

标准编制说明

一、任务来源及背景

按照国家药品监督管理局办公厅《国家药监局综合司关于印发 2020 年医疗器械行业标准制修订项目计划项目的通知》（药监综械注〔2020〕48 号）的有关规定和要求，标准计划项目《组织工程医疗器械产品 胶原蛋白 第 2 部分：I 型胶原蛋白分子量检测——十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳法》（项目编号：N2020002-T-ZJY）由全国外科植入物和矫形器械标准化技术委员会组织工程医疗器械产品分技术委员会（SAC/TC110/SC3）归口，标准起草单位是中国科学院过程工程研究所、四川省食品药品检验检测院、中国食品药品检定研究院。

二、制定标准的必要性和意义。

分子量是对胶原蛋白定性及纯度判断的重要指标之一。I 型胶原蛋白分子量高达 300 kDa，其分子由 2 条 $\alpha 1$ 链和 1 条 $\alpha 2$ 链组成，且 $\alpha 1$ 链的分子量大于 $\alpha 2$ 链。常规的检测胶原蛋白分子量的方法主要有液相凝胶过滤色谱法，但这种方法很难将 I 型胶原与其它类型胶原分离。因此本标准旨在建立一种基于十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳的方法测定不同类型的 I 型胶原蛋白产品的分子量信息。美国 ASTM 发布了胶原蛋白表征指南，提出了分子量测定的意义和重要性，推荐用 SDS-PAGE 方法，但是没有给出具体的实验方法。药典中虽然有蛋白质分子量测定的 SDS-PAGE 通用方法，但是，主要适用于可溶性好的蛋白质。胶原蛋白大分子多为酸溶性，且作为组织的基质蛋白具有较强的黏性，因此，单纯依据药典的方法无法实现胶原蛋白分子量的测定。国际、国内尚未有 I 型胶原蛋白分子量检测方法标准。本标准的制定可以实现分子量的初步分析，为 I 型胶原蛋白产品的定性及纯度的判断提供依据，有利于提高我国胶原蛋白行业在国际的竞争力。

三、主要起草验证过程

本标准草案于 2019 年开始预研，于 2019 年立项时完成了草案的初稿（小组讨论稿）。于 2020 年 1 月起草小组开始进行了认真的修改完善，完成了工作组讨论稿；2020 年 3 月 13 日，组织工程医疗器械产品分技术委员会秘书处组织起草小组通过网络视频会议形式，召开医疗器械标准草案（工作组讨论稿）研讨会。讨论会上起草小组对标准草案内容进行逐字逐句的研讨，根据讨论意见对草案再次进行修改完善，同时拟定了标准验证方案。2020 年 4~6 月由 2 家实验室开展了验证实验，对标准中规定的方法的可行性和可靠性进行了验证。2020

年 6 月完成了验证实验。在验证实验结果分析的基础上，进一步完善了标准草案，形成“征求意见稿”，于 2020 年 7 月 7 日发文至医疗器械标准管理中心及全体委员，向全体委员及社会广泛征求意见。

四、标准编制原则和依据

本标准的制定贯彻了国家标准 GB/T 1.1-2009《标准化工作导则 第 1 部分：标准的结构和编写》的有关规定。本标准起草时参考了《中华人民共和国药典》四部（2020 版），0541 电泳法（第五法）。

五、主要实验（或验证）的情况

胶原样品的特点为大分子纤维状具有三螺旋结构的蛋白，具有一定的黏性，在制备电泳样品时样品的前处理非常关键。本标准验证用实验样品分为牛 I 型胶原的固体与溶液两类样品。固体样品的前处理方法为：将样品用 SDS 缓冲液溶解，热变性之后进行上样；液体样品的前处理方法为：将液体样品与 SDS 缓冲液按一定比例混合，热变性之后进行上样。本次验证由中国科学院过程工程研究所、四川省食品药品检验检测院两家单位分别对胶原溶液 A、胶原海绵 B、胶原溶液 C1、胶原冻干品 C2、胶原膜 C3 五个样品进行验证。验证情况如下：

1、样品变性处理方法验证：固体样品（胶原海绵、胶原冻干品和胶原膜）：称取供试品适量（蛋白含量约 5 mg）加水 8 mL，SDS 样品缓冲液（5×）2 mL，混合后于 100 °C 水浴加热 5 min~10 min 使蛋白质变性，离心（650 g，5 min ~10 min）；液体样品：取液体样品适量（蛋白含量约 5 mg），加水至终体积为 8 mL，SDS 样品缓冲液（5×）2 mL，混合后于 100 °C 水浴加热 5 min ~10 min 使蛋白质变性，离心（650 g，5 min ~10 min）。电泳加样体积为 10 μL。利用此方法处理得到的胶原样品溶液均澄清透明，这表明利用此方法处理样品可使样品充分变性，该样品变性处理方法是可行的和可靠的。

2、电泳凝胶制备验证：按照比例分别配制 7.5% 的分离胶溶液和 5% 的浓缩胶溶液，得到的分离胶和浓缩胶在 45 min 之内均可有效聚合，表明电泳凝胶制备方法是可行的和可靠的。

3、加样方法验证：待浓缩胶溶液聚合后小心拔出样品梳，将电极缓冲液注满电泳槽前后槽，在加样孔中加入样品，结果表明此方法加入样品可有效在孔道底部聚集；在分子量标准品加样 5 μL，I 型胶原蛋白标准品和待测样品加样 10 μL 的条件下，均可得到清晰的条带。结果表明加样方法是可行的和可靠的。

4、参考电泳条件验证：采用恒压或者恒流电泳模式，推荐采用恒压电泳，初始电压为 80 V，进入分离胶时调至 120 V。此条件可实现样品中不同条带的有效分离。验证结果表明参考电泳条件是可行的和可靠的。

5、染色方法验证：本次实验使用考马斯亮蓝 R-250 染色液，待电泳结束后，将胶片置于染色液中染色 1 h ~2 h。观察胶片可充分染色，能观察到明显的样品蓝色条带。验证结果表明使用考马斯亮蓝 R-250 染色的方法是可行的和可靠的。

6、脱色方法验证：待胶片充分染色后，先用水冲洗表面的多余染料，再将胶片浸泡于乙醇、冰醋酸和水混合配制的脱色液中，中间可根据脱色情况更换脱色液，可达到胶片背景透明，蓝色样品条带清晰。验证结果表明脱色方法是可行的和可靠的。

7、分子量结果计算方法验证：中科院过程所对 5 个样品分别平行检测 3 次得到的样品图谱见图 1。结果表明样品与蛋白标准品的条带（约 371.7kDa）和分子量基本一致，样品的分子量均在 360-392 kDa 之间，RSD 值均小于 2%；四川省食品药品检验检测院对 5 个样品分别平行检测 6 次，结果表明，样品与蛋白标准品的条带和分子量基本一致，样品的分子量在 380~461 kDa 之间，RSD 值均小于 7%。两家验证结果相比有一些差异，分析其原因，可能是所使用的市售电泳凝胶品牌不同，凝胶的厚度不一样，导致条带的移行距离出现差异，此内容将以注的形式在标准正文中予以提示。但是，同样与牛 I 型胶原蛋白标准品相比，RSD 值均小于 7%，在允许的变异范围（药典规定 RSD 值小于 10%）。

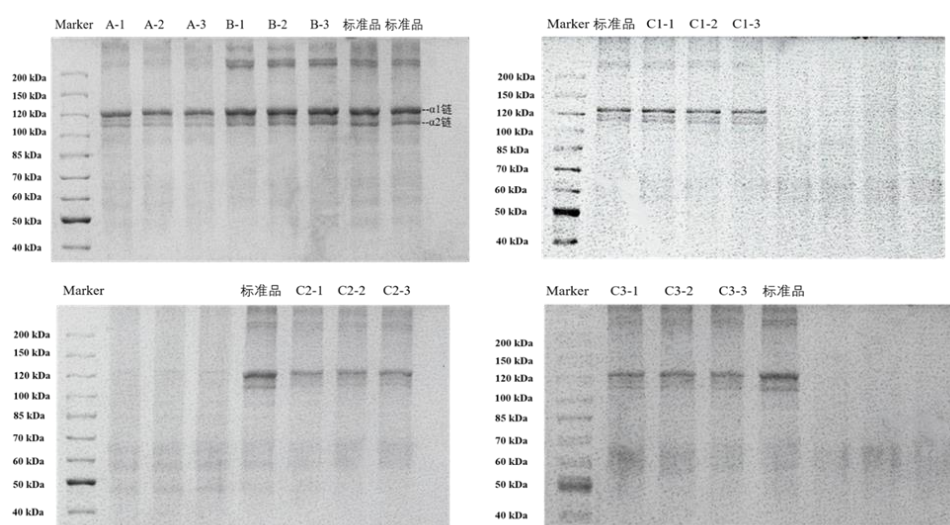


图 1 中科院过程所 SDS-PAGE 图

以上验证结果显示，标准中给出的方法经中科院过程所和四川省食品药品检验检测院验证是可行的和可靠的，能够用于测试 I 型胶原蛋白分子量。

六、重大意见分歧的处理依据和结果的说明

无。

七、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

本标准主要参考了《中华人民共和国药典》四部（2020 版），0541 电泳法，并结合胶原蛋白的特性和样品形式的多样性进行方案设计。所给出的方法与药典中一致的内容包括：6 试剂中纯化水的标准、8.5 染色方法、8.6 脱色方法、9.2 a) 迁移率计算方法、9.2 b) 标准曲线绘制和 10) 可接受准则；与药典中不一致的内容包括：溶剂配制方法、分离胶及浓缩胶配制比例、样品前处理方法、电泳条件。

八、与有关的现行法律、法规和强制性国家标准的关系。

本标准与有关的现行法律、法规和强制性国家标准无冲突和交叉。本标准是对 YY/T 1453 “组织工程医疗器械产品 I 型胶原蛋白表征方法”的补充。

九、行业标准作为强制性行业标准或推荐性行业标准的建议

本标准为方法标准，建议作为推荐性行业标准。

十、贯彻标准的措施和建议

标准发布后 1 年内，将根据各方反馈意见择期召开标准宣贯会议。向监管部门、技术审评部门、检验机构、生产企业等使用单位发放标准宣贯资料，并解答标准中相关技术难点和疑点。建议本标准在发布之日起 12 个月实施。

十一、废止现行有关标准的建议

无。

十二、其他应予说明的事项

无。

全国外科植入物和矫形器械标准化技术委员会
组织工程医疗器械产品分技术委员会
二〇二〇年七月七日