

T/XJZJXH

新疆维吾尔自治区质量检验检测协会团体标准

T/XJZJXH 0004—2024

牛奶中糠氨酸的快速测定方法 拉曼光谱法

The qualitative determination of furosine in milk by surface-enhanced laser
raman spectrometry

2024 - 07 - 24 发布

2024 - 07 - 25 实施

目 次

前言	II
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 原理	1
5 试剂和材料	1
6 仪器和设备	1
7 测定步骤	2
8 结果计算	3
9 检测方法灵敏度、准确度、精密度	3
附录 A（资料性） 标准物质色谱图及出峰时间	4

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件由新疆农业科学院农业质量标准与检测技术研究所提出。

本文件由新疆维吾尔自治区质量检验检测协会归口并组织实施。

本文件起草单位：新疆农业科学院农业质量标准与检测技术研究所。

本文件协作单位：新疆畜牧科学院畜牧业质量标准研究所。

本文件主要起草人：刘圣红、马玉娥、何茜、郭万慧、周晓龙、马磊、孙小惠、古丽斯坦·阿布都拉、郑伟华、姜娜。

本文件实施应用中的疑问，请咨询新疆农业科学院农业质量标准与检测技术研究所。

对本文件的修改意见建议，请反馈至新疆农业科学院农业质量标准与检测技术研究所（新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市沙依巴克区南昌路403号）。

新疆农业科学院农业质量标准与检测技术研究所 联系电话：0991-4502172；传真：0991-4502172；
邮编：830091

牛奶中糠氨酸的快速测定方法 拉曼光谱法

1 范围

本文件规定了利用拉曼光谱法快速检测牛奶中糠氨酸的原理、试剂和材料、仪器和设备、测定步骤、结果计算及检测方法。

本文件适用于生鲜牛乳、巴氏杀菌乳、UHT高温灭菌乳中糠氨酸的快速检测。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

牛乳试样经盐酸水解后测定蛋白质含量，水解液经稀释后直接用于测定。样品中的糠氨酸分子与表面增强试剂混合后，分子吸附在表面增强纳米颗粒上，其拉曼散射信号可增强 10^6 倍以上，使用便携式激光拉曼检测仪可自动判别其特征峰并定性检测出糠氨酸。通过对测定的拉曼谱图进行基线调整和归一化处理，应用外标法可完成牛乳样本中糠氨酸的定量分析。

5 试剂和材料

以下所有试剂，除特别注明者外，均为分析纯试剂，实验用水应符合 GB/T 6682中规定的一级水要求。

5.1 糠氨酸标准品

CAS 19746-33-9，纯度大于99.5%。

5.2 表面增强试剂

金纳米溶胶。

5.3 无机盐离子团聚剂

1.0 M 盐酸溶液。

5.4 糠氨酸标准储备溶液

将糠氨酸标准品按标准品证书提供的肽纯度系数（Net Peptide Content）换算，用3 mol/L盐酸溶液配置成标准储备液。-20℃条件下可储存24个月。

示例：糠氨酸标准品证书上标注肽纯度系数为69.1%，则称取7.24 mg糠氨酸标准品，用3.0 mol/L盐酸溶液溶解并定容至10.0 mL，标准储备液的浓度为500.0 mg/L。

5.5 柠檬酸钠溶液

准确称取1 g柠檬酸钠，溶于水中，定容至100 mL，柠檬酸钠溶液的浓度为1%。

6 仪器和设备

6.1 激光拉曼光谱仪

仪器参考条件：激光波长785 nm，激光功率200 mW，积分时间5秒，平均次数2次。

6.2 微波消解仪

微波消解仪配有聚四氟乙烯消解内罐。

6.3 微波消解管

微波消解管的量程为30 mL。

6.4 分析天平

分析天平的感量为0.001 g，0.0001 g。

6.5 移液枪

移液枪的量程为5 mL。

6.6 冷藏冰箱

储藏温度范围为4°C~10°C。

7 测定步骤

测定步骤包括采样、样品制备、定性检测、定量检测。

7.1 采样

用于检测的巴氏杀菌乳和运输温度为2°C~6°C，UHT灭菌乳储存和运输温度不高于25°C。

按GB/T 10111的规定取不少于250.0 mL样品，样品不应受到破坏或者再转运和储藏期间发生变化。监督抽查或仲裁检验等采样应到加工厂抽取成品库的代销产品，1周内测定。

7.2 样品制备

7.2.1 金纳米粒子的合成

准确量取2.424 mL浓度为1%的HAuCl₄溶液加入50.0 mL水中，加热煮沸。再加入1.5 mL浓度为1%的柠檬酸钠溶液，继续加热30 min，冷却至室温，即可使用。金纳米粒子的扫描电镜图和紫外吸收图参见附录A中图A1。

7.2.2 试样水解液的制备

称量1.000 g（准确至0.001 g）牛奶样品，倒入聚四氟乙烯消解管中，加入10.0 mL浓度为8 N的盐酸溶液，酸水解牛奶样品，同时做试剂空白实验，盖消解管专用盖后将消解管安装至支架上，放入微波消解仪，按表1中的升温程序进行微波消解，消解完成后冷却至室温，定容至25.0 mL，过0.22 μm水相滤膜，取滤液供上机测定。

表1 微波消解程序

升温时间/min	消解温度/°C	保持时间/min
7	120	5
5	150	5
5	180	30

7.3 定性检测

在玻璃测试管中依次加入0.20 mL待测液、0.05 mL无机盐团聚剂和0.20 mL 表面增强试剂，混匀后开始上机检测。根据谱图中904 cm⁻¹、1074 cm⁻¹、1150 cm⁻¹和1453 cm⁻¹处特征拉曼光谱，对牛奶中的糠氨酸进行评估：如同时存在上述特征峰，则可判定样品中含有糠氨酸；否则，不能证明样品中含有糠氨酸，需要进一步实验验证。牛奶中糠氨酸定性测定表面增强拉曼光谱图参见附录A中A2。

7.4 定量检测

对测定的拉曼谱图进行基线调整和归一化处理，操作如下：

- a) 首先将测定的拉曼光谱数据进行基线调整。
- b) 以糠氨酸特征峰 1150 cm^{-1} 作为定量特征峰，对糠氨酸特征拉曼峰进行归一化处理。
- c) 归一化后得到的特征拉曼峰的峰面积可根据当次实验中糠氨酸标品特征峰测得的标准曲线进行定量。牛奶中糠氨酸定量测定表面增强拉曼光谱图参见附录 A 中 A3-4。

8 结果计算

按式（1）计算样品中糠氨酸含量。

$$X = \frac{c \times V \times V_1}{V_2 \times m} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

- X —试样中糠氨酸含量，单位为微克每千克（ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）；
 c —从标准曲线得到的糠氨酸的浓度，单位为微克每升（ $\mu\text{g}/\text{L}$ ）；
 V —样品定容体积，单位为毫升（ mL ）；
 V_1 —加液体积，单位为毫升（ mL ）；
 V_2 —取液体积，单位为毫升（ mL ）；
 m —称取试样的质量，单位为克（ g ）。

9 检测方法灵敏度、准确度、精密度

本检测方法的灵敏度、准确度、精密度要求如下：

9.1 灵敏度

本方法检出限为 $0.05\text{ mg}/\text{kg}$ ，定量限为 $0.1\text{ mg}/\text{kg}$ 。

9.2 准确度

本方法在 $0.5\text{ mg}/\text{L}$ ~ $50.0\text{ mg}/\text{L}$ 添加浓度水平上的回收率为 70% ~ 120% ；

9.3 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 15% 。

附录 A
(资料性)
标准物质色谱图及出峰时间

A.1 金纳米粒子的紫外吸收见图 A.1。

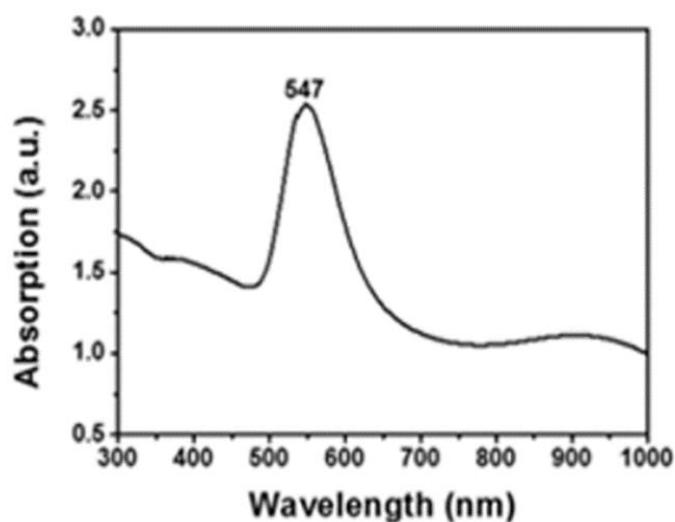


图 A.1 金纳米粒子紫外吸收图

A.2 糠氨酸表面增强拉曼光谱见图 A.2。

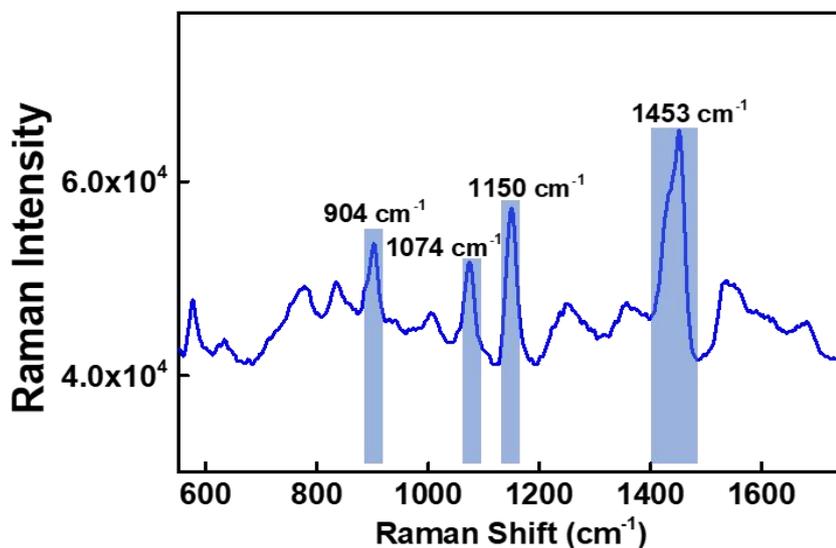


图 A.2 糠氨酸表面增强拉曼光谱图

A.3 不同浓度糠氨酸拉曼光谱图 A.3。

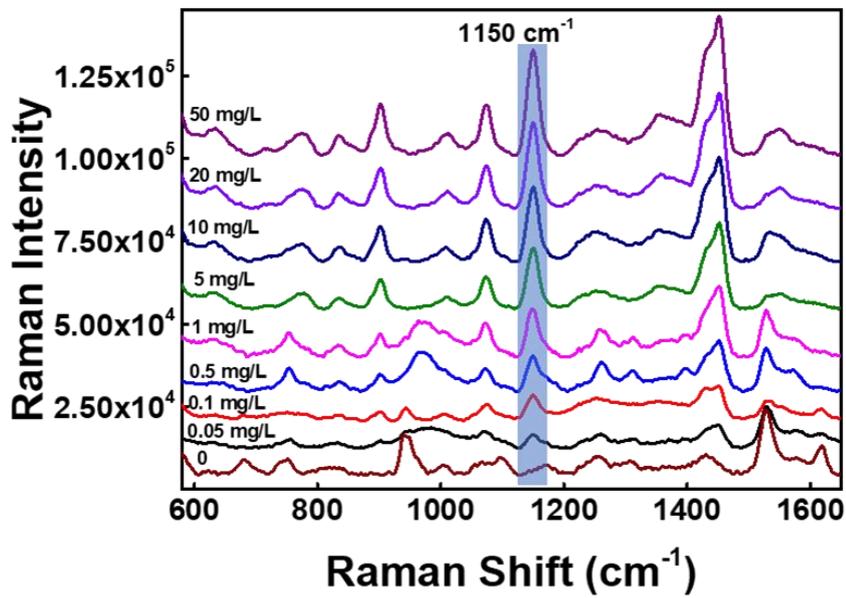


图 A.3 不同浓度糠氨酸标准品拉曼光谱图

A.4 不同浓度糠氨酸拉曼光谱标准曲线图 A.4。

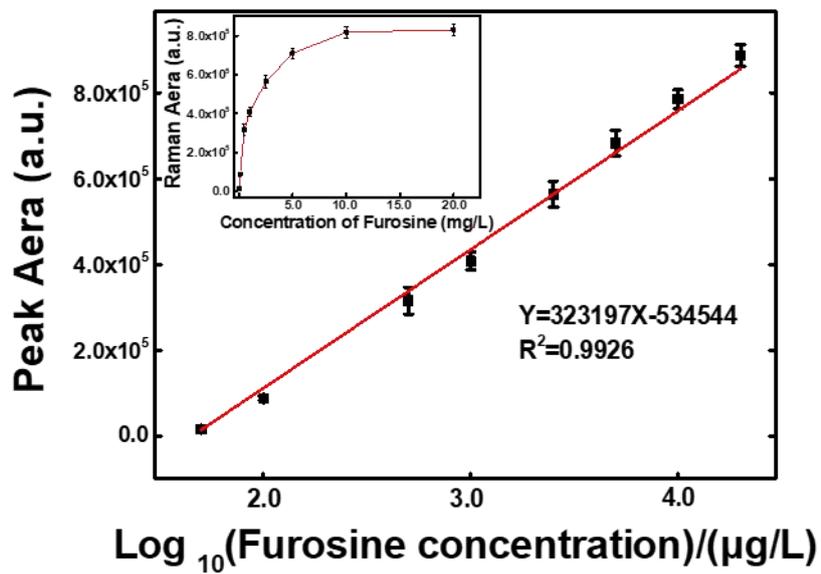


图 A.4 不同浓度糠氨酸拉曼光谱标准曲线图

A.5 牛奶中糠氨酸回收加标拉曼图谱见图 A.5。

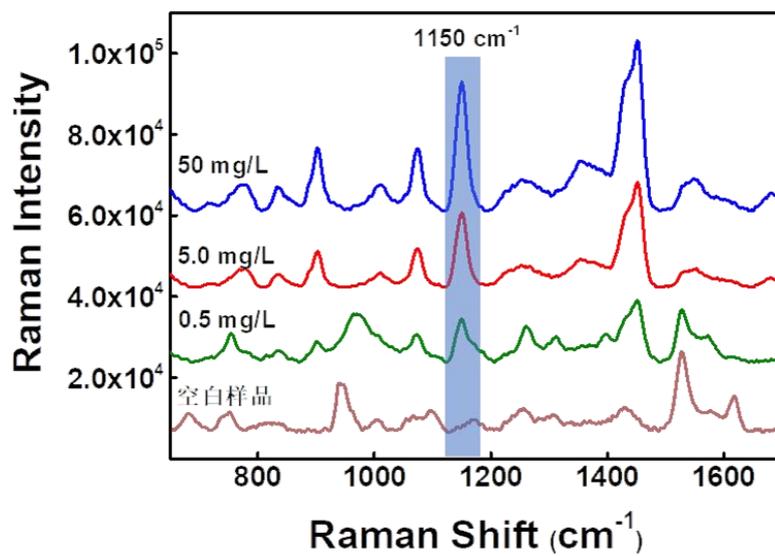


图 A. 5 牛奶中糠氨酸回收加标拉曼图谱