ICS 点击此处添加ICS号

点击此处添加中国标准文献分类号

|  |
| --- |
|  |

CAAPP

中国畜产品加工研究会团体标准

|  |
| --- |
|  |

T/CAAPP 00021—2024

蛋壳膜提取物

Eggshell membrane extract

2024 - xx -xx发布

2024 - xx -xx实施

中国畜产品加工研究会   发布

目次

[前  言 II](#_Toc28841)

[1 范围 1](#_Toc9842)

[2 规范性引用文件 1](#_Toc18521)

[3 术语和定义 2](#_Toc11085)

[4 生产工艺流程 2](#_Toc12578)

[5 技术要求 3](#_Toc14723)

[6 检验规则 5](#_Toc8439)

[7 标志、标签、包装、运输、贮存 5](#_Toc15941)

[附　录　A 7](#_Toc11015)

[附　录　B 10](#_Toc6063)

[附　录　C 13](#_Toc30239)

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。

蛋壳膜提取物

* 1. 范围

本文件规定了蛋壳膜提取物的术语和定义、生产工艺流程、技术要求、检验规则及标志、签标、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、蛋壳收集、壳膜水法分离、收集蛋壳膜、干燥、粉碎制成的蛋壳膜粉，以及蛋壳膜粉经酶解、灭酶、过滤、精制（可选）、浓缩、灭菌、干燥、包装等工艺制得的蛋壳膜提取物（含蛋壳膜肽）。

* 1. 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 2762 食品安全国家标准 食品中污染物限量

GB 2763 食品安全国家标准 食品中农药最大残留限量

GB 31650 食品安全国家标准食品中兽药最大残留限量

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 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 9683 复合食品包装袋卫生标准

GB 14880 食品安全国家标准 食品营养强化剂使用标准

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》

* 1. 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

* + 1. 蛋壳膜 eggshell membrane

又称蛋壳内膜，简称蛋膜，由蛋白膜和内蛋壳膜组成。

* + 1. 蛋壳膜粉 eggshell membrane powder

又称蛋膜粉，以鸡蛋为原料，经清洁除菌、打蛋、收集蛋壳（含膜）、去除残留蛋清、壳膜水法分离、收集蛋壳膜、干燥、粉碎等工艺制得的粉末。

* + 1. 蛋壳膜提取物 eggshell membrane extract

又称蛋壳膜酶解物、蛋膜提取物、水解蛋壳膜，是以蛋壳膜粉为原料，经酶解、混合（或不混合）、浓缩、灭菌、干燥等工艺制得的粉末。

* + 1. 蛋壳膜肽 eggshell membrane peptide

又称蛋膜肽，以蛋壳膜粉为原料，经过酶解、精制、浓缩、灭菌、干燥等工艺生产的，主要成分相对分子质量低于10 000的产品，属于蛋壳膜提取物类别。

* + 1. 壳蛋清洁除菌 cleaning and degerming of eggshell

对禽蛋进行淋湿、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。

* + 1. 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壳膜。

* 1. 生产工艺流程

蛋壳膜粉：鸡蛋收集→清洁除菌→打蛋→收集蛋壳（含膜）→去除残留蛋清→烘干→粗粉碎→壳膜水法分离→收集蛋壳膜→干燥→粉碎→包装

蛋壳膜提取物（含蛋壳膜肽）：蛋壳膜粉→酶解→灭酶活→过滤→精制（可选）→浓缩→灭菌→干燥→粉碎（可选）→包装

* 1. 技术要求
     1. 基本要求

不得添加任何非食用的原料。不得超范围使用食品添加剂，食品添加剂的使用应符合 GB 2760 的规定，食品中污染物限量应符合 GB 2762 的规定。食品中农药最大残留限量应符合 GB 2763 的规定。兽药残留限量应符合 GB 31650 的规定。

* + 1. 原辅料要求

鸡蛋：应符合GB 2749的规定。

蛋壳（含膜）：鸡蛋经破壳、加工处理后24小时内的蛋壳。

蛋壳膜粉：蛋壳膜粉原料中蛋壳应去除干净，蛋壳碳酸钙的含量不得超过5%。

酶制剂：应符合GB 1886.174、GB 2760的规定。

生产用水：应符合GB 5749的规定。

* + 1. 感官要求

蛋壳膜提取物（含蛋壳膜肽）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 | 米白色至棕黄色 | 将样品置于清洁、干燥的白瓷盘中，在自然光线下目测其色泽和状态，嗅其气味。 |
| 组织形态/性质 | 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 |

* + 1. 理化指标

蛋壳膜提取物（含蛋壳膜肽）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） |
| 透明质酸/% | ≥ | 0.5 | 附录 A |
| 蛋白质/（g/100g） | ≥ | 60 | GB 5009.5（第一法） |
| 胶原蛋白/% | ≥ | 3 | 附录 B |
| 硫酸软骨素（以硫酸粘多糖计）/% | ≥ | 0.2 | 附录 C |
| a 肽含量/% | ≥ | 40 | GB/T 22492 附录 B |
| a 相对分子质量< 10 000的蛋壳膜肽含量 /% | ≥ | 80 | GB 31645 附录 A |
| a 相对分子质量< 5 000的蛋壳膜肽含量 /% | ≥ | 40 | GB 31645 附录 A |
| 钙/(mg/kg) | ≤ | 180 | GB 5009.92（第一法） |
| 铅（以 Pb 计）/(mg/kg) | ≤ | 0.1 | GB 5009.12（第二法） |
| 砷/(mg/kg) | ≤ | 0.25 | GB 5009.11（第一法） |
| 汞/(mg/kg) | ≤ | 0.1 | GB 5009.17（第一法） |
| 镉/(mg/kg) | ≤ | 0.1 | GB 5009.15 |
| a 仅适用于蛋壳膜肽产品。 | | | |

* + 1. 微生物指标

蛋壳膜提取物（含蛋壳膜肽）的微生物指标应符合表 3 的规定。

表 3 微生物指标

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 项 目 | 指 标 | 检验方法 |
| 菌落总数/（CFU/g） ≤ | 5000 | GB 4789.2 |
| 霉菌和酵母菌/（CFU/g） ≤ | 300 | GB 4789.15（第一法） |
| 大肠菌群/（CFU/g） ≤ | 20 | GB 4789.3（第二法） |
| 大肠埃希氏菌/（/25g） | 不得检出 | GB 4789.38（第二法） |
| 金黄色葡萄球菌/（/25g） | 不得检出 | GB 4789.10（第一法） |
| 沙门氏菌/（/25g） | 不得检出 | GB 4789.4 |
| 注：样品的采集及处理按照GB 4789.1执行。 | | |

* + 1. 食品添加剂和食品营养强化剂

食品添加剂的使用应符合 GB 2760 的规定。

食品营养强化剂使用应符合 GB 14880 的规定。

* + 1. 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。

* + 1. 生产加工过程卫生要求

应符合 GB 14881 的规定。

* 1. 检验规则
     1. 抽样

同班次，一次投料为一批。从每批产品中随机抽取不少于 5 个最小包装单位样品，然后，用取样工具伸入每袋的 3/4 处，所取试样不应少于 100g。微生物抽样按 GB 4789.1 规定采集样品。

* + 1. 出厂检验

成品出厂前须经生产企业质量检验部门按本标准规定逐批检验，并签发合格证，方可出厂。

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。产品出厂需经工厂检验部门逐批检验，合格后方能出厂。

* + 1. 型式检验

型式检验项目为本标准中规定的全部项目。

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：

1. 新产品投产前；
2. 原料变化或改变主要生产工艺，可能影响产品质量时；
3. 停产三个月以上，恢复生产时；
4. 出厂检验与上次型式检验有较大差异时；
5. 国家监管机构提出进行型式检验的要求时。
   * 1. 判定规则

出厂检验判定规则

* + - * 1. 出厂检验项目全部符合本标准，判该批产品为合格品。
        2. 出厂检验项目有一项不符合本标准，可加倍抽样复验，复验后仍不符合本标准，判该批产品为不合格品。

型式检验判定规则

* + - * 1. 型式检验项目全部符合本标准判为合格品。
        2. 受检样品检验项目全部合格时，判整批产品为合格品。若有不合格项目（微生物指标除外）时，应重新自同批产品中抽取两倍量样本，对不合格项目进行复验，复验后仍有一项不合格，则判整批产品不合格，微生物指标有一项不符合本标准要求时，判该批产品不合格。
  1. 标志、标签、包装、运输、贮存
     1. 标志、标签

包装储运图示标志应符合GB/T191规定

标签应标明：产品名称、配料表、规格、批号、生产日期、保质期、食品产地、食用限量、不适用人群等，其标签内容应符合GB 7718、GB 28050及相应要求的规定。食用限量为500毫克/天。不适宜人群包括：婴幼儿、孕妇、哺乳期妇女、对鸡蛋过敏者。

* + 1. 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 9683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。

* + 1. 运输

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。

搬动时应轻拿轻放，严禁扔摔、撞击、挤压。

运输过程不得暴晒、雨淋、受潮。

* + 1. 贮存

产品应贮存在阴凉、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。

* + 1. 保质期

在本标准规定的包装、运输、贮存条件下，保质期为24个月。





（规范性附录）

透明质酸的测定 分光光度法

* 1. 简介

本方法规定了蛋壳膜原料、半成品和成品中透明质酸含量的分光光度法测定。

* 1. 仪器

分析天平，感量为 0.1 mg。

紫外可见分光光度计。

加热板。

冰浴。

涡旋振荡器。

* 1. 试剂和材料

本方法除特殊规定外，所用试剂为分析纯。

水：去离子水或者蒸馏水。

一次性紫外可见比色皿（比色皿 1 cm×1 cm）。

带盖玻璃试管 10 mL。

70%乙醇。

四硼酸钠（CAS 号：1303-96-4）。

96%硫酸（ACS 级）（CAS 号：7664-93-9）。

葡萄糖醛酸内酯（CAS 号：32449-92-6）：纯度 99%。

苯甲酸（CAS 号：65-85-0）。

咔唑（CAS 号：86-74-8）

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。

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

苯甲酸溶液：准确称取 1 g 苯甲酸加入 200 mL 水中，搅拌溶解。

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。

* 1. 试剂及标准溶液的配制

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

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

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

* 1. 样品准备

样品稀释（现用现配）。

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

1:100 稀释：准确量取 1 mL1:10 稀释液，加入 99 mL的水，混匀备用。（稀释因子=100）

1:100 稀释：准确量取 1 mL1:100 稀释液，加入 99 mL的水，混匀备用。（稀释因子=1000）

如果吸光度值不在 15μg/mL标准品和 45μg/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。

* 1. 适用系统

进行紫外可见分光光度计准备。

* 1. 操作步骤

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。

吸取 2.5 mL含四硼酸钠硫酸置于各试管中。

吸取 0.5 mL空白样、标准品和样品稀释液至相应试管中。

盖紧试管盖子，在冰浴器中冷却至室温。

用涡旋振荡器振荡试管不少于 10 s。

用沸水浴加热 10 min。

在冰浴器中冷却至室温。

在各试管中分别加入 0.1 mL 咔唑溶液。

盖紧试管盖子，用涡旋振荡器混匀不少于 10 s。

沸水浴加热 15 min。

在冰浴器中冷却至室温。

* 1. 测定

使紫外-可见分光光度计在 530 nm处归零，样品槽为空。

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 R2 值应≥0.98。

注：空白样的吸收率应低于0.09，45 μg/mL的葡萄糖醛酸内酯的吸收率应大于0.35。

* 1. 计算

式中：

*X*——试样中透明质酸的含量，单位为质量分数（%）；

*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（μg/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（μg）换算为克（g）的系数。

计算结果保留三位有效数字。



（规范性附录）

胶原蛋白的测定 分光光度法

* 1. 简介

本测试方法规定了蛋壳膜原料、半成品和成品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，用于蛋壳膜原料、半成品和成品中的胶原蛋白含量的测定。

* 1. 仪器

分析天平（0.1 mg）。

紫外可见分光光度计。

圆底或平底烧瓶:容量约为 200 mL，宽颈。

干燥箱：可控温于 105 ℃±1 ℃。

pH 计。

铝箔或不透明塑料薄膜。

水浴锅：可控温于 60 ℃±0.5 ℃。

分光光度计：可用波长 558 nm±2 nm；使用光电比色计，其中干涉波器最大吸收波 558 nm±2nm。

比色皿：光程为 10 mm。

分析天平；可准确称重至 0.001 g。

容量瓶：250 mL。

表面皿：直径为 5 cm~6 cm。

* 1. 试剂和材料

本方法除特殊规定外，所用试剂为分析纯。

浓硫酸（CAS 号：7664-93-9），浓度 98%。

一水柠檬酸（CAS 号：5949-29-1），纯度 99%。

氢氧化钠（CAS 号：1310-73-2）。

三水醋酸钠（CAS 号：6131-90-4），纯度 99%。

1-丙醇（CAS 号：71-23-8），浓度 98%。

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

4-对二甲氨基苯甲醛（CAS 号：100-10-7）。

高氯酸（60%, w/w）（CAS 号：7601-90-3）。

异丙醇（2-丙醇）（CAS 号：67-63-0）。

4-羟基-L-脯氨酸（CAS 号：51-35-4）。

3.5 mol/L 硫酸溶液：取 250 mL去离子水加入 500 mL容量瓶中，然后缓慢加入 95 mL浓硫酸，冷却后用去离子水定容。

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

缓冲液：将 30 g一水合柠檬酸、62.5 mL 6 mol/L氢氧化钠、15 g三水醋酸钠溶解于约 500 mL去离子水中。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，然后用去离子水定容。该缓冲液可在 4°C 下避光稳定保存 2 个月。

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。

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。

* 1. 标准溶液的配制

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，用去离子水溶解，并于 100 mL 的容量瓶定容，4°C 下保存 2 个月。

羟脯氨酸中间液（6.0 μg/mL）：用去离子水将 2.5 mL 储备液稀释至 250 mL，现配现用。

羟脯氨酸工作液。

空白样：去离子水。

S1（0.6 μg/mL）：取 10.0 mL 羟脯氨酸中间液用去离子水稀释至 100 mL。

S2（1.2 μg/mL）：取 20.0 mL 羟脯氨酸中间液用去离子水稀释至 100 mL。

S3（1.8 μg/mL）：取 30.0 mL 羟脯氨酸中间液用去离子水稀释至 100 mL。

S4（2.4 μg/mL）：取 40.0 mL 羟脯氨酸中间液用去离子水稀释至 100 mL。

* 1. 样品准备

准确称量约 4g 样品(精确至 0.001 g)，转移样品至 100 mL 圆底烧瓶中。

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。

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。

测定制剂：用去离子水稀释 3.0 mL [滤液]储备样品至 100 mL。（最终稀释容积=100）

* 1. 适用系统

进行紫外可见分光光度计准备。

* 1. 操作步骤

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。

各试管中加入 1.0 mL的氧化液，混合均匀，室温静置 20 min。

加入 1.0 mL的显示剂，混合均匀，用铝箔或塑料薄膜将比色管封口，水浴加热至 60℃，保持15 min。

加热结束后，将试管置于冰浴冷却 3-6 min，待测。

使紫外-可见分光光度计在 558 nm 处归零，样品槽为空。

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。

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 R2 值应≥0.98。根据线性回归分析，用下式计算胶原蛋白浓度。

式中：

*X* —— 试样中胶原蛋白的含量，单位为质量分数（%）；

*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*1—— 初始稀释容积，单位为毫升（mL）；

*V*2 —— 最终稀释容积，单位为毫升（mL）；

*V*3 —— 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（μg）换算为克（g）的系数。

计算结果保留三位有效数字。



（规范性附录）

硫酸软骨素的测定 分光光度法

* 1. 简介

本测试方法规定了样品制剂的酶解条件，以及蛋壳膜原料、半成品和成品中硫酸软骨素的含量。

* 1. 仪器

分析天平（0.1 mg）。

紫外可见分光光度计。

带温度计的加热/搅拌板。

带加热及磁力搅拌的温度控制器。

* 1. 试剂和材料

本方法除特殊规定外，所用试剂为分析纯。

半微量比色皿。

容量可调节移液器（满足 40 μL，960 μL 和 1000 μL）。

圆底烧瓶：100 mL。

容量瓶：500 mL，10 mL。

硫酸软骨素 A 钠盐（来源于牛气管）（CAS 号：39455-18-0）。

1,9-二甲基亚甲基蓝氯化锌复盐（CAS 号：931418-92-7）。

甲酸，99%（CAS 号：64-18-6）。

三（羟甲基）氨基甲烷（CAS 号：77-86-1）。

碱性蛋白酶（CAS 号：9014-01-1）。

L-半胱氨酸盐酸盐一水合物（CAS 号：7048-04-6）。

碳酸钠（CAS 号：497-19-8）。

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去离子水加入 1000 mL 容量瓶中，搅拌至完全溶解。加入 2.1 mL 99%甲酸，用 1M NaOH将pH值调至3.3。用去离子水定容。

Tris 溶液（2M）——将 24.228 g三（羟甲基）氨基甲烷加入装有 90 mL左右去离子水的 100 mL量瓶中。搅拌至溶解，然后用去离子水定容。

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。

* 1. 标准溶液的配制

硫酸软骨素标准储备液（1000 μg/mL）：将 25 mg 硫酸软骨素 A 钠盐溶于去离子水，定容于 25 mL 容量瓶中。4°C 条件下稳定保存一周。

硫酸软骨素工作溶液：溶液可在 4℃条件下稳定保存一周。

S1（15 μg/mL）：用去离子水稀释 150 μL 硫酸软骨素标准储备液至 10 mL。

S2（30 μg/mL）：用去离子水稀释 300 μL 硫酸软骨素标准储备液至 10 mL。

S3（45 μg/mL）：用去离子水稀释 450 μL 硫酸软骨素标准储备液至 10 mL。

S4（60 μg/mL）：用去离子水稀释 600 μL 硫酸软骨素标准储备液至 10 mL。

S5（75 μg/mL）：用去离子水稀释 750 μL 硫酸软骨素标准储备液至 10 mL。

* 1. 样品准备

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 去离子水，放置磁力搅拌棒。

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。

称量 400 mg 碱性蛋白酶，转移至圆底烧瓶中。可用少量去离子水辅助或冲洗烧瓶瓶壁。

加入碱性蛋白酶后 55℃继续加热并搅拌 60 min。

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

将烧瓶从加热器或加热罩中移除，用去离子水稀释内容物至 500 mL（样品制剂）。

* 1. 适用系统

进行紫外可见分光光度计准备。

* 1. 操作步骤

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。

将 40 μL 去离子水（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。

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.7.1）。

加入 DMMB-Tris 30 s后，在 525 nm处测量溶液的吸光度。

其余比色皿重复步骤 C.7.3和 C.7.4。

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。

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：

式中：

*X* ——试样中硫酸软骨素的含量，单位为质量分数（%）；

*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。