

ICS 67.120.20  
CCS X 10

# CAAPP

## 中国畜产品加工研究会团体标准

T/CAAPP 00020—2024

### 蛋膜肽

Eggshell membrane peptide

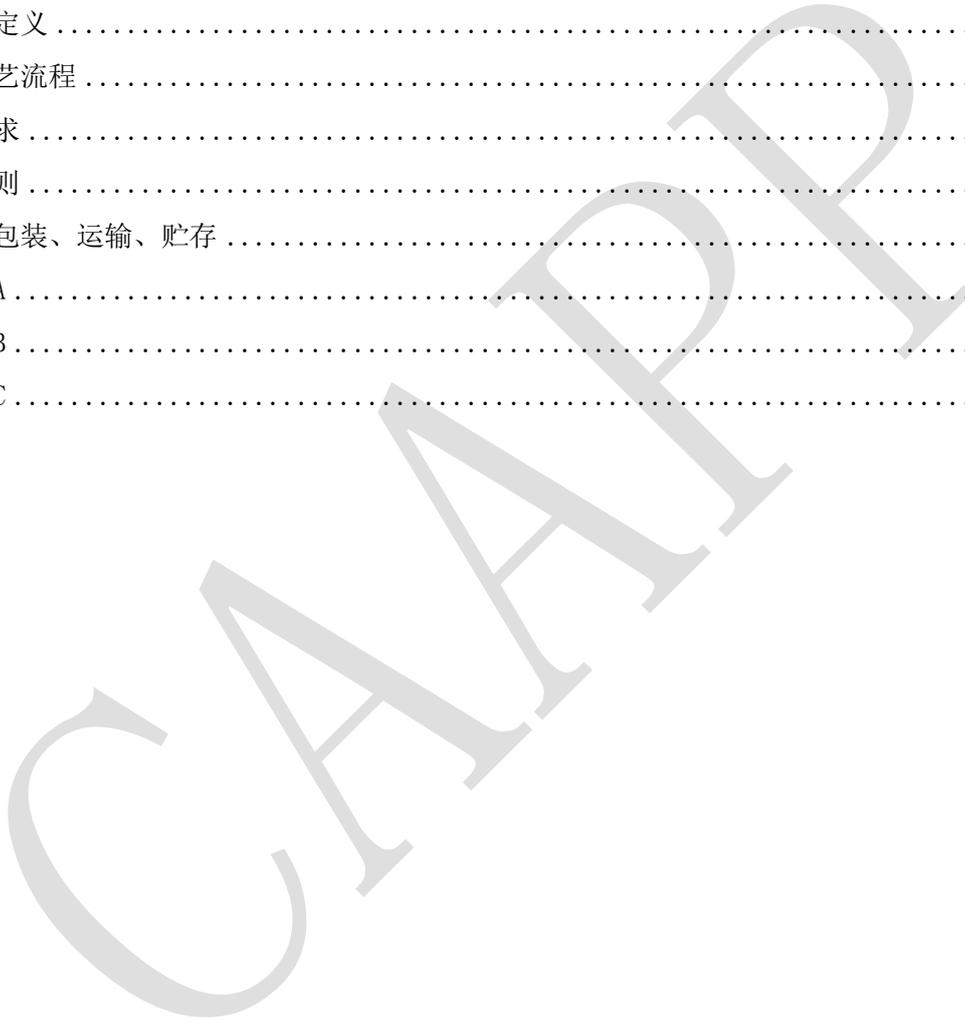
2024 - 05 -15 发布

2024 - 06 -15 实施

中国畜产品加工研究会 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 .....	2
4 生产工艺流程 .....	2
5 技术要求 .....	2
6 检验规则 .....	4
7 标签、包装、运输、贮存 .....	4
附 录 A .....	6
附 录 B .....	8
附 录 C .....	11



## 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。

本文件由中国畜产品加工研究会提出并归口。

本文件起草单位：湖北神地农业科贸有限公司、华中农业大学、湖北神地生物科技有限公司、湖北神地汇丰科技有限公司。

本文件主要起草人：杨丰帆、马美湖、高宇洁、彭丽、黄茜、盛龙、何羽婧、王丽梅、杨砚、邹敏、王鑫涛、赵特。

本文件为首次发布。

使用本文件应征得发布单位同意。

CAAPP

# 蛋膜肽

## 1 范围

本文件规定了蛋膜肽的术语和定义、生产工艺流程、技术要求、检验规则及标签、包装、运输、贮存的要求。

本文件适用于以鸡蛋为原料，经清洁除菌、打蛋、收集蛋壳、壳膜水法分离、收集蛋壳膜、干燥、粉碎、酶解、灭酶、过滤、精制或不精制、浓缩、灭菌、干燥、包装等工艺制得的蛋膜肽产品。

## 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/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 2749 食品安全国家标准 蛋与蛋制品
- GB 2760 食品安全国家标准 食品添加剂使用标准
- 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
- GB 4789.4 食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验
- GB 4789.10 食品安全国家标准 食品微生物学检验 金黄色葡萄球菌检验
- GB 4789.15 食品安全国家标准 食品微生物学检验 霉菌和酵母计数
- GB 4806.7 食品安全国家标准 食品接触用塑料材料及制品
- GB 4806.13 食品安全国家标准 食品接触用复合材料及制品
- GB 5009.3 食品安全国家标准 食品中水分的测定
- GB 5009.5 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 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/T 8946 塑料编织袋通用技术要求
- GB 14881 食品安全国家标准 食品生产通用卫生规范
- GB/T 22492 大豆肽粉
- 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 29921 食品安全国家标准 食品中致病菌限量
- GB 31645 食品安全国家标准 胶原蛋白肽
- NY/T4279-2023 洁蛋生产技术规程
- JJF 1070 定量包装商品净含量计量检验规则

国家质量监督检验检疫总局令第75号《定量包装商品计量监督管理办法》

国家质量监督检验检疫总局令第102号《食品标识管理规定》

### 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

#### 3.1 蛋壳内膜 eggshell membrane

又称蛋壳膜或蛋膜，是蛋壳内蛋白外的白色薄膜，由蛋白膜和内蛋壳膜组成。

#### 3.2 蛋膜肽 eggshell membrane peptide

以鸡蛋为原料，经清洁除菌、打蛋、收集蛋壳、壳膜水法分离、收集蛋壳膜、干燥、粉碎、酶解、灭酶、过滤、精制或不精制、浓缩、灭菌、干燥等工艺制得的，主要成分相对分子质量低于10 000的肽类产品。

#### 3.3 清洁除菌 cleaning and degerming

对鸡蛋进行淋湿、刷洗、清洗或拭擦等程序，除去蛋壳表面微生物、禽粪与污垢，直到无肉眼可见污物，在清洗水中添加禽蛋清洗除菌剂或清洗消毒剂，以提高清洗除菌、脱垢的效果。

#### 3.4 壳膜水法分离 water separation of eggshell and membrane

以水为分离介质，采用人工或机械方式分离蛋壳和蛋膜。

### 4 生产工艺流程

鸡蛋收集→清洁除菌→打蛋→收集蛋壳→去除残留蛋清→烘干→粗粉碎→壳膜水法分离→收集蛋膜→干燥→粉碎→酶解→灭酶活→过滤→精制或不精制→浓缩→灭菌→干燥→粉碎或不粉碎→包装

### 5 技术要求

#### 5.1 原辅料要求

5.1.1 鸡蛋：应符合 GB 2749 的规定。

5.1.2 酶制剂：应符合 GB 1886.174 的规定。

5.1.3 生产用水：应符合 GB 5749 的规定。

#### 5.2 感官要求

蛋膜肽的感官指标应符合表 1 的规定。

表 1 感官要求

项 目	指 标	检验方法
色 泽	米白色至略带黄色	随机取 5g 蛋膜肽置于一清洁、干燥的白瓷盘中，在自然光线下目测其色泽和状态，取 100 mL 温开水（50℃ 以下）于无色透明的容器内冲溶稀释后，立即嗅其气味，辨其滋味，观察有无外来异物。
状 态	粉末、无结块	
滋、气味	具有本产品固有的滋味和气味，无异味	
外观及杂质	无肉眼可见外来异物	

### 5.3 理化指标

蛋膜肽的理化指标应符合表 2 的规定。

表 2 理化指标

项 目	指 标	检验方法	
水分/ (g/100g)	≤	7.0	GB 5009.3 (第一法)
蛋白质/ (g/100g)	≥	60	GB 5009.5 (第一法)
透明质酸/ (g/100g)	≥	0.5	附录 A
胶原蛋白 (以羟脯氨酸测定值换算) / (g/100g)	≥	3	附录 B
硫酸软骨素 (以硫酸粘多糖计) / (g/100g)	≥	0.2	附录 C
肽含量/ (g/100g)	≥	50	GB/T 22492 附录 B
相对分子质量< 10 000 的肽占肽含量的比例 /%	≥	80	GB 31645 附录 A
钙/ (mg/kg)	≤	180	GB 5009.92 (第一法)
铅 (以 Pb 计) / (mg/kg)	≤	0.2	GB 5009.12 (第一法)
砷/ (mg/kg)	≤	0.25	GB 5009.11 (第一法)
汞/ (mg/kg)	≤	0.05	GB 5009.17 (第一法)
镉/ (mg/kg)	≤	0.05	GB 5009.15

### 5.4 微生物指标

蛋膜肽的微生物指标应符合表 3 的规定。

表 3 微生物指标

项 目	采样方案 <sup>a</sup> 及限量				检验方法
	n	c	m	M	
菌落总数/ (CFU/g)	5	2	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	GB 4789.2
霉菌和酵母菌/ (CFU/g)	5	2	10	50	GB 4789.15 (第一法)
大肠菌群/ (CFU/g)	5	2	10	10 <sup>2</sup>	GB 4789.3 (第二法)
金黄色葡萄球菌/ (/25g)	5	2	0	-	GB 4789.10 (第一法)
沙门氏菌/ (/25g)	5	2	0	-	GB 4789.4

<sup>a</sup> 样品的采集及处理按照 GB 4789.1 执行。

## 5.5 食品添加剂

食品添加剂的使用应符合 GB 2760 的规定。

## 5.6 净含量及允许短缺量

应符合国家质量监督检验检疫总局令第75号《定量包装商品计量监督管理办法》的规定，按JJF 1070 规定的方法测定。

## 5.7 生产加工过程卫生要求

应符合 GB 14881 的规定。

## 6 检验规则

### 6.1 抽样

6.1.1 同一批原料、同一班次、同一生产线生产的包装完好的同一品种、同一规格产品为一批。

6.1.2 随机抽取同一批次产品。抽样人员需携带取样工具和盛装样品的容器。从同一批次样品堆的不同部位抽取相应数量的样品。抽取样品量不少于 5 个独立包装，总量不少于 500 g。将抽取的样品通过四分法分样，取出一部分供检验。

### 6.2 出厂检验

6.2.1 成品出厂前须经生产企业质量检验部门按本标准规定的出厂检验项目逐批检验，合格后方可出厂。

6.2.2 出厂检验项目包括：感官要求、净含量、蛋白质、水分、菌落总数、大肠菌群，微生物指标不得复检。

### 6.3 型式检验

6.3.1 型式检验项目为本标准中规定的全部项目。

6.3.2 型式检验正常生产时每年进行一次，有下列情况之一时应进行型式检验：

- a) 新产品投产前；
- b) 原料变化或改变主要生产工艺，可能影响产品质量时；
- c) 停产三个月以上，恢复生产时；
- d) 出厂检验与上次型式检验有较大差异时；
- e) 国家监管机构提出进行型式检验的要求时。

### 6.4 判定规则

全部项目的检验结果都符合本标准要求则判为合格品。微生物指标中有一项检验结果不符合本标准要求时，判该批产品为不合格品。除微生物指标外，其他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验一次，判定以复验结果为准，若仍有一项指标不合格，则判该批产品为不合格品。

## 7 标签、包装、运输、贮存

### 7.1 标签

7.1.1 包装储运图示标志应符合 GB/T191 规定。

7.1.2 预包装食品标签应符合 GB 7718、GB 28050 的规定；不适宜人群包括：婴幼儿、孕妇、哺乳期妇女、对鸡蛋过敏者。

## 7.2 包装

所用包装材料应符合相应的食品包装材料卫生要求。产品内包装采用塑料包装袋、复合包装袋，塑料包装袋应符合GB 4806.7，复合包装袋应符合GB 4806.13的规定；产品外包装为纸盒、瓦楞纸箱或塑料编织袋，瓦楞纸箱应符合GB/T 6543的规定，塑料编织袋应符合GB/T 8946的规定。

## 7.3 运输

7.3.1 运输过程中温度应控制在  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 。

7.3.2 运输工具应保持清洁、卫生。产品不得与有毒、有害、有腐蚀性、易挥发或有异味的物品混装运输。

7.3.3 搬动时应轻拿轻放，严禁扔摔、撞击、挤压。

7.3.4 运输过程不得暴晒、雨淋、受潮。

## 7.4 贮存

产品应贮存在 $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 的阴凉、干燥、通风的室内，离地离墙存放。不得与有毒、有害、有腐蚀性、易挥发或有异味的物品同库贮存。

## 7.5 保质期

在本标准规定的包装、运输、贮存条件下，保质期为18个月。

---

## 附录 A

## (规范性附录)

## 透明质酸的测定 分光光度法

## A.1 原理

本方法规定了蛋膜肽中透明质酸含量的分光光度法测定。透明质酸中含有等量摩尔比的 N-乙酰氨基葡萄糖和葡萄糖醛酸，用硼砂作化剂对透明质酸用硫酸进行酸解，可将葡萄糖醛酸内酯分离出来。葡萄糖醛酸内酯与吡唑反应形成有机络合物，该络合物显示特有的颜色，其吸光度和葡萄糖醛酸内酯的浓度成正比。通过葡萄糖醛酸内酯的含量可以确定透明质酸的含量。

## A.2 仪器

A.2.1 分析天平，感量为0.1 mg。

A.2.2 紫外可见分光光度计。

A.2.3 涡旋振荡器。

## A.3 试剂和材料

本方法除特殊规定外，所用试剂为分析纯。

A.3.1 水：蒸馏水。

A.3.2 一次性紫外可见比色皿（比色皿1 cm×1 cm）。

A.3.3 带盖玻璃试管10 mL。

A.3.4 70%乙醇。

A.3.5 四硼酸钠（CAS号：1303-96-4）。

A.3.6 96%硫酸（ACS级）（CAS号：7664-93-9）。

A.3.7 葡萄糖醛酸内酯（CAS号：32449-92-6）：纯度99%。

A.3.8 苯甲酸（CAS号：65-85-0）。

A.3.9 吡唑（CAS号：86-74-8）。

A.3.10 硼砂溶液：准确称取0.953 g四硼酸钠于100 mL容量瓶中，用96%硫酸定容。

A.3.11 吡唑溶液：准确称取0.125 g吡唑，置于100 mL容量瓶中，用70%乙醇溶解并定容。

A.3.12 苯甲酸溶液：准确称取1 g苯甲酸加入200 mL水中，搅拌溶解。

A.3.13 标准储备液：精确称量0.050 g葡萄糖醛酸内酯（A.3.7），放入100 mL容量瓶，用苯甲酸溶液溶解并定容至100 mL。

## A.4 标准溶液的配制

A.4.1 15 μg/mL标准品：用水将300 μL标准品储备液（A.3.13）稀释至10 mL，现用现配。

A.4.2 30 μg/mL标准品：用水将600 μL标准品储备液（A.3.13）稀释至10 mL，现用现配。

A.4.3 45 μg/mL标准品：用水将900 μL标准品储备液（A.3.13）稀释至10 mL，现用现配。

## A.5 样品准备

A.5.1 空白样-水。

A.5.2 样品稀释（现用现配）。

A.5.2.1 1:10稀释：准确称取11 g样品加入99 mL水中。（稀释因子=10）

A.5.2.2 1:100稀释：准确量取1 mL 1:10稀释液，加入99 mL的水，混匀备用。（稀释因子=100）

A.5.2.3 1:1000稀释：准确量取1 mL 1:100稀释液，加入99 mL的水，混匀备用。（稀释因子=1000）

A.5.2.4 如果吸光度值不在15  $\mu\text{g/mL}$ 标准品和45  $\mu\text{g/mL}$ 标准品的吸光度范围内，则可能需进一步稀释以得到精确结果。

## A.6 操作步骤

A.6.1 为各样品稀释液、空白样品和标准品分别准备一个有盖玻璃试管。

A.6.2 吸取2.5 mL含四硼酸钠硫酸置于各试管中。

A.6.3 吸取0.5 mL空白样、标准品和样品稀释液至相应试管中。

A.6.4 盖紧试管盖子，冰浴冷却至室温。

A.6.5 用涡旋振荡器振荡试管不少于10 s。

A.6.6 用沸水浴加热10 min。

A.6.7 冰浴冷却至室温。

A.6.8 在各试管中分别加入0.1 mL吡啶溶液。

A.6.9 盖紧试管盖子，用涡旋振荡器混匀不少于10 s。

A.6.10 沸水浴加热15 min。

A.6.11 冰浴冷却至室温。

## A.7 测定

A.7.1 使紫外-可见分光光度计在530 nm处归零，样品槽为空。

A.7.2 测量样品稀释液、空白样、标准品的吸光度。

根据空白样和标准稀释液建立标准曲线，该标准曲线的相关系数  $R^2$  值应 $\geq 0.98$ 。

注：空白样的吸收率应低于0.09，45  $\mu\text{g/mL}$ 的葡萄糖醛酸内酯的吸收率应大于0.35。

## A.8 计算

$$X = \frac{C \times f \times 2.15}{m \times 1000000} \times 100$$

式中：

$X$ ——试样中透明质酸的含量，（g/100 g）；

$C$ ——根据标准曲线获得的试样溶液中葡萄糖醛酸内酯的含量，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g/mL}$ ）；

$f$ ——稀释因子，单位为毫升（mL）；

$m$ ——样品重量，单位为克（g）；

2.15——透明质酸分子量（379.32）/葡萄糖醛酸内酯分子量（176.12）；

1000000——单位微克（ $\mu\text{g}$ ）换算为克（g）的系数。

计算结果保留三位有效数字。

## 附录 B

## (规范性附录)

## 胶原蛋白的测定 分光光度法

## B.1 原理

本测试方法规定了蛋膜肽中的胶原蛋白含量的分光光度法测定。羟脯氨酸在胶原蛋白中的平均含量为 12.5%，因此用转换系数 8 将羟脯氨酸值转换为胶原蛋白，用于蛋膜肽中的胶原蛋白含量的测定。

## B.2 仪器

B.2.1 分析天平（感量0.0001 g和0.001 g）。

B.2.2 紫外可见分光光度计：可用波长558 nm $\pm$ 2 nm；使用光电比色计，其中干涉波器最大吸收波558 nm $\pm$ 2 nm。

B.2.3 干燥箱：可控温于105℃ $\pm$ 1℃。

B.2.4 pH计。

B.2.5 水浴锅：可控温于60℃ $\pm$ 0.5℃。

## B.3 试剂和材料

本方法除特殊规定外，所用试剂为分析纯。

B.3.1 浓硫酸（CAS号：7664-93-9），浓度98%。

B.3.2 一水柠檬酸（CAS号：5949-29-1），纯度99%。

B.3.3 氢氧化钠（CAS号：1310-73-2）。

B.3.4 三水醋酸钠（CAS号：6131-90-4），纯度99%。

B.3.5 1-丙醇（CAS号：71-23-8），浓度98%。

B.3.6 三水 N-氯-对甲苯磺酰胺钠盐（氯胺 T）（CAS号：7080-50-4）。

B.3.7 4-对二甲氨基苯甲醛（CAS号：100-10-7）。

B.3.8 高氯酸（60%,w/w）（CAS号：7601-90-3）。

B.3.9 异丙醇（2-丙醇）（CAS号：67-63-0）。

B.3.10 4-羟基-L-脯氨酸（CAS号：51-35-4）。

B.3.11 3.5 mol/L硫酸溶液：取250 mL蒸馏水加入500 mL容量瓶中，然后缓慢加入95 mL浓硫酸，冷却后用蒸馏水定容。

B.3.12 6 mol/L氢氧化钠配制：将24 g氢氧化钠（B.3.3）溶解于50 mL蒸馏水中，转移至100 mL容量瓶中，用蒸馏水定容。

B.3.13 缓冲液：将30 g一水合柠檬酸、62.5 mL的6 mol/L氢氧化钠、15 g三水醋酸钠溶解于约500 mL蒸馏水中。转移至1 L容量瓶中，加入290 mL 1-丙醇。用浓硫酸调节pH至6.0，然后用蒸馏水定容。该缓冲液可在4℃下避光稳定保存2个月。

B.3.14 氧化液：将1.41 g氯胺T试剂溶解于100 mL缓冲液中。临用前配制。

B.3.15 显色试剂：将2.5 g 4-对二甲氨基苯甲醛加入8.75 mL高氯酸中，溶解，边搅拌边缓慢加入16.25 mL异丙醇（2-丙醇）。现配现用。

B.3.16 圆底或平底烧瓶：容量约为200 mL，宽颈。

- B. 3. 17 比色皿：光程为10 mm。  
 B. 3. 18 表面皿：直径为5 cm~6 cm。  
 B. 3. 19 容量瓶：250 mL。

#### B. 4 标准溶液的配制

- B. 4. 1 羟脯氨酸标准储备液（600 μg/mL）：准确称取60 mg 4-羟基-L-脯氨酸，用蒸馏水溶解，并于100 mL的容量瓶定容，4℃下保存2个月。  
 B. 4. 2 羟脯氨酸中间液（6.0 μg/mL）：用蒸馏水将2.5 mL储备液稀释至250 mL，现配现用。  
 B. 4. 3 羟脯氨酸工作液。  
 B. 4. 3. 1 空白样：蒸馏水。  
 B. 4. 3. 2 S1（0.6 μg/mL）：取10.0 mL羟脯氨酸中间液用蒸馏水稀释至100 mL。  
 B. 4. 3. 3 S2（1.2 μg/mL）：取20.0 mL羟脯氨酸中间液用蒸馏水稀释至100 mL。  
 B. 4. 3. 4 S3（1.8 μg/mL）：取30.0 mL羟脯氨酸中间液用蒸馏水稀释至100 mL。  
 B. 4. 3. 5 S4（2.4 μg/mL）：取40.0 mL羟脯氨酸中间液用蒸馏水稀释至100 mL。

#### B. 5 样品准备

- B. 5. 1 准确称量约4 g样品(精确至0.001 g)于烧瓶中，避免试样粘在烧瓶壁上。  
 B. 5. 2 缓慢加入30 mL 3.5 mol/L 硫酸溶液至烧瓶中，用表面皿盖住，于105℃干燥箱内恒温16 h。  
 B. 5. 3 储备样品：用圆形滤纸趁热将水解产过滤至500 mL容量瓶中。用10 mL 3.5 mol/L硫酸溶液分三次洗涤烧瓶和滤纸，合并至上述容量瓶中。用水定容，摇匀。  
 B. 5. 4 测定制剂：用蒸馏水稀释3.0 mL储备样品滤液定容至100 mL。

#### B. 6 操作步骤

- B. 6. 1 吸取2.0 mL测定制剂和羟脯氨酸工作溶液（B.4.3）至各试管中。  
 B. 6. 2 各试管中加入1.0 mL的氧化液，混合均匀，室温静置20 min。  
 B. 6. 3 加入1.0 mL的显示剂，混合均匀，水浴加热至60℃，保持15 min。  
 B. 6. 4 加热结束后，将试管置于冰浴冷却3-6 min，待测。  
 B. 6. 5 使紫外-可见分光光度计在558 nm处归零，样品槽为空。  
 B. 6. 6 用紫外-可见分光光度计测定样品、标准品和空白样在558 nm处的吸光度。  
 B. 6. 7 根据空白样和中间液建立标准曲线（吸光度-标准品浓度，μg/mL），标准曲线相关系数R<sup>2</sup>值应≥0.98。根据线性回归分析，用下式计算胶原蛋白浓度。

$$X = \frac{C \times V_1 \times V_2 \times 8}{V_3 \times m \times 1000000} \times 100$$

式中：

- X——试样中胶原蛋白的含量，（g/100 g）；  
 C——根据标准曲线获得的试样溶液中羟脯氨酸的含量，单位为微克每毫升（μg/mL）；  
 V<sub>1</sub>——初始稀释容积，单位为毫升（mL）；  
 V<sub>2</sub>——最终稀释容积，单位为毫升（mL）；  
 V<sub>3</sub>——滤液量体积，单位为毫升（mL）；  
 m——样品重量，单位为克（g）；

8——羟脯氨酸和胶原蛋白含量之间的转换系数；

1000000——单位微克（ $\mu\text{g}$ ）换算为克（g）的系数。

计算结果保留三位有效数字。

CAAPP

## 附 录 C

(规范性附录)

## 硫酸软骨素的测定 分光光度法

## C.1 原理

本测试方法规定了样品制剂的酶解条件,以及蛋膜肽中硫酸软骨素的含量测定的方法。1,9-二甲基亚甲基蓝氯化锌复盐是一种阳离子染料,能特异性结合硫酸软骨素并显示特有的颜色,其吸光度与硫酸软骨素的含量成正比。

## C.2 仪器

- C.2.1 分析天平(0.1 mg)。
- C.2.2 紫外可见分光光度计。
- C.2.3 带温度计的加热器或加热罩。
- C.2.4 带加热及磁力搅拌的温度控制器。

## C.3 试剂和材料

本方法除特殊规定外,所用试剂为分析纯。

- C.3.1 半微量比色皿。
- C.3.2 容量可调节移液器(满足 40  $\mu$ L, 960  $\mu$ L 和 1000  $\mu$ L)。
- C.3.3 圆底烧瓶: 100 mL。
- C.3.4 容量瓶: 500 mL, 10 mL。
- C.3.5 硫酸软骨素A钠盐(来源于牛气管)(CAS号: 39455-18-0)。
- C.3.6 1,9-二甲基亚甲基蓝氯化锌复盐(CAS号: 931418-92-7)。
- C.3.7 甲酸, 99%(CAS号: 64-18-6)。
- C.3.8 三(羟甲基)氨基甲烷(CAS号: 77-86-1)。
- C.3.9 碱性蛋白酶(CAS号: 9014-01-1)。
- C.3.10 L-半胱氨酸盐酸盐一水合物(CAS号: 7048-04-6)。
- C.3.11 碳酸钠(CAS号: 497-19-8)。
- C.3.12 含DMMB的甲酸缓冲液, pH 3.3——将10.7 mg 1,9-二甲基亚甲基蓝氯化锌复盐和900 mL蒸馏水加入1000 mL容量瓶中,搅拌至完全溶解。加入2.1 mL 99%甲酸,用1 M的NaOH将pH值调至3.3。用蒸馏水定容。
- C.3.13 Tris溶液(2 M)——将24.228 g三(羟甲基)氨基甲烷加入装有90 mL左右蒸馏水的100 mL量瓶中。搅拌至溶解,然后用蒸馏水定容。
- C.3.14 DMMB-Tris——测定前,将9 mL含DMMB的甲酸缓冲液(C.3.12)和1 mL Tris溶液(C.3.13)混合。该混合液不稳定,必须在制备后15 min内使用。

## C.4 标准溶液的配制

- C.4.1 硫酸软骨素标准储备液(1000  $\mu$ g/mL): 将25 mg硫酸软骨素A钠盐溶于蒸馏水,定容于25 mL容量瓶中。4  $^{\circ}$ C条件下稳定保存一周。

- C. 4. 2 硫酸软骨素工作溶液：溶液可在4℃条件下稳定保存一周。
- C. 4. 3 S1（15 μg/mL）：用蒸馏水稀释150 μL硫酸软骨素标准储备液至10 mL。
- C. 4. 4 S2（30 μg/mL）：用蒸馏水稀释300 μL硫酸软骨素标准储备液至10 mL。
- C. 4. 5 S3（45 μg/mL）：用蒸馏水稀释450 μL硫酸软骨素标准储备液至10 mL。
- C. 4. 6 S4（60 μg/mL）：用蒸馏水稀释600 μL硫酸软骨素标准储备液至10 mL。
- C. 4. 7 S5（75 μg/mL）：用蒸馏水稀释750 μL硫酸软骨素标准储备液至10 mL。

## C. 5 样品准备

- C. 5. 1 准确称取2 g样品，242 mg L-半胱氨酸盐酸盐一水合物及212.5 mg碳酸钠至100 mL圆底烧瓶中，加入40 mL蒸馏水，放置磁力搅拌棒。
- C. 5. 2 将烧瓶置于加热器或加热罩中，以450 rpm速率搅拌，同时在55℃温度下加热5~10 min使酸碱中和，然后加入酶。
- C. 5. 3 称量400 mg碱性蛋白酶，转移至圆底烧瓶中。可用少量蒸馏水辅助或冲洗烧瓶瓶壁。
- C. 5. 4 加入碱性蛋白酶后55℃继续加热并搅拌60 min。
- C. 5. 5 样品必须完全溶解，这样才能保证有效酶解。如果酶解不完全，需用新的取样并重复步骤C.5.1-C.5.4
- C. 5. 6 将烧瓶从加热器或加热罩中移除，用蒸馏水稀释内容物至500 mL（样品制剂）。

## C. 6 操作步骤

- C. 6. 1 紫外-可见分光光度计在525 nm处归零，样品槽中有一空比色皿。
- C. 6. 2 将40 μL蒸馏水（空白样）、样品制剂（三份）或硫酸软骨素工作液（C.4.2）吸取至单独的半微量比色皿中。
- C. 6. 3 将比色皿放入仪器中，小心吸取960 μL DMMB-Tris(C.3.14)至其中一个比色皿中（C.6.1）。
- C. 6. 4 加入DMMB-Tris 30 s后，在525 nm处测量溶液的吸光度。
- C. 6. 5 其余比色皿重复步骤C.6.3和C.6.4。
- C. 6. 6 如果吸光度值不在S1（15 μg/mL）和S5（75 μg/mL）标准品的吸光度范围内，则需调整样品制剂的稀释方案。
- C. 6. 7 建立标准曲线（吸光度-标准品浓度），然后通过线性回归分析用以下等式计算硫酸软骨素（sGAG）含量，以样品百分比计：

$$X = \frac{C \times V}{m \times 1000000} \times 100$$

式中：

X——试样中硫酸软骨素的含量，（g/100g）；

C——根据标准曲线获得的试样溶液中硫酸软骨素的含量，单位为微克每毫升（μg/mL）；

V——样品制剂的稀释容积，单位为毫升（mL）；

m——样品重量，单位为克（g）；

1000000 ——单位微克（μg）换算为克（g）的系数。

计算结果保留三位有效数字。