ICS 67.040
CCS X04

中华人民共和国国家标准

GB/T 9695.23—XXXX
代替 GB/T 9695.23—2008

肉与肉制品 羟脯氨酸含量测定

Meat and meat products—Determination of hydroxyproline content

征求意见稿

XXXX－XX－XX 发布　　XXXX－XX－XX 实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会　发布

前　言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件规定了食品质量相关技术要求，食品安全相关要求见有关法律法规、政策和食品安全标准等文件。

本文件代替GB/T 9695.23—2008《肉与肉制品 羟脯氨酸含量测定》，与GB/T 9695.23—2008相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

——删除了分光光度计法中的“试验报告”章；

——增加了高效液相色谱法为第二法。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由中国商业联合会提出。

本文件由全国肉禽蛋制品标准化技术委员会（SAC/TC399）归口。

本文件起草单位：广州检验检测认证集团有限公司、中国商业联合会、武汉市华测检测技术有限公司、广州质量检验研究院、华测检测认证集团北京有限公司、中国农业科学院农产品加工研究所、哈尔滨商委肉制品有限公司、福建省力诚食品有限公司、山西六味斋控股集团有限公司、南京农业大学、北京农学院、浙江方圆检测集团股份有限公司、中国肉类食品综合研究中心、广西神冠胶原生物集团有限公司、国检测试控股集团辽宁有限公司、温州市顶诺食品有限公司、厦门泓益检测有限公司、烟台富美特信息科技股份有限公司、食药环检验研究院（山东）集团有限公司、威海市食品药品检验检测研究院、江苏绿水青山检验检测技术有限公司。

本文件主要起草人：黄伟乾、刘振宇、姚晓庆、何敏恒、王红星、冼燕萍、李佩珊、张春晖、万丽葵、何顺发、 崔军 、李春保、赵冰、盛华栋、张水锋、王真、鲁振、史宇璇、韩东、秦晓洁、任南、周亚仙、王儒、鲁婷婷、黄玉克、赵叶祺、王欣 、王琰、杨继凯、姜华军、周宏霞、刘荣、万延延。

本文件及其所代替文件的历次版本发布情况为：

——1990年首次发布为GB/T 9695.23—1990，2008年第一次修订；

——本次为第二次修订。

肉与肉制品 羟脯氨酸含量测定

1 范围

本文件描述了肉与肉制品中羟脯氨酸的分光光度法和高效液相色谱法。

本文件第一法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。

本文件第二法适用于肉与肉制品中羟脯氨酸的测定。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 9695.19 肉与肉制品 取样方法

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

第一法 分光光度法

4 原理

试样经硫酸水解后，释放的羟脯氨酸经氯胺T氧化，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，外标法定量。

5 试剂与材料

除非另有说明，本方法所用试剂均为分析纯，水为 GB/T 6682 规定的三级水。

5.1 试剂

5.1.1 浓硫酸（H_2SO_4，ρ_{20} = 1.84 g/mL）。

5.1.2 一水柠檬酸（$C_5H_8O_7 \cdot H_2O$）。

5.1.3 氢氧化钠（NaOH）。

5.1.4 无水乙酸钠[$Na(CH_3CO_2)$]。

5.1.5 正丙醇（C_3H_7OH）。

5.1.6 氯胺 T（$C_7H_7ClNNaO_2S \cdot 3H_2O$，即三水・N-氯-对甲苯磺酰胺钠盐）。

5.1.7 对二甲氨基苯甲醛[$(CH_3)_2NC_6HCHO$]。

5.1.8 高氯酸溶液（$HClO_4$，质量分数为 60%）。

5.1.9 乙醇（C_2H_5OH）。

5.1.10　异丙醇[$(CH3)_2CHOH$]。

5.1.11　五氧化二磷（P_2O_5）。

5.2　材料

5.2.1　容量瓶：250 mL 和 2 L。

5.2.2　表面皿：直径为 5 cm～6 cm。

5.2.3　圆底或平底烧瓶：容量约为 200 mL，宽颈。

5.2.4　圆形滤纸：直径为 12.5 cm。

5.2.5　铝箔或不透明塑料薄膜。

5.3　溶液配制

5.3.1　硫酸溶液：$c \approx 3$ 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。冷却至室温后用水定容。

5.3.2　缓冲溶液：（pH = 6.8）

准确称取 26.0 g 一水柠檬酸、14.0 g 氢氧化钠和 78.0 g 无水乙酸钠。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 ℃暗处可稳定保存 4 周。

5.3.3　氯胺 T 溶液

称取 1.41 g 氯胺 T，用 100 mL 缓冲溶液（5.3.2）溶解。临用前配制。

5.3.4　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 9.4 注），可按如下操作：用热乙醇 70%（体积分数，下同）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%乙醇洗涤布氏漏斗中的固体。将固体转移至三角瓶中，用 70%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%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。

5.4　标准品

L-羟脯氨酸标准品（$C_5H_9NO_3$，CAS号：51-35-4），纯度≥99.0%。

5.5　标准溶液配制

5.5.1　标准储备液（500 μg/mL）

称取 50 mg L-羟脯氨酸于 100 mL 容量瓶中，用水溶解，加一滴硫酸溶液（5.3.1），用水定容。该溶液于 4 ℃下可稳定存放 1 个月。

5.5.2　标准中间工作液（5 μg/mL）

移取 5.00 mL 上述标准储备液至 500 mL 容量瓶中，用水定容。

5.5.3　标准系列工作液：分别吸取标准中间工作液（5.5.2）10 mL、20 mL、30 mL、40 mL、50 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 μg/mL、1.0 μg/mL、1.5 μg/mL、2.0 μg/mL、2.5 μg/mL。临用前配制。

6　仪器和设备

6.1　电动绞肉机：带水平刀片，能高速旋转。

6.2　干燥箱：可控温于 105 ℃±1℃。

6.3　pH 计。

6.4　水浴锅：可控温于 60 ℃±1 ℃。

6.5　分光光度计：可用波长 558 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。配有光程为 10 mm 的比色皿。

6.6　分析天平：感量 0.1 mg。

7　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。

8　试样制备

8.1　肉及生肉制品

用刀将肉在冷冻时（0 ℃以下）切成小块（约0.5 cm^3，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 ℃以上保温30 min后，冷却，按8.2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。

8.2　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。

9　分析步骤

9.1　试样水解

称取 4 g 试样（精确至 0.001 g）于烧瓶中，避免试样粘在烧瓶壁上。量取 30 mL 硫酸溶液（5.1），加入烧瓶中，用表面皿盖住，于 105 ℃干燥箱内恒温 16 h。用圆形滤纸趁热将水解产物过滤至 250 mL 容量瓶中。用 10 mL 硫酸溶液（5.1）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。

9.2　测定

9.2.1　取标准系列工作液（5.5.3）各 4.00 mL 于比色管中，加入 2.00 mL 氯胺 T 试剂（5.3.3），混合后于室温下放置 20 min。加入 2.00 mL 显色剂（5.4）于比色管中，充分混合，用铝箔或塑料薄膜将比色管封口。将比色管迅速放入 60 ℃水浴（6.7）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 处用分光光度计或光电比色计（6.8）测定吸收值。扣除空白溶液的吸收（9.3），根据标准系列工作液的吸光度绘制标准曲线。

9.2.2 用移液管移取一定体积（V_1）的水解产物（9.1）至 250 mL 容量瓶中，定容后羟脯氨酸的浓度在 0.5 μg/mL～2.5 μg/mL 之间。移取 4.00 mL 定容后溶液于比色管中，按照 9.2.1 中“加入 2.00 mL 氯胺 T 试剂”起进行操作。扣除空白溶液的吸收（9.3），从 9.2.1 所得标准曲线查得水解产物中羟脯氨酸的含量。

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_1）在 5 mL～25 mL 之间。

9.3 空白测试

用水代替标准工作液，重复9.2.1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（5.4），如有必要。需纯化对二甲氨基苯甲醛液（见5.4）。

10 计算

试样中羟脯氨酸的含量按式（1）计算：

$$X = \frac{6.25 c_1}{m_1 \times V_1} \qquad \text{……（1）}$$

式中：

X—— 试样中羟脯氨酸的含量，%；

c_1—— 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（μg/mL）；

m_1—— 试样质量，单位为克（g）；

V_1—— 从250 mL容量瓶中吸取滤液的体积（见9.3.1），单位为毫升（mL）；

6.25—— 换算系数。

注：6.25是由样品水解、分取稀释以及单位换算得出的换算系数，即(250×250)/10^6×100。

计算结果保留至小数点后两位。

11 精密度

11.1 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：

$$r = 0.0131 + 0.0322\,\overline{X} \qquad \text{……（2）}$$

式中：

r—— 重复性限，%；

$\overline{X}$—— 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。

11.2 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：

$$R = 0.0195 + 0.0529\overline{X} \quad \text{……（3）}$$

式中：

R—— 再现性限，%；

$\overline{X}$—— 两次测试结果的平均值，%。

注：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%。

12 其他

本方法对肉与肉制品中羟脯氨酸的定量限为 0.03%。

第二法 高效液相色谱法

13 原理

试样经盐酸水解后产生的游离羟脯氨酸与6-氨基喹啉-N-羟基琥珀酰亚胺基氨基甲酸酯（AQC）发生衍生反应，衍生物经反相液相色谱分离，紫外检测器检测，外标法定量。

14 试剂

除非另有说明,本方法所用试剂均为分析纯，水为 GB/T 6682 规定的一级水。

14.1 乙腈（C_2H_3N）：色谱纯。

14.2 氢氧化钠。

14.3 盐酸（HCl，ρ=1.19 g/mL）：优级纯。

14.4 甲酸（HCOOH）。

14.5 甲酸铵（HCO_2NH_4）

14.6 6-氨基喹啉-N-羟基琥珀酰亚胺基氨基甲酸酯（CAS 号：148758-94-2）：纯度＞98%。

14.7 十水合四硼酸钠（$Na_2B_4O_7{\cdot}10H_2O$）。

15 材料

15.1 水解管：配有聚四氟乙烯密封盖。

15.2 水相滤膜：0.45 μm。

16 试剂配制

16.1 氢氧化钠溶液（1 mol/L）：称取氢氧化钠40 g，溶解于900 mL水中，用水稀释至1 L，混匀。

16.2 衍生用缓冲溶液：称取十水合四硼酸钠 2.5 g，加 40 mL 水溶解，用水定容至 50 mL，0.45 μm 水相滤膜过滤。

16.3 衍生化试剂：称取 6-氨基喹啉-N-羟基琥珀酰亚胺基氨基甲酸酯 12.5 mg，用 5 mL 乙腈溶解，加盖密封，涡旋混合 10 s，置于 55 ℃水浴中加热至试剂充分溶解。

16.4 盐酸溶液（6 mol/L）

量取盐酸（14.4）510 mL，用水定容至 1 L，摇匀。

16.5 甲酸铵水溶液（200 mmol/L）

称取 12.61 g 甲酸铵，用水定容至 1 L，混匀。

16.6 甲酸铵-乙腈-甲酸(84:11:5, v/v)溶液

取甲酸铵水溶液（16.6）840 mL、乙腈 110 mL 及甲酸 50 mL，混匀。

16.7 7.5%（甲酸铵-甲酸-乙腈）水溶液

取甲酸铵-甲酸-乙腈溶液（16.7）75 mL，用水定容至 1 L，混匀。

17 标准品

羟脯氨酸（$C_5H_9NO_3$，CAS号：51-35-4）：纯度不低于99.0%，或经国家认证并授予标准物质证书的标准品。

18 标准溶液配制

18.1 标准储备液（1 000 mg/L）：称取 100.0 mg 羟脯氨酸标准品，用水溶解后定容至 100 mL。于 4 ℃冰箱内储存，有效期 6 个月。

18.2 标准中间液（100 mg/L）：准确吸取 10.00 mL 羟脯氨酸标准储备液（18.1）于 100 mL 的容量瓶内，用水定容。

18.3 标准系列工作溶液：分别吸取标准中间液（18.2）1.00 mL、2.00 mL、5.00 mL、20.00 mL、50.00 mL 于 100 mL 容量瓶中，用水定容，得到标准曲线工作溶液质量浓度分别为 1.0 μg/mL、2.0 μg/mL、5.0 μg/mL、20.0 μg/mL、50.0 μg/mL。现用现配。

19 仪器和设备

19.1 微波消解仪。

19.2 高效液相色谱仪：配有紫外检测器。

19.3 电热恒温干燥箱：可控温度 110 ℃ ± 1 ℃。

19.4 分析天平：感量 1mg 和 0.1 mg。

19.5 氮吹仪。

19.6 恒温培养箱：可控温度 60 ℃ ± 1 ℃。

20 取样

同第7章。

21 试样制备

同第8章。

22 分析步骤

22.1 样品水解

22.1.1 微波加热水解法

称取 1 g 试样（其中肉干、肉松等干制品 0.2 g ~ 0.5 g，精确至 0.001 g）于消解管中，加入 10.0 mL 盐酸溶液（16.3）。摇匀密封后放入微波消解仪中，于 130 ℃下微波水解 1 h，水解后试样转移至 50 mL 容量瓶中，用水定容至刻度。取 1.0 mL 水解液于氮吹仪上 50 ℃下吹至近干，残留物用 1.0 mL 水溶解，振荡混匀，过 0.45 μm 滤膜后，转移至样品瓶，为样品测定液，待衍生化。

22.1.2 加热水解法

称取1 g试样（其中肉干、肉松等干制品0.2 g-0.5 g，精确至0.001 g）于玻璃水解管中，加入10.0 mL盐酸溶液（16.3）。摇匀密封后，置于110 ℃电热恒温干燥箱中水解12 h（加热1 h后取出，轻轻摇动玻璃水解管），取出冷却。摇匀后，打开玻璃水解管，用滤纸过滤，滤液转移至50 mL容量瓶中，用水定容至刻度。吸取1.0 mL滤液于氮吹仪上50 ℃下吹至近干，残留物用1.0 mL水溶解，振荡混匀，过0.45 μm滤膜后，转移至样品瓶，为样品测定液，待衍生化。

22.2 衍生化

移取待衍生试样溶液或标准工作溶液 20 μL 于洁净的 1.5 mL 离心管中，加入 140 μL 衍生用缓冲溶液（16.3），涡旋状态下加入 40 μL 衍生化试剂（16.4），涡旋混匀 20 s，加盖密封于进样瓶中，在室温下静置 1 min，转移至 60℃水浴或恒温箱中衍生 20 min，取出放置至室温，将衍生产物转移至进样小瓶中，待测。

22.3 空白试验

除不加试样外，均按22.1和22.2操作。

22.4 仪器参考条件

22.4.1 色谱柱：C_{18} 色谱柱（4.6 mm×250 mm，5 μm），或性能相当者；

22.4.2 柱温：40 ℃；

22.4.3 流速：1.5 mL/min；

22.4.4 进样体积：5 μL；

22.4.5　检测波长：260 nm；

22.4.6　流动相：A 相为 7.5%(甲酸铵-甲酸-乙腈)水溶液（16.8），B 相为乙腈（16.9），流动相梯度洗脱程序见表 1；

表 1 高效液相色谱法洗脱程序

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	100	0
7.50	100	0
16.00	90.0	10.0
16.10	30.0	70.0
18.00	30.0	70.0
18.10	100	0
20.00	100	0

22.5　标准曲线的制作

将标准系列工作曲线（18.3）按 22.2 衍生化，衍生后的标准系列工作液分别注入高效液相色谱仪中，以工作液中羟脯氨酸的质量浓度为横坐标，以羟脯氨酸衍生物的峰面积为纵坐标，分别绘制标准曲线。标准溶液衍生物的色谱图见附录 A。

22.6　试样溶液的测定

将衍生后的待测液注入高效液相色谱仪中，得到相应的峰面积，根据标准曲线得到试样溶液中羟脯氨酸的质量浓度。待测液中目标化合物的响应值应在标准曲线线性范围内，超过线性范围则应对待衍生试样溶液进行稀释，重新按样品衍生分析步骤处理后再进样分析。

23　结果计算

试样中羟脯氨酸的含量按式（4）计算：

$$X=\frac{(\rho-\rho_0)\times V}{m\times 10^6}\times f\times 100 \qquad \cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots（4）$$

式中：

X——试样中羟脯氨酸的含量，单位为克每百克（g/100 g）；

ρ——试样溶液中羟脯氨酸的浓度，单位为微克每毫升（μg/mL）；

ρ_0——空白溶液中羟脯氨酸的浓度，单位为微克每毫升（μg/mL）；

V——试样水解定容体积，单位为毫升（mL）；

m——试样质量，单位为克（g）。

f——稀释倍数。

10^6——单位换算系数。

计算结果保留至小数点后两位。

24　精密度

在重复性条件下获得的2次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的10%。

25 其他

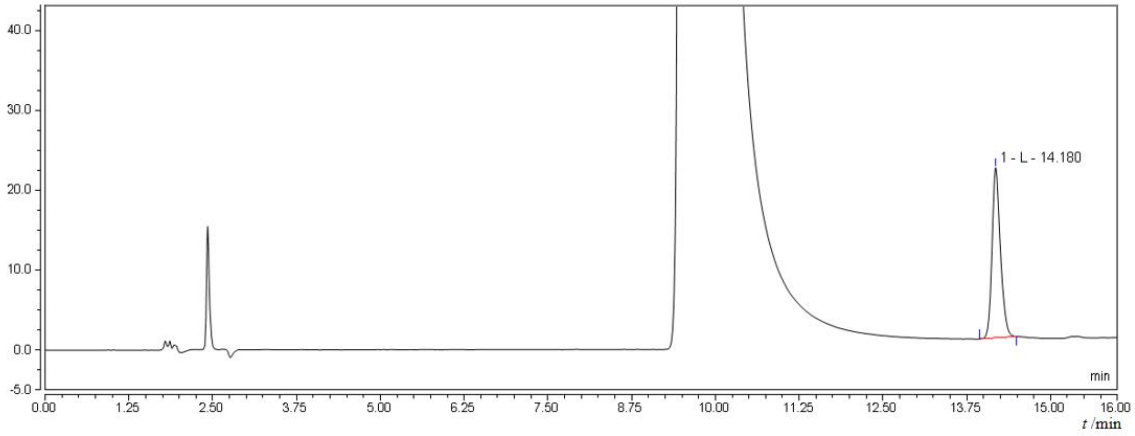
取样量1.0 g，定容体积为50.0 mL时，方法的检出限为0.002 g/100 g，定量限为0.005 g/100 g。

干制品取样量为0.2 g，定容体积为50.0 mL时，方法的检出限为0.01 g/100 g，定量限为0.025 g/100 g。

附 录 A
(资料性）

羟脯氨酸衍生物色谱图

羟脯氨酸标准溶液衍生物液相色谱图见图A.1。



图A.1 羟脯氨酸标准溶液衍生物色谱图

参 考 文 献

[1] 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-Parts 1:General principles and definitions*，IDT)

[2] GB/T 6379.2-2004 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-Parts 2:Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method*，IDT）