

表面增强拉曼光谱法快速测定液态乳中三聚氰胺方法的研究和评价

张 渊¹, 夏婧竹², 于 爽², 徐春祥^{1*}

(1. 江苏省食品药品监督检验研究院, 南京 210008; 2. 南京简智仪器设备有限公司, 南京 210049)

摘 要: **目的** 建立便携式拉曼光谱法定性检测液态乳中三聚氰胺的快速检验方法。**方法** 选择市场上有代表性的拉曼光谱仪, 确定检测方法。探究增强试剂、常见的添加剂及原料对检测结果的影响以及三聚氰胺类似物对检测结果的影响, 确定方法的适用范围并被验证。对指定的 3 家验证机构进行方法验证。**结果** 5 家企业的快速检测产品中有 3 家在验证中完全满足方法的性能指标, 1 家企业的产品的 2 次验证实验中有 1 次不符合方法的性能指标, 1 家企业的产品 3 次验证实验中有 2 次不符合方法的性能指标。3 次不符合方法的性能指标的验证实验仅在灵敏度上略差。**结论** 本方法各项性能指标符合要求, 可以应用于液态乳中三聚氰胺的快速检测。

关键词: 表面增强拉曼光谱; 三聚氰胺; 牛奶

Research and evaluation of surface enhanced Raman spectroscopy in the rapid determination of melamine in liquid milk

ZHANG Yuan¹, XIA Jing-Zhu², YU Shuang², XU Chun-Xiang^{1*}

(1. Jiangsu Institute for Food and Drug Control, Nanjing 210008, China;
2. S & S Instrument (Nanjing) Co., Ltd, Nanjing 210049, China)

ABSTRACT: Objective To establish a fast method for the qualitative determination of melamine in liquid milk by portable Raman spectrometric. **Methods** The representative Raman spectrometer on the market was selected, and the detection method was determined. The influence of reinforcing reagent, common additives and raw materials on the test results and the influence of melamine analogues on the test results were explored, and the applicable scope of the method were determined and verified. The method validation was performed for the three specified verification agencies. **Results** Among the rapidly tested products, three out of five enterprises fully met the performance indexes of the method in the verification. One enterprise's products failed to meet the performance index of the method in two verification experiments. Two enterprise's products failed to meet the performance index of the method in three verification experiments. The three verification experiments of performance indexes that do not conform to the method were only slightly less sensitive. **Conclusion** The method can be applied to the rapid detection of melamine in liquid milk.

KEY WORDS: surface enhanced Raman spectroscopy; melamine; milk

*通信作者: 徐春祥, 研究员级高级工程师, 主要研究方向为食品检测。E-mail: xcx70@163.com

*Corresponding author: XU Chun-Xiang, Professor, Jiangsu Institute for Food and Drug Control, Beijing West Road, No.6, Gulou District, Nanjing 210008, China. E-mail: xcx70@163.com

0 引言

拉曼光谱法是研究化合物分子受光照射后所产生的散射光与入射光能量差与化合物振动频率间关系的分析方法^[1]。其信号来源于分子振动和转动,是分子极化率变化诱导产生的^[2]。拉曼光谱强度取决于相应的振动过程中极化率变化的大小,表征了分子结构性,可用来鉴定分子中存在的官能团,从而达到识别未知化合物的目的^[3-4]。但是由于传统拉曼光谱信号很弱,使其应用范围受到了限制。近年来,纳米技术的发展为拉曼光谱提供了新的应用空间。表面增强拉曼光谱(surface-enhanced Raman scattering, SERS)是使用经特殊处理的均匀纳米颗粒作为基板,引起表面等离子共振,从而产生被增强的局域电场,散射光信号最高可被增强到14个数量级^[5]。SERS技术的发展使拉曼光谱检测的灵敏度产生了飞跃,极大地扩展了其可能的应用领域。目前在食品卫生、环境保护、医学检验等领域已有广泛的应用。

资料表明,三聚氰胺可能从环境、食品包装材料等途径进入到食品中,其含量很低。为确保人体健康和食品安全,原卫生计生委特制定我国三聚氰胺在食品中的限量值:婴儿配方食品中三聚氰胺的限量值为1 mg/kg,其他食品中三聚氰胺的限量值为2.5 mg/kg。目前,检测三聚氰胺的国家标准方法为高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)、气相色谱-质谱联用法(gas chromatography-mass spectrography, GC-MS)和液相色谱-质谱联用法(liquid chromatography coupled with mass spectrometry, LC-MS)等,检测定量限分别为2、0.05、0.01 mg/kg^[5]。这些方法虽然检测三聚氰胺含量准确,但是分析时间长,前处理复杂,成本高,不适用于现场快速检测。目前食品安全监测部门和生产厂家都迫切需要现场快速检测三聚氰胺的技术,目前常见的快速筛选方法有拉曼光谱法^[6-8]、胶体金免疫层析法、酶联免疫法^[9]等。近年来,拉曼表面增强技术在食品安全监测领域发展迅速,通过优化纳米增强试剂^[10-12]、改进前处理方法^[13]、开发软件算法及定量依据方法^[14-15],牛奶中三聚氰胺的检出限可达0.05 mg/kg。拉曼光谱法可进行三聚氰胺半定量、定量测定,操作简单快捷,耗材简便廉价,是适用于基层食品安全监管的快检技术。

目前,三聚氰胺拉曼快检方法缺乏相关标准及检测效果评判依据,市场上相关快检产品均由仪器或试剂的生产厂家提供,方法各不相同,效果参差不齐,甚至一些方法尚存在不少问题,因此亟需优选出合适的统一方法并建立相关评价标准。

本研究针对市场主流的4款拉曼产品进行分析验证,优选出了合适的检测方法,同时建立了三聚氰胺拉曼检测

评价方法及性能评价指标,对市场上三聚氰胺拉曼光谱法产品的开发及评价提供依据,有助于提高三聚氰胺快检的准确性。

1 材料与方法

1.1 实验材料

液态乳制品,市售,按国标方法 GB/T 22388—2008《原料乳与乳制品中三聚氰胺》^[16]方法检测,均不含有三聚氰胺,作为空白基质。

1.2 仪器与试剂

SSR-3000 便携式拉曼光谱仪(简智仪器公司、赛默飞世尔、北京同方威视、欧普图斯科技公司);仪器参数均满足:发射波长为(785±1) nm,线宽<0.1 nm,能量≥250 mW;光谱分辨率≤15 cm⁻¹;光谱响应范围500~2000 cm⁻¹,或大于该响应范围。XS-205DU 型电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司)、VORTEX4 涡旋振荡器(美国 IKA 公司);Avanti JXN-6 离心机(美国 Beckman 公司)。

三聚氰胺(分析纯,阿拉丁生化科技股份有限公司);三氯乙酸、硫氰酸钾、碳酸钠、氯金酸、柠檬酸三钠、硝酸银、氯化钠、氢氧化钠(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);水为 GB/T 6682—2008《分析实验室用水规格和试验方法》^[17]规定的二级水。

1.3 实验方法

1.3.1 表面增强试剂和促凝剂的配制方法

纳米金溶胶:取100 mL 0.01%氯金酸(AuCl₃·HCl·4H₂O)水溶液加热至沸,剧烈搅拌下准确加入1.0 mL 1%柠檬酸三钠(Na₃C₆H₅O₇)水溶液,金黄色的氯金酸水溶液在2 min内变为红色,继续煮沸15 min,冷却后用蒸馏水补加到100 mL。增强试剂配制用水为 GB/T 6682—2008《分析实验室用水规格和试验方法》^[17]规定的一级水。

纳米银溶胶:取200 mL 1.0 mmol/L 硝酸银(AgNO₃)水溶液加热沸腾,剧烈搅拌下逐滴准确滴加5.0 mL 1%柠檬酸三钠(Na₃C₆H₅O₇)水溶液,持续煮沸1 h,溶液变为灰绿色,冷却后用蒸馏水补加到200 mL。增强试剂配制用水为 GB/T 6682—2008 规定的一级水。

金溶胶的促凝剂:称取5.85 g氯化钠,溶于100 mL水中,摇匀,备用,或配制成其他相当的无机盐溶液。银溶胶的促凝剂:称取5.85 g氯化钠和2 g氢氧化钠,溶于100 mL水中,摇匀,备用,或配制成其他相当的无机盐溶液。

1.3.2 实验样品的制备

(1) 基质样品制备

取市售纯牛奶30瓶(250 mL/瓶),混合摇匀,总量不

低于 7.2 L, 为保证牛奶样品拆封后短时间内不变质, 添加 1% 的山梨酸钾防腐。

(2) 盲样制备

分别移取纯牛奶基质样品各 4 份, 每份 1800 mL, 向其中加入三聚氰胺标准品溶液, 充分混匀均质后配制成三聚氰胺浓度为 0 倍限量值(空白)(0 mg/kg)、0.5 倍限量值(1.25 mg/kg)、1 倍限量值(2.5 mg/kg)、2 倍限量值(5 mg/kg)的盲样。

(3) 盲样均匀性考察

为检验盲样的均匀性, 取牛奶盲样中三聚氰胺含量为 2.5 mg/kg 各 10 份(i), 每份样品按 GB/T 22388—2008《原料乳与乳制品中三聚氰胺检测方法》^[16]中液相色谱法在重复条件下测定 2 次(j), 采用单因子方差分析法对结果进行统计处理, 计算 F 值, 若 $F_{0.05(9, 10)} < 3.02$ (临界值), 则表明在 0.05 显著水平时, 盲样中的三聚氰胺是均匀的。测定和计算结果表明: 盲样中的 $F_{0.05(9, 10)} = 2.963 < 3.02$, 则表明在 0.05 显著水平时, 三聚氰胺含量是均匀的。

(4) 盲样稳定性考察

为检验盲样的稳定性, 取牛奶盲样中三聚氰胺含量为 2.5 mg/kg 1 份, 按 GB/T 22388-2008《原料乳与乳制品中三聚氰胺检测方法》^[16]中液相色谱法在重复条件下测定 6 次(n_1), 该样品放置 15 d 后, 再重新测定 6 次(n_2), 采用 t 检验法对前后 2 次测定的平均值进行比较, 若 $t <$ 显著性水平 $\alpha_{0.05}$, 自由度为(n_1+n_2-2)的临界值 $t_{\alpha(n_1+n_2-2)}$, 则表明在 0.05 显著水平时, 盲样是稳定的。结果显示, 经 t 检验法对前后 2 次测定的平均值进行比较, $t=0.240 <$ 显著性水平 $\alpha_{0.05}$, 自由度为(n_1+n_2-2)的临界值 $t_{\alpha(n_1+n_2-2)} (=1.812)$, 表明在 0.05 显著水平时, 则 2 个平均值之间无显著性差异。

1.3.3 前处理方法

为研究在不同方法下对于最终判定结果是否有影响, 本研究配制了 4 种三聚氰胺浓度梯度的牛奶样品(三聚氰胺含量分别为 0、1.25、2.5、5.0 mg/kg):

A 法: 取 400 μ L 样品于 2 mL 的离心管中, 加入 400 μ L 10% 的硝酸锌溶液, 混匀后再加入 400 μ L 10% 的硫氰酸钾溶液, 混匀后以 8000 r/min 离心 2 min, 取 400 μ L 上清液于 2 mL 的离心管中, 加 400 μ L 碳酸钠溶液(0.25 mol/L), 混匀后以 8000 r/min 离心 2 min, 取上清液备用。

B 法: 取 0.5 mL 样品于 2 mL 离心管中, 再加入 1 mL 5% 三氯乙酸溶液, 涡旋 30 s 混匀; 放入离心机, 以 6000 r/min 转速离心 1 min; 上清液备用。

C 法: 取 0.5 mL 样品于 2 mL 的离心管中, 加入 100 μ L 10% 三氯乙酸, 混匀振荡 30 s, 将其置于离心机内 10000 r/min 以上转速离心 1 min; 取中层清液 200 μ L 移至离心管中(可直接吸取, 也可先移上层溶液后再吸取) 10000 r/min 以上转速离心 1 min; 取上清液备用。

1.3.4 实验步骤

A 法: 在检测样品池中依次加入 100 μ L 样品, 50 μ L 促凝剂, 100 μ L 纳米表面增强试剂, 混匀静置 8 min 后检测。

B 法: 在检测样品池中依次加入 100 μ L 促凝剂, 100 μ L 纳米表面增强试剂, 50 μ L 样品, 快速摇晃均匀, 等待 20 s 后检测。

C 法: 在检测样品池中依次加入 350 μ L 促凝剂, 80 μ L 纳米表面增强试剂, 200 μ L 样品, 快速摇晃均匀, 等待 20 s 后检测。

1.3.5 不同厂家方法仪器兼容性

本实验筛选国内外 4 家厂商生产的便携式拉曼光谱仪作为评价对象, 采用 1.3.3 中制备的 4 种三聚氰胺浓度梯度的牛奶为样品, 确定提取方法、测定方法、仪器型号为 3 个变量, 每次改变 1 个变量, 分别测定 4 种浓度梯度样品, 每个样品平行测定 3 次。

1.3.6 常用添加剂干扰实验

我们选择了多种可能在液态乳和乳饮料中添加的食品添加剂及辅料, 分别在空白样品和添加了 2.5 mg/kg 三聚氰胺的牛奶样品中加入 10 倍量正常使用量的各种成分, 按确立的方法进行检测。

1.3.7 三聚氰胺类似物干扰实验

在三聚氰胺制造过程中产生的杂质可能会形成双氰胺、三聚氰酸、三聚氰酸二酰胺和三聚氰胺一酰胺等类似物, 同时不法商贩也有可能用类似结构化合物替代三聚氰胺加入液态乳中, 因此本研究研究了 4 种类似物对拉曼光谱检测三聚氰胺的影响。分别在 0、1.25、2.5、5 mg/kg 的三聚氰胺加标样品中分别加入 10 mg/kg 的上述 4 种类似物, 按确立的方法进行检测。

1.3.8 适用范围的确定

本研究选用不同品牌的纯牛奶, 调制乳, 发酵乳若干, 每种乳制品准备 6 个空白样品和 6 个 2.5 mg/kg 的三聚氰胺加标样品, 按确定的方法进行快速检测。

2 结果与分析

2.1 前处理方法的研究

液态乳中三聚氰胺的检测前处理方法的原理是用蛋白沉淀剂将牛奶中的蛋白质沉淀后取上清液进行测定, 国标 GB/T 22388—2008《原料乳与乳制品中三聚氰胺检测方法》^[16]中对液态乳的前处理方法是加入 1% 的三氯乙酸和乙腈沉淀蛋白。由于乙腈在拉曼光谱中有较强的特征峰, 会给后期的测定带来干扰, 因此在各仪器厂家的方法中大多没有采用。为提高蛋白沉淀效果, 各仪器厂家的方法中采取增加三氯乙酸用量或增加其他品种沉淀剂的方式来满足实验要求。经收集整理, 选取了 3 种普适性好的方法(1.3.1)进行研究。检测结果表明, 空白样品和 1.25 mg/kg 浓度的样品显示结果均为阴性, 2.5 mg/kg 和 5.0 mg/kg 浓度

的样品显示结果均为阳性, 满足卫生部等 5 部门在 2011 年发布了关于三聚氰胺在食品中的限量值的公告(2011 年第 10 号)。因此, 以上 3 种前处理方法均能满足实验的要求。

2.2 实验步骤的研究

各仪器厂家的测定步骤大体类似, 均是将样品与促凝剂和表面增强试剂混合均匀后检测。由于各厂家制备的表面增强试剂有各自独特的技术, 甚至是专利技术, 因此在测定步骤中, 添加促凝剂和表面增强试剂的用量和次序略有不同。实验结果表明, 这 3 种测定步骤在同厂家前处理的情况下均能满足实验的要求(表 1)。

2.3 兼容性研究

为优选出最佳实验条件, 本研究进行了各设备厂家的提取方法、测定方法与各仪器内置软件之间能否兼容使用的研究。

如表 2 所示, 在改变测定方法和提取方法时, 除方法 B 与各设备兼容性较好以外, 大多数方法与设备之间不能

兼容。可能由于各仪器厂家在设计内置计算软件时, 是根据各自提取方法和测定方法生成的拉曼光谱图而设计的定性定量方法。由于在不同的提取方法和测定方法中, 加入的试剂各不相同, 因此相同样品进行不同方法得到的拉曼谱图也各不相同, 计算方法也就不尽相同, 导致了方法与设备内置软件间的不兼容性。

表 1 牛奶中三聚氰胺的 3 种检测方法结果对比
Table 1 Comparison of three detection methods for melamine in milk

方法类别	三聚氰胺加标浓度			
	0	1.25 mg/kg	2.5 mg/kg	5.0 mg/kg
A	阴性	阴性	阳性	阳性
B	阴性	阴性	阳性	阳性
C	阴性	阴性	阳性	阳性

表 2 不同方法在不同拉曼设备上的检测结果
Table 2 Results of different methods on different Raman devices

实验方法	简智	赛默飞世尔	同方威视	欧普图斯
提取方法 A + 测定方法 A	0 mg/kg: 阴性	0 mg/kg: 阴性	0 mg/kg: 阴性	0 mg/kg: 阴性
	1.25 mg/kg: 阴性	1.25 mg/kg: 阴性	1.25 mg/kg: 阴性	1.25 mg/kg: 阴性
	2.5 mg/kg: 阴性	2.5 mg/kg: 阳性	2.5 mg/kg: 阴性	2.5 mg/kg: 阳性
	5.0 mg/kg: 阳性	5.0 mg/kg: 阳性	5.0 mg/kg: 阳性	5.0 mg/kg: 阳性
提取方法 A + 测定方法 B	0 mg/kg: 阴性	0 mg/kg: 阴性	0 mg/kg: 阴性	0 mg/kg: 阴性
	1.25 mg/kg: 阴性	1.25 mg/kg: 阴性	1.25 mg/kg: 阴性	1.25 mg/kg: 阴性
	2.5 mg/kg: 阴性	2.5 mg/kg: 阳性	2.5 mg/kg: 阴性	2.5 mg/kg: 阳性
	5.0 mg/kg: 阳性	5.0 mg/kg: 阳性	5.0 mg/kg: 阳性	5.0 mg/kg: 阳性
提取方法 A + 测定方法 C	0 mg/kg: 阴性	0 mg/kg: 阴性	0 mg/kg: 阴性	0 mg/kg: 阴性
	1.25 mg/kg: 阴性	1.25 mg/kg: 阴性	1.25 mg/kg: 阴性	1.25 mg/kg: 阴性
	2.5 mg/kg: 阴性	2.5 mg/kg: 阴性	2.5 mg/kg: 阴性	2.5 mg/kg: 阴性
	5.0 mg/kg: 阳性	5.0 mg/kg: 阳性	5.0 mg/kg: 阳性	5.0 mg/kg: 阳性
提取方法 B + 测定方法 A	0 mg/kg: 阴性	0 mg/kg: 阴性	0 mg/kg: 阴性	0 mg/kg: 阴性
	1.25 mg/kg: 阴性	1.25 mg/kg: 阳性	1.25 mg/kg: 阳性	1.25 mg/kg: 阳性
	2.5 mg/kg: 阳性	2.5 mg/kg: 阳性	2.5 mg/kg: 阳性	2.5 mg/kg: 阳性
	5.0 mg/kg: 阳性	5.0 mg/kg: 阳性	5.0 mg/kg: 阳性	5.0 mg/kg: 阳性
提取方法 B + 测定方法 B	0 mg/kg: 阴性	0 mg/kg: 阴性	0 mg/kg: 阴性	0 mg/kg: 阴性
	1.25 mg/kg: 阴性	1.25 mg/kg: 阴性	1.25 mg/kg: 阴性	1.25 mg/kg: 阴性
	2.5 mg/kg: 阳性	2.5 mg/kg: 阳性	2.5 mg/kg: 阳性	2.5 mg/kg: 阳性
	5.0 mg/kg: 阳性	5.0 mg/kg: 阳性	5.0 mg/kg: 阳性	5.0 mg/kg: 阳性
提取方法 B + 测定方法 C	0 mg/kg: 阴性	0 mg/kg: 阴性	0 mg/kg: 阴性	0 mg/kg: 阴性
	1.25 mg/kg: 阴性	1.25 mg/kg: 阴性	1.25 mg/kg: 阴性	1.25 mg/kg: 阴性
	2.5 mg/kg: 阴性	2.5 mg/kg: 阴性	2.5 mg/kg: 阴性	2.5 mg/kg: 阴性
	5.0 mg/kg: 阳性	5.0 mg/kg: 阳性	5.0 mg/kg: 阳性	5.0 mg/kg: 阳性

表 2(续)

实验方法	简智	赛默飞世尔	同方威视	欧普图斯
提取方法 C + 测定方法 A	0 mg/kg: 阴性	0 mg/kg: 阴性	0 mg/kg: 阴性	0 mg/kg: 阴性
	1.25 mg/kg: 阴性	1.25 mg/kg: 阴性	1.25 mg/kg: 阴性	1.25 mg/kg: 阴性
	2.5 mg/kg: 阳性	2.5 mg/kg: 阳性	2.5 mg/kg: 阳性	2.5 mg/kg: 阳性
	5.0 mg/kg: 阳性	5.0 mg/kg: 阳性	5.0 mg/kg: 阳性	5.0 mg/kg: 阳性
提取方法 C + 测定方法 B	0 mg/kg: 阴性	0 mg/kg: 阴性	0 mg/kg: 阴性	0 mg/kg: 阴性
	1.25 mg/kg: 阴性	1.25 mg/kg: 阴性	1.25 mg/kg: 阴性	1.25 mg/kg: 阴性
	2.5 mg/kg: 阳性	2.5 mg/kg: 阴性	2.5 mg/kg: 阴性	2.5 mg/kg: 阴性
	5.0 mg/kg: 阳性	5.0 mg/kg: 阳性	5.0 mg/kg: 阳性	5.0 mg/kg: 阳性
提取方法 C + 测定方法 C	0 mg/kg: 阴性	0 mg/kg: 阴性	0 mg/kg: 阴性	0 mg/kg: 阴性
	1.25 mg/kg: 阴性	1.25 mg/kg: 阴性	1.25 mg/kg: 阴性	1.25 mg/kg: 阴性
	2.5 mg/kg: 阴性	2.5 mg/kg: 阳性	2.5 mg/kg: 阳性	2.5 mg/kg: 阴性
	5.0 mg/kg: 阳性	5.0 mg/kg: 阳性	5.0 mg/kg: 阳性	5.0 mg/kg: 阳性

2.4 前处理方法和试验步骤的确定

A、B、C 3 种方法均能满足三聚氰胺限量值的准确判定, 但 B 法操作步骤最为简单, 方法兼容性也最好, 因此本研究最终选取 B 法为本快速检测方法的研究对象, 进行下一步的研究。其他方法如需使用, 也应进行相应的验证。

2.5 常用添加成分干扰实验

液态乳中常见的添加成分有安赛蜜、羟甲基纤维素钠、低聚半乳糖、三聚磷酸钠、单甘脂、柠檬酸钠等, 这些添加成分在乳制品中起到营养强化、稳定乳体系、延长保质期、改善口感口味等功能。按确立的方法进行检测。测得结果见表 3。结果表明, 各种常见添加成分的加入对于用拉曼光谱法测定三聚氰胺的结果没有影响。

2.6 类似物干扰实验

按确立的方法进行检测, 结果见表 4, 三聚氰胺类似物的加入对于液态乳中三聚氰胺的拉曼光谱检测没有影响。

2.7 适用范围

本研究选用不同品牌的纯牛奶、调制乳、发酵乳各 4 种, 每种乳制品准备 6 个空白样品和 6 个 2.5 mg/kg 的三聚氰胺加标样品, 按确定的方法实验, 结果见表 5。实验结果为空白样品共 72 个, 阳性加标样品共 72 个; 假阳性率为 0; 假阴性率也为 0。结果表明纯牛奶、调制乳、发酵乳皆适用于本方法。

表 3 牛乳中添加不同成分的检测结果
Table 3 Inspection results of different components in milk

序号	添加物质	0 mg/kg 样品	2.5 mg/kg 样品
1	水溶 MH-5063 乳酸奶香精	阴	阳
2	麦奶粉末香精	阴	阳
3	鲜牛奶香精	阴	阳
4	羟甲基纤维素钠	阴	阳
5	水溶乳可丹	阴	阳
6	水溶稳定剂 AM9268	阴	阳
7	水溶稳定剂 AYS695	阴	阳
8	水溶改性淀粉	阴	阳
9	复合乳化稳定剂	阴	阳
10	水溶低聚半乳糖	阴	阳
11	超微碳酸钙	阴	阳
12	乳矿物盐	阴	阳

表 3(续)

序号	添加物质	0 mg/kg 样品	2.5 mg/kg 样品
13	水溶斯潘 60	阴	阳
14	单甘酯	阴	阳
15	蔗糖脂肪酸酯	阴	阳
16	柠檬酸钠	阴	阳
17	三氯蔗糖	阴	阳
18	三聚磷酸钠	阴	阳
19	热稳定精制 L 乳酸	阴	阳
20	阿斯巴甜	阴	阳
21	安赛蜜	阴	阳
22	山梨酸钾	阴	阳

表 4 三聚氰胺类似物干扰实验
Table 4 Interference experiment of melamine analogues

三聚氰胺加标浓度/(mg/kg)	三聚氰胺一酰胺	三聚氰酸二酰胺	三聚氰酸	双氰胺
0	阴性	阴性	阴性	阴性
1.25	阴性	阴性	阴性	阴性
2.5	阳性	阳性	阳性	阳性
5	阳性	阳性	阳性	阳性

表 5 适用范围验证
Table 5 Scope of application verification

液态乳种类及品牌	纯牛乳				调制乳				发酵乳			
	蒙牛	伊利	卫岗	德运	旺仔	特仑苏	青藏牧场	卫岗	光明	新希望	安慕希	弗瑞希
空白	阴	阴	阴	阴	阴	阴	阴	阴	阴	阴	阴	阴
加标 2.5 mg/kg	阳	阳	阳	阳	阳	阳	阳	阳	阳	阳	阳	阳

2.8 产品方法性能指标的计算

取以纯牛奶(经仪器方法确证)为代表空白基质, 移取三聚氰胺标准溶液制成添加水平为 0、1.25、2.5、5 mg/kg 的盲样样本各 50 份, 共计 200 份样品。按确立方法进行测定。对于阳性样品来说, 检出 100 个阳性结果, 假阴性率为 0%; 对于阴性样品, 测出 100 个阴性, 假阳性率为 0%; 同时, 灵敏度和特异性均为 100%。可见确立的方法符合食药监科便函[2016]83 号《食品快速检测方法评价技术规范》^[18]的要求。

2.9 与参比方法一致性分析

取以纯牛奶为基质, 添加三聚氰胺制成浓度为 2.8 mg/kg 的盲样 40 份, 其中 20 份按确立的方法进行测定, 另外 20 份以 GB/T 22388—2008《原料乳与乳制品中三聚

氰胺检测方法》^[16]作为参比方法, 对方法一致性进行研究。在限量值浓度水平(2.5 mg/kg), 确立的拉曼光谱法测定结果与参比方法测定结果完全一致, 符合方法一致性要求。

2.10 验证结果与汇总

本研究选取操作性简便、性能稳定可靠、市场占有率较高的有代表性的 5 家商品化拉曼光谱仪, 在甲乙丙 3 家验证单位对本方法进行了验证, 每家机构的验证仪器不少于 3 个品牌的产品。验证开展了包括灵敏度、特异性、假阴性率、假阳性率分析^[10], 实验评价的样品以纯牛奶为空白基质, 盲样中三聚氰胺浓度分别为 0(空白)、1.25 mg/kg(0.5 倍限量值)、2.5 mg/kg(1 倍限量值)、5 mg/kg(2 倍限量值)4 个添加水平, 每个添加水平平行制备 50 份, 验证结果汇总见表 6。

表 6 方法性能指标汇总表
Table 6 Summary of the performance index

验证单位及验证品牌	甲			乙			丙		
	A 品牌	B 品牌	C 品牌	C 品牌	D 品牌	B 品牌	D 品牌	C 品牌	E 品牌
显著性差异	2.29	—	0.5	0.25	—	0	—	0.5	—
灵敏度(p+)/%	99	100	99	98	100	98	100	98	100
特异性/%	94	100	99	98	100	99	100	100	100
假阴性率(pf-)/%	1	0	1	2	0	2	0	2	0
假阳性率(pf+)/%	6	0	1	2	0	1	0	0	0
相对准确度/%	96.5	100	99	98	100	98.5	100	99	100

结果表明,以纯牛奶作为空白基质时,本方法特异性为 94%~100%;灵敏度为 98%~100%;假阳性率≤6%;假阴性率≤2%。

3 结论与讨论

根据以上实验结果,本研究将三聚氰胺-拉曼光谱快检方法中的灵敏度定为≥99%,特异性定为≥85%,通过验证实验发现,5 家企业的快速检测产品有 3 家在验证中完全满足方法的性能指标,1 家企业的产品 2 次验证实验中 1 次不符合方法的性能指标,1 家企业的产品 3 次验证实验中 2 次不符合方法的性能指标。3 次不符合方法的性能指标的验证实验仅在灵敏度上略差,考虑到仪器内置校准曲线的可调性及特异性实验的良好性能,故目前制定的性能指标基本能满足实际的需要。

本方法研究液态乳中三聚氰胺的拉曼光谱法快速检测。选择了市场上有代表性的拉曼光谱仪进行了实验,从样品的提取方法、测定步骤、所加的试剂及增强试剂的用量及先后次序、各测试方法的兼容性等几个方面进行了研究,确定了检测的方法即本文中的 B 法为快速检测方法的研究对象,后进行了常见的添加剂的干扰性实验,结果表明液态乳中常用的 22 种添加剂对于检测结果没有影响,三聚氰胺的 4 种类似物的加入同样没有影响。在不同品牌的调制乳、发酵乳、纯牛奶加标实验确定了方法的适用范围并进行了验证。通过在指定的 3 家验证机构进行方法验证,产品方法性能指标的计算和与参比方法的一致性分析,结果均表明本方法能满足液态乳中非法添加物三聚氰胺的快检需求。

本研究优选出合适的拉曼光谱-三聚氰胺检测方法,同时建立了三聚氰胺拉曼检测评价方法及性能评价指标,对市场上三聚氰胺拉曼光谱法产品的开发及评价提供了依据,有助于提高三聚氰胺快检的准确性,同时也有助于基层食品安全的监管。

参考文献

[1] 侯彦秋, 李永生. 用于乳制品中三聚氰胺含量测定的固相萃取富集流动注射紫外光度法[J]. 分析试验室, 2013, (8): 98-102.
HOU YQ, LI YS. A flow-injection solid phase extraction-separation ultraviolet photometry for automatic determination of melamine content in dairy products [J]. Chin J Anal Lab, 2013, 32(8): 98-102.

[2] 胡继明, 胡军. 拉曼光谱在分析化学中的某些应用进展[J]. 光散射学报, 1998, (3): 141-144.
HU JM, HU J. Advances on analytical applications of Raman spectroscopy [J]. Chin J Light Scattering, 1998, (3): 141-144.

[3] CHENG Y, DONG Y, JINGHANG WU, *et al.* Screening melamine adulterant in milk powder with laser Raman spectrometry [J]. J Food Compos Anal, 2010, 23(2): 199-202.

[4] SMITH GPS, GORDON KC, HOLROYD SE. Raman spectroscopic quantification of calcium carbonate in spiked milk powder samples [J]. Vibrational Spectrosc, 2013, 67(7): 87-91.

[5] 赵翔宇, 彭少杰, 赵建丰. 表面增强拉曼光谱法快速检测牛奶中的三聚氰胺[J]. 乳业科学与技术, 2011, 1: 27-29.
ZHAO XY, PENG SJ, ZHAO JF. Surface enhanced Raman scattering for the rapid detection of melamine in milk [J]. J Dairy Sci Technol, 2011, 1: 27-29.

[6] ZHANG K, HU Y, LI G. Diazotization-coupling reaction-based selective determination of nitrite in complex samples using shell-isolated nanoparticle-enhanced Raman spectroscopy [J]. Talanta, 2013, 116(116): 712-718.

[7] 陈漾, 李攻科, 胡玉玲. 表面增强拉曼光谱法快速定量分析食品中福美双、二氰蒽醌和灭蝇胺的残留[J]. 分析科学学报, 2015, 31(3): 307-312.
CHEN Y, LI GK, HU YL. Rapid analysis of pesticide residues in food using surface-enhanced Raman spectroscopy [J]. J Anal Sci, 2015, 31(3): 307-312.

[8] YANG Q, LIANG F, WANG D, *et al.* Simultaneous determination of thiocyanate ion and melamine in milk and milk powder using surface-enhanced Raman spectroscopy [J]. Anal Methods, 2014, 6(20): 8388-8395.

[9] KUKLYA A, UTESCHIL F, KERPEN K, *et al.* Development of an

- electrospray-63Ni-differential ion mobility spectrometer for the analysis of aqueous samples [J]. *Talanta*, 2014, 120: 173–180.
- [10] 王锐笙, 李学铭, 董鹏, 等. 亚单分子层三聚氰胺的便携式拉曼检测[J]. *光散射学报*, 2008(04): 379–383.
- WANG DS, LI XM, DONG K, *et al.* Portable Raman spectrometer detection of sub-monomolecular layer level of melamine [J]. *J Light Scattering*, 2008, (4): 379–383.
- [11] LI JM, MA WF, WEI C, *et al.* Detecting trace melamine in solution by SERS using Ag nanoparticle coated poly(styrene-co-acrylic acid) nanospheres as novel active substrates [J]. *Langmuir* *Acs J Surf Colloids*, 2011, 27(23): 14539–44.
- [12] 赵蕊池, 王培龙, 石雷. 自组装有序纳米银线表面增强拉曼光谱检测牛奶中三聚氰胺[J]. *分析化学*, 2017, (45): 75–82.
- ZHAO RC, WANG PL, SHI L. Determination of melamine in milk by surface enhanced Raman scattering technique based on self-assembly ordered silver nanowires [J]. *Chin J Anal Chem*, 2017, (45): 75–82.
- [13] 刘峰, 邹明强, 张朦, 等. 液态乳三聚氰胺液相色谱和拉曼光谱检测快速前处理方法[J]. *光谱学与光谱分析*, 2014, 34(3): 685–688.
- LIU F, ZOU MQ, ZHANG M, *et al.* Rapid pretreatment method for liquid milk melamine detection by liquid chromatography and Raman spectroscopy [J]. *Spectrosc Spectral Anal*, 2014, 34(3): 685–688.
- [14] 田小雪, 王海霞. 表面增强拉曼散射光谱法快速检测牛奶/奶粉中的三聚氰胺[C]// 中国化学会第七届全国仪器分析及样品预处理学术研讨会. 中国化学会, 2013.
- TIAN XX, WANG HX. Rapid determination of melamine in milk / milk powder by surface enhanced Raman scattering spectroscopy [C]//The 7th National Symposium on instrumental analysis and sample pretreatment. Chinese Chemical Society, 2013.
- [15] 陈安宇, 焦义, 刘春伟, 等. 采用增强拉曼检测技术对牛奶中三聚氰胺的检测[J]. *中国卫生检验杂志*, 2009, (8): 1710–1712.
- CHEN AY, JIAO Y, LIU CW, *et al.* Detecting melamine in milk usage using surface-enhanced raman spectroscopy [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2009, (8): 1710–1712.
- [16] GB/T 22388—2008 原料乳与乳制品中三聚氰胺检测方法[S].
- GB/T 22388—2008 Determination of melamine in raw milk and dairy products [S].
- [17] GB/T 6682—2008 分析实验室用水规格和试验方法[S].
- GB/T 6682—2008 Analytical laboratory water specifications and test methods [S].
- [18] 食药监科便函[2016]83号 食品快速检测方法评价技术规范[Z].
- Food and Drug Administration Bureau brief letter [2016] No. 83 Rapid evaluation of food testing methods [Z].

(责任编辑: 王 欣)

作者简介

张 渊, 工程师, 主要研究方向为食品质量与安全。
E-mail: 543440367@qq.com

徐春祥, 研究员级高级工程师, 主要研究方向为食品检测。
E-mail: xcx70@163.com