

### 发酵鱼粉中寡肽含量的测定

The Detection of Oligopeptides in Fermented fishmeal

2011 - 01 - 17 发布

2011 - 02 - 20 实施

## 前 言

本标准由福建省海洋与渔业厅提出并归口。

本标准由福建省质量技术监督局批准。

本标准由福建省农业科学院中心实验室起草。

本标准主要起草人：罗钦、杨苏、陈人弼、宋永康。

本标准按GB/T 1.1-2009《标准化工作导则 第1部分：标准的结构和编写》的起草规则编写。

# 发酵鱼粉中寡肽含量的测定

## 1 范围

本标准规定了发酵鱼粉中寡肽含量的测定方法。  
本标准适用于发酵鱼粉中寡肽含量的测定。

## 2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 601 化学试剂标准滴定溶液的制备

GB/T 6003.1 金属丝编织网试验筛

GB/T 6379.1-2004 测量方法与结果的准确度（正确度与精密度） 第1部分：总则与定义

GB/T 6379.2-2004 测量方法与结果的准确度（正确度与精密度） 第1部分：确定标准测量方法重复性与再现性的基本方法

## 3 方法原理

寡肽是指由2个~20个氨基酸残基通过肽键连接形成的肽，分子量一般在180Da~2000Da之间。单宁酸能沉淀分子量在2000Da以上的蛋白质，通过采用凯氏定氮法测出经单宁酸沉淀后滤液中的寡肽与游离氨基酸总含量，再用甲醛滴定法测定出滤液中游离氨基酸的含量，计算两者的差值即为发酵鱼粉中寡肽的含量。

## 4 试剂和材料

除另有规定外，试剂均为分析纯，水为蒸馏水（GB 6682 规定的三级水）。

4.1 单宁酸溶液：称取 16g 单宁酸溶于 100mL 水中，用滤纸过滤，现配现用。

4.2 混合催化剂：6g 硫酸钾和 0.4g 硫酸铜（五个结晶水）混合均匀。

4.3 混合指示剂：0.1%甲基红乙醇溶液和 0.5%溴甲酚绿乙醇溶液等体积混合。

4.4  $0.01\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  盐酸标准溶液：按 GB/T 601 制备。

4.5 蔗糖。

4.6 硼酸溶液：称取 2g 硼酸溶于 100mL 水中。

4.7  $0.1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  氢氧化钠标准溶液：按 GB/T 601 制备。

4.8  $0.05\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  氢氧化钠标准溶液：用  $0.1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  氢氧化钠标准溶液使用时稀释后使用。

4.9 中性甲醛溶液（pH=8.10）：量取 200mL 37.0%~40.0% 甲醛溶液于 400mL 烧杯中，置于电磁搅拌器上，边搅拌边用  $0.05\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  氢氧化钠溶液调至 pH8.10。

4.10 30%过氧化氢。

4.11 氢氧化钠溶液：称取 40g 氢氧化钠溶于 100mL 水中。

4.12 pH6.8缓冲溶液：取 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液22.4mL和 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸二氢钾溶液25.0mL，加蒸馏水至200mL。

## 5 仪器设备

5.1 实验室用样品粉碎机或研钵。

5.2 试验筛：采用 GB/T 6003.1 中  $\phi 200 \times 50-0.25/0.16$ 。

5.3 分析天平：感量 0.0001g。

5.4 消煮炉或电炉。

5.5 滴定管：酸式，10 mL、25 mL。

5.6 凯氏烧瓶：150 mL。

5.7 凯氏蒸馏装置：常量直接蒸馏式或半微量水蒸气蒸馏式。

5.8 锥形瓶：磨口和非磨口，150 mL、250 mL。

5.9 容量瓶：100 mL。

5.10 pH 计：精度 0.01。

5.11 电磁搅拌器。

5.12 振荡机。

5.13 离心机：转速 5000r/min。

## 6 测定步骤

### 6.1 样品处理

选取具有代表性的试样用四分法缩减至 200 g，粉碎后全部通过试验筛（5.2），装于密封容器中待测，防止试样成分的变化。

称取经上述处理的试样 5g（准确至 0.0001g），置于磨口锥形瓶（5.8）中，加 100mL 水，不时振摇，浸渍 3h 后于 5000r/min 离心机中离心 30min，过滤取滤液(a)备用。

### 6.2 寡肽和游离氨基酸总量的测定

吸取滤液(a)10mL 置于 100 mL 容量瓶中，加入 50mL 水，摇匀，加入 10mL 单宁酸溶液（4.1），摇匀后定容至 100mL，于离心机离心（5000r/min）30min，过滤取滤液(b)备用。

吸取滤液(b)10mL 置于凯氏烧瓶（5.6）中，加入混合催化剂（4.2）6.4g，混匀后再加入 12mL 浓硫酸，在消煮炉或电炉上小心加热，待泡沫消失后，加强火力直至溶液澄清，然后再继续加热至少 2h。将消化后的溶液冷却，加水 20mL，转入 100 mL 容量瓶中，冷却后用水稀释至刻度，摇匀，为试样分解液。取 10mL 硼酸溶液（4.6），置于锥形瓶（5.8）中，加入混合指示剂（4.3）2 滴，使凯氏蒸馏装置的冷凝管下端插入液面下。准确移取 10mL 试样分解液注入蒸馏装置的反应室中，用少量蒸馏水洗净，加入 10mL 氢氧化钠溶液（4.11），塞好玻璃塞，并在入口处加水密封。蒸馏 4 min 移动锥形瓶（5.8）使液面离开冷凝管下端，再蒸馏 1 min，用少量蒸馏水冲洗冷凝管下端外部，取下锥形瓶。

蒸馏后的吸收液立即用盐酸标准溶液（4.4）滴定，溶液由蓝绿色变为灰红色为终点。记录消耗盐酸标准溶液滴定的体积。

空白的测定：称取蔗糖0.5g，代替试样，按自6.1 “置于磨口锥形瓶（5.8）中……”起至6.2 “……记录消耗盐酸标准溶液滴定的体积”操作进行空白测定，消耗盐酸标准溶液(4.4)的体积不得超过0.2mL。

### 6.3 游离氨基酸含量的测定

将 pH 计接通电源，预热 30min 后，用 pH6.8 缓冲溶液（4.12）校准 pH 计。

吸取 10mL 滤液(a)于 100mL 烧杯中,加 5 滴过氧化氢溶液(4.10)和 10mL 水。然后将烧杯置于电磁搅拌器上,插入电极。开动电磁搅拌器,先用氢氧化钠溶液(4.7)较快调节 pH 达到 7.5 左右后,再用氢氧化钠标准溶液(4.8)慢慢调节至 pH8.10,并且保持 1min 不变。然后慢慢加入 15mL 中性甲醛溶液(4.9),1min 后用氢氧化钠标准溶液(4.8)滴定至 pH8.10。记录滴定所消耗氢氧化钠标准溶液的体积。

## 6.4 结果计算与报告

### 6.4.1 寡肽和游离氨基酸的总含量

$$T(\%) = \frac{(V - V_0) \times C \times 0.0140 \times 6.25 \times 100}{W} \times 100 \dots\dots\dots (1)$$

式中:

- T—寡肽和游离氨基酸的总含量, %;
- V—样品消耗盐酸标准溶液的体积, mL;
- V<sub>0</sub>—试剂空白消耗盐酸标准溶液的体积, mL;
- C—盐酸标准溶液的浓度, mol · L<sup>-1</sup>;
- 0.0140—每毫升盐酸标准溶液(1mol · L<sup>-1</sup>)相当于氮的质量, g;
- 6.25—氮换算为粗蛋白质的系数;
- W—样品的质量, g。

### 6.4.2 游离氨基酸的含量

$$A(\%) = \frac{C \times V \times 0.128 \times 10}{W} \times 100 \dots\dots\dots (2)$$

式中:

- A—游离氨基酸的含量, %;
- C—氢氧化钠标准溶液的浓度, mol · L<sup>-1</sup>;
- V—加入中性甲醛溶液后, 滴定试样消耗 0.05mol · L<sup>-1</sup> 氢氧化钠标准溶液的体积, mL;
- 0.128—每毫升氢氧化钠标准溶液(1mol · L<sup>-1</sup>)相当于游离氨基酸的质量, g;
- W—样品的质量, g。

### 6.4.3 寡肽的含量

$$G = T - A \dots\dots\dots (3)$$

式中:

- G—寡肽的含量, %;
- T—寡肽和游离氨基酸的总含量, %;
- A—游离氨基酸的含量, %。

结果的表述: 同一样品两次测定结果的算术平均值作为结果。

### 6.4.4 允许差

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的相对偏差不得超过 3%。

## 7 精密度

本方法在不同实验室内测定精密度的详细情况参见附录 A。由三个实验室测定的统计结果显示本标准的重复性标准差小于 3%、重复性变异系数小于 10%、重复性限小于 10%。

附 录 A  
(资料性附录)  
实验室间对比测定结果

根据 GB/T 6379.1-2004、GB/T 6379.2-2004 进行实验室间试验，以确定本方法的精密度，本试验有三个实验室参加，样品为发酵鱼粉，实验室间试验结果见表 A.1。

表 A.1 实验室间测定的统计结果

参数	样品 1	样品 2
参加的实验室的数目	3	3
可接受的结果的数目	3	3
寡肽含量平均值 / (%)	12.82	21.88
重复性标准差, $S_r$ / (%)	0.5	0.6
重复性变异系数 / (%)	3.6	2.6
重复性限, $r(2.8 \times S_r)$ / (%)	1.3	1.6
再现标准差, $S_R$ / (%)	0.2	0.3
再现性变异系数 / (%)	1.6	1.4
再现性限, $R(2.8 \times S_R)$ / (%)	0.6	0.8

参 考 文 献

- [1] 罗钦,陈人弼,宋永康.鱼粉中寡肽和游离氨基酸的测定方法,福建农业学报,2005,20(4):285~288.
- [2] 罗钦,陈人弼,宋永康.发酵鱼粉中寡肽检测技术研究,福建农业学报,2008,23(3):327~330.
- [3] 冯秀燕,计成.高效液相色谱法进行寡肽分离测定的研究[J],中国饲料,2001,20:25~27.
- [4] Sforza, S., Ferroni, L., Galaverna, G., Dossena, A., Marchelli, R.J. Extraction, Semi-Quantification, and Fast On-line Identification of Oligopeptides in Grana Padano Cheese by HPLC-MS. *Agric. Food Chem.*, 2003, 51(8): 2130-2135.
- [5] 李小东、陈朝晖等.大豆蛋白肽的测定方法[J].大豆通报,2004,(1):25.
-