ICS 71.100.70
CCS Y42

T/GDCA

广 东 省 化 妆 品 学 会 团 体 标 准

T/GDCA 009—2022

化妆品原料 重组可溶性胶原蛋白

Cosmetic Ingredient Recombinant Soluble Collagen

（征求意见稿）

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。

XXXX－XX－XX 发布　　XXXX－XX－XX 实施

广东省化妆品学会　　发 布

化妆品原料 重组可溶性胶原蛋白

1 范围

本文件规定了重组可溶性胶原蛋白的质量控制要求、检测指标与方法、稳定性验证、包装储运方法等，并规定了一种重组可溶性胶原蛋白生物学活性的测定方法和定量标准。

本文件适用于作为化妆品原料的重组可溶性胶原蛋白的质量控制与活性检测。

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 191 包装储运图示标志
GB/T 601 化学试剂 标准滴定溶液的制备
GB/T 602 化学试剂 杂质测定用标准溶液的制备
GB/T 603 化学试剂 试验方法中所用制剂及制品的制备
GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法
YY/T 1849-2022 重组胶原蛋白
T/SHRH 031-2020 化妆品紧致、抗皱功效测试-体外成纤维细胞Ⅰ型胶原蛋白含量测定
化妆品安全技术规范（2015年版）（国家食品药品监督管理总局公告 2015年第 268 号）
重组胶原蛋白生物材料命名指导原则 （国家食品药品监督管理总局公告 2021年第 21 号）
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
胶原蛋白 collagen
一类含有至少 20 种在遗传学上不同类型的分泌蛋白质家族，主要担任机体的结构支撑功能，具有独特的由三条多肽链(被称为α链)组成的三螺旋构型，并具有一定的生物学功能。

3.2
重组胶原蛋白 recombination soluble 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(3.1)或类似胶原蛋白(3.1)的多肽，经过提取和纯化等步骤制备而成。

3.3
可溶性胶原 soluble collagen
用于化妆品原料的可溶于水的胶原蛋白(3.1)或类似胶原蛋白(3.1)的多肽。

4 质量控制

4.1 通则

重组可溶性胶原蛋白，由于不同胶原蛋白亚型、不同氨基酸序列、不同表达体系等差异，不具有统一的产物。与天然胶原蛋白相比，氨基酸组成、分子量大小和(或)结构可能差异很大，甚至是个全新的蛋白质，可以是单一亚型全长氨基酸序列的重组人胶原蛋白，也可以是将两种或多种亚型嵌合的重组人源化胶原蛋白，或者与天然胶原蛋白氨基酸序列同源性较低的重组类胶原蛋白。

重组胶原蛋白的质量控制与分子量大小、结构特性、质量属性复杂程度以及生产工艺相关。本文件涉及到的质量控制体系为化妆品原料成品检测，在生产过程中的原辅料质量控制、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。

4.2 分类与命名

参照《重组胶原蛋白生物材料命名指导原则》（国家食品药品监督管理总局公告 2021年第 21 号），将重组可溶性胶原蛋白分为重组人胶原蛋白、重组人源化胶原蛋白、重组类胶原蛋白三种。

4.3 剂型

根据重组可溶性胶原蛋白的形态，可分为溶液、凝胶、粉末与海绵状固体等不同剂型。其中粉末与海绵状固体应为溶液剂型经冷冻干燥等工艺制得。

4.4 质量要求

4.4.1 感官评价

重组可溶性胶原蛋白的感官评价标准见表1。

表 1 感官评价指标

检测项目	要求
外观	白色至淡黄色溶液、凝胶、粉末或海绵状固体
气味	无或略有特征性气味
杂质	无肉眼可见明显异物

4.4.2 理化性质

重组可溶性胶原蛋白的理化性质标准见表2。

表 2 理化性质指标

检测项目	要求
纯度	≥85%
蛋白含量	标示量的 90%～110%
分子量	质谱法为理论计算值±10%；电泳法为理论计算值±10kD
pH 值	5.0～8.0

4.4.3 安全性

重组可溶性胶原蛋白的安全性标准见表3。

表 3　安全性指标

检测项目	要求
菌落总数（CFU/mL 或 CFU/g）	≤100
霉菌和酵母菌总数（CFU/mL 或 CFU/g）	≤10
耐热大肠菌群（mL 或 g）	不得检出
铜绿假单胞菌（mL 或 g）	
金黄色葡萄球菌（mL 或 g）	
铅（mg/kg）	≤10
汞（mg/kg）	≤1
砷（mg/kg）	≤2
镉（mg/kg）	≤5

4.4.4　稳定性

重组可溶性胶原蛋白的稳定性受多种因素影响，包括纯化工艺、微生物负载、包装贮存条件等。重组可溶性胶原蛋白原料的稳定性主要受温度影响，即热稳定性，其性质可能会直接影响预期用于化妆品的安全性和有效性，因此，应对其热稳定性进行动态评价和分析。

重组可溶性胶原蛋白的稳定性标准为，进行热稳定性检测后，肉眼观察无可见析出物或凝胶化。

4.4.5　生物学活性

重组可溶性胶原蛋白的生物学活性是指与天然胶原蛋白功能相关的生物学作用。胶原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支架和良好的微环境，如促进细胞黏附、增殖等，并能够促进皮肤成纤维细胞合成分泌细胞外基质蛋白。因此，可通过评价细胞-胶原蛋白相互作用或成纤维细胞合成分泌细胞外基质蛋白能力来评价重组可溶性胶原蛋白的生物学活性。

进行测定的任意一个或多个生物学活性指标中，重组可溶性胶原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，可表明重组可溶性胶原蛋白具有生物学活性。

5　检测方法

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。《中华人民共和国药典》 2020版四部方法外的试剂配制方法参照GB/T 601、GB/T 602、GB/T 603方法配制标定。

5.1　外观与气味

自然光下肉眼直接观测，嗅闻气味，应符合表1要求。

5.2　杂质

溶液样品直接取样，凝胶样品可根据粘稠度加水稀释后取样，粉末与海绵状固体样品称取适量加水制成适当浓度的待测溶液，将样品置于比色管内，自然光下肉眼直接观察，应无肉眼可见异物。

5.3　纯度

按照YY/T 1849-2022 5.4中规定的方法进行测定。

5.4 蛋白含量

按照YY/T 1849-2022 5.6中规定的方法进行测定。

5.5 分子量

按照《中华人民共和国药典》2020年版 四部 通则 0541 电泳法 第五法 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法（SDS-PAGE法）或按照YY/T 1849-2022中5.3.3.2、5.3.3.3描述的方法（高效液相色谱法、质谱法）进行检测。

5.6 pH 值

按《化妆品安全技术规范》2015年版第四章1.1 pH值中方法测试，溶液和凝胶样品可采用直测法测定，粉末与海绵状固体样品用水制成1 mg/mL待测溶液进行测定。

5.7 菌落总数

参照《化妆品安全技术规范》2015版规定的方法检验。

5.8 霉菌和酵母菌总数

参照《化妆品安全技术规范》2015版规定的方法检验。

5.9 耐热大肠菌群、铜绿假单胞菌与金黄色葡萄球菌

参照《化妆品安全技术规范》2015版规定的方法检验。

5.10 铅、汞、砷、镉的测定

参照《化妆品安全技术规范》2015版规定的方法检验。

5.11 稳定性测定

将各剂型重组可溶性胶原蛋白以水配制成10 mg/mL溶液，置于（60±0.5）℃水浴中保持4 h，应满足肉眼观察无可见析出物或凝胶化。

与稳定性相关的工艺验证宜采用连续三批次重组可溶性胶原蛋白进行。在相关工艺条件无变化时，每年宜进行至少一个批次产品的稳定性检验。在工艺条件有变化时,应考虑对重组可溶性胶原蛋白稳定性的影响，必要时进行再次验证。

5.12 生物学活性测定

细胞增殖、黏附等细胞活性可按照YY/T 1849-2022 5.4中规定的方法进行测定。成纤维细胞合成分泌I型胶原蛋白能力可按照T/SHRH 031-2020中方法进行测定。成纤维细胞合成分泌其他细胞外基质蛋白能力可以以荧光定量PCR法进行测定，具体实验方法见附录A。

6 包装、运输和贮存

6.1 温度

作为蛋白制品，重组可溶性胶原蛋白贮存和运输过程中的温度条件与剂型有关，溶液剂型贮存与运输环境为-20～-18℃，凝胶剂型贮存与运输环境为4～8℃，粉末与海绵状固体可在常温下短时间贮存与运输，长时间贮存应在4～8℃环境中。

6.2 标志

产品销售包装图示标志应按GB/T 191执行，标注内容为：产品名称、商标（如有）、保质期（用生产日期、保质期或生产批号、限期使用日期等方式组合表示）、生产者名称、地址、净含量、执行标准号以及根据产品特点所应标注的其他内容。

6.3 包装

产品采用适宜要求包装，产品根据用户要求包装。

6.4 运输

产品属于非危险品，在运输时应防火、防热、防雨淋、防受潮。

6.5 贮存

避光、密闭，避免阳光直射。

6.6 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启封的情况下，保质期按销售包装标注执行。

附 录 A
（规范性）
生物学活性测定—荧光定量 PCR 法

荧光定量PCR法是对细胞中目的基因的mRNA水平实现定量检测的方法。以mRNA反转录出的cDNA作为模板，在含有特异性结合DNA双链的荧光染料与目的基因的特异性引物的体系中进行PCR扩增，得到的CT值与模板起始拷贝数的对数呈线性负相关，根据CT值结果，可以计算出模板DNA的起始拷贝数，实现对目的基因的相对定量。

A.1 材料与试剂

实验中用到的细胞首选人皮肤成纤维细胞系（如BJ）或小鼠胚胎成纤维细胞系（如NIH/3T3）;其他成纤维细胞或细胞系也可用于本试验；但应证明其等同性。

实验中用到的试剂包括：TRIzol试剂、一步法反转录试剂盒、SYBR Green荧光定量PCR试剂盒、DEPC-水、无水乙醇、氯仿、异丙醇。

实验中用到的主要设备包括：高速冷冻离心机、全波长酶标仪、荧光定量PCR仪。

A.2 实验方法

A.2.1 细胞处理

A.2.1.1 细胞在正常生长条件下培养至丰度约 70%后，更换为不含血清的培养基，饥饿培养 4 小时。

A.2.1.2 将配制好的胶原蛋白样品以适当浓度添加入细胞培养基中，培养 24 小时。

A.2.2 细胞内总RNA提取纯化

A.2.2.1 取培养的细胞吸除培养基，使用预冷的 PBS 洗两次，加入 1 mL TRIzol 试剂，吹打收集到离心管中，室温放置 5 分钟。

A.2.2.2 向离心管中加入 200μL 氯仿，涡旋振荡器震荡离心管 15 秒，静置 10 分钟后，4 ℃下 12000 g 离心 15 分钟。

A.2.2.3 离心后液体分层，RNA 存在于上层无色透明的水相层中，体积约 600μL，转移至新的离心管后，加入 500μL 异丙醇，缓慢上下颠倒几次混匀，静置 15 分钟后，4 ℃下 12000 g 离心 10 分钟。

A.2.2.4 离心后 RNA 沉淀于离心管底部，面对光源可见为胶状沉淀，吸除上清后，加入 1 mL 75%乙醇洗涤 RNA，4 ℃下 12000 g 离心 5 分钟。

A.2.2.5 吸除乙醇上清，静置 5 分钟干燥 RNA，加入 20μL DEPC-水溶解 RNA。

A.2.2.6 提取出的 RNA 在-80 ℃可以暂存 1 个月，需尽快完成以下 2.3 与 2.4 步骤。

A.2.3 RNA浓度测定

A.2.3.1 将提取的 RNA 取 1μL，加入到 99μL DEPC-水中，使总体积为 100μL。将稀释后的 RNA 溶液加入到 96 孔 UV 紫外板中。

A.2.3.2 96 孔版放入全波长酶标仪中，选择待测区域，设置程序为：震荡 10 秒、测定 260 nm 吸光值、测定 280 nm 吸光值，读取数值。

A.2.3.3 计算 OD260/OD280 比值，比值在 1.8-2.0 之间时表明提取的 RNA 质量满足后续需要。

A.2.3.4 根据公式 OD260×0.04×稀释倍数，计算得到 RNA 溶液浓度，单位为μg/μL。以 DEPC-水稀释调整 RNA 浓度至 1μg/μL。

A.2.4 反转录（注：试剂盒可能不同，按实际使用的试剂盒说明书配置反转录体系与反应程序）

A.2.4.1 使用反转录试剂盒，在 200μL 的 PCR 管中配制反转录体系：

a) 浓度为 1μg/μL 的 RNA 溶液，1μL；

b) 5×qRT SuperMix，4μL；
c) 预混酶溶液，1μL；
d) DEPC-水，14μL。

反转录体系终体积为20μL，使用移液器轻轻吹打混匀，掌上离心机短暂离心30秒。

A.2.4.2 将反转录体系PCR管放入RCR仪中，设置反应程序：

——50℃处理15分钟；
——85℃处理10秒钟。

体系中的mRNA被反转录为cDNA。

A.2.4.3 反转录出的cDNA能够作为后续荧光定量PCR反应的模板，对目标分子进行基因水平的检测。cDNA在-20℃可以保存6个月，在-80℃可以长期保存。

A.2.5 引物设计与特异性验证

A.2.5.1 引物设计使用美国国家生物技术信息中心（NCBI）网站的Primer-BLAST功能在线完成（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast）。

A.2.5.2 设计引物应遵循以下原则：

——目的产物的长度为150-250个碱基；
——引物长度范围为18-25个碱基；
——退火温度在58℃-62℃之间；
——GC含量在40%-60%之间；
——不含有连续的4个及以上相同的碱基；
——引物自身配对碱基少于3个。

A.2.5.3 对于每个目标分子，设计3对不同引物，由生物公司进行合成。

A.2.5.4 收到合成好的引物后，需先按照下文2.5步骤进行引物特异性进行验证，满足扩增效率En大于0.9，C_T值在35以内，熔解曲线峰型单一且峰值温度在80℃以上的引物，可以用来进行荧光定量PCR试验。

本标准中用于生物学活性测定的已验证引物信息如表A.1所示。其中全大写斜体基因名代表人源基因（如*COL1A1*），首字母大写斜体基因名代表鼠源基因，并在前加注m标示（如*m COL1A1*）。引物名称后的F代表正向（Forward）引物，R代表反向（Reverse）引物。

表A.1 已验证的引物信息

引物名称	引物序列	Tm（℃）	目的片段长度（bp）
COL1A1-F	5’- CCCCGAGGCTCTGAAGGT -3’	60.0	140
COL1A1-R	5’- GCAATACCAGGAGCACCATTG-3’	57.8	
COL3A1-F	5’- CCTCCAACTGCTCCTACTCG-3’	62.0	172
COL3A1-R	5’- GACCAGTAGGGCATGATTCACA-3’	59.1	
ATCB-F	5’- GAGAAAATCTGGCACCACACC-3’	57.8	176
ATCB-R	5’- GATAGCACAGCCTGGATAGCA-3’	57.8	
m Col1a1-F	5’-ATGCTTGATCTGTATCTGCCACA -3’	56.6	171
m Col1a1-R	5’- CCCTTGGGTCCCTCGACT-3’	60.0	
m Col3a1-F	5’- GAAAGAGGATCTGAGGGCTCG-3’	59.8	141
m Col3a1-R	5’- GGGTGAAAAGCCACCAGACT-3’	62.0	
m Actb-F	5’- CGCTGCGCTGGTCGT-3’	56.2	123
m Actb-R	5’- CCCACCATCACACCCTGG-3’	60.0	

A.2.6 **荧光定量PCR**（注：各单位使用试剂盒与仪器可能不同，按试剂盒说明书配置PCR体系，并根据仪器设置合适的PCR程序）

A.2.6.1 使用 SYBR Green 荧光定量试剂盒中的试剂配制，配制反应体系：

a) 2×SYBR Green PCR 预混液，10μL；
b) 正向与反向引物，各 1.5μL；
c) 浓度为 1μg/μL 的 cDNA 溶液，1μL；
d) 灭菌一级水，6μL。

PCR 体系终体积为 20μL，使用掌上离心机短暂离心 30 秒。

A.2.6.2 每个样品的每个待测分子均需三个重复孔，设置不加入 cDNA 的空白对照；除待测分子外，还需要β-肌动蛋白（*ACTB*）作为参考分子。

A.2.6.3 将八联 PCR 管放入荧光定量 PCR 仪中，设置反应程序：

a) 95 ℃处理 2 分钟；
b) 95 ℃处理 5 秒钟；
c) 60 ℃处理 10 秒钟；
d) 4 ℃恒温保存。

其中 b 与 c 步骤重复 40 个循环。

A.2.6.4 PCR 程序结束后，软件自动生成每个样品的 C_T 值。

A.3 定量分析

将每个样品三个重复的C_T值取平均值，计算待测分子C_T值减去参考分子（ACTB）C_T值的差值，即ΔC_T。计算经原料处理后细胞中待测分子的ΔC_T值减去未经处理细胞中待测分子的ΔC_T值的差值，即$\Delta\Delta C_T$。计算以2为底数，（$-\Delta\Delta C_T$）为指数的指数值，即$2^{-\Delta\Delta CT}$，作为每个样品中待测分子的定量结果，实现基因水平的定量检测。

参 考 文 献

[1] YY/T 1849-2022 重组胶原蛋白。