



中华人民共和国国家标准

GB/T 22729—2008

海洋鱼低聚肽粉

Oligopeptides powder of marine fish

2008-12-31 发布

2009-08-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局 发布
中国国家标准化管理委员会

前 言

本标准的附录 A 为规范性附录。

本标准由全国食品工业标准化技术委员会提出。

本标准由全国特殊膳食标准化技术委员会归口。

本标准起草单位：中国食品发酵工业研究院、浙江海氏生物科技有限公司、北京中食海氏生物技术有限公司、北京同仁堂健康药业股份有限公司、江南大学分析测试中心。

本标准主要起草人：蔡木易、易维学、陈岩、戴军、张宏、徐亚光、谷瑞增、张如民。

海洋鱼低聚肽粉

1 范围

本标准规定了海洋鱼低聚肽粉的产品分类、技术要求、试验方法、检验规则以及标签、包装、运输和贮存。

本标准适用于海洋鱼低聚肽粉产品的生产、检验和销售。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

- GB 2733 鲜、冻动物性水产品卫生标准
- GB/T 4789.2 食品卫生微生物学检验 菌落总数测定
- GB/T 4789.3 食品卫生微生物学检验 大肠菌群测定
- GB/T 4789.4 食品卫生微生物学检验 沙门氏菌检验
- GB/T 4789.5 食品卫生微生物学检验 志贺氏菌检验
- GB/T 4789.10 食品卫生微生物学检验 金黄色葡萄球菌检验
- GB/T 4789.15 食品卫生微生物学检验 霉菌和酵母计数
- GB/T 5009.3 食品中水分的测定
- GB/T 5009.4 食品中灰分的测定
- GB/T 5009.5 食品中蛋白质的测定
- GB/T 5009.11 食品中总砷及无机砷的测定
- GB/T 5009.12 食品中铅的测定
- GB/T 5009.15 食品中镉的测定
- GB/T 5009.17 食品中总汞及有机汞的测定
- GB/T 5009.92 食品中钙的测定
- GB/T 5009.124 食品中氨基酸的测定
- GB/T 9695.23 肉与肉制品 羟脯氨酸含量测定

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

海洋鱼低聚肽粉 oligopeptides powder of marine fish

以海洋鱼皮、鱼骨或鱼肉为原料,用酶解法生产的、相对分子质量低于1 000 u的低聚肽(短肽)为主要成分的粉末状产品。

3.2

胶原 collagen

鱼、牛、猪等动物的皮、骨等组织中一类含特有的羟脯氨酸的无支链纤维蛋白质。

4 产品分类

4.1 分类原则

产品按原料分为三类。

4.2 类别

4.2.1 海洋鱼皮胶原低聚肽粉

以海洋鱼皮为原料生产的低聚肽粉产品。

4.2.2 海洋鱼骨胶原低聚肽粉

以海洋鱼骨为原料生产的低聚肽粉产品。

4.2.3 海洋鱼肉低聚肽粉

以海洋鱼肉为原料生产的低聚肽粉产品。

5 技术要求

5.1 原辅材料

海洋鱼皮、海洋鱼骨、海洋鱼肉：应符合 GB 2733 规定的要求。其他原辅材料应符合相应的国家标准或行业标准。

5.2 感官特性

产品的感官特性应符合表 1 的规定。

表 1

项 目	特 性
形 态	粉末状,无结块
色 泽	白色或淡黄色
杂 质	无正常视力可见的外来杂质

5.3 理化指标

产品的理化指标应符合表 2 的规定。

表 2

项 目	指 标		
	海洋鱼皮胶原低聚肽粉	海洋鱼骨胶原低聚肽粉	海洋鱼肉低聚肽粉
总氮(以干基计)/%	≥ 14.5	13.5	13.5
低聚肽(以干基计)/%	≥ 85.0	75.0	80.0
羟脯氨酸/%	≥ 3.0	2.0	—
钙/(mg/kg)	≥ —	400	—
灰分/%	≤ 7.0	—	7.0
相对分子质量小于 1 000 u 的蛋白质水解物所占比例/%	≥	85.0	
干燥失重/%	≤	7.0	

5.4 污染物指标

产品中污染物指标应符合表 3 的规定。

表 3

项 目	指 标
无机砷/(mg/kg)	≤ 0.5
铅/(mg/kg)	≤ 0.5
镉/(mg/kg)	≤ 0.1
甲基汞/(mg/kg)	≤ 0.5

5.5 微生物指标

产品中微生物指标应符合表 4 的规定。

表 4

项 目	指 标
菌落总数/(CFU/g)	≤ 5 000
大肠菌群/(MPN/100g)	≤ 30
霉菌/(CFU/g)	≤ 25
酵母/(CFU/g)	≤ 25
致病菌(沙门氏菌、志贺氏菌、金黄色葡萄球菌)	不得检出

6 试验方法

6.1 感官检验

称取 10 g 样品,散放在白色搪瓷平盘中,在自然光下直接观察样品的形态、色泽和杂质。

6.2 总氮

按照 GB/T 5009.5 规定的方法测定。测定结果不进行蛋白质系数换算,以总氮质量分数表示。

6.3 低聚肽

6.3.1 方法提要

低分子质量的蛋白质水解物(包括低聚肽及游离氨基酸)可溶于三氯乙酸溶液;高分子质量的蛋白质在三氯乙酸溶液中易沉淀。样品经三氯乙酸溶液溶解后,离心分离出沉淀蛋白质,收集离心清液。按照 GB/T 5009.5 规定的方法测定离心清液的酸溶蛋白质水解物含量,清液的酸溶蛋白质水解物含量减去游离氨基酸含量得到低聚肽的含量。

6.3.2 分析步骤

6.3.2.1 酸溶蛋白质水解物含量的测定

称取 2 g(精确至 0.001 g)样品,加入 10 mL 15%三氯乙酸溶液,混合均匀,静置 10 min。将样品溶液在 4 000 r/min 下离心 10 min 后,取全部离心清液,按 GB/T 5009.5 规定的方法测定清液的蛋白质水解物含量,计算出样品中酸溶蛋白质水解物含量。蛋白质换算系数为 6.25,检验结果根据样品的干燥失重,折算为干基。

6.3.2.2 游离氨基酸含量的测定

6.3.2.2.1 氨基酸自动分析仪测定法

称取 0.02 g~0.03 g 样品,精确至 0.000 1 g,用 3.5%磺基水杨酸溶液溶解均匀。将样品溶液转移至 50 mL 容量瓶中,定容。将样品溶液在转速为 4 000 r/min 离心机上离心 5 min,取离心清液,再用 0.45 μm 微孔滤膜过滤离心清液,将滤液转移至 50 mL 容量瓶中,定容摇匀备用,然后按照 GB/T 5009.124 规定的方法,用氨基酸自动分析仪测定其游离氨基酸含量。

6.3.2.2.2 高效液相色谱仪测定法

6.3.2.2.2.1 方法提要

用三氯乙酸沉淀蛋白质后,以邻苯二甲醛(OPA)和氯甲酸苄甲酯(FMOC—Cl)分别作为一级氨基酸和二级氨基酸的衍生反应试剂,采用柱前自动衍生化反相高效液相色谱法测定海洋鱼低聚肽粉中的游离氨基酸总量。

6.3.2.2.2.2 仪器

- a) 高效液相色谱仪:配四元梯度泵,紫外检测器,自动进样器和化学工作站软件及在线脱气机。
- b) 分析天平:感量 0.000 1 g。
- c) pH 计。

6.3.2.2.2.3 试剂

三乙胺、四氢呋喃、乙酸、硼酸,均为分析纯;甲醇、乙腈、氨基酸标准品、邻苯二甲醛(OPA)、氯甲酸苄甲酯(FMOC—Cl)均为色谱纯;超纯水。

6.3.2.2.2.4 测定

称取样品 0.5 g,精确至 0.000 1 g,于 25 mL 容量瓶中,加 5%三氯乙酸 10 mL 沉淀 2 h,定容摇匀,过滤,于 10 000 r/min 离心 15 min,取上清液上机,采用外标法进行测定。

色谱条件:分析柱:Hypersil AA-ODS,5 μ m,200 mm $\times$ 2.1 mm(内径)。流动相:A液:含 0.018%三乙胺(TEA)的 20 mmol/L 乙酸钠缓冲液,用稀乙酸调至 pH7.2,加 0.3%四氢呋喃(THF);B液:20%的 100 mmol/L 乙酸钠缓冲液,用稀乙酸调至 pH7.2,加 40%乙腈和 40%甲醇。梯度洗脱程序:0 min时 A 液为 100%,在 17 min 内 B 液由 0%至 60%;18 min 时 B 液为 100%,并保持至 24 min;25 min 时 B 液回到 0%。流速:18.1 min 前为 0.45 mL/min;18.5 min 升至 0.8 mL/min,并保持至 23.9 min;24 min 降回至 0.45 mL/min。紫外检测:测定一级氨基酸用 338 nm,二级氨基酸用 262 nm(15 min 后)。荧光检测:测定一级氨基酸激发波长 340 nm,发射波长 450 nm;14.5 min 后将波长切换到 266 nm(激发)和 305 nm(发射)进行二级氨基酸的测定。

6.3.3 结果计算

低聚肽含量 X_1 按式(1)计算:

$$X_1 = X_2 - X_3 \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中:

X_1 ——样品中低聚肽含量(以干基计),%;

X_2 ——样品中酸溶蛋白质水解物含量(以干基计),%;

X_3 ——样品中游离氨基酸含量(以干基计),%。

6.4 相对分子质量小于 1 000 u 的蛋白水解物所占比例

按照附录 A 规定的方法测定。

6.5 羟脯氨酸

按照 GB/T 9695.23 规定的方法测定。

6.6 钙

按照 GB/T 5009.92 规定的方法测定。

6.7 干燥失重

按照 GB/T 5009.3 规定的方法测定。

6.8 灰分

按照 GB/T 5009.4 规定的方法测定。

6.9 无机磷

按照 GB/T 5009.11 规定的方法测定。

6.10 铅

按照 GB/T 5009.12 规定的方法测定。

6.11 镉

按照 GB/T 5009.15 规定的方法测定。

6.12 甲基汞

按照 GB/T 5009.17 规定的方法测定。

6.13 菌落总数

按照 GB/T 4789.2 规定的方法检验。

6.14 大肠菌群

按照 GB/T 4789.3 规定的方法检验。

6.15 霉菌和酵母

按照 GB/T 4789.15 规定的方法检验。

6.16 致病菌

沙门氏菌、志贺氏菌、金黄色葡萄球菌分别按照 GB/T 4789.4、GB/T 4789.5、GB/T 4789.10 规定的方法检验。

7 检验规则

7.1 检验分类

7.1.1 出厂检验

出厂检验的项目包括：感官特性、总氮、低聚肽、相对分子质量小于 1 000 u 的蛋白质水解物所占比例、干燥失重、灰分（海洋鱼骨胶原低聚肽粉除外）、菌落总数、大肠菌群。

7.1.2 型式检验

型式检验的项目包括 5.2、5.3、5.4、5.5 中规定的全部项目。

常年生产的产品每年应进行一次型式检验，但有下列情况之一时亦应进行型式检验：

- 新产品投产时；
- 原料、工艺有较大改变时；
- 长期停产后恢复生产时；
- 出厂检验结果与上次型式检验结果有较大差异时；
- 质量监督机构提出进行型式检验的要求时。

7.2 抽样

7.2.1 组批

同一班次生产的，同一类型的产品为一批。

7.2.2 抽样方法和数量

从每批产品中随机抽取不少于 3 个最小包装单位样品，用取样工具伸入每袋的 3/4 处取样，所取试样不得少于 100 g。

将采取的试样混匀，装入清洁、干燥、带磨口玻璃瓶中，瓶上粘贴标签，注明生产班次、产品类别、批号、取样日期和地点。

微生物检验按无菌操作取样。

7.3 判定规则

7.3.1 出厂检验判定和复检

7.3.1.1 出厂检验项目全部符合本标准要求的产品判为合格品。

7.3.1.2 出厂检验项目中微生物指标不符合本标准或发现恶性杂质（如玻璃、金属、昆虫等），不得复检，判为不合格品。

7.3.1.3 出厂检验项目中除 7.3.1.2 提到的指标外,其他指标不符合本标准,可在同批产品中加倍抽样,对不合格项目进行复检,复检结果仍不符合本标准规定,判为不合格品。

7.3.2 型式检验判定和复检

7.3.2.1 型式检验项目全部符合本标准要求的產品判为合格品。

7.3.2.2 型式检验项目中微生物指标不符合本标准或发现恶性杂质(如玻璃、金属、昆虫等),不得复检,判为不合格品。

7.3.2.3 型式检验项目中除 7.3.2 提到的指标外,其他指标不符合本标准,可在同批产品中加倍抽样,对不合格项目进行复检,复检结果仍不符合本标准规定,判为不合格品。

8 标签、包装、运输和贮存

8.1 标签

8.1.1 产品标签上应标示产品名称、净含量、制造者及经销者的名称和地址、生产日期、生产批号、保质期、产品标准号等。

8.1.2 产品名称应符合第 4 章中的要求。

8.2 包装

包装容器应符合食品容器和包装材料的卫生标准。

8.3 运输

运输产品的工具、车辆应清洁、卫生、干燥,无污染物。运输产品过程中,应有遮盖,防雨防晒,不能与有毒、有害、有异味的物品混运。

8.4 贮存

8.4.1 产品不应露天堆放。成品仓库应清洁、干燥、通风,无鼠虫害。

8.4.2 产品堆放应有垫板,离地 10 cm 以上,离墙 20 cm 以上。

8.4.3 产品不应与有毒、有害、有异味、易腐败变质或潮湿的物品同仓库存放。

附录 A

(规范性附录)

相对分子质量小于 1 000 u 的蛋白质水解物所占比例
(高效凝胶过滤色谱法)

A.1 方法提要

相对分子质量小于 1 000 u 的蛋白质水解物(包括低聚肽和少量游离氨基酸)所占比例,采用高效凝胶过滤色谱法测定。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,使用凝胶色谱测定相对分子质量分布的专用数据处理软件(即 GPC 软件),对色谱图及其数据进行处理,计算得到蛋白质水解物的相对分子质量大小及分布范围,进而得到相对分子质量小于 1 000 u 的蛋白质水解物(包括低聚肽和少量游离氨基酸)所占比例。

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:超纯级或二次蒸馏水。

A.2.4 相对分子质量校正曲线所用标准品:

A.2.4.1 细胞色素 C(cytochrome, M_r 12500)。

A.2.4.2 抑肽酶(aprotinin, M_r 6500)。

A.2.4.3 杆菌酶(bacitracin, M_r 1450)。

A.2.4.4 乙氨酸-乙氨酸-酪氨酸-精氨酸(M_r 451)。

A.2.4.5 乙氨酸-乙氨酸-乙氨酸(M_r 189)。

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或积分仪。

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 0.000 1 g。

A.4 色谱条件与系统适应性实验

色谱柱:TSKgel G2000 SWXL 300 mm×7.8 mm 或性能与此相近的同类型其他适用于测定蛋白质和多肽的凝胶柱。

流动相:乙腈:水:三氟乙酸为 45:55:0.1(体积比)。

检测波长:UV220 nm。

流速:0.5 mL/min。

柱温:30 ℃。

进样体积:10 μ L。

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 5 000,低聚肽的分配系数(K_d)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 0.1% (质量浓度) 的上述不同相对分子质量的肽标准品溶液, 用孔径为 $0.2\ \mu\text{m}$ ~ $0.5\ \mu\text{m}$ 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($\lg M_r$)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

称取样品 20.0 mg 于 10 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 $0.2\ \mu\text{m}$ ~ $0.5\ \mu\text{m}$ 聚四氟乙烯或尼龙过滤膜过滤后, 上机进样。

A.7 相对分子质量的计算

将第 A.6 章制备的样品溶液在上述色谱条件下分析。然后用 GPC 数据处理软件, 将样品的色谱数据代入校正曲线方程中进行计算, 即可得到样品中肽的相对分子质量及其分布范围。用峰面积归一化法计算相对分子质量范围在 1 000 u 以下的蛋白质水解物的峰面积相对百分比之和。
