

ICS 67.050  
X 04

# NY

## 中华人民共和国农业行业标准

NY/T 939-2005

---

### 巴氏杀菌乳和UHT灭菌乳中复原乳的鉴定

Identification of reconstituted milk in pasteurized and UHT milk

2005-09-30 发布

2005-09-30实施

---

中华人民共和国农业部 发布

## 前 言

本标准的第4章为强制性条文，其余为推荐性条文。

本标准的附录A和附录B为资料性附录。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国畜牧业标准化技术委员会归口。

本标准起草单位：中国农业科学院畜牧研究所。

本标准主要起草人：王加启、卜登攀、魏宏阳、李树聪、于建国、郭宗辉、付宝华、周凌云、刘世军、黄萌萌、刘光磊。

# 巴氏杀菌乳和UHT灭菌乳中复原乳的鉴定

## 1 范围

本标准规定了巴氏杀菌乳和UHT灭菌乳中复原乳的鉴定和相应的检测方法。

本标准适用于巴氏杀菌乳和UHT灭菌乳中复原乳的鉴定。

## 2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件，其随后所有的修改单（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本标准，然而，鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本标准。

GB/T 5413.1 婴幼儿配方食品和乳粉 蛋白质的测定

GB/T 6682—1992 分析实验室用水规格和试验方法

ISO 5538:1987 乳和乳制品 取样 品质检验

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

### 3.1

**生乳 raw milk**

从健康奶畜挤下的常乳，仅经过冷却，可能经过过滤，但未经过巴氏杀菌、低于巴氏杀菌的热处理、净乳和其他的杀菌处理。

### 3.2

**复原乳 reconstituted milk**

炼乳或/和全脂乳粉与水勾兑成的原料乳。

### 3.3

**巴氏杀菌 pasteurilization**

经低温长时间（62℃～65℃，保持30min）或经高温短时间（72℃～76℃，保持15s；或80℃～85℃，保持10s～15s）的处理方式。

### 3.4

**超高温瞬时灭菌 UHT**

经135℃以上保持数秒的处理方式。

生乳经UHT灭菌处理后，乳果糖含量应该低于600mg/L。

## 4 复原乳的鉴定

### 4.1 巴氏杀菌乳

当巴氏杀菌乳每100g蛋白质中糠氨酸含量大于12mg时，则鉴定为含有复原乳。

## 4.2 UHT灭菌乳

当UHT灭菌乳发生下列情况之一时，则鉴定为含有复原乳：

a)  $W - 0.7 \times t > 190$ ;

式中：

$W$  —— 待测UHT灭菌乳样品中每100g蛋白质中所含糠氨酸的毫克数；

$t$  —— 待测UHT灭菌乳贮存天数；

0.7 —— 待测UHT灭菌乳每贮存一天每100g蛋白质中产生的糠氨酸毫克数。

b) 当UHT灭菌结束时乳每100g蛋白质中糠氨酸含量为140mg~190mg时，乳果糖含量（mg/L）与糠氨酸含量（每100g蛋白质所含毫克数）比值小于2。

## 5 试验方法

### 5.1 糠氨酸含量的测定

#### 5.1.1 原理

牛奶在加热过程中会发生梅拉德反应，使蛋白质和糖生成特定产物之一——糠氨酸（ $\epsilon$ -N-2-呋喃甲基-L-赖氨酸）。糠氨酸的含量利用高效液相色谱紫外（280nm）检测器测定，依据糠氨酸标准物质定量。

#### 5.1.2 试剂与材料

除非另有说明，在分析中仅用分析纯试剂和GB/T6682中一级水。

5.1.2.1 甲醇(CH<sub>3</sub>OH)：色谱纯，用0.45 $\mu$ m滤膜真空脱气过滤。

5.1.2.2 高纯度氮气：99.99%。

5.1.2.3 3mol/L盐酸溶液。

5.1.2.4 10.6mol/L盐酸溶液。

5.1.2.5 三氟乙酸(色谱纯)溶液：体积分数为0.1%。

5.1.2.6 糠氨酸(furosine)（ $\epsilon$ -N-(2-呋喃甲基)-L-赖氨酸)标准贮备溶液：将糠氨酸标准物用3mol/L盐酸溶液（5.1.2.3）配制成200 $\mu$ g/mL的标准贮备液，该标准贮备溶液在-20℃可贮存24个月。

5.1.2.7 糠氨酸标准工作溶液：取0.1mL标准贮备溶液（5.1.2.6），用3mol/L盐酸溶液（5.1.2.3）定容至10mL，配制成2 $\mu$ g/mL的糠氨酸标准工作溶液。

#### 5.1.3 仪器和设备

5.1.3.1 检测实验室常用仪器设备。

5.1.3.2 高效液相色谱仪，带有梯度系统，UV-检测器。

5.1.3.3 凯氏定氮仪。

5.1.3.4 C18萃取柱，500mg。

5.1.3.5 硅胶色谱柱：颗粒大小 $5\mu\text{m}$ ，柱直径4.6 mm，长250mm。

5.1.3.6 干燥箱： $110\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

5.1.3.7 带螺盖耐热试管，或者其他能够密封的耐热试管：容积为20mL。

5.1.3.8 注射器：10mL。

#### 5.1.4 采样

取代表样250mL送往实验室，样品不应受到破坏或者在转运和贮藏期间发生变化。采样参照ISO5538:1987执行。

#### 5.1.5 分析步骤

##### 5.1.5.1 试样水解液的制备

吸取2.00mL试样，置于带密闭的耐热试管(5.1.3.7)中，加入6mL的10.6mol/L盐酸溶液(5.1.2.4)，混匀。向试管中缓慢通入高纯度氮气(5.1.2.2)1min~2min，密闭试管，然后将其置于干燥箱(5.1.3.6)中，在 $110^{\circ}\text{C}$ 下加热水解23h~24h。加热约1h后，轻轻摇动试管。

加热结束后，将试管从干燥箱中取出，冷却后干过滤，保留滤液供测定。

##### 5.1.5.2 试样水解液中蛋白质含量的测定

吸取2.00mL试样水解液(5.1.5.1)，按GB/T 5413.1测定试样溶液中蛋白质含量。

##### 5.1.5.3 试样水解液中糠氨酸含量的测定

###### 5.1.5.3.1 试样水解液的纯化

将C18萃取柱(5.1.3.4)安装在注射器上，先后分别用5mL甲醇和10mL水润湿萃取柱，保持萃取柱湿润状态。吸取0.500mL试样水解液于萃取柱，用注射器(5.1.3.8)缓慢推入C18萃取柱内。吸取3mol/L盐酸溶液洗脱萃取柱中的样品至3 mL。

###### 5.1.5.3.2 测定

1) 色谱条件：C18硅胶色谱柱， $250\text{mm} \times 4.6\text{mm}$ ， $5\mu\text{m}$ 粒径，柱温 $32^{\circ}\text{C}$ 。

2) 洗脱液：0.1%三氟乙酸溶液(5.1.2.5)为洗脱液A，甲醇(5.1.2.1)为洗脱液B。

3) 洗脱梯度：见表1。

表1 洗脱梯度

序号	时间 min	流量 mL/min	洗脱液A %	洗脱液B %
1	—	1.00	100.0	0.0
2	16.00	1.00	86.8	13.2
3	16.50	1.50	100.0	0.0
4	30.00	1.00	0.0	100.0

4) 测定：利用洗脱液A和洗脱液B的混合液(50:50)，以1mL/min的流速平衡色谱系统。注

入20 $\mu$ L~50 $\mu$ L的3 mol/L盐酸溶液平衡柱子,以检测溶剂的纯度。注入10 $\mu$ L待测溶液测定糠氨酸含量。每测定10个样品后测定一次标准工作溶液(5.1.2.7),以校准仪器。糠氨酸的出峰时间应该在8min~10min(参见附录A和附录B)。

### 5.1.6 结果计算

糠氨酸含量以样品质量分数*W*计,数值以每100g蛋白质中所含毫克数表示,按如下公式计算:

$$W = \frac{b \times D}{m} \times 100 \dots\dots\dots (1)$$

式中:

*W* —— 样品中每100g蛋白质中糠氨酸的含量,单位为毫克(mg);

*b* —— 样品水解液中糠氨酸浓度,单位为微克每毫升( $\mu$ g/mL);

*D* —— 测定时稀释倍数(*D*=6);

*m* —— 样品水解液中蛋白质浓度,单位为毫克每毫升(mg/mL)。

计算结果精确到小数点后一位。

### 5.1.7 精密度

在重复性条件下获得两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的5%。

## 5.2 乳果糖含量的测定

### 5.2.1 原理

牛奶在加热处理过程中,部分乳糖异构为乳果糖,经 $\beta$ -D-半乳糖苷酶水解后生成半乳糖和果糖,通过酶法测定产生的果糖量计算牛乳中乳果糖含量。

### 5.2.2 试剂与材料

除非另有说明,在分析中仅用分析纯试剂和GB/T6682中一级水。

5.2.2.1 碳酸氢钠(NaHCO<sub>3</sub>)。

5.2.2.2 过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>),质量分数为30%。

5.2.2.3 辛醇(C<sub>8</sub>H<sub>18</sub>O)。

5.2.2.4 灭菌水。

5.2.2.5 300g/L硫酸锌溶液。

5.2.2.6 150g/L亚铁氰化钾溶液。

5.2.2.7 0.33 mol/L氢氧化钠溶液(NaOH)。

5.2.2.8 1 mol/L氢氧化钠溶液 (NaOH)。

5.2.2.9 缓冲液 A: pH=7.5。

称4.8g磷酸氢二钠 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), 0.86g磷酸二氢钠 ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) 和0.1g硫酸镁 ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) 溶解于80mL水中, 用1mol/L 氢氧化钠溶液调整pH到 $7.5 \pm 0.1$  ( $20^\circ\text{C}$ ), 稀释到100mL, 摇匀。

5.2.2.10 缓冲液 B: pH=7.6。

称取14.00g三乙醇胺 [ $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_3\text{HCl}$ ] 和0.25g硫酸镁 ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) 溶解于80mL水中。用1mol/L 氢氧化钠溶液 (5.2.2.8) 调整pH到 $7.6 \pm 0.1$  ( $20^\circ\text{C}$ ), 稀释到100mL, 摇匀。

5.2.2.11 缓冲液C。

将40.0mL缓冲液B用水稀释到100mL, 摇匀。

5.2.2.12  $\beta$ -D-半乳糖苷酶悬浮液。

用3.2mol/L 硫酸铵溶液将活性为30IU/mg的  $\beta$ -D-半乳糖苷酶 (EC 3.2.1.23) 制备成浓度为5mg/mL的悬浮液。

5.2.2.13 葡萄糖氧化酶悬浮液。

用灭菌水将活性为200IU/mg的葡萄糖氧化酶 (EC 1.1.3.4) 制备成浓度为20mg/mL悬浮溶液。

5.2.2.14 过氧化氢酶悬浮液。

用灭菌水将活性为65000IU/mg的过氧化氢酶 (EC 1.11.1.6) 制备成浓度为20mg/mL的悬浮液。

5.2.2.15 己糖激酶/葡萄糖-6-磷酸脱氢酶悬浮液。

在1mL浓度为3.2mol/L 硫酸铵溶液中加入2mg活性为140IU/mg的己糖激酶 (EC 2.7.1.1) 和1mg活性为140IU/mg的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 (EC 1.11.1.6), 轻摇均匀, 成悬浮液。

5.2.2.16 磷酸葡萄糖异构酶悬浮液。

用3.2mol/L硫酸铵溶液将活性为350IU/mg的磷酸葡萄糖异构酶 (EC 5.3.1.9) 制备成浓度为2mg/mL的悬浮液。

5.2.2.17 ATP溶液。

将50mg 5'-ATP- $\text{Na}_2$  和50mg碳酸氢钠 (5.2.2.1) 溶于1mL水中。

5.2.2.18 NADP溶液。

将10mg  $\beta$ -NADP- $\text{Na}_2$  溶于1mL水中。

### 5.2.3 仪器和设备

5.2.3.1 检测实验室常用仪器设备。

5.2.3.2 水浴或干燥箱：温度能维持在 $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 。

5.2.3.3 分光光度计，能在340nm波长处检测。

### 5.2.4 采样

同5.1.4。

### 5.2.5 分析步骤

#### 5.2.5.1 试液制备

量取50.0mL样品到100mL容量瓶中，用水稀释到刻度后混匀。

#### 5.2.5.2 纯化

吸取10.0mL试液(5.2.5.1)于50mL锥形瓶中，依次加入1.75mL亚铁氰化钾溶液(5.2.2.6)、1.75mL硫酸锌溶液(5.2.2.5)和6.5mL缓冲液A(5.2.2.9)。每加入一种溶液后，充分振荡均匀。全部溶液加完后，静置10min，过滤，弃去最初的1mL~2mL滤液，收集滤液。

#### 5.2.5.3 水解乳糖和乳果糖

吸取5.00mL滤液于10mL容量瓶中，加入50 $\mu\text{L}$ 的 $\beta$ -D-半乳糖苷酶悬浮液(5.2.2.12)，混匀后加盖。在 $40^{\circ}\text{C}$ 水浴或干燥箱培养至少10h。

#### 5.2.5.4 葡萄糖氧化

依次加入2.0mL缓冲液C(5.2.2.11)、100 $\mu\text{L}$ 葡萄糖氧化酶悬浮液(5.2.2.13)、1滴辛醇(5.2.2.3)、0.5mL浓度为0.33mol/L氢氧化钠溶液(5.2.2.7)、50 $\mu\text{L}$ 过氧化氢(5.2.2.2)和0.1mL过氧化氢酶悬浮液(5.2.2.14)，每加入一种试剂均要摇匀。全部溶液加完后，在 $40^{\circ}\text{C}$ 水浴或干燥箱中培养3h。冷却后稀释至10mL，过滤，弃去最初的1mL~2mL滤液，收集滤液。

#### 5.2.5.5 空白

依照5.2.5.1到5.2.5.4步骤处理空白溶液，但不加 $\beta$ -D-半乳糖苷酶悬浮液(5.2.2.12)。

#### 5.2.5.6 测定

测定步骤见表2。

表2 测定步骤

步骤	空白	样品
比色皿中依次加入：		
缓冲液B(5.2.2.10)	1.00mL	1.00mL
ATP溶液(5.2.2.17)	0.100mL	0.100mL
NADP溶液(5.2.2.18)	0.100mL	0.100mL
滤液(5.2.5.4)	1.00mL	1.00mL
水	1.00mL	1.00mL



混合均匀后，静置3min		
加入己糖激酶/葡萄糖-6-磷酸脱氢酶悬浮液(5.2.2.15)	20 $\mu$ L	20 $\mu$ L
混合均匀，等反应停止后(约10min)，记录吸光值	$A_{b1}$	$A_{s1}$
加入磷酸葡萄糖异构酶悬浮液(5.2.2.16)	20 $\mu$ L	20 $\mu$ L
混合均匀，等反应停止后(10min~15min)，记录吸光值	$A_{b2}$	$A_{b2}$
注1：以上反应均在同一比色皿中完成。		
注2：如果1mL滤液吸光值增加超过1.3，则减少样品滤液取样体积，注意增加水以保证比色皿中反应液总体积不变。		

## 5.2.6 结果计算

### 5.2.6.1 吸光值差

样品吸光值差  $\Delta A_s$  的计算：

$$\Delta A_s = (A_{s2} - A_{s1}) \dots\dots\dots (2)$$

空白吸光值差  $\Delta A_b$  的计算：

$$\Delta A_b = (A_{b2} - A_{b1}) \dots\dots\dots (3)$$

样品净吸光值差  $\Delta AL$  的计算：

$$\Delta AL = \Delta A_s - \Delta A_b \dots\dots\dots (4)$$

### 5.2.6.2 乳果糖含量

乳果糖的含量以样品的质量浓度  $c$  计，数值以毫克每升 (mg/L) 表示，按下列公式计算：

$$c = \frac{ML \times V_1 \times 400}{\varepsilon \times d \times V_2 \times V} \times \Delta AL \dots\dots\dots (5)$$

式中：

$\Delta AL$ ——样品净吸光值差；

$ML$  ——乳果糖的摩尔质量 (342.3g/mol)；

$\varepsilon$  ——NADPH在340nm处的摩尔吸光值 (6.3 L · mmol<sup>-1</sup> · cm<sup>-1</sup>)；

$V_1$  ——比色皿液体总体积， $V_1=3.240$ mL；

$V_2$  ——比色皿中滤液的体积， $V_2=1.00$ mL；

$d$  ——比色皿光通路长度， $d=1.00$ cm；

$V$  ——测试样体积 (L)。

计算结果精确到小数点后一位。

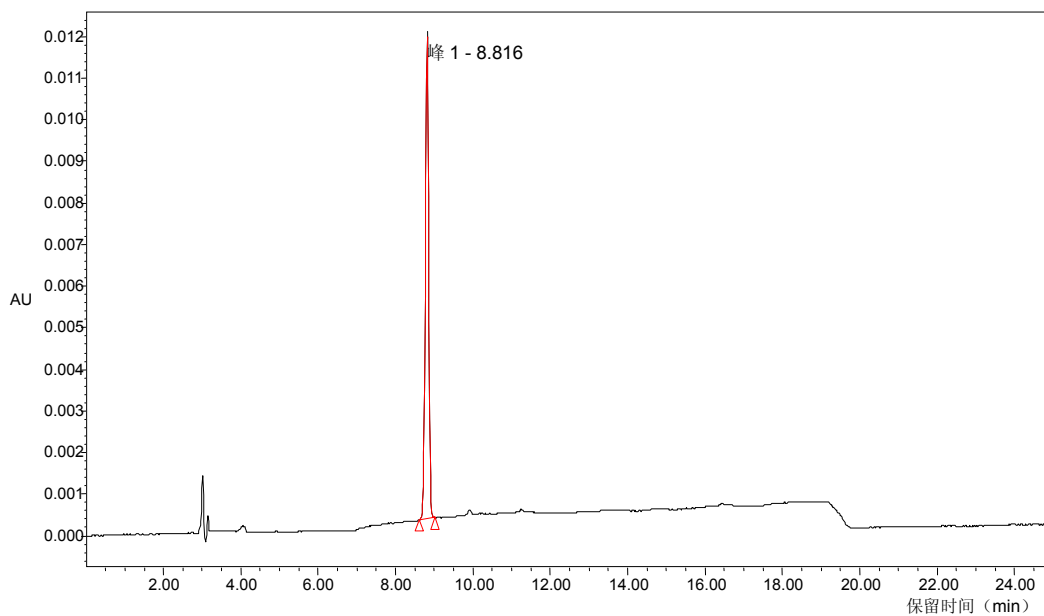
### 5.2.7 精密度

在重复性条件下获得两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的5%。

## 附录A

(资料性附录)

## 糠氨酸的分离图谱



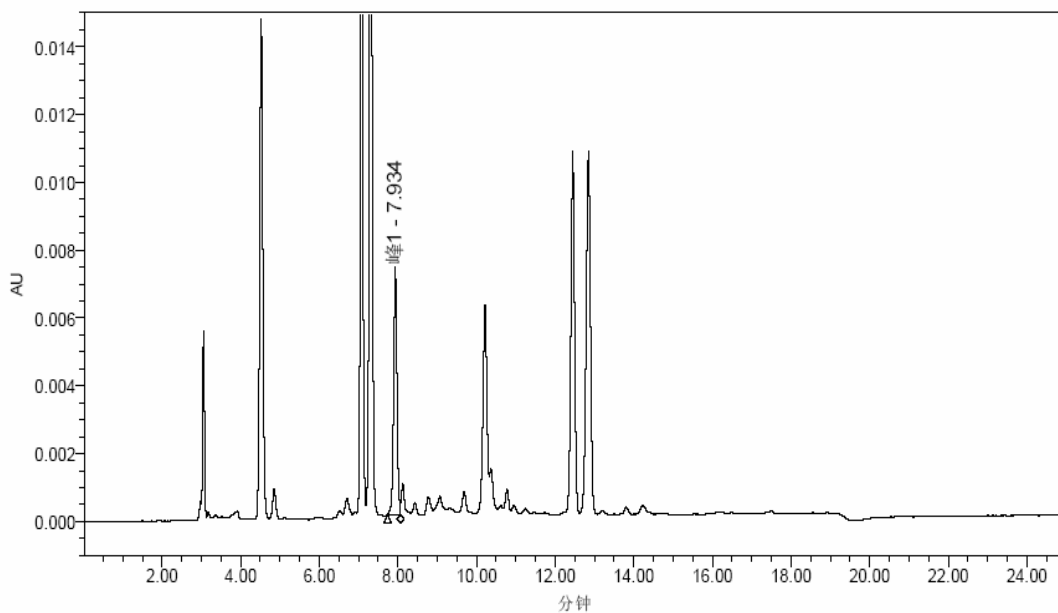
注：横轴表示保留时间，单位为分钟（min）；纵轴表示吸光度（AU）；峰1表示糠氨酸峰

图A.1 糠氨酸标准物图谱

## 附录B

(资料性附录)

## 巴氏杀菌乳样品中糠氨酸的分离图谱



注：横轴表示保留时间，单位为分钟（min）；纵轴表示吸光度（AU）；峰1表示糠氨酸峰

图B.1 巴氏杀菌乳中糠氨酸图谱