



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104338175 A

(43) 申请公布日 2015. 02. 11

(21) 申请号 201310333125. 1

(22) 申请日 2013. 08. 01

(71) 申请人 上海华睿生物科技有限公司

地址 201506 上海市金山区金山工业区亭卫
公路 6725 号 7 幢

(72) 发明人 顾其胜 辛春华 王南平 王知华
金强

(74) 专利代理机构 上海精晟知识产权代理有限
公司 31253

代理人 冯子玲

(51) Int. Cl.

A61L 15/32 (2006. 01)

A61L 27/24 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书3页

(54) 发明名称

一种医用无菌无热源鱼皮胶原蛋白海绵的制
备方法

(57) 摘要

本发明属于生物医用材料制备领域, 特别涉
及一种鱼皮胶原蛋白海绵的制备方法, 经过前处
理、酸溶、盐析、透析纯化、超滤膜浓缩、除菌、除
热源和冻干得到医用无菌无热源鱼皮胶原蛋白海
绵。本发明使用了成本低廉、且更加安全的鱼皮作
为胶原蛋白海绵的来源, 不需要经过交联的步骤
就能得到高纯度、低灰分的医用胶原蛋白海绵。

1. 一种医用无菌无热源鱼皮胶原蛋白海绵的制备方法,其特征在于步骤如下:

(1) 去除鱼皮上的鱼肉及脂肪,用 10-50 倍鱼皮重量的清水清洗 2 次,将洗净的鱼皮剪碎成 $0.5 \sim 5\text{cm}^2$ 的小块;

(2) 用 10-50 倍鱼皮重量的 1% ~ 10%NaCl 溶液搅拌下漂洗鱼皮 32h ~ 48h,每 8h ~ 12h 更换一次 NaCl 溶液;

(3) 用 10-50 倍鱼皮重量的去离子水漂洗 4 次,每次 0.5 ~ 1h;

(4) 用 10-50 倍鱼皮重量的 0.1mol/L NaOH 溶液搅拌下漂洗 32h ~ 48h,每 8h ~ 12h 换一次 NaOH 溶液;

(5) 用 10-50 倍鱼皮重量的去离子水漂洗 4 次,每次 0.5 ~ 1h,至 pH6 ~ 7;

(6) 将经前述步骤(1)~(5)处理后得到的鱼皮置于 0.3 ~ 1.0mol/L 的稀酸缓冲液中溶胀,搅拌 4h ~ 12h 后离心,取上清液,得到鱼皮粗胶原提取液;

(7) 鱼皮粗胶原提取液经 $5\mu\text{m}$ 滤膜过滤,加入饱和 NaCl 或 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液盐析,蛋白析出;静置数小时后离心,得到胶原沉淀;

(8) 将胶原沉淀重新溶解于 3-5 倍鱼皮重量的纯水中,以 5-20 倍鱼皮重量的纯水为透析外液,半透膜截流分子量 100KDa,对胶原蛋白进行透析纯化;

(9) 取纯化胶原液用 30KD ~ 50KD 分子量的超滤膜浓缩,至胶液中蛋白浓度达到 1% ~ 4%;

(10) 浓缩后的胶液用 $0.22\mu\text{m} \sim 0.45\mu\text{m}$ 板式膜进行除菌,然后加入 0.1% ~ 5% (w/v) 药用活性炭搅拌后过滤,以去除热源;

(11) 胶液置于 -60°C 低温冷冻干燥机冻干,得到胶原蛋白海绵。

2. 如权利要求 1 所述的鱼皮胶原蛋白海绵的制备方法,其特征在于所述稀酸为盐酸、醋酸或柠檬酸。

3. 如权利要求 1 所述的鱼皮胶原蛋白海绵的制备方法,其特征在于所述步骤(1) ~ (10) 均在 $0^\circ\text{C} \sim 10^\circ\text{C}$ 条件下进行。

一种医用无菌无热源鱼皮胶原蛋白海绵的制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物医用材料制备领域,特别涉及一种鱼皮胶原蛋白海绵的制备方法。

背景技术

[0002] 胶原蛋白广泛存在于从低等脊椎动物的体表面到哺乳动物机体的一切组织之中。鱼类的胶原主要存在于鳞和皮之中。胶原是一类特殊的蛋白质,是三螺旋结构,不同的三股肽链可以组成 27 种不同的胶原类型。不同的胶原类型具有不同的功能特性。

[0003] 胶原蛋白具有低抗原性、可生物降解性、生物相容性、促进血小板凝聚等生物学特性,是非常重要的天然生物材料,主要医学应用包括注射型胶原蛋白、胶原蛋白膜、胶原纤维、胶原蛋白管及各类胶原蛋白复合材料。其中胶原蛋白海绵被应用于外科止血,口腔再吸收性敷料,组织填充,细胞培养材料,组织工程支架等方面。

[0004] 目前市场上的胶原蛋白海绵多来源于陆生动物的皮、骨等。由于日益严重的安全问题,如疯牛病、口蹄疫等,威胁着陆生来源产品的安全性。鱼皮中含有大量的胶原蛋白,是制备胶原蛋白海绵的优质原料,且具有更高的安全性和更低廉的成本。

发明内容

[0005] 本发明要解决的技术问题是:提供一种以鱼皮为原料,制备无菌无热源胶原蛋白海绵的方法。

[0006] 本发明提供了一种医用无菌无热源鱼皮胶原蛋白海绵的制备方法,步骤如下:

[0007] (1) 去除鱼皮上的鱼肉及脂肪,用 10-50 倍鱼皮重量的清水清洗 2 次,将洗净的鱼皮剪碎成 $0.5 \sim 5\text{cm}^2$ 的小块;

[0008] (2) 用 10-50 倍鱼皮重量的 1%~10%NaCl 溶液搅拌下漂洗鱼皮 32h~48h,每 8h~12h 更换一次 NaCl 溶液;

[0009] (3) 用 10-50 倍鱼皮重量的去离子水漂洗 4 次,每次 0.5~1h;

[0010] (4) 用 10-50 倍鱼皮重量的 0.1mol/L NaOH 溶液搅拌下漂洗 32h~48h,每 8h~12h 换一次 NaOH 溶液;

[0011] (5) 用 10-50 倍鱼皮重量的去离子水漂洗 4 次,每次 0.5~1h,至 pH6~7;

[0012] (6) 将经前述步骤(1)-(5)处理后得到的鱼皮置于 0.3~1.0mol/L 的稀酸缓冲液中溶胀,搅拌 4h~12h 后离心,取上清液,得到鱼皮粗胶原提取液;

[0013] (7) 鱼皮粗胶原提取液经 $5\mu\text{m}$ 滤膜过滤,加入饱和 NaCl 或 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液盐析,蛋白析出;静置数小时后 $0^\circ\text{C} \sim 10^\circ\text{C}$ 离心,转速 8000-10000rpm,得到胶原沉淀;

[0014] (8) 将胶原沉淀重新溶解于 3-5 倍鱼皮重量的纯水中,以 5-20 倍鱼皮重量的纯水为透析外液,半透膜截流分子量 100KDa,对胶原蛋白进行透析纯化;

[0015] (9) 取纯化胶原液用 30KD~50KD 分子量的超滤膜浓缩,至胶液中蛋白浓度达到 1%~4%;

[0016] (10) 浓缩后的胶液用 $0.22\ \mu\text{m} \sim 0.45\ \mu\text{m}$ 板式膜进行除菌, 然后加入 $0.1\% \sim 5\%$ (w/v) 药用活性炭搅拌后过滤, 以去除热源;

[0017] (11) 胶液置于 -60°C 低温冷冻干燥机冻干, 得到胶原蛋白海绵。

[0018] 所述的稀酸可以是盐酸、醋酸或柠檬酸。

[0019] 所述的胶原蛋白海绵制备工艺中, 步骤(1) - (10) 均在 $0^\circ\text{C} \sim 10^\circ\text{C}$ 条件下进行。

[0020] 本发明的有益效果: 使用了成本低廉、且更加安全的鱼皮作为胶原蛋白海绵的来源, 经过前处理、酸溶、盐析、透析纯化、超滤膜浓缩、除菌、除热源和冻干, 不需要经过交联的步骤就能得到高质量的医用胶原蛋白海绵。

具体实施方式

[0021] 实施例 1

[0022] 称取 200g 新鲜罗非鱼皮, 剪成 $0.5\text{cm} \times 0.5\text{cm}$ 小片状, 4°C 条件下, 5% NaCl 溶液搅拌漂洗 (1:30w/w) 48h, 每 12h 换一次 NaCl 溶液, 过滤去除滤液; 去离子水 (1:30w/w) 漂洗原料 4 次, 每次 1h; 4°C 条件下, 滤干的鱼皮中加入 0.1M NaOH 溶液搅拌漂洗 (1:30w/w) 48h, 每 12h 换一次 NaOH 溶液, 过滤去除滤液; 再以去离子水 (1:30w/w) 漂洗原料 4 次, 每次 1h, 至漂洗液 pH 为 $6 \sim 7$;

[0023] 4°C 下, 将经前处理的原料置于 0.5mol/L 醋酸溶液 (1:30w/w) 中溶胀, 搅拌 4h, 在 $0^\circ\text{C} \sim 10^\circ\text{C}$ 下、转速 $8000 \sim 10000\text{rpm}$ 离心, 取上清液, 得到鱼皮粗胶原提取液;

[0024] 4°C 条件下, 料液经 $5\ \mu\text{m}$ 膜过滤, 再加入饱和 NaCl 溶液盐析, 直至 NaCl 终浓度 4% , 蛋白析出; 静置数小时后, 在 $0^\circ\text{C} \sim 10^\circ\text{C}$ 下、转速 $8000 \sim 10000\text{rpm}$ 离心, 获得胶原沉淀;

[0025] 将胶原沉淀重新溶解于纯水中, 以纯水 (1:20w/w) 为透析外液, 半透膜截流分子量 100KDa , 4°C 透析 72 小时, 每 12 小时更换一次透析外液;

[0026] 取纯化胶原液在 4°C 条件下用 50KDa 的膜浓缩, 至胶液中蛋白浓度达到 2% ;

[0027] 浓缩好的胶液经 $0.22\ \mu\text{m}$ 板式膜过滤进行除菌;

[0028] 加入 1% (w/v) 椰壳活性炭搅拌后过滤, 去除热源;

[0029] -60°C 低温冷冻干燥机冷冻干燥 72 小时, 得到医用胶原海绵。

[0030] 实施例 2

[0031] 称取 200g 新鲜草鱼皮, 剪成 $1\text{cm} \times 1\text{cm}$ 小片状, 4°C 条件下, 5% NaCl 溶液搅拌漂洗 (1:30w/w) 48h, 每 12h 换一次 NaCl 溶液, 过滤去除滤液; 去离子水 (1:30w/w) 漂洗原料 4 次, 每次 1h;

[0032] 4°C 条件下, 滤干的鱼皮中加入 0.1M NaOH 溶液搅拌漂洗 (1:30w/w) 48h, 每 12h 换一次 NaOH 溶液, 过滤去除滤液; 再以去离子水 (1:30w/w) 漂洗原料 4 次, 每次 1h, 至漂洗液 pH 为 $6 \sim 7$;

[0033] 4°C 下, 将经前处理的原料置于 0.1mol/L 盐酸溶液 (1:30w/w) 中溶胀, 搅拌 4h, 在 $0^\circ\text{C} \sim 10^\circ\text{C}$ 下、转速 $8000 \sim 10000\text{rpm}$ 离心, 取上清液, 得到鱼皮粗胶原提取液;

[0034] 4°C 条件下, 料液经 $5\ \mu\text{m}$ 膜过滤, 再加入饱和 NaCl 溶液盐析, 直至 NaCl 终浓度 4% , 蛋白析出; 静置数小时后, 在 $0^\circ\text{C} \sim 10^\circ\text{C}$ 下、转速 $8000 \sim 10000\text{rpm}$ 离心, 获得胶原沉淀;

[0035] 将胶原沉淀重新溶解于纯水中, 以纯水 (1:20w/w) 为透析外液, 半透膜截流分子量 100KDa , 4°C 透析 72 小时, 每 12 小时更换一次透析外液;

- [0036] 取纯化胶原液在 4℃ 条件下用 30KDa 的膜浓缩,至胶液中蛋白浓度达到 3% ;
 [0037] 浓缩好的胶液经 0.22 μ m 板式膜过滤进行除菌 ;
 [0038] 加入 1% (w/v) 椰壳活性炭搅拌后过滤,去除热源 ;
 [0039] -60℃ 低温冷冻干燥机冷冻干燥 72 小时,得到医用胶原海绵。

[0040] 实施例 3

[0041] 表 1 :本发明的胶原蛋白海绵与现有产品质量比较

[0042]

	实施例 1	实施例 2	牛腱医用胶原海绵
水分含量(%)	13.5	13.7	13.5
灰分(%)	0.51	0.49	1.41
拉力(g)	>50	>50	>50
吸水量(倍)	28	27	30
色氨酸(%)	0.052	0.046	0.282

[0043] 从上表可以看出,本发明的灰分含量低于现有医用胶原海绵 ;另外,由于胶原蛋白中缺乏色氨酸,因此,色氨酸的含量能够作为衡量胶原蛋白纯度的标准,本发明的实施例 1 和实施例 2 的胶原蛋白海绵中色氨酸的含量远低于现有医用胶原海绵,纯度较高。