ICS 67.050
CCS X04

QB

中华人民共和国轻工行业标准

QB/T XXXXX—XXXX

乳制品中乳糖的测定 核磁共振波谱法

Determination of lactose in dairy products—Nuclear magnetic resonance spectroscopy

（报批稿）

XXXX－XX－XX 发布　　XXXX－XX－XX 实施

中华人民共和国工业和信息化部　　发 布

工业和信息化部标准报批公示

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。

本文件由中国轻工业联合会提出。

本文件由全国特殊食品标准化技术委员会（SAC/TC466）归口。

本文件起草单位：中轻技术创新中心有限公司、中国食品发酵工业研究院有限公司、中轻检验认证有限公司、黑龙江飞鹤乳业有限公司、泉州市从心食品科技有限公司、中国科学院化学研究所、北京大学、武汉中科牛津波谱技术有限公司、中国科学技术大学、方圆标志检验检测（山东）有限公司 、信阳师范学院、首都师范大学、天津科技大学、安徽国泰众信检测技术有限公司、北京市营养源研究所有限公司、合肥德克斯低温技术有限公司。

本文件主要起草人：钟其顶、武竹英、樊双喜、刘英涛、向俊锋、张永章、扶晖、罗欢、张家海、盛建伟、周秋菊、李中峰、陈楠楠、张祎迈、陈洪周、吴一凡、王雨松、刘一诺、冯翠萍、崔洁、刘永成、张秀、崔亚娟、董邦胜。

本文件为首次发布。

工业和信息化部标准报批公示

乳制品中乳糖的测定 核磁共振波谱法

1 范围

本文件描述了乳制品中乳糖含量的核磁共振波谱检测方法。

本文件适用于液体乳、奶片、奶酪、乳粉中乳糖的测定。

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。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

JY/T 0578 超导脉冲傅里叶变换核磁共振波谱测试方法通则

JJF 1448 超导脉冲傅里叶变换核磁共振谱仪校准规范

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

在合适的测试条件下，一维核磁共振波谱峰面积与样品中所对应的自旋核的数目成正比，同时，基于核磁共振信号强度（峰面积）互易原理，即给定线圈中核磁共振信号强度与90°脉冲宽度成反比，分别测定外标参考物质和待测样品的一维核磁共振氢谱（^{1}H NMR）及90°脉冲宽度，外标法测定样品中乳糖的含量。

5 试剂和材料

除非另有说明，本方法所用试剂均为分析纯，水为GB/T 6682规定的二级水。

5.1 试剂

5.1.1 重水（D_2O）：纯度≥99.8%。

5.1.2 3-（三甲基硅烷基）氘代丙酸钠[$(CH_3)_3SiCD_2CD_2CO_2Na$，TSP-d_4]。

5.1.3 叠氮化钠（NaN_3）。

5.1.4 浓盐酸（HCl）。

5.1.5 氢氧化钠（NaOH）。

5.2 溶液配制

5.2.1 TSP-d_4 重水溶液（10 g/L）：称取 TSP-d_4（5.1.2）0.5 g（精确至 0.1 mg）和叠氮化钠（5.1.3）5 mg（精确至 0.1 mg），用重水（5.1.1）溶解后，转移至 50 mL 容量瓶中，定容至刻度。

5.2.2 盐酸（2 mol/L）：量取浓盐酸（5.1.4）16.8 mL，用水稀释并定容至 100 mL，临用现配。

5.2.3 氢氧化钠溶液（2 mol/L)：称取氢氧化钠（5.1.5）40 g（精确至 1 mg），用水溶解后，转移至 500 mL 容量瓶中，定容至刻度，临用现配。

5.3 标准品

5.3.1 柠檬酸（$C_6H_8O_7$，CAS 号：77-92-9）纯度≥98%，或经国家认证并授予标准物质证书的标准品。

5.3.2 乳糖（$C_{12}H_{22}O_{11}$，CAS 号：63-42-3）纯度≥98%，或经国家认证并授予标准物质证书的标准品。

5.4 标准溶液配制

5.4.1 柠檬酸外标溶液（2 g/L）：准确称取柠檬酸（5.3.1）0.20 g（精确至 0.1 mg），用水溶解后，转移至 100 mL 容量瓶中，定容至刻度。于 4℃冰箱密封保存，有效期 1 个月。
5.4.2 乳糖标准储备液（51.2 g/L）：准确称取乳糖（5.3.2）5.12 g（精确至 1 mg），用水溶解后，转移至 100 mL 容量瓶中，定容至刻度，临用现配。
5.4.3 乳糖系列标准工作液：准确量取乳糖标准储备液（5.4.2）5 mL 于 10 mL 容量瓶中，用水定容至刻度，摇匀后得到 25.6 g/L 的乳糖标准溶液。使用以上相同方法，分别得到 12.8 g/L、6.4 g/L、3.2 g/L、1.6 g/L、0.8 g/L、0.4 g/L、0.2 g/L、0.1 g/L、0.05 g/L 乳糖标准工作液。可根据样品中乳糖含量适当调整乳糖标准工作液浓度范围及乳糖标准储备液浓度。

6 仪器设备

6.1 核磁共振波谱仪：氢（^{1}H）共振频率不低于 400 MHz；控温精度不低于± 0.1 K。应按照 JJF 1448 的规定对 ^{1}H 谱灵敏度、^{1}H 谱分辨力、^{1}H 谱线型、^{1}H 谱定量重复性进行校准。
6.2 核磁共振样品管：外径 5 mm，同心且均匀；或由核磁共振波谱仪厂商提供、指定样品管。
6.3 分析天平：感量为 0.1 mg 和 1 mg。
6.4 磁力搅拌器。
6.5 pH 计：分辨力为 0.01。
6.6 移液器：量程为 10 μL~100 μL 和 100 μL~1 000 μL。
6.7 滤膜：0.45 μm 水相膜。
6.8 离心机：转速≥8 000 r/min。

7 分析步骤

7.1 上机样品制备

7.1.1 样品处理

称取液态样品10.0 g或固态样品1.0 g（精确至1 mg）加入35 mL水溶解，转移至50 mL烧杯中，于磁力搅拌器（6.4）上搅拌30 min，用盐酸（5.2.2）或氢氧化钠溶液（5.2.3）调pH至4.4~4.5，转移至50 mL容量瓶中，用水定容至刻度，摇匀。取5 mL定容后的溶液于10 mL离心管中，以8 000 r/min离心10 min，取中间澄清溶液，使用0.45 μm水相膜（6.7）过滤，取540 μL滤液于核磁管中，加入60 μL TSP-d_4重水溶液（5.2.1），混匀，待测。

7.1.2 标准样品配制

分别取900 μL柠檬酸外标溶液（5.4.1）和乳糖系列标准工作液（5.4.3），分别加入100 μL TSP-d_4重水溶液（5.2.1），涡旋振荡1 min，各取600 μL分别于核磁管中，待测。

7.2 核磁共振分析参考条件

7.2.1 样品管不旋转。
7.2.2 检测温度：（300.0 ± 0.1） K。
7.2.3 空扫次数：4 次。
7.2.4 扫描次数：64 次。
7.2.5 谱宽：8 000 Hz。
7.2.6 采样点数：65 536。
7.2.7 接收增益：16。
7.2.8 弛豫延迟时间：≥4 s。
7.2.9 水峰压制脉冲序列：预饱和加相位循环。

7.3 仪器校准

必要时，按照JY/T 0578的规定对探头温度进行校准。

7.4 核磁共振测定步骤

7.4.1 将装有上机样品的样品管置于核磁共振波谱仪检测腔内，设置样品管不旋转。
7.4.2 设置待测样品温度为 300.0 K，测样前应等待至少 5 min 至仪器温度稳定。
7.4.3 新建氢谱标准实验文件。
7.4.4 锁场与调谐。
7.4.5 匀场。
7.4.6 测定样品的 90°脉冲宽度，并记录结果。
7.4.7 调用预饱和加相位循环的水峰压制脉冲序列。
7.4.8 根据前述（7.2）要求设定空扫次数、扫描次数、谱宽、采样点数、接收增益、弛豫延迟时间，设定 90°脉冲宽度为前述测定值（7.4.6），根据水峰压制效果优化水峰压制位置、压制功率等，各样品测试时保持接收机增益值一致，可根据样品浓度优化扫描次数。
7.4.9 采集核磁共振水峰压制 ^{1}H 谱信号。
7.4.10 保存仪器所测谱图，并记录仪器状态和测量数据。

7.5 校正因子（CF）的计算

将装有标准样品的核磁管置于核磁共振波谱仪检测腔内。根据前述（7.2）要求设定仪器条件，根据前述（7.4）步骤进行测定。测得样品和外标的定量峰积分面积和积分区域对应的氢原子数量，用计算所得上机样品中乳糖的质量浓度为横坐标，乳糖系列标准工作液（5.4.3）浓度为纵坐标，绘制线性回归方程$y=ax+\beta$，以线性回归方程的斜率a作为校正因子（CF）。

7.6 样品的测定

将装有待测样品的核磁管置于核磁共振波谱仪检测腔内。根据前述（7.2）要求设定仪器条件，根据前述（7.4）步骤进行操作。测得样品和外标的定量峰积分面积和积分区域对应的氢原子数量，根据校正因子（CF）计算得到待测样品中乳糖的浓度。

8 数据处理

8.1 数据预处理

将原始数据进行傅立叶变换、相位校正和基线校正，以TSP-d_4中硅烷甲基的化学位移作为零点进行定标。

8.2 定性分析

将乳糖和外标物柠檬酸的^{1}H NMR谱（见附录A）信号峰进行归属，得到乳糖和外标物柠檬酸的定量相关参数（见附录B）。

8.3 定量峰积分

根据定性分析（8.2）得到的定量相关参数，确定外标物柠檬酸和乳糖的定量峰积分面积。

9 分析结果的表述

9.1 上机样品中乳糖的浓度按式（1）计算:

$$c_s=\frac{c_Q}{M_Q}\times\frac{A_s}{A_Q}\times\frac{H_Q}{H_s}\times\frac{N_Q}{N_s}\times\frac{P_s}{P_Q}\times\frac{T_s}{T_Q}\times M_L \quad\cdots\cdots(1)$$

式中：

c_s——上机样品中乳糖的浓度，单位为毫克每升（mg/L）；
c_Q——外标物柠檬酸溶液的质量浓度，单位为毫克每升（mg/L）；
M_Q——外标物柠檬酸的摩尔质量，M_Q = 192.14 g/mol；
A_s——乳糖的定量峰积分面积；
A_Q——外标物柠檬酸的定量峰积分面积；
H_Q——外标物柠檬酸积分区域对应的氢原子数量；

H_s——乳糖积分区域对应的氢原子数量；
N_Q——柠檬酸外标溶液的上机扫描次数；
N_s——上机样品的上机扫描次数；
P_s——上机样品的^{1}H 90°脉冲宽度；
P_Q——外标物柠檬酸的^{1}H 90°脉冲宽度；
T_s——上机样品的检测温度，单位为开尔文（K）；
T_Q——柠檬酸外标溶液的检测温度，单位为开尔文（K）；
M_L——乳糖的摩尔质量，M_L = 342.30 g/mol。
计算结果保留两位小数。

9.2 样品中乳糖的含量按式（2）计算：

$$w = \frac{c_s \times V}{m_s \times 1000} \times \mathrm{CF} \cdots\cdots (2)$$

式中：
w——样品中乳糖的含量，单位为克每千克（g/kg）；
c_s——式（1）计算得到的乳糖浓度，单位为毫克每升（mg/L）；
V——样品的定容体积，单位为毫升（mL）；
m_s——样品的质量，单位为克（g）；
1000——换算系数;
CF——校正因子。
计算结果保留一位小数。

10 精密度

在重复条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不应超过算术平均值的10%。

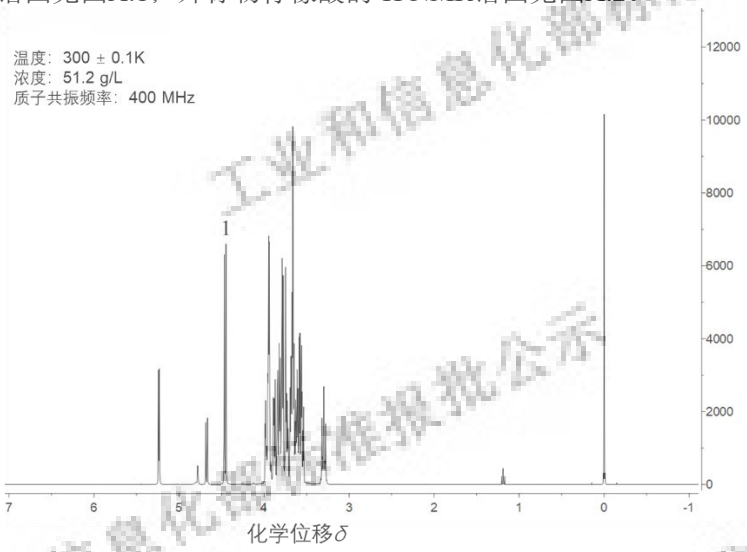
11 其他

当样品为固体，本方法的检出限为0.3 g/kg，定量限为1.1 g/kg；当样品为液体，本方法的检出限为0.03 g/kg，定量限为0.1 g/kg。

工业和信息化部标准报批公示

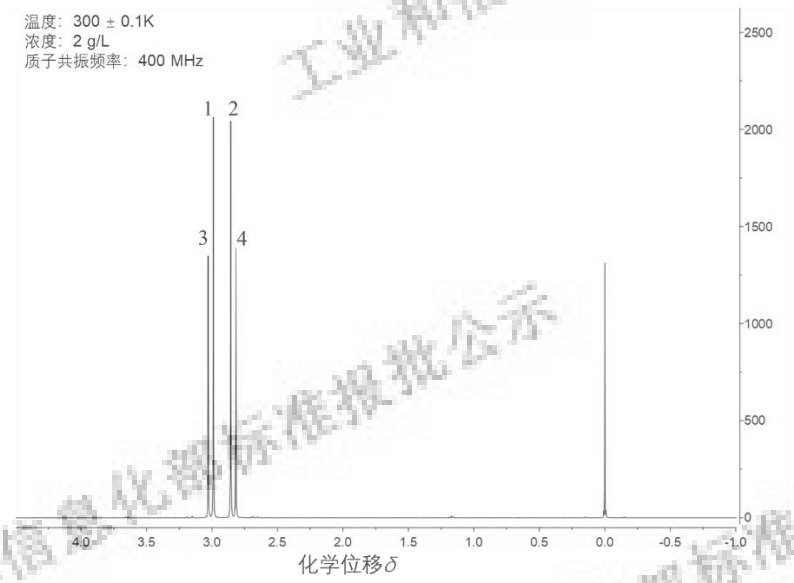
附 录 A
（资料性）
乳糖和外标物柠檬酸 ^{1}H NMR 谱图

乳糖的^{1}H NMR谱图见图A.1；外标物柠檬酸的^{1}H NMR谱图见图A.2。



标引序号说明：
1——乳糖的定量峰。

图 A.1 乳糖 ^{1}H NMR 谱图



标引序号说明：
1、3，2、4——外标物柠檬酸的定量峰。

图 A.2 外标物柠檬酸 ^{1}H NMR 谱图

工业和信息化部标准报批公示

附 录 B
（资料性）
乳糖和外标物柠檬酸核磁共振定量相关参数

乳糖和外标物柠檬酸的核磁共振定量相关参数见表B.1。

表 B.1 乳糖和外标物柠檬酸的核磁共振定量相关参数

化合物	摩尔质量/ $g\cdot mol^{-1}$	δ（^1H）（峰形，耦合常数）	氢原子数量	积分区域/ $\Delta\delta$	检测温度/ K
乳糖	342.30	4.45（*d*, *J* = 7.8 Hz)	1	4.359~4.503	300.0
柠檬酸	192.14	3.01（*d*, *J* = 15.7 Hz）	2	2.921~3.143	
		2.84（*d*, *J* = 15.7 Hz）	2	2.693~2.916	

工业和信息化部标准报批公示