

分光光度法测定鱼皮中羟脯氨酸含量

郭恒斌¹, 曾庆祝², 闫磊¹, 王巍¹

(1. 大连水产学院食品工程系, 辽宁 大连 116023) (2. 广州大学食品工程系, 广东 广州 510006)

摘要: 采用分光光度法测定鱼皮(鱿鱼皮和狗鲑鱼皮)中的羟脯氨酸(Hyp)含量。结果表明: 两种鱼皮中羟脯氨酸的含量分别为0.823%和2.247%, 平均回收率分别为98.47%和98.39%, 变异系数分别为1.65%和0.64%。该法重复性好, 可信度高, 可作为判定鱼皮中胶原蛋白含量的一个定量指标。

关键词: 鱼皮; 羟脯氨酸; 分光光度法

中图分类号: TS254.7; **文献标识码:** A; **文章编号:** 1673-9078(2007)07-0081-03

Spectrophotometric Determination of Hydroxyproline Content in Fish Skins

GUO Heng-bin¹, ZENG Qing-zhu², YAN Lei¹, WANG Cui¹

(1. Department of Food Engineering, Dalian Fisheries University, Dalian 116023, China)

(2. Department of Food Engineering, Guangzhou University, Guangzhou 510006, China)

Abstract: The hydroxyproline (Hyp) content in two fish skins, squid skin and chum salmon skin, was determined by the spectrophotometric method and was shown to be 0.823% and 2.247%, respectively. The average recovery rates for the two skins were 98.47% and 98.39%, respectively, and the CV of Hyp from the two skins were 1.65% and 0.64%, respectively. This method can be used as a reliable method for the quantitative determination of the collagen in fish skins.

Key words: fish skin; hydroxyproline; spectrophotometric method

鱼皮中含有大量的蛋白质, 其中含量最多的为I型胶原蛋白, 最高可超过其蛋白质总量的80%, 较鱼体的其他部位要高许多, 有研究报道真鲷鱼皮中胶原蛋白含量占粗蛋白的80.5%, 鳗鲡则高达87.3%^[1]。胶原蛋白的氨基酸组成主要为脯氨酸、甘氨酸和丙氨酸。其中I型胶原蛋白中甘氨酸(Gly)占30%, 脯氨酸(Pro)和羟脯氨酸(Hyp)约占25%, 在一般动物蛋白质中的羟脯氨酸含量极低^[2]。目前, 胶原蛋白的含量是根据羟脯氨酸的含量再乘以相应的系数而得到的^[3-4]。测定羟脯氨酸的方法有多种, 包括分光光度法、氨基酸分析仪法、HPLC法和电泳法等, 其中以分光光度法最为常用, 如测定动物组织、猪肉、胶原海绵和鱼鳞中羟脯氨酸的含量^[5-8]。为了准确地评价鱼皮中羟脯氨酸及胶原蛋白的含量, 本文探索了采用分光光度法测定鱼皮中羟脯氨酸含量的可行性和准确性, 以便于鱼皮中胶原蛋白的进一步开发和利用。

收稿日期: 2007-04-13

基金项目: 大连市优秀青年基金项目(2005J22JH049)

作者简介: 郭恒斌(1981-), 男, 在读硕士研究生, 研究方向为水产品质量与安全控制; 通讯作者: 曾庆祝(1965-), 男, 教授

1 材料与方法

1.1 原理^[9]

鱼皮通过盐酸水解释放出单体羟脯氨酸, 氯胺T将羟脯氨酸氧化形成结构类似吡咯的氧化物, 并使这种氧化产物与显色剂(对二甲氨基苯甲醛)缩合而生成红色的产物, 进行比色测定。

1.2 材料

鱿鱼皮(大连金山水产有限公司), 狗鲑鱼皮(大连新港水产加工厂)。将鱼皮残余的鱼肉去除, 用剪刀剪成小片(1×1 cm²), 用自来水反复清洗后放入PE食品保险袋中于-20℃下冻藏备用。

1.3 仪器

电热恒温鼓风干燥箱、BP221S(赛多利斯)电子天平、721分光光度计、HWS26型电子恒温水浴锅等。

1.4 试剂及配制

6 mol/L 盐酸, 0.01 mol/L 盐酸, 0.1 mol/L NaOH 溶液。

柠檬酸缓冲液: 柠檬酸钠 120 g, 冰醋酸 12 mL, 柠檬酸 46 g, 氢氧化钠 34 g 溶解于蒸馏水中, 定容至

1000 mL, 临用时调整 pH=6.0。

0.05 mol/L 氯胺 T 溶液: 称取氯胺 T 7.05 g, 溶解于 100 mL 蒸馏水中, 然后加入乙二醇独甲醚 150 mL, 再加入 250 mL 柠檬酸缓冲液混合均匀。

对二甲基氨基苯甲醛试剂: 取无水乙醇 20 mL 慢慢加入浓硫酸 2.74 mL 作为 A 液; 取对二甲基氨基苯甲醛 12.0 g, 缓慢加入无水乙醇 40 mL, 水浴加热使其完全溶解并冷却至室温, 作为 B 液。然后将 A 液慢慢加入 B, 混合均匀。

3.5 mol/L 高氯酸溶液: 取 27 mL 高氯酸, 以蒸馏水定容到 100 mL。

羟脯氨酸标准储存液: 准确称取 L-羟脯氨酸标准品 100 mg, 加入 0.01 mol/L 盐酸中溶解, 稀释并定容到 100 mL, 在冰箱中保存。

羟脯氨酸标准工作液: 吸取羟脯氨酸标准储存液 10 mL 到 100 mL 容量瓶中, 蒸馏水定容(临用前配制), 质量浓度为 100 mg/L。

1.5 样品处理

准确称取经解冻晾干的鱼皮 1 g (精确至 0.001 g) 于碘量瓶中, 样品不得粘附碘量瓶内壁, 加入 6 mol/L 的盐酸 50 mL。于 120~130 °C 下水解 8 h。水解完成后将水解物用蒸馏水定容至 100 mL, 用滤纸过滤, 收集滤液于锥形瓶中, 加入活性炭以去除色素, 再过滤, 取滤液 1 mL, 用 0.1 mol/L NaOH 调节 pH=6.5~7.0, 定容到 50 mL 备用。

1.6 羟脯氨酸标准曲线的绘制

准确吸取羟脯氨酸标准工作液 1.0 mL, 2.0 mL, 2.5 mL, 3.0 mL, 3.5 mL, 4.0 mL, 4.5 mL 分别用蒸馏水定容到 100 mL。取上述标准液 1 mL 于试管中, 分别加入 1 mL 柠檬酸缓冲液和 1 mL 0.05 mol/L 氯胺 T 溶液, 室温 (25 °C) 氧化 10 min 后, 加入高氯酸 1 mL, 放置 10 min, 最后加入对二甲基氨基苯甲醛显色试剂 1 mL, 在 65 °C 水浴显色 10 min, 冷却后在 560 nm 处测吸光度 (蒸馏水为空白对照)。以羟脯氨酸质量浓度为横坐标, 吸光度为纵坐标绘制标准曲线, 求出回归方程。

1.7 回收率的测定

取鲑鱼皮和狗鲑鱼皮, 按 1.5 的方法处理, 分别测定其羟脯氨酸含量, 再在各样品中分别加入标准羟脯氨酸, 进行测定, 按下式计算回收率。每一样品做 3 次平行试验。

$$\text{回收率}/\% = \frac{X - Y}{Z}$$

式中: X-加入羟脯氨酸后样品中测定出的羟脯氨酸总量

(g); Y-样品中羟脯氨酸测定量 (g); Z-加入标准羟脯氨酸量 (g)

2 结果与讨论

2.1 羟脯氨酸标准曲线的测定

按照 1.6 的方法, 测定羟脯氨酸的标准曲线, 羟脯氨酸标准样品的质量浓度和吸光度值如表 1 所示:

表 1 羟脯氨酸标准样品质量浓度和吸光度对照表

Hyp 浓度/($\mu\text{g/mL}$)	0	1	2	2.5
吸光度 (A)	0	0.085	0.156	0.192
Hyp 浓度/($\mu\text{g/mL}$)	3	3.5	4	4.5
吸光度 (A)	0.232	0.268	0.304	0.349

根据测定的数值, 以羟脯氨酸质量浓度为横坐标, 吸光度值为纵坐标绘制标准曲线 (见图 1 所示), 并计算出回归方程为: $y=0.076x+0.0034$, 羟脯氨酸浓度与吸光度之间的线性相关系数 $r=0.9996$ ($p<0.001$), 显示出羟脯氨酸浓度与吸光度之间良好的线性相关关系。

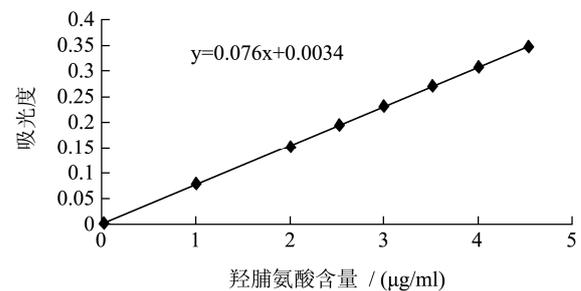


图 1 标准曲线

2.2 鱼皮中羟脯氨酸含量的测定

将原料鱼皮按 1.5 的方法处理后, 测定吸光度并计算 Hyp 的含量, 每次测定取 3 个平行实验数据, 结果如表 2 所示。样品中羟脯氨酸含量按下式计算:

$$W/\% = \frac{h \times 10^{-6}}{\frac{m}{100} \times \frac{v}{50}}$$

式中: W-样品中羟脯氨酸的含量 (%); h-标准曲线上相对应的羟脯氨酸的含量 ($\mu\text{g/mL}$); m-样品的质量 (g); v-稀释至 50 mL 时所取滤液的体积 (mL)。

由表 2 可知, 鲑鱼皮和狗鲑鱼皮中羟脯氨酸的百分含量分别为 0.823% 和 2.247%。由于羟脯氨酸含量与胶原蛋白的含量是呈正相关的, 将测定的羟脯氨酸含量乘以相应的系数即可得出胶原蛋白的含量, 所以羟脯氨酸的含量可以反应出鱼皮中胶原蛋白的含量。

表2 鱼皮中羟脯氨酸的含量

Table 2 The contents of Hyp in fish skin

样品	鱿鱼皮	狗鲑鱼皮
A (吸光度)	0.1285±0.003	0.3450±0.02
ρ /($\mu\text{g}/\text{ml}$)	1.646±0.04	4.495±0.01
C/(g/g)	0.00823±0.04	0.02247±0.01

2.3 测定方法的准确度和精密度分析

表3 回收率试验

Table 3 The recovery rate test of measurement method

样品	样品质量/g	样品 Hyp 质量/g	加入 Hyp 质量/g	检出量/g	回收率/%
鱿鱼皮	1.0008	0.00819	0.0031	0.0112	97.10
	1.0012	0.00832	0.0031	0.0114	99.35
	1.0019	0.00844	0.0031	0.0116	101.94
	0.9991	0.00794	0.0031	0.0109	95.48
狗鲑鱼皮	1.0018	0.0239	0.0031	0.0271	103.22
	1.0011	0.0226	0.0031	0.0257	100.00
	0.9993	0.0214	0.0031	0.0243	93.55
	1.0006	0.0220	0.0031	0.0250	96.77

表4 稳定性试验

Table 4 The stability test of measurement method

样品	试验号	吸光度 A	Hyp 浓度/(g/mL)	标准偏差	变异系数/%
鱿鱼皮	1	0.127	1.626	0.027	1.65
	2	0.125	1.600		
	3	0.128	1.639		
	4	0.130	1.666		
	平均值	0.1275	1.633		
狗鲑鱼皮	1	0.340	4.429	0.028	0.64
	2	0.338	4.403		
	3	0.337	4.389		
	4	0.335	4.363		
	平均值	0.3375	4.396		

为了确定方法的准确性,用羟脯氨酸标准样品和两种鱼皮(每种取四个样品),按 1.6 的方法分别测定,计算回收率,结果如表 3 所示。由表 3 可知,鱿鱼皮

样品回收率在 95.48%~101.94%之间,平均回收率为 98.47%;狗鲑鱼皮样品回收率在 93.55%~103.22%之间,平均回收率为 98.39%。另外,根据表 4 可以看出,对鱿鱼皮和狗鲑鱼皮分别经过 4 次平行测定,计算其标准偏差分别为 0.027 和 0.028,变异系数分别为 1.65%和 0.64%。可以看出,此方法测定鱼皮中羟脯氨酸含量具有较高的准确度和精密度。

3 结论

采用分光光度法测定鱼皮中羟脯氨酸含量快速、简便,并具有较高的准确度和精密度,可作为判定鱼皮中羟脯氨酸及胶原蛋白含量的一个定量指标。

参考文献

- [1] 鸿巢章二,桥本周久.水产利用化学[M].北京:中国农业出版社,1994
- [2] 陈胜军,曾名勇,董士远.水产胶原蛋白及其活性肽的研究进展[J].水产科学,2004,23(6):44-46
- [3] 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
- [4] Kolodziejaska I, Sikorski Z E, Niecikowska C Parameters affecting the isolation of collagen from squid (*Illex argentinus*) skin [J]. Food Chemistry, 1999, 66, 153-157
- [5] 冯志民,徐衡,马旺扣.动物组织中羟脯氨酸测定方法的建立及初步应用[J].南京铁道医学院学报,1999,18(3):168-170
- [6] 曾勇庆,王慧.猪肉中羟脯氨酸的分光光度法测定[J].山东农业大学学报,2000,31(1):79-81
- [7] 关静,叶萍,武继民.胶原海绵的羟脯氨酸含量测定[J].氨基酸和生物资源, 2000, 22(1):52-54
- [8] 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,2004,4:83-85
- [9] Bergman I, Loxley R Two improved and simplified method for the spectrophotometric determination of hydroxyproline [J]. Analytical chem., 1963,35:1961

如何识别茶叶的质量

色,新茶外观干硬疏松,色泽新鲜,一般呈嫩绿色。陈旧的茶叶则紧缩暗软;香,质量好的茶叶,一般都香味纯正,沁人心脾;味,新茶汤色澄清而香气足,陈茶则汤色变褐、香味差;形,质量好的茶叶外形应均匀一致,所含碎茶和杂质少。