

团 体 标 准

T/XXX XXX—2024

胶原三肽

Collagen Tripeptides

征求意见稿

2024-XX-XX 发布

2024-XX-XX 实施

中国国际科技促进会 发 布

目 次

前 言 II

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 术语和定义 1

4 技术要求 1

附 录 A （规范性） 检验方法 3

附 录 B 甘氨酸-脯氨酸-羟脯氨酸（GPH）所占比例的检验方法 5

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。

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。

本文件由山东艾美科生物技术有限公司提出。

本文件由中国国际科技促进会归口。

本文件起草单位：山东艾美科生物技术有限公司、德州蓝力生物技术有限公司、海南华研胶原蛋白科技股份有限公司、中国海洋大学、上海统园食品技术有限公司、湖北跃海生物科技有限公司、南昌大学、安徽盛美诺生物技术有限公司、东莞市福泽医疗科技有限公司。

本文件主要起草人：吴浩浩、王玉民、赵子方、刘金双、余波、王辉、刘爱青、周成勇。

胶原三肽

1 范围

本文件适用于食品加工用途的胶原三肽产品。

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 31645 食品安全国家标准 胶原蛋白肽
GB/T 9695.23 肉与肉制品 羟脯氨酸含量测定
GB 2760 食品安全国家标准 食品添加剂使用标准
GB 5009.3 食品安全国家标准 食品中水分的测定
GB 5009.4 食品安全国家标准 食品中灰分的测定
GB 5009.5 食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定
GB 5009.11 食品安全国家标准 食品中总砷及无机砷的测定
GB 5009.12 食品安全国家标准 食品中铅的测定
GB 5009.15 食品安全国家标准 食品中镉的测定
GB 5009.17 食品安全国家标准 食品中总汞及有机汞的测定
GB5009.123 食品安全国家标准 食品中铬的测定
GB 4789.1 食品安全国家标准 食品微生物学检验总则
GB 4789.2 食品安全国家标准 食品微生物学检验菌落总数测定
GB 4789.3 食品安全国家标准 食品微生物学检验大肠菌群计数

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 胶原三肽 Collagen Tripeptide

以富含胶原蛋白的动物结缔组织（包括皮、骨、筋、腱、鳞等）为原料，利用先进生物工程技术制备的胶原蛋白最小结构单元，是一种含有甘氨酸、脯氨酸（或羟脯氨酸）及一个其他氨基酸的三肽。

4 技术要求

4.1 原料要求

可以使用的原料、禁止使用的原料，应符合GB 31645的规定。

4.2 感官要求

应符合表1的规定。

表 1 感官要求

项目	固态样品	液态样品	检验方法
色泽	白色或淡黄色	无色或淡黄色	固态样品：取5克的被测样品置于洁净的白色瓷盘中，在自然光线下用肉眼观察其色泽和外观形态，看有否外来到异物，嗅其香气，品其滋味。 液态样品：取2克的被测样品置于洁净烧杯中，在自然光下观察色泽和有无沉淀，闻其气味，用温开水漱口，品其滋味。
滋味、气味	具有该产品应有的滋味和气味，无异味	具有该产品应有的滋味和气味，无异味	
状态	粉末状或颗粒状，无结块，无正常视力可见的外来异物	液体澄清，无正常视力可见的沉淀物	

4.3 理化指标

应符合表 2 的规定。

表 2 理化指标

项目	指标	检验方法
胶原三肽所占比例/%	≥ 30.0	附录 A
特征三肽甘氨酸-脯氨酸-羟脯氨酸（以干基计）（g/100 g）	≥ 3.0	附录 B
羟脯氨酸（以干基计）/（g/100 g）	≥ 6.0	GB/T 9695.23
总氮（以干基计）/（g/100 g）	≥ 15.0	GB 5009.5
灰分/（g/100 g）	≤ 7.0	GB 5009.4
水分/（g/100 g）	≤ 7.0	GB 5009.3第一法

4.4 污染物限量

应符合表3的规定。

表 3 污染物限量

项目	限量	检验方法
铅（以Pb计）/（mg/kg）	1.0	GB5009.12
镉（以Cd计）/（mg/kg）	0.1	GB5009.15
总砷（以As计）/（mg/kg）	1.0	GB5009.11
铬（以Cr计）/（mg/kg）	2.0	GB5009.123
总汞（以Hg计）/（mg/kg）	0.1	GB5009.17

4.5 微生物限量

应符合表4的规定。

表 4 微生物限量

项目	采样方案 ^a 及限量				检验方法
	n	c	m	M	
菌落总数/（CFU/g）	5	2	10 ⁴	10 ⁵	GB 4789.2
大肠菌群/（CFU/g）	5	2	10	10 ²	GB 4789.3
^a 样品的采样及处理按GB 4789.1执行。					

4.6 食品工业用加工助剂

食品工业用加工助剂的使用应符合GB 2760的规定。

附 录 A
(规范性)
胶原三肽所占比例检测方法
(高效体积排阻色谱法)

A. 1 方法提要

采用高效体积排阻色谱法测定。即以多孔性填料为固定相，依据样品组分分子体积大小的差别进行分离，在肽键的紫外吸收波长214 nm条件下检测，根据标准品保留时间范围来确定样品色谱图中胶原三肽的峰面积，利用胶原三肽峰面积与样品色谱图总峰面积的比值，计算样品中胶原三肽所占比例。

A. 2 仪器和设备

- A. 2.1 高效液相色谱仪：配有紫外可见光检测器和含有数据处理软件的色谱工作站。
- A. 2.2 流动相真空抽滤脱气装置。
- A. 2.3 超声波振荡器。
- A. 2.4 分析天平：感量 0.0001 g。
- A. 2.5 混匀器。
- A. 2.6 高压蒸汽灭菌锅。
- A. 2.7 吸量管：10 mL、25 mL。
- A. 2.8 容量瓶：10 mL、100 mL、500 mL、1 L。
- A. 2.9 烧杯：500 mL、1 L。
- A. 2.10 滤膜：孔径 0.22 μm。
- A. 2.11 样品瓶：1.5 mL。
- A. 2.12 离心管：1.5 mL。
- A. 2.13 试剂瓶：250 mL、1 L。
- A. 2.14 注射器：1 mL。
- A. 2.15 量筒：100 mL、250 mL。

A. 3 试剂

除非另有说明，本方法所用试剂均为色谱纯。

- A. 3.1 三(羟甲基)氨基甲烷 (Tris)。
- A. 3.2 浓盐酸 (HCl)。
- A. 3.3 二水氯化钙 ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)。
- A. 3.4 氯化钠 (NaCl)。
- A. 3.5 水 (H_2O)。
- A. 3.6 标准品：甘氨酸-脯氨酸-羟脯氨酸 (H-Glycine-Proline-Hydroxyproline-OH, 分子量 285.3, 纯度≥95%)。

A. 4 溶液配制

A. 4.1 1 M 三(羟甲基)氨基甲烷溶液

将 60.57 g 三(羟甲基)氨基甲烷溶于盛有 250 mL 水的 500 mL 烧杯中，搅拌使其完全溶解。加入 20 mL 浓盐酸，搅拌均匀，pH 稳定后继续慢慢的加入浓盐酸至 pH 为 7.5。转移至 500 mL 容量瓶中用水定容至刻度。然后转移至 1 L 的试剂瓶中用 121℃高压蒸汽灭菌 20 min。

A. 4.2 0.1 M 氯化钙溶液

将 1.4701 g 二水氯化钙溶于 30 mL 水中，搅拌使其完全溶解。用水定容至 100 mL，然后转移至 250 mL 的试剂瓶中用 121℃高压蒸汽灭菌 20 min。

A. 4.3 流动相的配制

在 1 L 烧杯中加入 1 M 三(羟甲基)氨基甲烷溶液 10 mL，0.1 M 氯化钙溶液 50 mL，氯化钠 8.7 g，先加入 500 mL 水进行搅拌使其完全溶解，转移到容量瓶中用水定容至 1 L，混匀后用滤膜进行过滤。

A. 5 色谱条件

A. 5.1 色谱柱：Superdex™ 30 Increase 10/300 GL 并加装保护柱。

A. 5.2 检测波长：214 nm。

A. 5.3 流速：0.3mL/min。

A. 5.4 进样体积：10 μL。

A. 5.5 分析时间：75 min。

A. 6 标准品色谱图

用流动相配制成浓度为 1% 的标准品溶液，用滤膜过滤后进样，得到标准品的色谱图。

A. 7 样品的制备

用称量纸称取样品 0.1 g，转移至 10 mL 容量瓶中，用流动相定容至刻度，用混匀器进行完全溶解。用滤膜过滤，其滤液用于测定。

A. 8 胶原三肽所占比例的计算

将 A. 7 制备的样品溶液在 A. 5 色谱条件下进样分析。然后根据公式（1）进行计算

$$X = \frac{A}{B} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中：

X：试样中胶原三肽的相对百分比，单位%；

A：试样中胶原三肽的峰面积；

B：试样中总峰面积。

结果保留两位有效数字。

附录 B

(规范性)

特征三肽甘氨酸-脯氨酸-羟脯氨酸含量检验方法

B.1 原理

采用反相色谱法测定。即以多孔性填料为固定相，根据样品组分分子体积大小的差别进行分离，在肽键的紫外吸收波长 220 nm 条件下检测，使用数据处理软件根据标准品的面积和浓度制作标准直线方程。并计算得到甘氨酸-脯氨酸-羟脯氨酸在样品中所占比例。

B.2 试剂

除非另有说明，本方法所用试剂均为色谱纯。

B.2.1 三氟乙酸 ($\text{C}_2\text{HF}_3\text{O}_2$)。

B.2.2 水 (H_2O)。

B.2.3 标准品：甘氨酸-脯氨酸-羟脯氨酸 (H-Glycine-Proline-Hydroxyproline-OH, MW285.3)。

B.3 色谱条件

B.3.1 色谱柱：ZORBAX SB-Aq, 4.6×250mm 5 μm 。

B.3.2 流动相：0.1%三氟乙酸溶液。

B.3.3 检测波长：220 nm。

B.3.4 流速：1 mL/min。

B.3.5 柱温箱：50°C。

B.3.6 进样体积：10 μL 。

B.3.7 分析时间：15 min。

B.4 标准曲线的建立

用流动相配制成浓度为 1%的标准品溶液，用流动相进行稀释，分别制成浓度为 0.001% (10 $\mu\text{g/mL}$), 0.002% (20 $\mu\text{g/mL}$), 0.003% (30 $\mu\text{g/mL}$), 0.004% (40 $\mu\text{g/mL}$), 0.005% (50 $\mu\text{g/mL}$)，用滤膜过滤后进样，使用数据处理软件根据标准品的面积和浓度制作标准直线方程。

B.5 样品的制备

用称量纸称取样品 0.1 g，转移至 10 mL 容量瓶中，用流动相定容至刻度，再用流动相进行 10 倍稀释，得到浓度为 0.1%的样品溶液。用滤膜过滤，其滤液用于测定。

B.6 甘氨酸-脯氨酸-羟脯氨酸三肽所占比例的计算

将 B.5 制备的样品溶液在 B.3 色谱条件下进样分析。然后根据公式 (2) 进行计算：

$$X = \frac{C \times V \times F}{m} \times 10^{-6} \times 100 \quad \dots\dots\dots (2)$$

式中：

X：试样中甘氨酸-脯氨酸-羟脯氨酸的含量，单位为克每百克 (g/100g)；

C：试样中甘氨酸-脯氨酸-羟脯氨酸的浓度，单位为微克每毫升 ($\mu\text{g/mL}$)；

V：试样溶液的体积，单位为毫升 (mL)；

F：稀释倍数；

m：试样的质量，单位为克 (g)；

10^{-6} ：换算系数。

结果保留两位有效数字。