

比色法测定明胶中的 L-羟脯氨酸

张笑¹, 刘杰²⁺, 陈翠岚²

(1 江苏省产品质量监督检验研究院 南京 210029;

2 昆山市流通领域食品质量检测中心 昆山 215300)

摘要: 本实验旨在建立明胶中 L-羟脯氨酸测定的方法。采用比色法对明胶中的 L-羟脯氨酸含量进行测定,结果表明,本方法的检出限为 0.26 g/100g,回收率为 92.59% ~ 101.25%,RSD 为 1.42%,可用于明胶中 L-HYP 含量的测定。

关键词: 明胶; 比色法; L-羟脯氨酸; 动物胶原水解蛋白

中图分类号: TS202.3 **文献标识码:** A **国家标准学科分类代码:** 550.2055

Determination of L-hydroxyproline in Gelatin by colorimetry method

Zhang xiao¹, Liu jie²⁺, Chen Cuilan²

(1 Jiangsu Institute for Quality Supervision and Inspection of Products, Nanjin 210029, China;

2 Circulating Food Quality Supervision and Inspection Center of Kunshan, kunshan 215300, China)

Abstract: This study aim at developing a method to detect L-hydroxyproline (L-HYP) in Gelatin. The L-hydroxyproline content in Gelatin was determined by colorimetry method in this study. The result shows that detection limit of this method is 0.26 g/100g; the recovery ratios and RSD are 92.59% ~ 101.25% and 1.42%, respectively. The method is suitable for the determination of L-HYP in Gelatin.

Key words: Gelatin; colorimetry method; L-hydroxyproline; animal protein hydrolysate

1 引言

明胶是动物胶原的水解产物,其中蛋白质的含量约占 82% 以上,明胶中几乎含有除色氨酸外所有组成蛋白质的氨基酸。同时,明胶因为其溶解性强、作用稳定、凝胶强度可变等优良特性^[1-2]使得它在食品领域的应用越来越广泛。

L-羟脯氨酸(L-HYP)是动物胶原水解蛋白的主要成分之一,其含量占胶原蛋白氨基酸总量的 10% 以上,被认为是胶原中的特征性氨基酸,其含量是衡量动物胶原水解蛋白含量的一个重要指标。动物胶原水解蛋白的含量是根据 L-羟

脯氨酸的含量乘以相应的系数而得到的^[3-4]。目前,L-羟脯氨酸的测定主要包括比色法^[5-6]、氨基酸分析仪法^[7-8]、HPLC 法^[9]和电泳法等,其中以比色法最为常用。我国于 1990 年将比色法定为《肉与肉制品 L(-)-羟脯氨酸含量测定》的国家标准方法,并且一直沿用至今。但到目前为止,国内外对明胶中 L-羟脯氨酸进行测定的报道不多,也未见国家标准方法出台。本文采用比色法对明胶中的 L-羟脯氨酸进行测定,在建立检测方法的同时,一方面旨在调查市售明胶中 L-羟脯氨酸的含量,另一方面希望能够为允许添加明胶而又有蛋白质指标要求的食品制定含氮量标准提供依据。

2 材料与amp;方法

2.1 材料与试剂

实验材料选取5种市售明胶产品。所用试剂均为分析纯,水为蒸馏水或同等纯度的水。主要包括以下试剂:

新蒸馏的苯酚;浓盐酸(GB 622)。盐酸溶液:1 mol/L。氢氧化钠(GB 629):1 mol/L、10 mol/L溶液。

缓冲溶液:将50 g柠檬酸,26.3 g氢氧化钠和146.1 g结晶乙酸钠(GB 694)溶于水,稀释至1 L,此溶液与200 mL水和300 mL正丙醇混合。

氯胺T(HG3-972)溶液:将1.41 g氯胺T,溶于10 mL水中,依次加入10 mL正丙醇和80 mL缓冲溶液,用时现配。

显色剂:称取10 g对二甲氨基苯甲醛,用35 mL高氯酸(GB 623)溶解,缓慢加入65 mL异丙醇。

L(-)-羟脯氨酸($C_5H_9NO_3$)标准溶液:标准储备液(1 mg/mL):准确称取0.1 g L-HYP标准品,加入1滴1 mol/L盐酸溶解,用水定容至100 mL容量瓶中(冰箱内可贮存6个月)。

标准工作液(10 μ g/mL):吸取标准储备液逐步用水稀释,用时现配。

氮气:纯度大于99.5%。

2.2 仪器

PE LAMBDA25 紫外可见分光光度计。

2.3 原理与方法

2.3.1 实验原理

明胶中的胶原蛋白经过浓酸水解,转变成游离的氨基酸。其中的羟脯氨酸经氯胺T氧化,生成含有吡咯环的氧化物。用高氯酸破坏过量的氯胺T后,羟脯氨酸氧化物与对二甲氨基苯甲醛反应生成红色化合物^[10],最后用紫外可见分光光度计在558 nm \pm 2 nm处测吸光值,通过与标准系列比较定量。

2.3.2 样品的前处理

称取0.3 g(精确至0.000 1 g)的样品于水解管中。在水解管内加入6 mL浓盐酸,再加入

1滴苯酚,边充氮气边封口,然后将水解管放在110 \pm 1 $^{\circ}$ C的恒温干燥箱内,水解6 h后,取出冷却。

2.3.3 标准曲线的绘制

吸取L(-)-羟脯氨酸标准工作液(10 μ g/mL) 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mL(0, 2, 4, 6, 8, 10 μ g),分别置于10 mL具塞试管或比色管中,加氯胺T溶液2 mL,摇匀后于室温放置20 min。再加入显色剂2 mL,用水定容至刻度,摇匀,塞上塞子于60 $^{\circ}$ C恒温水浴中保温20 min后取出,迅速冷却,在波长558 nm \pm 2 nm处测定吸光值,绘制标准曲线。

2.3.4 样品测定

打开水解管,用水将水解溶液转移至100 mL(V_1)容量瓶中并定容至刻度,混匀、过滤。取1 mL滤液于100 mL容量瓶中,分别用10 mol/L、1 mol/L氢氧化钠溶液调节pH为8 \pm 0.2后,定容至刻度,摇匀,备用。吸取1 mL(V_2)的过滤液于10 mL比色管中,按照2.3.3所述方法操作,加入氯胺T溶液2 mL,摇匀后于室温放置20 min。再加入显色剂2 mL,用水定容至刻度,摇匀,塞上塞子于60 $^{\circ}$ C恒温水浴中保温20 min后取出,迅速冷却,在波长558 nm \pm 2 nm处测定吸光值,与标准曲线比较定量。

2.3.5 结果计算

在标准曲线上查得样品的L-HYP含量,根据以下公式进行计算:

$$X = \frac{C \times 10^{-6}}{\frac{W}{V} \times V_2} \times 100 = \frac{C \times V_1 \times 10^{-2}}{W \times V_2}$$

式中: X 为样品中L(-)-羟脯氨酸的含量,%; C 为从标准曲线上查得相应的L(-)-羟脯氨酸量, μ g; W 为称取试样的质量,g; V_1 为水解后定容的体积,mL; V_2 为比色时吸取的溶液体积,mL。

3 结果与amp;讨论

3.1 标准曲线绘制

根据2.3.3的方法,制作标准曲线,得到线性回归方程为 $Y = 0.357 1X + 0.001 4$, $r = 1.000 0$ 。因此,吸光度和羟脯氨酸浓度之间有很好的相关性。

3.2 回收率

按 2.3 的试验方法,采用加标法测定回收率,结果如表 1。

回收率的范围在 92.59% ~ 101.25% 之间,表明方法具有很好的准确度。

3.3 精密度和检出限

3.3.1 精密度

按 2.3 的试验方法,对同一样品平行测定 10 次,测量结果如表 2。

计算得到相对标准偏差为 1.42%,表明方法具有良好的精密度。

3.3.2 检出限

在相同试验条件下,对样品的全试剂空白连续测定 20 次,再测定某已知浓度的标准溶液,得出方法检出限为 0.26 g/100g。以扣除空白后,吸光值为 0.01 所对应的浓度为检出限,即

检出限 = 0.01 × 标准溶液浓度 / (标准溶液吸光度 - 空白吸光度平均值),
测定结果见表 3。

3.4 样品测定结果

本实验所购 5 个市售样品的 L-HYP 含量测定结果如表 4 所示。

表 4 样品测定结果

Table 4 The detection result of 5 Gelatin samples

样品	测定值/%	各样品测定平均值/%
1	15.47	15.2
	14.86	
2	14.11	14.3
	14.51	
3	15.23	14.9
	14.47	
4	13.88	13.5
	13.12	
5	14.21	14.2
	14.26	

综上所述,从方法回收率、精密度、检出限的结果可以看出,本方法能够满足检测明胶产品中

表 1 回收率实验结果

Table 1 The results of recovery ratio

样品	样品测定值/mg	加标量/mg	加标样品测定值/mg	加标回收率
1	42.72	18.0	60.46	98.56%
2	42.85	18.0	60.10	95.83%
3	43.02	27.0	68.02	92.59%
4	43.39	27.0	70.56	100.63%
5	43.19	36.0	79.64	101.25%
6	43.46	36.0	78.12	96.28%

表 2 精密度试验结果

Table 2 The results of RSD

测量次数	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
测量值/%	14.21	14.21	14.52	14.24	14.60	14.75	14.54	14.26	14.68	14.22
RSD/%	1.42									

表 3 检出限试验结果

Table 3 The results of detection limit

试验次数	空白吸光度平均值(n=20)	标准溶液浓度(g/100g)	标准溶液吸光度(g/100g)	检出限(g/100g)	平均检出限(g/100g)
1	0.02	0.30	0.032	0.25	0.26
2	0.02	0.60	0.043	0.26	

L-HYP含量的需求。实验所购5个明胶样品中L-羟脯氨酸的含量在13.5~15.2%之间,含量相差较小。在制定允许添加明胶,而同时又有蛋白质指标要求的食品中的含氮量标准时,利用该方法测定明胶中的L-羟脯氨酸能够为其标准提供依据。

4 结 论

本实验建立的方法用于明胶中L-HYP的测定,与氨基酸自动分析仪、液相色谱仪方法相比,不需要衍生,简单有效,并且检测成本低。本方法的检出限为0.26 g/100g,回收率为92.59%~101.25%,RSD为1.42%,具有很好的准确度和精密性,可以用于明胶中的L-HYP含量的测定。

参考文献

- [1] 缪进康. 明胶及其在科技领域中的利用[J]. 明胶科学与技术, 2009, 29(1): 28-47.
MIAO J K. Gelatin and gelatin using in fields of technology[J]. The Science and Technology of Gelatin, 2009, 29(1): 28-47.
- [2] 利健霄. 明胶在酸奶制品中的应用[J]. 乳品加工, 2008, 9: 52.
LI J AI. The application of gelatin in the yogurt products[J]. Dairy Industry, 2008, 9: 52.
- [3] KOLODZIEJSKA I, SIKORSKI Z E, NIECIKOWSKA C. Parameters affecting the isolation of collagen from squid (*Illex argentinus*) skin [J]. Food Chemistry, 1999, 66: 153-157.
- [4] KAREN M E, ISABEL A, GRO-INGUNN H, et al. Collagen content in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.) and subsequent changes in solubility during storage on ice[J]. Food Chemistry, 1998, 62: 197-200.
- [5] 沈同, 王镜岩. 生物化学(上册)[M]. 高等教育出版社, 2004: 154-160.
SHEN T, WANG J Y. Biochemistry[M]. Higher education press, 2004: 154-160.
- [6] 国家技术监督局. GB/T 9695. 23—1990 肉与肉制品 L(-)羟脯氨酸含量测定[S].
National bureau of technical supervision. GB/T 9695. 23-1990 L-HYP detect of meat and meat product[S].
- [7] 孙玮, 潘峰, 袁发焕, 等. 血清游离羟脯氨酸的快速检测[J]. 分析测试学报, 2002, 21(3): 80-82.
SUN W, PAN F, YUAN F H, et al. Rapid determination of hydroxyproline in sera[J]. Journal of Instrumental Analysis, 2002, 21(3): 80-82.
- [8] 曾暖茜, 王洪健, 周兴起, 等. 氨基酸自动分析仪对乳制品中羟脯氨酸的测定方法研究[J]. 现代食品科技, 2008, 24(7): 719-721.
ZENG N Q, WANG H J, ZHOU X Q. Determination of hydroxyproline in dairy products by amino acid autoanalyzer[J]. Modern Food Science and Technology, 2008, 24(7): 719-721.
- [9] 唐志毅, 肖路延, 罗玲, 等. 一种新的高效液相色谱法选择性测定尿羟脯氨酸[J]. 中华医学检验杂志, 1999, 22(4): 210-212.
TANG ZH Y, XIAO L Y, LUO L, et al. A new method of HPLC in urine L-HYP determination[J]. Chinese Journal of Medical Laboratory Sciences, 1999, 22(4): 210-212.
- [10] 张俊杰, 曾庆孝. 比色法测定鱼鳞中羟脯氨酸的研究[J]. 食品科技, 2004, 4: 84.
ZHANG J J, ZENG Q X. Determination of hydroxyproline in fish scales[J]. Food Science and Technology, 2004, 4: 84.

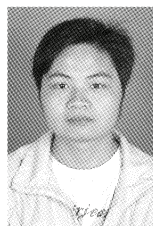
作者简介



张笑, 江苏省产品质量监督检验研究院高级工程师, 从事食品检验分析、检验研究工作二十余年。

E-mail: kaixindeseguo@163.com

Zhang Xiao, senior engineer of Jiangsu Institute for Quality Supervision and Inspection of Products, engaged in food quality supervision and inspection more than twenty years.



刘杰, 昆山市流通领域食品质量检测中心从事食品检验分析工作。

E-mail: liujianjut@163.com

Liu Jie, study at food quality supervision and inspection in Circulating Food Quality Supervision and Inspection Center of Kunshan.