

# 三维指纹荧光光谱在食品安全检测中的应用

## Detection of food safety using fluorescence fingerprint

### 一、三维指纹荧光光谱

荧光现象是指仅由特定波长的激发光照射到样品上，由此而产生的波长各异的光（荧光光谱），如图 1（左）所示。对于同一个样品来说，一个固定的激发波长，有多个发射峰，或对于同一个发射波长，有几个激发波长都能对其进行激发。因此，改变激发和发射波长，对样品进行扫描，可以得到三维荧光光谱，如图 1（右）。三维数据从上往下看，可观测到等高线图模式，能够将样品所有的荧光特性都表现出来。三维荧光光谱又被称为荧光指纹光谱（Fluorescence Fingerprint），通常，采集三维荧光光谱非常耗时，但 F7000 有全球最快的扫描速度-60000 nm/min，以 1 nm 为扫描间隔，仅需要 4 min 即可完成全波段三维荧光光谱的扫描。

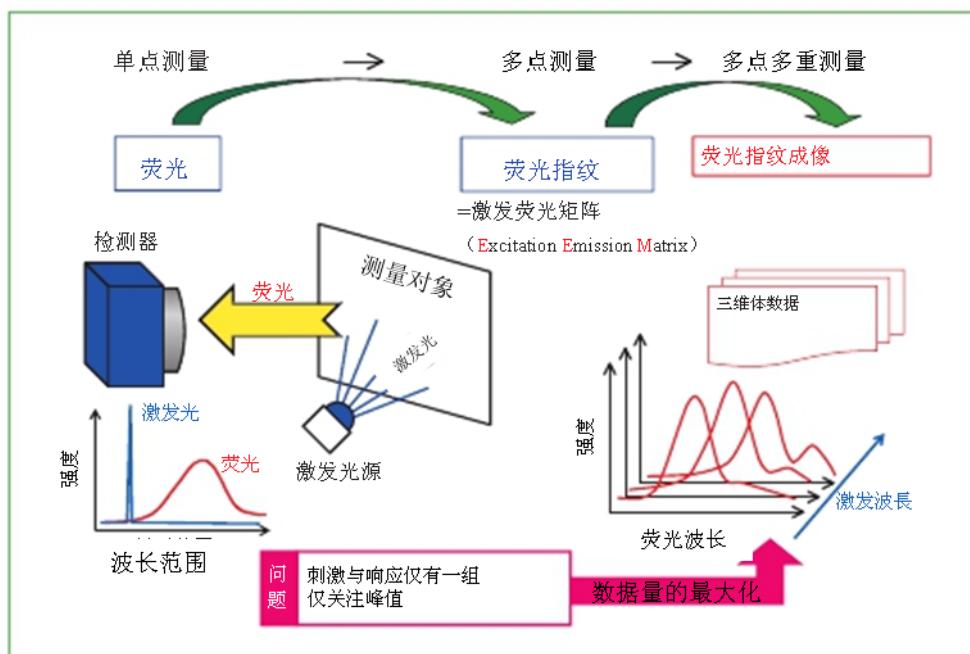


图 1 从荧光到荧光指纹

### 二、荧光光谱的处理

荧光指纹光谱的测量示例如图 2 左所示。图中，X 轴为发射波长，Y 轴为激发波长。在 45 度对角线上，激发波长等于发射波长，即所谓的散射光。根据测量原理，该散射光也有可能是其他激发波长与发射波长呈整数倍的位置（2 次光、3 次光...）。此外，根据斯托克斯定律，一般的发射波长要大于激发波长，在前述 45 度对角线的发射波长轴

一侧（图 2 对角线下侧）即为荧光指纹光谱。

由此，实际上用于数据解析的信息，是删除了不需要的信息，仅留下荧光指纹所必需的信息。也就是说，①除去比发射波长大的激发波长部分（从对角线靠近激发波长的部分），②除去 1 次、2 次、3 次…散射光，③需要删除噪声多灵敏度低的区域。进行如上前处理后，得到的荧光指纹区域如图 2 右所示。例中所示，原始数据为 5,041 点荧光强度值（Z 轴的数值），去除不需要的点后，剩余 2,063 个点。最终剩下的数据为离散数据，在 X 轴进行扫描后，得到一维向量，留作以后解析所用。

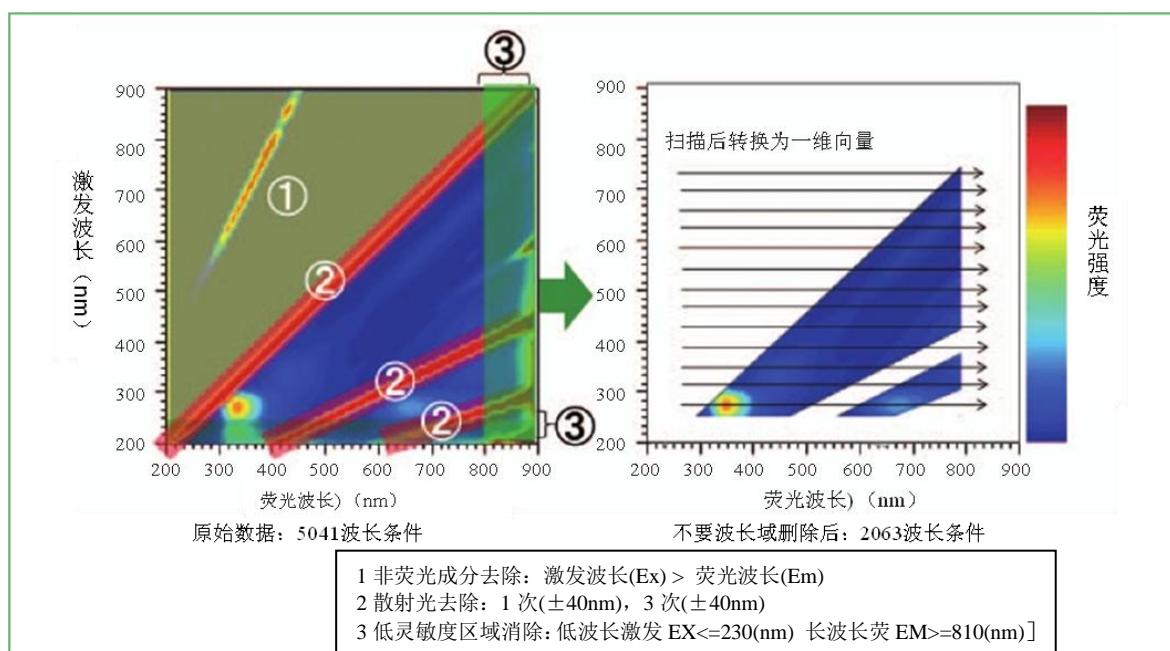


图 2 荧光指纹数据的处理

### 三、三维指纹荧光在小麦真菌毒素推断中的应用

真菌毒素包括脱氧萎镰菌醇 (Deoxynivalenol, DON)、瓜萎镰菌醇 (Nivalenol, NIV)、玉米烯酮 (Zearalenone, ZEA) 等。由于真菌毒素污染不仅会导致谷类产量品质不佳，摄取了污染谷物的人或动物也会发生呕吐、腹泻、头痛等症状，因此，开发一种针对真菌毒素污染的快速，简单的非破坏性检测方法是非常有意义的。

以真菌毒素污染的小麦为测量对象，分别在农田中红霉病毒的发病程度（低、中、高、非常高）不同的 4 块试验区采集样品，并粉碎为小麦粉待测。通过标准方法对真菌毒素的几种典型物质—DON、NIV、ZEA 的含量进行分析，DON 由液相色谱法进行测定；由于 NIV、ZEA 含量非常低，采用 LC/MS/MS 测定其含量。采用日立 F7000，采集三种物质的荧光指纹光谱，并进行 PLS 回归分析，通过荧光指纹信息可试着进行各真菌

## 毒素污染浓度的定量推断。

图 3 中，将 DON、NIV、ZEA PLS 回归分析预测的结果与实际测量的结果进行比较。在此，通过将荧光指纹测量与多变量解析相组合，使对小麦粉中的真菌毒素浓度的推断，以及对不同真菌毒素的同时定量成为了可能。

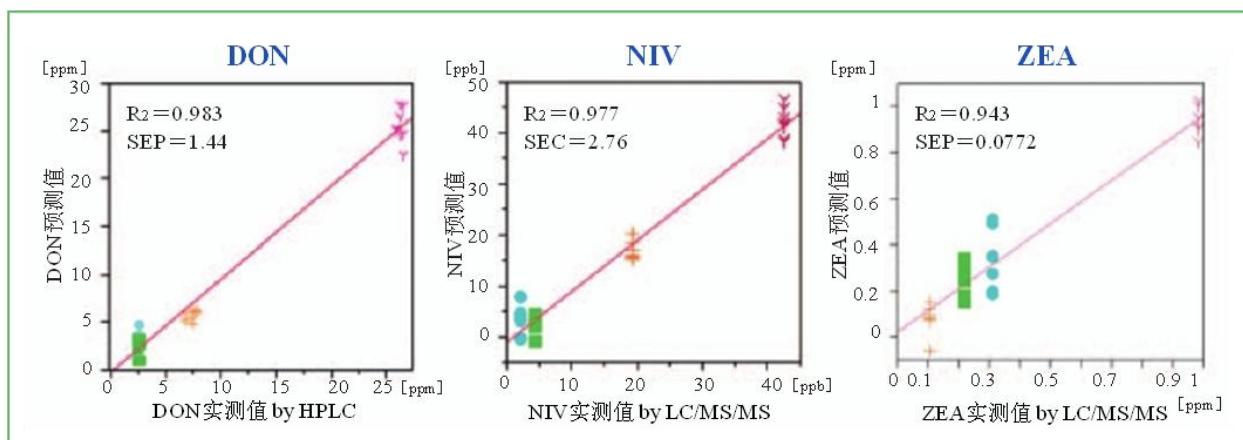


图 3 三种真菌毒素的同时推断（验证结果）

#### 四、三维指纹荧光在肉豆蔻中黄曲霉毒素推断中的应用

黄曲霉毒素是分布在热带与亚热带地区，由黄曲霉等霉菌生成的真菌毒素的一种，被认为是自然界中最强的致癌物质。本应用中，通过荧光指纹光谱，开发了无需繁琐前处理，即可简易，快速的检测肉豆蔻萃取液中黄曲霉毒素 B1 的方法。

将肉豆蔻粉碎以后，加入甲醇溶液（甲醇：水=8：2）振动提取，离心后取上层清液待测。在萃取液中添加黄曲霉毒素 B1 标准溶液（甲醇：水=8：2），制备成 0.0~4.0 ppb 的加标溶液（23 个浓度梯度），该溶液无需前处理，即可进行荧光指纹光谱的采集。为了找到荧光指纹光谱的最佳测量条件，本应用对透射测量与反射测量进行了比较（图 4）。

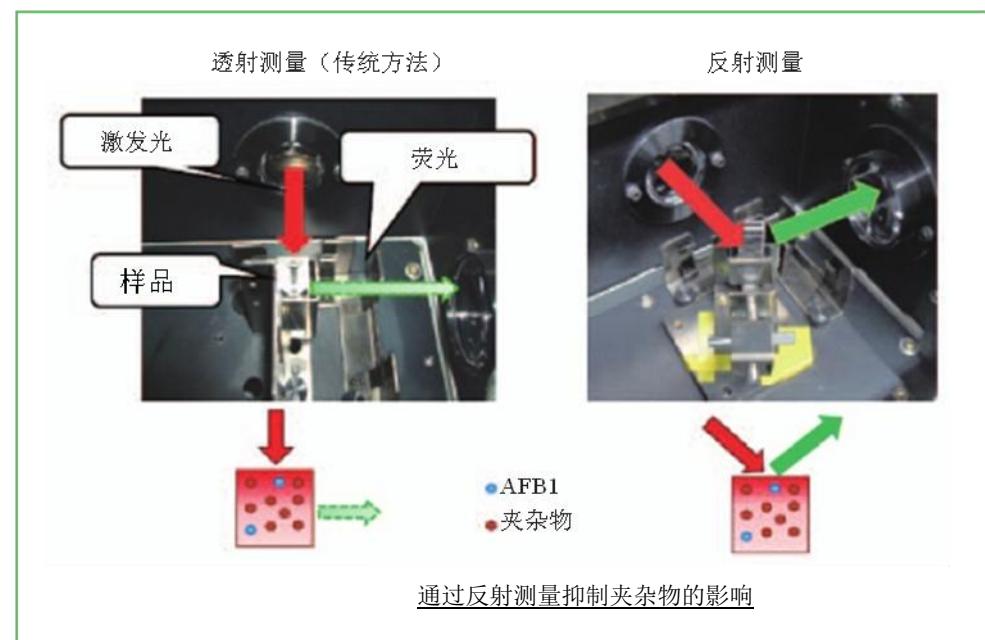


图 4 荧光指纹测量中的透射测量与反射测量

图 5 为不同测量条件下的荧光指纹光谱。图 5(a)中，由于仅是甲醇，所以基本看不到荧光信息；在其中添加黄曲霉毒素 B1(图 5(b))，能观察到黄曲霉毒素的特征荧光峰。然而，在肉豆蔻萃取液中添加黄曲霉毒素 B1，采用如图 4 所示的透射法，无法采集到黄曲霉毒素 B1 的特征荧光峰。主要原因是肉豆蔻萃取液中的色素吸收激发光，使激发光无法到达比色皿内部。而在反射法中，由于仅在比色皿表面发生荧光现象，所以可清晰的得到如图 5(d)所示的含有黄曲霉毒素信息的荧光指纹。因此，使用如图 5(d)所示的方法进行后续的实验。

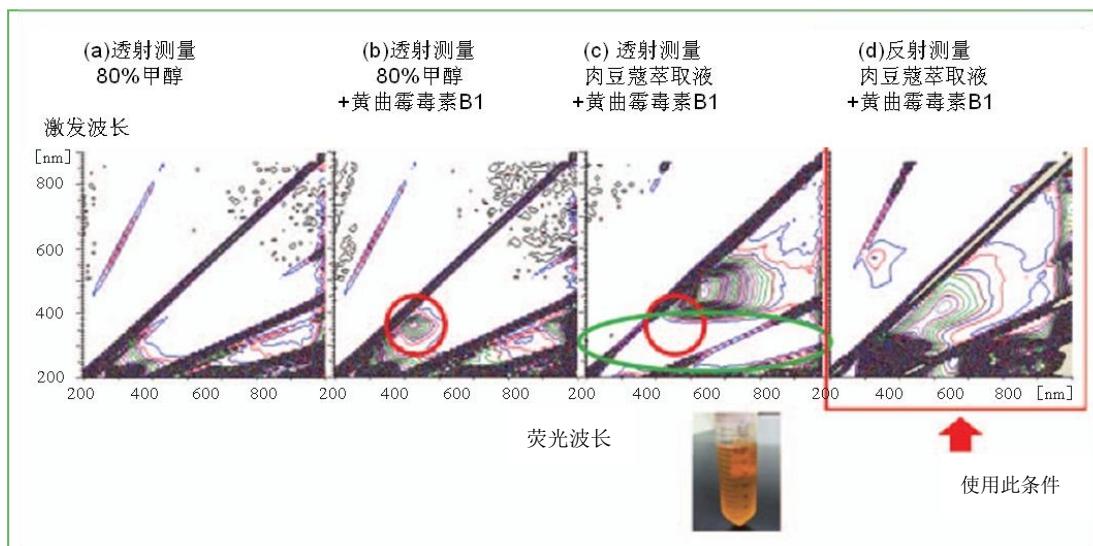


图 5 黄曲霉毒素 B1 的荧光指纹测量

将得到的荧光指纹数据进行 PLS 回归分析，以黄曲霉毒素 B1 的推测值为纵坐标，加入的黄曲霉毒素 B1 标准溶液的浓度为横坐标，可简单推测肉豆蔻萃取液中 ppb 级别的低浓度黄曲霉毒素 B1，如图 6。

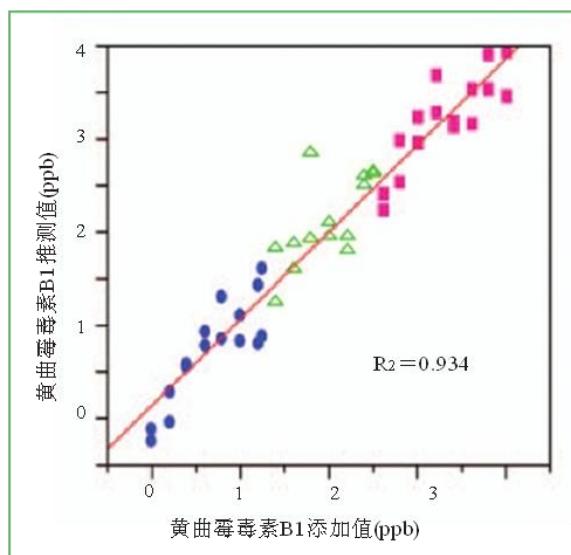


图 6 通过 PLS 回归分析进行的黄曲霉毒素 B1 浓度推测  
( ●△■表示的是 3 个阶段的浓度 )