|  |  |
| --- | --- |
| ICS | 67.040 |
| CCS | |  | | --- | |  |   X 10 |

团体标准

T/FDSA XXX—2023

口服胶原蛋白生物利用度的评价方法

Method for evaluation of the bioavailability of orally consumed collagen

征求意见稿

2023-XX-XX发布

2023-XX-XX实施

中国食品药品企业质量安全促进会  发布

目次

[前言 II](#_Toc128167885)

[1 范围 1](#_Toc128167886)

[2 规范性引用文件 1](#_Toc128167887)

[3 术语和定义 1](#_Toc128167888)

[3.1 口服胶原蛋白 1](#_Toc128167889)

[3.2 生物利用度 1](#_Toc128167890)

[4 生物利用度评价 1](#_Toc128167891)

[4.1 试剂](#_Toc128167892) 1

[4.2 受试物羟脯氨酸含量检测 2](#_Toc128167893)

[4.3 动物实验方法 2](#_Toc128167894)

[4.4 血浆羟脯氨酸测定](#_Toc128167895) 2

[4.5 药代动力学 3](#_Toc128167896)

[4.6 生物利用度计算](#_Toc128167897) 3

[参考文献](#_Toc128167898) 4

1. 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 提出。

本文件由中国食品药品企业质量安全促进会归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

口服胶原蛋白生物利用度的评价方法

* 1. 范围

本文件规定了口服胶原蛋白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。

* 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 14967-2015 食品安全国家标准 胶原蛋白肠衣

GB 6783-2013 食品安全国家标准 食品添加剂 明胶

GB 31645 食品安全国家标准 胶原蛋白肽

GB/T 9695.23 肉与肉制品 羟脯氨酸含量测定

GB 2760 食品安全国家标准 食品添加剂使用标准

* 1. 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

* + 1. 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）。

* + 1. 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。

* 1. 生物利用度评价
     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﹪。

* + 1. 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。

* + 1. 动物实验方法

4.3.1 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只～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。

4.3.2 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1 min，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。

4.3.3 药代动力学方法

大鼠禁食12 h（饮水正常供应）以排除饮食干扰后，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。

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。

4.3.4 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。

* + 1. 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 μ g/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。

1. 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。
2. 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。
   * 1. 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）

* + 1. 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）

参考文献

[1] GB 31645 食品安全国家标准 胶原蛋白肽

[2] GB/T 9695.23 肉与肉制品 羟脯氨酸含量测定

[3] GB 2760 食品安全国家标准 食品添加剂使用标准

[4] 国家药品监督管理局《化学药物制剂人体生物利用度和生物等效性研究技术指导原则》（2005年3月，[H]GCL2-1）

[5] Wang L, Wang Q, Qian J, et al. Bioavailability and bioavailable forms of collagen after oral administration to rats[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2015, 63(14): 3752-3756.

