



中华人民共和国国家标准

GB/T 22031—2008

干酪及加工干酪制品中添加的 柠檬酸盐含量的测定 酶-比色法

Determination of added citrate content in cheese and
processed cheese products—Enzyme-colorimetric method

(ISO 12082:1997 Processed cheese and processed cheese products—
Calculation of the content of added citrate emulsifying agents and
acidifiers/pH-controlling agents, expressed as citric acid, MOD)

2008-06-17 发布

2008-10-01 实施



中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会

发布

前 言

本标准修改采用国际标准 ISO 12082:1997《加工干酪及其制品 添加的柠檬酸盐乳化剂和酸度调节剂含量(以柠檬酸计)的测定》(英文版)。

考虑到我国国情,本标准与 ISO 12082:1997 的主要差异如下:

- 分析步骤中增加标准曲线的绘制,由试液吸光度测定与标准系列比较定量,不采用国际标准中摩尔吸光系数计算定量;
- 乳糖含量的测定以试剂空白和试液空白扣除干扰组分和葡萄糖本底值,不采用国际标准中吸光度减量计算;
- 免去国际标准中预试验和试验报告章条;
- 编写格式、用语遵照我国标准 GB/T 1.1—2000《标准化工作导则 第1部分:标准的结构和编写规则》和 GB/T 20001.4—2001《标准编写规则 第4部分:化学分析方法》。

本标准的附录 A、附录 B 为规范性附录。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国畜牧业标准化技术委员会归口。

本标准负责起草单位:农业部食品质量监督检验测试中心(上海)。

本标准主要起草人:孟瑾、韩奕奕、吴榕。

干酪及加工干酪制品中添加的 柠檬酸盐含量的测定 酶-比色法

1 范围

本标准规定了干酪及加工干酪制品中添加的柠檬酸盐含量(以柠檬酸计)的测定方法。
本标准适用于干酪及加工干酪制品中添加的柠檬酸盐含量的测定。

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/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法(GB/T 6682—1992, neq ISO 3696:1987)

3 原理

测定样品中总柠檬酸盐的含量,扣除原料带入样品中的柠檬酸盐的量(以 0.04 倍乳糖换算),即为样品中添加的柠檬酸盐含量。柠檬酸盐以柠檬酸计。

4 分析步骤

样品中总柠檬酸盐的测定和含量计算按附录 A 的规定执行。

样品中乳糖的测定和含量计算按附录 B 的规定执行。

5 结果计算

样品中添加的柠檬酸盐含量 w_a 以柠檬酸计,数值以质量分数(%)表示,按式(1)计算:

$$w_a = w_c - rw_1 \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中:

w_c ——样品中总柠檬酸含量, %;

r ——原料乳清粉或乳粉中柠檬酸含量与乳糖含量的比率(柠檬酸/乳糖)($r=0.04$);

w_1 ——样品中乳糖含量, %。

计算结果表示到小数点后两位。

6 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这两个测定值的算术平均值的 10%。

附录 A (规范性附录)

干酪及加工干酪制品中柠檬酸盐含量的酶法测定

A.1 范围

本附录规定了酶法测定干酪及加工干酪制品中柠檬酸盐含量的方法。

本附录适用于干酪及加工干酪制品中柠檬酸盐含量的酶法测定。

A.2 原理

柠檬酸盐裂解酶(CL)将柠檬酸盐转化为草酰乙酸盐和乙酸盐,苹果酸脱氢酶(MDH)和乳酸脱氢酶(LDH)在还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)的存在下催化脱羧草酰乙酸盐以及脱羧产物丙酮酸盐,分别转化成L-苹果酸和L-乳酸。NADH在反应中被氧化成了NAD⁺。在340 nm处测定样品溶液中NADH的吸光度差值,计算样品中柠檬酸盐的含量。

A.3 试剂

所有的试剂如未注明规格,均为分析纯;实验用水如未注明,均应符合GB/T 6682的规定。

- A.3.1 三氯乙酸溶液(200 g/L):称取20 g三氯乙酸(CCl_3COOH)溶于水中,混匀,并定容至100 mL。
- A.3.2 氢氧化钠溶液(200 g/L):称取20 g氢氧化钠(NaOH),用水溶解后转移至100 mL容量瓶中,定容。充分混合。
- A.3.3 氢氧化钠溶液(40 g/L):称取4 g氢氧化钠(NaOH),用水溶解后转移至100 mL容量瓶中,定容。充分混合。
- A.3.4 氢氧化钠溶液(4 g/L):称取0.4 g氢氧化钠(NaOH),用水溶解后转移至100 mL容量瓶中,定容。充分混合。
- A.3.5 氯化锌溶液(0.8 g/L):称取0.8 g氯化锌(ZnCl_2),用水溶解后转移至1 000 mL容量瓶中,定容。充分混合。
- A.3.6 缓冲液(pH 7.8):称取7.13 g双甘氨酸($\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CONHCH}_2\text{CO}_2\text{H}$),溶解于70 mL水中,转移至100 mL容量瓶中。用氢氧化钠溶液(A.3.2)调节pH至7.8,加入10 mL氯化锌溶液(A.3.5)并定容至100 mL。充分混合。储存在0℃~4℃的冰箱中,此溶液可以保存四周。
- A.3.7 碳酸氢钠溶液(4.0 g/L):称取4.0 g碳酸氢钠(NaHCO_3),用水溶解后转移至1 000 mL容量瓶中,定容。充分混合。
- A.3.8 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)溶液:称取50 mg烟酰胺腺嘌呤二核苷酸二钠盐($\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{N}_7\text{O}_{14}\text{P}_2\text{Na}_2$)和100 mg碳酸氢钠(NaHCO_3),溶解于10 mL水中。
- A.3.9 硫酸铵溶液(422 g/L):称取42.2 g硫酸铵 $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$,用水溶解后转移至100 mL容量瓶中,定容。充分混合。
- A.3.10 苹果酸脱氢酶(MDH)和乳酸脱氢酶(LDH)悬浊液:用硫酸铵溶液(A.3.9)分别溶解苹果酸脱氢酶(猪心, EC 1.1.1.37)和乳酸脱氢酶(兔肉, EC 1.1.1.27),使苹果酸脱氢酶(MDH)的活性不低于600 IU/mL、乳酸脱氢酶的活性不低于1 400 IU/mL。缓慢搅匀成悬浊液后,储存在0℃~4℃冰箱中,此溶液可以保存一年。
- A.3.11 柠檬酸盐裂解酶(CL)溶液:用0℃水溶解柠檬酸盐裂解酶(产气肠杆菌, EC 4.1.3.6),使柠檬酸盐裂解酶的活性不低于40 IU/mL。缓慢搅匀成悬浊液后,储存在0℃~4℃冰箱中,此溶液可以保存一周;在-20℃冰箱中,可以保存四周。

A.3.12 柠檬酸标准溶液(160 $\mu\text{g}/\text{mL}$):称取 175 mg 一水柠檬酸($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$),用水溶解后转移至 1 000 mL 容量瓶中,定容。充分混合。

A.4 仪器

常用实验室仪器及以下各项。

- A.4.1 分析天平:感量 0.1 mg。
 A.4.2 pH 计:精确至 ± 0.1 。
 A.4.3 粉碎机。
 A.4.4 具塞刻度比色管:10 mL,分度值 0.1 mL。
 A.4.5 中速滤纸。
 A.4.6 紫外可见分光光度计,340 nm,1 cm 比色皿。
 A.4.7 水浴锅。

A.5 试样制备

A.5.1 干酪

除去干酪的外壳或发霉的表层,使试样具代表性。用粉碎机(A.4.3)将试样粉碎,混匀。

A.5.2 干酪制品

选择具有代表性的试样,用粉碎机(A.4.3)粉碎,混匀。

A.6 分析步骤

A.6.1 试液制备

称取 1 g 试样(A.5),精确至 0.1 mg,溶于 50 mL 的温水($40\text{ }^\circ\text{C}\sim 50\text{ }^\circ\text{C}$)中,全部转移入 100 mL 容量瓶中,冷却至 $20\text{ }^\circ\text{C}$ 。再加入 10 mL 三氯乙酸溶液(A.3.7),用水定容,混合均匀后静置 30 min。用滤纸(A.4.5)过滤,弃去初滤液约 10 mL。吸取 25 mL 滤液于烧杯中,用氢氧化钠溶液(A.3.3)调节滤液 pH 至 4 后,再用氢氧化钠溶液(A.3.3)调节 pH 至 8。将烧杯中的溶液转移入 100 mL 容量瓶中,用水定容。同时做空白试验。

A.6.2 测定

A.6.2.1 标准曲线的绘制

试剂在使用前恢复至室温。准确吸取 0, 0.50, 1.00, 1.50, 2.00 mL 两组柠檬酸标准溶液(A.3.12),分别置于 10 mL 比色管(A.4.4)中,各加入 1.00 mL 缓冲液(A.3.6)、0.10 mL NADH 溶液(A.3.8)、0.02 mL 苹果酸脱氢酶(MDH)和乳酸脱氢酶(LDH)悬浊液(A.3.10),摇匀。在 $20\text{ }^\circ\text{C}\sim 25\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴锅(A.4.7)中保持 5 min,用水定容至 5.00 mL。其中一组用 1 cm 比色皿(A.4.6),以空气作参比,在波长 340 nm 处测定各比色管内溶液的吸光度 A_0 。另一组各加入 0.02 mL 的柠檬酸盐裂解酶(A.3.11),混匀,在 $20\text{ }^\circ\text{C}\sim 25\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴锅(A.4.7)中保持 10 min,用 1 cm 比色皿(A.4.6),以空气作参比,在波长 340 nm 处测定各比色管内溶液的吸光度 A_{10} 。根据式(A.1)计算吸光度 A ,以柠檬酸含量为纵坐标,吸光度 A 为横坐标,绘制标准曲线。

$$A = A_0 - A_{10} \quad \dots\dots\dots(A.1)$$

式中:

A_0 ——柠檬酸盐裂解酶添加前的吸光度;

A_{10} ——柠檬酸盐裂解酶添加后水浴 10 min 的吸光度。

注:如果吸光度降低超过 0.800,用水溶液稀释样品和空白试样,重复 A.6.2.1 步骤。

A.6.2.2 试液吸光度的测定

用移液管吸取两份 2.00 mL 试液(A.6.1),置于 10 mL 比色管(A.4.4)中。以下步骤同 A.6.2.1

中“各加入 1.00 mL 缓冲液(A. 3.6)……根据式(A. 1)计算吸光度 A”操作,在标准曲线上查出对应的柠檬酸含量。同时做空白试验。

A.7 结果计算

样品中柠檬酸的含量 X ,以克每百克(g/100 g)表示,按式(A. 2)计算:

$$X = \frac{c \times V_1 \times V_3}{10\,000 \, m \times V_2 \times V_4} \dots\dots\dots(A. 2)$$

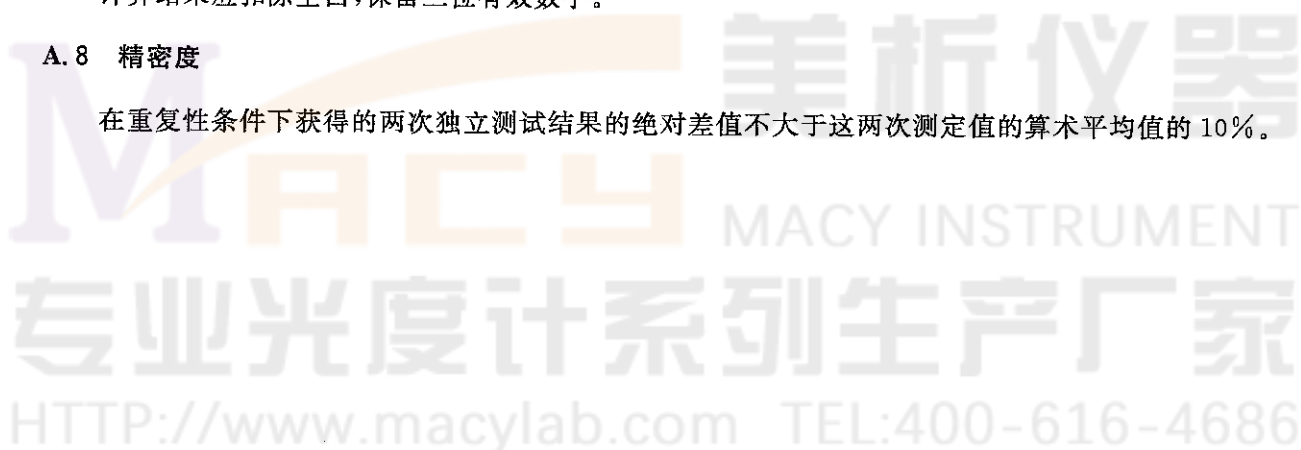
式中:

- c ——标准曲线上查出的试液中柠檬酸的含量,单位为微克(μg);
- V_1 ——试样经脱蛋白处理后的定容体积,100 mL;
- V_3 ——滤液定容体积,100 mL;
- m ——试样的质量,单位为克(g);
- V_2 ——吸取滤液体积,25.00 mL;
- V_4 ——吸取试液体积,2.00 mL。

计算结果应扣除空白,保留三位有效数字。

A.8 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这两次测定值的算术平均值的 10%。



附录 B

(规范性附录)

干酪及加工干酪中乳糖含量的酶法测定

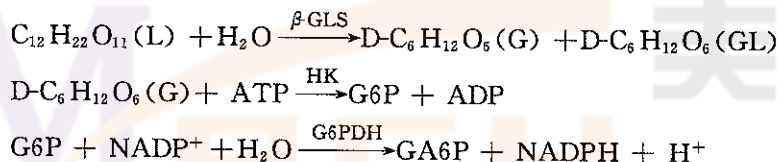
B.1 范围

本附录规定了酶法测定干酪及加工干酪制品中乳糖含量的方法。

本附录适用于干酪及加工干酪制品中乳糖含量的酶法测定。

B.2 原理

在 β -半乳糖苷酶(β -GLS)催化下,乳糖被酶解为D-葡萄糖(G)和D-半乳糖(GL)。己糖激酶(HK)将D-葡萄糖磷酸化生成6-磷酸葡萄糖(G6P),同时将三磷酸腺苷(ATP)转化为二磷酸腺苷(ADP)。受6-磷酸葡萄糖脱氢酶(G6PDH)催化,6-磷酸葡萄糖氧化为6-磷酸葡萄糖酸(GA6P),同时烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADP⁺)被还原成还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)。在波长340 nm处NADPH的吸光度值与乳糖含量成正比,与标准系列比较定量。



B.3 试剂和材料

所有的试剂如未注明规格,均为分析纯;实验用水如未注明,均应符合GB/T 6682的规定。

B.3.1 乳糖标准物质($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11} \cdot \text{H}_2\text{O}$):纯度 $\geq 99\%$ 。

B.3.2 亚铁氰化钾溶液(36 g/L):称取3.6 g亚铁氰化钾($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$),用水溶解,定容至100 mL,混匀。

B.3.3 硫酸锌溶液(72 g/L):称取7.2 g硫酸锌($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$),用水溶解,定容至100 mL,混匀。

B.3.4 硫酸溶液(2 mol/L):用水稀释浓硫酸,浓硫酸:水为1:8(体积比)。

警告:稀释浓硫酸时应当将硫酸缓慢加入水中,且不断搅动。否则会引起爆炸。

B.3.5 氢氧化钠溶液(200 g/L):称取20.0 g氢氧化钠(NaOH),用水溶解,定容至100 mL,混匀。

B.3.6 氢氧化钠溶液(4 g/L):称取4.0 g氢氧化钠(NaOH),用水溶解,定容至1 000 mL,混匀。

B.3.7 硫酸铵溶液(422 g/L):称取42.2 g硫酸铵 $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$,用水溶解,定容至100 mL,混匀。

B.3.8 柠檬酸盐缓冲液(pH 6.6):分别称取2.8 g柠檬酸钠($\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)、0.042 g柠檬酸($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$)和0.635 g七水硫酸镁($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)溶于40 mL水中,用硫酸溶液(B.3.4)或者氢氧化钠溶液(B.3.6)调节pH至 6.6 ± 0.1 后,用水定容至50 mL,混匀后放置 $0\text{ }^\circ\text{C} \sim 4\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中贮藏,可保存三个月,使用前放置至室温。

B.3.9 三乙醇胺(TEA)缓冲液(pH 7.6):分别称取14.0 g盐酸三乙醇胺($\text{C}_6\text{H}_{15}\text{NO}_3 \cdot \text{HCl}$)和0.25 g七水硫酸镁($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$),用80 mL水溶解,用氢氧化钠溶液(B.3.5)调节pH至 7.6 ± 0.1 后,定容至100 mL,混匀后放置 $0\text{ }^\circ\text{C} \sim 4\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中贮藏,可保存两个月。

B.3.10 NADP⁺-ATP-TEA缓冲悬浊液:分别准确称取65 mg烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸二钠($\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{N}_7\text{O}_{17}\text{P}_3\text{Na}_2$)和170 mg 5-三磷酸腺苷二钠盐($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_5\text{O}_{13}\text{P}_3\text{Na}_2$),溶于30 mL的三乙醇胺缓冲液(B.3.9)中,混匀后放置 $0\text{ }^\circ\text{C} \sim 4\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中贮藏,可保持两周,使用前放置至室温。

B.3.11 β -半乳糖苷酶-硫酸铵 $[\beta\text{-GLS}-(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ 悬浊液(pH约7.6):将 β -半乳糖苷酶($\beta\text{-GLS}$),

埃希氏大肠杆菌, EC 3.2.1.23)溶于硫酸铵溶液(B.3.7)中,使 β -半乳糖苷酶的活性不低于60 IU/mL。缓慢搅匀成悬浊液后放置0℃~4℃冰箱中,可保存12个月。使用时该悬浊液的容器应浸入冰水中。

B.3.12 己糖激酶-6-磷酸葡萄糖脱氢酶-硫酸铵[HK-G6PDH-(NH₄)₂SO₄]悬浊液:将己糖激酶(HK, 酵母, EC 2.7.1.1)和6-磷酸葡萄糖脱氢酶(G6PDH, 酵母, EC 1.1.1.49)溶于硫酸铵溶液(B.3.7)中,使己糖激酶活性不低于280 IU/mL(25℃),6-磷酸葡萄糖脱氢酶活性不低于140 IU/mL(25℃)。缓慢搅匀成悬浊液后放置0℃~4℃冰箱中,可保存12个月。使用时该悬浊液的容器应浸入冰水中。

B.3.13 乳糖标准溶液[c(C₁₂H₂₂O₁₁·H₂O)=80 μg/mL]:精确称取经87℃烘烤2h至恒重的乳糖标准物质(B.3.1)0.842 g,溶于水中,定容至100 mL,摇匀。准确吸取1.00 mL上述溶液,用水稀释到100 mL,即得浓度为80 μg/mL的乳糖标准工作溶液。该溶液放置0℃~4℃冰箱中,现用现配。

B.4 仪器和设备

实验室常规仪器及以下各项。

- B.4.1 分析天平:感量0.1 mg。
- B.4.2 定量滤纸:中速,直径15 cm。
- B.4.3 比色管:10 mL,带盖。
- B.4.4 分光光度计:340 nm,1 cm比色皿。
- B.4.5 水浴锅:能在20℃~36℃保温。

B.5 试样制备

取有代表性的样品至少200 g,充分混匀,置于密闭的玻璃容器内。

B.6 分析步骤

B.6.1 试液的制备

准确称取1 g样品于烧杯中,用温水(40℃~50℃)溶解,玻璃棒搅拌,将烧杯中样品完全转移至100 mL容量瓶,用水定容,混匀。加入5 mL亚铁氰化钾溶液(B.3.2)、5 mL硫酸锌溶液(B.3.3)和10 mL氢氧化钠溶液(B.3.6),每次添加后充分混合溶液,用水定容至100 mL,混合均匀后静置30 min。过滤,弃去开始的部分滤液。吸取5.00 mL滤液于100 mL容量瓶中,用水定容至100 mL,即为试液。

B.6.2 标准曲线的绘制

用微量移液管吸取0,0.20,0.40,0.60,0.80,1.00 mL乳糖标准工作溶液(B.3.13),分别置于比色管(B.4.3)中,各加入0.20 mL柠檬酸盐缓冲溶液(B.3.8)、0.05 mL β -半乳糖苷酶-硫酸铵悬浊液(B.3.11),摇匀,于水浴锅(B.4.5)中恒温15 min。取出后加入1.00 mL NADP⁺-ATP-TEA缓冲溶液(B.3.10)、0.05 mL己糖激酶-6-磷酸葡萄糖脱氢酶-硫酸铵悬浊液(B.3.12),摇匀,于水浴锅(B.4.5)中恒温60 min。取出后,冷却至室温,用水定容至5.00 mL,摇匀,放置5 min。用1 cm比色皿(B.4.4),以乳糖标准溶液含量为0的试剂溶液作参比,在波长340 nm处测定各比色管内溶液的吸光度。以乳糖含量为纵坐标,吸光度为横坐标,绘制标准曲线。

B.6.3 试液吸光度的测定

准确吸取1.00 mL试液(B.6.1)于比色管(B.4.3)中,加入0.20 mL柠檬酸盐缓冲溶液(B.3.8)、1.00 mL NADP⁺-ATP-TEA缓冲溶液(B.3.10)、0.05 mL己糖激酶-6-磷酸葡萄糖脱氢酶-硫酸铵悬浊液(B.3.12),摇匀,于水浴锅(B.4.5)中恒温60 min。取出后,冷却至室温,用水定容至5.00 mL,摇匀,放置5 min,作为试液参比溶液。

准确吸取1.00 mL试液(B.6.1)于比色管(B.4.3)中。以下按B.6.2“各加入0.20 mL柠檬酸盐缓冲溶液(B.3.8)……放置5 min”操作,用1 cm比色皿(B.4.4),在波长340 nm处测定各比色管内溶液

的吸光度,在标准曲线上查出对应的乳糖含量。

B.7 结果计算

试样中乳糖的含量 X ,以克每百克(g/100 g)表示,按式(B.1)计算:

$$X = \frac{c \times V_1 \times V_3}{10\,000 \, m \times V_2 \times V_4} \dots\dots\dots (B.1)$$

式中:

- c ——标准曲线上查出的试液中乳糖的含量,单位为微克(μg);
- V_1 ——试样经脱蛋白处理后的定容体积,250 mL;
- V_3 ——滤液定容体积,100 mL;
- m ——试样的质量,单位为克(g);
- V_2 ——吸取滤液体积,5.00 mL;
- V_4 ——吸取试液体积,1.00 mL。

用平行测定的算术平均值表示,保留三位有效数字。

B.8 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的10%。

