400-2008) 国家标准<sup>[13]</sup>。但是液相色谱法要用到乙腈对蛋白质进行沉淀, 还要用到磷酸和磷酸二氢钾, 而乙腈和磷酸是有毒副作用的。同步荧光光谱法是研究混合荧光物质有效的方法之一, 与稳态荧光法相比, 同步荧光法具有灵敏度高、选择性好、散射光影响小而且不用预分离等优点<sup>[14]</sup>。作者通过对奶粉的稳态荧光光谱和同步荧光光谱以及含有三聚氰胺奶粉的同步荧光光谱的研究发现, 同步荧光光谱除上述特点外, 其峰值与浓度有着很好的线性关系, 能灵敏地分辨出奶粉和三聚氰胺混合溶液中蛋白质和三聚氰胺的光谱。与现有检测方法相比, 同步荧光法具有使用材料简单、无毒副作用、灵敏快捷等特点, 因而研究结果能为奶粉中蛋白质的含量的测量及三聚氰胺的检测提供理论依据。

## 1 实验仪器和方法

### 1.1 实验装置和仪器

实验中使用英国 Edinburgh Instruments 公司生产的 FLS900 型稳态和瞬态时间分辨荧光光谱仪, 其中光源为波长连续可调的氙灯, 经激发单色仪精确选择激发光, 发射谱扫描区间为  $300\text{nm} \sim 470\text{nm}$ ; 上海安亭科学仪器厂生产的 TGL-16C 型高速台式离心机用于奶粉的离心实验。

### 1.2 实验样品和方法

实验样品为三聚氰胺、双城雀巢有限公司生产的雀巢全脂奶粉和 3 次蒸馏水。奶粉水溶液中奶粉按质量百分比进行配制, 其浓度范围为  $0.00001\text{g/mL} \sim 0.01\text{g/mL}$ 。配制好的奶粉水溶液去除表层油脂, 然后在离心机上高速离心 10min 后取上清液, 放入 3mL 的石英比色皿中。采用恒定波长差值进行波长同步荧光扫描。

## 2 实验结果与分析

### 2.1 奶粉中蛋白质的稳态荧光光谱

采用  $280\text{nm}$  的激发光照射奶粉水溶液, 在  $300\text{nm} \sim$

$440\text{nm}$  的范围内扫描其发射光谱, 得到奶粉中蛋白质稳态荧光光谱如图 1 所示, 其同步荧光光谱如图 2 所示。从图中可以看出蛋白质的稳态荧光光谱的谱峰较宽, 发射范围从  $300\text{nm}$  至  $400\text{nm}$ , 其中含有多个峰值, 即  $305\text{nm}$ ,  $330\text{nm}$  和  $350\text{nm}$ 。

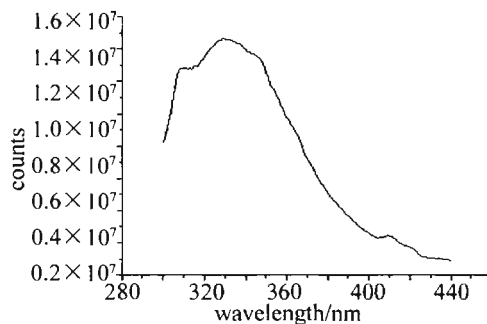


Fig. 1 Fluorescent spectra of milk powder

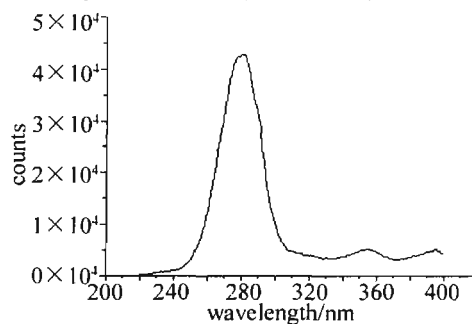


Fig. 2 Synchronous fluorescent spectra of milk powder

分析认为, 当采用紫外光照射奶粉溶液时, 其中的蛋白质吸收入射光并向外发射荧光。氨基酸是蛋白质的基本构成单位, 探测研究氨基酸的结构和性质等对于探索生命过程具有重要的意义<sup>[15-16]</sup>, 因而有必要探究氨基酸吸收光和发射光的特性。由于蛋白质中氨基酸的种类较多, 但是有内源荧光的氨基酸只有色氨酸 (tryptophan, Trp)、酪氨酸 (tyrosine, Tyr)、苯丙氨酸 (phenylalanine, Phe), 其中, Trp 的荧光强度最大, Tyr 次之, Phe 最小。因为蛋白质的荧光通常在  $280\text{nm}$  或更长的波长被激发, Phe 在绝大多数实验条件下不被激发, 所以很少能观察到 Phe 的发射谱。这样蛋白质的内源荧光主要来自 Trp 和 Tyr 残基。Trp 残基对微环境的变化很敏感, 并且大多数蛋白质都含有几个不同的 Trp 残基, 因而常作为内源荧光探针来研究溶液状态下蛋白质的构象。从图 1 可以看出, 蛋白质的谱峰宽度从  $300\text{nm}$  到  $360\text{nm}$ , 这正是 Trp 和 Tyr 竞争从而产生了重叠的结果。

从实验结果和分析可以看出, 普通的稳态荧光光谱很难精确分析物质的结构, 而且不容易得出荧光峰值和浓度之间的关系。而同步荧光光谱的谱线比较尖锐, 且只有唯一的峰位。实验中用同步荧光更容易找出奶粉的浓度和荧光强度之间的关系。

### 2.2 恒波长同步荧光光谱分析

实验中采用固定发射光波长  $\lambda_{em}$  和激励光  $\lambda_{ex}$  的波长差 ( $\Delta\lambda = \lambda_{em} - \lambda_{ex} = \text{常数}$ ) 进行同步荧光光谱扫描, 由于  $\Delta\lambda$  的选择直接影响到所得同步光谱的形状、带宽和信号强度。为此, 实验中分别设定  $\Delta\lambda$  为 20nm, 30nm, 40nm, 50nm, 60nm, 70nm, 80nm, 90nm, 并逐一扫描奶粉水溶液的同步荧光光谱, 如图 3 所示。从图中

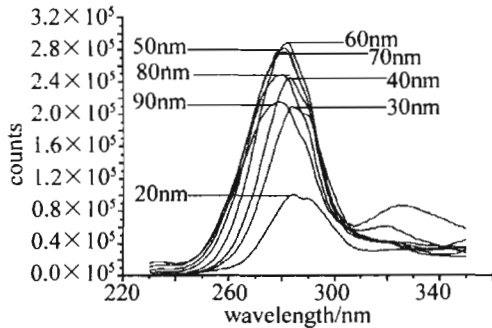


Fig. 3 Synchronous fluorescent spectra of milk powder with different  $\Delta\lambda$  可以看出, 当  $\Delta\lambda$  逐渐增大时荧光峰值先增大后减小,  $\Delta\lambda = 60\text{nm}$  时, 同步荧光光谱的峰值最大即量子产率最高, 且它的谱峰也最尖锐。故而实验中选取  $\Delta\lambda = 60\text{nm}$  进行不同浓度的奶粉水溶液的同步扫描, 其结果如图 4 所示。因为主要研究奶粉中蛋白质含量和荧光强度间的关系, 故图中的浓度为折合的蛋白质浓度。从图中可以看出, 蛋白质含量和同步荧光强度间很好地满足线性关系。

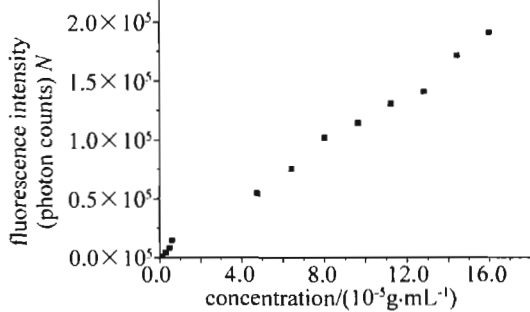


Fig. 4 Relationship between the fluorescent intensity and the content of milk powder in water solution

在同步扫描荧光测定中, 同步荧光的信号强度  $I_{sf}(\lambda_{ex}, \lambda_{em})$  可以表示为下式:

$$I_{sf}(\lambda_{ex}, \lambda_{em}) = kCbE_{ex}(\lambda_{ex} - \Delta\lambda)E_{em}(\lambda_{em}) \quad (1)$$

$$\text{或 } I_{sf}(\lambda_{ex}, \lambda_{em}) = kCbE_{ex}(\lambda_{ex})E_{em}(\lambda_{em} + \Delta\lambda) \quad (2)$$

式中,  $C$  为待测物质的浓度,  $b$  为式样溶液的厚度,  $E_{ex}(\lambda_{ex})$  表示激发光谱,  $E_{em}(\lambda_{em})$  为发射光谱,  $k$  为实验的条件常数。由以上两式可知, 对于某种待测物质, 在实验条件固定不变的情况下, 同步荧光的信号强度与待测物质的浓度成正比<sup>[11]</sup>。

实验中取  $\Delta\lambda = 60\text{nm}$  进行同步荧光扫描, 扫描范

围为 230nm~360nm。发现其浓度和荧光强度成线性关系, 线性范围是 0.16g/mL~320g/mL。经软件拟合可以得到线性方程为  $y = 136.399 + 1.1833 \times 10^9 x$ 。式中,  $x$  代表浓度, 单位是 g/mL,  $y$  代表荧光强度, 即光子数。由于实验误差和计算机拟合使得线性方程中出现截距, 但是相对于线性系数的数量级小得多。因而实验结果和上述理论符合得很好。

### 2.3 含三聚氰胺奶粉的荧光光谱特征

实验表明, 采用 254nm 的激发光照射三聚氰胺的水溶液, 其发射谱的谱峰位于 360nm 处, 如图 5 所示。

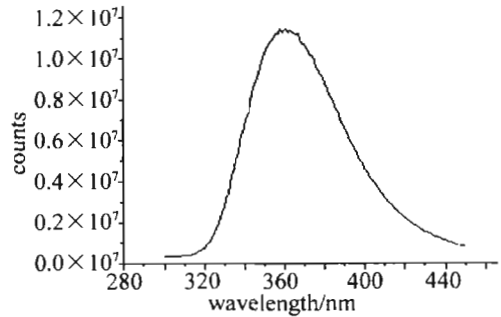


Fig. 5 Fluorescent spectra of melamine with the excitation light of 254nm 以 254nm 的激发光照射奶粉的水溶液, 其发射谱峰位在 333nm 附近, 如图 6 所示。奶粉的谱峰和三聚氰胺的就形成了竞争的局面, 进而形成了如图 7 所示的峰位在 354nm 左右的奶粉和三聚氰胺混合溶液光谱。这样在混合物的稳态光谱中就无法分辨出奶粉中是否含有三聚氰胺。

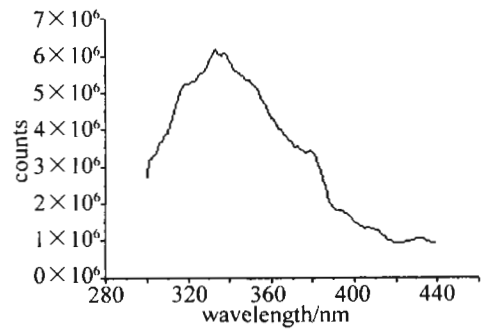


Fig. 6 Fluorescent spectra of milk powder with the excitation light of 254nm

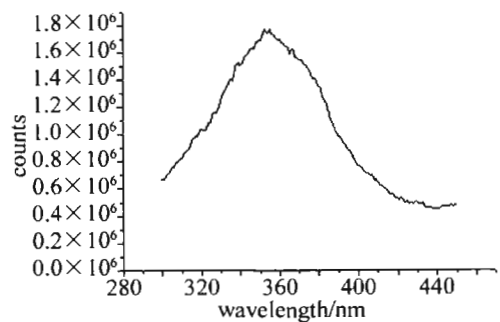


Fig. 7 Fluorescent spectra of mixture of milk powder-melamine

利用同步荧光进行扫描, 当  $\Delta\lambda = 38\text{nm}$  时, 奶粉和三聚氰胺的同步荧光光谱分别如图 8 和图 9 所示, 而

含三聚氰胺奶粉的同步荧光光谱如图10所示。从图8、图9、图10这3幅同步荧光光谱图可以看出,奶粉的同步荧光峰位于283nm处,三聚氰胺的同步荧光峰位于319nm处,含三聚氰胺奶粉的同步荧光光谱同时含有两个峰位,分别位于283nm和319nm。因而同步荧光光谱能够很好分辨出奶粉和三聚氰胺。

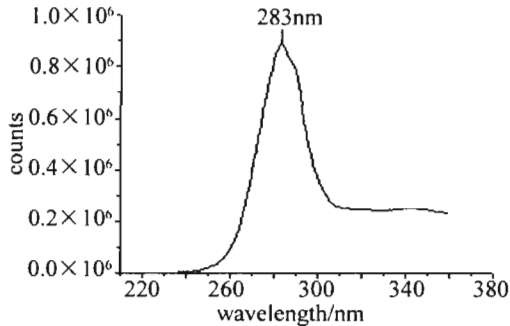


Fig. 8 Synchronous fluorescent spectra of milk powder with  $\Delta\lambda = 38\text{nm}$

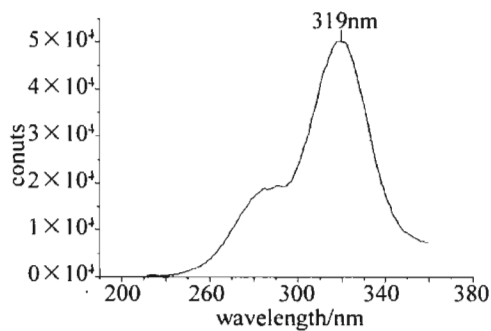


Fig. 9 Synchronous fluorescent spectra of melamine with  $\Delta\lambda = 38\text{nm}$

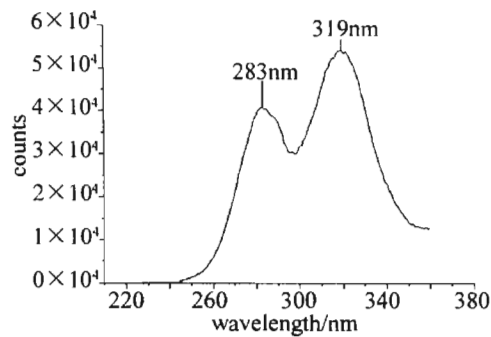


Fig. 10 Synchronous fluorescent spectra of mixture of melamine and milk powder with  $\Delta\lambda = 38\text{nm}$

### 3 结论

实验中用紫外光照射奶粉水溶液及其与三聚氰胺的混合溶液,分别获得稳态和同步光谱,得到以下结论:(1)激励光为280nm时,奶粉中的蛋白质吸收了入射光并向外发射荧光,发射谱的范围为300nm~400nm,峰值分别位于305nm,330nm,350nm,并对其发射荧光的机制进行了分析;(2)得到了奶粉水溶液的恒定波长同步荧光光谱,改变 $\Delta\lambda$ 时发现,当 $\Delta\lambda = 60\text{nm}$ 时,

同步荧光的强度达到最大值;(3)固定 $\Delta\lambda = 60\text{nm}$ ,得到不同浓度的奶粉水溶液同步荧光光谱,发现其同步荧光强度和浓度成线性关系,线性方程为 $y = 136.399 + 1.1833 \times 10^9 x$ ;(4)分析奶粉和三聚氰胺的混合溶液的同步荧光光谱,选择 $\Delta\lambda = 38\text{nm}$ 时,可以精确地检验出奶粉中是否含有三聚氰胺。

作者采用灵敏的荧光光谱和同步荧光光谱分析技术研究了奶粉、奶粉-三聚氰胺的光谱特性,结果能为奶粉中蛋白质的含量的测量及三聚氰胺的检测提供理论依据,相关的后续理论研究仍在进行中。

### 参 考 文 献

- [1] HE L L, LIU Y, LIN M Sh, *et al.* A new approach to measure melamine, cyanuric acid, and melamine cyanurate using surface enhanced Raman spectroscopy coupled with gold nanosubstrates[J]. *Sensing and Instrumentation for Food Quality and Safety*, 2008, 2(1): 67-71.
- [2] ZHANG Y F, LE G W, SHI Y H, *et al.* The study on immunopeptides of wheat through hydrolyzing wheat isolated proteins by alcalase [J]. *Food & Machinery*, 2006, 22(3): 44-46 (in Chinese).
- [3] ZHANG N, TANG Y, HAO D M, *et al.* Determination of serum proteins by high performance capillary zone electrophoresis[J]. *Chinese Journal of Chromatogram*, 1999, 17(6): 593-595 (in Chinese).
- [4] ZHAO Ch R, LIU B Sh, ZHANG H Y. Spectrophotometric determination of albumin with acid brown SR [J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2005, 25(1): 92 (in Chinese).
- [5] MA Ch Q, LI K A, TONG Sh Y. Determination of proteins by fluorescence quenching of erythrosin B [J]. *Analytica Chimica Acta*, 1996, 333(1/2): 83-88.
- [6] FENG N Ch, HE S P, ZHANG J A, *et al.* Resonance light scattering study on interaction of solochrome cyanine *r* with protein and light scattering determination of trace protein [J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2004, 24(2): 194 (in Chinese).
- [7] LIU Zh Y, ZHU T, GU E D, *et al.* Acid Orange II detection by fluorescence spectra [J]. *Acta Optical Sinica*, 2008, 28(6): 1106-1110 (in Chinese).
- [8] LAN X F, LIU Y, GAO Sh M, *et al.* Analysis of fluorescence spectra of alcohol and its characteristic [J]. *Laser Technology*, 2003, 27(5): 477-479 (in Chinese).
- [9] LITZAU J J, MERCER G E, MULLIGAN K J. LIB No. 4423, GC-MS screen for the presence of melamine, ammeline, ammelide, and cyanuric acid [EB/OL]. [2009-01-09]. <http://www.cfsan.fda.gov/~frf/lib4423.html>.
- [10] TURNIPSEED S, CASEY C, NOCHETTO C, *et al.* LIB No. 4421, determination of melamine and cyanuric acid residues in infant formula using LC-MS/MS [EB/OL]. [2009-01-09] <http://www.cfsan.fda.gov/~frf/lib4421.html>.
- [11] WU M L, CHEN C H. Determination of melamine in cyanamide by high performance liquid phase chromatography (HPLC) [J]. *Ningxia Petro Chemical Industry*, 2005(2): 24-26 (in Chinese).
- [12] WANG Zh. *Chemical dictionary* [M]. 4th ed. Beijing: Chemical Industry Press, 2003: 3 (in Chinese).

(下转第201页)

## 参 考 文 献

- [1] LECLERC P, ALLOUCHE V. Temporal response diagnostic for the Laser Megajoule[J]. SPIE, 1999, 3492: 843-850.
- [2] THOMAS S, BOYD B, DAVIS D T, *et al.* Temporal multiplexing for economical measurement of power versus time on NIF[J]. SPIE, 1997, 3047: 700-706.
- [3] MILAM D, THOMPSON C, SELL W, *et al.* Measurements at 351 nm of temporal dispersion in fibers[R]. Livermore; University of California, Radiation Laboratory, 1998: 1-24.
- [4] ZHU Q Ch, WU F Ch, SHI A Y. A new UV optical fiber with wide bandwidth[J]. Journal of Dalian university of Technology, 1997, 37 (s2): 217-218 (in Chinese).
- [5] XIA Y W, YE J X, LIU H, *et al.* Study on the propagation characteristics of ultraviolet picosecond laser pulse in step-index multimode fiber[J]. High Power Laser and Particle Beams, 1999, 11 (3): 284-288 (in Chinese).
- [6] XIA Y W, SUN Zh H, TANG J, *et al.* Propagation characteristics of temporal profile in optical fibers[J]. Optics & Optoelectronic Technology, 2008, 6(6): 5-8 (in Chinese).
- [7] XU L B, LIU H, PENG Zh T, *et al.* Experimental research on pulse-shape measurement of high power laser with the use of fiber sampling techniques[J]. Optics & Optoelectronic Technology, 2008, 6(3): 35-37 (in Chinese).
- [8] SONG Y, WANG L. Effect of fiber dispersion on pulse width[J]. Laser Technology, 2008, 32(6): 568-571 (in Chinese).
- [9] WANG C, LI K, KONG F M. Study of characteristics of polarization mode dispersion in single mode fibers with elliptical birefringence[J]. Laser Technology, 2006, 30(5): 465-468 (in Chinese).
- [10] AKHMANOV S A, VYSLOUKH V A, CHIRKIN A S. Optics of femtosecond laser pulses[M]. New York: American Institute of Physics, 1992: 9-14.
- [11] NEUMANN E G. Single-mode fibers[M]. Berlin: Springer-Verlag, 1988: 20-30.
- [12] ACRAWAL G P. Nonlinear fiber optics[M]. Boston: Academic Press, 1989: 15-20.
- [13] LI H M, ZHANG Q H, TANG Y, *et al.* GB/T 22400-2008, rapid determination of melamine in raw milk High performance liquid chromatography method [EB/OL]. [2009-01-09]. [http://220.181.176.160/stdlinfo/servlet/com.sac.sacQuery.GjbzcxDetailServlet?std\\_code=GB/T%2022400-2008](http://220.181.176.160/stdlinfo/servlet/com.sac.sacQuery.GjbzcxDetailServlet?std_code=GB/T%2022400-2008) (in Chinese).
- [14] XU J G, WANG Z B. Analysis method of fluorescence[M]. 3rd ed. Beijing: Science Press, 2006: 137-139 (in Chinese).
- [15] ZOU B F, ZHANG Y Ch, HU Sh X. Study on the design of measuring organic aerosol fluorescence lidar[J]. Laser Technology, 2008, 32(3): 287-289 (in Chinese).
- [16] MA Y G, ZHU Ch Y, HE M X, *et al.* The experimental study about the diffusivities of amino acids in aqueous solution[J]. Laser Technology, 2005, 29(2): 145-147 (in Chinese).

(上接第 196 页)