

ICS 71.100.70

CCS Y 42

团 体 标 准

T/ZGKSL 015-2023

重组胶原蛋白透皮吸收测定方法

Test method for absorption of recombinant collagen
through the skin

2023-09-22 发布

2023-09-22 实施

中 国 抗 衰 老 促 进 会 发 布

目 次

前 言	II
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 定性定量方法	1
4.1 基本要求	1
4.2 定性方法——荧光标记法	1
4.3 定量方法——扩散池法	4
5 试验报告	6
参 考 文 献	7

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。

本文件由中国抗衰老促进会提出并归口。

本文件起草单位：西安巨子生物基因技术股份有限公司、西北大学、中国科学院过程工程研究所、陕西慧康生物科技有限责任公司、江苏江山聚源生物技术有限公司、江苏创健医疗科技股份有限公司、陕西省药品技术审评中心。

本文件主要起草人：范代娣、史静静、段志广、张贵锋、张若冰、李元、徐丽明（原单位：中国食品药品检定研究院）、范婷、李佳佳、严建亚、贾利平、刘彦楠、高建萍、罗琳娜。

重组胶原蛋白透皮吸收测定方法

1 范围

本文件提供了化妆品领域用重组胶原蛋白原料透皮吸收的定性和定量分析方法。
本文件适用于定性或定量评价化妆品领域用重组胶原蛋白原料透皮吸收的能力。

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 27818 化学品 皮肤吸收 体外试验方法

YY/T 1849 重组胶原蛋白

《中华人民共和国药典》

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

重组胶原蛋白 recombinant collagen

采用重组DNA技术，对编码所需人胶原蛋白质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带入适当的宿主细胞（细菌、酵母或其他真核细胞等）中，表达并翻译成胶原蛋白或类似胶原蛋白的多肽，经过提取和纯化等步骤制备而成。

[来源：YY/T 1849, 3.2]

4 定性定量方法

4.1 基本要求

本文件给出了用于重组胶原蛋白透皮吸收的定性分析方法和相对定量分析方法。宜先进行定性分析，其结果为有透皮吸收的情况时再进行定量分析；若定性分析结果没有透皮吸收则没有必要进行定量分析。

4.2 定性方法——荧光标记法

4.2.1 原理

异硫氰酸荧光素（Fluorescein isothiocyanate, FITC）被广泛用于在蛋白质氨基上附加荧光标签。当FITC在碱性溶液中与蛋白质反应时，异硫氰酸酯基团与蛋白游离的伯氨基反应，形成FITC-蛋白质结合物，在荧光灯源紫外线或蓝紫光激发下产生黄绿色荧光，发射波长为 525 nm，激发波长为 495 nm，通过在荧光显微镜下观察对相应蛋白进行定性、定位分析。本文件依据FITC标记蛋白的原理对重组胶原蛋白进行标记，以评价重组胶原蛋白的透皮吸收特性。

4.2.2 试剂、材料、仪器和设备

所用试剂均为分析纯。

a) 试剂和材料如下：

- 1) FITC；
- 2) 碳酸钠；
- 3) 碳酸氢钠；
- 4) 二甲基亚砜 (DMSO)；
- 5) 氯化铵 (NH₄Cl)；
- 6) 市售脱毛膏；
- 7) 试验动物：白化豚鼠或 SD 大鼠，雌雄不限，周龄为 8 周，体重 250 g~300 g。

注：若选择其他皮肤模型如组织工程3D皮肤等需自行验证。

b) 仪器和设备如下：

- 1) 分析天平，感量 0.0001 g；
- 2) 凝胶色谱分离柱；
注：根据重组胶原蛋白的分子量大小选择合适孔径填料的色谱柱。
- 3) 蛋白纯化系统；
- 4) 宠物电推剪；
- 5) 冷冻切片机；
- 6) 荧光倒置显微镜。

4.2.3 重组胶原蛋白-FITC 标记物的制备

4.2.3.1 溶液配制

溶液配制如下：

- a) 碳酸钠缓冲液 (0.1 M, pH 9.0)：称取 0.106 g 无水碳酸钠、0.756 g 碳酸氢钠加水溶解，调 pH 至 9.0，定容至 100 mL 备用 (现配现用)；
- b) FITC 溶液：溶解 FITC 于无水 DMSO 中，配制成 1 mg/mL 的溶液，体积为 1.5 mL；
- c) NH₄Cl 溶液 (1 M)：称取 0.535 g NH₄Cl 加 0.1 M 碳酸钠缓冲液 (pH 9.0) 溶解，定容至 10 mL。

4.2.3.2 试验步骤

具体试验操作可同时参考所使用的 FITC 使用说明书 (如索莱宝的 FITC)，主要步骤如下：

- a) 用碳酸钠缓冲液 (0.1 M, pH 9.0) 配制重组胶原蛋白溶液，浓度≥2 mg/mL，体积为 20 mL；
- b) 按 1 mL 重组胶原蛋白溶液加入 50 μL FITC 溶液的比例，将 FITC 少量多次 (每次 5 μL) 加入至重组胶原蛋白溶液中，边加边轻轻搅拌；
注 1：按照重组胶原蛋白的氨基酸序列，FITC 与重组胶原蛋白中伯氨基的摩尔比需>1.0，FITC 需过量。
注 2：反应体系 (20 mL) 可根据实际需要进行调整，调整后加入的 FITC、NH₄Cl 也按相同比例进行调整。
- c) 待所需 FITC 加入完毕，将反应液于 4 °C 避光孵育 8 h；
- d) 取 1.1 mL 的 NH₄Cl 溶液 (1 M) 加至 c) 反应液中，轻轻摇晃均匀，使 NH₄Cl 终浓度至 50 mM，4 °C 终止反应 2 h；
- e) 选择填料孔径大小合适的凝胶过滤色谱柱对上述标记物进行层析分离，用 5 个~10 个柱体积的 PBS (10 mM, pH 7.0) 平衡凝胶色谱柱后，将以上反应混合物从柱顶注入，打开凝胶柱，待其全部流入柱床后，加入 PBS 缓冲液 (10 mM, pH 7.0) (根据不同重组胶原蛋白的分子量选择适宜的色谱分离条件，参考的色谱分离条件：凝胶色谱柱的填料采用 G-25，柱子径高分别为 1.6 cm×60 cm，流速为 8 mL/min)，同时用紫外检测器检测吸收峰；
- f) 通过凝胶过滤色谱的分离，根据保留时间的差异确定荧光标记重组胶原蛋白及未标记的 FITC。建议在正式上样分离之前设置对照以确定重组胶原蛋白及 FITC 的保留时间。回收保留时间短

的重组胶原蛋白-FITC 标记物（可能含有未被标记的重组胶原蛋白），分离色谱图见图 1，其中 a 色谱峰对应重组胶原蛋白-FITC 标记物、b 色谱峰对应 FITC；a, b 之间的色谱峰对应碳酸盐缓冲液。

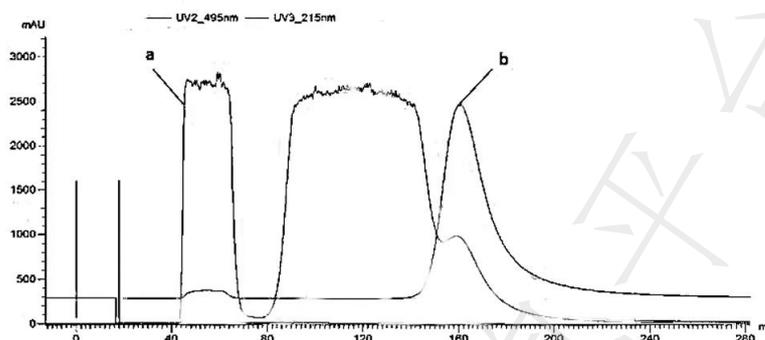


图 1 重组胶原蛋白-FITC 分离色谱图

g) 将回收的重组胶原蛋白-FITC 标记物于 4 °C 避光储存，用于后续试验。

注：推荐现制备现用。

4.2.3.3 标记效果评价

可采用以下2种评价方法：

a) 通过测定重组胶原蛋白-FITC 标记物在 495 nm 和重组胶原蛋白的特征吸收波长（例如 280 nm）处的吸光值来计算标记物中荧光素和重组胶原蛋白的比值(F/P)，F/P 应位于 0.3~1.0。若 F/P 值在此范围之外则标记失败，应重新进行标记。摩尔比 F/P 按式（1）计算。

$$F/P = \frac{A_{495} \times C}{A_x - 0.35 \times A_{495}} \dots \dots \dots (1)$$

式中：

F/P —— 荧光素和重组胶原蛋白的比值，摩尔比；

C —— $C = \frac{MW \times E_{0.1\%}}{389 \times 195}$ ，是重组胶原蛋白给定的常数；

MW —— 重组胶原蛋白的分子量，道尔顿（Da）；

389 —— FITC 的分子量，道尔顿（Da）；

195 —— 1.0 mg/mL FITC 在 495 nm 处的吸收值；

$0.35 \times A_{495}$ —— 校正系数；

$E_{0.1\%}$ —— 1.0 mg/mL 重组胶原蛋白在特征吸收波长 x 处的吸收；

A_x —— 重组胶原蛋白-FITC 标记物在重组胶原蛋白特征吸收波长 x 处的吸收值；

A_{495} —— 重组胶原蛋白-FITC 标记物在 495 nm 下的吸收值。

b) 根据回收的重组胶原蛋白-FITC 标记物与 FITC 的分离色谱图确定蛋白是否标记成功(见图 1)。

判定标记成功的标准为：

1) 纯化后重组胶原蛋白-FITC 凝胶色谱分析时，应是单一峰，无游离的 FITC 峰；

2) 纯化后重组胶原蛋白-FITC 标记物应在 495nm 处有吸收峰。

注：分离纯化过程宜尽可能避光以防 FITC 淬灭。

4.2.4 透皮吸收动物试验

试验步骤如下：

a) 试验动物准备：豚鼠或大鼠，每个时间点实验动物数不少于 3 只，麻醉后，背部备皮，具体操作过程为：采用宠物电推剪将动物背部毛发推掉，再涂抹脱毛膏，至动物背部毛发脱落后擦掉

脱毛膏，注意脱毛膏与动物皮肤反应时间不宜过长，时间过长会引起动物背部皮肤发红；

- b) 样品贴敷：取新鲜分离的 FITC 标记后重组胶原蛋白，重组胶原蛋白-FITC 标记物在重组胶原蛋白的特征吸收波长处的吸光度值应在 0.2~1.4 范围内，采用无纺布充分浸润重组胶原蛋白-FITC 溶液后敷于麻醉后的试验鼠的备皮部位，用黑色胶带充分固定，并进行避光保护，单笼饲养；

取材和观察：在不同的时间点（如 0 h、0.5 h、1h、2 h、4 h、6 h、8 h，可根据实际需要进行调整，定性研究如适用可延长至 8 h）处死动物，取重组胶原蛋白-FITC 标记物贴敷部位全层皮肤并立即进行冷冻切片的制备。冷冻切片切取方向从皮下组织向表皮层纵向切割，每个样品的切片数不少于 3 张），并注意每次制片时清理切刀，防止样品之间因切刀制样出现荧光污染。将冷冻切片置于荧光显微镜下进行观察。设置激发波长为 495 nm、发射波长为 525 nm，对重组胶原蛋白-FITC 标记物进行定位分析。

- d) 结果判定：根据 3 张切片观察到的重组胶原蛋白-FITC 标记物所在位置定性评价透皮吸收的能力。若荧光仅在皮肤角质层及其表面，则判定为不可吸收；若荧光进入皮肤角质层以下，则判定可透皮吸收。

4.3 定量方法——扩散池法

4.3.1 试验原理

化学品皮肤吸收体外试验方法是模拟受试物在皮肤中的分布和吸收。通过添加供给液和收集接收液，分别模拟涂抹供试品后皮上及皮下组织对供试品的吸收状态，考察供试品不同时间点渗透进入皮肤的情况。由于试验的待测供试品为重组胶原蛋白，而猪皮本身含有胶原蛋白，在经过不同时间点测试后，接收液中可能会含有猪皮来源胶原蛋白，需设置空白对照，如生理盐水。利用 Franz 扩散池渗透实验收集猪皮表面、皮肤内部和接收液中的供试品样品，并以 HPLC 或依据《中华人民共和国药典》四部通则 0731 蛋白质含量测定法 进行检测，确定重组胶原蛋白渗入猪皮各层的含量和透皮吸收率。

4.3.2 材料和仪器装置

材料和仪器装置如下：

- a) 生理盐水：用于溶剂对照；
- b) 供试品：重组胶原蛋白；
- c) Franz 扩散池：包括供给池和接收池；
- d) HPLC 色谱仪；
- e) 恒温磁力搅拌水浴锅。

4.3.3 猪皮准备和溶液配制

猪皮准备和溶液配制如下：

- a) 猪皮准备：取新鲜猪皮（24 h 以内离体猪皮），用宠物电推剪刀剪去腹部或背部皮肤毛发，剥离去毛部位皮肤，去除皮下脂肪组织后用生理盐水冲洗干净（处理后的猪皮厚度约为 0.8 mm ~1.0 mm），置于生理盐水中浸泡约 30 min，取出，用滤纸吸干，备用。

- b) 供试品溶液配制：采用生理盐水将重组胶原蛋白配制成 10 mg/mL 的溶液。

注：可根据供试品重组胶原蛋白的特性配制不同的浓度，10 mg/mL 仅为参考浓度。

4.3.4 测试方法

4.3.4.1 装置准备

将配套的磁子放置于接收池内，并将猪皮固定于供给池和接收池之间，固定后在接收池中加满生理

盐水，排尽空气，使猪皮的底面与接收液紧密接触。如有条件，可用经皮水分流失测量的探头检测每块猪皮的经皮失水值（TEWL），确认猪皮屏障功能无异常。

4.3.4.2 供试品皮肤接触

为了去除猪皮本身的胶原蛋白带来的误差，设置溶剂对照组，用生理盐水代替供试品样品。将供试品均匀加至猪皮表面。每组样品（包括供试品组和溶剂对照组）设3组平行样，放置于（32±1）℃恒温水浴槽内，环境中的相对湿度保持在30%~70%之间，并于300 r/min震摇条件下匀速连续搅拌。扩散不同的时间点进行样品采样，如0 h、0.5 h、2 h、4 h、6 h、8 h、12 h、24 h，作为参考时间点，最长采样时间宜不超过24 h。

取样可按下面两种方式，包括单个时间点取样和多个时间点取样，取样位置为皮上、皮中、皮下：

a) 单个时间点取样，按如下步骤：

- 1) 皮上部分采样：收取上层供给液（猪皮之上供给池内液体）；并用1 mL生理盐水洗涤3次回收每次洗涤液（含猪皮表面及供给池内侧的残留样品），均收集于离心管中。再用角质层取样胶带剥离2次皮肤表面角质层，并将胶带置于上述生理盐水中，浸泡24小时。最后获取皮上回收液（宜采用不破坏重组胶原蛋白的浸提条件，如4℃）。
- 2) 皮中采样：用手术剪将皮肤剪碎至米粒大小或匀浆，在4℃条件下，置于3 mL生理盐水中浸提24小时。浸提完成后10000 rpm，离心10 min，得到的上清液为“皮中萃取液”。宜采用不破坏重组胶原蛋白的浸提条件，且回收率满足80%~120%。
- 3) 皮下部分采样：先回收下层接收液，并用1 mL生理盐水分3次冲洗接收池内侧的残留样品，与下层接收液混合，获得“皮下接收液”。

b) 多个时间点取样：若设计为在一定时间内（如24 h）的多个时间点连续取样时，则在期间的每个时间点进行皮下部分取样（回收下层接收液）后，用相同体积的生理盐水补齐（在接收池中加满生理盐水）。选不同的时间点连续皮下部分取样，进行动力学研究，给出吸收曲线，在最后的取样点增加皮上部分和皮中采样，计算物料平衡（皮上和皮中采样步骤如a）所述）；此时的总透皮吸收量为各个时间点透皮量（下层接收液中重组胶原蛋白含量）的总和，再结合终点采样“皮上回收液”和“皮中萃取液”的供试品测定结果，计算终点试验周期的透皮吸收率。

4.3.4.3 重组胶原蛋白含量检测

采用以下一种或两种方法进行样品中重组胶原蛋白含量检测，建议首选HPLC方法。

- a) HPLC方法：用系列浓度的供试品作为对照品用于定量检测。精密称（量）取对照品，配制一系列浓度的对照品溶液；分别精密取一定量的系列浓度对照品溶液和各试验组供试品回收液，进样，记录色谱图，测量对照品溶液和试验组供试品回收液中待测物质（重组胶原蛋白）的峰面积，用面积归一化法测定各测试样品中重组胶原蛋白相对含量，并对检测限、定量限、重复性、精密度进行考察。
- b) 参考《中华人民共和国药典》2020版四部通则0731蛋白质含量测定法中适宜的方法进行重组胶原蛋白含量的测定，同时进行检测限、定量限、重复性、精密度的考察。

4.3.5 数据分析和计算

a) 分别对比每个时间点的样品组与溶剂对照组的“皮中萃取液”和“皮下接收液”中重组胶原蛋白含量，根据统计学分析结果进行如下判定和计算：

- 1) 若“皮中萃取液”和“皮下接收液”中测定结果与溶剂对照组相比均无统计学差异，则表明供试品完全不可吸收；
- 2) 若仅“皮中萃取液”中测定结果显示有统计学差异，则表明供试品能够被皮肤吸收，但没有渗透到皮肤下层；其被吸收进入皮中部分重组胶原蛋白含量需去除溶剂对照组的检测数据（猪

皮本身的胶原蛋白可能降解并被浸提到萃取液中的胶原蛋白含量)，计算皮内吸收量；

- 3) 若“皮下接收液”中测定结果有统计学差异（无论“皮中萃取液”中测定结果是否有统计学差异），表明供试品能够被皮肤吸收，并渗透到皮肤下层；其被渗透于皮肤下层的重组胶原蛋白含量需去除溶剂对照组的检测数据（猪皮本身的胶原蛋白可能降解并渗透到皮肤模型下层的胶原蛋白含量），计算皮肤透过量；
- 4) 皮内吸收量和皮肤透过量合计为重组胶原蛋白吸收及透过的总量，计算各个时间点的透皮吸收数据，包括：透皮吸收量（或百分率）、透皮吸收趋势分析，并给出物料平衡。透皮吸收量按式（2）计算。

$$Q_n = \frac{C_n V_n + \sum C_i \times V_i (i=1 \dots n-1)}{A} \dots \dots \dots (2)$$

Q_n ——单位面积累计经皮渗透量， $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ；

A ——渗透面积， cm^2 ；

C_n ——取样的重组胶原蛋白浓度， $\mu\text{g}/\text{mL}$ ；

V_n ——接收液体积， mL ；

V_i ——取样体积， mL ；

C_i —— n （取样时间点）取样点之前的重组胶原蛋白浓度测定值， $\mu\text{g}/\text{mL}$ ；

注： C_n ， C_i 均为已减掉溶剂对照组的重组胶原蛋白含量。

- b) 透皮吸收趋势分析：以不同透皮时间为横坐标，以不同透皮时间点的累计透皮吸收量为纵坐标，绘制曲线图，获得经时透皮吸收趋势图。
- c) 物料平衡分析：每个取样时间点重组胶原蛋白物料平衡的计算方法按式（3）计算，物料平衡宜满足（ 100 ± 10 ）%。

$$B = \frac{(m_u + m_i + m_d)}{m_l} \times 100\% \dots \dots \dots (3)$$

式中：

B ——物料平衡值，%；

m_u ——皮上部分重组胶原蛋白含量， μg ；

m_i ——皮内吸收量（皮中部分重组胶原蛋白含量）， μg ；

m_d ——皮肤透过量（皮下部分重组胶原蛋白含量）， μg ；

m_l ——重组胶原蛋白负载量（最初添加量）， μg 。

5 试验报告

试验报告应包括以下内容：

- a) 供试品信息；
- b) 试剂、材料、仪器和设备（含试验动物）；
- c) 试验步骤及结果；
- d) 结果分析及判定。

参 考 文 献

- [1] 刘楚怡,隋海松,车帅,等.海蜇、牛骨和鳕鱼皮胶原肽的透皮吸收性能研究[J].日用化学工业, 2017, 47(3):5.
 - [2] 闫森,樊君,谭春雷.脂质体包裹胶原蛋白的制备及其透皮性能[J].精细化工, 2012, 29(6):4.
 - [3] 舒成仁,葛苗苗,黄露,等.复方利多卡因乳膏体外透皮吸收实验[J].医药导报, 2011, 30(8):3.
-

全国团体标准信息平台