



中华人民共和国农业行业标准

NY/T 801—2004

生鲜牛乳及其制品中碱性磷酸酶 活度的测定方法

Method for determination of alkaline phosphatase
activity in raw milk and its products

2004-04-16 发布

2004-06-01 实施

中华人民共和国农业部 发布

前 言

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准起草单位：农业部乳品质量监督检验测试中心。

本标准主要起草人：王金华、张宗城、张均媚。

生鲜牛乳及其制品中碱性磷酸酶活度的测定方法

1 范围

本标准规定了生鲜牛乳及其制品中碱性磷酸酶活度的测定方法。

本标准适用于生鲜牛乳及其制品中碱性磷酸酶活度的测定。

本标准方法的检出限为 0.02 μg 苯酚/mL 或 g 。

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 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 术语和定义

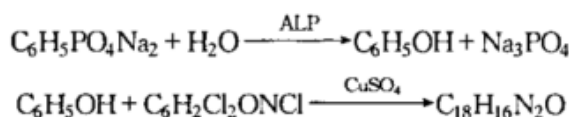
下列术语和定义适用于本标准。

碱性磷酸酶活度 alkaline phosphatase activity

产品中具活性的碱性磷酸酶数量,它表示为在一定条件下 1 mL 液态乳或 1 g 固态乳制品复原的液态乳中碱性磷酸酶催化磷酸酐二钠生成苯酚的微克数。

4 原理

生鲜牛乳及其制品中碱性磷酸酶(ALP)在 40 $^{\circ}\text{C}$ 条件下催化磷酸酐二钠生成的苯酚与 2,6-二氯醌氯亚胺反应生成蓝色靛酚,在 655 nm 处测定靛酚吸光度,与标准苯酚比较定量。



5 试剂

所用试剂均为分析纯试剂,实验用水应符合 GB 6682 中一级水的规格或相当纯度的水。

5.1 碳酸钠(Na_2CO_3)

5.2 碳酸氢钠(NaHCO_3)

5.3 碳酸盐缓冲液,pH 9.64

称取 4.689 g 碳酸钠和 3.717 g 碳酸氢钠,溶于水,定容至 100 mL。

5.4 稀释碳酸盐缓冲液,pH 9.64

将碳酸盐缓冲液用水稀释 $V_{10.00} \rightarrow V_{100.00}$ 。

5.5 磷酸酐二钠($\text{C}_6\text{H}_5\text{PO}_4\text{Na}_2$)

5.6 2,6-二氯醌氯亚胺溶液,3 g/L

称取 0.030 g 2,6-二氯醌氯亚胺($\text{O}=\text{C}_6\text{H}_2\text{Cl}_2=\text{NCl}$),精确至 0.000 1 g,溶于 10 mL 甲醇中,存于棕色试剂瓶,4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中冷藏。测定当天配制。

5.7 硫酸铜溶液,2 g/L

称取 0.200 g 硫酸铜(CuSO_4),溶于水,定容至 100 mL。

5.8 正丁醇($\text{C}_4\text{H}_9\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$)

沸点 $116\text{ }^\circ\text{C}\sim 118\text{ }^\circ\text{C}$ 。

5.9 正丁醇溶液,7.5%

将 75 mL 正丁醇和 925 mL 水混合,存于棕色试剂瓶,4℃冰箱中冷藏。

5.10 正丁醇溶液,8.3%

将 83 mL 正丁醇和 917 mL 水混合,存于棕色试剂瓶,4℃冰箱中冷藏。

5.11 底物显色剂缓冲液,pH9.50

取 10 mL 水置于 100 mL 分液漏斗中,称取 0.500 g 磷酸酚二钠($\text{C}_6\text{H}_5\text{PO}_4\text{Na}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$),精确至 0.000 1 g,溶于其中;加入 25 mL 碳酸盐缓冲液、2 滴~3 滴 2,6-二氯醌氯亚胺溶液和 1 滴硫酸铜溶液,混匀,静置 5 min;再加入 3 mL 正丁醇,混匀,静置分层后,放出底层水相溶液到容量瓶中,用水定容至 500 mL;混匀,4℃冰箱中冷藏。测定当天配制。

5.12 乙酸镁溶液,8.82%

称取 8.82 g 乙酸镁[$\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$],精确至 0.000 1 g,用水定容至 100 mL,该溶液含镁 10 mg/mL。

5.13 盐酸溶液,0.1 mol/L

量取 8.3 mL 盐酸(HCl),置于容量瓶中,用水定容至 1 L。

5.14 苯酚标准溶液,1 mg/mL

称取 1.000 g 无水苯酚,精确至 0.000 1 g,置于容量瓶中,用盐酸定容至 1 L,存于棕色试剂瓶,4℃冰箱中冷藏。该溶液稳定性可达数月。

5.15 苯酚标准溶液,10 μg/mL

将苯酚标准储备液用水稀释 $V_{10.00}\longrightarrow V_{1\,000.0}$,存于棕色试剂瓶,4℃冰箱中冷藏。测定当天配制。

6 仪器

6.1 恒温水浴锅

精确至 1℃。

6.2 可见光分光光度计

655 nm。

6.3 微量移液器

1.00 mL,精度 0.01 mL。

6.4 冰浴容器

6.5 离心机

3 000 r/min。

7 试样的制备

取样后,样品应保存在 0℃~4℃冰箱中,36 h 内开始测定。

7.1 生鲜牛奶

用微量移液器吸取 1 mL 样品,定容至 250 mL。

7.2 全脂牛奶、脱脂牛奶、浓缩乳、巧克力奶

置于烧杯内。

7.3 酸牛奶和其他发酵乳制品

称取均质样品 5 g, 精确至 0.000 1 g, 置于烧杯内; 加入 25 mL 碳酸盐缓冲液后, 再加入 0.08 g 碳酸钠和 0.06 g 碳酸氢钠, 精确至 0.000 1 g, 用碳酸盐缓冲液定容至 50 mL。

7.4 冰淇淋

称取均质样品 5 g, 精确至 0.000 1 g, 融化后静置 1 h, 放出内含空气, 用水定容至 50 mL。

7.5 炼乳

称取 5 g, 精确至 0.000 1 g, 用水定容至 50 mL。

7.6 稀奶油、奶油

称取 5 g, 精确至 0.000 1 g, 用正丁醇定容至 50 mL。

7.7 干酪

称取均质样品 5 g, 精确至 0.000 1 g。若 pH 大于 7.0, 则加 2 mL 水; 若 pH 等于或小于 7.0, 则加入 1 mL 水及 1 mL 稀释碳酸盐缓冲液, 搅匀。加入 18 mL 正丁醇溶液, 搅拌混匀, 静置 5 min; 过滤, 滤液在冰浴容器中冷却 5 min 后加入 4 mL 乙酸镁溶液, 混匀; 用碳酸盐缓冲液定容至 50 mL。

7.8 干酪素

称取 5 g, 精确至 0.000 1 g, 溶于 20 mL 正丁醇溶液, 颠摇使干酪素完全溶解; 加入 8 mL 乙酸镁溶液, 混匀; 用碳酸盐缓冲液定容至 50 mL。

7.9 乳粉

称取 5 g, 精确至 0.000 1 g, 用水溶解, 定容至 50 mL。

8 分析步骤

8.1 标准曲线的绘制

用微量移液器吸取 0.00 mL、0.10 mL、0.20 mL、0.50 mL、1.00 mL 苯酚标准溶液, 分别置于 25 mL 比色管中; 各加入 0.5 mL 碳酸盐缓冲液, 混匀; 各加入 0.1 mL 2,6-二氯醌氯亚胺溶液和 2 滴硫酸铜溶液, 混匀, 在 $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中加热 5 min; 取出后, 在冰浴容器中冷却 5 min; 加入 20 mL 正丁醇, 缓慢颠摇 6 次, 混匀; 离心机分离 5 min, 用吸管吸取分离的正丁醇, 过滤, 滤液置于 1 cm 比色皿中。苯酚标准溶液系列分别含 0 μg 、1.0 μg 、2.0 μg 、5.0 μg 、10 μg 苯酚。用 0 μg 苯酚标准溶液调整分光光度计零点, 在 655 nm 处测定各比色杯中标准溶液的吸光度。以苯酚含量为横坐标, 吸光度为纵坐标, 绘制标准曲线。

8.2 试料的测定

用微量移液器分别吸取 1 mL 试样置于三个带塞试管中, 其中两个做平行样品试验, 另一个做空白试验。将空白试验的整个试管在沸水中加热 2 min, 然后冷却至室温。三个带塞试管中分别加入 10 mL 底物显色剂缓冲液, 缓慢颠摇混匀, $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴锅中加热 15 min, 加热期间至少混匀 1 次。从恒温水浴锅中取出后加入 0.1 mL 2,6-二氯醌氯亚胺溶液及 2 滴硫酸铜溶液, 混匀, 立即在 $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴锅中加热 5 min, 取出后在冰浴容器中冷却 5 min, 加入 20 mL 正丁醇缓慢颠摇 6 次, 混匀, 静置分层。若正丁醇乳化, 可在冰浴容器中冷却 5 min, 离心机分离 5 min。吸出分离出的正丁醇, 过滤, 滤液置于 1 cm 比色皿中, 以空白试料调整分光光度计的零点, 在 655 nm 处测定试料吸光度, 并在标准曲线上查出对应的苯酚含量。

9 结果计算

样品中碱性磷酸酶活度按式(1)计算:

$$A = \frac{P \times d}{m} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

A ——碱性磷酸酶活度,单位为 μg 苯酚/mL 或 μg 苯酚/g;

P ——标准曲线上查出的苯酚含量,单位为微克(μg);

d ——稀释倍数(无稀释时 $d = 1$);

m ——样品体积或质量,单位为毫升或克(mL 或 g)。

10 允许差

相对相差 $\leq 10\%$ 。
