

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 4642—2025

蜂王浆中酮胺类糖化蛋白的测定 分光光度法

Determination of keto-amine glycosylated proteins in royal jelly—
Spectrophotometric method

2025-01-09 发布

中华人民共和国农业农村部 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编写起草规则》的规定起草。

请注意本文件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。

本文件由农业农村部畜牧兽医局提出。

本文件由全国畜牧业标准化技术委员会(SAC/TC 274)归口。

本文件起草单位：中国农业科学院蜜蜂研究所、江苏蜂奥生物科技有限公司、广西梧州甜蜜家蜂业有限公司、上海森峰园蜂业有限公司。

本文件主要起草人：张红城、张勇、乔江涛、黄忠连、于富民、孔令杰、董捷。



蜂王浆中酮胺类糖化蛋白的测定 分光光度法

1 范围

本文件描述了蜂王浆中酮胺类糖化蛋白含量测定的分光光度法。

本文件适用于蜂王浆中酮胺类糖化蛋白的测定。

本文件方法的检出限为 3 mg/g,定量限为 10 mg/g。

注:结果以蜂王浆蛋白中所含 1-脱氧-1-吗啉-D-果糖(DMF)的质量计。

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 9697—2008 蜂王浆

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

酮胺类糖化蛋白 keto-amine glycosylated proteins

具有酮胺类结构的糖化蛋白。

注:在蜂王浆中一般由还原糖通过非酶促褐变与蛋白质产生醛亚胺,再通过 amadori 重排反应形成酮胺类糖化蛋白,其酮胺类结构与 DMF 一致。

4 原理

试样中酮胺类糖化蛋白在碱性条件下还原氯化硝基四氮唑蓝(NBT),生成蓝紫色甲臞类化合物,在 530 nm 处有最大吸收。吸光度与酮胺类糖化蛋白成正比,根据 DMF 标准曲线,计算蜂王浆蛋白质中酮胺类糖化蛋白的含量。

5 试剂或材料

除非另有说明,仅使用分析纯试剂。

5.1 水:GB/T 6682,三级水。

5.2 碳酸盐缓冲液(0.1 mol/L,pH 10.8):准确称取无水碳酸钠 9.45 g、碳酸氢钠 0.84 g 于 1 000 mL 烧杯中,用水溶解定容至 1 000 mL 容量瓶中,于 2℃~8℃保存,有效期 3 个月。

5.3 Triton X-100 溶液(0.02% pH 10.8):准确量取 1 mL Triton X-100(30%)溶液于烧杯中,用碳酸盐缓冲液(5.2)稀释成 1 500 mL。现配现用。

5.4 DMF 标准储备溶液(6 mmol/L):准确称取 37.40 mg 的 DMF(CAS 号:6291-16-3,纯度≥98%)于 25 mL 容量瓶中,用水溶解定容,于 2℃~8℃保存,有效期 3 个月。

5.5 NBT 储备溶液(0.5 mmol/L,pH 10.8):准确称取 102.20 mg 的 NBT 于 250 mL 容量瓶中,用碳酸盐缓冲液(5.2)溶解并定容,在 2℃~8℃条件下储存于棕色瓶中,有效期 3 个月。

5.6 标准系列溶液:分别取 DMF 标准储备溶液(5.4) 0 μL、20 μL、50 μL、100 μL、150 μL、200 μL 至 6 支试管中,用水补足至 1 000 μL。配制成 DMF 浓度分别为 0 mmol/L、0.12 mmol/L、0.3 mmol/L、

0.6 mmol/L、0.9 mmol/L、1.2 mmol/L 的标准系列溶液。

6 仪器设备

- 6.1 分光光度计:精度±2 nm。
- 6.2 恒温水浴锅:精度±1 ℃。
- 6.3 分析天平:感量 0.01 g 和 0.01 mg。
- 6.4 涡旋混匀器。

7 样品

将蜂王浆充分搅拌均匀;对于冷冻的供试样品,在 25 ℃ 下完全解冻后,搅拌均匀。分出约 50 g 作为试料,置于样品瓶中,密封,并标明标记。

取样后应立即试验。如不能及时试验,应在-18 ℃ 冰箱中冷冻保存。

8 试验步骤

8.1 蜂王浆中蛋白质含量测定

按 GB 9697—2008 中 5.4 的规定测定蜂王浆中蛋白质含量的质量分数。

8.2 试样溶液制备

平行做两份试验。试样解冻至 25 ℃,用玻璃棒搅拌均匀,准确称取 1 g(精确至 0.01g)样品,用水充分溶解并定容至 200 mL,待测。

8.3 标准曲线的绘制

分别取系列标准溶液(5.6)各 100 μL 于 6 支 10 mL 试管中,再分别加入 2 mL 57 ℃ 预热的 NBT (5.5)和 2mLTriton X-100 溶液(5.3),涡旋混匀。于 57 ℃ 水浴中反应 20 min,以标准曲线 0 mmol/L 为空白,在 530 nm 波长下测定其吸光度。以 DMF 浓度为横坐标、吸光度为纵坐标绘制标准曲线。

8.4 空白试样溶液制备

精密吸取 100 μL 试样(8.2)至 10 mL 试管中,加入 2 mL57 ℃ 预热的水和 2 mL Triton X-100 溶液(5.3)涡旋混匀,于 57 ℃ 水浴 20 min。

8.5 试样测定

精密吸取 100 μL 试样(8.2)至 10 mL 试管中,分别加入 2 mL 57 ℃ 预热的 NBT(5.5)和 2 mL Triton X-100 溶液(5.3)涡旋混匀。于 57 ℃ 水浴中反应 20 min,以空白试样溶液(8.4)为参比,在 530 nm 波长处测定吸光度。

9 试验数据处理

试样中酮胺类糖化蛋白的含量以蜂王浆蛋白中所含 DMF 的质量计,以 $w(\text{mg/g})$ 表示,结果按公式(1)计算。

$$w = \frac{c \times V \times 249.26}{m \times \Omega} \dots\dots\dots (1)$$

式中:
 c ——通过 DMF 标准曲线计算所得待测样对应的 DMF 的浓度,单位为毫摩尔每升(mmol/L);
 V ——试样定容体积,单位为升(L);
249.26 ——DMF 的摩尔质量,单位为每摩尔(g/mol);
 m ——试样的质量,单位为克(g);
 Ω ——蜂王浆中蛋白质质量分数,单位为百分号(%);
测定结果以平行测定的算术平均值表示,保留 3 位有效数字。

10 精密度

在重复性条件下,两次独立测定结果与其算数平均值的绝对差值不大于算数平均值的 10%。
