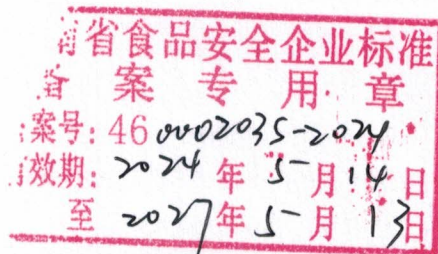


Q/HNHY

海南省食品安全企业标准

Q/HNHY 0178S—2024

活性胶原三肽



2024-04-20 发布

2024-05-20 实施

海南华研胶原科技股份有限公司 发布

前 言

本标准按照《中华人民共和国食品安全法》和 GB/T 1.1《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。

本标准附录 A 为规范性附录。

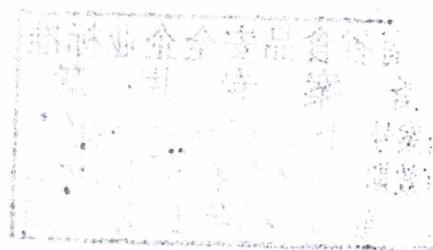
本标准由海南华研胶原蛋白科技股份有限公司提出。

本标准由海南华研胶原蛋白科技股份有限公司起草。

本标准适用于委托生产企业：山东百阜福瑞达制药有限公司（地址：山东省济宁市曲阜市陵城高新技术产业开发区）

本标准主要起草人：赵子方、符策雷、王争光、李小青、李艳芳、齐新原、汤丽伟、张文文。

本标准为首次发布。



活性胶原三肽

1 范围

本标准规定了活性胶原三肽的术语和定义、技术要求、食品添加剂、生产加工过程中的卫生要求、检验规则以及标签、标志、包装、运输、贮存和保质期的要求。

本标准适用于以富含胶原蛋白的新鲜动物组织（包括水产品或家畜家禽产品的皮、骨、筋、腱、鳞）为原料，以蛋白酶为加工助剂，经前处理、酶解、离心分离或过滤、浓缩、干燥、粉碎或不粉碎、过筛或不过筛、包装等生产工艺制成的三肽（三个氨基酸之间由肽键连接组成）含量大于 30%，可用于食品原料用或直接食用的活性胶原三肽的生产控制、检验和贮运等环节。

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 191 包装储运图示标志
- GB 1886.174 食品安全国家标准 食品添加剂 食品工业用酶制剂
- GB 2707 食品安全国家标准 鲜（冻）畜、禽产品
- GB 2760 食品安全国家标准 食品添加剂使用标准
- GB 2733 食品安全国家标准 鲜、冻动物性水产品
- 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 食品卫生微生物学检验 大肠菌群计数
- GB 4789.4 食品安全国家标准 食品卫生微生物学检验 沙门氏菌检验
- GB 4789.15 食品安全国家标准 食品卫生微生物学检验 霉菌和酵母计数
- GB 4789.25 食品安全国家标准 微生物学检验 酒类、饮料、冷冻饮品采样和检样处理
- GB 4806.7 食品安全国家标准 食品接触用塑料材料及制品
- 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 5749 生活饮用水卫生标准
- GB/T 6543 运输包装用单瓦楞纸箱和双瓦楞纸箱
- GB 7718 食品安全国家标准 预包装食品标签通则
- GB 14881 食品安全国家标准 食品生产通用卫生规范

- GB 23350 限制商品过度包装要求 食品和化妆品
 GB 28050 食品安全国家标准 预包装食品营养标签通则
 GB/T 28118 食品包装用塑料与铝箔复合膜、袋
 GB 31645 食品安全国家标准 胶原蛋白肽
 JJF 1070 定量包装商品净含量计量检验规则
 国家市场监督管理总局令第70号《定量包装商品计量监督管理办法》

3 术语和定义

3.1 三肽：三个氨基酸之间由肽键连接组成肽。

3.2 特征肽：本品特有的肽段，由 Gly（甘氨酸）-Hyp（羟脯氨酸）-Yaa（除这两个外的任意一个氨基酸）组成的三肽或 Gly（甘氨酸）-Pro（脯氨酸）-Yaa（除这两个外的任意一个氨基酸）组成的三肽。

4 技术要求

4.1 原料和加工助剂要求

- 4.1.1 水产品（包括水产品的皮、刺、鳞）：应符合 GB 2733 要求。
 4.1.2 家畜家禽产品（包括家畜家禽产品的皮、骨、筋、腱）：应符合 GB 2707 要求。
 4.1.3 蛋白酶：为 GB2760 规定的酶制剂，应符合 GB 1886.174 的要求。
 4.1.4 水：应符合 GB 5749 要求。

4.2 感官要求

应符合表1的要求。

表1 感官要求

项 目	要 求	检 验 方 法
色 泽	白色至黄棕色	取5克左右的被测样品置于一洁净的白色瓷盘中，在自然光线下用肉眼观察其色泽和外观形态；看是否有外来异物，嗅其香气，辨其滋味
状 态	粉末状或颗粒状，无结块，无正常视力可见的外来异物	
滋味与气味	具有产品应有的滋味和气味，无异味	

3.3 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
水分, g/100g	≤	7.0
灰分, g/100g	≤	7.0
总氮, g/100g	≥	15.0
相对分子质量小于10000的胶原蛋白肽所占比例	≥	90.0
三肽, g/100g	≥	30.0

GB 5009.3
 GB 5009.4
 GB 5009.5
 GB 31645 附录A
 按附录A规定方法执行

表 2 理化指标（续表）

项 目	指 标	检验方法	
特征肽（Gly-Pro-Yaa+Gly-Hyp-Yaa） ^a g/100g	≥	20.0	按附录B规定方法执行
铅（以 Pb 计），mg/kg	≤	0.9	GB 5009.12
镉（以 Cd 计），mg/ kg	≤	0.1	GB 5009.15
总砷（以 As 计），mg/kg	≤	1.0	GB 5009.11
总汞（以Hg计），mg/ kg	≤	0.1	GB 5009.17
铬（以Cr计），mg/ kg	≤	2.0	GB 5009.123
^a 特征肽：Gly-Pro-Yaa 和 Gly-Hyp-Yaa 之和；该指标仅在供需合同有约定时测定。			

4.4 微生物限量

4.2.1 食品原料用产品微生物限量应符合表 3 的要求。

表 3 微生物限量

项 目	采样方案及限量（若非指定，均以/25g表示）				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	100	GB 4789.3
注：样品的采样及处理按GB 4789.1和GB/T 4789.25执行。					

4.2.2 直接食用产品微生物限量应符合表 4 的要求。

表 4 微生物限量

项 目	采样方案及限量（若非指定，均以/25g表示）				检验方法
	n	c	m	M	
菌落总数，CFU/g	5	2	10 ⁴	5×10 ⁴	GB 4789.2
大肠菌群，CFU/g	5	2	10	100	GB 4789.3
霉菌，CFU/g ≤	50				GB 4789.15
沙门氏菌	5	0	0	-	GB 4789.4
注：样品的采样及处理按GB 4789.1和GB/T 4789.25执行。					

4.5 净含量

应符合《定量包装商品计量监督管理办法》的规定，按 JJF1070 规定的方法检测。

5 食品添加剂

食品加工助剂的来源和用量应符合GB 2760的规定，质量应符合本标准3.1的规定。

6 生产加工过程的卫生要求

应符合 GB 14881 的要求。

7 检验规则

7.1 组批

以同一品种、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。

7.2 抽样

7.2.1 食品原料用产品：每批产品随机抽取 10~12 个完整的包装，在无菌条件下打开包装，每个包装取样 200g~300g 无菌独立包装，为供试验样品，5 个试验样品用于微生物指标检验，余下的用于理化检验和留样。

7.2.2 直接食用产品：每批产品随机抽取 10~12 个完整的包装，5 个试验样品用于微生物指标检验，余下的用于理化检验和留样。

7.3 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感官、净含量、水分、灰分、总氮、菌落总数、大肠菌群。

7.4 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，检验项目包括本标准技术要求中的 3.2-3.5 规定的项目。有下列情况之一时亦应进行型式检验。

- 产品正式投入生产时；
- 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；
- 出厂检验与上一次型式检验结果有较大差异时；
- 长期停产 6 个月以上，恢复生产时；
- 食品安全监督部门提出进行型式检验的要求时。

7.5 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。微生物指标不符合本标准要求时，判该批产品为不合格品，不得复检。微生物指标以外的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。

8 标签、标志、包装、运输、贮存

8.1 标签、标志

食品工业用产品销售标签应符合 GB 7718 的规定；直接食用的产品销售标签应符合 GB 7718 和 GB 28050 的规定；储运图示的标志应符合 GB/T 191 的规定。

8.2 包装

产品内包装材料为塑料袋或复合铝箔袋，塑料袋应符合 GB 4806.7 的规定，复合铝箔袋符合 GB/T 28118 的规定。销售包装应符合 GB 23350 的要求。包装规格根据市场需求包装。

8.3 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品质的物品混装、混运。

8.4 贮存

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品质的物品同库储存。

9 保质期

在符合本标准规定的条件下，产品保质期按标签标示执行。

附录 A
(规范性附录)
三肽的检测方法

A.1 三肽的测定方法

A.1.1 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 220nm 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,通过面积归一化法计算水解液不同分子量肽段分布比例。

A.1.2 试剂

- A.1.2.1 乙腈:色谱纯。
- A.1.2.2 三氟乙酸:分析纯。
- A.1.2.3 水:GB/T6682规定的一级水。
- A.1.2.4 相对分子质量校正曲线所用标准品。
- A.1.2.5 细胞色素 C (12,384 Da)。
- A.1.2.6 抑肽酶 (6,511 Da)。
- A.1.2.7 杆菌肽 (1,450 Da)。
- A.1.2.8 氧化型谷胱甘肽 (651 Da)。
- A.1.2.9 甘氨酸-脯氨酸-羟脯氨酸 (280 Da)。
- A.1.2.10 甘氨酸-甘氨酸-甘氨酸 (189 Da)。

A.1.3 仪器和设备

- A.1.3.1 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.1.3.2 流动相真空抽滤脱气装置。
- A.1.3.3 超声波振荡器。
- A.1.3.4 分析天平:感量0.0001 g。

A.1.4 色谱条件与系统适应性实验

- A.1.4.1 色谱柱:TSKgel G 2000swxl 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三肽分子量肽段分布的凝胶柱。
- A.1.4.2 流动相:乙腈:水:三氟乙酸,体积比为40:60:0.05。
- A.1.4.3 检测波长220 nm。
- A.1.4.4 流速:0.5 mL/min。
- A.1.4.5 柱温:30℃。

A. 1.4.6 进样体积:10 μL 。

A. 1.4.7 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(乙氨酸-乙氨酸乙氨酸)峰计算不低于5000,蛋白肽的分配系数(K)应在0~1之间。

A. 1.5 相对分子质量校正曲线制作

分别用流动相配制浓度为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($\lg\text{MW}$)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. 1.6 样品制备

用称量纸称取样品125.0mg左右,转移至25mL容量瓶中,用流动相定容至刻度,超声振荡10min,0.2 μm ~0.5 μm 测定。

A. 1.7 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,用峰面积归一化法计算相对分子质量介于189~500 Da的胶原蛋白肽的相对百分比含量。

附录 B

特征肽含量检测方法

(液相色谱质谱联用法)

B.1 方法提要

采用液相色谱质谱联用法测定,即利用超高效液相色谱仪对复杂样品进行分离,以三重四级杆质谱仪作为定性和定量分析平台。采用合成肽作为目标肽的标准品,根据多肽序列计算目标肽的质荷比,利用多反应监测模式获得目标肽的特征碎片图谱,并选取高强度子离子为目标子离子。标准品稀释至不同浓度进行质谱检测,进行面积积分分析后,绘制标准曲线,应用于计算复杂样品中目标肽的浓度。

B.2 试剂

B.2.1 水: GB/T 6682规定的一级水。

B.2.2 乙腈: 质谱纯。

B.2.3 甲酸: 质谱纯。

B.2.4 甘氨酸脯氨酸羟脯氨酸 (Gly-Pro-Hyp) 标准品: 纯度 $\geq 98\%$ 。

B.2.5 甘氨酸羟脯氨酸丙氨酸 (Gly-Hyp-Ala) 标准品: 纯度 $\geq 98\%$ 。

B.3 仪器和设备

B.3.1 超高效液相色谱-三重四极杆串联质谱仪: 配有电喷雾离子源, 含有数据处理软件的工作站。

B.3.2 超声波振荡器。

B.3.3 分析天平: 感量为0.01 mg。

B.4 仪器参考条件

B.4.1 液相色谱参考条件

B.4.1.1 色谱柱: Atlantis T3 C18 Column (15 cm $\times$ 2.1 mm, 5 μ m)或其它性能相当的色谱柱。

B.4.1.2 流动相: 采用梯度洗脱, 流动相组成和洗脱梯度见表 B.4.1。

表 B.4.1 流动相组成

时间/min	0.1%甲酸水溶液	含有 0.1%甲酸的 95%乙腈水溶液
0	100	0
5	100	0
10	80	20
15	60	40
20	20	80
25	20	80
25.1	100	0
35	100	0

B.4.1.3 流速：0.35 mL/min。

B.4.1.4 柱温：40℃。

B.4.1.5 进样体积：5 μL。

B.4.2 质谱仪参考条件

B.4.2.1 喷雾电压：4.0 kV。

B.4.2.2 干燥气温度：300℃。

B.4.2.3 喷雾压力：35 psi。

B.4.2.4 干燥气流速：8 L/min。

B.4.2.5 扫描模式：母离子扫描模式（Precursor Scan）。

B.4.2.6 碰撞能量及检测离子见表B.4.2。

表 B.4.2 碰撞能量及检测离子

特征肽类型	标准品	碰撞能量(eV)	特征碎片离子	母离子扫描范围(m/z)
Gly-Pro-Yaa	Gly-Pro-Hyp	20	[Gly-Pro-46] ⁺ , m/z 127	189-337
Gly-Hyp-Yaa	Gly-Hyp-Ala	30	[Gly-Hyp-46] ⁺ , m/z 143	189-353

B.4.3 标准品层析图谱

B.4.4 样品制备

称取0.5 g样品，转移到10 mL容量瓶中，用0.1%甲酸水溶液定容到刻度，超声震动10 min，用0.22 μm 过滤膜过滤，滤液用于测定。

B.4.5 标准曲线制作

使用1 mg/mL 的混合标准储备液，配制六个不同浓度的标准溶液。通过高效液相色谱三重四级杆质谱法进行特征肽片段准确定量，以标准品浓度对曲线面积作图或作线性回归得到样品浓度校正曲线及其方程，计算回归方程以及相关系数（r²）。

B.5 样品浓度测定

将 B.4.4 制备的样品溶液在 B.4.1 和 B.4.2 条件下进样分析，记录标准工作液的离子流图，以浓度为横坐标，母离子峰面积为纵坐标，进行线性回归。记录样品溶液的离子流图，将母离子峰面积代入线性回归方程，计算样品溶液中各类型特征肽的浓度。

样品中特征肽含量按下式计算：

$$X_i = \frac{c_i \times V}{m \times 10000} \quad (1)$$

$$X = X_{\text{Gly-Pro-Yaa}} + X_{\text{Gly-Hyp-Yaa}} \quad (2)$$

其中：

X—样品中特征肽含量，单位为克每百克（g/100 g）；

X_i—样品中各类型特征肽含量，单位为克每百克（g/100 g）；

c_i —样品溶液中各类型特征肽的浓度，单位为微克每升 ($\mu\text{g/mL}$)；

V —样品定容体积，单位为毫升 (mL)；

m —称样量，单位为克 (g)。

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。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%。
