

ICS 67.050

B 50

备案号: 34646-2012

DB44

广东省地方标准

DB44/T 1013—2012

水产品鲜度指标 K 值的测定

Determination of K value as freshness index of aquatic products

2012-06-04 发布

2012-09-15 实施

广东省质量技术监督局 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1-2009 的规定进行起草。

本标准附录A为资料性附录。

本标准由广东省海洋与渔业局提出。

本标准由广东省水产标准化技术委员会归口。

本标准起草单位：中国水产科学研究院南海水产研究所。

本标准主要起草人：黄卉、杨贤庆、岑剑伟、郝淑贤、邓建朝。

水产品鲜度指标 K 值的测定

1 范围

本标准规定水产品鲜度指标 K 值的检测方法。

本标准适用于鱼类、虾类 K 值的测定。

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/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 原理

用高氯酸提取试样中的三磷酸腺苷及其分解关联物，用氢氧化钾溶液调节 pH，使高氯酸提取物沉淀，除去杂质后，用 C₁₈ 色谱柱分离，紫外检测器检测，外标法定量。根据测得的三磷酸腺苷及其分解关联物的含量，计算样品的 K 值。

4 试剂

除另有规定外，所有试剂均为分析纯，试验用水应符合 GB/T 6682 一级水的标准。

4.1 甲醇：色谱纯。

4.2 标准物质：三磷酸腺苷、二磷酸腺苷、单磷酸腺苷、肌苷酸、次黄嘌呤核苷、次黄嘌呤，纯度 ≥ 99%。

4.3 10%高氯酸溶液（m/v）：量取高氯酸 34 mL，用水稀释至 400 mL。

4.4 5%高氯酸溶液（m/v）：量取高氯酸 17 mL，用水稀释至 400 mL。

4.5 5 mol/L 氢氧化钾溶液：准确称取氢氧化钾 280 g，用水稀释至 1 000 mL。

4.6 20 mmol/L 柠檬酸-40 mmol/L 三乙胺-0.1%冰乙酸（pH4.8）：称取 3.84 g 无水柠檬酸、5.6 mL 三乙胺、1.0 mL 冰乙酸加水溶解定容至 1 L，0.22 μm 滤膜过滤。

4.7 标准储备溶液（20 mmol/L）：准确称取三磷酸腺苷标准品 0.110 2 g、二磷酸腺苷标准品 0.085 4 g、单磷酸腺苷标准品 0.073 5 g、肌苷酸标准品 0.069 6 g、次黄嘌呤核苷标准品 0.053 6 g、次黄嘌呤标准品 0.027 2 g，加水溶解后定容到 10 mL，-18℃ 保存。

4.8 标准工作溶液：吸取一定量的标准储备溶液（4.7），加水配制成 0.005 mmol/L~1.000 mmol/L 标准工作液，4℃ 保存。现用现配。

5 仪器

5.1 高效液相色谱仪：配有紫外检测器。

5.2 分析天平：感量 0.000 1 g。

5.3 天平：感量 0.01 g。

- 5.4 组织捣碎机。
- 5.5 均质机。
- 5.6 冷冻离心机：转速 10 000 r/min。
- 5.7 酸度计。

6 色谱条件

- 6.1 色谱柱：C₁₈柱，250 mm×4.6 mm (i.d.)，粒度 5 μm；或与之相当的色谱柱。
- 6.2 色谱柱温：40℃。
- 6.3 流速：1.0 mL/min。
- 6.4 检测波长：260 nm。
- 6.5 进样量：10 μL。
- 6.6 流动相：A 液：20 mmol/L 柠檬酸-40 mmol/L 三乙胺-0.1%冰乙酸 (pH4.8)；B 液：甲醇，梯度洗脱 (表 1)。

表1 梯度洗脱程序

时间, min	A 液, %	B 液, %
0.00	100	0
12.00	94	6
13.00	100	0
18.00	100	0

7 操作方法

7.1 样品制备

鱼类，取背部肌肉；虾类，去头去壳，取肉。将所取样品用组织捣碎机捣碎。

7.2 提取

准确称取 4.0 g 均匀碎鱼肉 (或虾肉)，加入 20 mL 预冷的 10%高氯酸溶液，均质后以 10 000 r/min 4℃冷冻离心 15 min，取上清液。沉淀用 5%高氯酸溶液 20 mL 洗涤，离心取上清液，重复操作一次，合并上清液，用 5 mol/L 氢氧化钾溶液调节 pH 为 6.8，静置 30 min。离心，将上清液转移到 100 mL 容量瓶中，用水定容。0.22 μm 滤膜过滤，溶液供上机测定。

7.3 色谱分析

将标准工作液和样品提取液置于液相色谱仪进样器中，按上述色谱条件进行色谱分析，记录峰面积，响应值均应在仪器检测的线性范围之内，根据标准品的保留时间定性，外标法定量。标准色谱图参见附录A中图A.1。

8 计算

样品中三磷酸腺苷、二磷酸腺苷、单磷酸腺苷、肌苷酸、次黄嘌呤核苷、次黄嘌呤含量均采用下

式计算:

$$X_n = \frac{A \times C \times V}{A_s \times m} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

X_n ——样品中三磷酸腺苷、或二磷酸腺苷、或单磷酸腺苷、或肌苷酸、或次黄嘌呤核苷、或次黄嘌呤的含量, 单位为微摩尔每克 ($\mu\text{mol/g}$);

A ——样品中三磷酸腺苷、或二磷酸腺苷、或单磷酸腺苷、或肌苷酸、或次黄嘌呤核苷、或次黄嘌呤的峰面积;

C ——标准工作溶液中三磷酸腺苷、或二磷酸腺苷、或单磷酸腺苷、或肌苷酸、或次黄嘌呤核苷、或次黄嘌呤的浓度, 单位为微摩尔每毫升 ($\mu\text{mol/mL}$);

V ——定容体积, 单位为毫升 (mL);

A_s ——标准工作液中三磷酸腺苷、或二磷酸腺苷、或单磷酸腺苷、或肌苷酸、或次黄嘌呤核苷、或次黄嘌呤的峰面积;

m ——样品质量, 单位为克 (g)。

$$K = \frac{X_{HxR} + X_{Hx}}{X_{ATP} + X_{ADP} + X_{AMP} + X_{IMP} + X_{HxR} + X_{Hx}} \times 100 \dots\dots\dots (2)$$

式中:

K ——样品中计算得到的K值, 单位为百分率 (%);

X_{HxR} ——样品中次黄嘌呤核苷的含量, 单位为微摩尔每克 ($\mu\text{mol/g}$);

X_{Hx} ——样品中次黄嘌呤的含量, 单位为微摩尔每克 ($\mu\text{mol/g}$);

X_{ATP} ——样品中三磷酸腺苷的含量, 单位为微摩尔每克 ($\mu\text{mol/g}$);

X_{ADP} ——样品中二磷酸腺苷的含量, 单位为微摩尔每克 ($\mu\text{mol/g}$);

X_{AMP} ——样品中单磷酸腺苷的含量, 单位为微摩尔每克 ($\mu\text{mol/g}$);

X_{IMP} ——样品中肌苷酸的含量, 单位为微摩尔每克 ($\mu\text{mol/g}$)。

9 线性范围

三磷酸腺苷、二磷酸腺苷、单磷酸腺苷、肌苷酸、次黄嘌呤核苷、次黄嘌呤各组标准溶液的线性范围: 0.005 mmol/L~1.000 mmol/L。

10 检测限、精密度和回收率

10.1 检测限

本方法的检测限为: 三磷酸腺苷28 mg/kg, 二磷酸腺苷22 mg/kg, 单磷酸腺苷19 mg/kg, 肌苷酸18 mg/kg, 次黄嘌呤核苷14 mg/kg, 次黄嘌呤7 mg/kg。

10.2 精密度

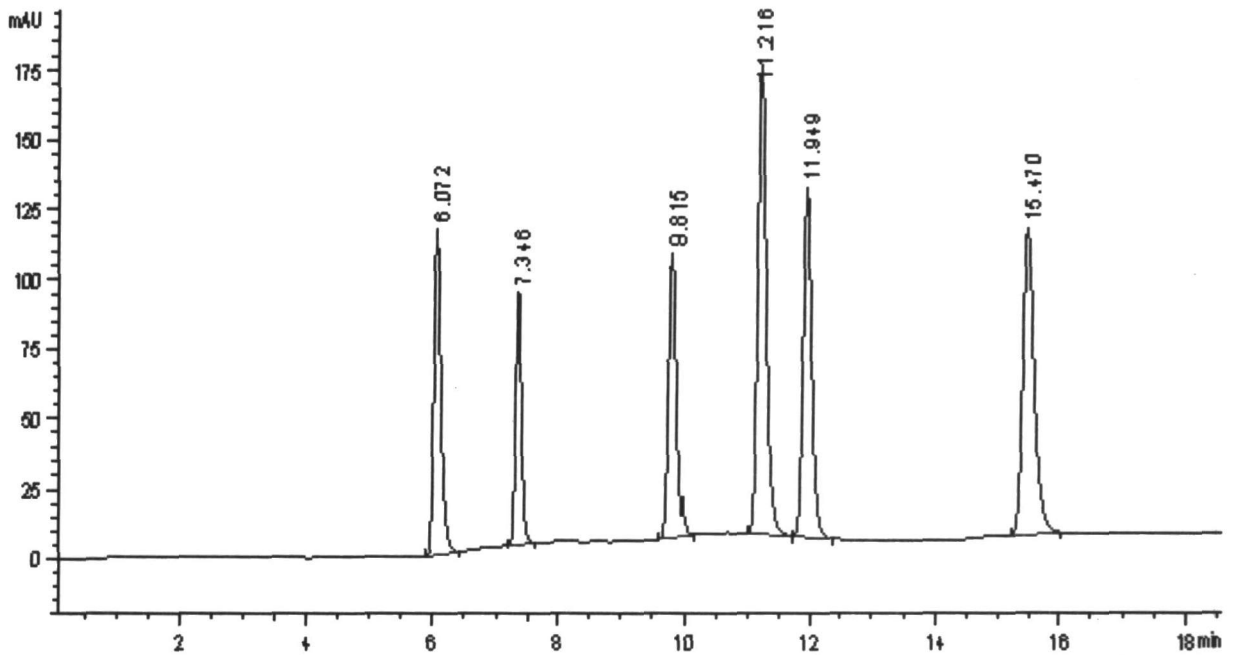
本标准的相对标准偏差 $\leq 10\%$ 。

10.3 回收率

本方法的回收率为 $\geq 75\%$ 。

附 录 A
(资料性附录)

三磷酸腺苷、二磷酸腺苷、单磷酸腺苷、肌苷酸、次黄嘌呤核苷、次黄嘌呤各组分液相色谱图



图A.1 三磷酸腺苷、二磷酸腺苷、单磷酸腺苷、肌苷酸、次黄嘌呤核苷、次黄嘌呤各组分液相色谱图

注：出峰顺序依次为：IMP、Hx、HxR、AMP、ADP、ATP。