

团 体 标 准

T/GDCA 052—2024

化妆品用原料 纤连蛋白

Cosmetic ingredients- Fibronectin

2024 - 11 - 01 发布

2024 - 11 - 01 实施

广东省化妆品学会 发 布

目 次

前言 II

1 范围 3

2 规范性引用文件 3

3 术语和定义 3

4 质量控制 3

5 试验方法 5

6 检验规则 6

7 标签、包装、运输、贮存、保质期 7

附录 A（规范性） 蛋白质分子量的测定 8

附录 B（规范性） 蛋白质浓度测定（BCA 法） 12

附录 C（规范性） 蛋白质纯度测定（分子排阻色谱法） 14

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。

请注意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专利的责任。

本文件由广东省化妆品学会提出。

本文件由广东省化妆品学会归口。

本文件起草单位：完美（广东）日用品有限公司、珠海市国生健康科技有限公司、广东工业大学、暨南大学、广州市暨源生物科技有限公司、广州远想医学生物技术有限公司、美尔健（深圳）生物科技有限公司、深圳柏垠生物科技有限公司、广州市白云区广工大化妆品研究院、珠海市大美湾化妆品创新研究院。

本文件主要起草人：苏敦、陈文杰、杨露、杜志云、项琪、蔡祥、肖巧学、周晗、阮仁全、崔俊锋、贺晓静、罗佳盈。

化妆品用原料 纤连蛋白

1 范围

本文件规定了化妆品用原料纤连蛋白的术语和定义、质量控制、试验方法、检验规则、标签、包装、运输、贮存和保质期。

本文件适用于基因工程技术制成的，作为化妆品原料使用的重组纤连蛋白。

本文件涉及到的质量控制体系为化妆品原料重组纤连蛋白成品检测。

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 分析实验室用水规格和试验方法

JJF 1070 定量包装商品净含量计量检验规则

QB/T 1685 化妆品产品包装外观要求

YY/T 1849-2022 重组胶原蛋白

《化妆品安全技术规范》

《中华人民共和国药典》

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

纤连蛋白 fibronectin

细胞外基质的高分子非胶原性黏附糖蛋白，承担机体细胞的黏附连接功能，具有由多个结构域组成的两条肽链，并具有一定的生物学功能。纤连蛋白的来源主要有两种，一种是生物提取，包括血浆提取、细胞培养提取；另一种是通过基因工程技术和重组纤连蛋白表达纯化。

3.2

重组纤连蛋白 recombinant fibronectin

采用重组DNA技术，对编码所需人源化纤连蛋白的基因进行遗传操作和（或）修饰，利用质粒或病毒载体将目的基因转染或转化进入适当的宿主细胞（细菌、酵母或其它真核细胞等）中，表达并翻译成纤连蛋白或类似纤连蛋白的多肽，经过提取和纯化等步骤制备而成。

3.3

形态分类 morphological classification

根据重组纤连蛋白的产品形态，可分为溶液、粉末等不同剂型。其中粉末类固体应为溶液剂型经冷冻或喷雾干燥等工艺制得。

4 质量控制

4.1 总体要求

重组纤连蛋白因氨基酸序列和表达体系的差异，与天然纤连蛋白相比，其氨基酸组成、分子量和结构会有所不同。可以是全长氨基酸序列的人源化纤连蛋白，也可以是由几种功能域组合而成的重组人源化纤连蛋白，或是与天然纤连蛋白氨基酸序列同源性较高的重组类人源化纤连蛋白，非全长氨基酸序列的应至少保持90%同源性。

4.2 质量要求

重组纤连蛋白、生产重组纤连蛋白所用原辅料及加工助剂均需符合《化妆品安全技术规范》等相关国家、行业标准及法律法规的规定。重组纤连蛋白生产工艺和过程控制应确保各类杂质已去除或降低至可接受水平。

4.3 感官指标

感官指标应符合表1的规定。

表1 感官指标

项目	指标	
	粉末	溶液
外观	白色至淡黄色粉末，无正常视力可见异物	无色至淡黄色透明液体 (低温储存时允许有少量絮状悬浮物)
气味	符合标示气味	

4.4 理化指标

理化指标应符合表2的规定。

表2 理化指标

项目		指标	
		粉末	溶液
鉴别	氨基酸序列	与人源化纤连蛋白氨基酸序列匹配度 $\geq 90\%$	
	蛋白质分子量	与标示分子量偏差 $\leq 5\%$	
pH		6.0~9.0	
溶解性		符合标示溶解特性	/
蛋白质浓度		符合标示值的 80%~120%	
蛋白质纯度		$\geq 80\%$	

4.5 微生物指标

微生物指标应符合表3的规定。

表3 微生物指标

项目	要求
菌落总数, CFU/g (或 CFU/mL)	≤ 10
霉菌和酵母菌总数, CFU/g (或 CFU/mL)	≤ 10
耐热大肠菌群, /g (或 mL)	不得检出
铜绿假单胞菌, /g (或 mL)	不得检出
金黄色葡萄球菌, /g (或 mL)	不得检出

4.6 安全性物质指标

安全性物质限量应符合表4的规定。

表4 安全性物质指标

项目	要求
铅，mg/kg	≤10
砷，mg/kg	≤2
镍，mg/kg	≤50
汞，mg/kg	≤1
镉，mg/kg	≤5
^a 甲醇，mg/kg	≤2000
^a 甲醇营养型酵母发酵来源重组纤连蛋白需测定甲醇含量。	

4.7 生物学活性

重组纤连蛋白的生物学活性是指以纤连蛋白生物学特性相关的属性为基础的生物学作用。纤连蛋白是皮肤真皮层细胞外基质的主要成分，主要生物学功能是为细胞提供黏附、连接和良好的微环境，如促进细胞黏附、增殖、迁移及组织修复等。

可进行测定的任意一个或多个生物学活性指标，重组纤连蛋白处理组与未经处理的对照组相比，表现出具有统计学意义的提升效果，可表明重组纤连蛋白具有生物学活性。

注：例如，可通过评价细胞-重组纤连蛋白相互作用来评价重组纤连蛋白的生物学活性。

4.8 毒理学试验

重组纤连蛋白作为化妆品原料应用在化妆品配方中，应按照《化妆品安全技术规范》规定的毒理学试验方法对其进行相应的试验，具体项目宜根据原料的用途及使用目的进行选择。建议进行急性经口毒性试验、皮肤和急性眼刺激试验、皮肤变态反应试验、皮肤光毒性和光变态反应试验、细菌回复突变试验、体外哺乳动物细胞染色体畸变试验、重复剂量经口毒性试验(28天)或亚慢性经口毒性试验(90天)。

4.9 净含量

应符合JJF 1070的规定。

4.10 包装外观

应符合QB/T 1685的规定。

5 试验方法

本文件所用试剂和水，在没有注明其他要求时，均指分析纯试剂和GB/T 6682规定的一级水。实验中所用标准溶液、制剂及制品，参引《中华人民共和国药典》2020版四部的，均按《中华人民共和国药典》2020版四部的规定制备。

5.1 感官指标

溶液样品解冻完全后，直接取样50mg混合均匀，粉末类固体样品称取50mg加水制成10mg/mL的待测溶液，将被测样品置于无色透明的容器内，在自然光下正常视力观察外观（色泽、性状，可见异物）和鉴别气味。

5.2 理化指标

5.2.1 鉴别

5.2.1.1 氨基酸序列

对目标蛋白的氨基酸序列进行全长测序和分析，测序结果在NCBI中进行BlastP比对。

5.2.1.2 蛋白质分子量

按照附录A规定的方法进行测定，重组纤连蛋白供试品分子量与标识分子量偏差 $\leq 5\%$ 。

注：对于易发生降解的纤连蛋白，在描述分子量时，应考虑降解产物在电泳图中的位置，可标示为范围值。

5.2.2 pH 值

按《化妆品安全技术规范》第四章1.1 pH 值中方法测试，溶液样品解冻完全后可采用直测法测定，粉末类固体样品称取50mg加水制成1mg/mL的待测溶液进行测定。

5.2.3 溶解性（粉末测定）

按《中华人民共和国药典》2020年版 四部 凡例 十五 规定的方法进行测定。

5.2.4 水分（粉末测定）

按《中华人民共和国药典》2020年版 四部 通则 0832 “水分测定法”规定的方法进行测定。

5.3 蛋白质浓度

按照附录B规定的方法进行测定。

5.4 蛋白质纯度

按照附录C规定的方法进行测定。

5.5 微生物指标

按《化妆品安全技术规范》规定的方法进行测定。

5.6 安全性物质指标

5.6.1 铅砷镍汞镉

按《化妆品安全技术规范》规定的方法进行测定。

5.6.2 甲醇

按《化妆品安全技术规范》规定的方法进行测定。

5.7 生物学活性测定

细胞增殖、分化、黏附和迁移生物学活性可参照YY/T 1849-2022 5.8中规定的方法进行测定，其他的生物学活性可参照相关标准规定方法进行。

5.8 毒理学试验

按《化妆品安全技术规范》规定的毒理学试验方法对其进行相应的试验。

6 检验规则

6.1 组批

以同一原料、同一生产线、同一班次生产的同一规格，具有同一性质质量的产品为一批。

6.2 出厂检验

6.2.1 本产品由生产厂的质量检验部门按本文件的规定进行检验，合格后方可出厂。生产厂应保证所有出厂的产品都符合本文件的要求。每批出厂的产品都应有合格标识。

6.2.2 出厂检验项目为：感官指标、理化指标（氨基酸序列鉴别除外）、菌落总数、霉菌及酵母菌总数。

6.3 型式检验

有下列情况之一应进行型式检验：

——新产品或老产品转厂生产的试制定型鉴定；

- 正式生产后，如结构、材料、工艺有较大改变，可能影响产品性能时；
- 正常生产时，对批量产品进行抽样检查，每年至少一次；
- 产品停产半年以上，恢复生产时；
- 出厂检验结果与上次型式检验有较大差异时；
- 国家质量监督检验机构提出进行型式检验要求时。

型式检验项目为本文件技术要求的全部项目。

6.4 抽样

样品应从包装完好的成品中随机抽取，净含量偏差按JJF 1070的规定执行，其他项目样品量应满足检验需求。

6.5 判定规则

检验项目全部符合本文件时，判定为合格。检验结果中如有一项指标（微生物指标除外）不符合本文件要求时，应在同批产品中重新抽取双倍样品，进行不合格项目的复检，复检结果符合要求时，作合格结论，如仍不合格，则判产品为不合格品。如微生物指标不合格，则判产品为不合格品，不再复检。

7 标签、包装、运输、贮存、保质期

7.1 标签

原料应有标签，内容宜包括，但不限于原料名称、生产商基本信息、原料规格、贮存条件、使用期限（生产日期和保质期或生产批号和限期使用日期），以及必要的安全或警示信息等内容。并能通过标签追溯到原料的基本信息（包括但不限于原料标准中文名称、INCI名称）、生产商名称、纯度或含量、生产批号或生产日期、保质期等中文标识。

7.2 包装

产品采用适宜要求包装，产品根据用户要求包装。实际净重应不低于标称质量，各种包装应封口严密不渗漏。包装外观要求应符合QB/T 1685的规定。

7.3 运输

作为蛋白制品，产品运输温度会影响产品稳定性，应选择合适的温度进行运输。建议溶液剂型运输环境为0℃~10℃，固体剂型可在常温下短时间运输，长时间运输应在0℃~10℃环境中。产品运输时应轻装、轻卸，按箱子图示标志堆放，不应倒置，避免剧烈震动、撞击、日晒雨淋，避免高温或冰冻，严禁在箱上踩踏和堆放重物。

7.4 贮存

作为蛋白制品，产品贮存温度会影响产品稳定性，应选择合适的温度进行贮存。建议溶液剂型贮存环境为-25℃~-15℃，固体剂型可在常温下短时间贮存，长时间贮存应在0℃~10℃冷库中。产品不得与易燃、易爆品混放。贮存时应距离地面至少20cm，距内墙至少50cm，中间应留有通道，按箱子图示标志堆放，且堆垛应采取必要的防护措施，堆垛高度应适当，避免损坏大包装，并严格执行先进先出原则。

7.5 保质期

在符合规定的运输和贮存条件下，产品在包装完整和未经启封的情况下，保质期按销售包装标注执行。

附 录 A
(规范性)
蛋白质分子量的测定

A.1 原理

SDS-PAGE法是一种变性的聚丙烯酰胺凝胶电泳方法。本法分离蛋白质的原理是根据多数蛋白质都能与阴离子表面活性剂十二烷基硫酸钠(SDS)按重量比结合成复合物,使蛋白质分子所带的负电荷远远超过天然蛋白质分子的净电荷消除了不同蛋白质分子的电荷效应,使蛋白质按分子大小分离。

本法用于蛋白质的定性鉴别、纯度和杂质控制以及定量测定。

A.2 主要仪器、设备

A.2.1 恒压或恒流电源。

A.2.2 垂直板电泳槽。

A.2.3 制胶模具。

A.3 试剂和材料

A.3.1 说明

除另有规定外,所有试剂均为分析纯,水为符合GB/T 6682中规定的一级水。

A.3.2 试剂

A.3.2.1 丙烯酰胺。

A.3.2.2 *N,N'*-亚甲基双丙稀酰胺。

A.3.2.3 三羟基甲基氨基甲烷。

A.3.2.4 盐酸。

A.3.2.5 十二烷基硫酸钠。

A.3.2.6 过硫酸铵。

A.3.2.7 甘氨酸。

A.3.2.8 β -巯基乙醇。

A.3.2.9 溴酚蓝。

A.3.2.10 甘油。

A.3.2.11 考马斯亮蓝 R-250。

A.3.2.12 甲醇。

A.3.2.13 冰醋酸。

A.3.2.14 四甲基乙二胺。

A.3.3 试剂配置

A.3.3.1 30%丙稀酰胺:称取丙稀酰胺 58.0 g, *N,N'*-亚甲基双丙稀酰胺 2.0 g,加适量水溶解,定容至 100 mL,滤纸过滤(避光 4℃保存)。

A.3.3.2 分离胶缓冲液(4x, 1.5 mol/L 三羟基甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液):称取三羟基甲基氨基甲烷 18.15 g,加适量水溶解,用盐酸调节 pH 值至 8.8,加水定容至 100 mL。

A.3.3.3 10%十二烷基硫酸钠溶液:称取十二烷基硫酸钠 10 g,加水溶解并定容至 100 mL。

A.3.3.4 四甲基乙二胺溶液:商品化试剂,低温保存。

10%过硫酸铵溶液:称取过硫酸铵 10 g,加水溶解并定容至 100 mL。建议现配现用或分装后置于-20℃环境下,则可贮存 2 周。

A.3.3.5 浓缩胶缓冲液(4x, 0.5mol/L 三羟基甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液): 称取三羟基甲基氨基甲烷 6.05 g, 加适量水溶解, 用盐酸调节 pH 值至 6.8, 加水定容至 100mL。

A.3.3.6 电泳缓冲液(10x): 称取三羟基甲基氨基甲烷 30 g, 甘氨酸 144 g, 十二烷基硫酸钠 10 g, 加水溶解并定容至 800mL, 用盐酸调节 pH 值至 8.1~8.8 之间, 加水定容至 1000mL。

A.3.3.7 非还原性供试品缓冲液(4x): 称取三羟基甲基氨基甲烷 3.03 g, 溴酚蓝 20 g, 十二烷基硫酸钠 8 g, 量取甘油 40mL, 加水溶解并定容至 80mL, 用盐酸调节 pH 值至 6.8, 加水定容至 100mL。

A.3.3.8 还原性供试品缓冲液(4x): 称取三羟基甲基氨基甲烷 3.03 g, 溴酚蓝 20 g, 十二烷基硫酸钠 8 mL, 量取甘油 40mL, 加水溶解并定容至 80mL, 加入 β -巯基乙醇 20mL, 用盐酸调节 pH 值至 6.8, 加水定容至 100mL。

A.3.3.9 分子量标准品溶液: 所选用的标准品的分子量范围须将待测样品的分子量包括在其中。

A.3.3.10 固定液: 称取三氯醋酸 5 g, 加水 200mL 溶解后, 加甲醇 200mL, 再加水定容至 500mL。

A.3.3.11 染色液: 称取考马斯亮蓝 R-250 1 g, 加入甲醇(或乙醇) 200mL 充分溶解, 混匀后加冰醋酸 50mL, 水 250mL, 混匀。

A.3.3.12 脱色液: 取甲醇(或乙醇) 200mL、冰醋酸 100mL 与水 700mL, 混匀。

A.3.3.13 保存液: 取冰醋酸 75mL, 加水至 1000mL, 摇匀。

A.4 凝胶制备

A.4.1 分离胶制备: 根据不同的分子量需要, 按表A.1制成分离胶溶液, 灌入模具内至一定高度, 加水封顶, 室温下聚合。

表A.1 分离胶溶液制备

分离胶体积	各种分离胶体积中应加入的溶液成分体积 (mL)				
	5	10	20	25	50
10%分离胶					
水	1.9	4.0	7.9	9.9	19.8
30%丙烯酰胺	1.70	3.30	6.70	8.30	16.70
分离胶缓冲液	1.25	2.50	5.00	6.30	12.50
10%十二烷基硫酸钠溶液	0.05	0.10	0.20	0.25	0.50
10%过硫酸铵溶液	0.05	0.10	0.20	0.25	0.50
四甲基乙二胺溶液	0.002	0.004	0.008	0.010	0.020
12%分离胶					
水	1.6	3.3	6.6	8.2	16.5
30%丙烯酰胺	2.00	4.00	8.00	10.00	20.00
分离胶缓冲液	1.25	2.50	5.00	6.30	12.50
10% 十二烷基硫酸钠溶液	0.05	0.10	0.20	0.25	0.50
10% 过硫酸铵溶液	0.05	0.10	0.20	0.25	0.50
四甲基乙二胺溶液	0.002	0.004	0.008	0.010	0.020
15%分离胶					
水	1.1	2.3	4.6	5.7	11.5
30%丙烯酰胺	2.50	5.00	10.00	12.50	25.00
分离胶缓冲液	1.25	2.50	5.00	6.30	12.50
10% 十二烷基硫酸钠溶液	0.05	0.10	0.20	0.25	0.50
10%过硫酸铵溶液	0.05	0.10	0.20	0.25	0.50
四甲基乙二胺溶液	0.002	0.004	0.008	0.010	0.020
注: 根据不同品种需求, 如需配制不同比例或不同体积的分离胶, 可参考此表进行适当调整。根据商品化试剂浓度、操作便利性需求, 可调整浓度及加入体积。					

A. 4. 2 浓缩胶制备：待分离胶溶液聚合后，用滤纸吸去上面的水层，再灌入按表A. 2配制的浓缩胶溶液，插入样品梳，注意避免气泡出现。

表A. 2 浓缩胶溶液制备

溶液成分	各种浓缩胶体积中应加入溶液成分体积（mL）	
	5	10
水	2. 9	5. 8
30%丙烯酰胺	0. 75	1. 50
浓缩胶缓冲液	1. 25	2. 50
10%十二烷基硫酸钠溶液	0. 05	0. 10
10%过硫酸铵溶液	0. 05	0. 10
四甲基乙二胺溶液	0. 005	0. 01
注：根据商品化试剂浓度、操作便利性的需求，可调整浓度及加入体积。		

A. 5 供试品溶液制备

将蛋白溶液与还原性供试品缓冲液（5x）按4：1体积比混匀，置水浴或100℃金属浴中加热10min，冷却至室温。标准品溶液同法操作。

A. 6 试验步骤与方法

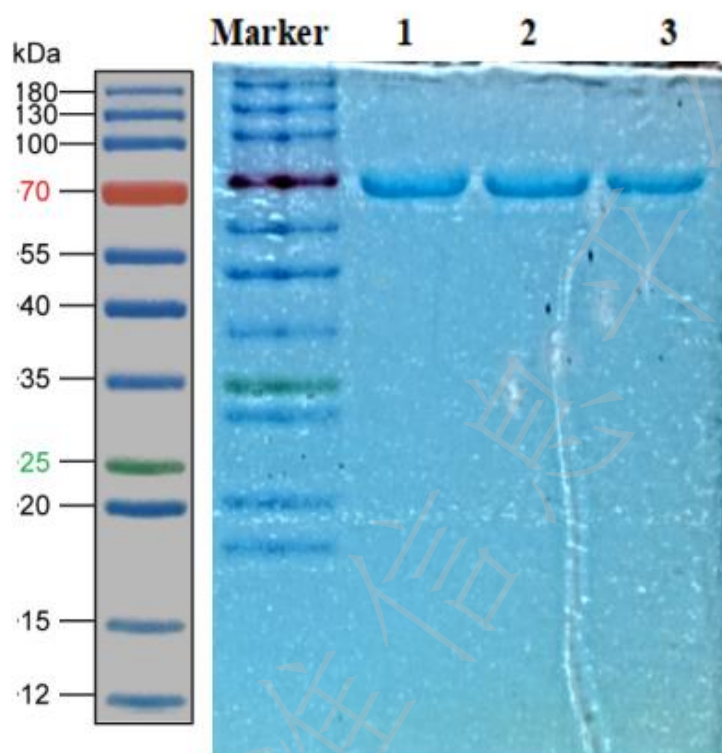
A. 6. 1 上样：待浓缩胶溶液聚合后，小心拔出样品梳，将电极缓冲液注满电泳槽。在加样孔中加入重组纤连蛋白供试品溶液与分子量标准品溶液不低于10 μg以上。

A. 6. 2 电泳：恒压电泳，初始浓缩胶电压为60V~80V，进入分离胶时调至120V~150V，当溴酚蓝迁移至胶最底部大约1 cm即可停止电泳。

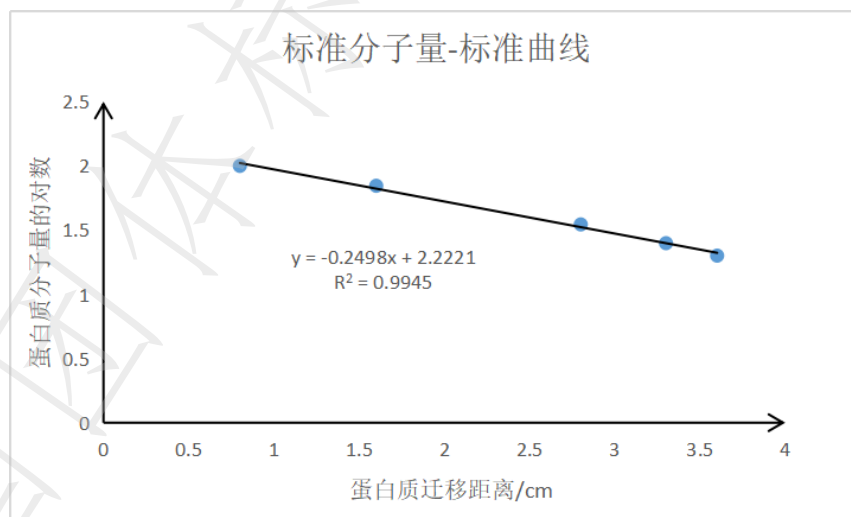
A. 6. 3 固定与染色（考马斯亮蓝染色法溶液）：取出电泳凝胶片，置固定液中60min，取出胶片置过量考马斯亮蓝染色液中1小时~2小时，弃去染色液。

A. 6. 4 脱色：取出胶片置过量脱色液中，根据需要多次更换脱色液，在摇床上脱色至凝胶背景透明后保存在保存液中

A. 6. 5 显影与结果判定：凝胶显色处理完毕后，示例见图A. 1，利用凝胶扫描系统对其进行拍照和分析。卡尺测量供试品蛋白和标准分子量（Marker）的迁移距离，每条谱带距分离胶顶部的距离为迁移距离。从标准分子量各条带相对分子量的对数为纵坐标，以其迁移距离为横坐标，按软件计算，线性回归，所得标准曲线回归常数 $R^2 \geq 0.95$ ，示例图见A. 2。将供试品蛋白迁移距离代入计算，由标准分子量的标准曲线求得供试品分子量，进而计算供试品蛋白分子量偏差。



图A. 1 SDS-PAGE 蛋白示例胶图



图A. 2 标准分子量标准曲线

如图A. 2所示，供试品蛋白分子量= $(-0.2498 \times 1.7) + 2.2221 \approx 62.75$ kDa，供试品蛋白分子量偏差= $(62.75 - 60) / 60 \times 100\% \approx 4.58\%$ 。

附 录 B
(规范性)
蛋白质浓度测定 (BCA 法)

B.1 原理

本法系依据蛋白质分子在碱性溶液中将 Cu^{2+} 还原为 Cu^+ ，2, 2'-联喹啉-4, 4'-二羧酸 (BCA) 与 Cu^+ 结合形成紫色复合物，在一定范围内其颜色深浅与蛋白质浓度呈正比，以蛋白质对照品溶液作标准曲线，采用比色法测定供试品中蛋白质的含量。

B.2 主要仪器、设备

- B.2.1 酶标仪。
- B.2.2 恒温培养箱。

B.3 试剂和材料

B.3.1 说明

除另有规定外，所有试剂均为分析纯，水为符合 GB/T 6682 中规定的一级水。

B.3.2 试剂

试剂盒型号：碧云天 (Beyotime) - P0010。

B.3.3 材料

96孔酶标板。

B.3.4 试剂配置

BCA工作液的配制：根据样品数量，按50体积BCA试剂A加1体积BCA试剂B (50:1) 配制适量BCA工作液，充分混匀。

B.4 样品处理

B.4.1 标准蛋白溶液的制备：取1.2 mL标准蛋白配制液加入到一管牛血清白蛋白 (30 mg) 中，充分溶解后配制成25 mg/mL的标准蛋白溶液。配制后可立即使用，也可以-20 °C长期保存。取适量25 mg/mL标准蛋白溶液，稀释至终浓度为0.5 mg/mL。

B.4.2 重组纤连蛋白溶液供试品制备：将供试品用水稀释至标准曲线的检测范围内。

B.5 试验步骤与方法

B.5.1 标准曲线的制作：取一块96孔酶标板，按下表B.1数据加入试剂。

表B.1 标准曲线制作

孔号	1	2	3	4	5	6	7	8
标准蛋白溶液 (μL)	0	1	2	4	8	12	16	20
水 (μL)	20	19	18	16	12	8	4	0
BCA 工作液 (μL)	200	200	200	200	200	200	200	200
蛋白浓度 (mg/mL)	0	0.025	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5

B.5.2 样品制备：将供试品用水稀释，取20 μL样品后，加入200 μL BCA工作液。

- B. 5.3 振荡混匀后，放置恒温培养箱37℃孵育30 min。
- B. 5.4 用酶标仪测定562 nm处的吸光值，以不含BCA的吸光值为空白对照。
- B. 5.5 以蛋白浓度（mg/mL）为横坐标，吸光值为纵坐标，绘制标准曲线。
- B. 5.6 根据测得的吸光值，在标准曲线上计算出样品的蛋白浓度。

附 录 C
(规范性)
蛋白质纯度测定(分子排阻色谱法)

C.1 原理

分子排阻色谱法是根据待测组分的分子大小进行分离的一种液相色谱技术。分子排阻色谱法的分离原理为凝胶色谱柱的分子筛机制。色谱柱多以亲水硅胶、凝胶或经过修饰的凝胶如葡聚糖凝胶和琼脂糖凝胶等为填充剂,这些填充剂表面分布着不同孔径尺寸的孔,药物分子进入色谱柱后,它们中的不同组分按其分子大小进入相应的孔内,大于所有孔径的分子不能进入填充剂颗粒内部,在色谱过程中不被保留,最早被流动相洗脱至柱外,表现为保留时间较短;小于所有孔径的分子能自由进入填充剂表面的所有孔径,在色谱柱中滞留时间较长,表现为保留时间较长;其余分子则按分子大小依次被洗脱。

C.2 主要仪器、设备

C.2.1 Agilent 1260 Infinity生物惰性四元液相色谱泵。

C.2.2 Agilent 1260 Infinity生物惰性高性能自动进样器。

C.2.3 Agilent 1200 Infinity系列恒温器。

C.2.4 包含生物惰性溶剂加热元件的Agilent 1260 Infinity柱温箱。

C.2.5 配备60mm最大光程高灵敏度流通池的Agilent 1260 Infinity二极管阵列检测器。

C.3 试剂和材料

C.3.1 说明

除另有规定外,所有试剂均为分析纯,水为符合GB/T 6682中规定的一级水。

C.3.2 试剂

C.3.2.1 氯化钠。

C.3.2.2 氨丁三醇。

C.3.3 材料及软件

C.3.3.1 凝胶色谱柱:应选用与供试品分子大小相适应的色谱柱填充剂,建议使用填充 $2.7\ \mu\text{m}$ 填料的安捷伦 AdvanceBio SEC 130Å, $7.8\times 300\text{mm}$ 色谱柱。

C.3.3.2 软件:Agilent ChemStation B.04.03(或更高版本)。

C.3.4 试剂配置

流动相的配制:按配方氯化钠0.9%和氨丁三醇0.36%配置流动相,调整流动相pH至8.0。

C.4 样品处理

C.4.1 重组纤连蛋白供试品制备:供试品溶解完全后,用 $0.22\ \mu\text{m}$ 滤膜过滤,备用进样。

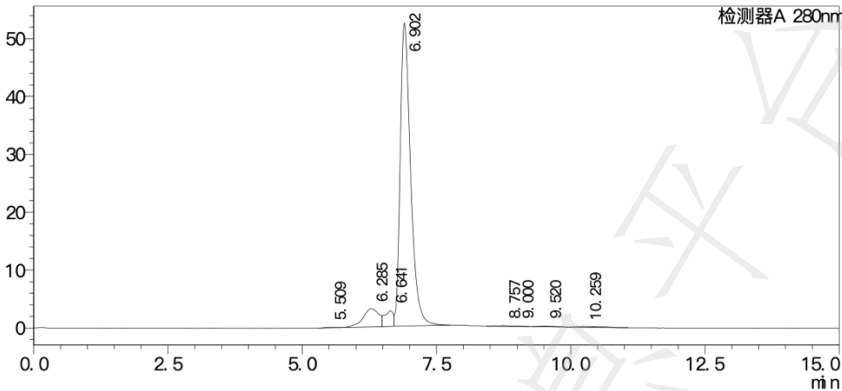
C.4.2 样品进样:采用Agilent 1260 Infinity生物惰性高性能自动进样器进样。

C.5 试验步骤与方法

C.5.1 取重组纤连蛋白供试品 $10\ \mu\text{L}$ 进样,测试波长为280nm,流速: $1\text{mL}/\text{min}$,记录色谱图。

C.5.2 测量各峰的面积和色谱图上除溶剂峰以外的总色谱峰面积,计算各峰面积占总峰面积的百分率,示意图见图C.1、图C.2。

<色谱图>
nV



图C.1 液相图谱

<峰表>

检测器A 280nm						
峰号	保留时间	面积	高度	标记	化合物名	面积%
1	5.509	1058	83			0.130
2	6.285	64661	3122	V		7.922
3	6.641	30620	2729	V		3.752
4	6.902	708801	52365	V		86.844
5	8.757	2594	126			0.318
6	9.000	1071	85	V		0.131
7	9.520	2569	112			0.315
8	10.259	4805	160			0.589
总计		816178	58782			100.000

图C.2 峰面积结果

C.6 结果判定

根据图2液相色谱图和图3峰面积结果，结合目标蛋白的SDS-PAGE电泳图谱，峰面积最大和峰高最高的即为目标蛋白的色谱峰，其面积占比即为目标蛋白纯度。