

分光光度法测定畜禽骨素中胶原蛋白含量

董宪兵, 李侠, 张春晖, 孙红梅, 李银

(中国农业科学院农产品加工研究所/农业部农产品加工重点实验室, 北京 100193)

摘要: 本文提供了一种快速、简单、准确、成本低的畜禽骨素中胶原蛋白含量的测定方法。通过热法和酸法提取畜禽骨中胶原蛋白, 计算其中胶原蛋白与羟脯氨酸含量的比值, 得到不同原料骨的胶原蛋白换算系数: 猪骨为 6.12~6.17, 牛骨为 6.77, 鸡骨为 6.27~6.30, 羊骨为 6.34~6.35, 结果表明水溶性和酸溶性的胶原蛋白换算系数差异不显著 ($P>0.05$)。根据骨素生产实际情况, 选用水溶性胶原蛋白换算系数作为骨素中胶原蛋白测定的换算系数, 用分光光度法测定热提骨素中羟脯氨酸含量, 乘以对应的胶原蛋白换算系数, 得到猪骨素、牛骨素和鸡骨素中胶原蛋白含量分别为 9.19%、7.92%、9.78%。该方法测定骨素中胶原蛋白含量的相对标准偏差在 0.01~0.03% 之间, 变异系数在 0.44~2.26% 之间, 平均回收率在 99.36~100.44% 之间, 说明分光光度法适用于骨素中胶原蛋白含量的测定。

关键词: 分光光度法; 畜禽骨素; 胶原蛋白换算系数; 羟脯氨酸; 胶原蛋白

文章编号: 1673-9078(2013)10-2538-2541

Determination of Collagen Content in Livestock and Poultry Ossein by Spectrophotometry

DONG Xian-bing, LI Xia, ZHANG Chun-hui, SUN Hong-mei, LI Yin

(Institute of Agro-Products Processing Science and Technology, Chinese Academy of Agricultural Science/Key Laboratory of Agricultural Product Processing, Ministry of Agriculture, Beijing 100193, China)

Abstract: The paper provided a rapid, simple, accurate and low cost method to determine collagen content in ossein. Collagens from livestock and poultry bone were extracted by acid and thermal processes, and then calculated the ratio of collagen protein and hydroxyproline content in order to obtain collagen conversion factors from different bones. However the results indicated that fewer differences of collagen conversion factors between water-soluble and acid soluble collagen could be seen. According to the actual production, water-soluble collagen was taken as the conversion factor in ossein. The hydroxyproline in ossein was measured by spectrophotometry and then the collagen contents of pig, bovine and chicken ossein were calculated as 9.19%, 7.92% and 9.78%, respectively. The relative standard deviation (RSD) was between 0.01% and 0.03% and coefficient variation (CV) changed from 0.44% to 2.26%. The average recovery rate ranged from 99.36% to 100.44%. In conclusion, the method was appropriate to detect of collagen content in livestock and poultry ossein.

Key words: spectrophotometry; livestock and poultry ossein; collagen conversion factor; hydroxy proline, collagen

我国畜禽骨资源丰富, 年产 1200 多万 t 畜禽骨。畜禽骨中含有大量的骨胶蛋白、矿物质、粘多糖、生长素等营养物质^[1-2], 但是长期由于技术水平的限制被浪费掉或经过简单加工成附加值很低的产品。近年来, 畜禽骨经抽提、浓缩、调和制备成骨素实现了畜禽骨的精深加工和高值化利用, 骨素因其“天然、绿色、健康”的特性, 广受消费者好评。

收稿日期: 2013-06-19

基金项目: 农业部 948 项目 (2011G8), 国家科技合作与交流专项 (010S2012ZR0302), 中央级院所创新项目 (2012EG134238), 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (2012ZL034)

作者简介: 董宪兵 (1986-), 男, 硕士, 研究方向: 农产品废弃物资源化

通讯作者: 张春晖 (1971-), 男, 博士, 教授级高工, 研究方向: 肉品科学

骨素中胶原蛋白含量是骨素品质的主要评定指标, 但是目前骨素生产企业没有一套完善可行的胶原蛋白含量测定方法, 仅仅用粗蛋白含量来表征胶原蛋白含量, 可能会出现掺假行为, 加大了骨素质量控制的难度, 所以目前急需一种简单、方便、准确、成本低、周期短的方法来测定骨素中胶原蛋白含量。目前文献报道中胶原蛋白含量的测定主要是离子色谱法^[3]、高效液相色谱法^[4]、毛细血管电泳法^[5]和分光光度法^[6-7]等。由于分光光度法成本低, 操作简单在测定胶原蛋白时用得较多, 分光光度法测定胶原蛋白主要通过测定胶原蛋白中羟脯氨酸含量再乘以胶原蛋白换算系数而得到, 由于羟脯氨酸 (HYP) 是胶原蛋白的特异性氨基酸, 含量稳定 (占总氨基酸的 12~14%)。

但是胶原蛋白换算系数在不同物种、部位存在差异,目前没有一个规范的数值,对胶原蛋白换算系数引用混乱。Etherington^[8]对陆生动物胶原蛋白换算系数常用7.1,水生动物多采用11.1,但Kittiphattanabawon^[9]在研究大眼鲷鱼皮时用7.7作为换算系数,Neuman^[10]用7.46作为哺乳动物和鸟类的换算系数,施辉阳在研究猪皮胶原蛋白测定时用10.0作为换算系数^[11],王信苏测定出草鱼鱼鳞胶原蛋白换算系数为14.9^[12],关于畜禽骨胶原蛋白换算系数也没有相关的研究报道。本文通过提取骨素生产中常用畜禽骨胶原蛋白,测定不同原料骨胶原蛋白换算系数,系统的研究了骨素中胶原蛋白含量的测定方法,为骨素生产企业提供切实可行、操作简单、成本低、周期短的骨素中胶原蛋白含量测定方法。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

T6 紫外分光光度计,北京普希通用仪器有限公司;LDZX-50KBS 立式蒸汽灭菌锅,上海申安医疗器械厂;BCD-2182M2D 美菱冰箱,合肥美菱股份有限公司;PG-150 破骨机,廊坊市顶天轻工机械有限公司;Neofuge-15R 高速冷冻离心机,上海力申科学仪器有限公司;DH6-90385-III 电热恒温鼓风干燥箱,上海新苗医疗器械制造有限公司;PG-150 破骨机,廊坊市顶天轻工机械有限公司。

猪腿骨、牛腿骨、羊腿骨、鸡骨均购于北京超市发超市;猪骨素、牛骨素、鸡骨素购于河南大用普乐泰生物科技有限公司;羟脯氨酸标准品、对二氨基苯甲醛、无水乙酸钠、氯胺 T、丁醇、乙酸等(国药集团化学试剂有限公司)。

1.2 HYP 标准曲线绘制

缓冲溶液、显色剂、氯胺 T、标准储备液等溶液配制参照 GB/T 9695.23-2008 的方法^[3]。准确移取 5.00 mL 标准储备液至 500 mL 容量瓶中,蒸馏水定容后分别吸取该溶液 10 mL、20 mL、30 mL、40 mL、50 mL 于 100 mL 容量瓶中,用水定容分别得到浓度为 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 、1.0 $\mu\text{g/mL}$ 、1.5 $\mu\text{g/mL}$ 、2.0 $\mu\text{g/mL}$ 、2.5 $\mu\text{g/mL}$ 的 HYP 标准溶液。分别取 4 mL 标准溶液于比色管中,同时用蒸馏水代替 HYP 溶液做空白,加入 2 mL 氯胺 T,混合于室温下放置 20 min,再加入 2 mL 显色剂于比色管中,充分混合封口后放入 60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中加热 20 min,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,用水作参比于 558 nm 处用紫

外分光光度计测定吸光值。以得到标准溶液吸光值扣除空白的吸光值为纵坐标,以相应的浓度为横坐标,绘制标准曲线。

1.3 胶原蛋白提取

用破骨机将猪腿骨、牛腿骨、羊腿骨、鸡骨充分破碎后取 100 g 用蒸馏水冲洗干净除去杂质和血水后分别装入 2 L 烧杯中。分别加入 1 L, 10% 正丁醇溶液于 4 $^{\circ}\text{C}$ 浸泡 2 d 以除去脂肪,每天换一次丁醇溶液。过滤后骨渣用蒸馏水反复冲洗,充分沥干后用 1 L, 0.1 mol/L NaOH 溶液于 4 $^{\circ}\text{C}$ 浸泡 1 d,每 2 h 搅拌一次以除去非胶原蛋白及防止内源性蛋白酶对胶原蛋白的影响。过滤、洗净、沥干后加入 1 L, 0.5 mol/L EDTA 溶液(pH 7.4) 4 $^{\circ}\text{C}$ 浸泡 5 d,每天换一次 EDTA 溶液以起脱钙的作用。过滤、洗净、沥干提取胶原蛋白,胶原蛋白提取分别用热提取和酸提取。热提取:取 50 g 骨渣加入 100 mL 蒸馏水于高压灭菌锅中 100 $^{\circ}\text{C}$ 提取 1.5 h 得到骨胶原蛋白原液。酸提取参照 Nagai^[14]的方法:50 g 骨渣加入 100 mL、0.5 mol/L 的乙酸溶液并于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下浸泡 3 d,经 4 $^{\circ}\text{C}$ 、20,000 \times g 离心 30 min 后上清液即为粗胶原蛋白。

1.4 胶原蛋白和 HYP 含量测定

1.4.1 胶原蛋白含量测定

骨胶原蛋白原液和粗胶原蛋白中胶原蛋白含量用凯氏定氮法测定,蛋白换算系数为 6.25。

1.4.2 HYP 含量测定

准确称取 2 g 左右的各种骨胶原蛋白原液和粗胶原蛋白于厌氧管中,加入 20 mL, 3 mol/L 硫酸并于 105 $^{\circ}\text{C}$ 干燥箱中恒温 16 h,消化完后水解产物过滤至 100 mL 的容量瓶,厌氧管用 5 mL, 3 mol/L 硫酸冲洗并一起定容,移取体积 V (5 mL~15 mL) 的水解产物于 100 mL 量瓶中定容。取 4 mL 定容后的溶液代替标准 HYP 溶液按照 1.2 中步骤处理后在波长 558 nm 处测定吸光值 (A_{558}),用相应的吸光值从标准曲线上查得对应的 HYP 含量。试样中 HYP 含量按下式计算:

$$X(\%) = \frac{c}{mV} \quad (1)$$

注: X-样品中 HYP 含量(%); c-标准曲线上相对应的 HYP 的含量($\mu\text{g/mL}$); m-样品的质量(g), V-移取的水解产物体积。

1.5 胶原蛋白换算系数计算

$$\text{胶原蛋白换算系数} = \frac{\text{样品中胶原蛋白含量}(\%)}{\text{样品中HYP含量}(\%)} \quad (2)$$

1.6 骨素中胶原蛋白测定

取骨素(猪骨素、牛骨素和鸡骨素),按照 GB/T 9695.23-2008/ISO3496: 1994 的方法测定 HYP 含量。用骨素中 HYP 含量乘以对应的胶原蛋白换算系数得到骨素中胶原蛋白含量。

1.7 稳定性和回收率测定

1.7.1 稳定性测定

称取一定量的骨素(猪骨素、牛骨素、鸡骨素),按照 1.4.2 的方法平行测定 4 次 HYP 的含量,计算相对标准偏差(RSD)和变异系数(CV)。

1.7.2 回收率测定

称取 2 g 样品(猪骨素、牛骨素、鸡骨素),分别加入标准 HYP,按 1.4.2 方法测定 HYP 含量,按下式计算回收率:

$$\text{回收率}(\%) = \frac{A - B}{C} \quad (3)$$

注: A-加入 HYP 后样品中测定出 HYP 量(mg); B-样品中 HYP 测定量; C-加入标准 HYP 量。

1.8 数据统计

采用 SAS8.2 软件中的一般线性模型中的最小乘法对数据进行分析(p<0.05)。

2 结果与讨论

2.1 HYP 标准曲线

按 1.2 的方法,根据测定的吸光值扣除空白的吸光值为纵坐标,以相应的浓度为横坐标,绘制标准曲线(图 1)。并计算出回归方程为 $Y=0.219+0.002$, HYP 浓度(X)与吸光度(Y)之间的线性相关系数 $r=0.9995$ ($P<0.001$),显示出 HYP 浓度与吸光度之间有良好的线性关系。

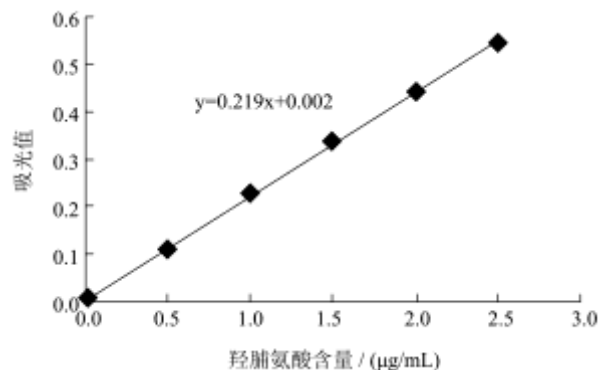


图 1 HYP 标准曲线

Fig.1 Standard curve of HYP

2.2 胶原蛋白换算系数

不同提取方式的胶原蛋白换算系数见表 1,热提取和酸提取胶原蛋白换算系数基本一致,说明水溶性胶原蛋白和酸溶性胶原蛋白中羟脯氨酸含量基本一致。由于骨素中的胶原蛋白是水溶性胶原蛋白,在测定骨素中骨胶原蛋白含量时应选用热提取时的胶原蛋白换算系数。不同骨之间胶原蛋白换算系数有一定差异,其中牛骨换算系数数值相对较大,猪骨胶原蛋白换算系数最小。在测定不同骨的骨素时引用相对应胶原蛋白换算系数即可。

表 1 不同提取方式胶原蛋白换算系数

Table 1 The collagen conversion factors through different extracted methods

	猪骨		牛骨		鸡骨		羊骨	
	热提取	酸提取	热提取	酸提取	热提取	酸提取	热提取	酸提取
胶原蛋白含量/%	0.57±<0.001	0.38±<0.001	0.25±<0.001	0.12±<0.001	0.65±<0.001	0.47±<0.001	0.51±<0.001	0.29±<0.001
HYP 含量/%	0.09±<0.001	0.06±<0.001	0.04±<0.001	0.02±<0.001	0.10±<0.001	0.07±<0.001	0.08±<0.001	0.05±<0.001
胶原蛋白换算系数	6.17	6.12	6.77	6.77	6.27	6.30	6.35	6.34

2.3 骨素中的胶原蛋白含量

表 2 骨素中胶原蛋白含量

Table 2 Collagen content in ossein

指标	猪骨素	牛骨素	鸡骨素
HYP 含量/%	1.49	1.17	1.54
胶原蛋白含量/%	9.19	7.92	9.78

不同骨素之间胶原蛋白含量有一定差异(表 2),其中鸡骨素胶原蛋白含量最高,原因可能是鸡骨中软骨较多,鸡骨蛋白中含有 20% 左右的胶原蛋白。不同

批次的骨素,总固形物含量不同,也会导致不同骨素之间的胶原蛋白含量有一定的差异。

2.4 稳定性和回收率

不同骨素中 HYP 含量经过 4 次平行测定结果如表 3 所示。该方法测定猪、牛、鸡骨素样品中 HYP 含量的标准差分别为 0.01%、0.01%、0.03%,变异系数分别为 0.44%、1.07%、2.26%,说明该方法对测定骨素中 HYP 含量具有非常好的稳定性。由表 4 可以看出,猪、牛、鸡骨素的回收率分别在 98.48~103.29%、

99.84~100.22%、97.48~100.35%之间, 平均回收率分别为 100.44%、99.98%、99.36%。RSD 均小于 2.2%, 综合稳定性和回收率试验结果表明此方法测定骨素中 HYP 含量具有较高的准确度和精密度, 说明可应用此方法测定骨素中的 HYP 含量。

表 3 骨素中 HYP 含量稳定性测定

Table 3 Determination the stability of HYP content

样品	HYP 含量/%	平均值/%	标准差/%	变异系数/%
猪骨素	1.49	1.49	0.01	0.44
	1.50			
	1.49			
	1.49			
牛骨素	1.17	1.17	0.01	1.07
	1.19			
	1.16			
	1.17			
鸡骨素	1.52	1.54	0.03	2.26
	1.59			
	1.51			
	1.55			

表 4 回收率测定

Table 4 Determination of recovery rate

样品	样品质量/g	HYP 质量/mg	添加的 HYP 质量/mg	检测出 HYP 质量/mg	回收率/%	平均回收率/%	标准差/%
猪骨素	1.01	1.51	10	11.60	100.93	100.44	2.17
	1.00	1.50	19	20.31	99.05		
	1.00	1.49	30	31.03	98.48		
	1.10	1.64	41	43.99	103.29		
牛骨素	1.00	1.17	11	12.20	100.22	99.98	0.17
	1.10	1.29	21	22.27	99.91		
	1.14	1.34	30	31.29	99.84		
	0.99	1.16	40	41.13	99.94		
鸡骨素	1.02	1.57	10	11.31	97.48	99.36	1.29
	1.02	1.57	20	21.49	99.60		
	1.00	1.53	29	30.63	100.35		
	1.10	1.70	39	40.70	100.01		

3 结论

本文通过提取不同骨的胶原蛋白, 得到热提取条件下猪、牛、羊、鸡骨的胶原蛋白换算系数分别为 6.17、6.77、6.27、6.35。把这些系数应用于骨素中胶原蛋白含量测定, 为骨素生产企业提供了一种快速、简单、准确、成本低、周期短的胶原蛋白含量测定方法。

参考文献

- [1] Ozimek G, Jelen, P, Ozimek L, et al. A comparison of mechanically separated and alkali extracted chicken protein for functional and nutritional properties [J]. Journal of Food Science, 1986, 51(3): 749-753
- [2] Hrynets Y, Omana D A, Xu Y, et al. Comparative study on the effect of acid-and alkaline-aided extractions on mechanically separated turkey meat (MSTM): chemical characteristics of recovered proteins [J]. Process Biochemistry, 2011, 46(1): 335-343
- [3] Avery N C, Sims T J, Bailey A J. Quantitative determination of collagen cross-links [M]. Extracellular Matrix Protocols: Humana Press, 2009
- [4] 郑婷,汪蕾,刘菊,等.高效液相色谱法测定鸡软骨 II 型胶原蛋白含量[J].药物分析杂志,2010,9:1767-1769
Zheng T, Wang L, Liu J, et al. HPLC determination of collagen II from chicken cartilage [J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 2010, 9: 1767-1769
- [5] Mazorra-Manzano M A, Torres-Llenez M J, González-Córdova A F, et al. A Capillary Electrophoresis Method for the Determination of Hydroxyproline as a Collagen Content Index in Meat Products [J]. Food Analytical Methods, 2012, 5(3): 464-470
- [6] 许庆陵,郭恒斌,曾庆祝.鱿鱼皮胶原蛋白制备技术研究[J].食品研究与开发,2008,29(9):59-64
Xu Q L, Guo H B, Zeng Q Z. Study on the Preparation Technology of Collagen from Squid (Ommastrephes Bartram) [J]. Food Research and Development. 2008, 29(9): 59-64
- [7] 秦玉青,刘承初,王造.鱿鱼皮胶原蛋白的测定与回收[J].上海水产大学学报,2002,11(2):138-144
Qin Y Q, Liu C C, Wang Z. Recovery of the collagen from squid skin [J]. Journal of Shanghai Fisheries University, 2002, 11(2): 138-144
- [8] Etherington D J, Sims T J. Detection and estimation of collagen [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1981, 32(6): 539-546
- [9] Kittiphattanabawon P, Benjakul S, Visessanguan W, et al. Characterisation of acid-soluble collagen from skin and bone of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*) [J]. Food chemistry, 2005, 89(3): 363-372
- [10] Neuman R E, Logan M A. The determination of collagen and elastin in tissues [J]. Journal of Biological Chemistry, 1950, 186(2): 549-556

- [11] 施辉阳,张鹏.酶法提取生猪皮胶原工艺条件的研究[J].食品工业科技.2004,2(7):93-95
Shi H Y, Zhang P. Enzymatic extraction of collagen from pork skin [J]. Science and Technology of Food Industry, 2004, 2(7): 93-95
- [12] 王信苏,汪之和.草鱼鱼鳞胶原蛋白的提取[J].现代食品科技,2006,22(4):148-150
Wang X S, Wang Z H. Extraction and application of collagen from fish scales [J]. Modern Food Science and Technology, 2006, 22(4): 148-150
- [13] GB 9695.23-2008 《肉和肉制品 羟脯氨酸含量测定》[S]
GB/T 9695.23-2008. Meat and Meat Products-Determination of Hydroxyproline Content [S]
- [14] Nagai T, Suzuki N. Isolation of collagen from fish waste material -skin, bone and fins [J]. Food Chemistry, 2007, 68: 277-281

现代食品科技