

T/ACCEM

团 体 标 准

T/ACCEM XXXX—XXXX

胶原蛋白生物活性物质生物利用度体内评价指南

Guidelines for in vivo evaluation of the bioavailability of collagen bioactive substances

（征求意见稿）

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX – XX – XX 发布

XXXX – XX – XX 实施

中国商业企业管理协会 发 布

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 基本原则 1

5 实验动物要求 1

6 受试物要求 2

7 试剂、仪器及用品要求 2

8 实验人员要求 2

9 评价流程 3

10 废弃物处理 5

11 评价报告 5

附录 A（规范性） 羟脯氨酸浓度检测方法..... 7

参考文献 9

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。

本文件由康道生物（南通）有限公司提出。

本文件由中国商业企业管理协会归口。

本文件起草单位：康道生物（南通）有限公司、XXX、XXX。

本文件主要起草人：XXX、XXX、XXX。

胶原蛋白生物活性物质生物利用度体内评价指南

1 范围

本文件规定了胶原蛋白生物活性物质生物利用度体内评价指南的基本原则、实验动物要求、受试物要求、试剂、仪器及用品要求、实验人员要求、评价流程、废弃物处理、评价报告。
本文件适用于胶原蛋白生物活性物质生物利用度体内评价。

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
GB 19489 实验室 生物安全通用要求
GB/T 31190 实验室废弃化学品收集技术规范
GB/T 35892 实验动物 福利伦理审查指南
SN/T 3592 实验室化学药品和样品处理的标准指南
SN/T 4835 实验室生物废弃物管理要求
《中华人民共和国药典（2020 年版）》

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

生物利用度 bioavailability
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 基本原则

4.1 科学性

评价过程应基于科学的理论和方法。

4.2 规范性

评价工作应严格遵循国家相关法律法规、政策标准以及动物福利伦理要求。

5 实验动物要求

5.1 动物选择

实验动物的选择应符合表 1 的规定。

表1 实验动物的选择

项目	要求
物种	SD 大鼠或 Wistar 大鼠
性别	单一性别，雌雄均可

表1 实验动物的选择（续）

项目	要求
年龄/周	8~10
体重/g	200±20
数量/只	每组≥5
来源	具有实验动物生产许可证的合格供应商

5.2 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。

5.3 动物福利伦理

实验动物的福利伦理宜按 GB/T 35892 的规定进行审查。

6 受试物要求

6.1 原料

6.1.1 可使用的原料：富含胶原蛋白的新鲜动物组织（包括皮、骨、筋、腱、鳞等）。

6.1.2 禁用原料：无检验检疫合格证明或经有害处理过的动物的组织。

6.2 纯度与含量

6.2.1 纯度要求：需高纯度胶原蛋白肽，不得掺杂非胶原蛋白，相对分子量小于 10 000 的胶原蛋白肽所占比例应不小于 90%。

6.2.2 添加剂限制：允许添加协同成分，但需明确标注含量。

7 试剂、仪器及用品要求

7.1 试剂

试剂要求具体如下：

- a) 实验用水：应符合 GB/T 6682 中一级水的规定；
- b) 氯化钠注射液：应符合《中华人民共和国药典（2020 年版）》的规定；
- c) 典型胶原三肽甘氨酸脯氨酸羧基脯氨酸（Gly-Pro-Hyp）：纯度宜不小于 99%；
- d) 盐酸：分析纯；
- e) 氢氧化钠：分析纯。

7.2 仪器及用品

试验所用的仪器及用品如下：

- a) 分析天平：感量 0.0001 g；
- b) 离心机：可控温于 4 ℃；
- c) 水浴锅：可控温于 100 ℃；
- d) 涡旋振荡器；
- e) 无菌离心管：50 mL；
- f) 灌胃针：16 号；
- g) 安剖瓶：1 mL；
- h) 无菌注射器：1 mL，5 mL。

8 实验人员要求

实验人员至少应符合如下要求：

- a) 具备胶原蛋白产品生物活性物质利用度体内评价相适应的专业技术能力；

- b) 遵守实验室相关的制度和操作规范;
- c) 接受过实验室安全教育, 掌握实验室生物安全操作知识;
- d) 应具有防范和处理评价工作中突发事件的能力。

9 评价流程

9.1 总流程

胶原蛋白生物活性物质生物利用度体内评价流程如下:
受试物准备→实验动物准备→给药→样本采样与处理→含量测定→结果计算。

9.2 受试物准备

9.2.1 羟脯氨酸含量测定

宜按 GB/T 9695.23 规定的方法进行测量。

9.2.2 受试制剂

- 受试制剂的制备步骤如下:
- a) 称取适量口服胶原蛋白产品于 50 mL 无菌离心管中;
 - b) 加入 25 mL 氯化钠注射液;
 - c) 涡旋混匀 1 min, 制得羟脯氨酸含量为 12.0 mg/mL 的受试制剂。

9.2.3 口服参比制剂

- 口服参比制剂的制备步骤如下:
- a) 称取 0.653 g Gly-Pro-Hyp 粉末于 50 mL 无菌离心管中;
 - b) 加入 25 mL 氯化钠注射液;
 - c) 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。

9.2.4 注射参比制剂

- 注射参比制剂制备步骤如下:
- a) 称取 1.567 g Gly-Pro-Hyp 粉末于 50 mL 无菌离心管中;
 - b) 加入 15 mL 氯化钠注射液;
 - c) 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。

9.3 实验动物准备

- 9.3.1 试验前, 动物在饲养环境中至少适应 3 d。
- 9.3.2 按照体重随机分为 4 组。
- 9.3.3 给药前, 大鼠宜禁食 12 h (饮水正常供应) 以排除饮食干扰。

9.4 给药

- 9.4.1 每组分别给予受试物, 给药方案具体见表 2。

表2 给药方案

组别	给药方式	给药剂量
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

- 9.4.2 经口灌胃的操作步骤如下:
 - a) 将动物称重后固定于垂直体位;
 - b) 测量剑突至口角距离作为插入深度 (大鼠宜 3 cm~4 cm);

- c) 宜使用 16 G~18 G 不锈钢钝头灌胃针进行, 推注速度宜为 1 mL/min, 观察无呛咳或反流;
- d) 追加 0.2 mL 空气确保完全给药。

9.4.3 尾静脉注射的操作步骤如下:

- a) 预热动物至血管扩张(温度宜为 40 °C, 持续 5 min);
- b) 使用 27 G 胰岛素针头, 45° 角穿刺;
- c) 推注速度宜不大于 0.1 mL/sec。

9.5 样本采样与处理

9.5.1 采样

9.5.1.1 采集点: 给药前(0 h)、0.5 h、1 h、2 h、4 h 和 8 h(所有组别)。

注: 注射参比制剂组追加给药后立即采样 1 次。

9.5.1.2 方法: 尾静脉取血, 宜采用 1.5 mL 肝素化负压采血管进行。

9.5.2 处理

9.5.2.1 血浆样本制备

血浆样本制备步骤如下:

- a) 血液样本冰浴静置 30 min;
- b) 4 °C 条件下 3 000×g 离心 15 min;
- c) 吸出上清, 即得血浆样本。

9.5.2.2 血浆水解液制备

- a) 血浆水解液制备步骤如下:
- b) 将 50 μL 血浆样本与 100 μL 6 mol/L 氢氧化钠溶液在安瓿瓶中混合;
- c) 将安瓿瓶封口, 于 100 °C 下加热 20 min;
- d) 室温冷却, 加入 100 μL 6 mol/L 盐酸溶液进行中和;
- e) 室温条件下 6 000×g 离心 5 min;
- f) 取上清液, 即得血浆水解液。

9.6 含量测定

9.6.1 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。

9.6.2 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。

9.6.3 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。

9.7 结果计算(保留三位有效数字)

9.7.1 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。

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

式中:

$iAUC_{\text{受试制剂}}$ — 受试制剂组的曲线下增量面积;

$AUC_{\text{受试制剂}}$ — 受试制剂组的曲线下面积；
 $AUC_{\text{空白对照}}$ — 空白对照组的曲线下面积。

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

式中：
 $iAUC_{\text{口服参比}}$ — 口服参比制剂组的曲线下增量面积；
 $AUC_{\text{口服参比}}$ — 口服参比制剂组的曲线下面积。

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

式中：
 $iAUC_{\text{注射参比}}$ — 注射参比制剂组的曲线下增量面积；
 $AUC_{\text{注射参比}}$ — 注射参比制剂组的曲线下面积。

9.7.2 生物利用度计算

9.7.2.1 相对生物利用度

按式（4）进行计算。

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

式中：
 F_r — 相对生物利用度；
其他同 8.7.1。

9.7.2.2 绝对生物利用度

按式（5）进行计算。

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

式中：
 F_s — 绝对生物利用度；
其他同 8.7.1。

10 废弃物处理

10.1 原则

- 10.1.1 分类收集、存放，分别集中处理。
- 10.1.2 宜采用废物回收以及固化、焚烧处理。
- 10.1.3 选择合适的方法进行检测，尽可能减少废物量、减少污染。
- 10.1.4 废弃物排放应符合国家有关环境排放标准。

10.2 具体措施

- 10.2.1 废弃化学品的收集与处理应符合 GB/T 31190 和 SN/T 3592 的规定。
- 10.2.2 微生物废弃物的处理应符合 GB 19489 和 SN/T 4835 的规定。
- 10.2.3 试验动物废弃物和尸体的处理应符合 GB 14925 的规定。

11 评价报告

评价报告至少应包含以下内容：

- a) 受试物：
 - 原料；
 - 纯度与含量；

- 制剂制备方法；
- b) 取样方法；
- c) 详细实验设计和操作方法：
 - 包括样本例数；
 - 参比制剂；
 - 给药剂量；
 - 给药方法；
 - 采样时间安排；
- d) 实验目的；
- e) 结果分析及讨论；
- f) 采用的数据处理程序和统计分析方法以及详细统计过程和结果；
- g) 参考文献。

附 录 A
(规范性)
羟脯氨酸浓度检测方法

A.1 原理

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 试剂和配置

A.2.1 如无特别说明,所用试剂均为分析纯。水为蒸馏水或去离子水,或相同纯度的水。

A.2.2 缓冲溶液(pH=6.8)

按 GB/T 9695.23 的规定进行配置。可提前几周配置,保存于 4℃暗处。

A.3 氯胺 T 溶液

按 GB/T 9695.23 的规定进行配置。临用前配置。

A.4 显色剂

按 GB/T 9695.23 的规定进行配置。临用前配置。

A.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。临用前配置。

A.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 $\mu\text{g/mL}$ 、3.750 $\mu\text{g/mL}$ 、1.875 $\mu\text{g/mL}$ 、0.938 $\mu\text{g/mL}$ 、0.469 $\mu\text{g/mL}$ 、0.234 $\mu\text{g/mL}$ 、0.117 $\mu\text{g/mL}$ 。临用前配置。

A.7 仪器和设备

包括试验室常规仪器及下列仪器:

- a) pH 计;
- b) 铝箔或不透明塑料薄膜;
- c) 水浴锅:可控温于 $60\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- d) 分光光度计:可用波长 $558\text{ nm}\pm 2\text{ nm}$;
- e) 分析天平:感量 0.0001 g;
- f) 容量瓶:100 mL、250 mL、500 mL、1 L;
- g) 具塞玻璃试管。

A.8 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具塞玻璃试管中,加入 50 μL 氯胺 T 试剂,混合后于室温下放置 $20\text{ min}\pm 1\text{ min}$;
- b) 加入 50 μL 显色剂于具塞玻璃试管中,充分混合,用铝箔或塑料薄膜封口;
- c) 将具塞玻璃试管放入 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴,加热 10 min;
- d) 取出具塞玻璃试管,用流动水冷却至少 3 min~5 min,在室温下放置 30 min;
- e) 用水作为空白溶液,于 $558\text{ nm}\pm 2\text{ nm}$ 处用分光光度计测定吸收值,平行测定 3 次,取平均值;
- 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.
 - [3] T/FDSA 0050—2023 口服胶原蛋白生物利用度测定方法
 - [4] GB/T 9695.23—2008 肉与肉制品 羟脯氨酸含量测定
 - [5] GB 31645—2018 食品安全国家标准 胶原蛋白肽
-