

比色法测定酱油中羟脯氨酸含量的探讨

美析仪器

摘要: 文章采用比色法对酱油中羟脯氨酸含量测定进行了研究。结果表明,该方法能够有效地测定酱油中羟脯氨酸含量,加标回收率为 81.4%~91.2% (n=3),相对标准偏差为 2.3%~3.6% (n=3)。

关键词: 酱油;羟脯氨酸;比色法;美析仪器 www.macylab.com;UV-1500

酱油按生产工艺分为酿造酱油、配制酱油两大类;按食用方法分为烹饪酱油和餐桌酱油。酿造酱油是以大豆(或脱脂大豆)、小麦和(或)麸皮为原料,经过微生物发酵制成的具有特殊色、香味的液体调味品。配制酱油是以酿造酱油为主体(以全氮计不得少于 50%),与酸水解植物蛋白调味液、食品添加剂等配制而成的液体调味品。但是一些不法商人将动物皮水解液添加到酱油中,以增加酱油的鲜味。动物水解蛋白的特有成分为 L-羟脯氨酸和羟赖氨酸,且羟脯氨酸的含量较高,而大豆蛋白不含有此成分。利用这一特性就可进行动物水解蛋白质的鉴定。

1 材料、试剂与仪器

1.1 材料

市售酱油 5 种。

1.2 试剂

盐酸,氢氧化钠,柠檬酸,乙酸钠,正丙醇,氯胺 T,对二甲氨基苯甲醛,高氯酸,异丙醇,L(-)-羟脯氨酸等试剂,均为分析纯。

1.3 主要仪器

电子天平 JA21002;紫外可见分光光度计 UV-1500;电热恒温水浴锅。

2 实验方法^[1-4]

2.1 试剂配制

缓冲溶液: 将 50 g 柠檬酸、261.3 g 氢氧化钠和 146.1 g 结晶乙酸钠(GB 694)溶于水,至 1 L,此溶液与 200 mL 水和 300 mL 正丙醇混合。

氯胺 T 试剂: 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。

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

羟脯氨酸标准储备液 500 μg/mL: 准确称取羟脯氨酸标准品 50.0 mg,用少量水溶解于 100 mL 容量瓶中,加入一滴 6 mol/L 盐酸,定容至刻度。

羟脯氨酸标准工作液: 吸取 5 mL 羟脯氨酸标准储备液于 500 mL 容量瓶中,用蒸馏水稀释定容。

2.2 羟脯氨酸标准曲线的绘制 参照乳与乳制品中动物水解蛋白鉴定等有关资料,绘制羟脯氨酸标准曲线。准确吸取羟脯氨酸标准工作液 10.0, 20.0, 30.0, 40.0 mL, 分别用蒸馏水定容

至 100 mL。吸取不同浓度上述稀释好的溶液 5 mL 于具塞试管中,加入 2.00 mL 靛胺 T, 摇匀后在室温下放置 20 min, 加入 2.00 mL 显色剂, 摇匀后迅速将试管移至 60 e 的水浴锅中, 保温 20 min, 再用流动的自来水冷却试管至少 3 min, 室温下放置 30 min, 最后用紫外可见分光光度计在(558 ± 2 nm) 波长处测定吸光度, 绘制标准曲线。

2.1.3 酱油处理与羟脯氨酸的测定

吸取酱油 5 mL 于顶空瓶中, 加 12 mol/L 盐酸 5 mL, 然后充入高纯氮气; 在充氮气状态下拧紧螺丝盖, 将已封口的水解管放在 105 e 的恒温干燥箱内, 水解 12 h 后, 取出冷却。趁热将水解溶液转入 100 mL 容量瓶中, 并用蒸馏水定容至刻度, 混匀、过滤。吸取 5 mL 水解液于 100 mL 三角瓶中, 氢氧化钠溶液调节 pH 为(8 ? 0.2), 定容至 100 mL 容量瓶中, 摇匀备用。再按 2.2 中方法处理, 最后在波长(558 ? 2) nm 处比色。酱油中羟脯氨酸含量按下式计算:

$$X = \frac{C}{25} \quad (1)$$

式中: X 为酱油中 L(-)- 羟脯氨酸的含量, g/dL。

C 为从标准曲线上查得相应的 L(-)- 羟脯氨酸量, g/mL。

2.1.4 回收率测定

分别吸取酱油 5 mL, 各加入 0.01, 0.05, 0.10 g/dL 标准羟脯氨酸; 分别吸取蒸馏水 5 mL, 各加入 0.01, 0.02, 0.03, 0.04 g/dL 标准羟脯氨酸; 按上述样品前处理步骤进行实验, 测定羟脯氨酸含量, 按式(2)计算回收率。每一样品做 3 次平行试验, 并对结果进行误差分析。

$$\text{回收率}(\%) = (X - Y) @ 100/Z \quad (2)$$

式中: X 为加入羟脯氨酸后样品中羟脯氨酸的测定总量, g/dL;

Y 为样品中羟脯氨酸测定量, g/dL; Z 为加入标准羟脯氨酸量, g/dL。

表 1 羟脯氨酸标准样品浓度与吸光度的测定结果

羟脯氨酸标准工作液体积(mL)	羟脯氨酸浓度(Lg/mL)	吸光度(A)
0.0	0.0	0.000
10.0	0.5	0.110
20.0	1.0	0.210
30.0	1.5	0.310
40.0	2.0	0.401

3.1.2 方法的加标回收和精密度试验

取 6 个样品, 按 2.4 的方法分别测定, 计算回收率, 结果如表 2 所示。

表 2 样品中羟脯氨酸含量测定的加标回收率及精密度(n= 3)

标准加入量(g/dL)	本底值(g/dL)	测定值(g/dL)	回收率(%)	RSD(%)
0.01	未检出	0.00889	88.9	2.8
0.02	未检出	0.01667	83.4	2.3
0.03	未检出	0.00266	88.7	3.6
0.04	未检出	0.0344	86.0	3.0
0.01	0.00878	0.01794	91.2	3.1
0.05	0.00878	0.05063	83.6	3.5
0.10	0.00878	0.09421	81.4	3.4

由表 3 数据可看出, 样品回收率在 81.4% ~ 91.2% 之间, 平均回收率为 86.17%, 可基本满足羟脯氨酸含量测定的需要。

3.1.3 酱油中羟脯氨酸含量的测定

将吸取 5 mL 酱油, 按 2.3 的方法处理后, 测定吸光度并计算羟脯氨酸的含量, 结果如表 3 所示。

表 3 酱油中羟脯氨酸的含量

样品号	样品量(mL)	吸光度 A	浓度 C(Lg/mL)	羟脯氨酸(g/dL)
-----	---------	-------	-------------	------------

每一样品做 3 次平行试验, 并对结果进行误差分析。

TEL:400-616-4686