

# 重组胶原蛋白液体敷料鉴别检验方法适用性研究

陈永霞<sup>1</sup>, 张莉露<sup>2</sup>, 王朝壹<sup>1</sup>, 陈扬<sup>2</sup>, 张文杰<sup>1\*</sup>

(1. 天津市医疗器械审评查验中心, 天津 3000191; 2. 纳通医用防护器材(天津)有限公司, 天津 300308)

**摘要:** 重组胶原蛋白敷料是目前市场较火的一种皮肤护理类产品, 可通过在创面形成保护层, 起物理屏障作用。用于非慢性创面(如浅表性创面、激光/光子/果酸换肤/微整形术后创面)的护理, 为创面愈合提供微环境。对敷贴类产品中所含的重组胶原蛋白鉴别的检测, 是确保产品质量可靠的指标之一。本文研究了一款重组胶原蛋白液体敷料的鉴别方法的适用性。分别使用肽图法、N末端氨基酸序列法和等电聚焦电泳法对该试验样品中的重组胶原蛋白进行鉴别, 检测结果发现肽图法、N末端氨基酸序列法对该样品具有适用性。而用现有的等电聚焦电泳法未发现有条带检出, 该方法不适用。企业在选择重组胶原蛋白鉴别方法时应结合产品实际情况, 对鉴别方法进行研究, 采用适宜的方法。

**关键词:** 重组胶原蛋白; 液体敷料; 医疗器械; 胶原蛋白鉴别

## Applicability of identification and testing methods for recombinant collagen liquid dressings

CHEN Yong-Xia<sup>1</sup>, ZHANG Li-Lu<sup>2</sup>, WANG Chao-Yi<sup>1</sup>, CHEN Yang<sup>2</sup>, ZHANG Wen-Jie<sup>1\*</sup>

(1. Tianjin Medical Device Evaluation and Inspection Center, Tianjin 3000191, China; 2. Nantong Medical Protective Equipment (Tianjin) Co., Ltd., Tianjin 300308, China)

**ABSTRACT:** Recombinant collagen dressings are currently a popular skin care product in the market, which can form a protective layer on the wound and act as a physical barrier. Used for the care of non chronic wounds (such as superficial wounds, laser/photon/fruit acid skin replacement/micro plastic surgery wounds), providing a microenvironment for wound healing. The detection of recombinant collagen protein in application products is one of the reliable indicators to ensure product quality. This article investigates the applicability of the identification method for a recombinant collagen liquid dressing. The applicability of a identification method for a recombinant collagen liquid dressing was studied. Peptide map method, N-terminal amino acid sequence method, and isoelectric focusing electrophoresis method were used to identify the recombinant collagen in the experimental sample, and the detection results showed that the peptide map method and N-terminal amino acid sequence method were applicable to the sample. However, the isoelectric focusing electrophoresis method did not detect any bands, so this method is not applicable. When choosing the identification method for recombinant collagen, enterprises should consider the actual situation of the product and adopt appropriate methods.

**KEY WORDS:** recombinant collagen protein; liquid dressings; medical devices; collagen identification

\* 通信作者: 张文杰, 高级工程师, 副主任, 研究方向为医疗器械审评和监管。E-mail: 757513155@qq.com

\*Corresponding author: ZHANG Wen-Jie, Senior Engineer, Deputy Director, Tianjin Medical Device Evaluation and Inspection Center, Tianjin 3000191, China. E-mail: 757513155@qq.com

## 0 引言

胶原蛋白在人体中约占体重的6%,占总蛋白质的25%-30%,是生物体内分布最广的功能蛋白<sup>[1-2]</sup>。重组胶原蛋白是指采用重组DNA(Deoxyribo-Nucleic Acid)技术,对人胶原蛋白的DNA序列进行操作和(或)剪接修饰,使用载体(比如质粒或病毒基因)放入合适的宿主细胞(比如酵母菌、大肠杆菌等)中,在宿主中合成胶原蛋白或者类似的多肽,经纯化和提取等工艺步骤制备<sup>[3-4]</sup>。重组胶原蛋白具有良好的生物相容性,不易引起免疫反应,具有良好的生物相容性和安全性。

重组胶原蛋白在多个领域的广泛应用使其成为现代生物技术和医学研究的重要方向之一<sup>[5]</sup>。在组织工程和再生医学领域可用来制作组织工程支架,促进细胞生长和组织再生<sup>[6]</sup>,可以促进伤口愈合,减少疤痕形成。在美容和护肤领域,重组胶原蛋白被广泛用于抗衰老护肤品中,帮助改善皮肤弹性和减少皱纹,还具有良好的保湿性能,增强皮肤的水合状态。在功能性食品领域可作为膳食补充剂,可以改善关节健康和皮肤状态<sup>[7]</sup>。另外重组胶原蛋白还可以作为药物递送载体,提高药物的稳定性和生物利用度<sup>[8]</sup>。2021年国家药品监督管理部门发布《重组胶原蛋白类医疗产品分类界定原则》。重组胶原蛋白类医疗器械的管理,需根据产品作用原理、预期用途等综合进行评定。管理类别不低于第二类<sup>[9]</sup>。为了确保产品质量可控,重组化胶原蛋白需参考相关行业标准进行必要的鉴别检测,参考标准例如《YY/T 1849 重组胶原蛋白-2022》<sup>[10]</sup>、相关的注册审查指导原则等。通过对产品进行重组胶原蛋白的鉴别,确定产品中是否存在胶原蛋白是表明产品有效性的重要指标<sup>[11]</sup>。

通过鉴别方法可以确认液体敷料中的胶原蛋白成分,确保产品符合质量标准。确认胶原蛋白的来源和结构,避免因异源蛋白引起的免疫反应。建立标准化的鉴别方法,可以确保批次产品的质量一致,有助于规范生产流程。高质量的鉴别方法可以提高产品的可靠性,增强品牌信誉和市场竞争能力,增加消费者对产品的信任和满意度。

目前对重组胶原蛋白鉴别检测方法的研究文献比较少。付步芳等,主要研究了聚丙烯酰胺凝胶电泳法(即等电点法)对胶原蛋白的鉴别及杂蛋白的检测方法<sup>[12]</sup>;本文研究了重组胶原蛋白液体敷料中胶原蛋白的鉴别方法适用性,综合比较了三个方法是适用性,启发企业需根据产品特点和检验条件来研究和选择合适的鉴别方法。

## 1 材料与方法

主要试剂与设备:重组胶原蛋白液体敷料(2305050201、2305040201,纳通医用防护器材(天津)有限公司);赖氨酸内肽酶(121-05063,Wako);胰蛋白酶(V511C,Promega);肽

图法色谱柱(186003687,Waters);PTH氨基酸混合标准液(Wako);高效液相色谱仪(ACQUITY UPLC H-Class,Waters);PPSQ全自动蛋白质多肽测序仪;凯氏定氮仪(K9840,海能)。

### 1.1 鉴别方法

#### 1.1.1 肽图法

根据2020版《中国药典》“肽图检查法”<sup>[13]</sup>,色谱柱为:以蛋白质与多肽分析用的十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂,当样品通过高压泵被流动相带入色谱柱时,通过梯度洗脱,将样品不同组分分开后进入检测器,记录色谱图。

样品纯水稀释至0.5 mg/mL。样品溶液400  $\mu$ L,加入等体积的100 mM Tris-HCl混匀,9 $^{\circ}$ C加热5 min。冷却至室温后,加入0.5 mg/mL Lys-C酶溶液8  $\mu$ L,37 $^{\circ}$ C混匀,预酶解2 h。再向样品中加入0.5 mg/mL Trypsin酶溶液8  $\mu$ L。37 $^{\circ}$ C混匀,酶解17 h,加入10  $\mu$ L 10%TFA混匀,终止反应。通过C18反相柱检测,检测波长214 nm,流动相A:0.1% TFA水溶液,流动相B:0.1%TFA乙腈溶液。流速0.3 mL/min。

#### 1.1.2 末端氨基酸序列法

按照2020版《中国药典》“0512 高效液相色谱法”进行测定<sup>[14]</sup>,氨基酸序列分析仪测定N端氨基酸序列。

取PVDF膜,加入200  $\mu$ L甲醇两次,460  $\mu$ L 0.1%三氟乙酸三次,约1000 pmol样品溶液460  $\mu$ L,0.1%三氟乙酸四次。滤过后,取出PVDF膜,放置于加热器上烘干。通过软件PPSQ Analysis/Labsolutions测试。

#### 1.1.3 等电聚焦电泳法

按照《中华人民共和国药典-2020》“0541-等电聚焦电泳法”检测<sup>[15]</sup>。取酯化后样品和标准品与缓冲液按比例混匀,沸水浴10 min 4500 rpm离心5 min,电泳上样于4%-12% Bis-tris梯度预制胶,进行实验。

## 2 结果与分析

### 2.1 鉴别

#### 2.1.1 肽图法检测

蛋白质样品经蛋白酶水解成多肽后通过反相高效液相色谱分析,根据多肽极性的差异得到蛋白质肽图。

通过数据采集及分析,样品(2305050201、2305040201)肽图谱中均包含标准品(纯胶原蛋白溶液(DA2390S010-01)和胶原蛋白海绵(DA2390S010)一致的肽段峰,即样品含有与胶原蛋白海绵和胶原蛋白液一致的胶原蛋白成分,详见图1。

#### 2.1.2 末端氨基酸序列检测

对蛋白质N端序列分析的方法分为两大类,其一为非质谱技术,例如经典的Edman降解法、RT-PCR反转录法;其二为质谱技术,这两种方法都有其使用的长处和制约之处。目前采用基于经典的Edman降解法的N端序列分析方法较为普遍,利

用蛋白质序列测序系统进行蛋白质 N 端序列分析。通过全自动蛋白质多肽测序仪对供试品的 N 端序列进行分析，提供确定蛋白质 N 端序列的实验数据。

首先对 1 PTH- 氨基酸进行校准，结果如图 2 所示，峰图明

显。PTH- 氨基酸校准后，测试样品，共 15 个循环。测试产品的 N 端序列为 NH<sub>2</sub>-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Pro-Gly-Asn-Pro-Gly-Ser-Pro-Gly-Asn-Gln。缩写为：GPPGEPGNPGSPGNQ，与理论 N 端氨基酸序列一致<sup>[16]</sup>。

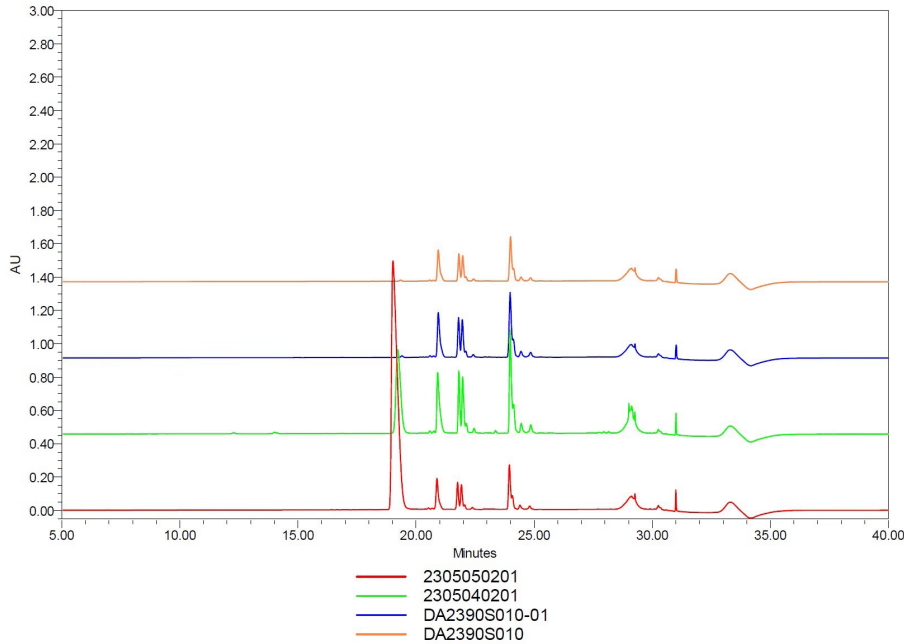


图 1 标准品及测试样品检测图谱

Fig.1 Standard and test sample detection chart.

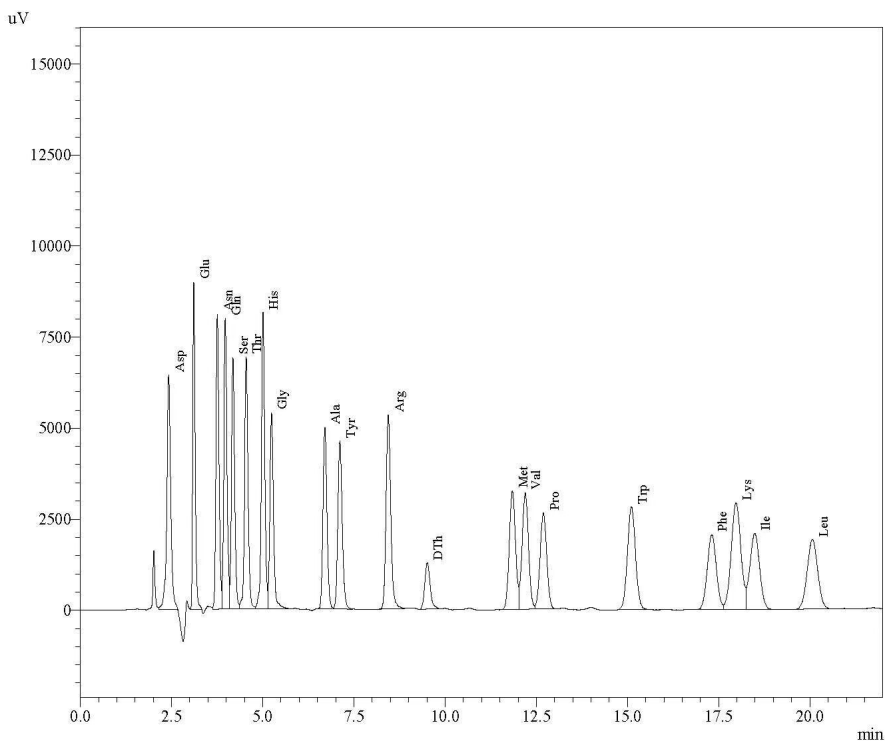


图 2 标准品校准测试图谱

Fig.2 Standard calibration test chart

2.1.3 等电聚焦电泳法检测结果

试验样品的条带与标准样品的条带进行对比匹配，根据是

否在相同的位置产生相似的条带达到鉴别的目的。

通过上述方法检测，试验样品（2305050201）上样量为

30  $\mu\text{L}$  即约 30  $\mu\text{g}$  时, 未跑出电泳条带, 标准品上样量为 50  $\mu\text{g}$  时可见电泳条带, 详见图 3。使用等电聚焦电泳法进行胶原蛋白的鉴别时, 对样品的重组胶原蛋白含量的水平有一定要求。根据以往经验使用电泳法时, 上面的液体中蛋白质总量最好在 50-100  $\mu\text{g}$ 。这可通过浓缩样品的方法, 使样品中的胶原含量富集, 以达到检出条带的目的, 但浓缩方法和浓缩精度需要进行系统的方法学的验证, 这对企业人员操作要求较高, 难以满足工业化生产的需要。虽然等电聚焦法不需要昂贵的设备投入, 普通质控实验室较易实现, 但是因为产品功效需求不同而添加的胶原蛋白和含量有差异, 所以该方法是否可行需要进行系统的研究。

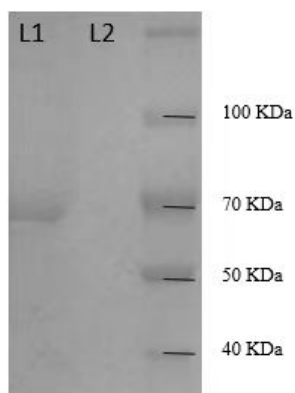


图 3 电泳分析图谱 (L1: 试验样品; L2: 标准品)

Fig.3 Electrophoretic analysis pattern (L1: Test sample; L2: Standard product)

### 3 讨论与结论

本研究使用肽图、末端氨基酸序列及等电聚焦电泳法对样品中的重组胶原进行了鉴别, 肽图法和末端氨基酸序列法分别需要用到高效液相色谱仪和氨基酸序列分析仪等仪器, 投入成本非常高, 操作复杂。而等电聚焦电泳法使用普遍且设备投入较少。经过研究发现, 肽图法和末端氨基酸序列所得结果与理论序列一致, 说明了这两种方法对本样品中胶原鉴别的检测是科学、可靠的, 而等电点方法则不适用。因此重组胶原蛋白的鉴别方法较多, 企业需要综合考虑原料特性、产品定位以及设备条件等因素, 确定合适的重组胶原蛋白鉴别方法。

胶原蛋白应用领域广泛, 随着胶原蛋白获取技术的日益进步, 在医美领域也逐渐扩大应用, 造福社会发展。随着对胶原蛋白研究的深入, 期待鉴定重组胶原的方法将越来越精简和准确, 更加有助于建立规范的生产流程, 提高行业标准。

### 参考文献

[1] QUERESHI S, MHASKE A, RAUT D, *et al.* Extraction and partial characterization of collagen from different animal skins

[J]. *Agricultural & Biological Chemistry*, 2010, 2(09): 28-31.

- [2] 范婷, 赵健峰, 常焯珺, 等. 重组人源化Ⅲ型胶原蛋白对皮肤功能性相关基因表达的影响 [J]. *日用化学工业 (中英文)*, 2022, 52(12): 1326-1332.
- [3] 李阳, 朱晨辉, 范代娣. 重组胶原蛋白的绿色生物制造及其应用 [J]. *化工进展*, 2021, 40(03): 1262-1275.
- [4] 魏春, 刘春, 刘心雨, 等. 基因工程技术生产重组胶原蛋白的研究进展 [J]. *发酵科技通讯*, 2021, 50(01): 1-5.
- [5] 盛嘉隽. 重组人胶原纳米纤维支架的制备及其生物相容性检测 [D]. 上海: 第二军医大学, 2017.
- [6] 鲁瑶. 可吸收胶原蛋白止血海绵在腔镜甲状腺手术中的止血疗效 [J]. *中国医药科学*, 2014, 4(17): 196-197.
- [7] 刘江娇. 酵母重组胶原蛋白贴敷料在面部激光术后创面皮肤修复中的应用 [J]. *中国医疗美容*, 2022, 12(09): 49-52.
- [8] 傅容湛, 范代娣, 杨婉娟, 等. 重组胶原蛋白的产业发展历程和生物医学应用前景展望 [J]. *生物工程学报*, 2022, 38(09): 3228-3242.
- [9] 夏慧敏, 吴莉, 于琦. 第二类重组胶原蛋白类敷料产品审评难点分析 [J]. *中国医疗器械信息*, 2023, 29(05): 4-7.
- [10] 国家药品监督管理局. YY/T 1849—2022 重组胶原蛋白 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2022.
- [11] 李丹荣. 胶原蛋白类医疗器械科学监管不断强化 [N]. *医药经济报*, 2021-12-06(008).
- [12] 付步芳, 陈丹丹. 胶原蛋白的鉴别及其杂蛋白检测技术 [J]. *药物分析杂质*, 2010, 30(7): 1351-1353.
- [13] 国家药典委员会. 中国药典 2020 年版四部通则 3405: 肽图检查法 [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.
- [14] 国家药典委员会. 中国药典 2020 年版四部通则 0512: 高效液相色谱法 [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.
- [15] 国家药典委员会. 中国药典 2020 年版四部通则 0541: 电泳法-等电聚焦电泳法 [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.
- [16] 杨树林, 刘斌, 高力虎, 等. 一种重组人源胶原蛋白及其制备方法: 中国, CN 201110327865.5 [P]. 2013-10-30.

### 作者简介



陈永霞, 硕士, 工程师, 研究方向: 二类医疗器械技术审评和现场检查。

张文杰, 高级工程师, 副主任, 研究方向为医疗器械审评和监管。