

TB

团 体 标 准

T/TDSTIA 008—2019

**巴氏杀菌乳中碱性磷酸酶活性的测定
发光法**

**Determination of alkaline phosphatase activity in pasteurized
milk——Enzymatic photo-activated system method**

2019-11-26 发布

2019-12-01 实施

天津市奶业科技创新协会

发布

前 言

本标准按照GB/T 1.1-2009《标准化工作导则 第1部分：标准的结构和编写》给出的规则起草。

本标准由国家奶业科技创新联盟提出，适用于联盟内部实施优质乳工程的企业，其他单位可参考。

本标准起草单位：中国农业科学院北京畜牧兽医研究所、农业农村部奶产品质量安全风险评估实验室（北京）、农业农村部奶及奶制品质量监督检验测试中心（北京）。

本标准主要起草人：郑楠，张养东，文芳，王加启，刘慧敏，叶巧燕，屈雪寅，孟璐。

请注意本标准的某些内容可能涉及专利。本标准的发布机构不承担识别这些专利的责任。

巴氏杀菌乳中碱性磷酸酶活性的测定 发光法

1 范围

本标准规定了采用发光法测定碱性磷酸酶活性的方法。

本标准适用于巴氏杀菌乳。

本标准检出限为20 mU/L。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 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文件。

3.1

碱性磷酸酶活性 alkaline phosphatase activity

特定条件下每分钟转化1 μmol 稳定芳香族底物所需的碱性磷酸酶的量，用mU/L表示。

4 原理

在碱性磷酸酶的存在下，稳定的芳香族底物在 $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 下水解，生成化学发光产物，大分子增强组分将光信号放大，在规定的孵育时间后，停止水解，在用已知酶活性片剂校准过的发光检测仪上，测量化学发光产物的量，并将其转换成碱性磷酸酶活性。

5 试剂或材料

除非另有规定，仅适用分析纯试剂。

5.1 水，GB/T 6682，一级。

5.2 非化学发光二氧杂环丁烷酯底物（0.2 mol/L）：3-（2'-螺旋金刚烷）-4-甲氧基-4-（3'-磷酸苯基）-1,2-二氧杂环丁烷二钠盐，溶于含1%荧光素的DEAE缓冲液。有商品化试剂可用[如

Charm AP®液体¹⁾。宜将底物储存于0℃~7℃之间；底物若在4℃、琥珀色塑料小瓶中储存，有效期6个月；若在30℃、琥珀色塑料小瓶中储存，只能稳定24 h。在测定中使用底物时，将其保持在0℃~7℃或置于冰上。

5.3 终止液：称取1.337 g 2-氨基-2-甲基-1-丙醇(CAS: 124-68-5)，用水溶解并定容至100 mL。称取0.02 g 苯扎氯铵(CAS: 63449-41-2)，用水溶解并定容至100 mL。上述两种溶液各取50 mL，混匀，调节pH至10.7，作为终止二氧杂环丁烷酯底物的酶水解反应的终止液。使用前需将其恢复至室温(18℃~24℃)。有商品化试剂可用[如Charm AP®液体²⁾]。该溶液在4℃可稳定1年，在室温下有效期2个月。

5.4 乙酸镁溶液：称取35.4 g 四水合乙酸镁(CAS: 142-72-3)，溶于25 mL水中，可适当加热以助于溶解，待温度冷却至室温后，定容至100 mL。0℃~4℃储存，有效期1年。

5.5 碱性磷酸酶校准片：由有已知碱性磷酸酶含量的干燥生乳制成的片剂，碱性磷酸酶活性为875 μU±26 μU，使用前用不含碱性磷酸酶的液体乳复原。市售碱性磷酸酶校准片在4℃下保存，有效期2年。有商品化试剂可用[如Charm AP®校准片³⁾]。

5.6 巴氏杀菌乳校准液：取3支50 mL试管分别标记为A₁、B₁和C₁，在每个试管中用100 μL水溶解一个校准片。分别向管A₁中加入20 mL，管B₁中加入5 mL，管C₁中加入2.5 mL无磷酸酶活性的巴氏杀菌乳样品，使校准液A₁、B₁和C₁的酶活性分别为44 mU/L、175 mU/L和350 mU/L。盖上盖子，剧烈振荡。冷藏条件下放置10 min。使用前混匀。

5.6 阳性质控：使用碱性磷酸酶冻干粉制备阳性质控，用10 mL不含磷酸酶活性的阴性试样复原，静置10 min，制得含450 mU/L碱性磷酸酶的阳性质控，使用前剧烈振荡。复原的阳性质控在0℃~7℃可保存48 h，在-15℃以下可保存2个月。使用时于室温水浴中解冻，剧烈振荡使其均质。不宜反复冻融。

6 仪器设备

6.1 化学发光检测仪：540 nm，配温度探针，通过内置软件将线性输出信号直接转换为酶活性（如Charm Luminometer®型号NovaLum⁴⁾）或带化学发光检测功能的酶标仪。

- 1) 商品化底物溶液 Charm AP®液体可从 Charm Sciences Inc. 获得。此处列出试剂品牌仅为提供参考，并不涉及商业目的。如果使用其他品牌可以得出相同的结果，标准使用者可以使用等效产品。
- 2) 终止液用于终止底物 AMPPD 的酶解反应。商品化终止液可从 Charm Sciences Inc. 获得。此处列出试剂品牌仅为提供参考，并不涉及商业目的。如果使用其他品牌可以得出相同的结果，标准使用者可以使用等效产品。
- 3) 商品化试剂 Charm AP®校准片可从 Charm Sciences Inc. 获得。此处列出试剂品牌仅为提供参考，并不涉及商业目的。如果使用其他品牌可以得出相同的结果，标准使用者可以使用等效产品。
- 4) 商品化化学发光光度计可从 Charm Sciences Inc. 获得。此处列出品牌仅为提供参考，并不涉及商业目的。如果使用其他品牌可以得出相同的结果，标准使用者可以使用等效产品。

- 6.2 天平：感量为1 mg，0.1 mg。
- 6.3 移液器：100 μ L，1 mL，5 mL。
- 6.4 孵育器：35 $^{\circ}$ C $\pm$ 1 $^{\circ}$ C，63 $^{\circ}$ C $\pm$ 0.2 $^{\circ}$ C。
- 6.5 水浴锅：63 $^{\circ}$ C $\pm$ 0.2 $^{\circ}$ C，95 $^{\circ}$ C $\pm$ 2 $^{\circ}$ C
- 6.6 一次性带盖小管：由不发光塑料制成，2 mL。
- 6.7 试管：50 mL，带防漏盖。
- 6.8 96孔酶标板：白色、不透明。

7 样品

7.1 总则

样品至少准备50 mL或50 g，测试前将样品混匀。测试时，样品应冷藏或在冰上进行测试，环境温度应在18 $^{\circ}$ C $\sim$ 24 $^{\circ}$ C之间。由于唾液中含有碱性磷酸酶，测试过程中应避免唾液的污染。

7.2 试样制备

7.2.1 巴氏杀菌乳试样

巴氏杀菌乳试样冷藏（0 $^{\circ}$ C $\sim$ 7 $^{\circ}$ C），混匀。

7.2.2 阴性试样

取适量试样在95 $^{\circ}$ C水浴（6.5）加热保持1 min，然后快速冷却。对于一些乳制品，如羊乳，在95 $^{\circ}$ C下保持1 min可能发生沉淀和分离，在这种情况下，可降低温度并延长时间。阴性试样若储存在0 $^{\circ}$ C $\sim$ 7 $^{\circ}$ C，可保存48 h；在 $\leq$ -15 $^{\circ}$ C的温度下储存，可保存6个月。经冷冻的阴性试样，需于室温水浴中解冻。使用前将剧烈振荡样品使其均匀，不宜反复冻融。用阴性试样校准光度检测仪零点，在适当校准的通道中，平均值应小于5 mU/L。

8 试验步骤

8.1 校准 1（适用于带直接测定酶活性结果的内置软件的化学发光检测仪）

8.1.1 应对每类乳制品分别进行校准，建立各种待测类型产品的校准曲线。当换用新批次/批号的底物和终止液时，需重新进行校准。

8.1.2 设定发光检测仪，默认背景值为 100，校准值为 100。

8.1.3 用阴性试样校准: 用移液器移取 100 μL 底物 (5.2) 加入一次性带盖小管底部, 再加入 100 μL 阴性试样, 混匀, 置于 35 $^{\circ}\text{C}$ 的孵育器中孵育 3 min。在孵育结束后的 15 s 内加入 1.0 mL 终止液 (5.3)。从孵育器中取出小管, 盖上盖子, 并剧烈振荡 5 s。将小管插入发光检测仪 (6.1), 读取并记录检测仪的读数。试验重复 3 次, 计算平均阴性值 (N), 若任何一个值超过平均值的 30%, 则按 8.1.3 重新测定。

8.1.4 用 350 mU/L 校准液校准: 用移液器移取 100 μL 底物 (5.2) 加入一次性带盖小管底部, 再加入 100 μL 校准品 C_1 或 C_2 , 混匀, 置于 35 $^{\circ}\text{C}$ 的孵育器中孵育 3 min。在孵育结束后的 15 s 内加入 1.0 mL 终止液 (5.3)。从孵育器中取出小管, 盖上盖子, 并剧烈振荡 5 s。将小管插入发光检测仪 (6.1), 读取并记录检测仪的读数。试验重复 3 次, 计算平均校准值 (C_x), 若任何一个值超过平均值的 30%, 则按 8.1.4 重新测定。

8.1.5 使用平均校准值 C_x (8.1.4) 和阴性平均值 N (8.1.3), 按式 (1) 计算校正值 C_r , 按式 (2) 计算背景值 B_g 。 参阅光度检测仪手册将校正值 C_r 输入检测仪中, 建立新的校正值, 背景值 B_g 输入光度计成为新的背景值。

$$C_r = (C_x - N) \times 0.286 \quad (1)$$

$$B_g = [N / (C_r / 100)] + 100 \quad (2)$$

8.1.6 再次用阴性试样校准: 重复 8.1.3 的操作。验证无碱性磷酸酶巴氏杀菌乳和灭菌乳的平均值是否小于 5 mU/L, 无碱性磷酸酶发酵乳、调制乳和奶油是否小于 15 mU/L。若平均值超出范围, 从 8.1.3 开始重新测定。

8.1.7 再次用 350 mU/L 校准液校准: 重复 8.1.4 的操作。验证校准品平均值是否在 320 mU/L ~ 400 mU/L 范围内。若任何一个值超过平均值的 30%, 从 8.1.4 开始重新测定。

8.1.8 用 44 mU/L 或 88 mU/L 校准液校准: 参照 8.1.4 的操作, 但将加入 100 μL 校准品 C_1 或 C_2 更改为加入 100 μL 校准品 A_1 或 A_2 , 其余操作步骤同 8.1.4。验证 44 mU/L 的校准液平均值是否在 32 mU/L ~ 55 mU/L, 或 88 mU/L 校准品平均值是否在 45 mU/L ~ 110 mU/L 范围内。若任何一个值超过其平均值的 40%, 则按 8.1.8 重新测定。

8.1.9 用 175 mU/L 校准液校准: 参照 8.1.4 的操作, 但将加入 100 μL 校准液 C_1 或 C_2 更改为加入 100 μL 校准品 B_1 或 B_2 。验证 175 mU/L 校准品平均值是否在 145 mU/L ~ 205 mU/L 范围内。若任何一个值超过平均值的 30%, 则按 8.1.9 重新测定。

8.1.10 阴性质控检测: 按测定程序 (8.1.3) 进行, 不加待测样品。每天进行阴性质控测试, 以验证光度检测仪校准和试剂性能。在适当校准的通道, 若测得的碱性磷酸酶活性水平低于 5 mU/L, 则系统通过验证 (阴性结果)。

8.1.11 阳性质控检测：用阳性质控样品（5.6），参照 8.1.4 的操作，但将加入 100 μL 校准品 C_1 或 C_2 更改为加入 100 μL 阳性质控样品（5.6）。每天进行阳性质控检测，以验证光度计校准和试剂性能。阳性质控样品（5.6）测定值应在 300 mU/L ~585 mU/L 。若在此范围内，表明校准完成，可进行样品测定（8.3），且本次校准对于该批次底物和终止液有效；若超出范围，重新配制阳性质控样品，按 8.1.11 重新测定；若仍然超出范围，从 8.1.3 开始重新校准光度检测仪。

8.2 校准 2（适用于具有化学发光检测功能的酶标仪）

8.2.1 应对每类乳制品分别进行校准，建立各种待测类型产品的校准曲线。当换用新批次/批号的底物和终止液时，需重新进行校准。

8.2.2 移取 100 μL 底物（5.2）至一次性带盖小管底部，加入 100 μL 校准液（碱性磷酸酶活性分别为 0、44、175、350、450 mU/L ）至小管底部，混匀，置于 35℃ 的孵育器（6.4）中孵育 3 min。孵育结束后，15 s 内加入 1.0 mL 终止液（5.3）。从孵育器中取出小管，盖上盖子，并剧烈振荡 5 s。将小管内的液体转移至 96 孔酶标板（6.8）的板孔中，放入酶标仪进行测定。记录相对发光强度 RLU 值，以 RLU 值为纵坐标、碱性磷酸酶活性为横坐标，绘制标准曲线。

8.3 样品测定

移取 100 μL 底物（5.2）加入一次性带盖小管（6.6）底部，再加入 100 μL 待测样品至小管底部，混匀，置于 35℃ 的孵育器（6.4）中孵育 3 min。孵育结束后，15 s 内加入 1.0 mL 终止液（5.3）。从孵育器中取出小管，盖上盖子，并剧烈振荡 5 s。将小管插入化学发光光度计（6.1），读取并记录光度计的读数，或将小管内的液体转移至 96 孔酶标板（6.8）的板孔中，放入酶标仪（6.1）进行测定。若测定值超过 7000 mU/L ，将样品稀释后重新测试。

8.4 阳性样品确证

若样品中碱性磷酸酶活性的测定结果 $\geq 350 \text{ mU/L}$ 或 mU/kg ，则样品疑似阳性，需经过试验（资料性附录）确认是否为耐热微生物型碱性磷酸酶或复活型碱性磷酸酶。

9 试验数据处理

9.1 总则

若使用内置于发光检测仪（6.1）中的软件计算结果，读数直接为碱性磷酸酶的活性单位 mU/L 。若使用无内置软件的光度计读数，按照 9.2 进行手动计算。

9.2 计算

记录无碱性磷酸酶乳制品质控、校准液（44 mU/L、175 mU/L、350 mU/L 或 88 mU/L、175 mU/L、350 mU/L）的相对发光强度 RLU 值，以平均 RLU 值为纵坐标、碱性磷酸酶活性为横坐标，绘制标准曲线。将测试样品的 RLU 值代入标准曲线中进行定量。

9.2.1 液体试样中碱性磷酸酶的活性

试样中碱性磷酸酶的活性以 X 计，数值以毫活力单位每升（mU/L）表示，按式（3）计算：

$$X = \frac{L - b}{a} \times f \quad (3)$$

式中：

L ——测试样品的相对发光强度 RLU 值；

a ——校准曲线的斜率；

b ——校准曲线的截距；

f ——稀释倍数。

计算结果保留整数，用两次平行测定的算术平均值表示。

9.3 结果表述

9.3.1 若试样中碱性磷酸酶活性<350 mU/L 或 mU/kg，则判定为碱性磷酸酶呈阴性。

9.3.2 若试样中碱性磷酸酶活性≥350 mU/L 或 mU/kg，但符合 8.5.4 或 8.6.4 的情况，则判定为未发现碱性磷酸酶残留，存在耐热微生物型碱性磷酸酶或复活型碱性磷酸酶；若符合 8.6.5 的情况，则判定为碱性磷酸酶呈阳性。

10 精密度

重复性条件下两次独立测试结果的绝对差值，满足以下要求：

- 酶水平为 350 mU/L~2 500 mU/L，不大于算术平均值的 21%；
- 酶水平约为 100 mU/L，不大于算术平均值的 30%；
- 酶水平约为 50 mU/L，不大于算术平均值的 38%。

附录 A

(资料性附录)

碱性磷酸酶阳性样品确证方法

A.1 耐热型碱性磷酸酶

A.1.1 取 1 mL 疑似阳性样品，在 63℃ 孵育器（6.4）或水浴（6.5）中保持 30 min，搅拌或每 10 min 混匀一次。若样品中脂肪含量 > 10%，加热至 66℃±1℃ 并保持 30 min。然后将样品迅速置于冰浴中冷却至 0℃~4℃，待测。

A.1.2 按照 8.1.10 的步骤测定阴性质控，按照 8.1.11 的步骤测定阳性质控。

A.1.3 按照 8.3 的步骤测定经加热处理的样品（A.1.1）和未经热处理的疑似阳性样品。

A.1.4 若经加热处理的样品和未经热处理的疑似阳性样品的测定结果相当，差值小于未经热处理的疑似阳性样品的 30%，则认为碱性磷酸酶阳性是由于耐热微生物所致。

A.1.5 若经加热处理的样品的测定结果比未经热处理的疑似阳性样品的测定结果低，且差值超过未经热处理的疑似阳性样品的 30%，则认为碱性磷酸酶阳性是由于巴氏杀菌不完全导致的碱性磷酸酶残留或碱性磷酸酶复活所致，需经过试验（8.6）确认是否为复活型碱性磷酸酶。

A.2 复活型碱性磷酸酶

A.2.1 移取 5.0 mL 疑似阳性样品至试管中，加入 0.1 mL 水，标记为“空白样”；移取 5.0 mL 疑似阳性样品至试管中，加入 0.1 mL 乙酸镁溶液（5.4），标记为“测试样”。拧上盖子，混匀后置于水浴中 34℃±1℃ 孵育 1 h。然后将样品迅速置于冰浴中冷却至 0℃~4℃，待测。

A.2.2 移取 1.0 mL 含乙酸镁的测试样（A.2.1）至试管中，加入 5.0 mL 阴性质控样品进行稀释，混匀，得到 1:6 稀释的测试样，标记为“稀释样”。

A.2.3 按照 8.3 的步骤测定未加乙酸镁的“空白样”和含有乙酸镁的“稀释样”。

A.2.4 若稀释样的测定结果大于空白样的测定结果，或在空白样品测定结果的 30% 内，则认为碱性磷酸酶阳性是由于碱性磷酸酶复活所致。

A.2.5 若稀释样的测定结果比空白样的测定结果低，且差值超过空白样的 30%，则认为碱性磷酸酶阳性是由于巴氏杀菌不完全导致的碱性磷酸酶残留。