



中华人民共和国国家标准

GB/T 16771—1997

橙、柑、桔汁及其饮料中 果汁含量的测定

Determination of juice content in orange, mandarine,
tangerine juice and their drinks



C9714943

1997-04-16 发布

1997-10-01 实施

国家技术监督局 发布

3

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
橙、柑、桔汁及其饮料中
果汁含量的测定

GB/T 16771—1997

*

中国标准出版社出版
北京复兴门外三里河北街16号

邮政编码:100045

电 话:68522112

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

版权专有 不得翻印

*

开本 880×1230 1/16 印张 1¼ 字数 26 千字

1997年9月第一版 1997年9月第一次印刷

印数 1—2 000

*

书号: 155066 • 1-14021 定价 12.00 元

*

标 目 316—50

前 言

制定本标准旨在规范饮料市场;鉴别、判定真假橙、柑、桔汁及其饮料中果汁的含量;便于企业验收原料、控制产品质量、维护自身的合法权益;保护消费者利益。

迄今为止,鉴别、判定真假橙、柑、桔汁及其饮料中果汁含量尚无国际标准可供借鉴。一些国家虽有报道,但都未形成经典方法。本标准汲取了先进国家和有关国际组织所沿用方法的合理部分,依据我国橙、柑、桔主要产区不同品种果汁,所含主要组分和数以万计的实测数据,经数理统计优化处理,推导出果汁含量计算公式,从而合理判定橙、柑、桔汁及其饮料中果汁的真实含量。

本标准的附录 A、附录 B、附录 C、附录 D、附录 E 都是标准的附录。

本标准由国家技术监督局提出。

本标准由全国食品工业标准化技术委员会归口。

本标准由全国食品工业标准化技术委员会、中国食品发酵工业研究所、中国农业大学(东区)、浙江省轻工业研究所、四川省轻工业研究所、湖南省食品质量监督检验所、河北省衡水市卫生防疫站共同组成的起草工作组负责起草;广东健力宝集团有限公司、海口罐头厂、杭州娃哈哈集团公司、浙江圣达保健品有限公司参加起草。

本标准主要起草人:徐清渠、郝煜、任一平、张永顺、徐德忠、冯敏、吴卫华;杨代明、元晓梅、陈青俊、霍秀岩参加起草。

中华人民共和国国家标准

橙、柑、桔汁及其饮料中
果汁含量的测定

GB/T 16771—1997

Determination of juice content in orange, mandarine,
tangerine juice and their drinks

1 范围

本标准规定了橙、柑、桔汁及其饮料中钾、总磷、氨基酸态氮、L-脯氨酸、总D-异柠檬酸、总黄酮6种组分的测定方法和用6种组分的实测值计算(推导)果汁含量的方法。

本标准适用于判定橙、柑、桔浓缩汁和果汁,以及果汁含量不低于2.5%的橙、柑、桔汁饮料。

2 引用标准

下列标准所包含的条文,通过在本标准中引用而构成为本标准的条文。本标准出版时,所示版本均为有效。所有标准都会被修订,使用本标准的各方应探讨使用下列标准最新版本的可能性。

GB 6682—92 分析实验室用水规格和试验方法

GB 10789—1996 软饮料的分类

GB/T 12143.1—89 软饮料中可溶性固形物的测定方法 折光计法

GB/T 12143.2—89 果蔬汁饮料中氨基酸态氮的测定方法 甲醛值法

3 定义

本标准采用下列定义。

3.1 浓缩汁、果汁及其饮料的定义同GB 10789。

3.2 标准值

根据不同品种、不同产区、不同采收期、不同加工工艺、不同贮存期橙、柑、桔果汁及由其浓缩汁复原的果汁中可溶性固形物含量和6种组分实测值的分布状态,经数理统计确定的合理数值。

3.3 权值

根据6种组分实测值变异系数的大小而确定的某种组分在总体中所占的比重。

4 方法提要

4.1 按本标准规定的方法测定样品中6种组分。

4.2 将6种组分的实测值分别与各自标准值的比值合理修正后,乘以相应的修正权值,逐项相加求得样品中的果汁含量。

5 橙、柑、桔汁及其混合果汁的标准值和权值

5.1 可溶性固形物的标准值

20℃时,用折光计测定(不校正酸度),橙、柑、桔汁及其混合果汁可溶性固形物(加糖除外)的标准

值,以不低于 10.0%计。

5.2 6 种组分的标准值和权值

6 种组分的标准值和权值见表 1。

表 1

组分	标准值			权值		
	橙汁	柑、桔汁	混合果汁	橙汁	柑、桔汁	混合果汁
钾,mg/kg	1370	1250	1300	0.18	0.16	0.18
总磷,mg/kg	135	130	135	0.20	0.19	0.19
氨基酸态氮 mg/kg	290	305	300	0.19	0.19	0.19
L-脯氨酸,mg/kg	760	685	695	0.14	0.14	0.14
总 D-异柠檬酸,mg/kg	80	140	115	0.15	0.17	0.15
总黄酮,mg/kg	1185	1100	1105	0.14	0.15	0.15

注:如标签上未标明橙汁或柑、桔汁时,以混合果汁计算。

6 测定方法

6.1 可溶性固形物

按 GB/T 12143.1 规定的方法测定。

6.2 钾

按附录 A(标准的附录)测定。

6.3 总磷

按附录 B(标准的附录)测定。

6.4 氨基酸态氮

按 GB/T 12143.2 规定的方法测定。测定结果的单位以 mg/kg 表述。

6.5 L-脯氨酸

按附录 C(标准的附录)测定。

6.6 总 D-异柠檬酸

按附录 D(标准的附录)测定。

6.7 总黄酮

按附录 E(标准的附录)测定。

7 果汁含量计算公式

橙、柑、桔汁及其饮料中果汁含量按式(1)计算:

$$y(\%) = \sum_{i=1}^6 \left(\frac{x_i}{X_i} \times R_i \right) \times 100 \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中: y ——果汁含量, %;

$x_{i(1\sim6)}$ ——样品中相应的钾、总磷、氨基酸态氮、L-脯氨酸、总 D-异柠檬酸、总黄酮含量的实测值, mg/kg;

$X_{i(1\sim6)}$ ——相应的钾、总磷、氨基酸态氮、L-脯氨酸、总 D-异柠檬酸、总黄酮的标准值, mg/kg;

$R_{i(1\sim6)}$ ——相应的钾、总磷、氨基酸态氮、L-脯氨酸、总 D-异柠檬酸、总黄酮的权值。

8 异常数据的修正原则

8.1 当 $\frac{x_i}{\bar{X}_5} > 1.25$ 时 ($i=1, 2, 3, 4, 6$), 须将大于 1.25 的组分项删除, 其权值按比例分配给剩余组分项; 修正后的果汁含量按式(2)计算:

$$y' = \frac{y'_1}{1 - \sum R_i} \dots\dots\dots (2)$$

式中: y' ——修正后的果汁含量, %;

y'_1 ——删除异常数据后果汁含量的计算值, %;

R_i ——被删除组分项的权值。

8.2 当 $\frac{x_5}{\bar{X}_5} > 1.25$ 时, 按 1.25 计算。

8.3 当 $\frac{x_i}{\bar{X}_5} (i=1, 2, 3, 4, 6) > \frac{x_5}{\bar{X}_5} \times 2$; 或 $\frac{x_i}{\bar{X}_5} (i=1, 2, 3, 4, 6) < \frac{x_5}{\bar{X}_5} \times 0.35$ 时, 须将其组分项删除, 相应的权值按比例分配给剩余组分项, 按式(2)计算果汁含量。

8.4 当同时修正 3 种组分时(总 D-异柠檬酸除外), 果汁含量按式(3)计算:

$$y'' = \frac{x_5}{\bar{X}_5} \times 100 \dots\dots\dots (3)$$

式中: y'' ——用总 D-异柠檬酸组分项计算出的果汁含量, %。

附录 A

(标准的附录)

钾的测定

A1 方法提要

钾的基态原子吸收钾空心阴极灯发射的共振线,吸收强度与钾的浓度成正比。将处理过的样品吸入原子吸收分光光度计的火焰原子化系统中,使钾离子原子化,在共振线 766.5 nm 处测定吸光度,与标准系列溶液比较,确定样品中钾的含量。添加适量钠盐,消除电离干扰。

A2 试剂

本试验方法中,所用试剂均为分析纯;实验用水应符合 GB 6682 中三级水规格。

A2.1 硝酸(GB626)。

A2.2 硫酸(GB 625)。

A2.3 10 g/L 氯化钠溶液:称取 1.0 g 氯化钠(GB 1266),用水溶解后定容至 100 mL。

A2.4 10 % (V/V) 硝酸溶液:量取 1 体积硝酸(A2.1),注入 9 体积水中。

A2.5 50 % (V/V) 盐酸溶液:量取 1 体积盐酸(GB 622),注入 1 体积水中。

A2.6 钾标准溶液:称取 0.9534 g 经 $150 \pm 3^\circ\text{C}$ 烘烤 2 h 的氯化钾(GB 646),精确至 0.0001 g。置于 50 mL 烧杯中。加水溶解,转移到 500 mL 容量瓶中。加 2 mL 盐酸溶液(A2.5),用水定容至刻度,摇匀。吸取 10.00 mL 于 100 mL 容量瓶中,用水定容至刻度,摇匀。此溶液钾的含量为 100 mg/L。

A3 仪器与设备

实验室常规仪器、设备及下列各项。

A3.1 原子吸收分光光度计:带钾空心阴极灯。

A3.2 空气压缩机或空气钢瓶气。

A3.3 乙炔钢瓶气。

A3.4 凯氏烧瓶:500 mL。

A3.5 天平:感量 10 mg。

A3.6 分析天平:感量 0.1 mg。

A4 试液的制备

称取一定量经混合均匀的样品(浓缩果汁 1.00~2.00 g;果汁 5.00~10.00 g;果汁饮料 20.0~50.0 g;水果饮料和果汁型碳酸饮料 50.0~100.0 g)于 500 mL 凯氏烧瓶中,加入 2~3 粒玻璃珠、10~15 mL 硝酸(A2.1)、5 mL 硫酸(A2.2)(称样量大于 20 g 的样品,须预先加热除去部分水分,待瓶中样液剩余约 20 g 时停止加热,冷却,再加硝酸、硫酸),浸泡约 2 h 或静置过夜。先用微火加热,待剧烈反应停止后,加大火力。溶液开始变为棕色时,立即滴加硝酸(A2.1),直至溶液透明,颜色不再变深为止。继续加热数分钟至浓白烟逸出,冷却,小心加入 20 mL 水,再加热至白烟逸出,冷却至室温。将溶液转移到 50 mL 容量瓶中,用水定容至刻度,摇匀,备用。

取相同量的硝酸、硫酸,按上述步骤做试剂空白消化液,备用。

A5 分析步骤

A5.1 工作曲线的绘制

吸取 0.00, 1.00, 2.00, 4.00, 6.00, 8.00, 10.00 mL 钾标准溶液(A2.6), 分别置于 50 mL 容量瓶中, 加 10 mL 硝酸溶液(A2.4)、2.0 mL 氯化钠溶液(A2.3), 用水定容至刻度, 摇匀, 配制成 0.0, 2.0, 4.0, 8.0, 12.0, 16.0, 20.0 mg/L 钾标准系列溶液。

依次将上述标准系列溶液吸入原子化系统中, 用 0.0 mg/L 钾标准溶液调整零点, 于波长 766.5 nm 处测定钾标准系列溶液的吸光度。以吸光度为纵坐标, 钾标准系列溶液的浓度为横坐标, 绘制工作曲线或计算回归方程。

A5.2 测定

吸取 5.0~20.0 mL 试液(A4)于 50 mL 容量瓶中, 加 10 mL 硝酸溶液(A2.4)、2.0 mL 氯化钠溶液(A2.3), 用水定容至刻度, 摇匀。将此溶液吸入原子化系统中, 用试剂空白溶液(A5.1)调整零点, 于波长 766.5 nm 处测吸光度, 在工作曲线上查出(或用回归方程计算出)试液中钾的含量(C_1)。

按上述步骤同时测定试剂空白消化液(A4.1)中钾的含量(C_{01})。

A6 分析结果的表述

样品中钾的含量按式(A1)计算:

$$x_1 = \frac{C_1 - C_{01}}{\frac{m_1}{50} \times \frac{V_1}{50}} = \frac{(C_1 - C_{01}) \times 2500}{m_1 \times V_1} \dots\dots\dots (A1)$$

式中: x_1 ——样品中钾的含量, mg/kg;

C_1 ——从工作曲线上查出(或用回归方程计算出)试液中钾的含量, mg/L;

C_{01} ——从工作曲线上查出(或用回归方程计算出)试剂空白消化液中钾的含量, mg/L;

V_1 ——测定时吸取试液的体积, mL;

m_1 ——样品的质量, g。

计算结果精确至小数点后第一位。

A7 允许差

同一样品的两次测定结果之差, 不得超过平均值的 5.0%。

附录 B

(标准的附录)

总磷的测定

B1 方法提要

样品经消化后, 在酸性条件下, 磷酸盐与钒-钼酸铵反应呈现黄色, 在波长 400 nm 处测定溶液的吸光度, 与标准系列溶液比较, 确定样品中总磷的含量。

B2 试剂

本试验方法中, 除特殊注明外, 所用试剂均为分析纯; 实验用水应符合 GB 6682 中三级水规格。

B2.1 硝酸(GB 626)。

B2.2 硫酸(GB 625)。

B2.3 10%(V/V)硫酸溶液: 量取 1 体积硫酸(B2.2), 缓慢注入 9 体积水中。

B2.4 钒-钼酸铵溶液: 称取 20.0 g 钼酸铵(GB 657), 溶解在约 400 mL 50℃ 热水中, 冷却。称取 1.0 g 偏钒酸铵(HG3—941), 溶解在 300 mL 50℃ 热水中, 冷却, 边搅拌, 边加入 1 mL 硫酸(B2.2)。将钼酸铵

溶液缓慢加到偏钒酸铵溶液中,搅拌均匀后转移到 1000 mL 容量瓶中,用水定容至刻度。

B2.5 磷标准溶液:称取 0.4394 g 经 $105 \pm 2^\circ\text{C}$ 烘烤 2 h 的磷酸二氢钾(GB 1274, 优级纯),精确至 0.0001 g。置于 50 mL 烧杯中。加水溶解,转移到 1000 mL 容量瓶中,用水定容至刻度,摇匀。此溶液磷的含量为 100 mg/L。

B3 仪器

实验室常规仪器、设备及下列各项。

B3.1 紫外分光光度计。

B3.2 凯氏烧瓶:500 mL。

B3.3 天平:感量 10 mg。

B3.4 分析天平:感量 0.1 mg。

B4 试液的制备

按本标准附录 A 中 A4 步骤操作。

B5 分析步骤

B5.1 工作曲线的绘制

吸取 0.00, 1.00, 2.00, 3.00, 4.00, 5.00 mL 磷标准溶液(B2.5), 分别置于 50 mL 容量瓶中, 加 10 mL 硫酸溶液(B2.3), 摇匀, 加 10 mL 钒-钼酸铵溶液(B2.4), 用水定容至刻度, 摇匀, 配制成 0.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0 mg/L 磷标准系列溶液。在室温下放置 10 min。用 1 cm 比色皿, 以 0.0 mg/L 磷标准溶液调整零点, 在波长 400 nm 处测定磷标准系列溶液的吸光度。以吸光度为纵坐标, 磷的含量为横坐标, 绘制工作曲线或计算回归方程。

B5.2 测定

吸取 5.0~10.0 mL 试液(B4)于 50 mL 容量瓶中, 加硫酸溶液(B2.3)补足至 10 mL, 以下步骤按 B5.1 操作。以试剂空白溶液调整零点, 在波长 400 nm 处测定吸光度。从工作曲线上查出(或用回归方程计算出)试液中磷的含量(C_2), 同时测定试剂空白消化液(A4)中磷的含量(C_{02})。

B6 分析结果的表述

样品中总磷的含量按式(B1)计算:

$$x_2 = \frac{C_2 - C_{02}}{\frac{m_2}{50} \times \frac{V_2}{50}} = \frac{(C_2 - C_{02}) \times 2500}{m_2 \times V_2} \dots\dots\dots (B1)$$

式中: x_2 ——样品中总磷的含量, mg/kg;

C_2 ——从工作曲线上查出(或用回归方程计算出)试液中磷的含量, mg/L;

C_{02} ——从工作曲线上查出(或用回归方程计算出)试剂空白消化液中磷的含量, mg/L;

V_2 ——测定时吸取试液的体积, mL;

m_2 ——样品的质量, g。

计算结果精确至小数点后第一位。

B7 允许差

同一样品的两次测定结果之差, 不得超过平均值的 5.0%。

附录 C

(标准的附录)

L-脯氨酸的测定

C1 方法提要

L-脯氨酸与水合茚三酮作用,生成黄红色络合物。用乙酸丁酯萃取后的络合物,在波长 509 nm 处测定吸光度,与标准系列溶液比较,确定样品中 L-脯氨酸的含量。

C2 试剂

本试验方法中,所用试剂均为分析纯;实验用水应符合 GB 6682 中三级水规格。

C2.1 乙酸丁酯(HG3—1466)。

C2.2 甲酸(HG3—1296)。

C2.3 无过氧化物乙二醇独甲醚的制备:将数粒锌粒放入乙二醇独甲醚(HG 10—1105)中,在避光暗处放置 2 d。

C2.4 3.0%茚三酮乙二醇独甲醚溶液:称取 3.0 g 水合茚三酮(进口分装或 HG 3—984),溶解在 100 mL 无过氧化物的乙二醇独甲醚溶液(C 2.3)中,贮存在棕色瓶内,置避光处。此溶液易被氧化,应每周制备一次。

C2.5 L-脯氨酸标准贮备溶液:称取 0.0500 g L-脯氨酸(生化试剂, $C_5H_9NO_2$, $[\alpha]_D^{20} = -83^\circ \sim -85^\circ$),精确至 0.0001 g,置于 50 mL 烧杯中,加水溶解,转移到 100 mL 棕色容量瓶中,用水定容至刻度,摇匀,贮存在约 4℃ 冰箱内。此溶液含 L-脯氨酸为 500 mg/L。

C3 仪器

实验室常规仪器、设备及下列各项。

C3.1 分光光度计。

C3.2 具塞试管:25 mL。

C3.3 离心机:转速不低于 4000 r/min,带 10 mL 具塞离心管。

C3.4 分析天平:感量 0.1 mg。

C3.5 天平:感量 10 mg。

C4 试液的制备

称取一定量混合均匀的样品(浓缩汁 1.00 g;果汁 5.00 g;果汁饮料、水果饮料和果汁型碳酸饮料 10.00~200.0 g)于 200 mL 容量瓶中,用水定容至刻度,摇匀,备用。

C5 分析步骤

C5.1 工作曲线的绘制

C5.1.1 显色

吸取 0.00, 0.50, 1.00, 2.50, 4.00, 5.00 mL L-脯氨酸贮备溶液(C2.5)于 50 mL 容量瓶中,用水定容至刻度,摇匀,配制成 0.0, 5.0, 10.0, 25.0, 40.0, 50.0 mg/L 的 L-脯氨酸标准系列溶液。

吸取上述标准系列溶液各 1.0 mL,分别置于 6 支 25 mL 具塞试管(C3.2)中,各加 1 mL 甲酸(C2.2),充分摇匀,加 2 mL 茚三酮乙二醇独甲醚溶液(C2.4),摇匀。将 6 支试管同时置于 1000 mL 烧杯的沸水浴中(电炉与烧杯间须垫石棉网,水浴液面须高于试管液面)。待烧杯中的水沸腾后,精确计时

15 min,同时取出 6 支试管,置于 20~22℃ 水浴中冷却 10 min。

C5.1.2 萃取、测定吸光度

在上述 6 支试管中各加 10.0 mL 乙酸丁酯(C2.1),盖塞,充分摇匀,使黄红色络合物萃取到乙酸丁酯液层中。静置数分钟,将试管中的乙酸丁酯溶液分别倒入 10 mL 具塞离心管中,盖塞。以 2500 r/min 转速,离心 5 min。

将上层清液小心倒入 1 cm 比色皿中,以试剂空白溶液调整零点,在波长 509 nm 处测定各上层清液的吸光度。以吸光度为纵坐标,L-脯氨酸的浓度为横坐标,绘制工作曲线或计算回归方程。

C5.2 试液的测定

吸取 1.0 mL 试液(C4)于 25 mL 具塞试管(C3.2)中,以下步骤按 C5.1 操作。从工作曲线上查出(或用回归方程计算出)试液中 L-脯氨酸的含量(C₄)。

C6 分析结果表述

样品中 L-脯氨酸的含量按式(C1)计算:

$$x_4 = \frac{C_4}{\frac{m_4}{200} \times 1.0} = \frac{C_4 \times 200}{m_4} \dots\dots\dots (C1)$$

式中: x_4 ——样品中 L-脯氨酸的含量,mg/kg;

C_4 ——从工作曲线上查出(或用回归方程计算出)试液中 L-脯氨酸的含量,mg/L;

m_4 ——样品的质量,g。

计算结果精确至小数点后第一位。

C7 允许差

同一样品的两次测定结果之差,不得超过平均值的 5.0%。

附录 D

(标准的附录)

总 D-异柠檬酸的测定

D1 方法提要

在异柠檬酸脱氢酶(ICDH)催化下,样品中的 D-异柠檬酸盐与烟酰胺-腺嘌呤-双核苷酸磷酸(NADP)作用,生成 NADPH 的量,相当于 D-异柠檬酸盐的量。在波长 340 nm 处测定吸光度,确定样品中总 D-异柠檬酸的含量。



D2 试剂

本试验方法中,所用试剂均为分析纯;实验用水应符合 GB 6682 中二级水规格。

D2.1 组合试剂盒(Cat No. 414433)

1 号瓶:内含咪唑缓冲液(稳定剂)30 mL,pH=7.1;

2 号瓶:内含 β-烟酰胺-腺嘌呤-双核苷酸-磷酸二钠 45 mg、硫酸锰 10 mg;

3 号瓶:内含异柠檬酸脱氢酶 2 mg,5(U)个活力单位。

D2.2 NADP 溶液:将 1 号瓶内的溶液升温至 20~25℃,倒入 2 号瓶中,使 2 号瓶的物质全部溶解,混合均匀。

- D2.3 异柠檬酸脱氢酶溶液:用 1.8 mL 水溶解 3 号瓶的物质,混合均匀。
- D2.4 4 mol/L 氢氧化钠溶液:称取 16 g 氢氧化钠(GB 629),加水溶解,定容至 100 mL。
- D2.5 4 mol/L 盐酸溶液:量取 33.4 mL 盐酸(GB 622),用水定容至 100 mL。
- D2.6 300 g/L 氯化钡溶液:称取 30 g 氯化钡(GB 652),溶解于热水中,冷却后定容至 100 mL。
- D2.7 71 g/L 硫酸钠溶液:称取 71 g 无水硫酸钠(HG3—123),溶解于水中,定容至 1000 mL。
- D2.8 缓冲溶液:称取 2.4 g 三羟甲基氨基甲烷和 0.035 g 乙二胺四乙酸二钠(GB 1401),用 80 mL 水溶解。先用 4 mol/L 的盐酸调整 pH=7.2 左右,再用 1 mol/L 盐酸溶液调整 pH=7.0(用酸度计测定),用水定容至 100 mL。
- D2.9 氨水(GB 637)。
- D2.10 丙酮(GB 686)。
- D2.11 洗涤溶液:量取 150 mL 水,加入 10 mL 氨水(D2.9)、100 mL 丙酮(D2.10),混匀。

D3 仪器与设备

实验室常规仪器、设备及下列各项:

- D3.1 紫外分光光度计:带石英比色皿,光程 1 cm。
- D3.2 酸度计:精度 0.1 pH 单位。
- D3.3 离心机:转速不低于 4000 r/min,离心管容积大于 80 mL。
- D3.4 微量可调移液管:
10~50 μ L,允许误差(%): ± 4.8 ;
0~1000 μ L,允许误差(%):100 μ L, ± 2.0 ;500 μ L, ± 1.0 ;1000 μ L, ± 1.0 。
- D3.5 玻璃棒或塑料棒:自制,直径约 3 mm,一端带钩。
- D3.6 分析天平:感量 0.1 mg
- D3.7 天平:感量 10,500 mg;1 g。

D4 试液的制备

- D4.1 果汁型碳酸饮料:称取 500 g 样品于 1000 mL 烧杯中,加热煮沸,在微沸状态下保持 5 min,并不断搅拌。待二氧化碳基本除净后冷却至室温,称量。用水补足至加热前的质量,备用。
- D4.2 浓缩果汁、果汁、果汁饮料、水果饮料:混匀后备用。

D5 分析步骤

D5.1 水解

按表 D1 规定的取样量称取试液。

浓缩汁、果汁:将试样称取在 50 mL 烧杯中,加 5 mL 氢氧化钠溶液(D2.4)。用玻璃棒搅拌均匀,在室温放置 10 min,使之水解。将溶液移入离心管(D3.3)中,用 5 mL 盐酸溶液(D2.5)和 10~20 mL 水,分数次洗涤烧杯,并入离心管中,使总体积约为 30 mL,搅拌均匀。

果汁饮料、水果饮料、果汁型碳酸饮料:将试液称取在离心管(D3.3)中,加 5 mL 氢氧化钠溶液(D2.4),用玻璃棒搅拌均匀,在室温放置 10 min,使之水解。加 5 mL 盐酸溶液(D2.5),搅拌均匀。

表 D1

样品名称	水解时取样量,g	比色测定时吸取量(V_2),mL
浓缩果汁	2.00	0.4~0.8
果汁	10.00	0.8~1.2
含 40%果汁的果汁饮料	20.00	1.5~2.0
含 20%果汁的果汁饮料	25.00	2.0
含 10%果汁的果汁饮料	40.0	2.0
含 5%果汁的水果饮料	60.0~80.0	2.0
含 2.5%果汁的果汁型碳酸饮料	100.0~150.0	2.0

D5.2 沉淀**D5.2.1 称样量小于或等于 25 g 的试液**

在盛有水解物的离心管(D5.1)中依次加入 2 mL 氨水(D2.9)、3 mL 氯化钡溶液(D2.6)、20 mL 丙酮(D2.10),用玻璃棒搅拌均匀。取出玻璃棒,按顺序摆放在棒架上。将离心管在室温(约 20℃)放置 10 min,以 3 000 r/min 转速,离心 5~10 min,小心倾去上层溶液,保留离心管底部沉淀物。

D5.2.2 称样量大于 25 g 的试液

按 D5.1 和 D5.2.1 的步骤分别制备 2~6 份沉淀物,然后用约 50 mL 洗涤溶液(D2.11)将 2 只(或 3 只、4 只、6 只,视称样量而定)离心管中的沉淀物合并到 1 只离心管中,在室温(约 20℃)放置 10 min。以下步骤按 D5.2.1 操作。

D5.3 溶解

将 D5.2 中取出的玻璃棒按顺序放回原离心管中,向离心管中加入 20 mL 硫酸钠溶液(D2.7)。将离心管置于微沸水浴中加热 10 min,同时用玻璃棒不断搅拌。趁热用缓冲溶液(D2.8)将离心管中的内容物转移至 50 mL 容量瓶中。冷却至室温(约 20℃)后用缓冲溶液(D2.8)定容至刻度,摇匀。

D5.4 将上述溶液用滤纸过滤,弃去最初滤液,保留滤液备用。

D5.5 测定**D5.5.1 测定条件**

波长:340 nm;温度:20~25℃;比色浓度:在 0.1~2.0 mL 试液中,含 D-异柠檬酸 3~100 μg 。

D5.5.2 测定步骤

按表 D2 规定的程序和溶液的加入量,用微量可调移液管(D3.4)依次将各种溶液加入比色皿中(微量可调移液管须用吸入溶液至少冲洗一次,再正式吸取溶液),立即用玻璃棒(D3.5)上下搅拌,使比色皿中的溶液充分混匀。

加异柠檬酸脱氢酶溶液后的最终体积为 3.05 mL。

表 D2

加入比色皿中的溶液	空白	样品
NADP 溶液(D2.2),mL	1.00	1.00
重蒸馏水,mL	2.00	$2.00 - V_2$
试样溶液(D5.4)(V_2),mL	—	V_2
混匀,约 3 min 后分别测定空白吸光度($E_{1\text{空白}}$)和样品吸光度($E_{1\text{样品}}$)。		
异柠檬酸脱氢酶溶液(D2.3),mL	0.05	0.05
混匀,约 10 min 达到反应终点,出现恒定的吸光度,分别记录空白吸光度($E_{2\text{空白}}$)和样品吸光度($E_{2\text{样品}}$)。如果 10 min 后未达到反应终点,每 2 min 测定一次吸光度,待吸光度恒定增加时,分别记录空白和样品开始恒定增加时的吸光度($E_{2\text{空白}}$ 和 $E_{2\text{样品}}$)。		

上述步骤完成后计算 ΔE ：

$$\Delta E = \Delta E_{\text{样品}} - \Delta E_{\text{空白}}$$
$$= (E_{2\text{样品}} - E_{1\text{样品}}) - (E_{2\text{空白}} - E_{1\text{空白}})$$

为得到精确的测定结果， ΔE 必须大于 0.100。如 ΔE 小于 0.100，应增加水解时的取样量或增加比色时的吸取量。

D5.5.3 异柠檬酸脱氢酶活力的判定方法

D5.5.3.1 D-异柠檬酸标准溶液

称取 $\frac{0.0153}{P}$ g、含有 2 个结晶水的 D-异柠檬酸三钠盐 ($C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$) 基准试剂，精确至 0.0001 g。置于 50 mL 烧杯中。加水溶解，转移到 100 mL 容量瓶中，用水定容至刻度，摇匀，贮存于冰箱中。此溶液含 D-异柠檬酸为 100 mg/L。

P 为 D-异柠檬酸基准试剂的纯度(百分含量)。0.0153 为系数，按下式计算得出：

$$\frac{294.1(C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O \text{ 的分子量}) \times 100(\text{稀释体积}) \times 0.1(D\text{-异柠檬酸的浓度})}{192.1(D\text{-异柠檬酸的分子量}) \times 1000} = 0.0153$$

D5.5.3.2 酶活力与标样吸潮的判定

表 D3

标准溶液的加入量,mL	酶溶液的加入量,mL	ΔE	判定
0.5	0.05	大于 0.5	正常
0.5	0.05	小于 0.5	酶失活或标样吸潮
0.5	0.10	大于 0.5	酶活力降低
0.5	0.10	小于 0.5	标样吸潮
1.0	0.05	大于 0.5	标样吸潮
1.0	0.05	小于 0.5	酶失活

若酶活力降低，应控制测定样品的 ΔE ，使之小于标样的 ΔE ，以保证测定样品中总 D-异柠檬酸反应完全。

D6 分析结果的表述

样品中总 D-异柠檬酸的含量按式(D1)计算：

$$x_5 = \frac{3.05 \times 192.1 \times V_5}{m_5 \times 6.3 \times 1 \times V_5'} \times \Delta E \dots\dots\dots (D1)$$

- 式中： x_5 ——样品中总 D-异柠檬酸的含量，mg/kg；
3.05——比色皿中溶液的最终体积，mL；
192.1——D-异柠檬酸的分子质量，g/mol；
 V_5 ——试液的定容体积，mL；
 V_5' ——比色测定时吸取滤液的体积，mL；
 m_5 ——样品的质量，g；
1——比色皿光程，cm；
6.3——反应产物 NADPH 在 340 nm 的吸光系数， $1 \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ 。

D7 允许差

同一样品的两次测定结果之差，果汁含量等于或大于 10% 的样品，不得超过平均值的 5.0%；果汁

含量 2.5%~10.0% 的样品,不得超过平均值的 10.0%。

附录 E

(标准的附录)

总黄酮的测定

E1 方法提要

橙、柑、桔中的黄酮类(橙皮甙、新橙皮甙等)与碱作用,开环生成 2,6-二羟基-4-环氧基苯丙酮和对甲氧基苯甲醛;在二甘醇环境中遇碱缩合生成黄色橙皮素查耳酮,其生成量相当于橙皮甙的量。在波长 420 nm 处比色测定吸光度,扣除本底后,与标准系列比较定量。

E2 试剂

本试验方法中,所用试剂均为分析纯;实验用水应符合 GB 6682 中三级水规格。

E2.1 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液:称取 4 g 氢氧化钠(GB 629),加水溶解,定容至 1000 mL。

E2.2 4mol/L 氢氧化钠溶液:称取 16 g 氢氧化钠(GB 629),加水溶解,定容至 100 mL。

E2.3 200 g/L 柠檬酸溶液:称取 20 g 柠檬酸(GB 9855),加水溶解,定容至 100 mL。

E2.4 90%(V/V)二甘醇溶液:量取 90 mL 一缩二乙二醇(又名二甘醇),加 10 mL 水,混匀,备用。

E2.5 试剂空白溶液:量取 20 mL 氢氧化钠溶液(E2.1)于 50 mL 烧杯中,用柠檬酸溶液(E2.3)调至 pH=6,转移到 100 mL 容量瓶中,用水定容至刻度,摇匀。

E2.6 橙皮甙标准溶液:称取 0.0250 g 橙皮甙[Hisperidin(由 Hesperetin 及 7-rhamnoglucoside 组成),分子式: $C_{28}H_{34}O_{15}$,分子量:610.6,橙皮甙含量约为 80%,本法以 80%计],精确至 0.0001 g,置于 50 mL 烧杯中,加 20 mL 氢氧化钠溶液(E2.1)溶解,用柠檬酸溶液(E2.3)调至 pH=6,转移到 100 mL 容量瓶中,用水定容至刻度,摇匀。溶液中橙皮甙的含量为 200 mg/L。此标准溶液需当日配制。

E3 仪器与设备

实验室常规仪器、设备及下列各项:

E3.1 紫外分光光度计。

E3.2 酸度计:精度 0.1 pH 单位。

E3.3 恒温水浴:温控 $\pm 1^{\circ}\text{C}$ 。

E3.4 具塞试管与试管架。

E3.5 分析天平:感量 0.1 mg。

E3.6 天平:感量 10 mg。

E4 试液的制备

称取一定量混合均匀的样品(浓缩汁 2.00~5.00 g;果汁 10.0 g;果汁饮料、水果饮料和果汁型碳酸饮料 50.0 g)于 100 mL 烧杯中,加入 10 mL 氢氧化钠溶液(E2.1),用氢氧化钠溶液(E2.2)调至 pH=12。静置 30 min 后,再用柠檬酸溶液(E2.3)调至 pH=6,转移到 100 mL 容量瓶中,加水定容至刻度,用滤纸过滤,收集澄清滤液,备用。

E5 分析步骤

E5.1 工作曲线的绘制

分别吸取 0.00, 1.00, 2.00, 3.00, 4.00, 5.00 mL 橙皮甙标准溶液(E2.6)于六支具塞试管(E3.4)

中,分别依次加入 5.00,4.00,3.00,2.00,1.00,0.00 mL 试剂空白溶液(E2.5),摇匀。再各加 5.0 mL 二甘醇溶液(E2.4)、0.1 mL 氢氧化钠溶液(E2.2),摇匀,配制成 0.0,20.0,40.0,60.0,80.0,100.0 mg/L 总黄酮标准系列溶液。

将上述试管置于 40°C 水浴(E3.3)中保温 10 min。取出,在冷水浴中冷却 5 min。用 1 cm 比色皿,以 0.0 mg/L 标准溶液调整零点,在波长 420 nm 处测定各溶液的吸光度。以吸光度为纵坐标,相应的总黄酮浓度为横坐标,绘制工作曲线或计算回归方程。

E5.2 测定

吸取 1~5 mL 试液(E4)于具塞试管中,用试剂空白溶液(E2.5),补加至 5 mL,加 5.0 mL 二甘醇溶液(E2.4),摇匀后加 0.1 mL 氢氧化钠溶液(E2.2),摇匀。同时吸取一份等量的试液(E4)按上述步骤不加氢氧化钠溶液(E2.2),作为空白调零。以下步骤按 E5.1 操作,测定试液吸光度,从工作曲线上查出(或用回归方程计算出)试液中总黄酮的含量(C_6)。

E6 分析结果的表述

样品中总黄酮的含量按式(E1)计算:

$$x_6 = \frac{C_6}{\frac{m_6}{100} \times \frac{V_6}{10}} = \frac{C_6 \times 1000}{m_6 \times V_6} \dots\dots\dots (E1)$$

式中: x_6 ——样品中总黄酮的含量,mg/kg;

C_6 ——在工作曲线上查出(或用回归方程计算出)的试液中总黄酮的含量,mg/L;

V_6 ——测定时吸取试液的体积,mL;

m_6 ——样品的质量,g。

E7 允许差

同一样品的两次测定结果之差,不得超过平均值的 5.0%。