

团体标准

T/FDSA 0050—2024

口服胶原蛋白生物利用度测定方法

Method for determination of the bioavailability of oral collagen protein

2024-02 -03 发布

2024-03 -06 实施

目 次

前 言 II

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 术语和定义 1

4 原理 1

5 试剂 1

6 仪器和用品 2

7 试验方法 2

8 结果计算 3

附 录 A （规范性） 羟脯氨酸浓度检测方法 氯胺 T 法..... 5

参 考 文 献 6

中国食品药品企业质量安全促进会

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。

本文件由广西神冠胶原生物集团有限公司提出。

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：广西神冠胶原生物集团有限公司、中国海洋大学、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、陕西佰诺兮生物科技有限公司、杭州本然重塑科技有限公司、杭州威圣健康科技有限公司、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、北京理工亘舒科技有限公司、西安国联质量检测技术股份有限公司、嘉利达（平阳）明胶有限公司、广东伊丽汇美容科技有限公司、株式会社 自然 中国办事处、民强（昆山）食品科技有限公司、国珍健康科技（北京）有限公司、德州蓝力生物技术有限公司、浙江平太荣生物科技有限公司、斐缦（长春）医药生物科技有限责任公司、中国保健协会食物营养与安全专业委员会。

本文件主要起草人：吴浩浩、周亚仙、曲词、孙云起、周瑛、陈忠平、付杰、马龙、朱瑜、郭迎春、戴晶晶、杨金凤、王文、钟桂军、宋琛、于文娟、邓玉林、崔苗、付彩霞、顾卓键、邹清、王权、党艳婷、王玉民、倪泳一、李宏强、梁运贤、林诗雅、李胜、陈则姜、宋立国、胡成虎、李爱民、弭玉霞、安颖、徐敏、王丽卫、辛念、范春雪、周欣、刘艳、孙莉。

口服胶原蛋白生物利用度测定方法

1 范围

本文件规定了基于活性肽段测定口服胶原蛋白生物利用度的原理、试剂、仪器和用具、试验方法和结果计算。

本文件适用于食用胶原蛋白产品的生物利用度测定。

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/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 9695.23 肉与肉制品 羟脯氨酸含量测定

GB 14925 实验动物 环境及设施

《中国药典》2020年版二部 氯化钠注射液

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 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蛋白产品。

3.2 生物利用度

口服胶原蛋白产品经胃肠道消化吸收后，活性肽段进入血液循环的程度和速度。

注：分为相对生物利用度和绝对生物利用度。

4 原理

选用典型胶原三肽甘氨酸脯氨酸羟脯氨酸（Gly-Pro-Hyp）作为参比试剂，通过大鼠口服药代动力学研究进行测定。利用氯胺T法检测血浆总羟脯氨酸含量和游离羟脯氨酸含量，二者之差即为血浆肽结合羟脯氨酸含量，以此判断胶原蛋白活性肽段进入血液循环的程度和速度。

5 试剂

5.1 实验用水：应符合 GB/T 6682 中一级水标准。

5.2 氯化钠注射液：应符合《中国药典》2020 年版二部标准。

5.3 Gly-Pro-Hyp：纯度≥99%。

5.4 盐酸：分析纯。

5.5 氢氧化钠：分析纯。

6 仪器和用品

- 6.1 分析天平：感量 0.0001 g。
- 6.2 离心机：可控温于 4℃。
- 6.3 水浴锅：可控温于 100℃。
- 6.4 涡旋振荡器。
- 6.5 无菌离心管：50 mL。
- 6.6 灌胃针：16 号。
- 6.7 安剖瓶：1 mL。
- 6.8 无菌注射器：1 mL，5 mL。

7 试验方法

7.1 受试物准备

7.1.1 羟脯氨酸含量测定

按照GB/T 9695.23规定的方法测定口服胶原蛋白产品的羟脯氨酸含量。

7.1.2 受试制剂

称取适量口服胶原蛋白产品于50 mL无菌离心管中，加入25 mL氯化钠注射液，涡旋混匀1 min，制得羟脯氨酸含量为12.0 mg/mL的受试制剂。

7.1.3 口服参比制剂

称取0.653 g Gly-Pro-Hyp粉末于50 mL无菌离心管中，加入25 mL氯化钠注射液，涡旋混匀1 min，制得羟脯氨酸含量为12.0 mg/mL的口服参比制剂。

7.1.4 注射参比制剂

称取1.567 g Gly-Pro-Hyp粉末于50 mL无菌离心管中，加入15 mL氯化钠注射液，涡旋混匀1 min，制得羟脯氨酸含量为48.0 mg/mL的注射参比制剂。

7.2 实验动物准备

7.2.1 动物选择

选用SD大鼠或Wistar大鼠，单一性别，雌雄均可。雌性动物应为未妊娠和未经产的。健康成年大鼠鼠龄在8~10周内。动物体重变异不超过动物平均体重的±20%。

7.2.2 饲养环境和条件

动物饲养环境和条件应符合GB 14925的有关规定。饲喂常规动物饲料，饮水量不限。试验前，动物在饲养环境中至少适应3 d。

7.2.1 动物分组

按照体重随机分为4组，每组至少5只。

7.3 给药

大鼠禁食12 h（饮水正常供应）以排除饮食干扰后，分别给予受试物。

- 空白对照组：经口灌胃2 mL氯化钠注射液。
- 受试制剂组：经口灌胃2 mL受试制剂。
- 口服参比制剂组：经口灌胃2 mL口服参比制剂。

——注射参比制剂组：尾静脉注射500 μL 注射参比制剂。

7.4 取样

采用1.5 mL肝素化负压采血管进行尾静脉取血，取血量为500 μL 。各组采血时间点为0 h（给药前）、0.5 h、1 h、2 h、4 h和8 h。另外，注射参比制剂组还需在给药后立即取血1次。

7.5 样品处理

7.5.1 血浆样本制备

将血液样本冰浴静置30 min后，在4℃条件下3 500 $\times$ g离心15 min，吸出上清，即得血浆样本。

7.5.2 血浆水解液制备

将50 μL 血浆样本与100 μL 6 mol/L氢氧化钠溶液在1 mL安瓿瓶中混合，封口，100℃加热20 min，室温冷却后，再加入100 μL 6 mol/L盐酸溶液中和，室温条件下6 000 $\times$ g离心5 min，取上清液，即得血浆水解液。

7.6 血浆羟脯氨酸含量测定

7.6.1 血浆游离羟脯氨酸

按照附录A规定的方法测定血浆样本中羟脯氨酸的浓度，即得血浆游离羟脯氨酸含量。

7.6.2 血浆总羟脯氨酸

按照附录A规定的方法测定血浆水解液中羟脯氨酸的浓度，再乘以稀释倍数5，即得血浆总羟脯氨酸含量。

7.6.3 血浆肽结合羟脯氨酸

血浆总羟脯氨酸含量与血浆游离羟脯氨酸含量之差，即得血浆肽结合羟脯氨酸含量。

8 结果计算

8.1 药代动力学参数计算

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。采用经过确证的数据处理软件，选择非房室数学模型分析方法，计算各组0 h~8 h血药浓度-时间曲线下面积（AUC）。受试制剂组、口服参比制剂组和注射参比制剂组的曲线下增量面积（iAUC），按照式（1）、（2）和（3）计算：

$$iAUC_{\text{受试制剂}} = AUC_{\text{受试制剂}} - AUC_{\text{空白对照}} \dots\dots\dots (1)$$

$$iAUC_{\text{口服参比}} = AUC_{\text{口服参比}} - AUC_{\text{空白对照}} \dots\dots\dots (2)$$

$$iAUC_{\text{注射参比}} = AUC_{\text{注射参比}} - AUC_{\text{空白对照}} \dots\dots\dots (3)$$

式中：

$iAUC_{\text{受试制剂}}$ ——受试制剂组的iAUC；

$iAUC_{\text{口服参比}}$ ——口服参比制剂组的iAUC；

$iAUC_{\text{注射参比}}$ ——注射参比制剂组的iAUC；

$AUC_{\text{空白对照}}$ ——空白对照组的AUC；

$AUC_{\text{受试制剂}}$ ——受试制剂组的AUC；

$AUC_{\text{口服参比}}$ ——口服参比制剂组的AUC；

$AUC_{\text{注射参比}}$ ——注射参比制剂组的AUC。

注：计算结果保留三位有效数字。

8.2 生物利用度计算

8.2.1 相对生物利用度

按照式（4）计算：

$$F_r = \text{iAUC}_{\text{受试制剂}} / \text{iAUC}_{\text{口服参比}} \times 100\% \dots\dots\dots (4)$$

式中：

F_r ——相对生物利用度；

$\text{iAUC}_{\text{受试制剂}}$ ——受试制剂组的iAUC；

$\text{iAUC}_{\text{口服参比}}$ ——口服参比制剂组的iAUC。

注：计算结果保留三位有效数字。

8.8.2 绝对生物利用度

按照式（5）计算：

$$F_s = \text{iAUC}_{\text{受试制剂}} / \text{iAUC}_{\text{注射参比}} \times 100\% \dots\dots\dots (5)$$

式中：

F_s ——绝对生物利用度；

$\text{iAUC}_{\text{受试制剂}}$ ——受试制剂组的iAUC；

$\text{iAUC}_{\text{注射参比}}$ ——注射参比制剂组的iAUC。

注：计算结果保留三位有效数字。

附 录 A
(规范性)
羟脯氨酸浓度检测方法 氯胺 T 法

A.1 方法提要

羟脯氨酸经氯胺T氧化后,与对二甲氨基苯甲醛反应生成红色化合物,在波长558 nm处比色测定。

A.2 试剂和配制

A.2.1 水: GB/T 6682规定的一级水。

A.2.2 缓冲溶液(pH=6.8): 将26.0 g一水柠檬酸[C₆H₈O₇·H₂O]、14.0 g氢氧化钠和78.0 g无水乙酸钠[Na(CH₃CO₂)]用500 mL水溶解,并转入1 L的容量瓶中,加入250 mL正丙醇,用水定容,于4℃暗处保存。

A.2.3 氯胺T溶液: 称取1.41 g 三水·N-氯-对甲苯磺酰胺钠盐[CH₃C₆H₄SO₂NCI₂Na·3H₂O](氯胺T),用100 mL缓冲溶液(4.1.1)溶解。现用现配。

A.2.4 显色剂: 称取10.0 g对二甲氨基苯甲醛,用35 mL高氯酸溶液[60%(质量分数)]溶解,缓慢加入65 mL异丙醇。现用现配。

A.2.5 羟脯氨酸标准液: 称取50 mg 羟脯氨酸(4-羟基-α-吡咯甲酸)于100 mL容量瓶中,用水溶解并定容。现用现配。

A.2.6 羟脯氨酸标准工作液: 移取20.00 mL羟脯氨酸标准液至100 mL容量瓶中,用水定容;吸取7.500 mL、3.750 mL、1.875 mL、0.938 mL、0.469 mL、0.234 mL、0.117 mL于100 mL容量瓶中,用水定容,所得羟脯氨酸标准工作液浓度依次为7.500 μg/mL、3.750 μg/mL、1.875 μg/mL、0.938 μg/mL、0.469 μg/mL、0.234 μg/mL、0.117 μg/mL。现用现配。

A.3 仪器和设备

A.3.1 水浴锅: 可控温于60℃±0.5℃。

A.3.2 酶标仪: 可用波长558 nm±2 nm。

A.3.3 分析天平: 感量0.0001 g。

A.3.4 酶标板: 96孔。

A.3.5 容量瓶: 100 mL、250 mL、500 mL、1 L。

A.3.6 具塞玻璃试管: 1 mL。

A.4 羟脯氨酸浓度测定

样品溶液中羟脯氨酸浓度的测定包括以下步骤:

a) 移取50 μL样品溶液或羟脯氨酸标准工作液于1 mL具塞试管中,加入50 μL氯胺T试剂,混合后于室温下放置20 min±1 min;

b) 加入50 μL显色剂和100 μL水,充分混合、封口;

c) 将试管放入60℃水浴,加热10 min;

d) 取出试管,用流动水冷却至少3 min,在室温下放置30 min;

e) 将上述试管中液体转移至96孔酶标板中,使用酶标仪于558 nm波长处,测定吸光度;

f) 以羟脯氨酸标准工作液浓度为横坐标,以扣除空白的相应吸光度为纵坐标,绘制标准曲线;

g) 以扣除空白的吸光度查找标准曲线,计算相应样品溶液中羟脯氨酸的浓度。

参 考 文 献

[1] 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）

[2] 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.

中国食品药品企业质量安全促进会