

ICS  
C



# 中华人民共和国食品安全国家标准

GB ××××—××××  
代替GB/T 5413.31—1997

## 婴幼儿食品和乳品中脲酶的测定

Determination of urease in foods for infants and young children,

raw milk and dairy products

(征求意见稿)

××××-××-××发布

××××-××-××实施

中华人民共和国卫生部 发布

## 前 言

本标准代替GB/T 5413.31—1997《婴幼儿配方食品和乳粉 脲酶的定性检验》。

本标准与GB/T 5413.31—1997相比，主要变化如下：

- 增加了第一法尿素酶活性测定；
- 第二法中增加了尿素溶液的贮存条件；
- 第二法中增加了纳氏试剂的贮存条件；
- 第二法中对判定结果的时限做了合理的规定。

本标准由中华人民共和国卫生部提出并归口。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

- GB 5413—1985、GB/T 5413.31—1997。

# 婴幼儿食品和乳品中脲酶的测定

## 1 范围

本标准规定了婴幼儿食品和乳品中脲酶的测定方法。

本标准方第一法适用于婴幼儿食品和乳品中脲酶的定量检验；第二法适用于婴幼儿食品和乳品中脲酶的定性检验。

## 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/T601 化学试剂 标准滴定溶液的制备

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

### 第一法 脲酶活性的测定

## 3 原理

将粉碎的大豆制品与中性脲酶缓冲溶液混合，在  $30 \pm 0.5^\circ\text{C}$  精确保温 30min，脲酶催化脲素水解产生氨的反应。用过量盐酸中和所产生的氨，再用氢氧化钠标准溶液回滴。

## 4 试剂和材料

除另有规定，本方法所用试剂均为分析纯或以上规格，水为 GB/T 6682 规定的三级水。

### 4.1 脲素

### 4.2 磷酸氢二钠 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )

### 4.3 磷酸二氢钾 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )

### 4.4 脲酶缓冲溶液 ( $\text{pH}7.0 \pm 0.1$ ):

称取 8.95g 磷酸氢二钠(4.2)和 3.40g 磷酸二氢钾(4.3)溶于水并稀释至 1000mL，再将 30g 脲素(4.1)溶在此缓冲溶液中，可保存 1 个月。

### 4.5 盐酸 [ $c(\text{HCL})=0.1\text{mol/L}$ ]:

吸取 8.3ml 盐酸，用水稀释至 1000ml，

### 4.6 氢氧化钠溶液 $c(\text{NaOH})=0.1\text{mol/L}$ ,

称取 4g 氢氧化钠溶于水并稀释至 1000ml，按 GB/T601 规定的方法配制和标定。

### 4.7 甲基红、溴甲酚绿混合乙醇溶液

称取 0.1g 甲基红，溶于 95%乙醇并稀释至 100ml，再称取 0.5g 溴甲酚绿，溶于 95%乙醇并稀释至 100ml，两种溶液等体积混合，储存于棕色瓶中。

## 5 仪器和设备

5.1 粉碎机：粉碎时应不产生强热（例如球磨机）。

5.2 试样筛：孔径  $200 \mu\text{m}$ 。

5.3 恒温水浴：可控温  $30 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 。

5.4 酸度计：精度 0.02pH，附有磁力搅拌器和滴定装置。

5.5 精密计时器。

5.6 粉碎机：粉碎时应不生强热

5.7 分析天平:感量 0.1mg;

5.8 实验室常用玻璃仪器。

## 6 试样的准备

用粉碎机(5.1)将具有代表性的试样粉碎,使之全部通过试样筛(5.2)。对特殊试样(水分或挥发物含量较高而无法粉碎的产品)应先在实验室温度下进行预干燥,再进行粉碎,当计算结果时应将干燥失重计算在内。

## 7 分析步骤

称取约 0.2g 已粉碎的试样(精确至 0.1mg),于玻璃试管中(如活性很高可称 0.05g 试样),加入 10mL 尿素缓冲溶液(4.4),立即盖好试管并剧烈摇动,马上置于  $30 \pm 0.5^\circ\text{C}$  恒温水浴(5.3)中,准确计时保持  $30\text{min} \pm 10\text{s}$ 。要求每个试样加入尿素缓冲液的时间间隔一致。停止反应时再以相同的时间间隔加入移入 10mL 盐酸溶液(4.5),迅速冷却到  $20^\circ\text{C}$ 。将试管内容物全部转入烧杯,用 20mL 水冲洗试管数次,以氢氧化钠标准溶液(4.6)用酸度计(5.4)滴定至 pH4.70。如果选择用指示剂,则将试管内容物全部转入 250mL 锥形瓶中,加入 8~10 滴混合指示剂(4.7),以氢氧化钠标准溶液(4.6)滴定至溶液呈蓝绿色。

另取试管作空白试验,分析步骤同上。

## 8 结果计算和表示

尿素酶活性 X,以尿素酶活性单位每克(U/g)表示,按式(1)计算。若试样经粉碎前的干燥处理,则按式(2)计算:

$$X = \frac{14 \times C (V_0 - V)}{30 \times m} \dots\dots\dots (1)$$

$$X = \frac{14 \times C (V_0 - V)}{30 \times m} \times (1 - S) \dots\dots\dots (2)$$

式中:

X——试样的尿素酶活性,单位为活性单位每克(U/g);

(指在在  $30 \pm 0.5^\circ\text{C}$  和 pH7 的条件下,每克试样每分钟分解尿素所释放的氨基氮的质量。

C——氢氧化钠标准滴定溶液浓度,单位为摩尔每升(mol/L);

$V_0$ ——空白试验消耗氢氧化钠标准滴定溶液体积,单位为毫升(mL);

V——试样消耗氢氧化钠标准滴定溶液体积,单位为毫升(mL);

m——试样质量,单位为克(g);

S——预干燥时试样失重的质量分数,%;

14——氮的摩尔质量,  $M(\text{N}_2)=14\text{g/mol}$ ;

30——反应时间,单位为分钟(min);

计算结果表示到小数点后两位。

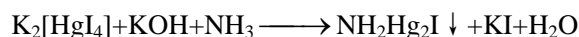
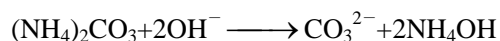
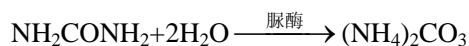
## 9 精密度

同一分析人员用相同方法,同时或连续两次测定活性 $\leq 0.2$ 时,结果之差不超过平均值的 20%,活性 $> 0.2$ 时,结果之差不超过平均值的 10%,结果以算术平均值表示。

## 第二法 脲酶的定性检验

### 10 原理

脲酶在适当酸碱度和温度条件下，催化尿素转化成碳酸铵。而碳酸铵在碱性条件下生成氢氧化铵，与纳氏试剂中的碘化钾汞复盐作用生成棕色的碘化双汞铵。



黄棕色沉淀

### 11 试剂和材料

除非另有规定，本方法所用试剂均为分析纯，水为 GB/T 6682 规定的三级水。

11.1 尿素溶液：10 g/L，保存于棕色试剂瓶中，冷藏，配制后一个月内使用。

11.2 钨酸钠溶液：100 g/L。

11.2 酒石酸钾钠溶液：20 g/L。

11.4 硫酸溶液：体积分数 50 mL/L。

11.5 中性缓冲液：

取下述磷酸氢二钠溶液 611 mL，磷酸二氢钾溶液 389 mL，两种溶液混合均匀。

11.5.1 磷酸氢二钠溶液：

称取无水磷酸氢二钠 9.47 g，溶于 1000 mL 水中。

11.5.2 磷酸二氢钾溶液：

称取磷酸二氢钾 9.07 g，溶于 1000 mL 水中。

11.6 纳氏试剂：

称取红色碘化汞 55 g，碘化钾 41.25 g，溶于 250 mL 水中，溶解后，移入 1000 mL 容量瓶中。

再称取氢氧化钠 144 g 溶于 500 mL 水中，充分溶解并冷却后，再缓慢地移入上述 1000 mL 的容量瓶中，加水稀释至刻度，摇匀，转入试剂瓶内，静置后，用上清液。此试剂需棕色瓶保存，冷藏，配制后一个月内使用。

11.7 25 mL 具塞的比色管。

11.8 试管：18×180 mm。

### 12 仪器和设备

12.1 水浴锅：40℃。

### 13 分析步骤

13.1 取试管甲、乙两支，各称入 (0.1±0.01) g 试样，再移入 1 mL 水，振摇 0.5 min (约 100 次)。然后分别移入 1 mL 中性缓冲溶液 (11.5)。

13.2 向甲管 (样品管) 移入 1 mL 尿素溶液 (11.1)，再向乙管 (空白对照管) 移入 1 mL 水。两管摇匀后，置于 40℃ 水浴中保温 20 min。

13.3 从水浴中取出两管后，各移入 4 mL 水，摇匀，再移入 1 mL 钨酸钠溶液 (11.2)，摇匀，移入 1 mL 硫酸溶液 (3.4)，摇匀，过滤，收集滤液备用。

13.4 取上述滤液 2 mL，分别移入到二支 25 mL 具塞的比色管中（11.7）。各移入 15 mL 水，1 mL 酒石酸钾钠溶液（11.3），2 mL 纳氏试剂（11.6），最后用水定容至 25 mL，摇匀。5 min 内观察结果。

#### 14 结果计算和表示

分析结果按表 1 进行判断。

表 1 结果的判断

脲酶定性	表示符号	显示情况
强阳性	++++	砖红色混浊或澄清液
次强阳性	+++	桔红色澄清液
阳性	++	深金黄色或黄色澄清液
弱阳性	+	淡黄色或微黄色澄清液
阴性	—	样品管与空白对照管同色或更淡