

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 1422—2007

乳及乳制品中乳糖的测定 酶—比色法

Determination of lactose in milk and milk products

Enzyme-colorimetric method

(IDF79B:1991, Dried milk, dried ice-mixes & processed cheese
determination of lactose content enzymatic methods, MOD)

2007-06-14 发布

2007-09-01 实施



中华人民共和国农业部 发布

前 言

本标准修改采用 IDF79B:1991《乳粉、冰淇淋粉和加工干酪中乳糖含量测定—酶法》(英文版)。
本标准根据 IDF79B:1991 重新起草。

考虑到我国国情,本标准与该国际标准的主要差异如下:

- 试剂部分增加酸度调节剂氢氧化钠、硫酸以及酶试剂硫酸铵的配制方法;
- 增加试样制备一章,包括液体、固液体、固体试样的制备;
- 分析步骤中增加标准曲线的绘制,由试液吸光度测定与标准系列比较定量,不采用国际标准中摩尔吸光系数计算定量;
- 以试剂空白和试液空白扣除干扰组分和葡萄糖本底值,不采用国际标准中吸光度减量计算;
- 免去国际标准中预试验和试验报告章条;
- 增加附录 A,规定酶的技术要求、试验方法及判定规则;
- 编写格式、用语遵照我国标准 GB/T 1.1—2000《标准化工作导则 第 1 部分:标准的结构和编写规则》和 GB/T 20001.4—2001《标准编写规则 第 4 部分:化学分析方法》。

本标准的附录 A 为规范性附录。

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:中国科学院沈阳应用生态研究所农产品安全与环境质量检测中心。

本标准主要起草人:王颜红、林桂凤、王世成、张红、杨玉兰、齐伟。

乳及乳制品中乳糖的测定 酶一比色法

1 范围

本标准规定了乳及乳制品中乳糖含量的酶一比色法测定方法。

本标准适用于乳及乳制品中乳糖的测定。

本标准试液的检出限为 0.5 μg/mL。

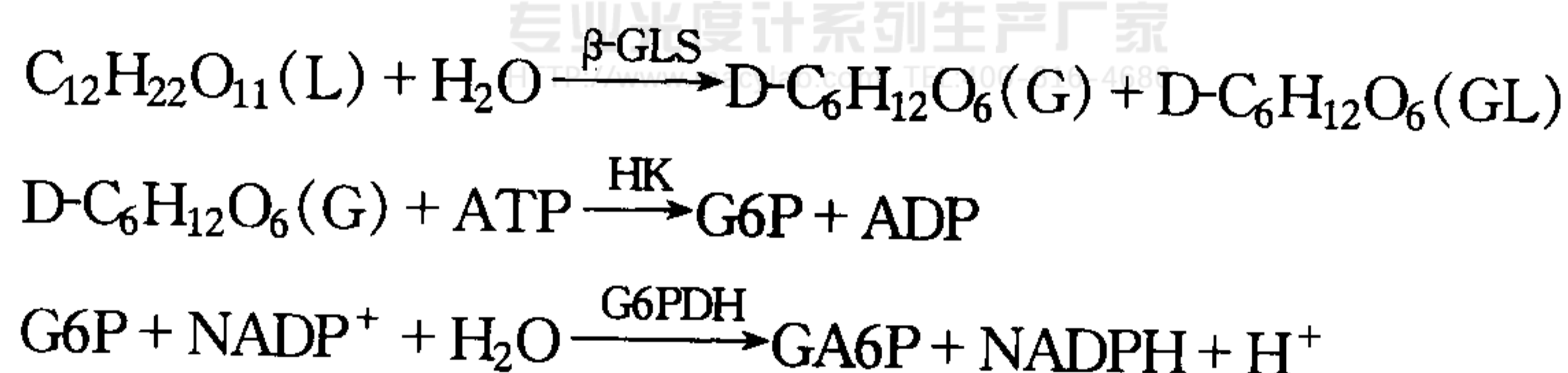
2 规范性引用文件

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 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 原理

在β-半乳糖苷酶(β-GLS)催化下,乳糖被酶解为D-葡萄糖(G)和D-半乳糖(GL)。己糖激酶(HK)将D-葡萄糖磷酸化生成6-磷酸葡萄糖(G6P),同时将三磷酸腺苷(ATP)转化为二磷酸腺苷(ADP)。受6-磷酸葡萄糖脱氢酶(G6PDH)催化,6-磷酸葡萄糖氧化为6-磷酸葡萄糖酸(GA6P),同时烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADP⁺)被还原成还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)。在波长 340 nm 处 NADPH 的吸光度值与乳糖含量成正比,与标准系列比较定量。



4 试剂

除非另有说明,在分析中仅使用确认为分析纯的试剂,实验用水应符合 GB/T 6682 的规定。

4.1 31 g/L 亚铁氰化钾溶液

称取 3.55 g 三水亚铁氰化钾(K₄[Fe(CN)₆]·3H₂O)溶于水,稀释至 100 mL,混匀。

4.2 40 g/L 硫酸锌溶液

称取 7.13 g 七水硫酸锌(ZnSO₄·7H₂O)溶于水,稀释至 100 mL,混匀。

4.3 2 mol/L 硫酸溶液

警告——稀释浓硫酸时应当将硫酸缓慢加入水中,且不断搅动。否则会引起爆炸。

用水稀释浓硫酸 V_{1.0} + V_{8.0}。

4.4 4 g/L 氢氧化钠溶液

称取 0.4 g 氢氧化钠(NaOH)溶于水,稀释至 100 mL,混匀,置于聚乙烯塑料瓶中。

4.5 200 g/L 氢氧化钠溶液

称取 20.0 g 氢氧化钠(NaOH)溶于水,稀释至 100 mL,混匀,置于聚乙烯塑料瓶中。

4.6 422 g/L 硫酸铵溶液

称取 42.2 g 硫酸铵((NH₄)₂SO₄)溶于水,稀释至 100 mL,混匀。

4.7 柠檬酸缓冲溶液, pH 6.6

称取 2.8 g 二水柠檬酸三钠($C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$), 0.042 g 一水柠檬酸($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$)和 0.625 g 七水硫酸镁($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), 溶于约 40 mL 水中, 混匀。

用 2 mol/L 硫酸溶液(4.3)或 4 g/L 氢氧化钠溶液(4.4)将 pH 调至 6.6 ± 0.1 , 定容至 50 mL, 混匀后放置 $0^\circ C \sim 4^\circ C$ 冰箱中, 可保存 3 个月, 使用前放置至室温。

4.8 三乙醇胺(TEA)缓冲溶液, pH 7.6

称取 14.0 g 三乙醇胺盐酸盐($C_6H_{15}NO_3 \cdot HCl$), 0.25 g 七水硫酸镁($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)溶于约 80 mL 水中, 用 200 g/L 氢氧化钠溶液(4.5)将 pH 调至 7.6 ± 0.1 , 稀释至 100 mL, 混匀后放置 $0^\circ C \sim 4^\circ C$ 冰箱中, 可保存 2 个月。

4.9 NADP⁺ - ATP - TEA 缓冲溶液

称取 65 mg 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸二钠盐($C_{21}H_{26}N_7O_{17}P_3Na_2$, 纯度 98% ~ 99%)和 170 mg 5-三磷酸腺苷二钠盐($C_{10}H_{14}N_5O_{13}P_3Na_2$, 纯度 99% ~ 100%), 溶于 30 mL 三乙醇胺缓冲溶液(4.8)中, 混匀后放置 $0^\circ C \sim 4^\circ C$ 冰箱中, 可保存 2 周, 使用前放置至室温。

4.10 β -GLS- $(NH_4)_2SO_4$ 悬浊液

将 β -半乳糖苷酶(β -GLS, 埃希氏大肠杆菌, EC 3.2.1.23)加入 422 g/L 硫酸铵溶液(4.6)中, 使 β -半乳糖苷酶的活性不低于 60 IU/mL(技术要求应符合附录 A 的规定), 缓慢搅匀成悬浊液后放置 $0^\circ C \sim 4^\circ C$ 冰箱中, 可保存 12 个月。使用时该悬浊液的容器应浸入冰水中。

4.11 HK-G6PDH- $(NH_4)_2SO_4$ 悬浊液

将己糖激酶(HK, 酵母, EC 2.7.1.1)和 6-磷酸葡萄糖脱氢酶(G6PDH, 酵母, EC 1.1.1.49)加入 422 g/L 硫酸铵溶液(4.6)中, 使己糖激酶的活性不低于 280 IU/mL(技术要求应符合附录 A 的规定), 6-磷酸葡萄糖脱氢酶的活性不低于 140 IU/mL(技术要求应符合附录 A 的规定), 缓慢搅匀成悬浊液后放置 $0^\circ C \sim 4^\circ C$ 冰箱中, 可保存 12 个月。使用时该悬浊液的容器应浸入冰水中。

4.12 乳糖标准溶液

称取经 $87^\circ C$ 干燥至恒重的一水乳糖($C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O$)0.842 g, 精确到 0.000 1 g, 溶于水中, 定容至 100 mL, 摇匀。准确吸取 1.00 mL 上述溶液, 用水定容至 100 mL, 即得 80 $\mu g/mL$ 乳糖标准溶液, 现用现配。

5 仪器

实验室常规仪器及以下各项:

- 5.1 分析天平: 感量 0.1 mg。
- 5.2 比色管: 10 mL, 带盖。
- 5.3 紫外可见分光光度计: 340 nm, 1 cm 比色皿。
- 5.4 恒温水浴锅: $\pm 1^\circ C$ 。
- 5.5 组织捣碎机。

6 试样制备

6.1 固体试样

取有代表性的样品至少 20 g, 用组织捣碎机(5.5)捣碎均匀, 置于密闭的玻璃容器内。

6.2 固液体试样

取有代表性的样品至少 200 g, 用组织捣碎机(5.5)捣碎均匀, 置于密闭的玻璃容器内。

6.3 液体试样

取有代表性的样品至少 200 g, 充分混匀, 置于密闭的玻璃容器内。

7 分析步骤

7.1 试液制备

用分析天平(5.1)称取试样,放置于 100 mL 玻璃烧杯中,固液体试样或液体试样称取 2 g,固体试样称取 0.2 g,均精确到 0.1 mg。加入约 20 mL 40℃~50℃ 热水,搅匀成乳浊状或悬浊状试料,转移至 250 mL 容量瓶中。用刻度移液管依次加入 5.0 mL 亚铁氰化钾溶液(4.1),5.0 mL 硫酸锌溶液(4.2)和 10.0 mL 4 g/L 氢氧化钠溶液(4.4),每次加入后均应充分摇匀。定容,混匀,静置 30 min,过滤,弃去最初滤液约 30 mL。吸取 5.00 mL 滤液于 100 mL 容量瓶中,定容,即为试液。

7.2 标准曲线绘制

用微量移液管吸取 0.00,0.20,0.40,0.60,0.80,1.00 mL 乳糖标准溶液(4.12),分别置于 10 mL 比色管(5.2)中,各加入 0.20 mL 柠檬酸缓冲溶液(4.7),0.05 mL β -GLS-(NH₄)₂SO₄ 悬浊液(4.10),摇匀,于 36℃±1℃ 恒温水浴锅(5.4)中恒温 15 min。取出后加入 1.00 mL NADP⁺-ATP-TEA 缓冲溶液(4.9),0.05 mL HK-G6PDH-(NH₄)₂SO₄ 铵悬浊液(4.11),摇匀,于 36℃±1℃ 恒温水浴锅中恒温 60 min。取出后,冷却至室温,用水定容至 5.00 mL,摇匀,放置 5 min。用 1 cm 比色皿,以乳糖标准溶液含量为 0.00 的试剂溶液作参比,在波长 340 nm 处测定各比色管内溶液的吸光度。以乳糖含量为纵坐标,以吸光度值为横坐标,绘制标准曲线。

7.3 试液的测定

用微量移液管吸取 1.00 mL 试液(7.1),置于 10 mL 比色管中,加入 0.20 mL 柠檬酸缓冲溶液,1.00 mL NADP⁺-ATP-TEA 缓冲溶液,0.05 mL HK-G6PDH-(NH₄)₂SO₄ 悬浊液,摇匀,于 36℃±1℃ 恒温水浴锅中恒温 60 min,取出,冷却至室温,用水定容至 5.00 mL,摇匀。此溶液即为空白溶液。

用微量移液管吸取 1.00 mL 试液(7.1),置于 10 mL 比色管中。以下按 7.2“各加入 0.20 mL 柠檬酸缓冲溶液(4.7)……用 1 cm 比色皿”操作,以空白溶液作参比,在波长 340 nm 处测定比色管内试液的吸光度,在标准曲线上查出对应的乳糖含量。

8 结果计算

乳及乳制品中乳糖的含量,数值以克每百克(g/100 g)表示,按下式计算:

$$X = \frac{cV_1V_3}{10\,000mV_2V_4}$$

式中:

X ——乳及乳制品中乳糖的含量,单位为克每百克(g/100 g);

c ——标准曲线上查出的试液中乳糖的含量,单位为微克(μ g);

m ——试料的质量,单位为克(g);

V_1 ——试料经脱蛋白处理后的定容体积,250 mL;

V_2 ——吸取滤液体积,5.00 mL;

V_3 ——滤液定容体积,100 mL;

V_4 ——吸取试液体积,1.00 mL。

两个平行样测定算术平均值的计算结果保留 3 位有效数字。

9 精密度

9.1 重复性

在重复性条件下获得的两次独立测试结果的绝对差值不大于这两个测定值算术平均值的 6%。

9.2 再现性

在再现性条件下获得的两次独立测试结果的绝对差值不大于这两个测定值算术平均值的 14%。

MAC 专业光度计 280 厂家
HTTP://www.mac/

$O_2 \cdot H_2O$

水定容至

(2 001Ng)克

$V_1 V_2$

$V_m 000 01$

(g)克百研克

加外单,量

:Im 025

附 录 A (规范性附录)

β-半乳糖苷酶、己糖激酶、6-磷酸葡萄糖脱氢酶的技术要求、试验方法及判定规则

A.1 技术要求

β-半乳糖苷酶、己糖激酶、6-磷酸葡萄糖脱氢酶按其活性计算都不应含有大于 0.01% 的以下各种酶:β-果糖苷酶、淀粉葡萄糖苷酶、纤维素酶、α-糖苷酶、葡萄糖脱氢酶和 NADPH 氧化酶。

A.2 试验方法

用微量移液管吸取 0.8 mL 乳糖标准溶液(4.12),置于 10 mL 比色管(5.2)中,加入 32 μg/mL 的蔗糖(分析纯)、可溶性淀粉(分析纯)、麦芽糖(生化纯)和纤维二糖(生化纯)的混合溶液 1 mL。以下按 7.2 “加入 0.02 mL 柠檬酸缓冲溶液(4.7)……在波长 340 nm 处测定比色管内溶液的吸光度。”操作。在标准曲线(7.2)上查出对应的乳糖含量。乳糖的测定回收率以质量分数(%)表示,按下式计算:

$$R = \frac{c}{0.8 \times 80} \times 100$$

式中:

c ——从标准曲线上查出的试液中乳糖含量,单位为微克(μg)。

A.3 判定规则

乳糖测定回收率,如在 85% ~ 120% 范围内,则判定 β-半乳糖苷酶、己糖激酶、6-磷酸葡萄糖脱氢酶符合技术要求。