

# 低场核磁共振技术快速检测鲜乳水分方法研究

刘颖, 曹佳佳, 章浩伟, 何亚金, 徐欣欣  
(上海理工大学医疗器械与食品学院, 上海 200093)

**摘要:** 运用低场核磁共振技术研究鲜乳变质过程中水分的变化规律, 选取反转恢复脉冲序列和Carr-Purcell-Meiboom-Gill序列测定鲜乳样品在不同贮藏时间的弛豫参数, 根据纵向弛豫时间 $T_1$ 、横向弛豫时间 $T_2$ 观测样品的水分含量, 并通过 $T_2$ 反演数据的拟合结果得出自由水和结合水的变化趋势。研究表明, 随着贮藏时间的延长直至鲜乳变质腐败, 鲜乳中的总水分先减少后增加, 其中自由水减少, 结合水先减少后增加。结果表明, 低场核磁共振技术可用于快速、有效地判定鲜乳的新鲜程度, 并有助于在鲜乳贮运过程中品质的实时监控。

**关键词:** 低场核磁共振; 弛豫时间; 自由水; 结合水; 快速检测

## Rapid Detection of Water Content in Fresh Milk by Low-Field Nuclear Magnetic Resonance

LIU Ying, CAO Jia-ji, ZHANG Hao-wei, HE Ya-jin, XU Xin-xin

(College of Medical Instrument and Food Sciences, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China)

**Abstract:** Low-field nuclear magnetic resonance (LF-NMR) was used to study the change of water content in fresh milk during the deterioration process. IR pulse sequence and carr-purcell-meiboom-gill (CPMG) pulse sequence were selected to determine relaxation parameters of fresh milk sample at different storage times. According to the collected relaxation time  $T_1$  and  $T_2$ , the water content of milk samples could be observed. Furthermore, the changing trends of free water and bound water were concluded by fitting  $T_2$  inversion data. This research showed that the total water content of fresh milk decreased firstly and then increased with the extension of storage time, among which the free water decreased continuously, and the bound water decreased initially and subsequently increased. The experimental results demonstrated that LF-NMR could be applied to determine the freshness of milk rapidly and efficiently, which will be beneficial to monitor the quality of fresh milk in real time during transportation or storage.

**Key words:** low-field nuclear magnetic resonance (LF-NMR); relaxation time; free water; bound water; rapid detection

中图分类号: TS207

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2014) 14-0093-04

doi:10.7506/spkx1002-6630-201414018

乳及乳制品含有丰富的营养物质<sup>[1]</sup>, 如人体日常所需的蛋白质、钙质、氨基酸、矿物质等, 且鲜乳作为所有乳制品的原料, 其质量直接影响乳制品的风味、感官指标、卫生指标以及营养价值, 需从根源上密切关注鲜乳的品质变化。可见, 如何快速、有效地检测鲜乳的新鲜度并对其品质进行监控具有重要的实际意义。

鲜乳是天然的培养基, 极易腐败变质, 而其变质过程中除非出现强烈异味, 否则难以觉察。鲜乳的含水量较高(约为87%), 且食品中的水分是引起食品化学性及微生物性变质的重要因素之一, 直接关系到食品的贮藏特性。所以, 鲜乳水分的快速检测可作为观察其新鲜度和变质腐败的有效途径。但在食品分析方法中, 水分

含量测定往往难以获得精确可靠的数据。传统测定水分含量的方法主要包括卡尔·费休法、近红外光谱法、电导测定法等, 但存在操作烦琐、费时、易受实验操作产生误差等缺点。而应用核磁共振技术对所测样品没有限制, 可实现快速无损检测, 在检测速度、准确度和灵敏度上都占有一定的优势<sup>[2-5]</sup>, 是测量食品中水分含量的理想手段。本研究采用低场核磁共振技术(磁场强度为0.5 T), 较高场磁共振仪造价低廉, 易于广泛应用到食品检测领域<sup>[6-8]</sup>。

本研究通过测定鲜乳样品的弛豫时间参数, 来观测鲜乳水分随贮藏时间延长的变化情况<sup>[9]</sup>。进一步反演、拟合 $T_2$ 数据, 探讨鲜乳在变质过程中水分的结合状态, 分

收稿日期: 2014-03-12

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(61101174); 上海理工大学核心课程建设项目;

教委卓越工程师培养计划项目; 大学生创新训练计划项目(XJ2013250)

作者简介: 刘颖(1980—), 女, 副教授, 博士, 研究方向为核磁共振技术。E-mail: ling2431@163.com

析对比自由水与结合水随鲜乳放置时间的变化趋势,从而快速、准确的判定鲜乳的新鲜程度,有助于在鲜乳运输或贮藏过程中品质的实时监控。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与试剂

盒装鲜乳 市购; 1 mL吸管(独立包装) 美国 Biologix公司; 吸水纸 日本小津产业株式会社; 8~12 mm硅胶试管塞 上海禾汽玻璃仪器有限公司。

### 1.2 仪器与设备

NMI20核磁共振分析仪(氢质子共振频率21.7 MHz, 主磁场强度0.5 T, 配套 $T_2$ -Inverter反演软件和10 mm×200 mm核磁共振专用测试管) 上海纽迈科技有限公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 低场磁共振测定水分原理

核磁共振(nuclear magnetic resonance, NMR)技术的基本原理是通过外加交变磁场激发处于静磁场中的原子核,使其自旋能级发生塞曼分裂,进而脱离静止、低能的平衡状态<sup>[10]</sup>。在停止射频脉冲后,原子核从非平衡状态恢复至平衡状态,其纵向磁化矢量方向和横向磁化矢量方向恢复平衡所用的时间,即为研究中重要磁共振参数:纵向弛豫时间 $T_1$ 和横向弛豫时间 $T_2$ <sup>[11-12]</sup>。食品中水分的研究基于低场核磁共振的工作原理,利用水分子中氢原子核在磁场中的活动特性,分析研究食品的水分变化情况<sup>[13-15]</sup>。水分含量的多少直接影响着组织的平均弛豫时间<sup>[16]</sup>,弛豫时间越短表明水分子与大分子结构结合越紧密,弛豫时间越长表明水分子越自由<sup>[17]</sup>。综合分析纵向弛豫时间 $T_1$ 和横向弛豫时间 $T_2$ 所提供的水分子结合力和流动性质等信息<sup>[18]</sup>,可进一步观测自由水与结合水的存在状态。

#### 1.3.2 测定鲜乳水分的脉冲序列选取

在食品研究领域中最常用的磁共振方法是检测样品<sup>1</sup>H质子的弛豫时间 $T_2$ ,因为其用时较短,可同时得到样品中多种组分的信息。但当横向弛豫时间 $T_2$ 检测不能得到所有需要信息时,如水分子的结合性和流动性等信息,可利用纵向弛豫时间 $T_1$ 进行辅助检测,进一步分析样品中各成分与周围环境的特征,得到所需信息<sup>[19]</sup>。在核磁共振系统中通过射频脉冲产生射频磁场,从而驱动激发磁化矢量,产生核磁共振信号的动力源。所以,不同射频脉冲形式所产生的作用是不同的。在食品研究中,测量横向弛豫时间 $T_2$ 常用的脉冲序列有硬脉冲FID序列、硬脉冲回波序列和Carr-Purcell-Meiboom-Gill(CPMG)序列等;测量纵向弛豫时间 $T_1$ 常用的脉冲序列

是反转恢复脉冲(inversion-recovery, IR)序列和饱和恢复脉冲(saturation-recovery, SR)序列等。

在本研究中,测量纵向弛豫时间 $T_1$ 序列脉冲的选取考虑到SR序列虽然要求的采集数据相对较少,但计算结果精确度相对较差。所以选用IR序列测量纵向弛豫时间 $T_1$ 值。在选取脉冲序列测量横向弛豫时间 $T_2$ 时,因CPMG脉冲序列能够克服磁场不均匀性及分子扩散效应所产生的影响<sup>[20]</sup>,且实验对象为鲜乳,其中水分含量约占87%,弛豫速度相对较慢,克服了CPMG脉冲序列难以测试衰减速度较快物质的缺点<sup>[21]</sup>,可采集到完整的数据信号,并准确地测得样品的横向弛豫时间 $T_2$ 值。

#### 1.3.3 鲜乳的取样与贮藏

将刚生产的市售盒装鲜乳迅速带至实验室进行取样,采用独立包装的巴氏吸管滴取1 mL鲜乳至核磁专用检测管中,避免取样过程中交叉污染引起鲜乳样品的变质。用硅胶试管塞密封,防止样品中水分的自然蒸发和外界潮湿空气对实验结果产生影响。将样品置于射频线圈中心,在30℃的低场磁共振仪恒温箱的条件下,在贮藏0、24、48、72、96 h后分别测定样品的弛豫特征值。实验取3份平行,编号为1~3号,每份平行测5次,测得弛豫参数的平均值。

#### 1.3.4 NMR弛豫时间测定

利用反转恢复脉冲IR序列和硬脉冲CPMG序列测定样品的纵向弛豫时间 $T_1$ 和横向弛豫时间 $T_2$ ,使样品中心、射频线圈中心和磁体中心保持在同一位置。IR实验采用的参数:重复时间(repetition time,  $T_R$ ) 1 000 ms、采样点数(number of data points, TD) 1024、谱宽(spectral width, SW) 100 kHz、累加采集次数(number of signal, NS) 16,逐步改变反转时间记录累加数据的傅里叶变换频谱峰值,利用 $T_1$ 拟合程序得到 $T_1$ 测量值。CPMG实验采用的参数:90°射频时间(P1) 16 μs、180°射频时间(P2) 32 μs、90°和180°射频之间的时间间隔(D1) 100 μs、回波点数(C1) 32,利用 $T_2$ 拟合程序进行双组分拟合得到 $T_2$ 测量值。每间隔24 h测定样品的弛豫时间 $T_1$ 、 $T_2$ ,考察弛豫参数的变化,分析样品中水分变化和结合状态。

## 2 结果与分析

### 2.1 鲜乳水分弛豫时间的变化趋势

采用反转恢复脉冲IR序列及CPMG脉冲序列分别测定1~3号鲜乳样品的纵向弛豫时间 $T_1$ 、横向弛豫时间 $T_2$ ,得到3组鲜乳样品的弛豫参数 $T_1$ 、 $T_2$ 的平均值随贮藏时间延长的变化过程如图1所示。

从图1可观察到纵向弛豫时间 $T_1$ 随时间的延长呈现“倒抛物”形态,即纵向弛豫时间先增大后减小。对比

分析表1中 $T_1$ 数据可得, 鲜乳在贮藏48 h后, 纵向弛豫参数 $T_1$ 增大到800 ms左右, 随后又出现明显减小趋势下降至700 ms左右。在最初的48 h内,  $T_1$ 快速增大, 而在48~96 h内 $T_1$ 不断减小, 并且最终的 $T_1$ 值大于初始值。纵向弛豫时间 $T_1$ 可以从分子角度阐明氢质子所处环境, 在0~48 h内纵向弛豫时间 $T_1$ 变长表示自由水含量更占优势; 在48~96 h内纵向弛豫时间 $T_1$ 变短表示结合水比例逐渐增大。同时, 纵向弛豫时间 $T_1$ 值的大小与以拉莫尔频率移动的氢质子数目呈反比, 因此可推测出鲜乳中总水量先减小后增加。

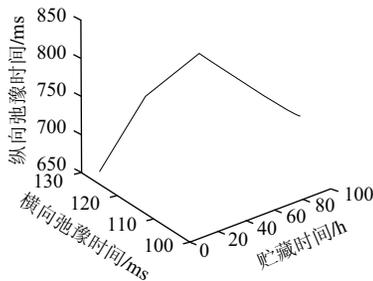


图1 弛豫时间 $T_1$ 、 $T_2$ 与贮藏时间之间的关系

Fig.1 Relationship between  $T_1$  or  $T_2$  relaxation time and storage time

表1 1~3号样品在不同贮藏时间的 $T_1$ 值

Table 1  $T_1$  values of samples No.1, 2 and 3 during different storage times

时间/h	纵向弛豫时间 $T_1$ /ms			
	1号样品	2号样品	3号样品	平均值
0	685.7	669.8	643.0	666.17
24	764.8	761.6	757.8	761.40
48	818.6	819.1	804.2	813.97
72	764.8	787.3	744.9	765.67
96	719.7	739.9	721.6	727.07

表2 1~3号样品在不同贮藏时间的 $T_2$ 值

Table 2  $T_2$  values of samples No. 1, 2 and 3 during different storage times

时间/h	横向弛豫时间 $T_2$ /ms			
	1号样品	2号样品	3号样品	平均值
0	125.41	125.44	124.17	125.01
24	121.30	121.34	121.42	121.35
48	116.36	116.18	116.05	116.20
72	110.05	110.45	109.63	110.04
96	106.12	107.59	106.44	106.72

为了进一步研究不同自由度的氢质子在物质内部的情况, 由图1观察到3组鲜乳的横向弛豫时间 $T_2$ 随时间逐渐递减, 从表2的 $T_2$ 实验数据可知, 3组鲜乳样品的横向弛豫时间 $T_2$ 在96 h内由125 ms左右持续缩短至106 ms左右,  $T_2$ 值的减小表明水分中氢质子的自由度不断降低。

结合纵向弛豫时间 $T_1$ 的变化情况进行综合分析, 鲜乳样品在0~48 h内,  $T_2$ 值减小则氢质子自由度降低, 表示自由水比例减小, 而同时 $T_1$ 变长表示鲜乳中自由水比例仍大于结合水比例; 在48~96 h内,  $T_2$ 值仍然减小则氢

质子自由度持续降低, 自由水比例继续减小, 且 $T_1$ 变短表示鲜乳中结合水比例增大。

## 2.2 鲜乳水分的不同结合状态

由于弛豫时间信号 $T_1$ 、 $T_2$ 反映的是鲜乳样品内部处于不同环境中的氢质子弛豫信号的总和, 为了更直观、详细地了解各种环境下氢质子的弛豫情况, 对采集到的横向弛豫时间 $T_2$ 数据进行反演<sup>[22]</sup>。以1号试管为样例, 将鲜乳样品的横向弛豫时间 $T_2$ 数据导入 $T_2$ -Inverter反演软件中进行反演计算, 得到结合水和自由水质子密度图谱 $T_{21}$ 、 $T_{22}$ 。将不同时期的自由水质子密度 $T_{21}$ 和结合水质子密度 $T_{22}$ 数据进行拟合处理, 绘制成图2所示的反演信号趋势图。由于2号、3号样品的反演信号的拟合趋势与1号样品一致, 故直接选取1号样品拟合曲线所表示的样品信息进行分析。

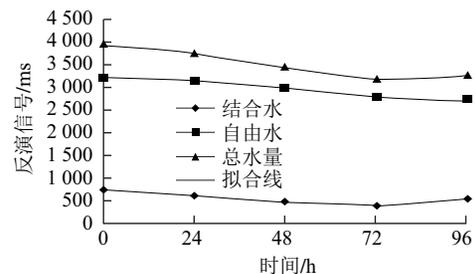


图2 1号样品自由水、结合水及总水量反演信号趋势

Fig.2 Trends of free water, bound water and water content in sample No. 1

弛豫时间 $T_{21}$ 其质子密度较低, 代表与大分子结合较紧密的质子, 可反映结合水的变化情况。弛豫时间 $T_{22}$ 其质子密度较高, 代表自由度大的质子, 可反映自由水的变化情况。由图2可观察到, 结合水质子密度 $T_{21}$ 呈先降低后升高的趋势, 自由水质子密度 $T_{22}$ 呈现不断下降的趋势。在鲜乳的变质过程中, 当其含有的动物体抗菌物质减少或消失后, 存在于鲜乳中的微生物如乳链球菌、乳酸杆菌、大肠杆菌和一些蛋白质分解菌等开始生长繁殖<sup>[23]</sup>。在0~72 h内, 乳酸链球菌的生长占优势, 在乳酸菌、酵母菌和水的作用下, 加速分解乳糖和其他糖类产生乳酸, 自由水含量快速减少。同时, 蛋白质在遇酸和蛋白质分解菌的共同作用下发生变质, 蛋白质分子表面的亲水基团以氢键紧密结合的结合水分子层消失, 结合水含量逐渐减少。在72~96 h内, 鲜乳中的乳糖含量已基本消耗, 脂肪含量相对较高, 在脂肪酶的催化作用下逐次水解, 自由水含量持续减少。并伴随着如芽孢杆菌、假单胞菌、变形杆菌等腐败细菌的生长繁殖, 吸收水分转化为细菌细胞体内的结合水, 结合水含量增加。

为了进一步观测总含水量的变化趋势, 对每组对应的自由水与结合水反演信号叠加后得到总水分的反演信号值, 并通过对总水分反演信号值进行拟合, 得到鲜乳中水分随贮藏时间延长的变化趋势。由图2中拟合得到的

总水量关于时间变化的曲线,可以观察到含水量的反演信号值从4 000 ms左右起始呈现下降趋势,且在0~48 h时间段内下降趋势明显,随着贮藏时间的延长,下降速度变得平缓,在72 h之后总水分反演信号值出现小幅回升,但96 h的反演信号值远小于0 h的初始值。可见,鲜乳中总水量随贮藏时间的延长直至鲜乳变质的过程中呈现先快速减少后小幅增加的趋势。总体而言,鲜乳腐败变质时的总水量较其新鲜时明显减少。

采集鲜乳样品及其存放96 h后的横向弛豫时间 $T_2$ 数据并反演得到结合水质子信号 $T_{21}$ 、自由水质子信号 $T_{22}$ ,测得3份样品信号幅值的均值,分析对比新鲜牛乳与变质牛乳的结合水与自由水信号比例变化如图3所示。

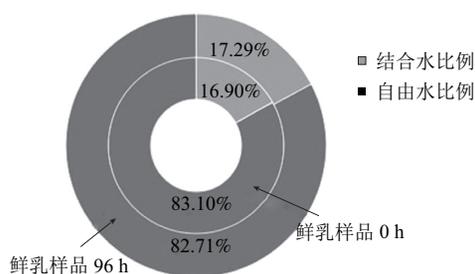


图3 样品自由水与结合水比例对比 (0 h和96 h)

Fig.3 Comparison of bound water and free water proportion (0 and 96 h)

表3 样品自由水与结合水反演信号及比值(0 h和96 h)  
Table 3 Signal ratio of bound water to free water (0 and 96 h)

	样品信号幅值均值	
	0 h	96 h
结合水	675.07	564.57
自由水	3 313.01	2 698.77
比值	0.204	0.210

由图3中的数据并结合前文弛豫时间 $T_1$ 、 $T_2$ 检测法得到的实验结果,分析可得结合水在牛乳含水量中的比例增大,自由水在牛乳含水量中的比例减小。根据表3对比可知,变质腐败的牛乳较新鲜牛乳而言,结合水与自由水反演信号幅值的比值较大。所以,结合水与自由水的比值可以作为牛乳品质监测及快速检测牛乳腐败的依据。

### 3 结论

鲜乳是天然的培养基,在贮藏过程中受微生物的影响极易发生腐败变质,且内部物质成分变化复杂,从而引发鲜乳水分结构和流动性的不断变化。本研究主要利用低场核磁共振技术检测鲜乳水分随贮藏时间延长的变化情况,和传统的乳制品水分检测方法相比,低场核磁共振检测方法具有以下优势:快速无损的检测手段,在检测过程中不会对食品的品质、风味等各方面因素造成任何的影响;实验操作方便,实验的可重复性比较高且

精确度高;受样本大小和外观色泽的影响较小,只需少量样本便可测定该食品的品质状况;通过宏观检测提供分子和质子水平的信息,可更方便快捷地研究样品分子环境。结果表明:鲜乳在变质过程中的总水分先减少后增加,其中自由水减少,结合水先减少后增加。该研究有助于鲜乳在贮藏过程中快速检测和品质监控,为乳制品行业及相关监管部门监测、控制和评价鲜乳的品质提供了新的研究思路 and 有效手段,并为进一步研究牛乳掺水、鲜乳的货架期、运输过程中鲜乳的验收及质量评价等问题提供了理论依据。

### 参考文献:

- [1] 孙涛,尹京苑,韩奕奕,等. 生鲜乳质量变化规律及其影响因素研究[J]. 食品科学, 2013, 34(11): 94-99.
- [2] CHALAND B, MARIETTE F, MARCHAL P, et al. H nuclear magnetic resonance relaxometric characterization of fat and water states in soft and hard cheese[J]. Journal of Dairy Research, 2000, 67(4): 609-618.
- [3] LINDON J C, TRANTER G E, KOPPENAAAL D. Encyclopedia of spectroscopy and spectrometry[M]. 2th ed. United Kingdom: Academic Press, 2010: 212-287.
- [4] HANNE C B, IDA K S, JENS A J, et al. Relationship between water mobility and distribution and sensory attributes in pork slaughtered at an age between 90 and 180 days[J]. Meat Science, 2007, 77(2): 190-195.
- [5] ISHIDA N, TAKANO H, NAITO S, et al. Architecture of baked breads depicted by a magnetic resonance imaging[J]. Magnetic Resonance Imaging, 2001, 19(6): 867-874.
- [6] 彭树美,林向阳,阮榕生,等. 核磁共振及成像技术在食品工业中的应用[J]. 食品科学, 2008, 29(11): 712-716.
- [7] 陈臣,郭本恒. 核磁共振技术在乳制品研究中的应用[J]. 中国乳品工业, 2007, 35(7): 32-35.
- [8] TINA S, MARIE T S, NANNA V, et al. Water mobility in acidified milk drinks studied by low-field  $^1\text{H}$  NMR[J]. International Dairy Journal, 2007, 17(4): 294-301.
- [9] HENRIK T P, LARS M, SIREN B E. Low-field  $^1\text{H}$  nuclear magnetic resonance and chemometrics combined for simultaneous determination of water, oil, and protein contents in oilseeds[J]. Journal of American Oil Chemists' Society, 2000, 77(10): 1069-1077.
- [10] 赵喜平. 磁共振成像系统的原理及其应用[M]. 北京: 科学出版社, 2000: 12-35.
- [11] 杜美红,孙永军. 低分辨核磁共振技术在食品安全分析检测中的应用[J]. 食品工业科技, 2013, 34(21): 374-376.
- [12] ISABEL S A, ICIAR M, JAVIER S V, et al. Estimation of freezing storage time and quality changes in hake (*Merluccius merluccius* L.) by low field NMR[J]. Food Chemistry, 2012, 135(3): 1626-1634.
- [13] AYLIN A, MECIT H O, KATHRYN L M, et al. Monitoring changes in feta cheese during brining by magnetic resonance imaging and NMR relaxometry[J]. Journal of Food Engineering, 2011, 107(2): 200-207.
- [14] 李政,李苗云,赵改名,等. 冻融循环下鸡肉品质变化的低场核磁共振研究[J]. 食品科学, 2013, 34(11): 58-61.
- [15] SHAO Xiaolong, LI Yunfei. Application of low-field NMR to analyze water characteristics and predict unfrozen water in blanched sweet corn[J]. Food and Bioprocess Technology, 2013, 6(6): 1593-1599.
- [16] 阮榕生,林向阳,张锦胜,等. 核磁共振技术在食品和生物体系中的应用[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2009: 25-67.
- [17] 陈卫江,林向阳,阮榕生,等. 核磁共振技术无损快速评价食品水分的研究[J]. 食品研究与开发, 2006, 27(4): 125-127.
- [18] SHARIFUDIN M S, KEVIN P N, LAURANCE D H. Combination of NMR and MRI quantitation of moisture and structure changes for convection cooking of fresh chicken meat[J]. Meat Science, 2006, 72(3): 398-403.
- [19] 范明辉,范崇东,王淼. 利用脉冲NMR研究食品体系中的水分性质[J]. 食品与机械, 2004, 20(2): 45-48.
- [20] 林婉瑜,林晶晶,林向阳,等. 利用核磁共振技术研究食盐对鱼糜加工的影响[J]. 食品科学, 2013, 34(5): 105-109.
- [21] BERTRAM H C, KARLSSON A H, ANDERSEN H J. The significance of cooling rate on water dynamics in porcine muscle from heterozygote carriers and non-carriers of the halothane gene—a low-field NMR relaxation study[J]. Meat Science, 2003, 65(4): 1281-1291.
- [22] 周航,李保国,汪红志,等. 利用 $^1\text{H}$ -NMR技术建立植物蛋白饮料品质监控系统[J]. 食品与发酵工业, 2011, 37(1): 133-136.
- [23] 杨洁彬. 食品微生物学[M]. 2版. 北京: 中国农业大学出版社, 1995: 201-207.