

团 体 标 准

T/CHC XXX—2024

胶原蛋白三肽

Collagen Tripeptide

征求意见稿

2024-XX-XX 发布

2024-XX-XX 实施

中国保健协会 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
5 检验规则	3
6 标志、包装、运输和储存	3
附 录 A （规范性） 相对分子质量介于 189-500 Da 胶原蛋白肽所占比例的检测方法 错误! 未定义书签。	
附 录 B （规范性） 羟脯氨酸含量测定方法	错误! 未定义书签。
参 考 文 献	9

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。

本文件由百岳特生物技术（上海）有限公司提出。

本文件由中国保健协会归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

胶原蛋白三肽

1 范围

本文件规定了胶原蛋白三肽的技术要求、试验方法、检验规则以及标志、包装、运输和储存的要求。本文件适用于食品加工用途的胶原蛋白三肽产品。

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
GB 5009.123 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

胶原蛋白三肽 Collagen Tripeptide

以动物结缔组织（包括皮、骨、筋、腱、鳞等）为原料，经过提取、水解、精制生产的，相对分子质量介于189-500 Da的胶原蛋白肽产品。

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，看有否外来异物，嗅其香气，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	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。

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
		一级	二级	
相对分子质量介于189-500 Da的胶原蛋白肽所占比例/(%)	≥	45.0	25.0	附录 A
羟脯氨酸 (以干基计) / (g/100 g)	≥	9.0	6.0	附录 B
总氮 (以干基计) / (g/100 g)	≥	15.0		GB5009.5
灰分/ (g/100 g)	≤	7.0		GB5009.4
水分/ (g/100 g)	≤	7.0		GB5009.3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。

5 检验规则

5.1 组批

同一批原料、同一生产日期、同一生产班次生产的包装完好的同一品种、同一规格产品为一组批。

5.2 抽样

从每批产品中随机抽取3—5个最小包装，用消毒后的取样工具在伸入包装3/4处取样，取样数量应满足检验项目的检验、复检和留样需要。

5.3 出厂检验

产品应由企业按本标准检验合格，签发合格证后方可出厂，出厂检验的项目包括本文件4.2-4.5规定的项目。

5.4 型式检验

型式检验是对产品质量进行的全面考核，正常生产时每年进行一次，检验项目包括本文件4.2-4.5规定的项目，有下列情况之一时亦应进行型式检验：

- a) 产品正式投入生产时；
- b) 正式生产后，如原料、工艺有较大变化或更换主要生产设备，可能影响产品质量时；
- c) 出厂检验与上一次型式检验结果有较大差异时；
- d) 长期停产6个月以上，恢复生产时；
- e) 食品安全监督部门提出进行型式检验的要求时。

5.5 判定规则

所检项目检验结果全部符合本标准规定时，判该批产品为合格品；其中项目不符合本标准要求时，判该批产品为不合格品。感官指标项目检验结果不符合本标准要求时，可以在原批次产品中双倍抽样复检一次，判定以复检结果为准，其余项目经判定不得复检。

6 标志、包装、运输和储存

6.1 标志

产品外包装上应注明企业名称和地址、产品名称、原材料来源、执行标准代号、生产日期、保质期及储运要求等；储运图标的标志应符合GB/T 191的规定。

6.2 包装

产品包装材料和容器应符合GB/T 1685的规定。

6.3 运输

运输工具必须清洁、干燥、无异味、无污染。运输时应防雨、防潮、防暴晒，防挤压、碰撞、冻结。装卸时轻放轻卸，不得与有毒、有害、有异味或其他可能影响产品质量的物品混装、混运。

6.4 储存

产品应储存于干燥、通风的仓库内，仓库周围应无异气污染，仓库内应保持清洁卫生，有防尘、防蝇、防鼠等设施。不得与有毒、有害、有异味、易挥发、易腐蚀或其他可能影响产品质量的物品同库储存。

附录 A (规范性)

相对分子质量介于189-500 Da胶原蛋白肽所占比例的检测方法 (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220 nm条件下检测,使用相对分子质量分布测定的专用数据处理软件(即GPC软件),对标准品和样品的色谱图及其数据进行处理,根据相对分子质量校正曲线方程,计算得到胶原三肽的相对分子质量大小及分布范围。

A.2 试剂

A.2.1 乙腈: 色谱纯。

A.2.2 三氟乙酸: 分析纯。

A.2.3 水: GB/T 6682规定的一级水。

A.2.4 相对分子质量校正曲线所用标准品:

细胞色素 C (cytochrome C, 分子量12384 Da);

抑肽酶 (aprotinin, 分子量6512 Da);

杆菌酶 (bacitracin, 分子量1423 Da);

甘氨酸甘氨酸酪氨酸精氨酸 (Gly-Gly-Tyr-Arg, 分子量451 Da);

甘氨酸甘氨酸甘氨酸 (Gly-Gly-Gly, 分子量189 Da)。

A.3 仪器和设备

A.3.1 高效液相色谱仪: 配有紫外检测器和含有GPC数据处理软件的色谱工作站。 A.3.2 流动相真空抽滤脱气装置。

A.3.3 超声波振荡器。

A.3.4 分析天平: 感量0.0001 g。

A.4 色谱条件与系统适应性实验

A.4.1 色谱柱: TSKge1 G2000 SWXL 300 mm×7.8 mm (GEL LOT 502R) 或性能与此相近的同类型其他适用于测定肽的分子量分布的凝胶柱。

A.4.2 流动相: 乙腈: 水: 三氟乙酸, 体积比为40: 60: 0.05。

A.4.3 检测波长: 220 nm。

A.4.4 流速: 0.5 mL/min。

A.4.5 柱温: 30℃。

A.4.6 进样体积: 10 μL。

A.4.7 为使色谱系统符合检测要求,规定在上述色谱条件下,凝胶色谱柱的柱效即理论塔板数(N)按三肽标准品(甘氨酸-甘氨酸-甘氨酸)峰计算不低于5000,蛋白肽的分配系数(Kd)应在0~1之间。

A.5 相对分子质量校正曲线制作

分别用流动相配制成浓度为1.0 g/L左右的上述不同相对分子质量的肽标准品溶液,用孔径为0.2 μm~0.5 μm聚四氟乙烯或尼龙过滤膜过滤后分别进样,得到系列标准品的色谱图。以相对分子质量的对数($\lg M_w$)对保留时间作图或作线性回归得到相对分子质量校正曲线及其方程。

A.6 样品制备

用称量纸称取样品125.0 mg左右,转移至25 mL容量瓶中,用流动相定容至刻度,超声振荡10 min,使样品充分溶解混匀,用孔径为0.2 μm~0.5 μm聚四氟乙烯或尼龙过滤膜过滤,其滤液用于测定。

A.7 相对分子质量的计算

将A.6制备的样品溶液在A.4色谱条件下进样分析, 然后使用GPC数据处理软件, 根据相对分子质量校正曲线方程对样品的色谱图及其数据进行计算处理, 即可得到样品中胶原三肽的相对分子质量大小及分布范围。用峰面积归一化法计算相对分子质量介于189-500 Da胶原蛋白肽的相对百分比含量。

附 录 B

(规范性)

羟脯氨酸含量测定方法 (氯胺 T 法)

B.1 原理

用硫酸于 105℃ 水解试样, 过滤、稀释水解产物。羟脯氨酸经氯胺 T 氧化后, 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。

B.2 试剂

如无特别说明, 所用试剂均为分析纯。水为 GB/T 6682 规定的一级水。

B.2.1 硫酸溶液 [$c(\text{H}_2\text{SO}_4) \approx 3 \text{ mol/L}$]

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 ($\rho_{20}=1.84 \text{ g/mL}$)。冷却至室温后用水定容。

B.2.2 缓冲溶液 (pH=6.8) 包括下列组分:

- 26.0 g 一水柠檬酸 ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$);
- 14.0 g 氢氧化钠;
- 78.0 g 无水乙酸钠 [$\text{Na}(\text{CH}_3\text{CO}_2)$]。

用 500 mL 水溶解上述试剂并转入 1L 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 1 个月。

B.2.3 氯胺 T 溶液

称取 1.41 g 三水·N-氯-对甲苯磺酰胺钠盐 (氯胺 T), 用 100 mL 缓冲溶液 (B.2.2) 溶解。临用前配制。

B.2.4 显色剂

称取 10.0 g 对二甲氨基苯甲醛, 用 35 mL 高氯酸溶液 [60% (质量分数)] 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, 可按如下操作: 用 70% (体积分数) 热乙醇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, 12h 后, 用布氏漏斗过滤。用少量 70% (体积分数) 乙醇洗涤布氏漏斗中的固体。将固体转移至三角瓶中, 用 70% (体积分数) 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% (体积分数) 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。

B.2.5 羟脯氨酸标准溶液

B.2.5.1 标准储备液

称取 10 mg 4-羟基- α -吡咯甲酸 (羟脯氨酸) 于 10 mL 容量瓶中, 用水溶解, 加一滴硫酸溶液 (B.2.1), 用水定容。该溶液于 4℃ 下可稳定存放 1 个月。

B.2.5.2 标准工作液

移取 0.25 mL 上述标准储备液至 50 mL 容量瓶中, 用水定容, 此工作溶液浓度为 5 mg/L。分别吸取该溶液 1.00 mL、2.00 mL、3.00 mL、4.00 mL 于 10 mL 容量瓶中, 用水定容, 所得标准工作液浓度依次为 0.5 mg/L、1.0 mg/L、1.5 mg/L、2.0 mg/L。临用前配制。

B.3 仪器和设备

实验室常规仪器及下列仪器。

- B.3.1 干燥箱：可控温于 $105^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ；
 B.3.2 圆形滤纸；
 B.3.3 水浴锅；
 B.3.4 紫外分光亮度计；
 B.3.5 分析天平：可准确称重至 0.001g ；
 B.3.6 容量瓶；
 B.3.7 三角烧瓶（带塞）；
 B.3.8 比色管（带塞）。

B.4 分析步骤

B.4.1 试样处理

称取 2g 试样（精确至 0.001g ）于三角烧瓶中，避免试样粘在烧瓶壁上。

B.4.2 水解

B.4.2.1 量取 30mL 硫酸溶液（C.2.1），加入三角烧瓶中，盖上塞子，于 105°C 干燥箱内恒温 16h 。

B.4.2.2 用圆形滤纸趁热将水解产物过滤至 50mL 容量瓶中。用 10mL 硫酸溶液（C.2.1）分三次洗涤三角烧瓶和滤纸，合并至上述容量瓶中。用水定容，摇匀。

B.4.3 测定

B.4.3.1 用移液管移取一定体积（ V ）的水解产物（C.4.2.2）至 50mL 容量瓶中，定容后羟脯氨酸浓度在 $0.5\text{mg/L} \sim 5\text{mg/L}$ 之间。

B.4.3.2 移取 4.00mL 上述溶液（C.4.3.1）于比色管中，加入 2.00mL 氯胺 T 试剂（C.2.3），混合后于室温下放置 $20\text{min} \pm 1\text{min}$ 。

B.4.3.3 加入 2.00mL 显色剂（C.2.4）于比色管中，充分混合，盖上塞子。

B.4.3.4 将比色管迅速放入 60°C 水浴中，加热 20min 。

B.4.3.5 取出比色管，用流动水冷却比色管至少 3min ，在室温下放置 30min 。

B.4.3.6 用水作参比，于 $558\text{nm} \pm 2\text{nm}$ 处用紫外分光亮度计测定吸收值。

B.4.3.7 扣除空白溶液的吸收（C.4.4），从 C.4.5 所得标准曲线查得水解产物中羟脯氨酸的含量。

B.4.4 空白测试

用水代替稀释溶液，重复 C.4.3.2 至 C.4.3.6 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（C.2.4），如有必要，需纯化对二甲氨基苯甲醛液（见 C.2.4）。

B.4.5 标准曲线

B.4.5.1 用 4.00mL 羟脯氨酸标准工作液（C.2.4.5.2）依次代替稀释后的水解产物，浓度分别为 0.5mg/L 、 1.0mg/L 、 1.5mg/L 、 2.0mg/L 、 5.0mg/L ，进行 C.4.3.2 至 C.4.3.6 的操作。

B.4.5.2 以扣除了空白的标准工作液的吸亮度为纵坐标，以相应的浓度为横坐标，绘制标准曲线，再次分析应重新绘制标准曲线。

B.5 计算

试样中羟脯氨酸的含量按式（1）计算：

$$X = \frac{c}{m \times V \times 4 \times \omega} \quad \text{式 (1)}$$

式中：

X —试样中羟脯氨酸的含量，%；

c —由标准曲线得到的试样溶液中羟脯氨酸的浓度，单位为毫克每升（ mg/L ）；

m —试样质量，单位为克（ g ）；

V —从 50mL 容量瓶中吸取滤液的体积（见 8.3.1），单位为毫升（ mL ）；

ω —样品中干物质含量。

计算结果以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示，结果保留三位有效数字。

B.6 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的10%。

参 考 文 献

[1] Sakai Y. Biological function of a skin-permeable collagen tripeptide (CTP) with glycine at the N-terminus[J]. JOURNAL-SOCIETY OF PHOTOGRAPHIC SCIENCE AND TECHNOLOGY OF JAPAN, 2004, 67(4): 397-401.

[2] Shin Y , Kim T , Piao Z ,et al.METHOD FOR PREPARING COLLAGENASE AND METHOD FOR PREPARING COLLAGEN TRIPEPTIDE USING SAME:WO2015KR12181[P].WO2016076647A1.
