

最终研究报告： JS2-25031（4-3）

天然胶原蛋白原液测试方法研究

（体外降解测试方法研究）

报告日期

2026 年 1 月 24 日

研究试验室

山东省医疗器械和药品包装检验研究院
山东省济南市高新区世纪大道15166号 邮编：250101



委托方

重庆芳禾生物科技有限公司
重庆市高新区金凤镇高新大道 28 号重庆国家生物医药产业基地标准厂房 1
期 4 号楼 1-3 层 邮编：400050

目 录

一. 研究目的.....	3
二. 产品概述.....	3
三. 研究方法.....	4
3.1 降解试验.....	5
3.2 重量损失.....	6
3.3 外观形貌.....	6
3.4 降解产物.....	6
3.5 凝胶电泳 (SDS) 光密度值变化.....	7
3.6 特征圆二色光谱(CD)值变化.....	8
四. 测试结果.....	8
4.1 重量损失.....	8
4.2 外观形貌.....	9
4.3 降解产物.....	11
4.4 凝胶电泳 (SDS) 光密度值变化.....	13
4.5 特征圆二色光谱(CD)值变化.....	14
五. 结论.....	14
参考文献.....	16

一. 研究目的

本研究目的在于建立“天然胶原蛋白原液”产品的体外降解方法，并对产品的降解过程进行表征，以考察其体外降解性能，为“天然胶原蛋白原液”的质量控制提供参考。同时，采用相同的方法对委托方提供的胶原蛋白对照产品开展体外降解研究。

本研究的测试周期为 2025 年 10 月 27 日至 2026 年 1 月 16 日。

二. 产品概述

由产品技术要求中的信息可知，“天然胶原蛋白原液”产品是由 SPF 荣昌猪猪皮纯化而成的 I 型胶原蛋白经过滤除菌及无菌操作方式分散于磷酸盐缓冲溶液中并填充于玻璃材质无菌注射针筒中制成，内含 27G 无菌注射针 1 支，该产品与配件均无菌状态提供，仅供一次性使用。产品信息如下：

产品名称：天然胶原蛋白原液；

规格：0.6mL/支 • 1 支/盒；型号：NCL0106；

批号：20240801。

样品照片见图 1。

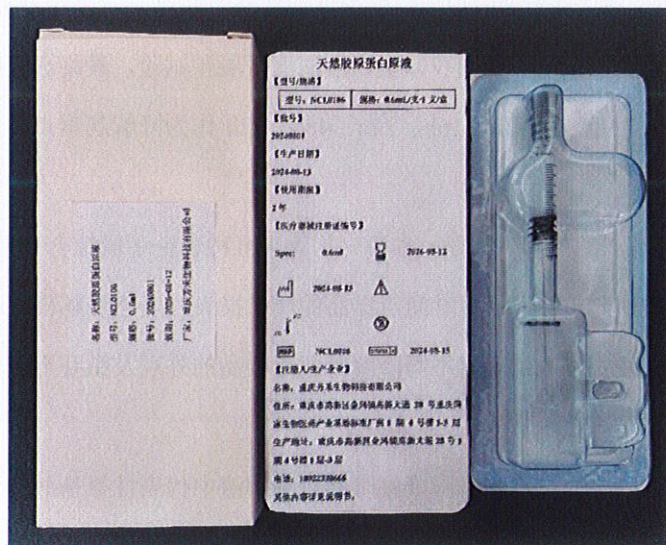


图 1 天然胶原蛋白原液照片

胶原蛋白对照产品由委托方提供，样品照片见图 2。

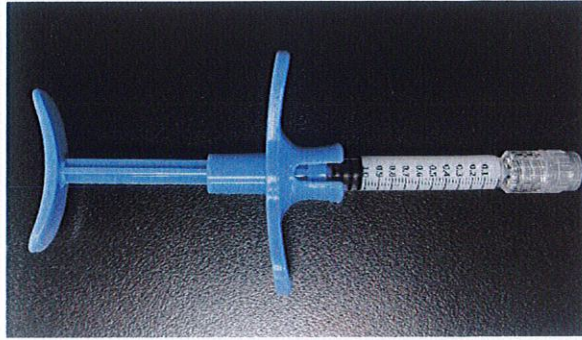


图2 胶原蛋白对照样品

三. 研究方法

经文献查询,胶原蛋白在体内的降解是通过基质金属蛋白酶(MMPs)特异性将三螺旋结构局部解旋,并发生肽键断裂^[1],经过其他多种蛋白酶的进一步降解后,最终生成可被细胞吸收利用的小分子肽段及氨基酸。本研究据此构建酶解法的体外降解模型,在开展天然胶原蛋白原液产品体外降解研究时,选择影响胶原蛋白降解过程的主要蛋白酶——胶原蛋白酶溶液作为降解基质,通过提高酶的浓度开展加速降解,采用多种分析方法表征不同时间点的样品降解情况,为评估其降解过程提供理论依据。

根据实验周期筛选适宜的胶原蛋白酶浓度和降解时间点,通过对 0.5IU/mL、1IU/mL、1.5IU/mL、2IU/mL、5IU/mL 不同胶原蛋白酶浓度开展预试验,最终选取胶原蛋白酶浓度为 1IU/mL,并选择 0.5h、4h、8h、16h、24h、48h、72h 作为降解观察点,以涵盖降解的前、中、后不同周期。

为多维度表征产品的降解过程,本研究构建了五种表征手段综合分析其降解行为:

- 1) 通过重量法测定不同降解时间点样品的质量损失,表征降解程度;
- 2) 通过目视及扫描电镜观察不同降解时间点样品的外观及微观形貌变化,表征结构变化;

- 3) 通过氨基酸分析仪测定不同降解时间点降解液中代表性氨基酸的含量变化,表征降解产物的变化:胶原蛋白在降解过程中肽链发生断裂,生成不同分子量的多肽片段及少量游离氨基酸。由于多肽片段组成复杂,无法直接对其进行定量表征,故研究采用强酸水解法将这些肽段彻底水解为游离氨基酸,对最终氨基酸进行定量以表征降解产物的情况。降解液经强酸水解的最终氨基酸包括天冬氨酸、苏氨酸、丝氨酸、谷氨酸、甘氨酸、丙氨酸、胱氨酸、缬氨酸、蛋氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸、赖氨酸、组氨酸、精氨酸、脯氨酸、羟脯氨酸,共 18 种氨基酸。其中羟脯氨酸是胶原蛋白特有的氨基酸,其含量稳定且几乎仅来源于胶原,因此以其作为特征标识物,通过氨基酸分析仪测定降解液中羟脯氨酸的含

量反映胶原蛋白主链的降解程度，分析体外降解趋势；

4) 通过聚丙烯酰胺凝胶电泳法 (SDS-PAGE) 测定不同降解时间点样品胶原蛋白特征 α 链条带光密度值的变化，表征降解程度：胶原蛋白降解过程中三螺旋结构发生解旋，大分子胶原蛋白持续断裂，导致特征 α 链 ($\alpha 1$ 和 $\alpha 2$) 条带对应的大分子物质含量逐渐减少，其光密度值也随之降低。通过 SDS-PAGE 测定未降解残留物 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 条带的光密度值变化，表征产品中未降解的大分子胶原蛋白的剩余含量，进而表征降解程度；

5) 通过圆二色光谱法 (CD) 测定不同降解时间点样品在胶原蛋白特征波长 221 nm 处 CD 吸收值的变化，表征降解程度：CD 对蛋白质的手性构象具有特异性响应，能有效反映蛋白质二级结构的含量与变化，由于胶原蛋白在降解过程中三螺旋结构发生解旋，二级结构可能受损，因此通过 CD 测定未降解残留物在 221nm 处的吸收值变化，可表征胶原蛋白二级结构的变化，进而表征降解程度。

3.1 降解试验

3.1.1 仪器和试剂

数字控温水浴锅 (英国 Stuart)；

胶原蛋白酶 (来源: Sigma, 批号: SLCM7881, 效价: 240IU/mg, 有效期至 2028 年 3 月)，氯化钙 (分析纯)，二水合磷酸二氢钠 (分析纯)，氢氧化钠 (分析纯)。

3.1.2 溶液配制

(1) 1IU/mL 胶原蛋白酶溶液: 称取胶原蛋白酶 20.83mg, 加胶原酶消化液稀释至 25mL, 得 200IU/mL 胶原酶贮备液, 取胶原酶贮备液 0.5mL 加胶原酶消化液稀释至 100mL, 得 1IU/mL 胶原蛋白酶溶液。临用现配。

(2) 氯化钙溶液: 称取氯化钙 1.1210g, 加水定容至 100mL。

(3) 胶原酶消化液: 称取二水合磷酸二氢钠 3.1210g、氯化钙溶液 1mL, 溶于约 800mL 纯水中, 以氢氧化钠溶液 (2mol/L) 调节 pH 至 7.398, 定容至 1L。

(4) 氢氧化钠溶液 (2mol/L): 称取氢氧化钠 4.0010g, 加水至 50mL。

3.1.3 试验方法

称取样品及对照样品 0.3g 至离心管, 精密称重。分别加 1IU/mL 胶原蛋白酶溶液稀释至 5mL, 轻轻混匀, 置于 37℃ 恒温水浴锅中进行降解试验。分别在 0.5h、4h、8h、16h、24h、48h、72h 时取出, 每个降解时间点平行制样三份。将各降解时间点的样品及对照样品在 4℃, 15000rpm 离心 10min。上清液部分用于“降解产物”项目, 沉淀的残留物部分用于“重量损失”、“外观形貌”、“凝胶电泳 (SDS) 光密度值变化”、“特征圆二色光谱 (CD) 值变化”

项目。

3.2 重量损失

3.2.1 仪器

电子天平（瑞士梅特勒）。

3.2.2 试验方法

将 3.1.3 项下每个降解时间点的上清液弃去，加水至 5mL 清洗未降解残留物部分，4℃ 15000rpm 离心 10min 后弃去上清液，将沉淀部分冻干。同时，另称取样品及对照样品各 0.3g 加水至 5mL，混匀后在 4℃，15000rpm 离心 10min，弃去上清液后冻干，作为未降解的 0 点。

精密称重冻干的未降解残留物，按式（1）计算不同降解时间点重量损失（%）。

$$\text{重量损失} = 1 - \frac{\text{各降解时间点样品未降解残留物冻干的重量}}{\text{0 点样品冻干的重量}} \times 100\% \dots\dots\dots (1)$$

3.3 外观形貌

3.3.1 仪器

扫描电镜（德国卡尔蔡司）。

3.3.2 试验方法

取 3.1.3 项下离心处理后的沉淀部分，目视观察不同降解时间点样品的外观变化。取 3.2.2 项下冻干后的未降解残留物，经扫描电镜观察不同降解时间点样品的微观形貌变化。

3.4 降解产物

3.4.1 仪器和试剂

氨基酸分析仪（日立），旋转蒸发仪（德国 IKA），烘箱（德国 Binder）；

盐酸（优级纯），羟脯氨酸标准品（来源：Sigma，批号：BCBL2526V，纯度：100%，有效期至 2027.9.19），氨基酸混合标液（来源：中国计量科学研究院，包括：天冬氨酸、苏氨酸、丝氨酸、谷氨酸、甘氨酸、丙氨酸、胱氨酸、缬氨酸、甲硫氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸、赖氨酸、组氨酸、精氨酸、脯氨酸，标准物质编号：GBW (E) 100062，批次编号：24001，浓度：1.0mmol/L，定值日期：2024.7.22，有效期至 2027.7.21）。

3.4.2 溶液配制

（1）盐酸溶液（6mol/mL）：量取盐酸 80mL，加水 80mL，等体积混合，即得。

（2）盐酸溶液（0.02mol/mL）：量取盐酸 3.6mL，用水稀释至 2000mL，混匀，即得。

（3）羟脯氨酸标准溶液：精密称定羟脯氨酸标准品 26.26mg，用盐酸溶液（0.02mol/L）溶解并定容至 100mL，作为储备液。取 0.5mL 羟脯氨酸储备液，用盐酸溶液（0.02mol/L）

定容至 5mL, 得到浓度为 26.26 μ g/mL 羟脯氨酸标准溶液。

(4) 混合氨基酸标准溶液: 量取氨基酸混合标液 0.2mL, 羟脯氨酸储备液 0.5mL, 用盐酸溶液 (0.02mol/L) 定容至 5mL, 即得。

3.4.3 试验方法

将 3.1.3 项下每个降解时间点的上清液部分经 0.45 μ m 滤膜过滤, 量取 2mL, 分别置于水解管中, 加入 6mol/LHCl 溶液 6mL, 110 $^{\circ}$ C 水解 24h, 冷却, 置旋转蒸发仪瓶中, 60 $^{\circ}$ C 减压蒸发至干。用盐酸 (0.02mol/L) 洗涤蒸发瓶, 转移洗涤液至 50mL 容量瓶中, 加盐酸 (0.02mol/L) 定容至刻度, 制得供试液。另称取样品及对照样品 0.12g, 加水至 2mL, 同法操作制备 0 点的供试液, 测定样品中的羟脯氨酸总含量。量取 1IU/mL 胶原蛋白酶溶液 2mL, 同法操作制备空白溶液。必要时可调整上清液取样量。

将羟脯氨酸标准溶液、供试液、空白溶液分别用 0.22 μ m 的膜过滤后, 用氨基酸分析仪进行测定, 进样量为 20 μ L。测定降解液中羟脯氨酸的含量, 按式 (2) 计算不同降解时间点降解产物含量 (%)。

$$\text{降解产物含量} = \frac{\text{各降解时间点降解液中羟脯氨酸含量}}{\text{样品中总羟脯氨酸含量}} \times 100\% \quad (2)$$

3.5 凝胶电泳 (SDS) 光密度值变化

3.5.1 仪器和试剂

电泳系统 (美国伯乐);

5 $\times$ SDS-PAGE 样品缓冲溶液 (来源: 金斯瑞, 批号: C31152504, 有效期至 2027.4.1), SurePAGE 8% Bis-Tris 体系变性预制胶 (来源: 金斯瑞, 批号: C35402507, 有效期至 2027.1.1), Tris-MOPS-SDS Running Buffer Powder (来源: 金斯瑞, 批号: C31382503, 有效期至 2027.3.1), Precis on Plus Protein All Blue Standards (来源: BIO-RAD, 批号: #1610373, 有效期至 2027.5.1), 考马斯亮蓝 (分析纯), 乙醇 (分析纯), 冰醋酸 (分析纯)。

3.5.3 试验方法

(1) 0.01mol/L 盐酸溶液: 量取盐酸 0.9mL, 加水至 1000mL, 混匀。

(2) Tris-MOPS-SDS Running Buffer: 取 Tris-MOPS-SDS Running Buffer Powder 1 包, 加水溶解并定容至 1000mL。

(3) 考马斯亮蓝染色液: 精确称取考马斯亮蓝 0.5005g, 加入乙醇 225mL、水 225mL、冰醋酸 50mL, 混匀。

(4) 考马斯亮蓝脱色液: 量取乙醇 800mL, 冰乙酸 100mL 与超纯水 100mL, 混匀。

3.5.3 试验方法

将 3.1.3 项下每个降解时间点离心后的样品尽量弃去上清, 取沉淀部分, 加水至 5mL。另称取样品及对照样品各 0.3g, 加水至 5mL, 作为未降解的 0 点。将上述样品分别 100℃加热溶解, 分别取上述样品溶解液 80μL, 加入 5×SDS-PAGE 样品缓冲溶液 20μL, 混匀后于 100℃水浴加热 5min。

将 SurePAGE 4-20% 预制胶放入电泳槽中固定, 加入电泳液, 移取蛋白分子量标准品 Marker 7μL、样品溶解液及对照样品溶解液 10μL, 分别添加到加样孔中。设置电泳仪电压为 120V, 进行电泳。将电泳结束的胶片置于考马斯亮蓝染色中染色 2h, 之后置于过量脱色液中, 脱色至凝胶背景透明, 用凝胶成像系统对胶片进行分析。

分析样品及对照样品特征条带 α1、α2 的光密度值总和, 没有特征条带 α1、α2 的泳道蛋白光密度值规定为 0。按式 (3) 计算不同降解时间点光密度值变化 (%)。

$$\text{光密度值变化} = 1 - \frac{\text{各降解时间点特征条带 } \alpha 1、\alpha 2 \text{ 的光密度值总和}}{\text{0 点特征条带 } \alpha 1、\alpha 2 \text{ 的光密度值总和}} \times 100\% \dots\dots\dots (3)$$

3.6 特征圆二色光谱(CD)值变化

3.6.1 仪器和试剂

圆二色光谱仪 (日本分光);

冰醋酸 (分析纯)。

3.6.2 溶液配制

1%乙酸溶液: 取冰醋酸 2mL, 加水稀释至 200mL, 混匀即得。

3.6.3 试验方法

取 3.5.3 项下的各降解时间点样品及对照样品溶解液适量, 加 1%乙酸溶液 5 倍稀释, 分析样品在 221nm 处的 CD 值, 按式 (4) 计算不同降解时间点 CD 值变化率 (%)。

$$\text{CD 值变化率} (\%) = 1 - \frac{\text{各降解时间点样品 CD 值}}{\text{0 点样品 CD 值}} \times 100\% \dots\dots\dots (4)$$

四. 测试结果

4.1 重量损失

根据 3.2 的方法, 测定各降解时间点样品的质量损失, 结果见表 2。

表 2 重量损失结果

降解时间点 (h)	天然胶原蛋白原液样品	胶原蛋白对照样品
	重量损失 (%)	重量损失 (%)
0.5	19	17
4	39	20
8	70	43

16	92	53
24	/	67
48	/	/
72	/	/

结果可知, 样品及对照样品在降解的前 16h 内, 质量损失有明显的上升趋势。但在试验操作中, 冻干过程可能影响盛装样品的离心管重量, 从而带来较大的偶然误差, 且随着降解时间的增长, 剩余样品质量较小, 在清洗和称量的过程中引入的误差较大或低于电子天平的最小称量值。因此, 该项目仅能大致表征降解趋势, 不能准确定量体外降解的重量损失。

4.2 外观形貌

根据 3.3 的方法, 分别从宏观、微观上对样品及对照样品降解后的外观形貌进行考察。外观结果分别如图 3 所示, 扫描电镜测试结果如图 4 所示。

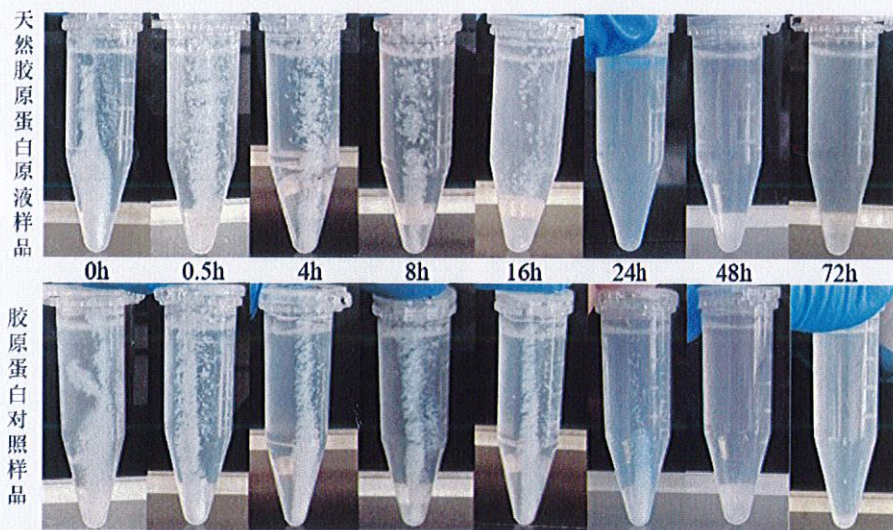
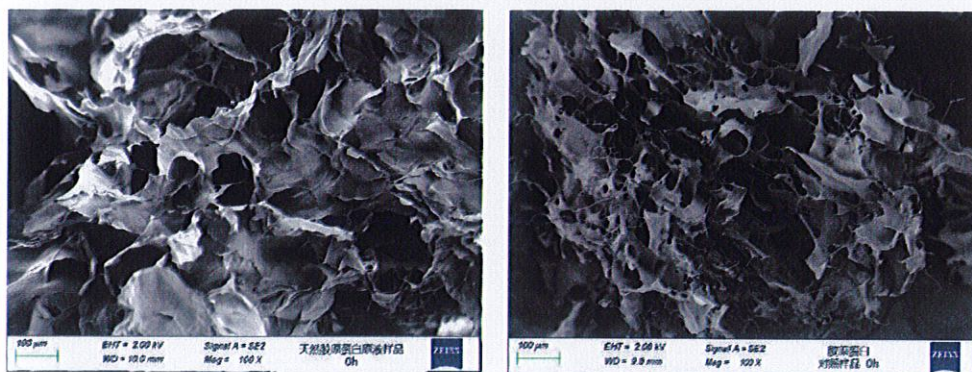
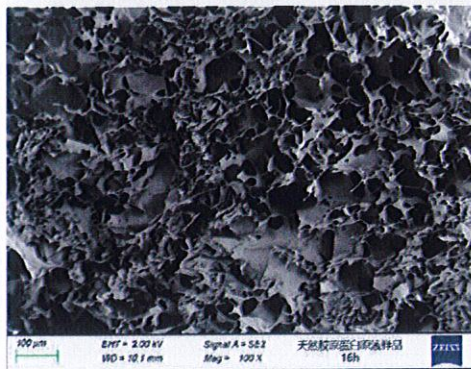
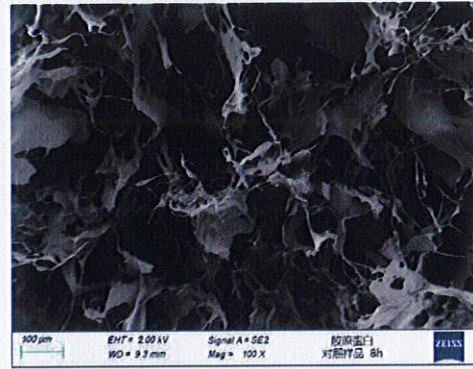
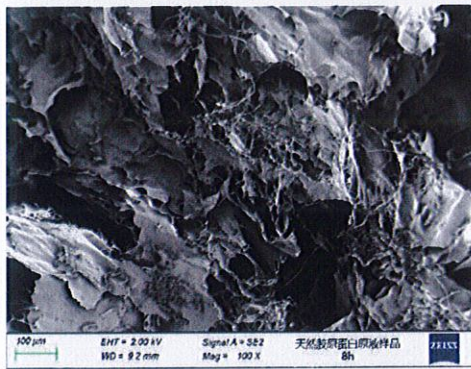
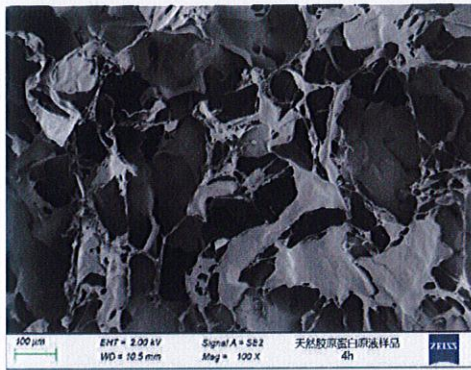
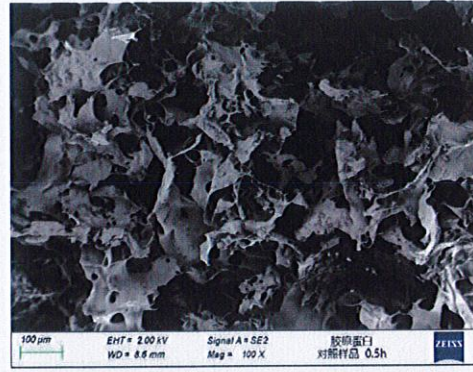
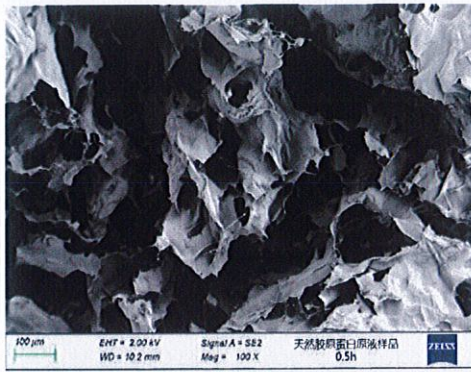


图 3 样品及对照样品外观结果





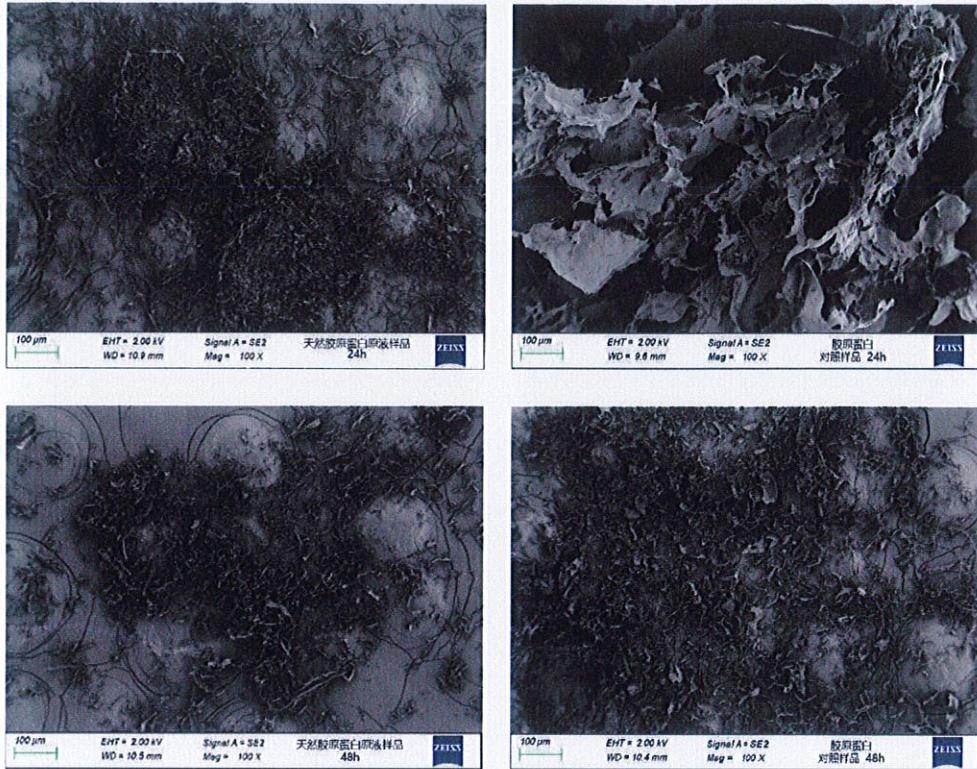


图4 样品及对照样品扫描电镜结果

由图3可知,随着降解时间的延长,样品及对照样品量显著减少。由图4可知,样品及对照样品的微观结构随着降解时间的延长发生显著变化,在降解前期,样品原来的具孔纤维状结构逐渐坍塌,形成片状产物,在后续的降解过程中样品逐渐裂解,呈碎片状。

4.3 降解产物

在预实验研究中,根据3.4的方法,采用氨基酸分析仪对样品降解液中全部氨基酸组分进行测定,典型色谱图如图5所示,结果可知,样品降解液经强酸水解的最终产物包括天冬氨酸、苏氨酸、丝氨酸、谷氨酸、甘氨酸、丙氨酸、胱氨酸、缬氨酸、蛋氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸、赖氨酸、组氨酸、精氨酸、脯氨酸、羟脯氨酸,共18种氨基酸。

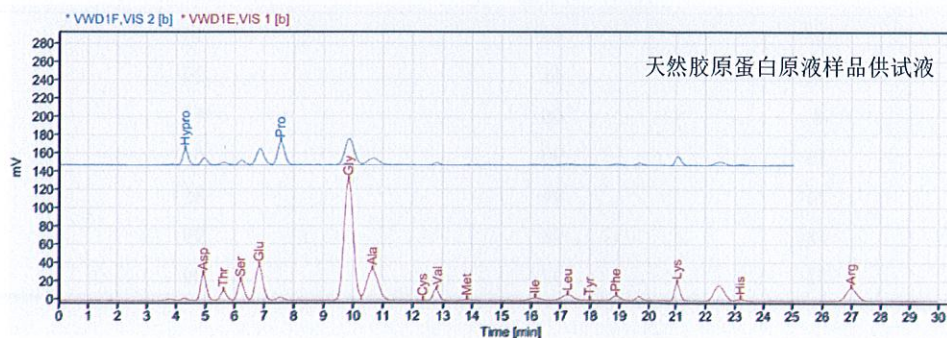


图5 总氨基酸含量色谱图

根据 3.4 的方法,测定样品及对照样品降解液中的特征标识物,即羟脯氨酸含量表征降解趋势,图 6 所示分别为羟脯氨酸标准溶液、样品供试液及对照样品供试液的典型色谱图,羟脯氨酸保留时间约为 4.34min,出峰附近无干扰,专属性较好。各降解时间点的降解产物含量结果见表 3。

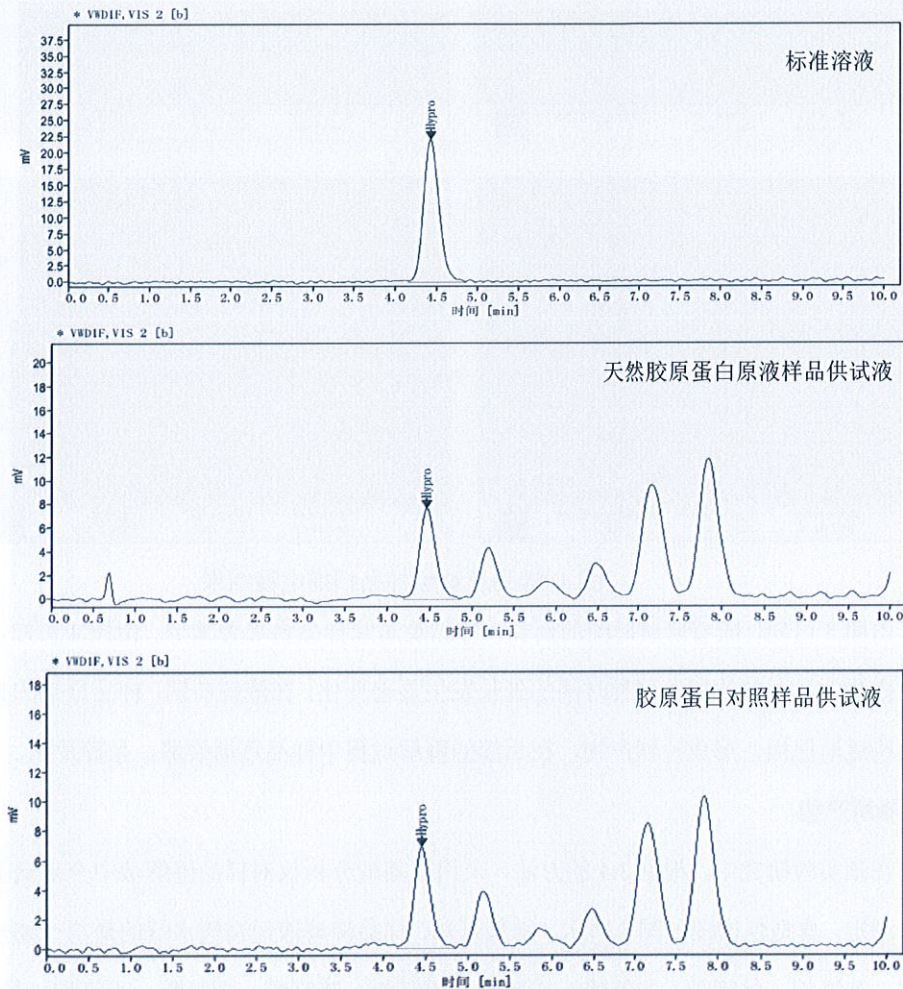


图 6 羟脯氨酸含量色谱图

表 3 降解产物含量测试结果

降解时间点 (h)	天然胶原蛋白原液样品 降解产物含量 (%)	胶原蛋白对照样品 降解产物含量 (%)
0.5	13	13
4	41	29
8	66	56
16	90	65
24	94	85
48	98	99
72	97	99

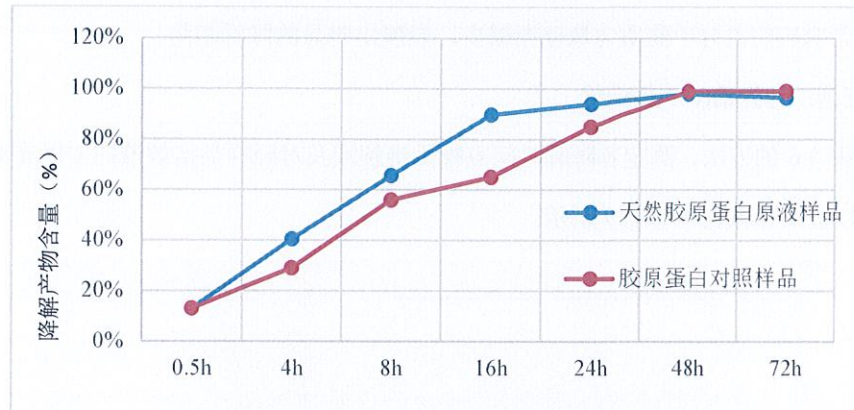


图 7 样品及对照样品降解产物含量趋势图

将各降解时间点降解液中的羟脯氨酸含量绘制成降解趋势图，如图 7 所示，结果可知，样品及对照样品在 72h 内降解液中的羟脯氨酸含量显著增加，表明胶原蛋白不断被断裂为肽段，经进一步水解得到的氨基酸持续增加，表现出明显的降解趋势。

4.4 凝胶电泳 (SDS) 光密度值变化

根据 3.5 的方法，测定各降解时间点样品溶解液及对照样品溶解液的特征条带光密度值的变化，SDS 图谱和光密度变化值见表 4 和图 8 所示。



图 8 样品及对照样品 SDS 图谱

表 4 样品及对照样品光密度值变化测试结果

降解时间点 (h)	天然胶原蛋白原液样品 光密度值减少量 (%)	胶原蛋白对照样品 光密度值变化 (%)
0.5	13	16
4	32	20
8	63	43
16	91	55
24	98	86
48	100	100
72	100	100

结果可知，在 72h 降解周期内，样品及对照样品溶解液 SDS 图谱中特征条带的光密度值随降解时间的增加显著减少，表明降解过程中大分子胶原蛋白持续断裂，特征 α 链 ($\alpha 1$ 和

α2) 条带对应的大分子物质含量逐渐减少，表现出明显的降解趋势。

4.5 特征圆二色光谱(CD)值变化

根据 3.6 的方法，测定各降解时间点样品溶解液及对照样品溶解液的 CD 光谱，CD 图谱和 CD 值变化见表 5 和图 9 所示。

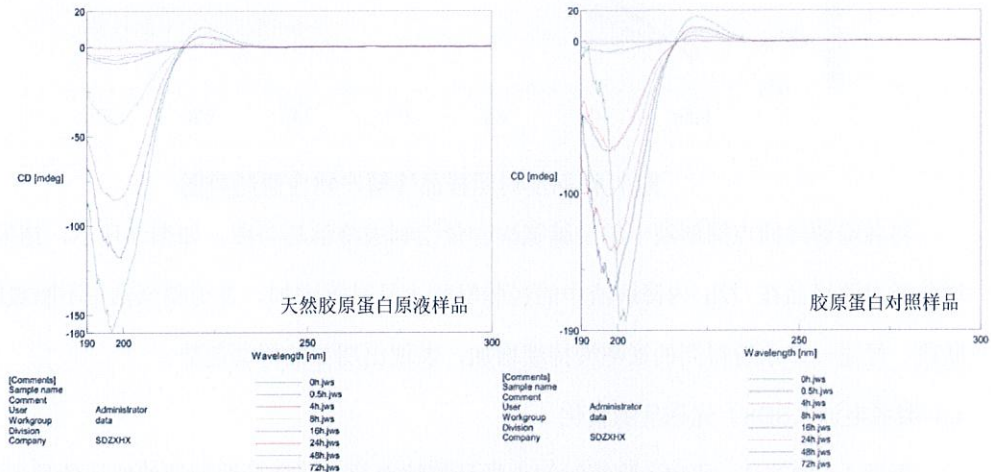


图 9 样品及对照样品 CD 图谱

表 5 样品及对照样品 CD 值变化测试结果

降解时间点 (h)	天然胶原蛋白原液样品	胶原蛋白对照样品
	CD 值减少量 (%)	CD 值变化 (%)
0.5	27	49
4	44	38
8	84	63
16	96	78
24	99	94
48	100	100
72	100	100

结果可知，在 72h 降解周期内，样品及对照样品溶解液在 221nm 处的 CD 值随降解时间的增加显著减少，表明降解过程中胶原蛋白的三螺旋二级结构持续被破坏，剩余胶原蛋白的三螺旋结构完整性及含量逐步下降，表现出明显的降解趋势。

五. 结论

本研究针对天然胶原蛋白原液产品和对照产品开展胶原蛋白酶溶液体系下的体外加速降解试验。

结果表明，天然胶原蛋白原液产品在 72h 的降解周期内，外观形貌存在明显的变化，72h 已无明显的未降解残留物。降解液经强酸水解后羟脯氨酸的含量不断增加，并逐渐趋于平衡。未降解残留物的溶解液中特征条带光密度值逐渐减少，即特征 α 链（α1 和 α2）条带对应的大分子物质含量逐渐减少。同时，未降解残留物的溶解液 221nm 处的 CD 值变化不断增加，

即胶原蛋白的三螺旋结构持续被解旋。综合以上测定结果可知，天然胶原蛋白原液产品在 72h 可达到完全降解。

与对照产品相比，二者表现出相同的降解趋势与机理。降解过程中均出现外观形貌的明显变化，降解液中羟脯氨酸含量持续升高并趋于平衡，未降解残留物溶解液的特征条带光密度值与 CD 值逐步降低，即胶原蛋白的三螺旋结构持续被解旋，肽键断裂，大分子物质含量逐步减少，最终在 72h 内实现完全降解。

参考文献

- [1] Chung L, Dinakar Pandian D, Yoshida N, Lauer-Fields JL, Fields GB, Visse R, Nagase H. Collagenase unwinds triple-helical collagen prior to peptide bond hydrolysis. EMBO J. 2004 Aug 4;23(15):3020-3030. doi: 10.1038/sj.emboj.7600318.

试验人员和监督人员:

李智月 李福金 朱子

批准人:

沈永

沈 永

2016.1.24

结束日期

小研安

