



中华人民共和国国家标准

GB 22031—2010

食品安全国家标准

干酪及加工干酪制品中添加的柠檬酸盐的 测定

National food safety standard

Determination of added citrate content in cheese and processed cheese products

2010-03-26 发布

2010-06-01 实施

中华人民共和国卫生部 发布

前 言

本标准代替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》。

本标准附录A、附录B为规范性附录。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

——GB/T 22031-2008。

食品安全国家标准

干酪及加工干酪制品中添加的柠檬酸盐的测定

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

本标准中引用的文件对于本标准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标准。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本标准。

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

样品中的总柠檬酸盐的测定和含量计算按附录A的规定执行。
样品中的乳糖的测定和含量计算按附录B的规定执行。

5 分析结果的表述

样品中添加的柠檬酸盐含量按（1）式计算：

$$w_a = w_c - r w_i \dots\dots\dots (1)$$

式中：

w_a ——样品中添加的柠檬酸盐含量，以柠檬酸计，以质量分数（%）表示；

w_c ——样品中总柠檬酸含量，单位为质量分数（%）；

w_i ——样品中乳糖含量，单位为质量分数（%）；

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）（ $r = 0.04$ ）。

以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示，结果保留至小数点后两位。

6 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的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

本标准适用于酶法测定干酪及加工干酪制品中的柠檬酸盐含量。

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规定的二级水。

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1000 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 $0\text{ }^\circ\text{C}\sim 4\text{ }^\circ\text{C}$ 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1000 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和乳酸脱氢酶的活性不低于1400 IU/mL。缓慢搅匀成悬浊液后, 储存在 $0\text{ }^\circ\text{C}\sim 4\text{ }^\circ\text{C}$ 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 $0\text{ }^\circ\text{C}$ 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 $0\text{ }^\circ\text{C}\sim 4\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中, 此溶液可以保存一周; 在 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 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1000 mL容量瓶中, 定容。充分混合。

A.4 仪器和设备

- A.4.1 天平：感量为0.1 mg。
 A.4.2 pH计：精度为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（精确至0.0001 g）试样（A.5），溶于50 mL的温水（40 °C~50 °C）中，全部转移入100 mL容量瓶中，冷却至20 °C。再加入10 mL三氯乙酸溶液（A.3.1），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.3.4）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0.00 mL、0.50 mL、1.00 mL、1.50 mL、2.00 mL（相当于0、80、160、200、320 μg柠檬酸）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 °C~25 °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 °C~25 °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（2）式计算吸光度 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。

$$A=A_0-A_{10} \dots\dots\dots (2)$$

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测试，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）……绘制标准曲线”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 分析结果的表述

样品中柠檬酸的含量按式 (A.2) 计算。

$$X = \frac{c \times V_1 \times V_3}{10000 \times m \times V_2 \times V_4} \dots\dots\dots (3)$$

式中：

X ——样品中柠檬酸的含量，单位为克每百克 (g/100g)；

c ——标准曲线上查出的试液中柠檬酸的含量，单位为微克 (μg)；

m ——试样的质量，单位为克 (g)；

V_1 ——试样经脱蛋白处理后的定容体积，单位为毫升 (mL)；

V_2 ——吸取滤液体积，单位为毫升 (mL)；

V_3 ——滤液定容体积，单位为毫升 (mL)；

V_4 ——吸取试液体积，单位为毫升 (mL)。

以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示，结果保留三位有效数字。

A.8 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的10%。

附录 B (规范性附录)

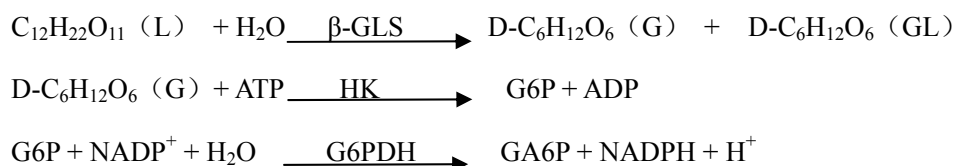
干酪及加工干酪中乳糖含量的酶法测定

B.1 范围

本标准适用于酶法测定干酪及加工干酪制品中的乳糖含量。

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

除非另有规定,本方法中所用试剂均为分析纯,水为GB/T 6682规定的二级水。

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):量取60 mL硫酸,缓缓注入适量水中,冷却至室温后用水稀释至1000 L,混匀。

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1000 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($\text{C}_6\text{H}_{15}\text{NO}_3 \cdot \text{HCl}$),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,可保持两个月。

B.3.10 $\text{NADP}^+ - \text{ATP} - \text{TEA}$ 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约为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 °C~4 °C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 $[\text{HK-G6PDH}-(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ 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 °C), 6-磷酸葡萄糖脱氢酶活性不低于140 IU/mL (25 °C)。缓慢搅匀成悬浊液后放置0 °C~4 °C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 (80 $\mu\text{g/mL}$): 精确称取经87 °C烘烤2 h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 $\mu\text{g/mL}$ 乳糖标准工作溶液。该溶液放置0 °C~4 °C冰箱中, 临用前配制。

B. 4 仪器和设备

B. 4.1 天平: 感量为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 °C~36 °C保温。

B. 5 分析步骤

B. 5.1 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. 5.2 试液的制备

准确称取1 g样品于烧杯。用温水 (40 °C~50 °C) 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 NaOH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. 5.3 标准曲线的绘制

用微量移液管吸取0.00, 0.20, 0.40, 0.60, 0.80, 1.00 mL(相当于0, 16, 32, 48, 64, 80 μg 乳糖)乳糖标准溶液 (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零的试剂溶液作参比, 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. 5.4 试液吸光度的测定

准确吸取 1.00 mL 试液 (B.5.2) 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.5.2) 于比色管 (B.4.3) 中。以下按 B.5.3 “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. 6 分析结果的表述

试样中乳糖的含量按式（4）计算。

$$X = \frac{c \times V_1 \times V_3}{10000 \times m \times V_2 \times V_4} \dots\dots\dots (4)$$

式中：

X ——试样中乳糖的含量，单位为克每百克（g/100g）；

c ——标准曲线上查出的试液中乳糖的含量，单位为微克（ μg ）；

m ——试料的质量，单位为克（g）；

V_1 ——试料经脱蛋白处理后的定容体积，单位为毫升（mL）；

V_2 ——吸取滤液体积，单位为毫升（mL）；

V_3 ——滤液定容体积，单位为毫升（mL）；

V_4 ——吸取试液体积，单位为毫升（mL）。

以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示，结果保留三位有效数字。

B.7 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%。

