

ICS 67.040
X 04



中华人民共和国国家标准

GB/T 9695.23—2008/ISO 3496:1994
代替 GB/T 9695.23—1990

肉与肉制品 羟脯氨酸含量测定

Meat and meat products—Determination of hydroxyproline content

(ISO 3496:1994, IDT)

2008-08-28 发布

2009-03-01 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

GB/T 9695.23—2008/ISO 3496:1994

——为计算公式增加了编号。

本部分代替 GB/T 9695.23—1990《肉与肉制品 L(—)-羟脯氨酸含量测定》。

本部分与 GB/T 9695.23—1990 相比主要修改如下：

——按照 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》进行了结构调整和文字修改；

——用硫酸溶液代替氯化亚锡盐酸溶液水解样品；

——修改了氯胺 T 溶液和显色剂的配制；

——改动了试样前处理和测定操作；

——用第 10 章“精密度”及其内容代替第 9 章“允许差”及其内容；

——增加了“试验报告”一章。

本部分由全国肉禽蛋制品标准化技术委员会提出并归口。

本部分起草单位：中国商业联合会商业标准中心、国家加工食品质量监督检验中心(广州)、广州市产品质量监督检验所。

本部分主要起草人：郭新东、邓穗兴、罗海英、冼燕萍、杜志峰、吴玉銮、靳晓蕾。

本部分所代替标准的历次版本发布情况为：

——GB/T 9695.23—1990。

肉与肉制品 羟脯氨酸含量测定

1 范围

GB/T 9695 的本部分规定了肉与肉制品中羟脯氨酸的测定方法。

本部分适用于肉与肉制品中含量低于 0.5% (质量分数) 的羟脯氨酸的测定。

2 术语和定义

下列术语和定义适用于 GB/T 9695 的本部分。

2.1

肉与肉制品羟脯氨酸含量 hydroxyproline content of meat and meat products

在本部分规定的条件下测定的羟脯氨酸的含量。

羟脯氨酸含量用质量分数表示。

3 原理

用硫酸于 105 °C 水解试样, 过滤、稀释水解产物。羟脯氨酸经氯胺 T 氧化后, 与对二甲氨基苯甲醛反应生成红色化合物, 在波长 558 nm 处进行比色测定。

4 试剂

如无特别说明, 所用试剂均为分析纯。水为蒸馏水或去离子水, 或相同纯度的水。

4.1 硫酸溶液 [$c(\text{H}_2\text{SO}_4) \approx 3 \text{ mol/L}$]

量取 750 mL 水于 2 L 的容量瓶中, 在搅拌下缓慢加入 320 mL 浓硫酸 ($\rho_{20} = 1.84 \text{ g/mL}$)。冷却至室温后用水定容。

4.2 缓冲溶液 (pH=6.8)

包括下列组分:

- a) 26.0 g 一水柠檬酸 ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$);
- b) 14.0 g 氢氧化钠;
- c) 78.0 g 无水乙酸钠 [$\text{Na}(\text{CH}_3\text{CO}_2)$].

用 500 mL 水溶解上述试剂并转入 1 L 的容量瓶中, 加入 250 mL 正丙醇, 用水定容。

该溶液于 4 °C 暗处可稳定保存几周。

4.3 氯胺 T 溶液

称取 1.41 g 三水·N-氯-对甲苯磺酰胺钠盐 (氯胺 T), 用 100 mL 缓冲溶液 (4.2) 溶解。

临用前配制。

4.4 显色剂

称取 10.0 g 对二甲氨基苯甲醛, 用 35 mL 高氯酸溶液 [60% (质量分数)] 溶解, 缓慢加入 65 mL 异丙醇。临用前配制。

若对二甲氨基苯甲醛需纯化 (见 8.4 注), 可按如下操作: 用 70% (体积分数) 热乙醇配制对二甲氨基苯甲醛饱和溶液。依次在室温和冰箱中冷却, 12 h 后, 用布氏漏斗过滤。用少量 70% (体积分数) 乙醇洗涤布氏漏斗中的固体。将固体转移至三角瓶中, 用 70% (体积分数) 热乙醇重新溶解固体, 加入冷水充分搅拌, 至有大量乳白色晶体析出, 于冰箱中过夜。用布氏漏斗过滤固体, 用 50% (体积分数) 乙醇洗涤后, 在有五氧化二磷干燥剂的条件下进行真空干燥。

4.5 羟脯氨酸标准溶液

4.5.1 标准储备液

称取 50 mg 4-羟基- α -吡咯甲酸(羟脯氨酸)于 100 mL 容量瓶中,用水溶解,加一滴硫酸溶液(4.1),用水定容。该溶液于 4 °C 下可稳定存放 1 个月。

4.5.2 标准工作液

移取 5.00 mL 上述标准储备液至 500 mL 容量瓶中,用水定容。分别吸取该溶液 10.00 mL、20.00 mL、30.00 mL、40.00 mL 于 100 mL 容量瓶中,用水定容,所得标准工作液浓度依次为 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 、1.0 $\mu\text{g/mL}$ 、1.5 $\mu\text{g/mL}$ 、2.0 $\mu\text{g/mL}$ 。临用前配制。

5 仪器和设备

实验室常规仪器及下列仪器。

- 5.1 电动绞肉机:带水平刀片,能高速旋转。
- 5.2 圆底或平底烧瓶:容量约为 200 mL,宽颈。
- 5.3 干燥箱:可控温于 105 °C \pm 1 °C。
- 5.4 圆形滤纸:直径为 12.5 cm。
- 5.5 pH 计。
- 5.6 铝箔或不透明塑料薄膜。
- 5.7 水浴锅:可控温于 60 °C \pm 0.5 °C。
- 5.8 分光光度计:可用波长 558 nm \pm 2 nm;或使用光电比色计,其中干涉滤波器最大吸收波长为 558 nm \pm 2 nm。
- 5.9 比色皿:光程为 10 mm。
- 5.10 分析天平:可准确称重至 0.001 g。
- 5.11 容量瓶:250 mL。
- 5.12 表面皿:直径为 5 cm~6 cm。

6 取样

实验室所收到的样品应具有代表性且在运输和储藏过程中没受损或发生变化。

取样方法参见 GB/T 9695.19。

取有代表性的样品 200 g。

7 试样制备

7.1 肉及生肉制品

用刀将肉在冷冻时(0 °C 以下)切成小块(约 0.5 cm³,边长约为 8 mm)。

将切好的试样装入密封样品盒中,或用耐热塑料袋真空包装,70 °C 以上保温 30 min 后,冷却,按

7.2 继续操作。

在待测试样保存、制备、称重过程中,试样需混合均匀,特别是脂肪和液体要保持均匀。

注:加热软化结缔组织便于切割均匀,但可能导致胶质液体流出。为使测试样品均匀,应注意脂肪的均匀分布。

7.2 熟肉制品

用绞肉机(5.1)将试样均质。将试样装入密封的容器里,防止变质和成分变化。试样应在均质化后 24 h 内尽快分析。

8 分析步骤

8.1 试样

称取 4 g 试样(精确至 0.001 g)于烧瓶(5.2)中,避免试样粘在烧瓶壁上。

8.2 水解

8.2.1 量取 30 mL±1 mL 硫酸溶液(4.1),加入烧瓶中,用表面皿(5.12)盖住,于 105 °C 干燥箱内(5.3)恒温 16 h。

8.2.2 用圆形滤纸趁热将水解产物过滤至 250 mL 容量瓶(5.11)中。用 10 mL 硫酸溶液(4.1)分三次洗涤烧瓶和滤纸,合并至上述容量瓶中。用水定容,摇匀。

8.3 测定

8.3.1 用移液管移取一定体积(V)的水解产物(8.2.2)至 250 mL 容量瓶(5.11)中,定容后羟脯氨酸的浓度在 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之间。

注:移取体积取决于样品中结缔组织的含量。通常情况下,移取的水解产物体积(V)在 5 mL~25 mL 之间。

8.3.2 移取 4.00 mL 上述溶液(8.3.1)于比色管中,加入 2.00 mL 氯胺 T 试剂(4.3),混合后于室温下放置 20 min±1 min。

8.3.3 加入 2.00 mL 显色剂(4.4)于比色管中,充分混合,用铝箔或塑料薄膜(5.6)将比色管封口。

8.3.4 将比色管迅速放入 60 °C 水浴(5.7)中,加热 20 min。

8.3.5 取出比色管,用流动水冷却比色管至少 3 min,在室温下放置 30 min。

8.3.6 用水作参比,于 558 nm±2 nm 处用分光光度计或光电比色计(5.8)测定吸收值。

8.3.7 扣除空白溶液的吸收(8.4),从 8.5 所得标准曲线查得水解产物中羟脯氨酸的含量。

8.4 空白测试

用水代替稀释溶液,重复 8.3.2 至 8.3.7 的操作。

注:若空白溶液的吸收值超过 0.040,则需重新配制显色剂(4.4),如有必要,需纯化对二甲氨基苯甲醛液(见 4.4)。

8.5 标准曲线

8.5.1 用 4.00 mL 羟脯氨酸标准工作液(4.5)依次代替稀释后的水解产物,进行 8.3.2 至 8.3.7 的操作。

8.5.2 以扣除了空白的标准工作液的吸光度为纵坐标,以相应的浓度为横坐标,绘制标准曲线。

再次分析应重新绘制标准曲线。

9 计算

试样中羟脯氨酸的含量按式(1)计算:

$$X = \frac{6.25c}{m \times V} \dots\dots\dots(1)$$

式中:

X ——试样中羟脯氨酸的含量,%;

c ——由标准曲线得到的试样溶液中羟脯氨酸的浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g}/\text{mL}$);

m ——试样质量,单位为克(g);

V ——从 250 mL 容量瓶中吸取滤液的体积(见 8.3.1),单位为毫升(mL);

计算结果保留至小数点后两位。

10 精密度

方法的精密度是根据 ISO 5725 组织的联合实验室测试获得的。对于重复性限 r 和再现性限 R ,置信度均为 95%。

10.1 重复性

同一分析者在同一实验室、采用相同的方法和相同的仪器、在短时间间隔内对同一样品独立测定两

次。两次测试结果的绝对差值不超出由式(2)求得的重复性限 r ：

$$r = 0.0131 + 0.0322\bar{X} \quad \dots\dots\dots(2)$$

式中：

r ——重复性限，%；

\bar{X} ——两次测试结果的平均值，%。

如果两次测试结果的绝对差值超过重复性限值，舍弃这两个结果，重新测定两次。

10.2 再现性

不同的分析者采用相同的方法、在不同的实验室用不同的仪器、对同一样品独立测定两次。两次测试结果的绝对差值不超出由式(3)求得的再现性限 R ：

$$R = 0.0195 + 0.0529\bar{X} \quad \dots\dots\dots(3)$$

式中：

R ——再现性限，%；

\bar{X} ——两次测试结果的平均值，%。

11 试验报告

试验报告应说明：

——取样方法；

——所采用的方法；

——测试结果；

——如果检验了重复性，列出最终结果。

试验报告也应说明本部分未规定或未列为可选的所有操作，以及可能影响测试结果的其他因素。

试验报告还应包括所有与识别样品有关的必需信息。

参 考 文 献

- [1] GB/T 9695.19 肉与肉制品 取样方法
 - [2] GB/T 6379.1—2004 测量方法与结果的准确度(正确度和精密度) 第1部分:总则与定义 (ISO 5725-1:1994, Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results—Part 1; General principles and definitions, IDT)
 - [3] GB/T 6379.1—2004 测量方法与结果的准确度(正确度与精密度) 第2部分:确定标准测量方法重复性与再现性的基本方法 (ISO 5725-2:1994, Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results—Part 2; Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method, IDT)
-