

ICS 11.040.40

CCS G30

YY

中华人民共和国医药行业标准

YY/T XXXXX—XXXX

重组胶原蛋白肽图指纹图谱分析

Peptide mass fingerprinting analysis of recombinant collagen

(征求意见稿)

(2022年7月)

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

建议标准发布 12 个月后开始实施

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

国家药品监督管理局 发布

目 次

前言	II
引言	III
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 缩略语	1
5 概述	1
6 试剂及其配制、仪器	1
7 操作方法	2
8 测定结果分析	3
9 报告	4
参考文献	5

中检院

征求意见稿

前 言

本文件按照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。

本文件的某些内容可能涉及专利，本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本文件由国家药品监督管理局提出。

本文件由中国食品药品检定研究院归口。

本文件起草单位：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。

本文件主要起草人： 。

中检院 征求意见稿

引 言

重组胶原蛋白的研究和产品研发经历了30多年的研究历程，取得了突破性进展，国内外已有多种不同表达体系的重组胶原蛋白类产品得到广泛应用，其中包括一些产品在医学领域的应用。近年来，我国重组胶原蛋白类医疗器械产品的研发得到了快速发展，已有数家企业的数十个产品获批而应用于临床。基于产业的发展和监管的需求，我国及时制定了“重组胶原蛋白”行业标准（YY/T 1849-2022《重组胶原蛋白》）。然而，由于各家产品的表达体系等重组工艺不尽相同，所选择的核酸序列长短不同，片段的组合与拼接等千差万别，重组胶原蛋白不可忽视的异质性分析成为了该类产品质量评价和质量控制的重要项目，目前尚缺乏有效的分析方法。

重组胶原蛋白的结构特征决定其生物功能和产品稳定性。本文件给出了重组胶原蛋白肽图检测的具体方法，可以用高效液相色谱法得到肽图进行日常监测；采用高效液相色谱-质谱联用方法可进行肽段覆盖率检查；同时，本文件还给出了利用肽图指纹图谱分析的方法，检测和分析重组胶原蛋白常见的脱酰胺化、氧化及异构体等异质性现象。这些异质性可通过高分辨率色谱质谱技术进行定性分析，对异质性修饰类型和修饰率进一步定量分析确证。

重组胶原蛋白肽图指纹图谱分析

1 范围

本文件规定了重组胶原蛋白肽图指纹图谱分析方法，包括肽图、肽段覆盖率、异质性分析。本文件适用于重组胶原蛋白的肽图指纹图谱分析。

注：本文件主要以重组人胶原蛋白为例进行验证。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验用水规格和试验方法

YY/T 1849 重组胶原蛋白

《中华人民共和国药典》

3 术语和定义

YY/T 1849中界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

3.1

肽图指纹图谱 Peptide mass fingerprinting

采用适宜的特异性酶将蛋白质裂解为肽段，经可靠方法分离和鉴定后获得的特征性图谱，它可提供待测蛋白质的肽段序列信息。

4 缩略语

下面缩略语适用于本文件。

DTT: 二硫苏糖醇(Dithiothreitol)

IAA: 碘乙酰胺(Iodoacetamide)

HCl: 盐酸(hydrochloric acid)

Tris: 三羟甲基氨基甲烷[Tris(hydroxymethyl)methyl aminomethane]

Tris-HCl: 三羟甲基氨基甲烷盐酸[Tri(Hydroxymethyl) Amino Methane Hydrochloride]

5 概述

参照《中华人民共和国药典》中3405，将重组胶原蛋白样品用适宜的蛋白酶酶解（如胰蛋白酶），用高效液相色谱进行分离获得特征性指纹图谱；利用高效液相色谱-高分辨率质谱技术进行分析得到多肽一级、二级谱图，然后与理论氨基酸序列酶解肽段匹配，进行胶原蛋白肽段覆盖率分析，用于评价重组胶原蛋白的符合性。

利用肽图指纹图谱可进行异质性分析，如：N端甲硫氨酸，信号肽或前导序列和其他可能的N端、C端修饰，以及各种其他翻译后修饰（如脱酰胺化、氧化、异构化、碎片化、二硫键错配、N-连接和O-连接的寡糖、糖基化、聚集等），评价产品工艺及其监测工艺的稳定性。

6 试剂及其配制、仪器

6.1 试剂

除特别注明外，所有试剂均为分析纯。实验用水应符合 GB/T 6682 的要求。主要试剂如下：

- a) 乙腈、甲酸：用于高效液相色谱-质谱检测时使用质谱纯，用于高效液相色谱检测时使用色谱纯；
- b) 胰蛋白酶：序列纯。取 20 μg 的酶加入 200 μL 0.1 mol/L Tris-HCl 溶液 (pH 8.0) 溶解成 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的溶液。（也可按照说明书配制使用）；
- c) 0.5 %醋酸溶液 (V/V)：精密量取 0.5 mL 醋酸加水并定容至 100 mL；
- d) 0.1 mol/L Tris-HCl 溶液 (pH 8.0)：精密称取 0.121 g Tris 溶于 5 mL 中，用 6 mol/L 的盐酸调 pH 值至 8.0，加水定容至 10 mL；
- e) 8 mol/L 盐酸胍溶液：精密称取 7.64 g 盐酸胍，加水溶解并定容至 10 mL，混匀，即得；
- f) 1 mol/L DTT 溶液：精密称取 0.1542 g DTT 加水 1.0 mL 溶解，即得；
- g) 1 mol/L IAA 溶液：精密称取 0.1849 g IAA 加水 1.0 mL 溶解，即得，避光保存。

6.2 仪器

主要仪器和设备如下：

- a) 分析天平：精度 0.00001 g；
- b) 离心机；
- c) 水浴锅或恒温箱；
- d) 涡旋仪；
- e) 高效液相色谱仪；
- f) 高效液相色谱-质谱仪（如：液相色谱-四极杆飞行时间高分辨质谱仪 (LCMS-QTOF)、液相色谱-静电场轨道阱高分辨质谱仪 (LCMS-Orbitrap) 等）。

7 操作方法

7.1 供试品溶液制备

7.1.1 不含二硫键供试品溶液制备

7.1.1.1 供试品溶解

不同性状的供试品溶解方法如下：

- 固体供试品：精密称取 5 mg（精确到 0.00001 g）重组胶原蛋白供试品置 15 mL 离心管中，加入 5 mL 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 1 mg/mL 的溶液。

7.1.1.2 酶解反应

按以下步骤进行：

- a) 取 7.1.1.1 中溶解的供试品溶液 100 μL 置超滤管 (10 kDa) 中，加入 100 μL 0.1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0) 溶液，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；
- b) 在超滤管中加入 100 μL 0.1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0) 溶液，反复吹打，将溶液吸到 0.5 mL 的离心管中。加入胰蛋白酶，胰蛋白酶与蛋白比例 (m/m) 1:20~1:50，充分振荡混匀，封口膜封好后于 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应一定时间（推荐 2 h~20 h）达到完全酶解，避免过长时间反应。

7.1.1.3 终止酶解反应

酶解完成后，向酶解样品管中加入 10 μL 10 %甲酸（终浓度约为 1 %），终止酶解反应，待用。
注：酶解时间根据蛋白理论序列长短及复杂程度进行预实验，确定达到完全酶切，且避免过度酶切的时间。

7.1.2 含有二硫键的供试品溶液制备

7.1.2.1 供试品溶解

同 7.1.1.1。

7.1.2.2 变性

按以下步骤进行样品变性处理：

- 取 7.1.2.1 中溶解的供试品 100 μ l 置超滤管 (10 kDa) 中，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 1 mol/L DTT，涡旋混匀后置 56 $^{\circ}$ C 中反应 30 min；
- 冷却至室温后加入 13 μ L 1 mol/L IAA，放置室温，避光反应 30 min；
- 11,000 g 离心 10 min，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 2 次，去掉外层套管中过滤掉的液体，保留超滤管中的供试品。

7.1.2.3 酶解反应

同 7.1.1.2。

注1：根据对理论氨基酸分析，采用合适的蛋白酶。常用胰蛋白酶，如胰蛋白酶不适用，可选用其他蛋白酶，如糜蛋白酶，Glu-C酶，Lys-C酶。

注2：含有二硫键还原样品宜现配现用，避免时间过久导致二硫键复连。

7.1.2.4 终止酶解反应

同 7.1.1.3。

7.2 高效液相色谱-质谱测定条件

7.2.1 高效液相色谱法条件

推荐色谱柱：用辛烷基硅烷键合硅胶或十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂，（推荐 Waters Xterra Ms C8 5 μ m 4.6 \times 150 mm、ACQUITY UPLC protein BEH C18 Column-300 \AA ，1.7 μ m、Shim-pack Arata Peptide C18，2.2 μ m，150 mm \times 2.0 mm 或 Thermo AccucoreTM-C18-2.6 μ m，2.1 \times 150 mm）；

流动相：流动相 A 为含 0.1% 甲酸水溶液，流动相 B 为含 0.1% 甲酸乙腈溶液，梯度洗脱，推荐流动相梯度见表 1，可根据不同色谱柱、不同样品进行调整；

流速：根据不同色谱柱的耐受能力选择 0.2 mL/min~1.0 mL/min；

柱温：35 $^{\circ}$ C~40 $^{\circ}$ C；

进样量：根据色谱柱的不同选择 1 μ L~10 μ L；

检测波长：214 nm。

表 1 流动相梯度

时间 (min)	A (%)	B (%)
0	98	2
5	98	2
65	70	30
70	10	90
74	98	2
75	98	2

7.2.2 质谱条件：可根据不同仪器的特点，对操作参数作适当调整，以获得最佳离子化效率。

离子源：电喷雾离子源；扫描方式：正离子扫描；扫描模式：一级质谱和二级质谱扫描。

8 测定结果分析

8.1 肽图

在高效液相色谱图或质谱总离子图中，供试品溶液的图形应与对照品或参比品一致。

8.2 肽段覆盖率

选用适宜的蛋白质鉴定软件（如：BioPharma Finder、UNIFI、Byomap）进行分析。具体操作步

骤如下:

- a) 输入理论氨基酸序列建立理论序列数据库;
- b) 根据理论氨基酸序列, 设置常见的可变修饰。重组胶原蛋白常见的可变修饰, 如: 甲硫氨酸氧化修饰 (Oxidation: M+15.9949 Da), 天冬酰胺脱酰胺化 (Deamidated: N+0.9840 Da), 谷氨酰胺脱酰胺化 (Deamidated: Q+0.9840 Da), 谷氨酰胺的焦谷氨酸化 (Gln→pyro-Glu: Q-17.0265 Da), 谷氨酸的焦谷氨酸化 (Glu→pyro-Glu: E-18.0105 Da), 氮端氨基甲酰化 (Carbamyl: +43.0058 Da), 甲硫氨酸脱硫代甲基化 (Dethiomethyl: M-48.0033 Da), 氮端脱氨化 (Ammonia-loss: -17.0265 Da) 和氮端乙酰化 (Acetyl: +42.0105 Da) 等;
- c) 若样品含有二硫键, 并且前处理操作中使用了碘乙酰胺进行半胱氨酸的烷基化, 需要设置半胱氨酸烷基化为固定修饰 (Carbamidomethyl: C+57.0214 Da);
- d) 打开原始质谱数据。选择酶切方式, 蛋白质酶类型为胰蛋白酶时, 酶切位点为精氨酸和赖氨酸, 设置最多允许 2 个漏切位点。设置母离子质量偏差 (candidate matching tolerance) 为 ±10 ppm, 二级质谱质量偏差 (Fragment match Tolerance) 为 ±10 ppm;
- e) 利用软件分析肽段覆盖率。

注: 对于小于 5 个氨基酸的肽段如未被软件识别, 需要采用其他酶进行酶切处理, 单独识别这些肽段, 对覆盖率进行补充说明。如, 胰蛋白酶有两个酶切位点 (K, R), 采用 Lys-C 酶只有一个位点 K 进行酶切, 肽段会变长, 可以被识别。

8.3 异质性分析

按以下步骤进行异质性分析:

- a) 软件参数设置和操作步骤同 8.2 a) -d);
- b) 分析发现的修饰种类和修饰位点;
- c) 计算修饰比例: 可以通过蛋白分析软件计算得到, 或手工计算。按式 (1) 计算。

$$\text{修饰比例} = \frac{\text{修饰肽段}}{(\text{修饰肽段} + \text{未修饰肽段})} \times 100\% \quad (1)$$

9 报告

报告宜至少包括以下内容:

- a) 供试品基本信息;
- b) 蛋白酶名称 (非标准中推荐的蛋白酶, 应同时提供反应体系);
- c) 测试仪器名称, 测试条件;
- d) 分析软件名称, 软件分析参数;
- e) 测试和分析结果;
- f) 附图: 肽图谱图、肽段覆盖率图。

参 考 文 献

- [1] 饶春明,陶磊,史新昌等. 重组人干扰素 α 1b质量肽图分析及二硫键定位[J]. 药物分析杂志, 2007(10):1505-1510
- [2] 解茹,张贵锋,高建萍等. 温度和pH对重组人血管内皮抑制素脱酰胺的影响[J]. 中国医药生物技术, 2010, 5(02):88-93
- [3] 柳军凯,贺鹏飞,赖燕华等. 人乳头瘤病毒18型L1抗原的肽图特征峰分析[J]. 药物分析杂志, 2019, 39(10):1836-1843
- [4] 黄露,刘博,范慧红. 基于质谱分析技术的科博肽中脱酰胺杂质测定方法研究[J]. 药学学报, 2021, 56(09):2352-2359
- [5] Pataridis S, Eckhardt A, Mikulíková, *et al.* Identification of collagen types in tissues using HPLC-MS/MS[J]. Journal of Separation Science, 2008, 31(20):3483-3488
- [6] Beck A, Wagner-Rousset E, Ayoub D, *et al.* Characterization of therapeutic antibodies and related products[J]. Analytical chemistry, 2013, 85(2): 715-736
- [7] Hao P, Ren Y, Datta A, *et al.* Evaluation of the effect of trypsin digestion buffers on artificial deamidation[J]. Journal of proteome research, 2015, 14(2): 1308-1314
- [8] Jin Y, Yi Y, Yeung B. Mass spectrometric analysis of protein deamidation - A focus on top-down and middle-down mass spectrometry[J]. Methods, 2020, 200:58-66
- [9] Huizen N, Ijzermans J, Burgers P C, *et al.* Collagen analysis with mass spectrometry[J]. Mass Spectrometry Reviews, 2020, 39:309-335