

# 乳与乳制品中动物水解蛋白鉴定

## —L(-)-羟脯氨酸含量测定法

### 1 主题内容与适用范围

本方法规定了乳与乳制品中 L(-)-羟脯氨酸含量的测定方法。

本方法适用于乳与乳制品中 L(-)-羟脯氨酸含量的测定。

本方法通过对 L(-)-羟脯氨酸含量的测定，可判定是否为动物水解蛋白。

### 2 引用标准

GB9695.23-90 肉与肉制品 L(-) - 羟脯氨酸含量测定

### 3 原理

试样经酸水解,释放出羟脯氨酸。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。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,在波长 558nm 处进行比色测定。

### 4 试剂

所用试剂均为分析纯,水为蒸馏水或同等纯度的水。

#### 4.1 氯化亚锡(GB638):0.75%溶液。

将氯化亚锡 7.5g 溶于 500mL 水中,再加入 500ml 浓盐酸(GB 622)。

#### 4.2 盐酸(GB622):6mol/L 溶液。

#### 4.3 氢氧化钠(GB629);1mol/L、10mol/L 溶液。

4.4 缓冲液:将 50g 柠檬酸,26.3g 氢氧化钠和 146.1g 结晶乙酸钠(GB694)溶于水,稀至 1L,此溶液与 200mL 水和 300mL 正丙醇混合。

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

4.6 显色剂:称取 10g 对二甲氨基苯甲醛,用 35mL 高氯酸(GB623)溶解,缓慢加入 65mL 异丙醇。

#### 4.7 L(-)-羟脯氨酸(C<sub>5</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>3</sub>)标准溶液。

4.7.1 标准储备液 500 μg/mL:称取 50.0mg L(-)-羟脯氨酸用少量水溶解,加一滴 6mol/L 盐酸,定容至 100mL 容量瓶中。

4.7.2 标准工作液 5 μg/mL:吸取标准储备液 5.00mL 于 500mL 容量瓶中,定容。

### 5 仪器和设备

5.1 实验室常规设备。

5.2 配有冷凝管的三角瓶:250mL。

5.3 恒温水浴。

5.4 试管加热器或水浴,可控温于 60℃。

5.5 分光光度计。

6 试样处理:

6.1 方法 1: 准确称取样品 2-5g (液体样品 5-10g) 放入 250mL 磨口三角瓶中。加几粒沸石。加入氯化亚锡溶液 100mL,置于水浴上加热回流 16h。趁热将水解溶液过滤于 200mL 容量瓶中,用 6mol/L 热盐酸 10mL 反复三次冲洗三角瓶和滤纸,冷却,用水定容到刻度,混匀。吸取 5~25mL(V1)水解液于 100mL 烧杯中,用 10mol/L、1mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 为  $8 \pm 0.2$ ,过滤于 250mL 容量瓶中,用 30mL 水冲洗烧杯和滤纸上的氢氧化亚锡沉淀,反复三次,把洗液并入滤液中,以水洗至刻度,摇匀备用。

6.2 方法 2: 准确称取一定量样品,精确到 0.0001g。使样品蛋白质含量在 10~20mg 范围内; 将称好的样品放于水解管中。在水解管内加 6mol/L 盐酸 10~15mL (视样品蛋白质含量而定) 或加入 12mol/L 盐酸 10~15mL, 含水量高的样品 (如牛奶) 可加入等体积的浓盐酸, 加入新蒸馏的苯酚 (3.3) 3~4 滴, 再将水解管放入冷冻剂中, 冷冻 3~5min, 再接到真空泵的抽气管上, 抽真空 (接近 0 psi), 然后充入高纯氮气; 再抽真空充氮气, 重复三次后, 在充氮气状态下封口或拧紧螺丝盖将已封口的水解管放在  $110 \pm 1^\circ\text{C}$  的恒温干燥箱内, 水解 24h 后 (如加入 12mol/L 盐酸, 水解时间可缩短至 6h) 后, 取出冷却。

打开水解管, 趁热将水解溶液过滤于 100mL 三角瓶中,用 6mol/L 热盐酸 10mL 反复三次冲洗试管和滤纸,冷却,用水定容到刻度,混匀。吸取 5~25mL(V1) 水解液于 100mL 三角瓶中,用 10mol/L、1mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 为  $8 \pm 0.2$ , 过滤于 50mL 容量瓶中,用水冲洗烧杯和滤纸上的氢氧化亚锡沉淀,反复三次,把洗液并入滤液中,以水洗至刻度,摇匀备用。

7 分析步骤

7.1 测定

7.1 标准曲线的绘制

吸取 L(-)-羟脯氨酸标准工作液 0.00,10.00,20.00,30.00,40.00mL,分别置于 100mL 容量瓶中,定容摇匀。浓度分别为 0.0,0.5,1.0,1.5,2.0  $\mu$  g/mL。取不同浓度的上述溶液 4.00mL,分别加入 20mL 具塞试管中,加氯胺 T 溶液 2mL,摇匀后于室温放置 20min。加入显色剂 2mL,摇匀,塞上塞子于 60℃试管加热器(或恒温水浴)中保温 20min 后取出,迅速冷却,在波长 558 $\pm$ 2nm 处测定吸光值,绘制标准曲线。

## 7.2 试样测定

从待测液中吸取已制备好的样液 4.00mL 于 20mL 具塞试管中,以下按 7.1 步骤进行,同时作空白试验。

## 8 分析结果的计算

$$\text{计算公式: } X = \frac{C \cdot V_1 \cdot A}{m \times 1000} \times 100$$

式中:X——样品中 L(-)-羟脯氨酸的含量,%;

C——从标准曲线上查得相应的 L(-)-羟脯氨酸量, $\mu$  g;

m——称取试样的质量,g;

$V_1$ ——样液体积,mL。

A——稀释倍数

当符合允许差所规定的要求时,取两次测定结果的算术平均值作为结果,结果精确到 0.01%。

## 9 允许差

同一分析者同时或相继进行的两次测定结果之差不得超过平均值的 5%。

## 10 判定方法

因 L(-)-羟脯氨酸为胶原蛋白中的特有组分,其含量占 10%以上;而乳蛋白中不含有此成分,如若样品中含有 L(-)-羟脯氨酸,可判定添加了动物水解蛋白。