

T/CVDA

团体标准

T/CVDA XXXXX—XXXX

宠物食品中复合硫酸软骨素评价技术标准

Guidelines for the evaluation of complex chondroitin sulfate in pet products

(征求意见稿)

XXXX—XX—XX 发布

XXXX—XX—XX 实施

中国兽药协会 发布

目 录

前 言..... 2

1 范围..... 3

2 规范性引用文件..... 3

3 术语和定义..... 3

 3.1 宠物..... 3

 3.2 宠物食品..... 3

 3.3 功能性宠物食品..... 3

 3.4 保健宠物食品..... 4

 3.5 宠物营养补充剂..... 4

 3.6 复合硫酸软骨素..... 4

4 原理..... 错误!未定义书签。

 4.1 测试宠物食品要求..... 4

 4.2 测试条件要求..... 4

5 测试..... 错误!未定义书签。

 5.1 试剂..... 5

 5.2 仪器和设备..... 5

 5.3 测定程序..... 5

6 结果计算..... 6

7 精密度..... 错误!未定义书签。

8 试验报告..... 7

参考文献..... 8

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。

本文件由中国兽药协会提出并归口。

本文件起草单位：上海宠幸宠物用品有限公司、卫仕营养科学研究院（江苏）有限公司、江苏大学、岛津企业管理（中国）有限公司、梅里埃检测技术（青岛）有限公司、芜湖卫仕生物科技有限公司、东西志览国际文化发展无锡有限公司。

本文件主要起草人：马海乐、李云亮、郭丽娜、孟海涛、兰凤洁、段玉清、严子华、刘淑琴、宋亮亮。

1 范围

本标准规定了宠物食品复合硫酸软骨素评价技术的术语和定义,并规范复合硫酸软骨素产品评价技术标准,具体包括要求(宠物食品要求、测试条件要求)、测试方法、结果计算与判定、实验报告。

本标准适用于声称含有硫酸软骨素成分的宠物饲料(宠物食品)、保健产品、宠物零食、饲料原料及添加剂的品质评价。

本标准适用的宠物品种为犬、猫为主的伴侣动物。

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/T6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB14925 实验动物环境及设施

GB19489 实验室生物安全通用要求

GB/T27476.1 检测实验室安全第1部分:总则

GB/T31190 实验室废弃化学品收集技术规范

GB/T 35507 生化用试剂测定通则

SN/T 3509 实验室样品管理指南

SN/T 3592 实验室化学药品和样品废弃物处理的标准指南

SN/T 4835 实验室生物废弃物管理要求

GB2760 食品安全国家标准食品添加剂使用标准

GB13432 预包装特殊膳食用食品标签通则

GB16740 保健(功能)食品通用标准

GB26687 食品安全国家标准复配食品添加剂通则

GB28050 食品安全国家标准预包装食品营养标签通则

GB/T 18823 饲料检测结果判定的允许误差

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 宠物 pet

家庭饲养的作为伴侣动物的犬和猫,或工作用途的犬。

3.2 宠物食品 pet food

专为宠物设计和制造的食品,以满足它们的营养需求和维持健康生活。这类食品通常包括以犬、猫为主的各类宠物所需的营养成分,如蛋白质、碳水化合物、脂肪、维生素和矿物质等。

3.3 功能性宠物食品 functional pet food

在基础宠物食品中,通过向基础宠物粮中添加一种或几种具有不同生物活性的物质,可以平衡和优化宠物的营养供给,增强其身体性能,并提升采食性。所谓“功能性”宠物食品或成分,指的是其带来

的益处超越了传统基本营养素（如蛋白质、碳水化合物、脂肪、维生素和矿物质等）的范畴，能够为宠物提供额外的健康支持或功能改善。

3.4 保健宠物食品 health care pet food

在满足宠物基础营养需求的同时，通过添加特定的功能性成分，为宠物提供额外的健康益处或预防性支持的食物。其作用通常超越了基础宠物食品所提供的能量和营养素，旨在改善宠物的健康状况、增强特定生理功能、缓解某些健康问题或延缓疾病的发生。

3.5 宠物营养补充剂 pet nutritional supplements

为弥补宠物日常饮食中可能存在的营养缺口或满足其特定生理需求而设计的产品。这些补充剂通常以片剂、粉剂、液体或软糖等形式提供，含有特定的营养素或功能性成分，如维生素、矿物质、氨基酸、益生菌、植物提取物或其他活性物质。宠物营养补充剂的主要作用是支持宠物的整体健康，增强免疫力，促进消化，维护关节、皮肤和毛发健康，或满足特定的生长阶段、疾病管理或运动需求。它们通常作为宠物日常饮食的补充，而非替代品。

3.6 复合硫酸软骨素 chondroitin sulfate

一类由N-乙酰半乳糖胺与D-葡萄糖醛酸聚合而成的糖胺聚糖，广泛分布于动物组织的细胞外基质和细胞表面。硫酸基团可与硫酸软骨素双糖单位中氨基半乳糖上的羟基发生反应，进行深度结合和重组，提供了多种同分异构体。通常情况下，硫酸软骨素以多种同分异构体的形式存在，即被称为复合硫酸软骨素。本标准中复合硫酸软骨素主要包括硫酸软骨素A、硫酸软骨素B和硫酸软骨素C。

4 要求

将硫酸软骨素样品经硫酸软骨素ABC酶水解后，采用外标法在波长232nm下进行液相色谱分离，并以特征峰面积来计算复合硫酸软骨素的含量。

4.1 宠物食品要求

测试样品应为声称含有硫酸软骨素成分的宠物饲料（宠物食品）、保健产品、宠物零食、饲料原料及添加剂中复合硫酸软骨素含量的检测。测试样品未受污染，同时避免阳光直射、高温和潮湿环境对样品的影响。

4.1.1 纳入标准

宠物食品标签明确标示含有硫酸软骨素或软骨素相关成分；配料表中标注使用了可能富含硫酸软骨素的原料（如动物软骨提取物、海洋生物提取物等）；样品不存在明显变质、霉变或异味；用于宠物营养补充或功能性目的的产品。

4.1.2 排除标准

不含硫酸软骨素的普通宠物食品（如以植物为主要原料的食品）；未标注成分详情或无法确认是否含硫酸软骨素的样品；样品过期、明显腐败或受到污染（如异物、霉菌生长）。

4.2 测试条件要求

4.2.1 测试环境要求

测试环境应保持洁净，避免尘埃、杂质和污染源对样品的干扰。室温通常控制在20~25℃，相对湿度控制在50%~70%，防止样品吸湿或因高湿度发生降解。避免强光直射，特别是紫外光可能导致样品的光降解。实验室需配备良好的通风系统，防止使用酸碱试剂或其他化学品时产生有害气体的积聚。

4.2.2 测试样品要求

测试样品需保证来源清晰，标明生产批次、储存条件及有效期。样品需保持干燥，避免吸潮或氧化。样品及标准品应保存在低温、避光环境中（如2~8℃冷藏），防止活性物质降解。

4.2.3 测试人员要求

测试人员应具备相关专业背景（如化学、制药、食品科学等），并接受过针对硫酸软骨素检测方法的系统培训。需熟悉硫酸软骨素的化学性质以及相关检测技术（如高效液相色谱法），能够熟练操作检测仪器并准确进行数据分析。测试人员必须严格遵循实验室标准操作规程（SOP）进行操作，确保检测过程的可追溯性和结果的高度一致性。同时，应遵守实验室管理规定，秉持职业道德，确保测试数据的真实性和可靠性。

5 测试方法

5.1 试剂

除非另有说明，本标准所用试剂均为分析纯，水为GB/T 6682规定的一级水。

5.1.1 检测用试剂

三羟甲基氨基甲烷[$(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$]、乙酸钠（ CH_3COONa ）、盐酸（ HCl ）、硫酸软骨素钠：纯度 $\geq 99.5\%$ 、硫酸软骨素ABC酶、氯化钠（ NaCl ）。

5.1.2 试剂配制

5.1.2.1 三羟甲基氨基甲烷缓冲液：称取 6.06g 三羟甲基氨基甲烷和 8.17g 乙酸钠，加 900mL 水溶解后用稀盐酸调节 pH 直至 8.0，稀释至 1000mL。

5.1.2.2 稀盐酸溶液：用移液管移取 23.4mL 浓盐酸加入到水中并稀释至 100mL。

5.1.2.3 硫酸软骨素 ABC 酶液：取硫酸软骨素 ABC 酶（5UN）加入 5mL 三羟甲基氨基甲烷缓冲液稀释制成每 100 μL 中含 0.1 单位的溶液，置于-20℃冷冻保存。

5.1.2.4 氯化钠溶液：称取 11.7g 氯化钠，加水溶解后并稀释至 100mL，该溶液浓度为 2mol/L。

5.1.2.5 标准溶液：称取 0.1g 硫酸软骨素钠标准品（精确至 0.0001g），用水溶解并稀释至 100mL。硫酸软骨素钠标准储备溶液浓度为 10mg/mL。

5.2 仪器和设备

分析天平：感量为1mg；超声波水浴槽；恒温水浴锅；高效液相色谱仪：配有二极管阵列检测器或紫外检测器；水系滤膜：0.45 μm 。

5.3 测定程序

5.3.1 样品前处理

将已脱脂的固体粉末样品在105℃下干燥4小时后，取1g于100 mL烧杯中，加入适量水使其分散均匀，再用超声波使其溶解并转移至100mL容量瓶中，用水定容至刻度，摇匀。

5.3.2 样品酶解液制备

移取100 μL样品溶液加入800 μL的三羟甲基氨基甲烷缓冲液，充分混匀，再加入100 μL硫酸软骨素ABC酶液，摇匀后置于37℃水浴中反应1小时。反应结束后在100℃下加热5min灭酶，随后置于冷水中冷却至室温，在10000rpm下离心20min；上清液用0.45 μm水系微孔滤膜过滤，用于液相色谱仪测定。

5.3.3 标准品酶解液制备

操作同5.3.2，将样品溶液换为硫酸软骨素钠标准储备溶液。

5.3.4 色谱条件

5.3.4.1 流动相：流动相A为纯水（使用稀盐酸溶液调节pH 3.5），流动相B为2mol/L的NaCl溶液（使用稀盐酸溶液调节pH 3.5）。

5.3.4.2 洗脱条件：梯度洗脱，0~4 min，0%流动相B；4~45min，0%流动相B→50%流动相B；45~51min，50%流动相B→0%流动相B。

5.3.4.3 流速：1 mL/min

5.3.4.4 色谱柱：强阴离子硅胶为填料的Hypersil SAX色谱柱，内径4.6 mm，柱长250 mm，粒径5 μm。

5.3.4.5 柱温：40℃。

5.3.4.6 进样体积：20 μL。

5.3.5 色谱检测

分别将样品酶解上清液和标准品酶解上清液注入高效液相色谱仪进样口，利用紫外检测器于232nm下进行测定，并记录各色谱峰面积。复合硫酸软骨素的检出限为1 mg/g。

6 结果计算

试样中复合硫酸软骨素的含量按式下式计算：

$$X = \left(\frac{P_1}{P'_1} + \frac{P_2}{P'_2} + \frac{P_3}{P'_3} \right) \times \frac{V \times c}{m}$$

式中：

X ——试样中复合硫酸软骨素的含量，单位为mg/g；

P_1 ——试样溶液中软骨素二糖峰面积；

P_2 ——试样溶液中6-硫酸化软骨素二糖峰面积；

P_3 ——试样溶液中4-硫酸化软骨素二糖峰面积；

P'_1 ——标准溶液中软骨素二糖峰面积；

P'_2 ——标准溶液中 6-硫酸化软骨素二糖峰面积；

P'_3 ——标准溶液中 4-硫酸化软骨素二糖峰面积；

V ——试样定容后体积，单位为 mL；

c ——硫酸软骨素钠标准溶液浓度，单位为 mg/mL；

m ——试样的质量，单位为 g。

7 结果判定

当复合硫酸软骨素含量大于1%时，待测样品被判定为硫酸软骨素高含量样品。

8 试验报告

实验报告应提供试验获得的所有内容、数据及可视化信息。未纳入统计分析的数据或由于数据缺乏、丢失等无法评价的情况也应报告，并说明在各组别中的平均值及误差。所有试验样品必须留样保存，宠物饲料（食品）留样 $\geq 500\text{g}$ ，液体样品留样量 $\geq 500\text{mL}$ 。

实验报告正文至少应包括：

- a. 实验名称；
- b. 实验目的；
- c. 实验材料，至少包括实验用品、受试样品及处理方法；
- d. 实验方法；
- e. 结果与分析，根据数据统计结果给出平均值和标准方差、误差值及决定系数，并以可视化的数据或图和表形式体现。
- f. 结论，针对受试样品的实验结果给出判定。

此外，试验过程中涉及的所有原始数据和相关可视化图表均要存档。

参考文献

- GB/T6682 分析实验室用水规格和试验方法
- GB19489 实验室生物安全通用要求
- GB/T27476.1 检测实验室安全 第1部分:总则
- GB/T31190 实验室废弃化学品收集技术规范
- GB/T 35507 生化用试剂测定通则
- GB2760 食品安全国家标准食品添加剂使用标准
- GB13432 预包装特殊膳食用食品标签通则
- GB16740 保健(功能)食品通用标准
- GB26687 食品安全国家标准复配食品添加剂通则
- GB28050 食品安全国家标准预包装食品营养标签通则
- GB/T 18823 饲料检测结果判定的允许误差
- SN/T 3509 实验室样品管理指南
- SN/T 3592 实验室化学药品和样品废弃物处理的标准指南
- SN/T 4835 实验室生物废弃物管理要求
- GB/T 20365-2006 硫酸软骨素和盐酸氨基葡萄糖含量的测定 液相色谱法
- 2020年版《中华人民共和国药典》——硫酸软骨素的测定方法
- 宫瑞泽, 王燕华, 陈宝, 孙印石. 2015年版《中华人民共和国药典》收载的鹿源药材中硫酸软骨素含量分析[J]. 药物分析杂志, 2018, 38(10): 1711-1718.
- 任丽萍, 于海洲, 宋玉娟, 等. 酶解液相色谱法测定硫酸软骨素钠含量[J]. 药物分析杂志, 2012, 32(7):4.
-