

《重组胶原蛋白肽图指纹图谱分析》

标准编制说明

一、工作简况

1、任务来源

按照国家药监局综合司关于医疗器械行业标准立项通知(药监综械注(2021)34号)的有关规定和要求,标准计划项目“重组胶原蛋白肽图指纹图谱分析”(项目编号:N2022099-T-zjy)由中国食品药品检定研究院归口,标准起草单位是四川省药品检验研究院(四川省医疗器械检测中心)、中国食品药品检定研究院、岛津企业管理(中国)有限公司、中国科学院过程工程研究所。

2、主要工作过程

本标准草案于2021年开始预研,以“重组胶原蛋白肽图指纹图谱分析”(小组讨论稿)参与2022年立项申请,获得立项批复(项目编号:N2022099-T-zjy)。

中国食品药品检定研究院(简称中检院)于2022年2月28日组织召开《重组胶原蛋白肽图指纹图谱分析》标准制定工作启动会和标准草案(工作组讨论稿)研讨会,标准起草工作组、重组胶原蛋白标准专家组专家和器械所领导及有关人员30余人参加了本次会议。中检院秘书处专家首先介绍了该项标准预研及立项工作概况,四川省药品检验研究院代表起草小组介绍了标准起草情况,参会专家和代表对标准草案和相关工作进行讨论。

根据会上提出的修改建议对标准草案(工作组讨论稿)进行了修改完善,初步确定验证方案为:3月启动验证工作,根据前期预研情况,选择有起草验证能力的单位,确定由4家单位组成起草验证小组:四川省药品检验研究院(四川省医疗器械检测中心)、中国食品药品检定研究院、岛津企业管理(中国)有限公司、中国科学院过程工程研究所。起草小组收集了5家企业(陕西巨子、山西锦波、江苏创建、江苏聚源生物、南京东万)提供的重组胶原蛋白样品,用于标准验证,及时启动了方法确认和验证工作。

中检院于4月18日组织召开了工作组标准草案讨论会，验证单位相关人员参加，各验证单位对标准验证情况进行了汇报，完善和确定标准草案（工作组讨论稿）各项内容。

标准起草小组根据本次研讨会达成的共识意见完善标准草案，形成了《重组胶原蛋白肽图指纹图谱分析》征求意见稿，并按照标准制定程序，于7月8日开始在中国食品药品检定研究院对外官方网站向全社会公开征求意见，向重组胶原蛋白标准工作组专家和相关企业定向征求意见。同时抄送医疗器械标准管理中心，及向相关监管部门（国家药品监督管理局医疗器械注册司和监管司、医疗器械技术审评中心、食品药品审核查验中心、药品评价中心）定向征求意见。截止时间为2022年9月8日。

二、标准编制原则和确定标准主要内容的依据

本标准按照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。本标准起草时参考了《中华人民共和国药典》、YY/T 1849《重组胶原蛋白》。

本部分利用高分辨率色谱质谱技术，给出了标准化的重组胶原蛋白肽图指纹图谱分析方法，所涉及的不同样品的前处理条件、蛋白酶酶解条件、变性或终止酶反应的方法、色谱质谱条件以及如何反映常见异质性的蛋白质分析软件的设置等关键步骤，均结合理论、技术分析和反复实验验证后确定，并经过多家实验室联合验证。

标准的主要内容涵盖术语和定义、试剂及其配制、仪器、操作方法、测定结果分析、报告。

三、主要实验验证情况

（一）验证方案

肽图指纹图谱分析的原理是采用特异性的酶将蛋白质裂解为肽段，经高效液相色谱分离，质谱方法分析，对重组胶原蛋白肽图、肽图覆盖率、异质性进行分析，验证试验方法的可行性、可靠性。

样品的代表性：验证样品涵盖单链重复片段组合的样品（I型和III型的重组胶原蛋白），单链全长的样品、含二硫键的全长且含有三螺旋结构重组胶原蛋白。对肽图、肽图覆盖率、异质性分析3项指标的测定和分析方法进行验证。每种样品至少两家单位验证。

（二）方法确认

1、样品制备方法验证：分别考察固体和液体样品制备方法，并进行规定。称取5mg（精确到0.00001 g）重组胶原蛋白置15mL离心管中，加入5mL 0.5%醋酸溶液溶解。液体供试品：取液体供试品适量，加0.5%醋酸溶液适量，制成蛋白浓度为1mg/mL的溶液。重组胶原蛋白溶于0.5%醋酸，溶液澄清。比较了水溶液，0.5%醋酸，0.1mol/L碳酸氢铵配制样品溶液，重组胶原蛋白在0.5%醋酸溶液里放置24小时稳定，脱酰胺化率不变，在水溶液和0.1mol/L碳酸氢铵溶液放置24小时脱酰胺化率有增加的趋势。

2、酶解方法验证：胰蛋白酶的酶解最佳pH值在8.0~8.5，制备的1mg/mL的样品溶液pH值偏酸，样品加到超滤管中，用100 μ L 0.1M Tris-HCl（pH 8.0）溶液，11,000 g离心10分钟，重复二次。是用Tris-HCl（pH 8.0）中和醋酸，洗脱醋酸溶液，去掉外层套管的液体，是为了保证酶解时样品的pH值为8.0，利于胰蛋白酶酶解。

3、样品变性条件筛选：比较了不含二硫键的样品加热变性与不加热，进行酶解，对于肽图和肽段覆盖率没有差异，故不含二硫键的重组胶原蛋白可以直接酶解。对于含二硫键的样品需加入100 μ L 8 mol/L盐酸胍，在涡旋仪上剧烈震荡15 s，使样品完全变性。加入5 μ L 1mol/L DTT，涡旋混匀后置56℃中反应30分钟。冷却至室温后加入13 μ L 1 mol/L IAA，放置室温，避光反应30分钟。11,000 g离心10分钟。继而在超滤管中加入100 μ L 0.1 mol/L Tris-HCl（pH 8.0），11,000 g离心10分钟，重复二次，去掉外层套管中过滤掉的液体，保留超滤管中的供试品。加入Tris-HCl（pH 8.0）反复洗，是为了洗脱残留的试剂，保证胰蛋白酶酶解条件。

经过反复方法筛选，确保异质性不会人为在检测过程引入，确定的实验条件见标准草案（征求意见稿）。

（三）验证结果

目前的验证结果如下：

1、肽图：简单重复序列短的重组胶原蛋白，可采用高效液相色谱法得到具有特征肽段峰的液相色谱图，可作为日常工艺稳定性监控。对于复杂的氨基酸数量较多的重组胶原蛋白酶解肽段较多，可采用总离子图进行定性比较，用于监测。

B样品的理论氨基酸序列少于500个氨基酸，高效液相色谱图可以清楚地展示其肽图谱特征，见图1。

A1样品的理论氨基酸序列超过1000个氨基酸，需要用液质总离子图清楚地展示其肽图谱特征，见图2。

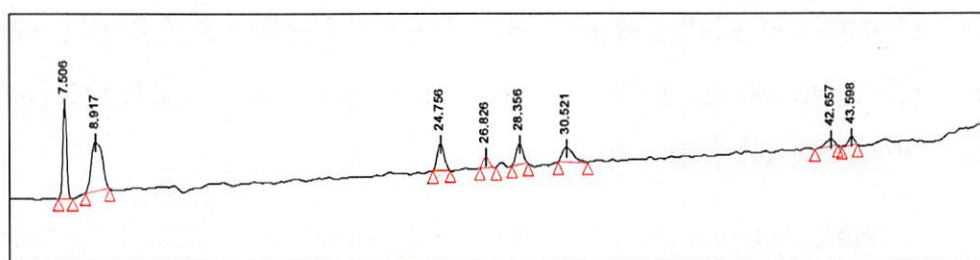


图1 B样品高效液相色谱图

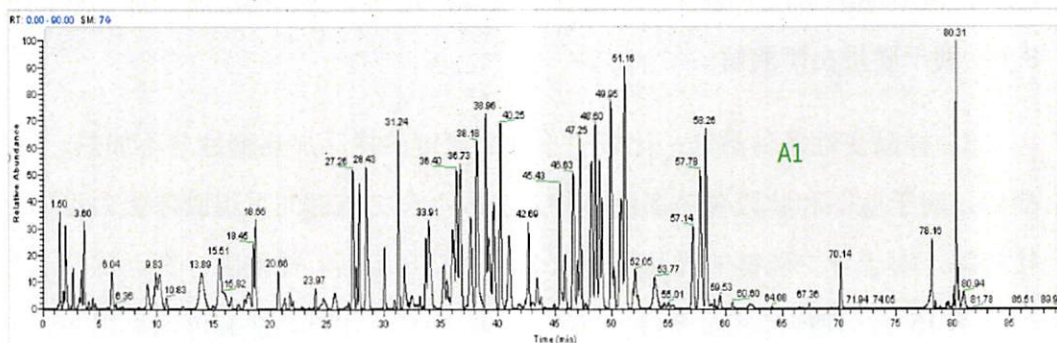


图2 A1样品液质总离子图

2、肽段覆盖率

B样品和D样品均为部分氨基酸序列的重复片段组成，其胰蛋白酶酶解后肽段覆盖率为100%。A1和A3样品理论氨基酸序列超过1000个氨基酸。胰蛋白酶酶解后用Thermo BioPharma Finder软件识别出绝大部分氨基酸，个别由于酶解肽段过短（如小于5个氨基酸），或者过长而无法确定，其肽段覆盖率如A3为96.1%。

此种情况时表明,如果需要测出全部氨基酸序列覆盖情况,则需要选择不同的酶,对于没能识别的肽段进行分析。

3、异质性分析

用Thermo BioPharma Finder软件对A1、B、A3样品进行异质性分析,结果如下。

A1样品异质性分析结果:修饰的类型为天冬酰胺脱酰胺化、谷氨酰胺脱酰胺化、甲硫氨酸氧化和异构化。

A3样品异质性分析结果:修饰的类型为天冬酰胺脱酰胺化、谷氨酰胺脱酰胺化和甲硫氨酸氧化。

B样品异质性分析结果:修饰的类型为天冬酰胺脱酰胺化和谷氨酰胺脱酰胺化。

D和E样品尚在验证中。

(四) 验证结论

初步验证结果表明,本标准给出的重组胶原蛋白肽图指纹图谱检测方法重复性好,方法可行和结果可靠。

四、采用国际标准或国外先进标准程度的说明,以及与国内外同类标准的对比情况

《中华人民共和国药典》3405“肽图检查法”的“胰蛋白酶裂解-反相高效液相色谱法”进行测定比较。“胰蛋白酶裂解-反相高效液相色谱法”采用紫外检测器检测肽图,不能做肽图覆盖率和异质性分析。“胰蛋白酶裂解-反相高效液相色谱法”没有具体产品的样品前处理和变性处理方法。

本标准规定了重组胶原蛋白不同样品前处理和变性方法,胰蛋白酶的具体酶解条件,高效液相色谱的色谱条件,质谱的检测器检测模式,肽段覆盖率和异质性分析方法。

五、与有关的现行法律、法规和强制性标准的关系。

与现行法律、法规和强制性国家无冲突。该标准是对 YY/T 1849《重组胶原蛋白》的具体方法补充,有助于 YY/T 1849 的实施。

六、重大分歧意见的处理依据和结果的说明

无重大分歧意见。

七、作为强制性行业标准或推荐性行业标准的建议

建议作为推荐性行业标准。

八、贯彻标准的要求和措施建议

为便于相关标准使用方理解和贯彻标准，计划在标准发布出版后适时召开标准宣贯会。宣贯对象为生产企业、监管人员、检验人员及其它相关人员。

建议本标准从发布之日起，可给予12个月过渡期，12个月后正式实施。

九、废止现行有关标准的建议

无。

十、其他应予说明的事项

无。

-----。

2022 年 7 月 7 日