

ICS 67.050  
X 04

NY

## Normy Przemysłu Rolnego Chińskiej Republiki Ludowej

NY/T 939-2016

Zastępuje NY/T 939-2005

---

### Identyfikacja mleka rekonstruowanego w mleku pasteryzowanym i UHT

Publikacja 2016-03-23

Wejście w życie 2016-04-01

Opublikowane przez **Ministerstwo Rolnictwa Chińskiej Republiki Ludowej**

## Przedmowa

Niniejszy standard został sporządzony zgodnie z zasadami podanymi w GB/T 1.1-2009.

Główne zmiany w stosunku do NY/T939-2005 są następujące:

- Zmieniono wartości wskaźnika do identyfikacji mleka rekonstruowanego w mleku pasteryzowanym;
- Zmieniono wartości wskaźnika do identyfikacji mleka rekonstruowanego w mleku UHT;
- Zmodyfikowano metodę obróbki wstępnej do oznaczania furozyny;
- Dodano metodę UPLC do oznaczania furozyny;
- Zmodyfikowano metodę określania laktulozy.

Norma ta została zaproponowana przez Departament Hodowli Zwierząt Ministerstwa Rolnictwa.

Niniejsza norma jest zarządzana przez Komitet Technologiczny Normalizacji Departamentu Hodowli Zwierząt Ministerstwa Rolnictwa (SAC/ TX 274).

Niniejsza norma została opracowana przez: Beijing Institute of Animal Sciences of Chinese Academy of Agricultural Sciences (pekiński instytut badawczy ds. weterynarii zwierząt hodowlanych chińskiej akademii nauk rolniczych), pekińskie laboratorium oceny ryzyka bezpieczeństwa jakości produktów mlecznych Ministerstwa Rolnictwa oraz centrum nadzoru i badania jakości mleka i produktów mlecznych Ministerstwa Rolnictwa (Pekin).

Główni autorzy tej normy: Zheng Nan, Wen Fang, Wang Jiaqi, Li Songli, Zhang Yangdong, Zhao Shengguo, Li Ming, Yang Jinhui, Chen Chongchong, Wang Xiaoqing, Chen Meixia, Wang Hui, Lan Xinyi, Huang Mengmeng, Bu Dengpan, Wei Hongyang, Li Shucong, Yu Jianguo, Zhou Lingyun.

# Identyfikacja mleka rekonstruowanego w mleku pasteryzowanym i UHT

## 1 Zakres

Niniejsza norma określa metodę identyfikacji mleka rekonstruowanego w mleku pasteryzowanym i mleku UHT.

Norma ta ma zastosowanie do mleka pasteryzowanego i mleka UHT.

## 2 Odniesienia normatywne

Następujące dokumenty są niezbędne do stosowania tego dokumentu. W przypadku, gdy odniesienia są datowane, tylko wersja z datą ma zastosowanie do niniejszego dokumentu. Tam, gdzie odniesienia nie są datowane, do niniejszego dokumentu stosuje się najnowszą wersję (wraz ze wszystkimi zmianami).

GB 5009.5 Krajowa norma bezpieczeństwa żywności Oznaczanie białka w żywności

GB/T 6682 Specyfikacje stosowanej wody i metody badań w laboratoriach analitycznych

GB/T 10111 Generowanie liczb losowych i ich aplikacja w pobieraniu próbek i badaniu jakości wyrobów

## 3 Terminologia i definicje

W niniejszym dokumencie obowiązują następujące terminy i definicje.

### 3.1

#### Mleko surowe

Surowe mleko, które nie zostało w żaden sposób zmienione, pochodzące z wymion zdrowych zwierząt mlecznych spełniających odpowiednie wymagania krajowe.

### 3.2

#### Mleko rekonstruowane

Mleczna ciecz otrzymana przez zmieszanie suchych lub zagęszczonych produktów mlecznych z wodą w proporcji.

### 3.3

#### Obróbka cieplna

Zastosowanie technologii cieplnej, nie mniej intensywnej niż pasteryzacja, w celu zahamowania wzrostu mikroorganizmów lub ich zabicia, przy jednoczesnej kontroli, by zachodziły jedynie ograniczone zmiany właściwości fizycznych i chemicznych obiektu poddanego działaniu ciepła.

### 3.4

#### Pasteryzacja

Metoda obróbki używana dla skutecznego zabicia patogennych mikroorganizmów, to jest przez niską temperaturę przez długi czas (63°C ~ 65°C, czas trwania 30min) lub przez wysoką temperaturę przez krótki czas (72°C ~ 76°C, przez 15s lub 80°C ~ 85°C, przez 10s ~ 15s).

### 3.5

#### Mleko pasteryzowane

Produkty płynne wytwarzane wyłącznie z surowego w wyniku pasteryzacji i tym podobnych procesów, o zawartości laktulozy poniżej 100mg/L.

3.6

### **Sterylizacja błyskawiczna ultrawysokotemperaturowa, UHT**

Metoda przetwarzania stosowana w celu skutecznego zabicia mikroorganizmów i zahamowania odpornych na ciepło zarodników. Obróbka cieplna, w której produkt jest podgrzewany do temperatury co najmniej 132°C w stanie ciągłego przepływu i utrzymywany w tym stanie przez krótki czas.

3.7

### **Mleko UHT**

Płynny produkt wytwarzany z surowego mleka krowiego, z dodatkiem lub bez dodatku mleka rekonstruowanego, który został poddany sterylizacji w ultra-wysokiej temperaturze w trybie błyskawicznym, a następnie pakowaniu aseptycznemu i tym podobnym procesom.

**NY/T 939-2016**

Zawartość laktulozy w surowym mleku krowim po obróbce UHT powinna być mniejsza niż 600mg/L.

3.8

### **Furozyna**

W procesie ogrzewania mleka krowiego białko aminokwasowe i laktoza ulegają reakcji meradowej, w wyniku której powstają:  $\epsilon$ -N-dezoksylaktulozo-L-lizyna ( $\epsilon$ -N-deoxylactolusyl-L-lysine), która w wyniku hydrolizy kwasowej przekształca się w bardziej stabilną furozynę ( $\epsilon$ -N-2-furoylometylo-L-lizyna,  $\epsilon$ -N-2-furoymethy-L-lysine).

3.9

### **Laktuloza**

Dwucukier powstały w wyniku izomeryzacji laktozy w mleku podczas procesu ogrzewania, katalizowanej przez wolną grupę aminową kazeiny. Jego nazwa chemiczna w języku angielskim to 4-O- $\beta$ -D-Galactopyranosyl-D-fructose. Może być stosowany jako wskaźnik do oceny efektu obróbki cieplnej mleka.

## **4 Metody badań**

### **4.1 Oznaczanie zawartości furozyny**

#### **4.1.1 Zasada**

Zawartość białka w próbkach oznacza się po hydrolizie kwasem solnym - hydrolizat rozcieńcza, a następnie analizuje metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) lub ultra wysokosprawnej chromatografii cieczowej (UPLC) w miernikiem ultrafioletowym (długość fali 280 nm) i ustala ilość metodą standardu zewnętrznego.

#### **4.1.2 Odczynnik i materiały**

O ile nie określono inaczej, wszystkie odczynniki stosowane w tej metodzie są analitycznie czyste, a woda jest wodą laboratoryjną klasy 1 zgodnie z GB/T 6682.

4.1.2.1 Metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ): czysty chromatograficznie.

4.1.2.2 Stężony kwas gronowy ( $\text{HCl}$ , gęstość 1,19 g/mL).

4.1.2.3 Kwas triakowy: czysty chromatograficznie.

4.1.2.4 Octan amonu.

4.1.2.5 Furozyna:  $C_{12}H_{17}N_3O_4 \cdot xHCl$ .

4.1.2.6 Roztwór kwasu solnego (3 mol/L): dodać 2,5 mL stężonego kwasu solnego do 7,5 mL wody i dobrze wymieszać.

4.1.2.7 Roztwór kwasu solnego (10,6 mol/L): dodać 88 mL stężonego kwasu solnego do 12 mL wody i dobrze wymieszać.

4.1.2.8 Roztwór octanu amonu (6 g/L) dokładnie odważyć 6 g i rozpuścić w wodzie, rozpuścić w 1L, następnie przefiltrować przez membranę wodną o średnicy 0,22  $\mu m$  i odgazowywać ultradźwiękami przez 10 min.

4.1.2.9 Roztwór octanu amonu (6 g/L) zawierający 0,1% kwasu trifluorooctowego: dokładnie odważyć 6 g kwasu octowego rozpuszczonego w części wody, dodać 1 mL kwasu trifluorooctowego, ustalić objętość do 1L, przepuścić przez membranę wodną 0,22  $\mu m$  i odgazowywać ultradźwiękami przez 10 min.

4.1.2.10 Wzorcowy roztwór podstawowy furozyny (500,0 mg/L): przeliczyć współczynnik czystości peptydów (zawartość peptydów netto) wzorca na podstawie współczynnika czystości peptydów podanego w certyfikacie wzorca. Użyć roztworu kwasu solnego 3 mol/L by wytworzyć wzorcowy roztwór podstawowy. W temperaturze minus 20°C może być przechowywany przez 24 miesiące.

Przykład:

Jeżeli współczynnik czystości peptydów na certyfikacie wzorcowej furozyny wynosi 69,1%, to należy odważyć 7,24 mg wzorca peptydu, rozpuścić go w roztworze kwasu solnego o stężeniu 3 mol/L. i ustalić objętość na 10ml. Gęstość standardowego roztworu podstawowego wynosi 500,0 mg/L.

4.1.2.11 Roboczy roztwór mianowany furozyny (2,0mg/L): odmierzyć 100  $\mu L$  wzorcowego roztworu podstawowego furozyny do kolby pomiarowej o pojemności 25ml i ustalić objętość za pomocą 3 mol/L roztworu kwasu solnego, stężenie tego roboczego roztworu mianowanego wynosi 2,0 mg/L.

4.1.2.12 Membrana filtra wodnego: 0,22  $\mu m$ .

#### 4.1.3 Aparatura

4.1.3.1 Wysokosprawny chromatograf cieczowy z detektorem UV lub detektorem diodowym.

4.1.3.2 Ultra wysokosprawny chromatograf cieczowy: z detektorem UV lub detektorem diodowym.

4.1.3.3 Piec suszarniczy: (110 plus minus 2)°C.

NY/T 939-2016

4.1.3.4 Szczelnie zamknięta probówka żaroodporna: objętość 20mL.

4.1.3.5 Waga: z czułością 0,01mg, 1mg.

4.1.3.6 Tester azotu Kjeldahla.

#### 4.1.4 Pobieranie próbek

Mleko pasteryzowane do badań powinno być przechowywane i transportowane w temperaturze 2°C~6°C, a mleko UHT w temperaturze nie wyższej niż 25°C.

Próbka o objętości co najmniej 250 ml powinna być pobrana zgodnie z GB/T 10111 i nie powinna być uszkodzona lub zmieniona podczas transportu lub przechowywania.

Próbki do pobierania próbek nadzorczych lub badań arbitrażowych powinny być pobierane z gotowego produktu w zakładzie przetwórczym przeznaczonym do sprzedaży i badane w ciągu jednego tygodnia.

#### **4.1.5 Procedury analityczne**

##### **4.1.5.1 Przygotowanie hydrolizatu próbki**

Aspirować 2,00 mL próbki do zamykanej żaroodpornej probówki, dodać 6,00ml roztworu kwasu solnego o stężeniu 10,6mol/L i dobrze wymieszać. Szczelnie zamknąć rurkę, umieścić w pojemniku do suszenia i ogrzewać w temperaturze 110 przez 12h-23h w celu hydrolizy, a po godzinnym podgrzewaniu delikatnie wstrząsnąć probówką. Po ogrzaniu probówki wyjąć z urządzenia do suszenia, schłodzić i przefiltrować przez bibułę filtracyjną, a przesącz wykorzystać do oznaczeń.

##### **4.1.5.2 Oznaczanie zawartości białka w hydrolizacie próbki**

Odmierzyć pipetą 2,00 ml, roztworu do hydrolizy próbki, zgodnie z przepisami GB 5009.5 w celu określenia zawartości białka w roztworze próbki.

##### **4.1.5.3 Oznaczanie zawartości furozyny w hydrolizacie próbki**

Odmierzyć pipetą 1,00 mL hydrolizatu próbki, dodać 5,00 mL roztworu octanu amonu 6g/L, dobrze wymieszać, przepuścić przez wodną membranę filtracyjną 0,22  $\mu$ m, a przefiltrowaną ciecz zbadać na maszynie. Przesącz bada się jedną z dwóch następujących metod, zgodnie z aparatem do chromatografii cieczowej stosowanym w laboratorium:

a) Metoda HPLC

1) Zalecane warunki chromatograficzne

Referencja chromatograficzna: kolumna silikonowa C<sub>18</sub>, 250 mm X 4,6 mm, wielkość cząstek 5 $\mu$ m, lub równoważna.

Temperatura kolumny: 32C.

Faza ruchoma: 0,1% roztwór kwasu trifluorooctowego jako faza ruchoma A i metanol jako faza ruchoma B.

Gradient elucji: patrz tabela 1.

**Tabela 1 Gradient elucji**

Numer	Czas (min)	Prędkość przepływu (ml/min)	Faza ruchoma A %	Faza ruchoma B %
1	-	1,00	100,0	0,0
2	16,00	1,00	86,8	13,2
3	16,50	1,00	0,0	100,0
4	25,00	1,00	100,0	0,0
5	30,00	1,00	100,0	0,0

2) Określenie (oznaczenie/badanie)

Układ chromatograficzny jest wyrównany przy użyciu mieszaniny fazy ruchomej A i fazy ruchomej B (50:50) przy prędkości przepływu 1 ml/min. Następnie układ jest

wyrównywany z początkową fazą ruchomą aż do uzyskania gładkiej linii podstawowej. W celu sprawdzenia czystości rozpuszczalnika wstrzykuje się roztwór 10µl 3mol/L kwasu solnego. Wstrzyknąć 10 µL porcji mierzonego roztworu w celu określenia zawartości furozyny. Chromatogram znajduje się w dodatku A.

#### b) Oznaczanie metodą UPLC

##### 1) Zalecane warunki chromatograficzne

Kolumna chromatograficzna: kolumna silikonowa o wysokiej wytrzymałości HSS T3, 100mmX2,1mm, cząsteczki 1,8µm lub podobnie.

Temperatura kolumny: 35°C.

Faza ruchoma: 6 g/L octanu amonu zawierającego 0,1% kwasu trójoctowego w wodzie jako faza ruchoma A, alkohol metylowy jako faza ruchoma B i czysta woda jako faza ruchoma C.

Warunki elucji: faza ruchoma A, elucja izokratyczna, 0,4 mL/min.

##### 2) Określenie

#### NY/T 939-2016

Zaleca się przepłukanie układu chromatograficznego fazami ruchomymi czystą wodą i metanolem, w tej kolejności. Przed użyciem przyrządu układ chromatograficzny powinien zostać przestawiony na czystą wodę z fazą ruchomą i wyrównany fazą ruchomą A przy prędkości przepływu 0,4 ml/min. Czystość rozpuszczalnika sprawdza się wstrzyknięciem 0,5 µL 3 mol/L roztworu kwasu solnego. Zawartość furozyny bada się poprzez wstrzyknięcie 0,5 µL roztworu czekającego na badanie. Chromatogram znajduje się w dodatku A.

#### 4.1.6 Obliczanie wyników

##### 4.1.6.1 Zawartość furozyny w próbce

Zawartość furozyny jest wyrażona jako ułamek masy F, w miligramach na sto gramów białka (mg/100g białka) i jest obliczana zgodnie z równaniem (1).

$$F = \frac{A_t * C_{std} * D * 100}{A_{std} * m} \dots\dots\dots(1)$$

Gdzie:

$A_t$  - Wartość powierzchni pików furozyny w badanej próbce;

$A_{std}$  -Wartość pola powierzchni pików furozyny w roztworze wzorcowym furozyny;

$C_{std}$  -Stężenie roztworu wzorcowego furozyny w miligramach na litr (mg/L);

D- Wielokrotność rozcieńczenia w czasie badania (D=6);

m- Stężenie białka w hydrolizacie próbki w gramach na litr (g/L).

Wyniki obliczeń są zachowywane z dokładnością do jednego miejsca po przecinku.

##### 4.1.6.2 Zawartość furozyny po pasteryzacji

Po zakończeniu pasteryzacji mleka zawartość furozyny jest wyrażana w miligramach na sto gramów białka (mg/100g białka) w ujęciu FT,

Obliczone zgodnie z równaniem (2).

$$FT = F \dots\dots\dots(2)$$

Obliczenia są zachowane do jednego miejsca po przecinku.

#### 4.1.6.3 Zawartość furozyny pod koniec sterylizacji UHT

Zawartość furozyny pod koniec sterylizacji UHT jest wyrażona jako FT w miligramach na sto gramów białka (mg/100g białka).

Obliczone zgodnie z równaniem (3).

$$FT = F - 0.7 \cdot t \dots \dots \dots (3)$$

gdzie:

0,7 - Ilość furozyny wytworzona w ciągu jednego dnia przechowywania próbki w temperaturze pokojowej, w miligramach na sto gramów białka (mg/100g białka):

t - Liczba dni przechowywania próbki w temperaturze pokojowej

Wyniki są obliczane z dokładnością do jednego miejsca po przecinku.

#### 4.1.7 Precyzja

Różnica bezwzględna między wynikami dwóch niezależnych badań uzyskanych w warunkach powtarzalności nie jest większa niż 10% średniej arytmetycznej.

Różnica bezwzględna między wynikami dwóch niezależnych badań uzyskanych w warunkach odtwarzalności nie jest większa niż 20% średniej arytmetycznej

#### 4.1.8 Granice wykrywalności

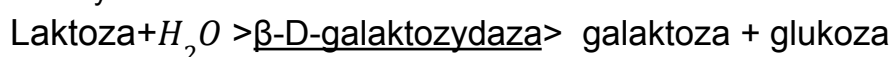
Granica wykrywalności dla obu metod: HPLC i UPLC wynosi 1,0 mg/100 g białka.

### 4.2 Oznaczanie zawartości laktulozy

#### 4.2.1 Zasada

Próbka jest hydrolizowana przez  $\beta$ -D-galaktozydazę w celu uzyskania galaktozy i fruktozy. Ilość wytworzonej fruktozy oznacza się metodą fermentacyjną w celu obliczenia zawartości laktulozy.

Tłuszcz i białko wytrąca się dodając do próbki roztwór siarczuanu cynku i żelazocyjanku potasu. Do przesączy dodaje się  $\beta$ -D-galaktozydazę. Pod wpływem  $\beta$ -D-galaktozydazy, laktoza jest hydrolizowana do galaktozy i glukozy. Laktuloza jest hydrolizowana do galaktozy i fruktozy:



NY/T 939-2016

Następnie dodaje się oksydazę glukozową (GOD), aby utlenić większość glukozy do kwasu glukonowego:



Nadtlenek wodoru powstały w wyniku powyższej reakcji może być usunięty przez dodanie katalazy:



Niewielka ilość nieutlenionej glukozy i laktulozy jest hydrolizowana w celu wytworzenia fruktozy, która następnie reaguje z adenosynotrójfosforanem (Adenosine triphosphate,



ATP) przez katalityczne działanie heksokinazy (HK) i wytwarzane są osobno glukoza-6-fosforan i fruktoza-6-fosforan.

Glukoza + ATP > heksokinaza > glukoza-6-fosforan + ADP

Fruktoza + ATP > heksokinaza > fruktoza-6-fosforan + ADP

W wyniku tej reakcji powstaje glukoza-6-fosforan, który jest katalizowany przez dehydrogenazę glukoza-6-fosforanową (G-6-PD) reaguje z kofaktorem oksydacyjnym, fosforanem nikotynamidu adeninowego (NADP), jest katalizowana przez dehydrogenazę glukoza-6-fosforanową (glukoza-6-fosfatydazę).

fosforan (NADP), tworząc zredukowany koenzym, fosforan dinukleotydu nikotynamidowo-adeninowego (NADPH):

Glukoza-6-fosfoglukonian|NADP deoksygenacja glukoza-6-fosforanu

Glukoza-6-fosforan|NADPH|H

Powstały w wyniku reakcji NADPH można zmierzyć przy długości fali 340 nm. Jednakże fruktoza-6-fosforan musi być mierzony z izomerem fosfoglukozy

(izomeraza fosfoglukozy, PGI) do 6-fosforanu glukozy:

Glukoza-6-fosforan

Fruktoza-6-fosforan

7/12

Glukoza-6-fosforan jest następnie reagowany z NADP<sup>+</sup>, a wartość absorbancji jest mierzona przy 340 nm.

#Różnica między

Obliczono różnicę pomiędzy zawartością fruktozy i laktozy. Pierwotna fruktoza w próbce może być odjęta od próbki ślepej. Oznaczenie próbki ślepej jest identyczne jak próbki. Procedura jest identyczna jak w przypadku próbki, z wyjątkiem tego, że nie dodaje się B-D-galaktohydryny.

#### 4.2.2 Odczynniki i materiały

Jeśli nie podano inaczej, odczynniki stosowane w tej metodzie to analitycznie czysta woda klasy laboratoryjnej I, jak określono w GB/T6682.

##### 4.2.2.1 Woda sterylizowana.

##### 4.2.2.2 Nadtlenek wodoru (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 30% frakcji masowej).

##### 4.2.2.3 Oktanol (CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CH<sub>3</sub>).

##### 4.2.2.4 Węglan wodoru (NaHCO<sub>3</sub>).

##### 4.2.2.5 Siarczan cynku (ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O).

##### 4.2.2.6 Żelazocyjanek potasu (K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]·3H<sub>2</sub>O).

##### 4.2.2.7 Wodorotlenek sodu (NaOH).

##### 4.2.2.8 Kwas siarkowy [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>].

##### 4.2.2.9 Wodorofosforan disodowy (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>).

##### 4.2.2.10 Fosforan dwuwodny (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O)

##### 4.2.2.11 Siarczan magnezu (MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O)

##### 4.2.2.12 Chlorowodorek trietanolaminy dysku [N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH)<sub>3</sub>]HCl.

##### 4.2.2.13 Fonem B-D-galaktozy (EC3.2.1.23): z *Aspergillus oryzae* 12,61 U/mg.

##### 4.2.2.14 Utlenianie glukozy li (EC1.1.3.4): z *Aspergillus niger* aktywność wynosi 200 IU/mg.

##### 4.2.2.15 Śliwka nadtlenkowa (EC1.11.1.6); z wątroby wołowej, aktywność 65000 IU/mg.

##### 4.2.2.16 Glikokinol (EC2.7.1.1): z drożdży piekarskich, aktywność 1401 U/mg.

- 4.2.2.17 Dehydroślina glukozy-6-fosforanowa (EC1.1.1.45: frombakers yast aktywność 1401 U/mg.
- 4.2.2.18 Izomeryzacja fosforanu glukozy (EC5.3.1.9): z drożdży, aktywność 3501 U/mg. Przekształcenie kwaśnej glukozy w kwas izobaryczny,

NY/T 939-2016

- 4.2.2.195'-Sól dwuzasadowa trifosforanu adenozy (5'-ATP-I Na)
- 4.2.2.20 Dwuzasadowy fosforan dinukleotydu nikotynamidu (B-NADP-Na).
- 4.2.2.21 Roztwór siarczynu cynku (168 g/L): rozpuścić 300 g siarczynu cynku w 800 mL wody i pozostawić do stężenia 11.
- 4.2.2.22 Roztwór żelaza potasowego (130 g/L): rozpuścić 150 g żelaza potasowego w 800 mL wody do objętości 11.
- 4.2.2.23
- Je roztwór wodorotlenku (0,33 mol/L): 1,32 g wodorotlenku wrzucono do 100 ml wody.
- 4.2.2.24 Roztwór tlenku chloru (1 mol/L): 1 g tlenku chloru upuszcza się w 100 mL wody.
- 4.2.2.25 Roztwór siarczynu pieniężnego (3,2 mol/L): rozpuścić 42,24 st. siarczynu pieniężnego w 100 ml wody.
- 4.2.2.26 Bufor A (pH 7,5): 48 g fosforanu diwodoru, 0,86 g fosforanu diwodoru i 0,1 g siarczynu magnezu rozpuszczono w 80
- Dostosować pH do 7,5 s.0,1(20) za pomocą 1 mol/L roztworu wodorotlenku i objętość do 100 mL.
- 4.2.2.27 Stopień B (pH 7,6): Odważyć 14,00 g chlorowodoru dietyloaminy i 0,25 g siarczynu magnezu w 80 ml wody,
- Doprowadzić pH do 7,6 ziemi 0,1(20C) za pomocą 1 mol/L roztworu wodorotlenku sodu i utrzymać objętość do 100ml.
- 4.2.2.28 Poziom C: Odmierzyć 40,0 ml buforu B, uzupełnić wodą do 100 ml i dobrze wstrząsnąć.
- 4.2.2.29 Fonoliza B-D-galaktozy 150 mg/ml): użyto roztworu kwasu siarkowego o stężeniu 3,2 mol/l, aby spławić 12,61 U/mg aktywności
- alkoholu B-D-galaktozylowego przygotowano zawiesinę o stężeniu 150 mg/mL. Gotowy do użycia. Nie wypełniać wibracją.
- 4.2.2.30 Zawiesina utleniająca glukozę (20 mg/ml): Przygotować ferment utleniający glukozę o aktywności 200 IU/mg w sterylnej wodzie do stężenia 20 mg/ml. zawiesina w stężeniu 20mg/ml. Gotowy do użycia.
- 4.2.2.31 Płyn do fermentacji nadtlenu wodoru (20mg/mL): śliwę nadtlenu wodoru o aktywności 65,000 IU/mg przygotowuje się w sterylnej wodzie do stężenia 20mg/ml. Przechowywać w temperaturze 1C i przed użyciem wstrząsnąć w celu homogenizacji.
- 4.2.2.32 Glukozylowany/odwodniony glukozą 6-fosforanowy płyn śliwkowy: dodać 2 mg aktywnego 140 IU/mg nadtlenu wodoru do 1 ml. roztworu kwasu siarkowego o stężeniu 3,2 mol/dziecko.
- Dodać 2mg 140 IU/mg glukuronidu i 1mg 140 IU/mg glukozy-6-fosforanu dehydrogenizowanego alkoholu do 1ml roztworu kwasu siarkowego o stężeniu 3,2 mol/dziecko i delikatnie wstrząsnąć w celu utworzenia zawiesiny.
- Przechowywać w temperaturze 20C.
- 4.2.2.33 Zawiesina fosforanu izobornilu glukozy (2 mg/mL): Do przygotowania zawiesiny 350 j.m./mg aktywnej substancji użyto roztworu siarczynu o stężeniu 3,2 mol/l.

4.2.2.345'-Trójfosforan adenozy (ATP) rozpuszczanie: 50 mg soli disodowej 5 trójfosforanu adenozy i 50 mg szpilki dwuwęglanowej rozpuszczono w 1 ml w wodzie. -Przechowywać w temperaturze 20°C.

4.2.2.35 Roztwór fosforanu mononuklearnego kwasu nikotynowego (NADP): rozpuścić 10 mg soli monosodowej fosforanu mononuklearnego kwasu nikotynowego w 1 mL wody.

w 1 mL wody. Przechowywać w temperaturze 20°C.

#### 4.2.3 Aparatura

4.2.3.1 Inkubator o stałej temperaturze: (40-2)°C, (50-2)°C.

4.2.3.2 Spektrofotometr: 340 nm.

#### 4.2.4 Pobieranie próbek

Tak jak w przypadku 4.1.4

#### 4.2.5 Procedura analityczna

##### 4.2.5.1 Oczyszczanie

Odmierzyć 20,0 mL próbki do butelki z nalewakiem o pojemności 200 ml i dodać kolejno 20,0 mL m, 7,0 mL roztworu żelaza potasowego, 7,0 mL roztworu siarczanu potasu i 26,0 mL roztworu siarczanu cynku.

Po dodaniu każdego roztworu próbkę całkowicie wytrząsano. Po dodaniu wszystkich roztworów odstawić na 10 min,

Odrzucić początkowe 1 mL do 2 mL przesącza i zebrać płyn.

##### 4.2.5.2 Hydroliza laktozy i laktofruktozy

Odpipetować 5,00 ml przesącza do kolby pomiarowej o pojemności 10 ml i dodać 200 litrów zawiesiny 3-D-galaktozy. Wymieszać, przykryć i inkubować w inkubować przez 1 godzinę w inkubatorze o temperaturze 50 °C.

(Live Lake Arts Wen Zhong Ying): Village gs Su Jianjia.

. coc. 1689112116590(FdcChal)

LP/T 939-2016

##### 4.2.5.3 Utlenianie glukozy

Do zhydrolizowanego roztworu badanego dodać kolejno 2,0 ml buforu C, 100 glinianów zawiesiny utleniającej glukozę, 1 kroplę oktanolu, 0,5 mL

0,33 mol/L roztwór złota utlenionego 50 nadtlentkiem i 50 nadtlentkiem zawiesiny śliwkowej. Po każdym dodaniu odczynnika należy delikatnie wstrząsnąć roztworem łyżką. Po dodaniu całego roztworu inkubować w inkubatorze o stałej temperaturze 40°C przez 3 h. Po schłodzeniu uzupełnić objętość wodą do 10 mL, przesączyć, odrzucić początkowy 1

2 mL przesącza i zebrać płyn.

##### 4.2.5.4 Pusty

Postępować zgodnie z etapami od 4.2.5.2 do 4.2.5.3 dla roztworu ślepego, ale bez dodawania zawiesiny zwrotnej 3-D-galaktozy.

##### 4.2.5.5 Próba

Patrz tabela 2,

Tabela 2 Procedura oznaczania

Procedura

Kuweta jest kolejno napełniana

Bufor B

Roztwór ATP

Roztwór NADP

Filtrat

Dobrze wymieszać i odstawić na 3 minuty.

Dodać zawiesinę glukuronidu/glukozy-6-fosforanu deoksyriwalenolu

Dobrze wymieszać, poczekać na zatrzymanie reakcji (około 10min), zapisać wartość absorbancji

Pusto

1.00 ml.

0. 100 ml.

0. 100 ml

1.00mL

1. 00 ml.

20  $\mu$ L.

Próbka

1,00 mL.

0. 100 ml.

0. 100 mL

1,00 mL,

1, 00 mL

Dodać izomeryczną zawiesinę fosforanu glukozy

Po ustaniu reakcji (10mn~15min) zapisać wartość pokonania.

Uwaga 1: Powyższe reakcje przeprowadza się w jednolitej kolorymetrii.

Uwaga 2: Jeśli wartość absorbancji przekracza 1,3, należy zmniejszyć objętość cieczy szybkiej i zwiększyć objętość wody, aby utrzymać całkowitą objętość na stałym poziomie.

#### 4.2.6 Obliczanie wyników

##### 4.2.6.1 Różnica absorbancji

Różnica w wartości absorbancji próbki A: obliczona według równania (4).

$$\triangle A_s = A_{s2} - A_{s1}$$

Różnica absorbancji ślepej próby A, obliczona zgodnie z równaniem (5).

$$DA_s = A_{m2} - A_n$$

Różnica absorbancji netto A: obliczona zgodnie z równaniem (6).

$$AL = OA_s - OA_b$$

##### 4.2.6.2 Zawartość laktozy

Zawartość laktozy jest wyrażona jako stężenie masowe L w miligramach na litr (mg/L) i jest obliczana zgodnie z równaniem (7).

$$L =$$

$$\frac{AL}{M} \times 1000$$

XAA,

eXdXV,

gdzie:

A.-

Różnica absorbancji netto próbki;

M-

masa molowa laktozy (342,3 g/mol);  
Absorbancja molowa NADPH przy 340nm (6,3L·mmol·cm<sup>-1</sup>);

V

Całkowita objętość cieczy w kuwecie (3,240 mL);

V.

Objętość przesącza w kuwecie w mililitrach (mL);

d-

długość drogi optycznej kuwety (1,00cm);

Czasy rozcieńczania.

W języku chińskim

:ngistroefou:occ.coc

159112445900hLchut)

20 .1.

20 ul.

(5)

(6)

(7)

NY/T 939-2016

Obliczenia są zachowywane do jednego miejsca po przecinku.

#### 4.2.7 Precyzja

Różnica bezwzględna między dwoma niezależnymi wynikami badań uzyskanymi w warunkach powtarzalności nie jest większa niż 10% średniej arytmetycznej

Różnica bezwzględna między wynikami dwóch niezależnych badań uzyskanych w warunkach odtwarzalności nie jest większa niż 20% średniej arytmetycznej

#### 4.2.8 Granica wykrywalności

Granica wykrywalności wynosi 4,2 mg/L.

#### 4.3 Obliczanie stosunku laktulozy do furozyny

Stosunek laktofruktozy do furozyny w próbce oblicza się według wzoru (8) w zakresie R.

Wyniki obliczeń są zachowywane z dokładnością do dwóch miejsc po przecinku.

### 5 Identyfikacja odzyskanego mleka

#### 5.1 Mleko pasteryzowane

Gdy dzieci <100,0mg/L, oznacza się, co następuje:

a) Gdy 12,0mg/100g białka < FT25,0mg/100g białka, jeśli R<0,50, mleko jest oceniane jako zawierające mleko odzyskane.

b) Gdy FT>25,0mg/100g białka, jeśli R<1,00, mleko jest oceniane jako zawierające mleko odzyskane.

#### 5.2 Mleko sterylizowane UHT

Gdy <600,0mg/L, FT190,0mg/100g białka, jeśli linijka wynosi 1,80, ocenia się, że zawiera mleko odzyskane.

Tekst techniczny WE w języku chińskim:

registrefo:pacc.c

.coc 1591124458i(nsdchut)

NY/T 939-2016

Dodatek A

(Dodatek informacyjny)

Chromatogramy cieczowe kwasu stigmasterowego

A.1 Chromatogramy wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC)

Patrz koło A.1 ~ rysunek A.2.

952849 Take -.

(DY) skrzynka na warzywa

0.00

12:00

15.00

180021002400#700

30.00

Czas retencji (min)

Rysunek A12mg/dziecko roztwór wzorcowy glicyny wykres harmoniczny koloru HPLC

95E8-Nadążanie

(กข)แฉ่

15.0018.0021.00 24.00 27.00300

Czas retencji (min)

Rysunek A.2 Kolorogram HPLC do oznaczania choriny w mleku sterylizowanym UHT

A.2 Tabela barw dla ultra wydajnej chromatografii cieczowej (UPLC)

Patrz rysunek A.3 do rysunku A.4.

C - wsparcie techniczne: tj.

registnilotpacc.c

.coc 15911248801fechuti

LP/T 939-2016

(NY) Nie.

11/12

k

Czas retencji (min)

Rysunek A. Chromatogram UPIC roztworu wzorcowego furozyny o stężeniu 32 mg/l

0.020