**《口服胶原蛋白生物利用度的评价方法》团体标准**

**（征求意见稿）编制说明**

**一、工作简况：包括任务来源、起草单位、主要起草人、参与单位、主要工作及其所做的其他工作等；**

**1、任务来源**

根据2020年全国标准化工作要点，大力推动实施标准化战略，持续深化标准化工作改革，加强标准体系建设，提升引领高质量发展的能力。依据《中华人民标准化法》以及《团体标准管理规定》相关规定，中国食品药品企业质量安全促进会决定制定《口服胶原蛋白生物利用度的评价方法》团体标准，满足企业及各方对口服胶原蛋白生物效价评估的实际需求，规范口服胶原蛋白产品生物利用度的评价方法，推动相关技术创新，促进行业健康快速发展。

**2、制定背景**

目前市场上口服胶原蛋白产品逐渐走红，但其中所用胶原蛋白的动物来源、加工工艺和分子量大小存在较大差异，让消费者难以判断产品生物效价（也称生物利用度）的高低。然而，蛋白质和多肽的生物利用度评价极具挑战性，这主要与其易受体内肽酶作用而发生水解有关。生物活性蛋白（肽）是指能够发挥除营养价值以外生理学活性的蛋白质或多肽，故其生物利用度需要基于入血的活性肽段（而非游离氨基酸）来进行评价，这显著区别于普通食物蛋白生物利用度的评价。

口服胶原蛋白是一类以动物结缔组织（如皮、骨和鳞）为原料制得的生物活性蛋白（肽）。大量动物和临床研究证据表明，胶原蛋白具有保护皮肤、关节、骨骼和心血管健康的活性。消化道、血液和组织细胞表面具有丰富多样的肽酶，这会对食源性生物活性蛋白（肽）造成显著的首过效应，因此，外周循环中食源性小肽（二/三肽为主）半衰期往往在10分钟以内、浓度通常仅在纳摩尔水平（活性浓度一般在微摩尔水平），从而难以到达各组织器官发挥生理活性。研究发现，胶原蛋白富含羟脯氨酸而较为耐受肽酶水解，其经消化吸收产生的含羟脯氨酸二/三肽（hydroxyproline-containing di-/tripeptides, HCP）在血液中可保持在微摩尔水平达6小时以上。HCP随血液循环分布于肝、肾、骨髓、皮肤、关节和软骨等器官和组织中，且具有多种独特的生理活性，如促进皮肤纤维原细胞生长，调节软骨细胞、成骨细胞、前脂肪细胞和辅助性 T 细胞分化，增加皮肤纤维原细胞、软骨细胞和关节滑膜细胞中透明质酸的合成等。因此，HCP是口服胶原蛋白产品发挥功能活性的关键物质基础。

胶原蛋白的生物利用度可采用体外细胞模型和动物模型来进行评价。根据加拿大Betti教授研究团队（2017）报道，牛皮胶原蛋白肽在Caco-2肠上皮细胞单层模型中的生物利用度介于15%至23%之间，该研究基于氨基酸跨膜转运总量来计算胶原蛋白肽的生物利用度，缺少对HCP的定量和定性检测。加拿大Kubow教授研究团队（2021）报道了采用HIEC-6正常人肠上皮细胞模型来评价胶原蛋白肽的生物利用度，克服了Caco-2结肠癌细胞中寡肽转运体1（PEPT1）表达过低的缺陷，观察了几种典型HCP（包括Gly-Pro、Hyp-Gly、Ala-Hyp、Pro-Hyp和Gly-Pro-Hyp）的生物利用度（介于~10%至~90%），但缺少对胶原蛋白肽生物利用度的总体评价。中国学者王林等人（2015）采用大鼠药代动力学试验评价了罗非鱼鱼皮胶原的生物利用度，基于经口灌胃和静脉注射游离羟脯氨酸的曲线下面积，分别算得相对和绝对生物利用度为57.8%和49.6%，并鉴定了HCP的种类，但该研究中生物利用度仍是基于游离氨基酸算得，缺少基于HCP的生物利用度计算。

口服胶原蛋白的生物效价评估对于规范消费市场和行业健康发展具有重要意义，经查询，国内尚无相关国家标准或行业标准。本文件旨在建立科学的口服胶原蛋白生物利用度评价方法，为口服胶原蛋白的功效评价和产品开发提供指导。

**3、起草单位及起草人**

本文件起草单位：中国保健协会食物营养与安全专业委员会、中国海洋大学、广西神冠胶原生物集团有限公司、中科梵肽（北京）科技发展有限公司、广东丸美生物技术股份有限公司、上海蔓森品牌管理有限公司、朗姿赛尔生物科技（广州）有限公司、华熙生物科技股份有限公司、山东海奥斯生物科技股份有限公司、杭州唯西贸易有限公司、济南法澜秀生物工程有限公司、馨辰生物（广东）有限公司、安徽佳洪健康产业有限公司、上海锦鲤吉品商业管理有限公司、河北肽都生物科技集团有限公司、深圳精准健康食品科技有限公司、嘉利达（平阳）明胶有限公司、广东伊丽汇美容科技有限公司、杭州大熊品牌管理有限公司、湖北优鲵可生物科技有限公司。

本文件主要起草人：孙莉、吴浩浩、梁运贤、曲词、孙云起、周瑛、马得胜、付杰、宋立国、戴晶晶、杨金风、王文、宋琛、于文娟、付彩霞、顾卓键、邹清、邓晓春。

**4、起草过程**

**4.1 标准研制阶段**

2022年9月，依据《中华人民共和国标准化法》、《国务院关于深化标准化工作改革方案》等文件的要求，按照中国食品药品企业质量安全促进会团体标准的制修订程序组织有关技术人员成立标准起草工作组，确定标准名称为《口服胶原蛋白产品的生物利用度评价》。

2022年9～10月，标准起草工作组收集、整理相关标准化资料、专业文献等，为本文件的编制提供参考，并通过企业和学术界调研，了解行业内实际需求情况，经实验研究、研讨、论证后编写完成《口服胶原蛋白产品的生物利用度评价》初稿和立项申请书。

**4.2 标准立项阶段**

中国食品药品企业质量安全促进会于2022年12月30日召开《口服胶原蛋白产品的生物利用度评价》团体标准线上立项评审会议，由团体标准牵头单位项目负责人介绍了标准立项背景、必要性、技术指标及主要编制内容等，来自南海水产研究所、海南大学、西南大学、宁波大学和中国标准化研究院的专家对该项团体标准的必要性、可行性和科学性进行了审议，认为该标准草案符合标准的立项要求，并建议进一步细化完善标准框架内容、确认标准范围和分类及完善标准实验方法和数据。

**4.3 标准起草阶段**

2023年1～2月，标准起草工作组根据立项会专家的建议，将该项团体标准的题目更改为《口服胶原蛋白生物利用度的评价方法》，将标准范围确定为食用胶原、明胶和胶原蛋白肽，完善了口服胶原蛋白的定义，并细化了动物实验方法和羟脯氨酸测定方法，进一步提升了该标准的科学性和可操作性

**4.4 征求意见阶段**

 ……

**4.5 技术审查阶段**

 ……

**二、标准编制原则和确定标准主要内容及其论据，如项目的社会意义和经济性、技术指标、性能要求、检验方法、检验规则等；**

**1、编制原则**

在标准制定过程中，标准起草工作组按照GB/T 1.1-2020 给出的规则编写，主要遵循以下原则：

（1）协调性: 保证标准与国内现行国家标准、行业标准协调一致。

（2）规范性：严格按照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》给出的规则起草，保证标准的编写质量。

（3）适用性：结合产品生产企业管理实践和产品的主要环境影响，提出对企业产品的具体质量要求和生产经营规范。

**2、主要内容及其确定依据**

**2.1 适用范围**

本文件规定了口服胶原蛋白产品生物利用度的评价方法。

本文件适用于食用胶原、明胶和胶原蛋白肽的生物利用度评价。

**2.2 术语和定义**

本文件根据国内外文献的论述和理解，对口服胶原蛋白及其生物利用度进行了如下定义：

口服胶原蛋白：以动物结缔组织（包括皮、骨、筋、腱、鳞等）为原料，经过提取、水解或精制生产的食用胶原（应符合GB 14967-2015的规定）、明胶（应符合GB 6783-2013的规定）和胶原蛋白肽（应符合GB 31645的规定）。

生物利用度：生物利用度是指口服胶原蛋白产品经胃肠道消化吸收产生的活性肽段（即含羟脯氨酸二/三肽）进入全身循环的程度和速度，分为绝对生物利用度和相对生物利用度。绝对生物利用度是以静脉注射甘氨酰脯氨酰羟脯氨酸（Gly-Pro-Hyp）为参比获得的含羟脯氨酸二/三肽进入体内循环的相对量；相对生物利用度是以经口灌胃Gly-Pro-Hyp为参比获得的含羟脯氨酸二/三肽进入体内循环的相对量。

**2.3 生物利用度评价**

**2.3.1 试剂**

除另有规定外，所有试剂均为分析纯。

试剂主要包括：

——实验用水：应符合 GB/T 6682 中一级水标准；

——0.9%氯化钠注射液，符合《中国药典》2015年版二部标准;

——硫酸；

——无水乙酸钠；

——氢氧化钠；

——正丙醇；

——高氯酸；

——一水柠檬酸；

——对二氨基苯甲醛；

——三水 N-氯-对甲苯磺酰胺钠盐（氯胺T）；

——标准品：甘氨酸-脯氨酰羟脯氨酸（Gly-Pro-Hyp），纯度≥99%；

**2.3.2　受试物羟脯氨酸含量检测**

受试物的羟脯氨酸含量，按照GB/T 9695.23规定的酸解和显色方法检测。

**2.3.3　动物实验方法**

**2.3.3.1 实验动物及分组**

选用300 g—350 g体重（6个月月龄）的雌性Sprague-Dawley大鼠，单笼饲养，自由摄食和饮水。待动物适应1周后，随机分组，每组8-12只，分为4组，即空白对照组、Gly-Pro-Hyp静脉注射组、Gly-Pro-Hyp经口灌胃组、受试样品组。

**2.3.3.2 受试样品配制**

a）Gly-Pro-Hyp灌胃样品的配制方法为：称取0.5125 g Gly-Pro-Hyp粉末于10 mL离心管中，加入5 mL 0.9%氯化钠注射液，涡旋混匀1 min，即为0.1025 g/mL母液；

b）Gly-Pro-Hyp静脉注射样品配制方法为：称取0.1640 g Gly-Pro-Hyp粉末于1.5 mL无菌离心管中，加入1 mL 0.9%氯化钠注射液，涡旋混匀1min，即为0.1640 g/mL注射液母液；

c）受试样品配制方法为：称取0.5125 g 受试产品粉末于10 mL离心管中，加入5 mL 0.9%氯化钠注射液，涡旋混匀1 min，即为0.1025 g/mL母液。

**2.3.3.3 药代动力学方法**

大鼠禁食12 h（饮水正常供应）以排除饮食干扰，分别给予药物。

——受试样品组：经口灌胃给予受试样品2 mL～4 mL（剂量以羟脯氨酸计，为82 mg羟脯氨酸/kg体重），将母液用0.9%氯化钠注射液稀释至相应浓度进行灌胃。

——空白对照组：经口灌胃给予受试样品组同体积0.9%氯化钠注射液。

——Gly-Pro-Hyp经口灌胃组：通过经口灌胃的方式给予Gly-Pro-Hyp样品2 mL～4 mL（剂量以羟脯氨酸计，为82 mg羟脯氨酸/kg体重），将母液用0.9%氯化钠注射液稀释至相应浓度进行灌胃。

——Gly-Pro-Hyp静脉注射组：通过尾静脉注射的方式给予Gly-Pro-Hyp 250 μL～500 μL（剂量以羟脯氨酸计，为82 mg羟脯氨酸/kg体重），将注射液母液用0.9%氯化钠注射液稀释至相应浓度进行注射。

胶原蛋白肽的人体摄入剂量可按照保健食品一般推荐最大摄入量（10 g/d,60 kg体重）和胶原蛋白含有约8%羟脯氨酸（质量含量）计算，以羟脯氨酸计为18 mg/kg体重。根据日本学者Sato教授团队（2019）的报道，正常成年人每日摄入2份牛排或者1份鲨鱼尾时，胶原蛋白摄入量即可超过10 g/d，故本文件胶原蛋白肽人体摄入量估算是合理和安全的。根据等体表面积原则，大鼠等效剂量需要在人体剂量的基础上乘以6.2倍，故本文件中胶原蛋白肽给予大鼠的剂量设置为82 mg/kg。

采用1.5 mL肝素化负压采血管尾静脉取血，各组采血时间点为0 h（药物给予前）、0.5 h、1 h、2 h、4 h、8 h和24 h，Gly-Pro-Hyp静脉注射组还需在药物给予后立即取血1次，每次取血大约500 μL。

**2.3.3.4 血液样本处理**

不同时间点收集到的静脉血负压管，4℃静置30 min后，离心力3500 g下离心15 min，吸出血液分层上清，即为血浆。

**2.3.4　血浆羟脯氨酸测定**

1. 血浆总羟脯氨酸的含量：40 μL血浆与300 μL硫酸（3 mol/L）在1 mL安剖瓶中混合，封口后置于105℃烘箱内恒温16 h，0.22 μm滤膜过滤后，取清液按照GB/T 9695.23规定的显色方法测定羟脯氨酸浓度，具体操作方法如下：
	* + - 移取40 μL上述样品溶液、空白（超纯水）或羟脯氨酸标准溶液（0.05 μg/mL~15 μg/mL，现用现配）于离心管中，加入20 μL氯胺T试剂（临用前配置），混合后于室温下放置20 min ± 1 min。
			- 加入20 μL显色剂于离心管中，充分混合，用铝箔或者塑料薄膜将离心管封口。
			- 将离心管迅速放入60℃水浴中，加热20 min。
			- 取出离心管，用流动水冷却至少3 min，在室温下放置30 min。
			- 将上述离心管中液体转移至96孔酶标板中，利用酶标仪测定558 nm处吸光值。
			- 以扣除空白的标准溶液吸光度为纵坐标，以相应的标准溶液浓度为横坐标，绘制标准曲线。
			- 以扣除空白的样品溶液吸光度查找标准曲线，计算样品溶液中羟脯氨酸的含量。
2. 血浆游离羟脯氨酸的含量：血浆稀释至合适比例后，按照GB/T 9695.23规定的显色方法测定羟脯氨酸浓度，具体操作方法同上。
3. 血浆肽结合羟脯氨酸的含量：血浆总羟脯氨酸与游离羟脯氨酸的含量之差。

**2.3.5　药代动力学**

以采血时间为横坐标，以血浆肽结合羟脯氨酸含量为纵坐标，绘制药代动力学曲线，操作步骤示例如下：

* 1. 利用PKSolver药动学药效学数据处理软件，选择【非房室模型分析-非脉管给药】，打开模型运算对话框。
	2. 点击【时间】输入按钮，在Excel表格中拖动鼠标选择相应数据，以输入时间数据。
	3. 点击【浓度】输入按钮，在Excel表格中拖动鼠标选择相应数据，以输入浓度数据。
	4. 选择设置“时间单位”和“浓度单位”。
	5. 输入“给药剂量”，设置“给药剂量”的单位。
	6. 点击【运行】，完成运算，计算所得血药浓度-时间曲线下面积（AUC）。

各组的曲线下增量面积（iAUC），即可反映含羟脯氨酸二/三肽入血的程度和速度，按照式（1）、（2）和（3）计算：

iAUC（Gly-Pro-Hyp灌胃）= AUC（Gly-Pro-Hyp灌胃）－ AUC（空白对照）……………（1）

iAUC（Gly-Pro-Hyp注射）= AUC（Gly-Pro-Hyp注射）－ AUC（空白对照）……………（2）

iAUC（受试样品）= AUC（受试样品）－ AUC（空白对照）…………………………（3）

**2.3.6　生物利用度计算**

受试样品的相对生物利用度（*F*r），按照式（4）计算：

*F*r= iAUC（受试样品）/iAUC（Gly-Pro-Hyp灌胃）×100%………………………（4）

受试样品的绝对生物利用度（*F*s），按照式（5）计算：

*F*s= iAUC（受试样品）/iAUC（Gly-Pro-Hyp注射）×100%………………………（5）

**3、社会意义和经济性**

推进健康中国建设，提高人民健康水平，是我国重要的战略规划和目标。口服胶原蛋白已被大量研究证实具有保护皮肤、关节、骨骼和心血管健康的活性，近年来在大健康市场上颇受青睐，市场渗透率正在逐年稳步提升。口服胶原蛋白的市场品类繁多，消费者目前对其功能活性的差异缺少科学的认识和评价标准，故本文件方法有利于对口服胶原蛋白产品实现科学分级，对于规范胶原蛋白消费市场有重要的意义。口服胶原蛋白产业是畜禽水产品加工副产物综合利用的重要出口，本文件有助于推动畜禽水产品加工副产物的高值化利用，对于提振我国农业经济具有重要意义。

**三、涉及专利的有关说明**

本文件不涉及专利及知识产权问题。

**四、采用国际标准和国外先进标准情况，与国际、国内同类标准技术内容的对比情况**

本文件中羟脯氨酸含量的测定方法与国家标准GB/T 9695.23和国际标准ISO 3496规定的酸解和显色方法完全一致。

**五、****与现行法律、行政法规和相关标准的关系**

 本文件与相关法律、法规、规章及相关标准协调一致，没有冲突。

**六、重大分歧意见的处理经过和依据**

 本文件在制定过程中未出现重大分歧意见。

**七、****实施标准的要求和措施建议**

本文件发布后，应向相关企业进行宣传、贯彻，推荐执行该文件。

**八、其他应当说明的事项**

无。

**标准起草工作组**

**2023年2月10日**