



(10) 授权公告号 CN 118348154 B

(45) 授权公告日 2024. 11. 15

(21) 申请号 202410516963.0

(22) 申请日 2024.04.26

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 118348154 A

(43) 申请公布日 2024.07.16

(73) 专利权人 山西锦波生物医药股份有限公司
地址 030032 山西省太原市山西综改示范
区太原唐槐园区锦波街18号

(72) 发明人 杨霞 徐文慧 何振瑞 岳海霞
张国梁 展梦瑶 赵碧玉 杨鑫
羊佳

(74) 专利代理机构 北京林达刘知识产权代理事
务所(普通合伙) 11277
专利代理师 李茂家 闫俊萍

(51) Int.Cl.

G01N 30/02 (2006.01)

G01N 30/06 (2006.01)

G01N 30/86 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 117310037 A, 2023.12.29

CN 111443149 A, 2020.07.24

审查员 许芷菲

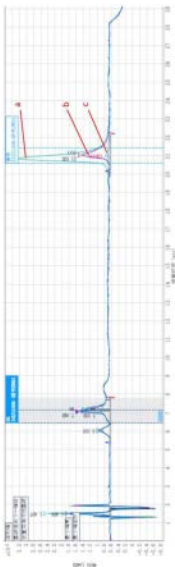
权利要求书2页 说明书15页
序列表(电子公布) 附图16页

(54) 发明名称

一种检测样品中重组人源化胶原蛋白含量的
方法

(57) 摘要

本发明属于生物检测技术领域,具体涉及一
种检测样品中重组人源化胶原蛋白含量的方法,
所述样品中含有重组人源化胶原蛋白和透明质
酸钠;所述方法包括如下步骤:对照品溶液的制
备、供试品溶液的制备、液相色谱检测和数据分
析。本发明提供的检测方法专属性强,当重组人
源化胶原蛋白的含量在一定范围内时,其浓度与
色谱峰面积具有良好的线性关系,准确度高,重
复性好,检出限和定量限分别可达0.05mg/ml和
0.1mg/ml。



1. 一种检测样品中重组人源化胶原蛋白含量的方法,其特征在于,
所述样品中含有重组人源化胶原蛋白和透明质酸钠;

所述方法包括如下步骤:对照品溶液的制备、供试品溶液的制备、液相色谱检测和数据
分析;

当所述样品中重组人源化胶原蛋白的含量大于等于0.5mg/mL时,所述供试品溶液的制
备包括如下稀释法所示的步骤:

稀释法:精密称取样品,置容器中,加入纯化水或PBS溶液稀释3~4倍,即得;

当所述样品中重组人源化胶原蛋白的含量小于等于1.0mg/mL时,所述供试品溶液的制
备包括如下酶解法所示的步骤:

酶解法:精密称取样品,置容器中,加入透明质酸酶,混匀,置于4~6℃环境下进行酶解
反应,即得;

所述液相色谱检测采用的条件包括:

色谱柱为十八烷基硅烷键合硅胶色谱柱;

流动相为水-乙腈二元流动相系统,在所述水-乙腈二元流动相系统中,流动相A为三氟
乙酸含量为0.1%v/v的三氟乙酸水溶液,流动相B为三氟乙酸含量为0.1%v/v的三氟乙酸
乙腈溶液;

洗脱方式为梯度洗脱,所述梯度洗脱的程序如下:

时间/min	流动相A/%v/v	流动相B/%v/v
0→3	95	5
3→6	95→88	5→12
6→8	88→87	12→13
8→9	87→85	13→15
9→14	85→80	15→20
14→20	80→75	20→25
20→22	75→74.5	25→25.5
22→27	74.5→70	25.5→30
27→29	70→95	30→5
29→30	95	5

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,

所述数据分析包括利用外标法计算所述供试品溶液中重组人源化胶原蛋白的浓度,进
而得到所述样品中重组人源化胶原蛋白的含量。

3. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,

当所述供试品溶液的制备包括稀释法所示的步骤时,所述对照品溶液的制备包括如下
步骤:精密称取重组人源化胶原蛋白对照品,置容器中,加入溶剂溶解,即得。

4. 根据权利要求3所述的方法,其特征在于,所述溶剂为纯化水或PBS溶液。

5. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,

当所述供试品溶液的制备包括酶解法所示的步骤时,所述对照品溶液的制备包括如下
步骤:精密称取敷料对照品,置容器中,加入透明质酸酶,混匀,置于4~6℃环境下进行酶解
反应,即得;其中,所述敷料对照品中包含所述重组人源化胶原蛋白和透明质酸钠。

6. 根据权利要求1或5所述的方法, 其特征在于,
所述透明质酸酶的用量与样品的质量比为(1 ~ 900) IU:1g, 所述酶解反应的时间为5min ~ 24h。

7. 根据权利要求1所述的方法, 其特征在于,
所述液相色谱检测采用的条件还包括:

流速为0.5-1.3mL/min;

柱温为27-37℃;

检测波长为200-230nm;

进样体积为8-22 μ L。

一种检测样品中重组人源化胶原蛋白含量的方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物检测技术领域,具体涉及一种检测样品中重组人源化胶原蛋白含量的方法,更具体涉及一种检测含透明质酸或其盐(例如钠盐)的样品中重组人源化胶原蛋白含量的方法。

背景技术

[0002] 胶原蛋白是一种生物高分子,是细胞外基质中最重要的组成部分,人体皮肤细胞的外层基质中,胶原蛋白占80%,透明质酸占20%。同时,胶原蛋白是人体内数量最庞大,含量最丰富的蛋白质,并且其独特的三螺旋结构使其性质十分稳定。并且,胶原蛋白具有其它高分子材料所不具有的生物组织相容性,低免疫源性、对细胞的支撑弹性和可降解性,被广泛地应用于美容、医疗、食品等领域。

[0003] 在过去的生产实践中,大量的胶原都来自于动物(如猪、牛等),但动物性蛋白的抗原性始终是一个难以克服的问题。近年来,随着基因重组、蛋白质组学等基础理论、技术手段和临床医疗探索研究的不断发展,众多学者对重组(类)人胶原蛋白的表达进行了广泛的研究。

[0004] 重组人源化胶原蛋白是由DNA重组技术制备的人胶原蛋白特定型别基因编码的全长或部分氨基酸序列片段,或是含人胶原蛋白功能片段的组合。它和人体的胶原蛋白属于同源物质,生物活性要高于人自身胶原蛋白,与人体的相容性极高,不会引起非人体成分导致的不良反应,从而在人体各种组织发挥生理功能。

[0005] 包含重组人源化胶原蛋白、透明质酸钠的医用创伤敷料,是一种常见的医疗器械,在医疗领域已得到广泛应用。目前对敷料中胶原蛋白含量的检测方法主要为凯氏定氮法,但该方法测定的是总有机氮,而不只是蛋白质氮,且实验时间太长,精度差,所用试剂有腐蚀性,尤其对于含有透明质酸钠的敷料,其透明质酸钠的含量对蛋白的检测存在干扰(透明质酸分子中的N-乙酰基葡萄糖胺片段也含有氮元素),且对于低浓度的蛋白测定误差较大,目前尚未有相关文献报道对该类产品中胶原蛋白含量的检测研究,开发一种新的检测胶原蛋白含量的方法是十分必要的。

发明内容

[0006] 发明要解决的问题

[0007] 尽管目前已有例如凯氏定氮法等针对含有重组人源化胶原蛋白和透明质酸钠的敷料进行蛋白含量检测的方法,但是其对于成分复杂的敷料中低浓度含量的重组人源化胶原蛋白检测的灵敏度低,可重复性小,因此从检测的准确度、简便性和经济性等方面来看,针对重组人源化胶原蛋白含量的检测方法仍有待开发的空間。对此,本发明旨在提供一种灵敏度高,能够快速且准确的检测敷料样品中重组人源化胶原蛋白的含量的方法。

[0008] 用于解决问题的方案

[0009] [1]、一种检测样品中重组人源化胶原蛋白含量的方法,其中,

[0010] 所述样品中含有重组人源化胶原蛋白和透明质酸钠；

[0011] 所述方法包括如下步骤：对照品溶液的制备、供试品溶液的制备、液相色谱检测 and 数据分析。

[0012] [2]、根据[1]所述的方法，其中，

[0013] 所述数据分析包括利用外标法计算所述供试品溶液中重组人源化胶原蛋白的浓度，进而得到所述样品中重组人源化胶原蛋白的含量。

[0014] [3]、根据[1]或[2]所述的方法，其中，

[0015] 当所述样品中重组人源化胶原蛋白的含量大于等于0.5mg/mL时，所述供试品溶液的制备包括如下稀释法所示的步骤：

[0016] 稀释法：精密称取样品，置容器中，加入溶剂稀释3~4倍，即得；优选地，所述溶剂为纯化水或PBS溶液。

[0017] [4]、根据[3]所述的方法，其中，

[0018] 所述对照品溶液的制备包括如下步骤：精密称取重组人源化胶原蛋白对照品，置容器中，加入溶剂溶解，即得；优选地，所述溶剂为纯化水或PBS溶液。

[0019] [5]、根据[1]或[2]所述的方法，其中，

[0020] 当所述样品中重组人源化胶原蛋白的含量小于等于1.0mg/mL时，所述供试品溶液的制备包括如下酶解法所示的步骤：

[0021] 酶解法：精密称取样品，置容器中，加入透明质酸酶，混匀，置于4~6℃环境下进行酶解反应，即得。

[0022] [6]、根据[5]所述的方法，其中，

[0023] 所述对照品溶液的制备包括如下步骤：精密称取敷料对照品，置容器中，加入透明质酸酶，混匀，置于4~6℃环境下进行酶解反应，即得；其中，所述敷料对照品中包含所述重组人源化胶原蛋白和透明质酸钠。

[0024] [7]、根据[5]或[6]所述的方法，其中，

[0025] 所述透明质酸酶的用量与样品的质量比为(1~900) IU:1g，所述酶解反应的时间为5min~24h。

[0026] [8]、根据[1]~[7]中任一项所述的方法，其中，

[0027] 所述液相色谱检测采用的条件包括：

[0028] 色谱柱为十八烷基硅烷键合硅胶色谱柱；

[0029] 流动相为水-乙腈二元流动相系统；优选地，所述水-乙腈二元流动相系统包含有机酸，优选三氟乙酸；更优选地，在所述水-乙腈二元流动相系统中，流动相A为三氟乙酸含量为0.1%v/v的三氟乙酸水溶液；流动相B为三氟乙酸含量为0.1%v/v的三氟乙酸乙腈溶液；

[0030] 洗脱方式为梯度洗脱。

[0031] [9]、根据[8]所述的方法，其中，

[0032] 所述梯度洗脱的程序如下：

[0033]

时间/min	流动相A/%v/v	流动相B/%v/v
0→3	95	5
3→6	95→88	5→12

6→8	88→87	12→13
8→9	87→85	13→15
9→14	85→80	15→20
14→20	80→75	20→25
20→22	75→74.5	25→25.5
22→27	74.5→70	25.5→30
27→29	70→95	30→5
29→30	95	5

[0034] [10]、根据[8]或[9]所述的方法,其中,

[0035] 所述液相色谱检测采用的条件还包括:

[0036] 流速为0.5-1.3mL/min;

[0037] 柱温为27-37℃;

[0038] 检测波长为200-230nm;

[0039] 进样体积为8-22μL。

[0040] 发明的效果

[0041] 本发明提供了一种基于高效液相色谱法的可用于定量检测敷料样品中重组人源化胶原蛋白的含量的方法,该方法专属性强,当重组人源化胶原蛋白的含量在一定范围内时,其浓度与色谱峰面积具有良好的线性关系,准确度高,重复性好,检出限和定量限分别可达0.05mg/ml和0.1mg/ml。总体而言,本发明提供的检测方法快速、准确、精密且重复性好,可以用来检测敷料样品中重组人源化胶原蛋白的含量。

附图说明

[0042] 图1:实施例1中专属性测谱图;其中,a为对照品溶液色谱图,b为供试品溶液色谱图,c为空白溶液色谱图。

[0043] 图2:实施例1中对照品溶液的浓度与峰面积线性关系图。

[0044] 图3:实施例2中专属性测谱图;其中,a为蛋白浓度为1.0mg/ml的敷料配制的对照品溶液的色谱图,b为蛋白浓度为0.5mg/ml的敷料配制的对照品溶液的色谱图,c为蛋白浓度为0.25mg/ml的敷料配制的对照品溶液的色谱图,d为蛋白浓度为0.125mg/ml的敷料配制的对照品溶液的色谱图,e为蛋白浓度为0.1mg/ml的敷料配制的对照品溶液的色谱图,f为蛋白浓度为0.05mg/ml的敷料配制的对照品溶液的色谱图,g为空白溶液的色谱图。

[0045] 图4:实施例2中对照品溶液的浓度于峰面积线性关系图。

[0046] 图5:实施例3中不同前处理方法下获得的色谱图;其中,a为蛋白加碱加热色谱图,b为蛋白加碱不加热色谱图,c为不做任何处理的蛋白色谱图。

[0047] 图6:实施例3中使用华熙生物透明质酸酶90μL酶解蛋白前后样品色谱变化图。

[0048] 图7:实施例3中使用华熙生物透明质酸酶50μL、20μL、10μL酶解蛋白前后样品色谱变化图。

[0049] 图8:实施例3中使用默克透明质酸酶50μL、100μL、200μL、250μL酶解2h样品色谱变化图。

[0050] 图9:实施例3中使用默克透明质酸酶100μL、200μL、250μL酶解12h样品色谱变化

图。

[0051] 图10:实施例3中使用默克透明质酸酶100 μ L、200 μ L、250 μ L酶解24h样品色谱变化图。

[0052] 图11:实施例3中样品在200-800nm范围内紫外图谱。

[0053] 图12:实施例3中不同流动相下样品色谱图。

[0054] 图13:实施例3不同柱温和流速下样品色谱图。

[0055] 图14A:实施例4中利用酶解法前处理敷料,0.1mg/ml两组平行样品的色谱图。

[0056] 图14B:实施例4中利用酶解法前处理敷料,0.5mg/ml两组平行样品的色谱图。

[0057] 图14C:实施例4中利用稀释法前处理敷料,1.0mg/ml两组平行样品的色谱图。

具体实施方式

[0058] 以下对本发明的实施方式进行说明,但本发明不限于此。本发明不限于以下说明的各构成,在本发明请求保护的范围内可以进行各种变更,而适当组合不同实施方式、实施例中各自公开的技术手段而得到的实施方式、实施例也包含在本发明的技术范围中。

[0059] I. 术语定义

[0060] 在本发明中,使用“数值A~数值B”、“数值A-数值B”、“数值A以上”或数值A以下表示的数值范围是指包含端点数值A、B的范围。

[0061] 在本发明中,术语“一(a)”或“一(an)”或“一(the)”可以指“一个”,也可以指“一个或多个”、“至少一个”以及“一个或多于一个”。

[0062] 在本发明中,术语“包含”、“具有”、“包括”或“含有”可以指包括在内的或开放式的,并不排除额外的、未引述的元件或方法步骤。与此同时,“包含”、“具有”、“包括”或“含有”也可以表示封闭式的,排除额外的、未引述的元件或方法步骤。

[0063] 在本发明中,术语“重组人源化胶原蛋白”是指由DNA重组技术制备的人胶原蛋白特定型别基因编码的全长或部分氨基酸序列片段,或是含人胶原蛋白功能片段的组合。进一步的,术语“重组III型人源化胶原蛋白”是指由DNA重组技术制备的基于胶原蛋白COL3A1基因或部分基因编码的重组胶原蛋白。

[0064] 在本发明中,术语“透明质酸钠酶”和“透明质酸酶”具有相同含义,是指能使透明质酸或透明质酸盐(如透明质酸钠)产生水解作用的酶。

[0065] 在本发明中,术语“敷料”是指用以覆盖伤口/创面例如非慢性创面(浅表性创面、小伤口、擦伤、切割伤创面)及周围皮肤的护理,以及预防整形切口的疤痕形成的各种医用材料。在一些实施方案中,本发明所述敷料包含重组人源化胶原蛋白、透明质酸钠和磷酸盐缓冲液。在一些实施方案中,本发明所述敷料由重组人源化胶原蛋白、透明质酸钠和磷酸盐缓冲液组成。

[0066] II. 检测样品中重组人源化胶原蛋白含量的方法

[0067] 在一些实施方案中,本发明提供的检测样品中重组人源化胶原蛋白含量的方法包括如下步骤:对照品溶液的制备、供试品溶液的制备、液相色谱检测 and 数据分析。

[0068] 本发明提供了一种检测样品中重组人源化胶原蛋白含量的方法,其基于高效液相色谱法,通过适当的样品前处理,能够高效检测敷料中重组人源化胶原蛋白的含量,具有快速、准确、精密且重复性好的优势。

[0069] i. 样品

[0070] 本发明提供的检测方法所针对的样品为含有重组人源化胶原蛋白和透明质酸钠的敷料样品。

[0071] 在一些实施方案中,所述样品包含重组人源化胶原蛋白、透明质酸钠和磷酸盐缓冲液。在一些具体的实施方案中,所述样品由重组人源化胶原蛋白、透明质酸钠和磷酸盐缓冲液组成。

[0072] 在一些实施方案中,所述重组人源化胶原蛋白包括重组Ⅲ型人源化胶原蛋白。

[0073] 在一些优选的实施方案中,所述重组人源化胶原蛋白为重组Ⅲ型人源化胶原蛋白。

[0074] 在一些实施方案中,所述重组Ⅲ型人源化胶原蛋白包括ZL201811438582.6中的重组Ⅲ型人源化胶原蛋白。

[0075] 在一些优选的实施方案中,所述重组Ⅲ型人源化胶原蛋白为ZL201811438582.6中的重组Ⅲ型人源化胶原蛋白。

[0076] 在一些更优选的实施方案中,所述重组Ⅲ型人源化胶原蛋白包含:

[0077] a) SEQ ID NO.1的氨基酸序列;

[0078] b) 与SEQ ID NO.1的氨基酸序列具有90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列,其保留SEQ ID NO.1的氨基酸序列的细胞黏附效果;

[0079] c) SEQ ID NO.1的氨基酸序列中添加、取代、缺失或插入1个或多个氨基酸残基的氨基酸序列,其保留SEQ ID NO.1的氨基酸序列的细胞黏附效果;或

[0080] d) 由核苷酸序列编码的氨基酸序列,所述核苷酸序列与编码SEQ ID NO.1的氨基酸序列的多核苷酸序列在严格条件下杂交,所述氨基酸序列保留SEQ ID NO.1的氨基酸序列的细胞黏附效果,所述严格条件是中等严格条件,中-高严格条件,高严格条件或非常高严格条件。

[0081] 在一些具体的实施方案中,所述样品由氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示的重组Ⅲ型人源化胶原蛋白、透明质酸钠和磷酸盐缓冲液组成。

[0082] ii. 供试品溶液和对照品溶液的制备

[0083] 为了更加精确的检测样品中重组人源化胶原蛋白的含量,根据样品信息中提供的不同的重组人源化胶原蛋白的含量,本发明提供了不同的样品前处理方法。

[0084] 在一些实施方案中,当所述样品中重组人源化胶原蛋白的含量大于等于0.5mg/mL时,所述供试品溶液的制备包括如下稀释法所示的步骤:

[0085] 稀释法:精密称取样品,置容器中,加入溶剂稀释3~4倍,即得;优选地,所述溶剂为纯化水或PBS溶液;更优选地,所述溶剂为纯化水。

[0086] 在所述稀释法中,所述稀释3~4倍的目标在于降低样品的黏度,以便进行过滤和液相色谱检测。在一些实施方案中,为了避免稀释后样品中重组人源化胶原蛋白的含量过低而低于检测限或定量限,或产生较大误差,稀释后样品中重组人源化胶原蛋白的含量大于等于0.125mg/mL。

[0087] 进一步的,当使用稀释法制备供试品溶液时,所述对照品溶液的制备包括如下步骤:精密称取重组人源化胶原蛋白对照品,置容器中,加入溶剂溶解,即得;优选地,所述溶剂为纯化水或PBS溶液;更优选地,所述溶剂为纯化水。

[0088] 在一些实施方案中,所述重组人源化胶原蛋白对照品为重组人源化胶原蛋白冻干;对于所述重组人源化胶原蛋白冻干的具体制备方法本发明不做特别限定,例如可以通过化学合成、微生物发酵等方法生产重组人源化胶原蛋白后进行冷冻干燥得到。

[0089] 在一些实施方案中,当所述样品中重组人源化胶原蛋白的含量小于等于1.0mg/mL时,所述供试品溶液的制备包括如下酶解法所示的步骤:

[0090] 酶解法:精密称取样品,置容器中,加入透明质酸酶,混匀,置于4~6℃环境下进行酶解反应,即得;优选的酶解环境温度为5℃。

[0091] 进一步的,当使用酶解法制备供试品溶液时,所述对照品溶液的制备包括如下步骤:精密称取敷料对照品,置容器中,加入透明质酸酶,混匀,置于4~6℃环境下进行酶解反应,即得;优选的酶解环境温度为5℃;其中,所述敷料对照品中包含所述重组人源化胶原蛋白和透明质酸钠;优选地,所述敷料对照品中包含所述重组人源化胶原蛋白、透明质酸钠和磷酸盐缓冲液;更优选地,所述敷料对照品由所述重组人源化胶原蛋白、透明质酸钠和磷酸盐缓冲液组成。

[0092] 在所述酶解法中,加入透明质酸酶的目标在于降低样品或敷料对照品的黏度,以便进行过滤和液相色谱检测。

[0093] 在一些实施方案中,为了避免酶解过程对重组人源化胶原蛋白产生影响从而影响检测结果,所述透明质酸酶的用量与样品的质量比为(1~900) IU:1g,所述酶解反应的时间为5min~24h。

[0094] 对于更具体的透明质酸酶的用量和酶解时间本发明不做特别限定,可根据具体选用的透明质酸酶的活力进行选择。

[0095] 在一些具体的实施方案中,所述透明质酸酶选用华熙生物的10000IU/ml的透明质酸酶,所述透明质酸酶的用量与样品的质量比为(100~900) IU:1g,优选为(200~600) IU:1g,所述酶解反应的时间为5min~10h,优选为5min~2h。

[0096] 在一些具体的实施方案中,所述透明质酸酶选用默克的100IU/ml的透明质酸酶,所述透明质酸酶的用量与样品的质量比为(1~5) IU:1g,优选为(2~4) IU:1g,更优选为4IU:1g,所述酶解反应的时间为5h~24h,优选为12h~20h,更优选为12h。

[0097] 在一些具体的实施方案中,在所述供试品溶液的制备和所述对照品溶液的制备中,所述样品的称量与所述对照品的称量相等,且最终得到的所述供试品溶液的量与所述对照品溶液的量相等。

[0098] 在一些具体的实施方案中,在所述供试品溶液和所述对照品溶液制备完成后,在进行液相色谱检测前,需要对所述供试品溶液和所述对照品溶液进行过滤,以避免杂质对液相色谱检测产生不利影响。

[0099] iii.液相色谱检测

[0100] 在一些实施方案中,所述液相色谱检测采用的色谱柱为十八烷基硅烷键合硅胶色谱柱;优选规格为Agilent Eclipse XDB-C18,4.6×150nm,5μm。

[0101] 在一些实施方案中,所述液相色谱检测采用的流动相为水-乙腈二元流动相系统;优选地,所述水-乙腈二元流动相系统包含有机酸,优选三氟乙酸;更优选地,在所述水-乙腈二元流动相系统中,流动相A为三氟乙酸含量为0.1%v/v的三氟乙酸水溶液;流动相B为三氟乙酸含量为0.1%v/v的三氟乙酸乙腈溶液;

条件者,按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用材料或仪器除非特别说明,均为可以使用通过市购获得的常规产品。

[0115] 实施例1

[0116] 1.仪器

[0117] Agilent 1260高效液相色谱仪(紫外检测器)、BCE3202-1CCN电子天平(赛多利斯)。

[0118] 2.试剂与材料

[0119] 三氟乙酸(默克,TFA suitable for HPLC,≥99.0%)、乙腈(默克,suitable for HPLC,gradient grade,≥99.9%)、水(娃哈哈)、敷料1(山西锦波生物医药股份有限公司)、重组Ⅲ型人源化胶原蛋白冻干(山西锦波生物医药股份有限公司)；

[0120] 敷料1配方:重组Ⅲ型人源化胶原蛋白(浓度为1.0mg/ml),辅以透明质酸钠和PBS缓冲溶液。

[0121] 3.溶液配制

[0122] 对照品溶液配制:取重组Ⅲ型人源化胶原蛋白冻干,溶解并稀释至1mg/mL,即得对照品溶液。

[0123] 供试品溶液配制:精密称取敷料1 2.5g于称量瓶中,加水定量至10g,即得供试品溶液。

[0124] 空白溶液配制:精密称取不添加胶原蛋白的敷料1 2.5g于称量瓶中,加水定量至10g,即得空白溶液。

[0125] 4.色谱条件

[0126] 固定相:色谱柱(Agilent Eclipse XDB-C18,4.6×150nm,5μm);流动相:A相(0.1%(v/v)TFA水溶液)与B相(0.1%(v/v)TFA乙腈溶液),梯度洗脱条件如下表1所示;流速:1.0mL/min;进样量:10μL;柱温:30℃;检测波长:214nm。

[0127] 表1梯度洗脱程序

[0128]

时间(min)	A相(体积分数/%)	B相(体积分数/%)
0	95	5
3	95	5
6	88	12
8	87	13
9	85	15
14	80	20
20	75	25
22	74.5	25.5
27	70	30
29	95	5
30	95	5

[0129] 5.专属性

[0130] 分别取对照品溶液、供试品溶液和空白溶液各10μL注入液相色谱仪,按色谱方法进行操作,记录色谱图。

[0131] 结果:色谱图如图1。对照品溶液和供试品溶液在 $RT=21.5\text{min}$ 处有相同的色谱峰,空白溶液在该保留时间无相同的色谱峰,且无相邻峰。表明该方法专属性良好。

[0132] 可接受标准(参考2020版《中国药典》:9101分析方法验证指导原则):空白溶液在主峰(胶原蛋白峰)位置处没有色谱峰出现。如有相邻峰,则相邻峰的分度大于1.5。

[0133] 6.线性和范围

[0134] 对照品溶液浓度分别为 0.1mg/ml 、 0.4mg/ml 、 0.6mg/ml 、 0.8mg/ml 、 1.0mg/ml 、 1.2mg/ml 。按照以上色谱条件进样检测,记录色谱图。以对照品溶液浓度为横坐标,以峰面积(A)为纵坐标绘制标准曲线。

[0135] 可接受标准(参考2020版《中国药典》:9101分析方法验证指导原则):线性回归方程的相关系数不得小于0.998。

[0136] 结果:线性方程: $y=9114.5x-98.666$, $R^2=0.9994$ 。表明对照品溶液在 $0.1-1.2\text{mg/ml}$ 浓度范围内线性关系良好。结果见表2和图2。

[0137] 表2线性结果

[0138]	浓度(mg/ml)	0.1	0.4	0.6	0.8	1	1.2
	峰面积	838.44	3426.6	5422.63	7322.52	8939.87	10827.375

[0139] 7.重复性试验

[0140] 平行制备6份供试品溶液,按照色谱条件,进样检测,记录色谱图。

[0141] 可接受标准(参考2020版《中国药典》:9101分析方法验证指导原则):相对标准偏差(RSD)值小于4%。

[0142] 结果:如表3所示,6份供试品平行样品的RSD值为1.69%。表明该方法重现性好。

[0143] 表3重复性结果

	样品	峰面积	浓度 mg/ml	RSD (%)
	1	2190.755	0.997	1.69%
	2	2167.18	0.991	
[0144]	3	2249.14	1.027	
	4	2190.755	1.001	
	5	2131.1	0.975	
	6	2179.02	0.996	

[0145] 8.精密度试验

[0146] 取供试品溶液,按照色谱条件,连续进样6针,记录色谱图。以峰面积或者按照线性方程计算含量后,再计算其相对标准偏差(RSD)值。

[0147] 可接受标准(参考2020版《中国药典》:9101分析方法验证指导原则):RSD值不大于4%。

[0148] 结果:如表4所示,同一份样品,连续进样6次RSD值为3.28%,表明该方法精密度良好。

[0149] 表4精密度结果

[0150]	峰面积	浓度 mg/ml	RSD (%)
	1995.01	0.919	3.28%
	2115.6	0.972	
	2082.41	0.957	
	2160.44	0.991	
	2196.89	1.007	
	2163.68	0.993	

[0151] 9. 准确度(回收率) 试验

[0152] 取供试品溶液9份,精密称定,分为3组,每组各加入胶原蛋白溶液(重组III型人源化胶原蛋白冻干用纯化水溶解,浓度4mg/mL) 0.5ml、0.625ml、0.75ml,按照上述色谱条件进样检测,记录色谱图。

[0153] 可接受标准(参考2020版《中国药典》:9101分析方法验证指导原则):样品中待测成分含量在0.01%时,回收率限度为85%-110%,RSD值不大于5%。

[0154] 结果:如表5所示,平均回收率为93.40%,其RSD值为4.2%,表明该方法回收率良好,方法准确可靠。

[0155] 表5准确度结果

[0156]	供试品样品	胶原蛋白峰面积	回收率 (%)	平均值 (%)	RSD (%)
	浓度 1 (80%)	3747.12	87.485	93.40	4.2%
		3864.48	94.049		
		3913.59	96.796		
	浓度 2 (100%)	4297.6	94.618		
		4232.66	91.713		
		4233.09	91.732		
	浓度 3 (120%)	4565.765	88.847		
		4743.38	95.470		
		4862.045	99.894		

[0157] 10. 检出限 (LOD)

[0158] 将对照品溶液稀释适当倍数,依法进样,记录色谱图,计算主峰信噪比(S/N),当S/N $\approx$ 3时的浓度为最低检测浓度即检出限。

[0159] 结果:当胶原蛋白浓度为0.05mg/ml时S/N=4,该方法对胶原蛋白的最低检出浓度为0.05mg/ml。

[0160] 11. 定量限 (LOQ)

[0161] 将对照品溶液稀释适当倍数,依法进样,记录色谱图,计算主峰信噪比(S/N),当S/N $\approx$ 10时的浓度为最低定量浓度即定量限。

[0162] 结果:当胶原蛋白浓度为0.1mg/ml时S/N=12,该方法对胶原蛋白的最低检出浓度为0.1mg/ml。

[0163] 实施例2

[0164] 1. 仪器

[0165] Agilent 1260高效液相色谱仪(紫外检测器)、BCE3202-1CCN电子天平(赛多利斯)。

[0166] 2. 试剂与材料

[0167] 三氟乙酸(默克,TFA suitable for HPLC, $\geq 99.0\%$)、乙腈(默克,suitable for HPLC, gradient grade, $\geq 99.9\%$)、水(娃哈哈)、透明质酸钠酶(默克,H1136-1AMP)、敷料2(山西锦波生物医药股份有限公司)、重组III型人源化胶原蛋白(山西锦波生物医药股份有限公司)、重组胶原蛋白无菌修复敷料(山西锦波生物医药股份有限公司,批号:01230501、01230502、01230503、01230601;重组III型人源化胶原蛋白浓度为0.1mg/ml);

[0168] 敷料2配方:重组III型人源化胶原蛋白(浓度分别为0、0.05、0.1、0.125、0.25、0.5、1.0mg/ml),辅以透明质酸钠和PBS缓冲溶液;敷料2配方工艺与敷料1一致。

[0169] 3. 溶液配制

[0170] 对照品溶液配制:精密称取不同浓度的敷料2 5.0g,分别于称量瓶中,加透明质酸钠酶200 μ L,摇匀,放置5℃条件下充分反应,即得对照品溶液。

[0171] 供试品溶液配制:精密称取重组胶原蛋白无菌修复敷料5.0g,分别于称量瓶中,加透明质酸钠酶200 μ L,摇匀,放置5℃条件下充分反应,即得供试品溶液。

[0172] 空白溶液配制:精密称取不添加胶原蛋白的敷料2 5.0g于称量瓶中,加透明质酸钠酶200 μ L,摇匀,即得空白溶液。

[0173] 4. 色谱条件

[0174] 固定相:色谱柱(Agilent Eclipse XDB-C18, $4.6 \times 150\text{nm}$, $5\mu\text{m}$);流动相:A相(0.1% (v/v) TFA水溶液)与B相(0.1% (v/v) TFA乙腈溶液),梯度洗脱条件如表1所示;流速:1.0mL/min;进样量:20 μ L;柱温:30℃;检测波长:214nm。

[0175] 5. 专属性

[0176] 分别取空白溶液和对照品溶液各20 μ L注入液相色谱仪,按色谱方法进行操作,记录色谱图。

[0177] 结果:色谱图如图3。0.1mg/ml-1.0mg/ml浓度的对照品溶液在 $RT=20.5\text{min}$ 处有色谱峰,0.05mg/ml浓度的对照品溶液和空白溶液在该保留时间无相同的色谱峰,且无相邻峰。0.05mg/ml浓度的对照品溶液低于检出限,故相同位置处无峰。表明该方法专属性良好。

[0178] 可接受标准(参考2020版《中国药典》:9101分析方法验证指导原则):空白溶液在主峰(胶原蛋白峰)位置处没有色谱峰出现。如有相邻峰,则相邻峰的分离度大于1.5。

[0179] 6. 线性和范围

[0180] 对照品浓度分别为0.05mg/ml、0.1mg/ml、0.125mg/ml、0.25mg/ml、0.5mg/ml、1.0mg/ml。按照以上色谱条件进样检测,记录色谱图。以对照品溶液浓度为横坐标,以峰面积(A)为纵坐标绘制标准曲线。

[0181] 可接受标准(参考2020版《中国药典》:9101分析方法验证指导原则):线性回归方程的相关系数不得小于0.998。

[0182] 结果:线性方程: $y=17837x-709.15$, $R^2=0.9995$ 。表明对照品溶液在0.05-1.0mg/ml浓度范围内线性关系良好。结果见表6和图4。

[0183] 表6线性结果

[0184]	浓度(mg/ml)	0.05	0.1	0.125	0.25	0.5	1.0
	峰面积	144.53	1029.925	1739.1525	3725.6425	8015.85	17209.3975

[0185] 7. 样品检测试验

[0186] 平行制备2份供试品溶液,按照色谱条件,进样检测,记录色谱图。

[0187] 结果:如表7所示,供试品样品的含量在80%-120%范围内,其相对标准偏差(RSD)值为4.69%。

[0188] 表7样品检测试验结果

[0189]	样品批号	峰面积 1	峰面积 2	平均峰面积	标准曲线法计算含量 (mg/ml)	RSD 值
	0123501-1	1068.86	1073.83	1071.345	0.100	4.69%
	0123501-2	1073.42	1054.06	1063.740	0.099	
	0123502-1	888.68	888.39	888.535	0.090	
	0123502-2	1012.23	912.50	962.365	0.094	
	0123503-1	1081.44	1109.67	1095.555	0.101	
	0123503-2	834.38	918.28	876.330	0.089	
	0123601-1	1061.74	912.91	987.325	0.095	
	0123601-2	981.26	963.74	972.500	0.094	

[0190] 实施例3

[0191] 1. 仪器

[0192] Agilent 1260高效液相色谱仪(紫外检测器)、BCE3202-1CCN电子天平(赛多利斯)、HH.S21-4电热恒温水浴锅(上海博迅)、PB-30酸度计(赛多利斯)。

[0193] 2. 试剂与材料

[0194] 三氟乙酸(默克,TFA suitable for HPLC, $\geq 99.0\%$)、甲酸(默克)、乙腈(默克, suitable for HPLC, gradient grade, $\geq 99.9\%$)、水(娃哈哈)、透明质酸钠酶(默克, H1136-1AMP)、透明质酸酶(华熙生物, 10000IU/ml)、氢氧化钠(AR, 西陇科学)、盐酸(AR, 天津风船)、敷料1(山西锦波生物医药股份有限公司)。

[0195] 氢氧化钠溶液配制:精密称取氢氧化钠适量,溶解并定容,得1.0mol/L氢氧化钠溶液;再量取适量稀释为0.1mol/L氢氧化钠溶液。

[0196] 盐酸溶液配制:精密量取盐酸溶液适量并定容,得1.0mol/L盐酸溶液,再量取适量稀释为0.1mol/L盐酸溶液。

[0197] 敷料1配方:重组Ⅲ型人源化胶原蛋白(浓度为1.0mg/ml),辅以透明质酸钠和PBS缓冲溶液。

[0198] 3. 样品前处理方法考察

[0199] 目前尚无敷料中胶原蛋白含量测定及完整样品前处理方法的文献,本实验考察了加不同浓度碱、酸、加热、酶对样品进行前处理。

[0200] 对不同处理条件下的样品进行色谱检测(色谱条件同实施例1),发现高浓度碱、酸(浓度为1.0mol/L)会破坏敷料黏度使其变稀,同时加酸的变化不如加碱的变化,敷料仍有一点稠度,但对蛋白的破坏比较大,(如图5,对比发现峰面积降低),低浓度碱、酸(浓度为0.1mol/L)虽然破坏蛋白少,但样品黏度大,再对其进行稀释后,含量低于检出限,不能准确测量含量。同时对样品水浴60℃,发现会使蛋白变性而不加热未能破坏敷料黏度,故对于蛋白含量较大的敷料采用稀释法进行前处理。

[0201] 通过对敷料进行不同倍数的稀释,发现敷料稀释4倍后,黏度降低,且蛋白的含量在稀释4倍后可以检测到。稀释倍数小于3,敷料样品比较粘稠,不好过0.22μm滤膜;稀释倍

数高于4则含量会降低,会影响检测结果。

[0202] 对于蛋白低浓度的敷料,可以采取酶解法,酶具有专一性,透明质酸钠酶为一种能水解透明质酸的酶,使敷料的黏度降低。

[0203] 前期在1g敷料中加入90 μ L的透明质酸酶(华熙生物,10000IU/ml),发现90 μ L酶在酶解过程中,虽会快速破坏敷料黏度,但也会破坏胶原蛋白(如图6),故降低酶量为50 μ L、20 μ L、10 μ L,考察该不同酶量下对敷料蛋白含量的影响,发现50 μ L、20 μ L酶加入5min后,即可快速破坏敷料黏度,而10 μ L酶破坏敷料黏度较慢,同时检测不同酶量敷料的蛋白含量,发现敷料峰面积接近(如图7),但样品反应12h后再检测无峰,反应时间越长,蛋白在酶的作用下会全部降解。分析结果说明该酶活性较大,对蛋白含量影响较大。

[0204] 后期在5g敷料中加入另一种透明质酸酶(默克,1amp,100IU/ml),考察50 μ L、100 μ L、200 μ L、250 μ L不同酶量下对敷料蛋白含量的影响,发现50 μ L酶加入样品12h后,仍有稠度,其他酶量下样品已变为液体,进液相检测不同酶量以及不同反应时间下蛋白的含量,分析结果(如图8~10)发现,200 μ L酶在反应12h以及24h后的敷料进液相,两者蛋白峰面积基本一致,反应2h后的样品进液相,其峰面积大于12h时的一半,说明敷料加入该酶反应12h后透明质酸钠已完全降解,且反应时间长,对蛋白无影响。100 μ L酶在反应24h后的敷料进液相,蛋白峰面积接近200 μ L酶时峰面积,250 μ L酶在反应12h后的敷料进液相,蛋白峰面积与200 μ L酶时峰面积基本一致,说明该酶加入200 μ L的量即可用来检测低浓度的蛋白敷料。

[0205] 4. 色谱条件的选择

[0206] (1) 所选仪器与材料

[0207] 紫外分光光度计(美普达,p7)、Agilent 1260高效液相色谱仪(紫外检测器)、BCE3202-1CCN电子天平(赛多利斯)、三氟乙酸(默克,TFA suitable for HPLC, $\geq 99.0\%$)。

[0208] (2) 检测波长选择

[0209] 将敷料稀释后,在紫外200-800nm范围内进行全波长扫描,发现在214nm处有最大特征吸收,因此将检测波长设置为214nm(见图11)。

[0210] (3) 色谱柱选择

[0211] Agilent ZORBAX Eclipse XDB色谱柱在较宽的pH=6-9范围内有良好的稳定性,并可使用0.01-0.02M的低浓度缓冲液,获得最高柱稳定性。

[0212] (4) 流动相选择(除流动相外,其他实验条件同实施例1)

[0213] 三氟乙酸作为离子对试剂,流动相中的三氟乙酸通过与疏水键合相和残留的极性表面以多种模式相互作用,来改善峰形、克服峰展宽和拖尾问题。结果如图12所示,三氟乙酸的紫外最大吸收峰低于200nm,对蛋白在214nm处的检测干扰很小。三氟乙酸添加在流动相中的浓度为0.1% (v/v),在这个浓度下,大部分的反相色谱柱都可以产生良好的峰形,当三氟乙酸浓度大大低于这个水平时,峰的展宽和拖尾就变得十分明显,故选用0.1% (v/v)的三氟乙酸作为流动相。

[0214] (5) 柱温及流速的选择(除柱温及流速外,其他实验条件同实施例1)

[0215] 在前期研究基础上,将30 $^{\circ}$ C、35 $^{\circ}$ C柱温以及1.0ml/min、0.8ml/min、0.6ml/min流速条件下峰形分离效果进行对比,结果如图13所示,表明在本方法下30 $^{\circ}$ C柱温、1.0ml/min流速更有利于胶原蛋白峰的分离。

[0216] 实施例4

[0217] 凯氏定氮法测含量:

[0218] 原理:含氮有机物经硫酸消化后,生成的硫酸铵被氢氧化钠分解释放出氨,后者借水蒸气被蒸馏入硼酸液中生成硼酸铵,最后用强酸滴定,依据强酸消耗量可计算出供试品的氮含量。

[0219] 试剂:定氮催化剂片(硫酸钾和硫酸铜混合片)、硫酸、40wt % 氢氧化钠、2wt % 硼酸、稀释水(超纯水)、0.1mol/L硫酸、敷料3(山西锦波生物医药股份有限公司)。

[0220] 仪器:石墨消解仪、全自动凯氏定氮仪。

[0221] 敷料3配方:重组Ⅲ型人源化胶原蛋白(浓度分别为0.1、0.5、1.0mg/ml),辅以透明质酸钠和PBS缓冲溶液;敷料3配方工艺与敷料2及敷料1一致。

[0222] 步骤:

[0223] (1)称取敷料(敷料3)5.0g置消化管中,依次加入适量硫酸钾和硫酸铜混合片和硫酸,将消化管放入消化仪中,按照仪器说明书的方法开始消解至溶液成澄明的绿色,取出,冷却。

[0224] (2)将配制好的碱液(40wt % 氢氧化钠)、吸收液(2wt % 硼酸)和适宜的滴定液(0.1mol/L硫酸)分别置自动蒸馏仪相应的瓶中,按照仪器说明书的要求将消化管装入正确位置,关上安全门,连接水源。

[0225] (3)在消化管中加入1/3的水,对管路进行清洗,先换酸清洗,碱管路清洗,硼酸管路清洗,最后接收杯清洗。

[0226] (4)换水,在消化管中加入1/3的水,对管路进行测试,清洗内部管路。开始自动蒸馏和滴定。

[0227] (5)敷料测试

[0228] 结果如下表8所示:

[0229] 表8凯氏定氮法测试结果

[0230]	敷料中蛋白浓度	平行1	平行2	平行3
	0.01 % (0.1mg/mL)	0.0000 %	0.0000 %	0.0079 %
	0.05 % (0.5mg/mL)	0.0509 %	0.0544 %	0.0511 %
	0.1 % (1.0mg/mL)	0.1085 %	0.1037 %	0.1144 %

[0231] 结论:

[0232] ①0.1mg/ml的三组平行敷料测定蛋白含量为0.0000 %、0.0000 %、0.0079 %,与理论蛋白含量(0.01 %)相差较大,且数据不平行,重复性差。

[0233] ②0.5mg/ml的三组平行敷料测定蛋白含量为0.0509 %、0.0544 %、0.0511 %,与理论蛋白含量(0.05 %)基本一致,数据间稍有误差。

[0234] ③1.0mg/ml的三组平行敷料测定蛋白含量为0.1085 %、0.1037 %、0.1144 %,与理论蛋白含量(0.1 %)基本一致,数据间有误差。

[0235] 使用本发明实施例1或2中方法:

[0236] ①利用酶解法(实施例2)前处理敷料,色谱图如图14A所示,0.1mg/ml的两组平行样品测定蛋白含量为0.0998mg/ml、0.0993mg/ml,与理论蛋白含量基本一致,数据间稍有误差。

[0237] ②利用酶解法(实施例2)前处理敷料,色谱图如图14B所示,0.5mg/ml的两组平行

样品测定蛋白含量为0.5001mg/ml、0.5010mg/ml,与理论蛋白含量基本一致,数据间稍有误差。

[0238] ③利用稀释法(实施例1)前处理敷料,色谱图如图14C所示,1.0mg/ml的两组平行样品测定蛋白含量为0.9968mg/ml、0.9911mg/ml,与理论蛋白含量基本一致,数据间稍有误差。

[0239] 综上,本发明建立了基于高效液相色谱法检测敷料中胶原蛋白含量的方法,该方法前处理简单,分析快速、准确度高,精密度好,可以用于敷料中胶原蛋白含量的测定。

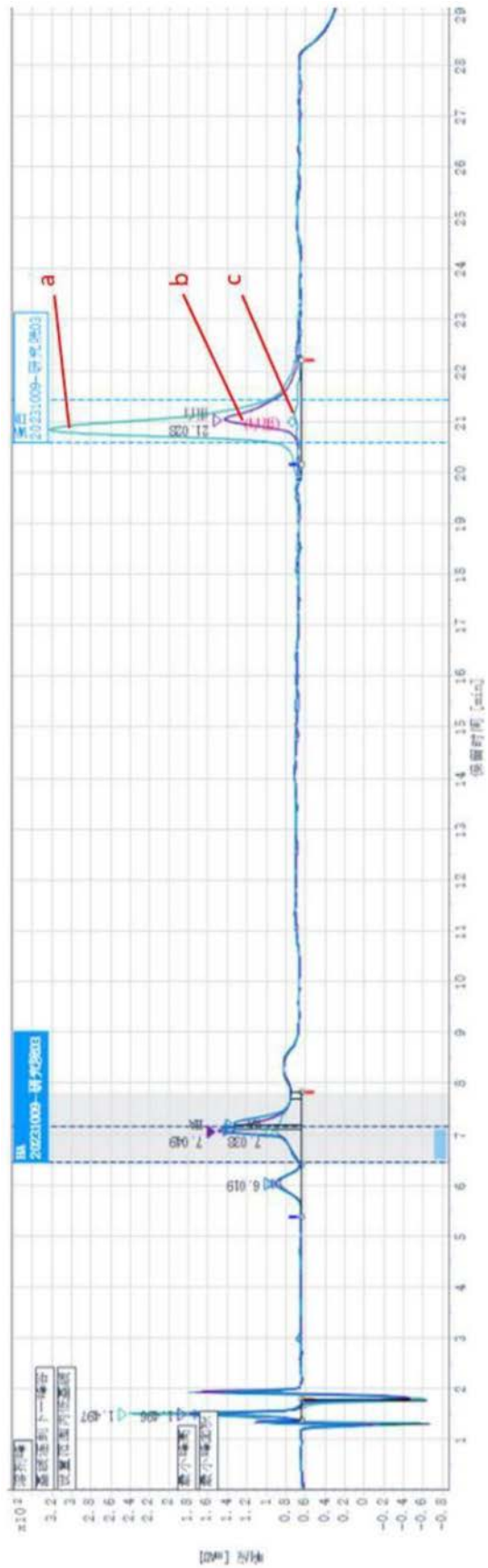


图1

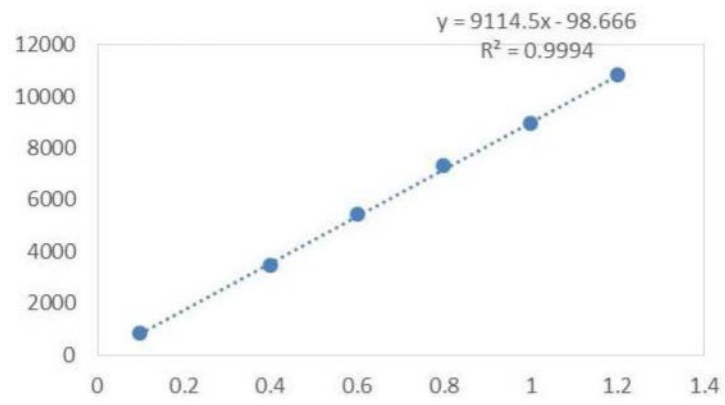


图2

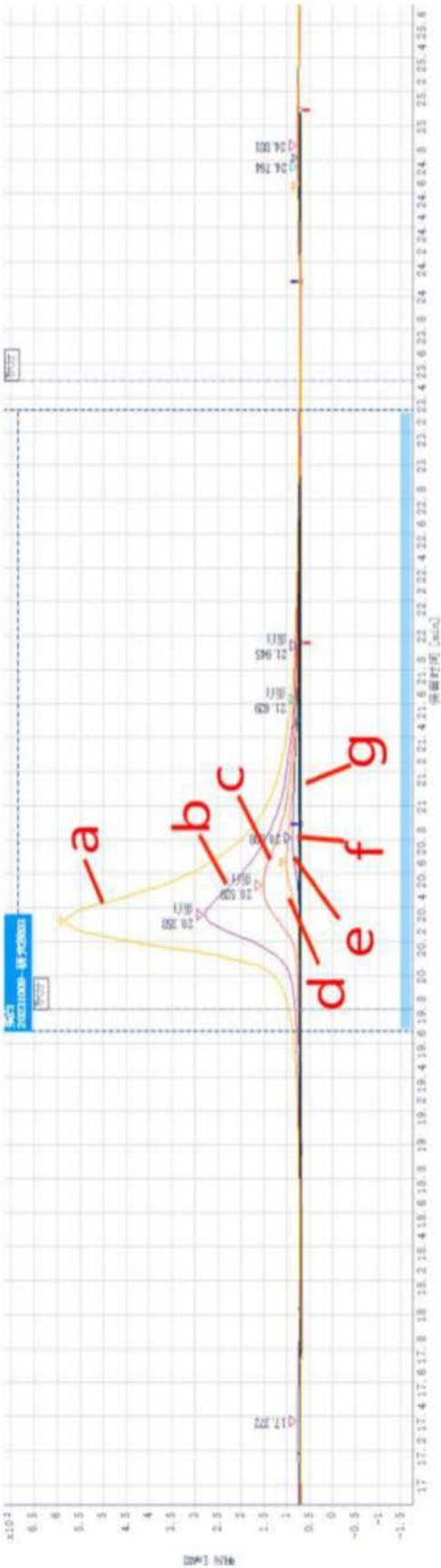


图3

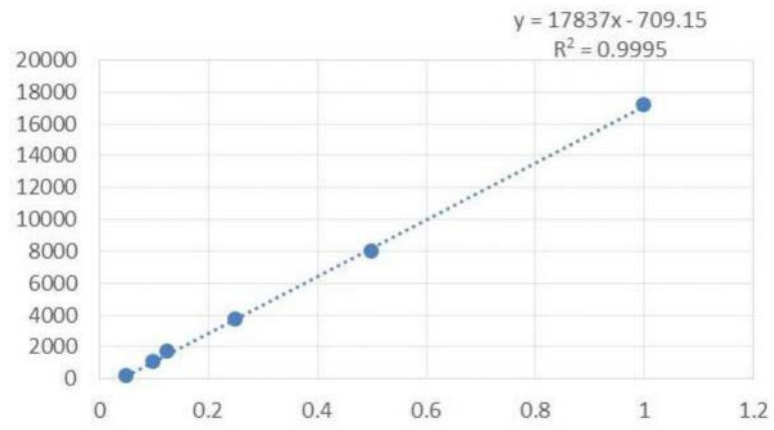


图4

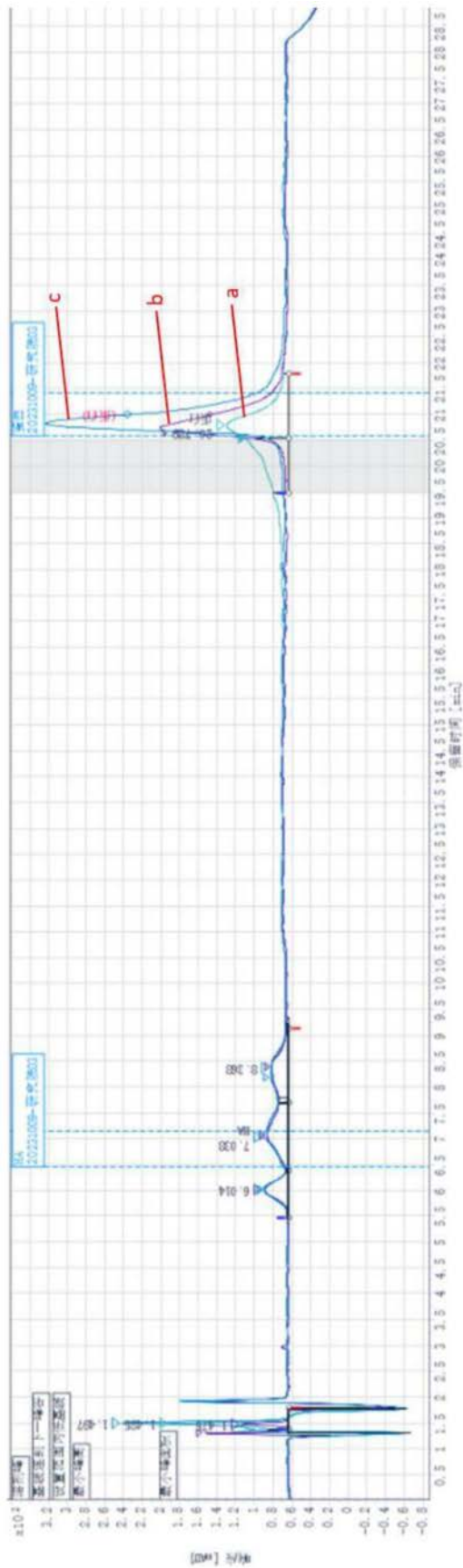


图5

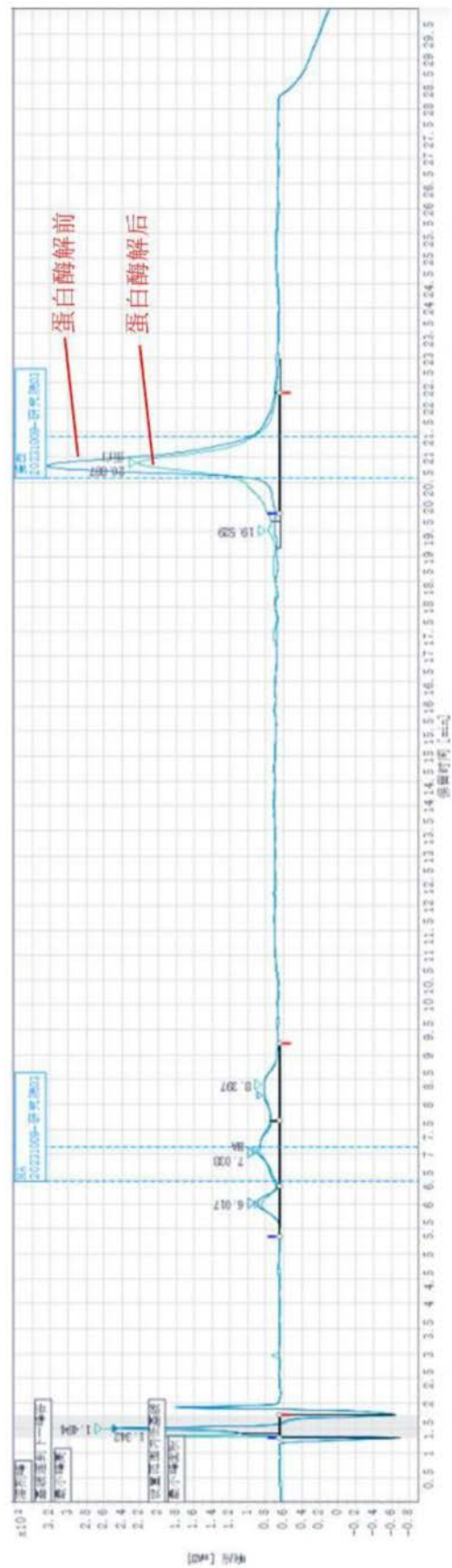


图6

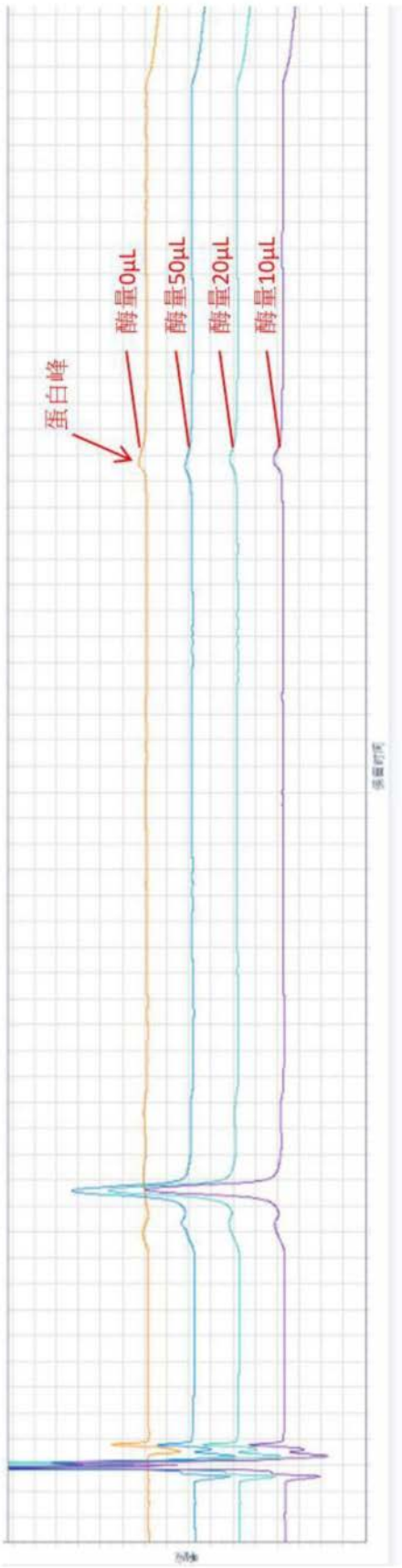


图7

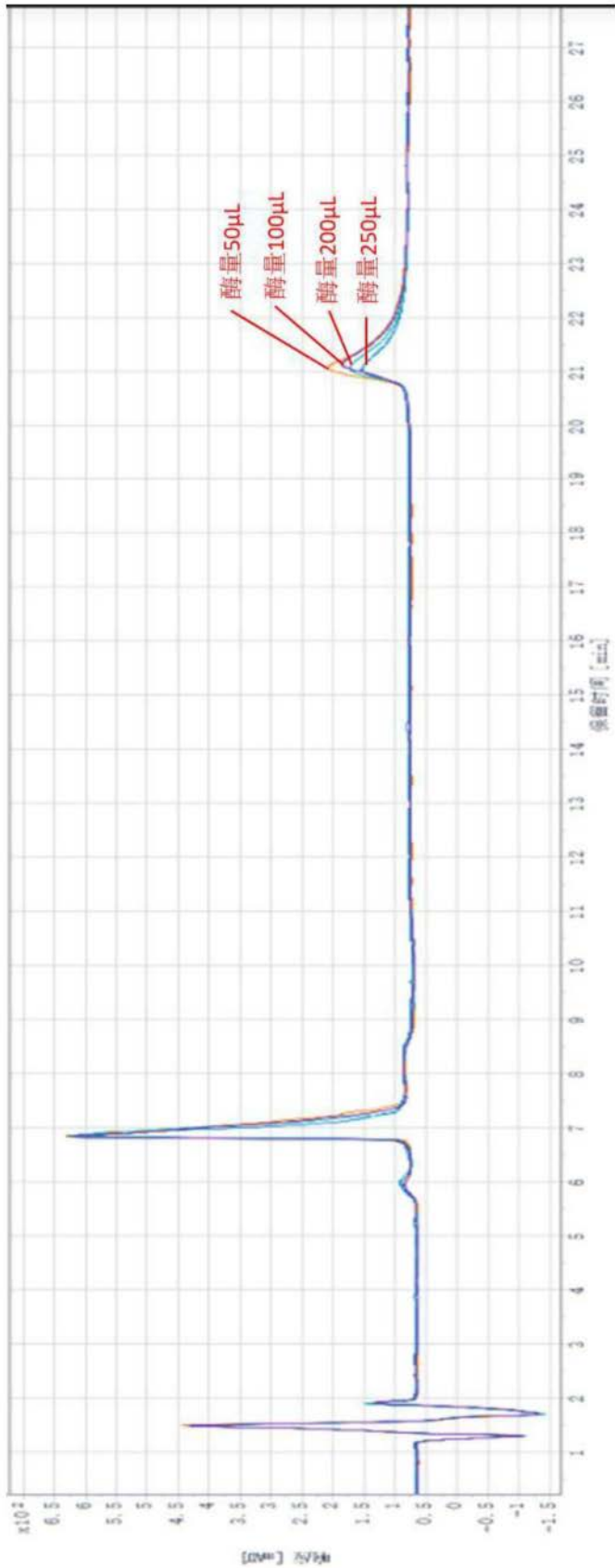


图8

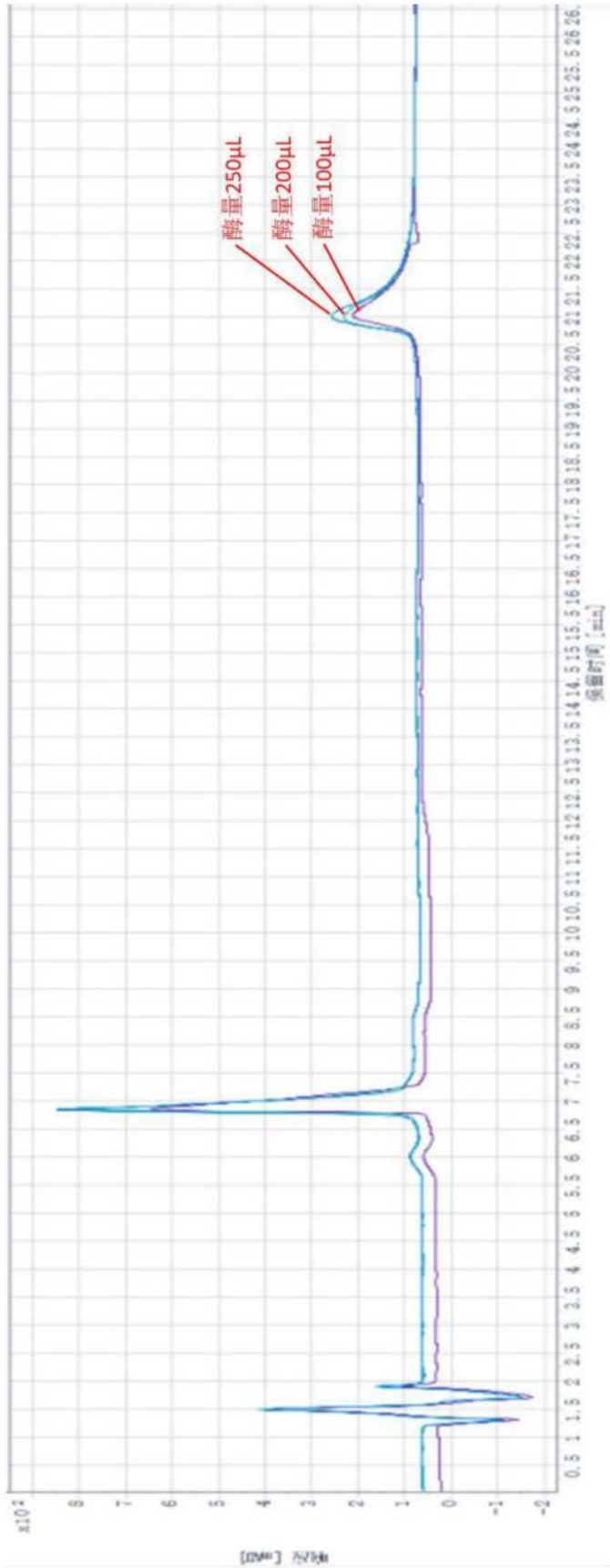


图9

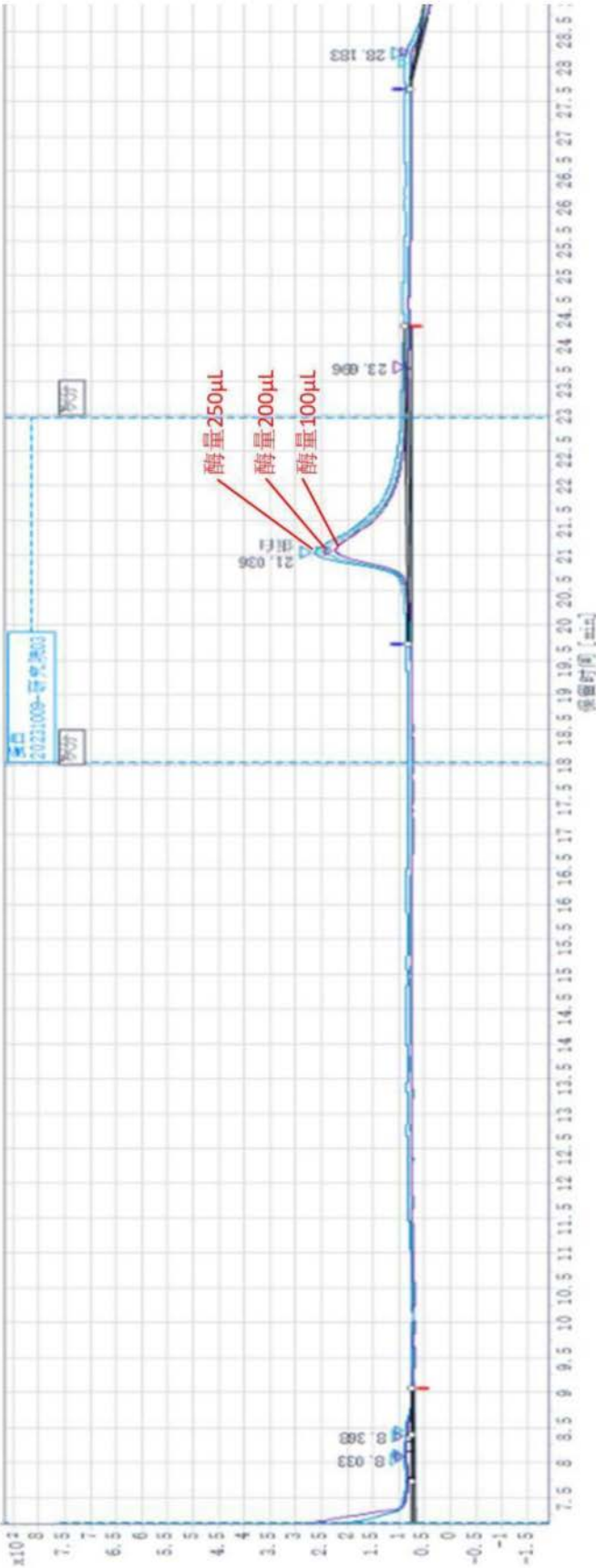


图10

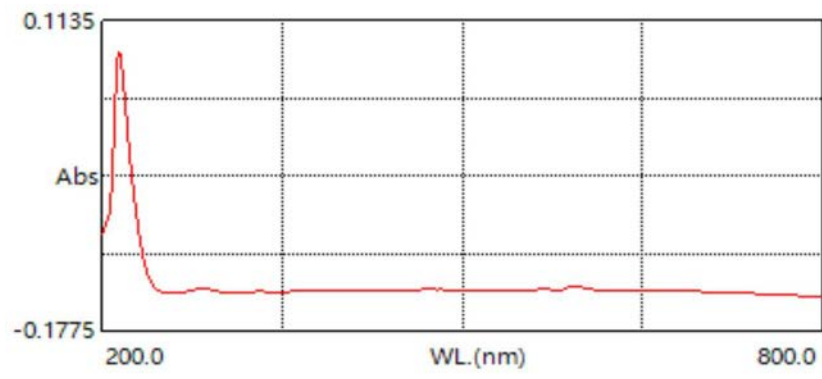


图11

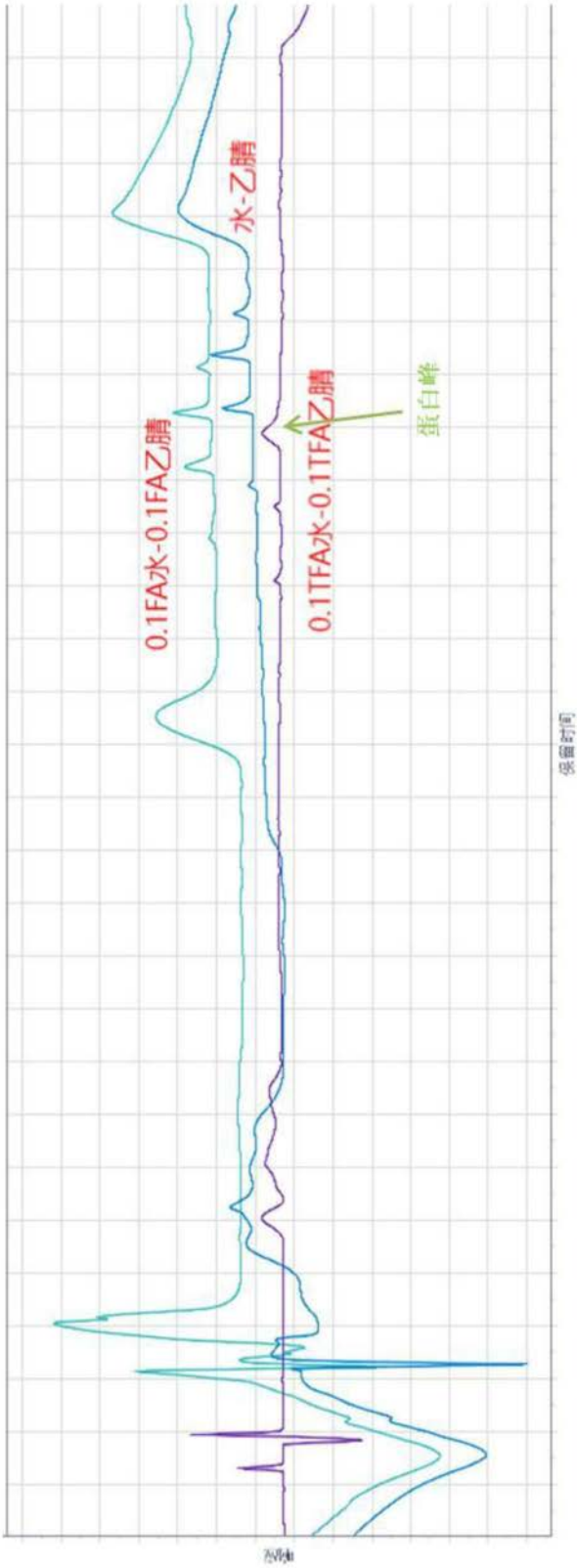


图12

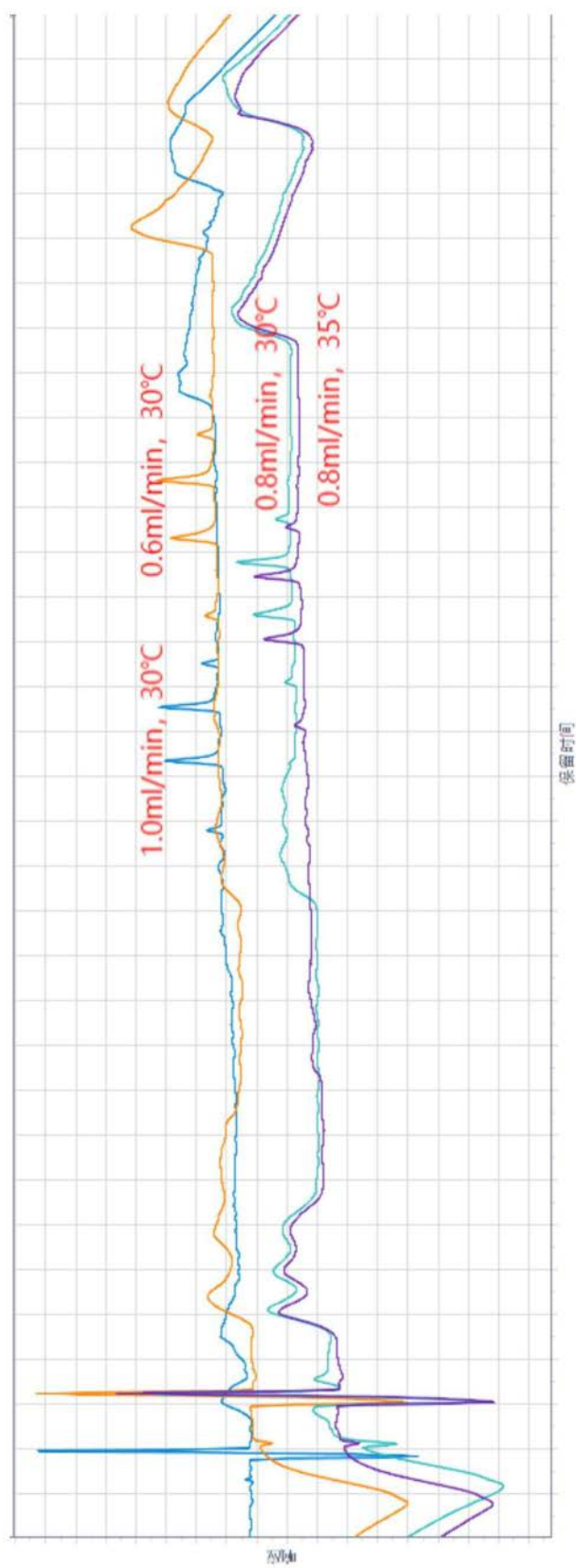


图13

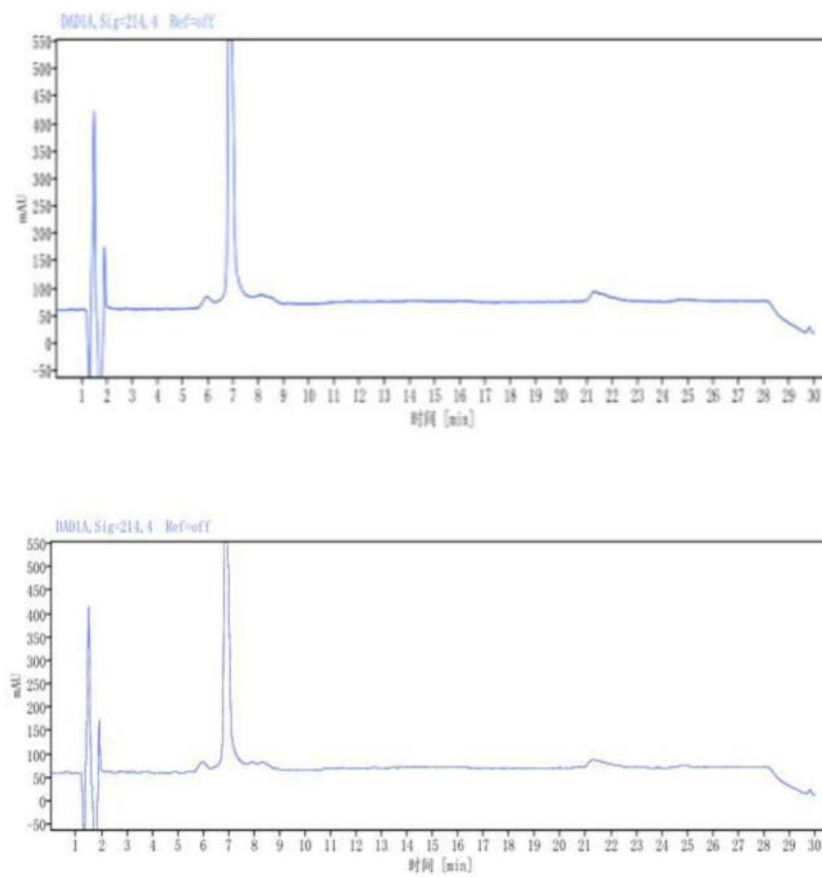


图14A

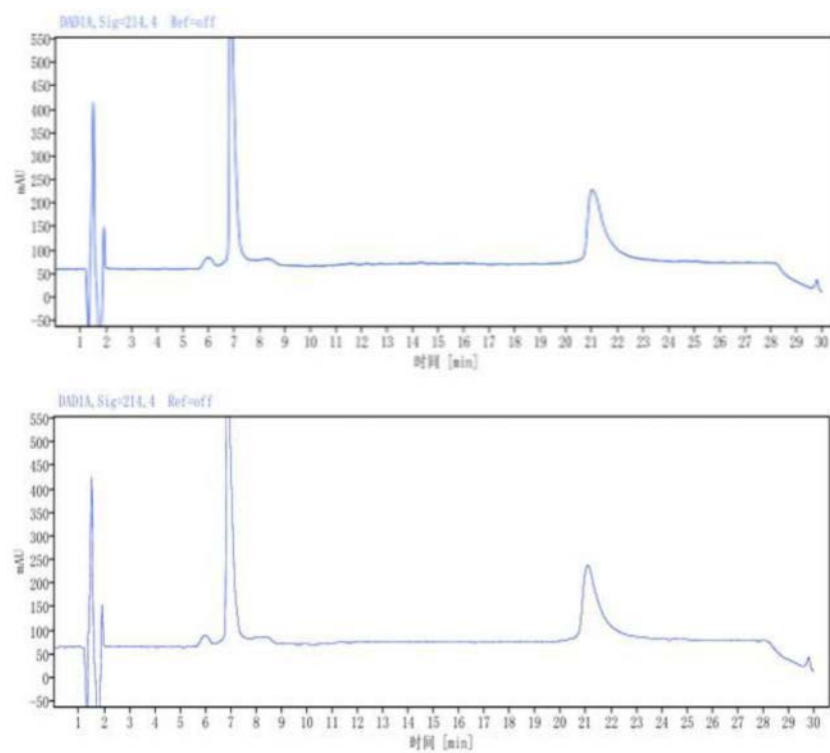


图14B

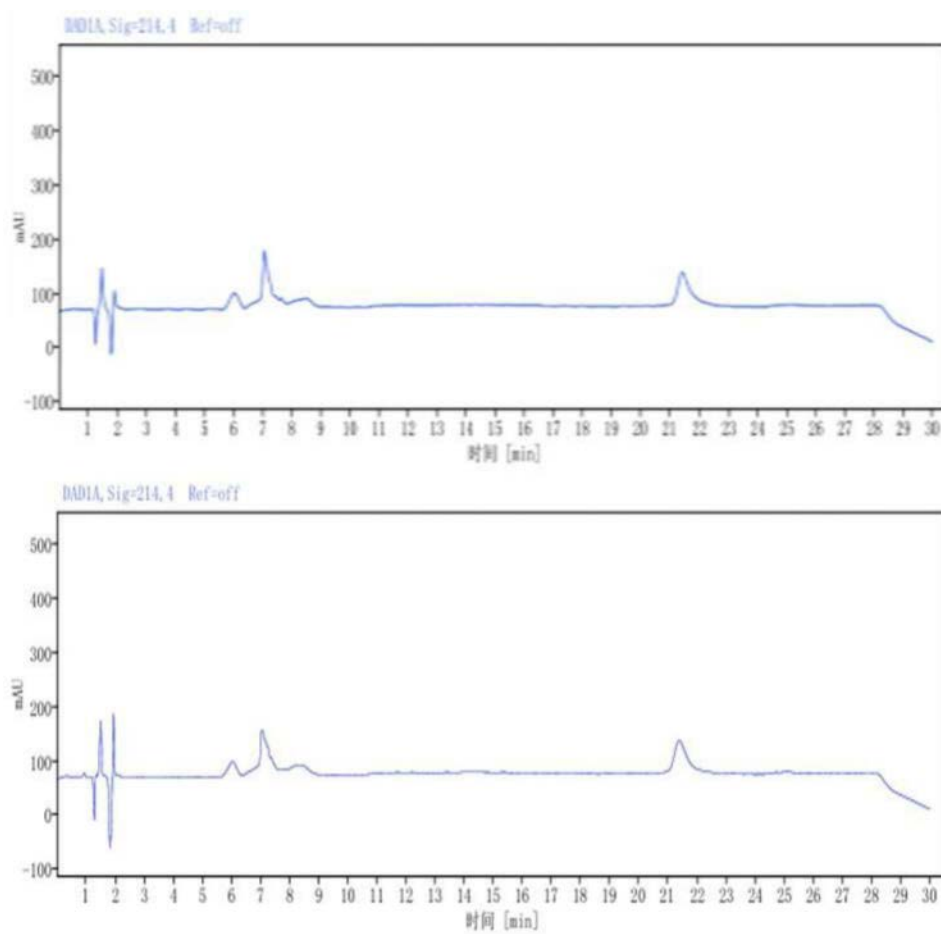


图14C