**食品安全国家标准**

**巴氏杀菌乳和UHT灭菌乳中复原乳**

**检验方法**

 **National  food safety standard  Identification of reconstituted milk in pasteurizedand UHT milk**

**（第一次讨论稿）**

中国农业科学院北京畜牧兽医研究所

农业部奶及奶制品质量监督检验测试中心（北京）

农业部奶产品质量安全风险评估实验室（北京）

**前     言**

**本标准代替NY/T939―2016《巴氏杀菌乳和UHT灭菌乳中复原乳的鉴定》。**

**与NY/T 939―2016相比，主要变化如下：**

**——删除了术语和定义中生乳、热处理、巴氏杀菌、巴氏杀菌乳、超高温瞬时灭菌、超高温瞬时灭菌乳（UHT灭菌乳）的定义；**

**——修改了糠氨酸测定方法中流动相条件；**

**——完善了乳果糖测定方法中的试剂配制。**

**本标准所代替标准的历次版本发布情况为：**

**——NY/T 939―2005、NY/T 939―2016。**

13　范围

本标准规定了巴氏杀菌乳和UHT灭菌乳中复原乳的检验方法。

本标准适用于巴氏杀菌乳和UHT灭菌乳。

14　术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

2.1

复原乳reconstituted milk

将干燥的或者浓缩的乳制品与水按比例混匀后获得的乳液。

2.2

糠氨酸Furosine

牛乳在加热过程中，氨基酸、蛋白质与乳糖通过美拉德反应生成*ε*-N-脱氧乳果糖基-L-赖氨酸（*ε*-N-deoxylactolusyl-L-lysine），经酸水解转换成更稳定的糠氨酸（*ε*-N-2-furoylmethyl -L-lysine，*ε*-N-2-呋喃甲基-L-赖氨酸）。

2.3

乳果糖Lactulose

牛乳在加热过程中，乳糖在酪蛋白游离氨基的催化下，碱基异构而形成的一种双糖。其化学名称为4-o-β-D-吡喃半乳糖基-D-果糖，可作为评价牛奶热处理效应的指标。

15　试验方法

3.1　糠氨酸含量的测定

3.1.1　原理

试样经盐酸水解后测定蛋白质含量，水解液经稀释后用高效液相色谱（HPLC）或超高效液相色谱（UPLC）在紫外（波长280nm）检测器下进行分析，外标法定量。

3.1.2　试剂和材料

注：除非另有说明，本方法所用试剂均为分析纯，水为GB/T6682规定的实验室一级水。

3.1.2.1  试剂

3.1.2.1.1 甲醇（CH3OH）：色谱纯。

3.1.2.1.2浓盐酸（HCl，密度为 1.19 g/mL）：分析纯。

3.1.2.1.3三氟乙酸：色谱纯。

3.1.2.1.4乙酸铵：色谱纯。

3.1.2.1.5 95%乙醇（C2H5OH）。

3.1.2.1.6硫酸铜（CuSO4·5H2O）。

3.1.2.1.7硫酸钾（K2SO4）。

3.1.2.1.8硫酸（H2SO4，密度为 1.84 g/mL）。

3.1.2.1.9硼酸（H3BO3）。

3.1.2.1.10氢氧化钠（NaOH）。

3.1.2.1.11溴甲酚绿指示剂（C21H14Br4O5S）。

3.1.2.1.12亚甲基蓝指示剂（C16H18ClN3S·3H2O）。

3.1.2.1.13甲基红指示剂（C15H15N3O2）。

3.1.2.2  试剂配制

3.1.2.2.1 盐酸溶液（3 mol/L）：在7.5 mL水中加入2.5 mL浓盐酸，混匀。

3.1.2.2.2盐酸溶液（10.6 mol/L）：在12 mL水中加入88 mL浓盐酸，混匀。

3.1.2.2.3 乙酸铵溶液（6 g/L）：准确称量6 g乙酸铵溶于部分水中，定容至1 L，过0.22 μm水相滤膜，超声脱气10 min。

3.1.2.2.4 乙酸铵（6g/L）含0.1 %三氟乙酸溶液：准确称量6 g乙酸铵溶于部分水中，加入1 mL三氟乙酸，定容至1 L，过0.22 μm水相滤膜，超声脱气10 min。

3.1.2.2.5硼酸溶液（20g/L）：称取 20 g硼酸，用水溶解并稀释至 1 L。

3.1.2.2.6氢氧化钠溶液（400 g/L）：称取40 g氢氧化钠加水溶解，冷却后，稀释至100 mL。

3.1.2.2.7甲基红乙醇溶液（1 g/L）：称取0.1 g甲基红，溶于95%乙醇并稀释至100 mL。

3.1.2.2.8亚甲基蓝乙醇溶液（1 g/L）：称取0.1 g亚甲基蓝，溶于95%乙醇并稀释至100 mL。

3.1.2.2.9溴甲酚绿乙醇溶液（1 g/L）：称取0.1 g溴甲酚绿，溶于95%乙醇，用95%乙醇稀释至100mL。

3.1.2.2.10混合指示液A：2份甲基红乙醇溶液与1份亚甲基蓝乙醇溶液临用时混合。

3.1.2.2.11混合指示液B：1份甲基红乙醇溶液与5份溴甲酚绿乙醇溶液。

3.1.2.3  标准品

3.1.2.3.1 糠氨酸：C12H17N2O4•xHCl。

3.1.2.3.2盐酸标准滴定溶液（0.0500 mol/L）。

3.1.2.4  标准溶液配制

3.1.2.4.1 糠氨酸标准储备溶液（500.0 mg/L）：将糠氨酸标准品按标准品证书提供的肽纯度系数（NetPeptide Content）换算后，用3mol/L盐酸溶液配制成标准储备溶液。-20℃条件下可储存24个月。

**示例：**糠氨酸标准品证书上标注肽纯度系数为69.1%，则称取7.24mg糠氨酸标准品，用3 mol/L盐酸溶液溶解并定容至10 mL，标准储备溶液的浓度为500.0 mg/L。

3.1.2.4.2 糠氨酸标准工作溶液（2.0 mg/L）：移取100 μL糠氨酸标准贮备溶液于25 mL容量瓶，以3 mol/L盐酸溶液定容。此标准工作溶液浓度即为2.0mg/L。

3.1.3　仪器

3.1.3.1  高效液相色谱仪：配有紫外检测器或二极管阵列检测器。

3.1.3.2  超高效液相色谱仪：配有紫外检测器或二极管阵列检测器。

3.1.3.4  干燥箱：（110±2）℃。

3.1.3.5  密封耐热试管：容积为20mL。

3.1.3.6 水相滤膜：0.22 μm。

3.1.3.7  天平：感量为0.01mg，1 mg。

3.1.3.8 定氮蒸馏装置。

3.1.3.9  凯氏定氮仪。

3.1.4　采样

用于检测的巴氏杀菌乳贮存和运输温度为2℃～6℃，UHT灭菌乳贮存和运输温度须不高于25℃。

依据GB/T 10111取不少于250 mL样品，样品不应受到破坏或者在转运和贮藏期间发生变化。监督抽检或仲裁检验采样应到加工厂抽取成品库的待销产品，一周内测定。

3.1.5　分析步骤

3.1.5.1　试样水解液的制备

吸取2.00 mL试样，置于密闭耐热试管中，加入6.00 mL 10.6 mol/L盐酸溶液，密闭试管，涡旋混匀。置于干燥箱，在110℃下加热水解12h～23 h。加热结束后，将试管从干燥箱中取出，冷却后用滤纸过滤，滤液供测定。

3.1.5.2　试样水解液中蛋白质含量的测定

3.1.5.2.1 凯氏定氮法

1）试样水解液消化：移取2.00 mL试样水解液移入干燥的100 mL定氮瓶中，加入0.2 g硫酸铜、6 g硫酸钾及10 mL硫酸，轻摇后于瓶口放一小漏斗，将瓶以45°角斜支于有小孔的石棉网上。小心加热，待内容物全部炭化，泡沫完全停止后，加强火力，并保持瓶内液体微沸，至液体呈蓝绿色并澄清透明后，再继续加热0.5 h～1 h。取下放冷，作为消化液备用。同时做试剂空白试验。

2）测定：装好定氮蒸馏装置，向水蒸气发生器内装水至2/3 处，加入数粒玻璃珠，加甲基红乙醇溶液数滴及数毫升硫酸，以保持水呈酸性，加热煮沸水蒸气发生器内的水并保持沸腾。

3）向接收瓶内加入30.0 mL硼酸溶液及6～8滴混合指示液A或混合指示液B，并使冷凝管的下端插入液面下，将全部消化液由小玻杯注入反应室，以50 mL水洗涤小玻杯并使之流入反应室内，随后塞紧棒状玻塞。将50.0 mL氢氧化钠溶液倒入小玻杯，提起玻塞使其缓缓流入反应室，立即将玻塞盖紧，并水封。夹紧螺旋夹，开始蒸馏。蒸馏10 min后移动蒸馏液接收瓶，液面离开冷凝管下端，再蒸馏1 min。然后用少量水冲洗冷凝管下端外部，取下蒸馏液接收瓶。尽快以盐酸标准滴定溶液滴定至终点，如用A混合指示液，终点颜色为灰蓝色；如用B混合指示液，终点颜色为浅灰红色。同时作试剂空白。

3.1.5.2.2自动凯氏定氮仪法

移取2.00 mL试样水解液，按照仪器说明书进行操作。

3.1.5.3　试样水解液中糠氨酸含量的测定

移取1.00 mL试样水解液，用超纯水稀释，巴氏杀菌乳试样水解液稀释3倍，灭菌乳试样水解液稀释30倍，过0.22 μm水相滤膜，滤液供上机测定。根据实验室配备的液相色谱仪器，按以下两种方法之一测定：

a）HPLC法测定

1）色谱参考条件

色谱柱：C18硅胶色谱柱，250 mm×4.6 mm，5 μm粒径，或相当者。

柱温：32℃。

波长：280 nm。

流动相：0.1 %三氟乙酸溶液为流动相A，乙腈为流动相B。

洗脱梯度：见表1。

表1 洗脱梯度

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 序号 | 时间min | 流速mL/min | 流动相A% | 流动相B% |
| 1 | － | 1.00 | 100.0 | 0.0 |
| 2 | 7.00 | 1.00 | 100.0 | 0.0 |
| 3 | 10.00 | 1.00 | 70.0 | 30.0 |
| 4 | 20.00 | 1.00 | 10.0 | 90.0 |
| 5 | 25.00 | 1.00 | 100.0 | 0.0 |
| 6 | 40.00 | 1.00 | 100.0 | 0.0 |

2）测定

利用流动相A和流动相B的混合液（50︰50）以1 mL/min的流速平衡色谱系统。然后，用初始流动相平衡系统直至基线平稳。注入10μL 3 mol/L盐酸溶液，以检测溶剂的纯度。注入10 μL待测溶液测定糠氨酸含量。色谱图参见附录A。

b）UPLC法测定

1）色谱参考条件

色谱柱：HSS T3高强度硅胶颗粒色谱柱，100 mm×2.1 mm，1.8μm粒径，或相当者。

柱温：35℃。

流动相：超纯水为流动相A， 0.1 %三氟乙酸溶液为流动相B，乙腈为流动相C。

洗脱梯度：见表2。

表2 洗脱梯度

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 序号 | 时间min | 流速mL/min | 流动相A% | 流动相B% | 流动相C% |
| 1 | 初始 | 0.4 | 45.0 | 55.0 | 0.0 |
| 2 | 0.5 | 0.4 | 45.0 | 55.0 | 0.0 |
| 3 | 2.0 | 0.4 | 100.0 | 0.0 | 0.0 |
| 4 | 2.1 | 0.4 | 0.0 | 0.0 | 100.0 |
| 5 | 3.5 | 0.4 | 0.0 | 0.0 | 100.0 |
| 6 | 3.6 | 0.4 | 45.0 | 55.0 | 0.0 |
| 7 | 8.0 | 0.4 | 45.0 | 55.0 | 0.0 |

2）测定

宜使用流动相纯水和甲醇，依次冲洗色谱系统；仪器使用前，使用流动相纯水过渡，用流动相A以0.4 mL/min的流速平衡色谱柱。注入0.5 μL 3mol/L盐酸溶液，以检测溶剂的纯度。注入0.5 μL待测溶液测定糠氨酸含量。色谱图参见附录A。

3.1.6结果计算

3.1.6.1  试样水解液中蛋白质含量

水解液中蛋白质含量以*m*计，数值以克每升（g/L）表示。

若采用凯氏定氮法，按公式（1）计算

式中：

*V——*水解液体积，单位为毫升（mL）；

*V*1*——*试液消耗盐酸标准滴定液的体积，单位为毫升（mL）；

*V*2*——*试剂空白消耗盐酸标准滴定液的体积，单位为毫升（mL）；

*c——*盐酸标准滴定溶液浓度，单位为摩尔每升（mol/L）；

0.0140*——*1 mL盐酸[c（HCl）＝1.000 mol/L]标准滴定溶液相当的氮的质量，单位为克每摩尔（g/mol）；

6.38*——*纯乳与纯乳制品中氮换算为蛋白质的系数。

计算结果保留至小数点后两位。

若采用自动凯氏定氮仪法，按公式（2）计算：

         

式中：

*C*N*——*水解液中氮浓度，单位为克每升（g/L）；

6.38*——*纯乳与纯乳制品中氮换算为蛋白质的系数。

3.1.6.2  试样中糠氨酸含量

糠氨酸含量以质量分数 *F*计，数值以毫克每百克蛋白质（mg/100g蛋白质）表示，按公式（3）计算：

         

式中：

*A*t*——*测试样品中糠氨酸峰面积的数值；

*A*std*——*糠氨酸标准溶液中糠氨酸峰面积的数值；

*C*std*——*糠氨酸标准溶液的浓度，单位为毫克每升（mg/L）；

*D——*测定时稀释倍数（*D*=6）；

*m——*样品水解液中蛋白质浓度，单位为克每升（g/L）；

计算结果保留至小数点后一位。

3.1.6.3  巴氏杀菌乳杀菌结束时糠氨酸含量

巴氏杀菌乳杀菌结束时糠氨酸含量以*FT*计，数值以毫克每百克蛋白质（mg/100 g蛋白质）表示，按公式（4）计算：

*FT*=*F*………………………………（4）

计算结果保留至小数点后一位。

3.1.6.4  UHT灭菌乳灭菌结束时糠氨酸含量

UHT灭菌乳灭菌结束时糠氨酸含量以*FT*计，数值以毫克每百克蛋白质（mg/100 g蛋白质）表示，按公式（5）计算：

*FT*=*F−0.7*×*t*………………………………（5）

式中：

0.7 ——常温下样品每贮存一天产生的糠氨酸含量，单位为毫克每百克蛋白质（mg/100g蛋白质）；

*t*——样品在常温下贮存天数。

计算结果保留至小数点后一位。

3.1.7　精密度

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算术平均值的10%。

在重现性条件下获得的两次独立测试结果的绝对差值不大于算术平均值的20%。

3.1.8检出限

HPLC法和UPLC法的检出限均为1.0 mg/100 g蛋白质。

3.2　乳果糖含量的测定

3.2.1　原理

试样经β-D-半乳糖苷酶（β-D-galactosidase）水解后生产半乳糖（galactose）和果糖（fructose），通过酶法测定产生的果糖量计算乳果糖含量。

试样中加入硫酸锌和亚铁氰化钾溶液，沉淀脂肪和蛋白质。滤液中加入β-D-半乳糖苷酶，在β-D-半乳糖苷酶作用下乳糖水解为半乳糖和葡萄糖（glucose），乳果糖水解为半乳糖和果糖：

                 

再加入葡萄糖氧化酶（glucose oxidase，GOD），将大部分葡萄糖氧化为葡萄糖酸：



上述反应生成的过氧化氢，可以加入过氧化氢酶除去：

                  

少量未被氧化的葡萄糖和乳果糖水解生成的果糖，在己糖激酶（hexokinase，HK）的催化作用下与腺苷三磷酸酯（Adenosine Trihosphate，ATP）反应，分别生成葡萄糖-6-磷酸酯（glucose-6-phosphate）和果糖-6-磷酸酯（fructose-6-phosphate）：

       

反应生成的葡萄糖-6-磷酸酯在葡萄糖-6-磷酸脱氢酶（glucose-6-phosphatedehydrogenase，G-6-PD）催化作用下，与氧化型辅酶Ⅱ，即烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸（nicotinamide adenine dinucleotide phosphate，NADP＋）反应生成还原型辅酶Ⅱ，即还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸（NADPH）：



反应生成的NADPH可在波长340 nm处测定。但是，果糖-6-磷酸酯需用磷酸葡萄糖异构酶（phosphoglucose isomerase，PGI）转化为葡萄糖-6-磷酸酯：

      

生成的葡萄糖-6-磷酸酯再与NADP＋反应，并于波长340 nm处测定吸光值。通过两次测定结果之差计算乳果糖含量。样品原有的果糖，可通过空白样品的测定扣除。空白样品的测定与样品测定步骤完全相同，只是不加β-D-半乳糖苷酶。

3.2.2　试剂和材料

注：除非另有说明，在分析中仅使用确认为分析纯的试剂和GB/T 6682中一级水。

3.2.2.1　试剂

3.2.2.1.1  灭菌水。

3.2.2.1.2  过氧化氢 (H2O2，质量分数：30%）。

3.2.2.1.3  辛醇 (C8H18O)。

3.2.2.1.4  碳酸氢钠（NaHCO3)。

3.2.2.1.5  硫酸锌（ZnSO4•7H2O)。

3.2.2.1.6  亚铁氰化钾（K4[Fe(CN)6] •3H2O）。

3.2.2.1.7  氢氧化钠（NaOH）。

3.2.2.1.8  硫酸铵（(NH4)2SO4）。

3.2.2.1.9  磷酸氢二钠（Na2HPO4）。

3.2.2.1.10  磷酸二氢钠（NaH2PO4）。

3.2.2.1.11  硫酸镁(MgSO4)。

3.2.2.1.12  三乙醇胺盐酸盐[N(CH2CH2OH)3HCl]。

3.2.2.1.13  β-D-半乳糖苷酶：fromAspergillus oryzae，活性≥8.0 units/mg solid，根据总活力单位和固体质量计算其活性为13.4units/mg。

3.2.2.14  葡萄糖氧化酶：from Aspergillus niger，活性为174.9 U/mg。

3.2.2.15  过氧化氢酶：from beef liver，活性为40,000-60,000 units/mg protein，20mgprotein/mL 悬浮液，或相当者。4℃保存，用前振荡使之均匀。

3.2.2.16 己糖激酶（HK）/葡萄糖-6-磷酸脱氢酶（GPD） ：己糖激酶 ≥65 units/mg protein，葡萄糖-6-磷酸脱氢酶≥75 units/mg protein。

3.2.2.17  磷酸葡萄糖异构酶（PGI）：活性≥400units/mg protein，总活力为5kU。

3.2.2.1.18  5’-腺苷三磷酸二钠盐（5’-ATP-Na2）。

3.2.2.1.19  烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸二钠盐（β-NADP-Na2）。

3.2.2.2　试剂配制

3.2.2.2.1  硫酸锌溶液（168 g/L）： 称取300 g硫酸锌溶于800 mL水中，定容至1 L，室温储存。

3.2.2.2.2  亚铁氰化钾溶液（130 g/L）：称取150 g亚铁氰化钾溶于800mL水中，定容至1 L，室温储存。

3.2.2.2.3  氢氧化钠溶液（0.33 mol/L）：将1.32 g氢氧化钠溶于100 mL水中，室温储存。

3.2.2.2.4  氢氧化钠溶液（1 mol/L）：将4 g氢氧化钠溶于100 mL水中，室温储存。

3.2.2.2.5  硫酸铵溶液（3.2 mol/L）：将42.24 g硫酸铵溶于100mL水中，室温储存。

3.2.2.2.6  缓冲液 A（pH为7.5）：称48 g磷酸氢二钠，7.5 g磷酸二氢钠和0.49 g硫酸镁溶解于800 mL水中，用1 mol/L 氢氧化钠溶液调整pH到7.5±0.1（20℃），定容到1 L，室温储存。若溶液呈浑浊状态，需重新配制。

3.2.2.2.7  缓冲液 B（pH为7.6）：称取14.00 g三乙醇胺盐酸盐和0.122 g硫酸镁溶解于80mL水中。用1 mol/L 氢氧化钠溶液调整pH到7.6±0.1（20℃），定容到100 mL。于2~8℃冷藏保存，保存期不超过7天，产生絮状沉淀时需重新配制。

3.2.2.2.8  缓冲液C：量取40.0 mL缓冲液B用水定容到100 mL，摇匀，现用现配。

3.2.2.2.9  β-D-半乳糖苷酶悬浮液：称取30 mg 活性为13.4 units/mg的β-D-半乳糖苷酶，用200μL 3.2 mol/L 硫酸铵溶液溶解，为1个平行用量。根据样品量的多少，现用现配。溶解时用枪头搅拌，切勿剧烈振荡。

3.2.2.2.10  葡萄糖氧化酶悬浮液：称取2.3 mg活性为174.9 U/mg的葡萄糖氧化酶，用100 μL灭菌水溶解，为1个平行用量。根据样品量的多少，现用现配，不可剧烈摇晃。

3.2.2.2.11  己糖激酶/葡萄糖-6-磷酸脱氢酶悬浮液：将总活力为5 KU的己糖激酶/葡萄糖-6-磷酸脱氢酶冻干粉溶于17 mL 3.2 mol/L硫酸铵中，充分溶解混匀，分装成0.8mL/份，为10个样品用量。-20℃保存，使用时解冻。

3.2.2.2.12  磷酸葡萄糖异构酶悬浮液：将1mL总活力为5kU的磷酸葡萄糖异构酶悬浮液，用5 mL 3.2 mol/L硫酸铵稀释6倍，混匀后，分装成0.8mL/份，为10个样品用量。4℃保存。

3.2.2.2.13  5’-腺苷三磷酸（ATP）溶液：将2 g 5’-腺苷三磷酸二钠盐和2g碳酸氢钠溶于40 mL水中。分装成4 mL/份，为10个样品用量。-20℃保存，使用时解冻。

3.2.2.2.14烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸（NADP）溶液：将400 mg烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸二钠盐溶于40 mL水中。分装成4 mL/份，为10个样品用量。-20℃保存，使用时解冻。

3.2.3仪器

3.2.3.1 恒温培养箱：（40± 2）℃，（50± 2）℃。

3.2.3.2分光光度计：340 nm。

3.2.3.3 刻度离心管：15 mL。

3.2.4采样

同3.1.4。

3.2.5分析步骤

3.2.5.1纯化

量取20.0 mL样品到200 mL锥形瓶，依次加入20.0 mL水、7.0 mL亚铁氰化钾溶液、7.0 mL硫酸锌溶液和26.0 mL缓冲液A。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1 mL～2 mL滤液，收集滤液。

3.2.5.2 水解乳糖和乳果糖

吸取5.00 mL滤液置于15 mL刻度离心管中，加200 μL的β-D-半乳糖苷酶悬浮液。混匀后加盖。在50℃恒温培养箱中培养1h。

3.2.5.3葡萄糖氧化

在水解后的试液中依次加入2.0 mL缓冲液C，100 μL葡萄糖氧化酶悬浮液，混匀。再依次加入1滴辛醇，0.5mL 0.33 mol/L 氢氧化钠溶液，50 μL过氧化氢，混匀。再加入50 μL过氧化氢酶悬浮液，加盖混匀。全部溶液加完后，在40℃恒温培养箱中培养3 h。冷却后用水定容至10 mL，过滤，弃去最初的1mL～2 mL滤液，收集滤液。

若试样为生乳或巴氏杀菌乳，吸取1.4 mL滤液于2 mL离心管中，置于浮漂上，于沸水浴上煮1~2min，冷却至室温后，12000 rpm 4℃离心5 min，上清液待测。

3.2.5.4空白

依照3.2.5.2到3.2.5.3步骤处理空白溶液，但不加β-D-半乳糖苷酶悬浮液。

3.2.5.5 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BATP溶液NADP溶液滤液水 |  1.00 mL0.100 mL0.100 mL1.00 mL1.00 mL |  1.00 mL0.100 mL0.100 mL1.00 mL1.00 mL |
| 混合均匀后，静置3 min |
| 加入己糖激酶/葡萄糖-6-磷酸脱氢酶悬浮液 | 20 μL | 20 μL |
| 混合均匀，等反应停止后（约10  min），记录吸光值。 | *Ab1* | *As1* |
| 加入磷酸葡萄糖异构酶悬浮液 | 20 μL | 20 μL |
| 混合均匀，等反应停止后（10 min～15  min），记录吸光值。 | *Ab2* | *As2* |
| 注：1. 以上反应均在同一比色皿中完成。2. 如果吸光值超过1.3，则减少滤液体积，增加水体积以保持总体积不变。 |

3.2.6结果计算

3.2.6.1吸光值差

样品吸光值差Δ*As*按式（5）计算。

Δ*As*＝*As2*-*As1*………………………………（5）

空白吸光值差Δ*Ab*按式（6）计算。

Δ*Ab*＝*Ab*2-*Ab1*………………… ………… （6）

样品净吸光值差Δ*AL*按式（7）计算。

Δ*AL*＝Δ*As*－Δ*Ab*……………………………（7）

3.2.6.2乳果糖含量

乳果糖的含量以质量浓度 *L*计，数值以毫克每升（mg/L）表示，按公式（8）计算：

      

式中：

Δ*A*L——样品净吸光值差；

*M*L ——乳果糖的摩尔质量（342.3 g/mol）；

*ε* ——NADPH在340 nm处的摩尔吸光值（6.3 L·mmol-1·cm-1）；

*V*1 ——比色皿液体总体积（3.240 mL）；

*V*2 ——比色皿中滤液的体积，单位为毫升（mL）；

*d*——比色皿光通路长度（1.00 cm）；

8 ——稀释倍数。

计算结果保留至小数点后一位。

3.2.7精密度

在重复性条件下，当检测结果小于20 mg/L时，两次独立测试结果的绝对差值不大于算术平均值的20%；当检测结果大于20mg/L时，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算术平均值的10%。

在重现性条件下获得的两次独立测试结果的绝对差值不大于算术平均值的20%。

3.2.8检出限

检出限为4.2 mg/L。

3.3　乳果糖/糠氨酸比值的计算

样品中乳果糖/糠氨酸比值以 *R*计，按公式（9）计算：

    

计算结果保留至小数点后两位。

16　复原乳的鉴定

16.1　巴氏杀菌乳

4.1.1当*L*≥100.0 mg/L时，判定为非巴氏杀菌乳。

4.1.2当*L*＜100.0 mg/L时，判定如下：

当*FT*≤12.0 mg/100 g蛋白质时，判定为未检出复原乳。

当12.0 mg/100 g蛋白质＜*FT*≤25.0 mg/100 g蛋白质时，若*R*≥0.50，则判定为未检出复原乳；若*R*＜0.5，则判定为检出复原乳。

当*FT*＞25.0 mg/100 g蛋白质时，若*R*≥1.00，则判定为过热巴氏杀菌乳；若*R*＜1.00，则判定为含有复原乳。

16.2　UHT灭菌乳

4.2.1 当*L*≥600.0mg/L时，判定为过热UHT灭菌乳。

4.2.2 当*L*＜600.0 mg/L时，判定如下：

当*FT*≤190.0mg/100 g蛋白质时，判定为未检出复原乳。

当*FT＞*190.0mg/100 g蛋白质时，若*R*≥1.80，判定为未检出复原乳；若*R*＜1.80，则判定为检出复原乳。

附录A

（资料性附录）

糠氨酸液相色谱图

A.1 高效液相色谱法（HPLC）色谱图

见图A.1—图A.2。



图A.1  2 mg/L糠氨酸标准溶液HPLC色谱图



图A.2 UHT灭菌乳中糠氨酸测定HPLC色谱图

A.2  超高效液相色谱法（UPLC）色谱图

见图A.3—图A.4。



图A.3  2 mg/L糠氨酸标准溶液UPLC色谱图



图A.4  UHT灭菌乳中糠氨酸测定UPLC色谱图