

团 体 标 准

T/GDMDMA 0029—2023

重组胶原蛋白医用敷料体外透皮吸收 评价指南(荧光标记法)

Guidelines for evaluating percutaneous absorption in vitro of
recombinant collagen medical dressings(fluorescence labeling method)

2023-12-27 发布

2023-12-27 实施

广东省医疗器械管理学会 发 布
中 国 标 准 出 版 社 出 版

目 次

前言 III

引言 IV

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 术语和定义 1

4 试验原理 2

5 受试物和待测物要求 2

6 试验方法 3

7 试验数据和报告 5

附录 A（资料性） 创面皮肤制备方法（胶带剥离法） 7

附录 B（资料性） 创面皮肤制备方法（微针穿刺法） 8

参考文献..... 9

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。

本文件由广东省医疗器械管理学会和新型生物材料与高端医疗器械广东研究院提出。

本文件由广东省医疗器械管理学会归口。

本文件起草单位：广州创尔生物技术股份有限公司、新型生物材料与高端医疗器械广东研究院、广州益诚生物科技有限公司、广州汇科生物药业有限公司、广州博联思医疗技术有限公司、广州润虹医药科技股份有限公司、肽源(广州)生物科技有限公司、广州远想医学生物技术有限公司、广东省医疗器械质量监督检验所、广东省科学院生物与医学工程研究所、广东省华微检测股份有限公司、上海微谱检测科技集团有限公司、广州暨南大学医药生物技术研究开发中心有限公司、广东省医疗器械管理学会、广州拜高健康产业有限公司、深圳柏垠生物科技有限公司、珠海市维美生物科技有限公司、威科检测集团有限公司、华熙生物科技股份有限公司、奥精医疗科技股份有限公司、江苏创健医疗科技股份有限公司。

本文件主要起草人：达琦、李婷、金振华、陈伟、向健、肖玲、吴琪、杨立峰、陆欧军、吴彩霞、陈颖、李新霞、赵澎、周晗、项琪、陈淑贞、郑保婷、罗思施、蒋丽婷、潘兴、刘舜莉、林晓娟、朱忠红、袁秦、罗鑫、罗思施、黄雪连、林洁琴、崔俊锋、袁新颂、张广湘、吴越、吴晶晶、吴鹏。

引 言

关于重组胶原蛋白医用敷料应用于非慢性创面时,其所含成分重组胶原蛋白是否被人体部分或全部吸收的研究,目前主要参考 GB/T 27818—2011、GB/T 27825—2011、《皮肤外用化学仿制药研究技术指导原则(试行)》等进行。上述标准适用于皮肤屏障完整的正常皮肤,且重组胶原蛋白与皮肤组织中其他蛋白成分相似性极高,对常规的检测方法提出了较大挑战,再加上 GB/T 27818—2011 与《皮肤外用化学仿制药研究技术指导原则》仅提出指导性的要求,并无规范化的操作方法。针对以上问题,本文件在医疗器械法规、标准和文献调研以及试验预研的基础上,对重组胶原蛋白医用敷料体外透皮吸收实验提出了评价方法和判定原则。

广东省医疗器械质量监督检验所、广东赤萌医疗科技有限公司、新型生物材料与高端医疗器械广东研究院检验中心、广东省华微检测股份有限公司、广东省科学院生物与医学工程研究所和广州暨南大学医药生物技术研究开发中心参与了全程验证、论证工作。

重组胶原蛋白医用敷料体外透皮吸收 评价指南(荧光标记法)

1 范围

本文件规定了重组胶原蛋白医用敷料体外透皮吸收试验方法的适用范围、试验原理、试验用受试物的要求、试验方法、试验数据和报告。

本文件适用于重组胶原蛋白医用敷料用于非慢性浅表创面时所含重组胶原蛋白透皮吸收的评价。本文件并非适用于检测所有的情况,仅适用于皮肤体外透皮的最初定性和定量评价。

注:医用敷料中常见的丝素蛋白、贻贝蛋白及其他蛋白类可参考本文件,但需要根据具体的产品特性进行分析评价。

2 规范性引用文件

本文件没有规范性引用文件。

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

离体皮肤组织 isolated skin tissue

从人或动物体表分离出的符合体外透皮吸收试验需要的皮肤组织,可直接用于试验,或经过一定创面制备流程后用于体外透皮吸收试验。

3.2

创面 wound

正常皮肤(组织)在外界致伤因子如外科手术、外力、热、电流、化学物质、低温以及机体内在因素如局部血液供应障碍等作用下所导致的损害,常伴有皮肤完整性的破坏以及一定量正常组织的丢失,同时,皮肤的正常功能受损。

3.3

受试物 test substance

经荧光标记的重组胶原蛋白,按终产品生产工艺制备成的重组胶原蛋白医用敷料。

3.4

待测物 analytes

受试物中所含的荧光标记的重组胶原蛋白。

3.5

终产品 finished product

经受过所有加工过程处于“待上市”状态的医疗器械或医疗器械组件,其加工过程包括包装以及灭菌(如适用)。

4 试验原理

将重组胶原蛋白进行荧光标记后配置受试物,将离体猪皮制备创面后进行体外透皮吸收试验,用荧光显微镜观察切片中荧光信号来定性和追踪重组胶原蛋白,同时使用酶标仪或荧光分光光度计对皮上、皮中和皮下组织中的重组胶原蛋白进行定量分析,从而评价重组胶原蛋白是否透过创面皮肤。

5 受试物和待测物要求

5.1 荧光标记

将荧光分子通过共价结合的方式标记到重组胶原蛋白上,推荐 FITC(异硫氰酸荧光素,Fluorescein isothiocyanate)作为重组胶原蛋白荧光标记物。其他荧光标记物,如 RBITC(异硫氰酸罗丹明 B, Rhodamine B isothiocyanate)、Cy5(菁染料 5, Cyanine-5)等也可用于重组胶原蛋白的荧光标记。经过分离纯化获得的荧光标记的重组胶原蛋白应置于 4℃ 避光保存,用于后续试验。若荧光标记的重组胶原蛋白为液体,建议标记后 2 个月内用于后续试验;若荧光标记的重组胶原蛋白为冻干粉末,建议标记后 6 个月内用于后续试验。

5.2 标记效果评价

应提供 FITC 标记前后全波段吸收峰扫描图谱(图 1)和 SDS-PAGE(十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳)或 HPLC(高效液相色谱)等图谱,同时报告标记产物的荧光标记率。FITC 标记的重组胶原蛋白应在荧光素对应的激发波长处(495 nm)左右有吸收峰。可选用紫外分光光度计、酶标仪等设备对荧光标记前后的重组胶原蛋白进行全波段吸收峰扫描。

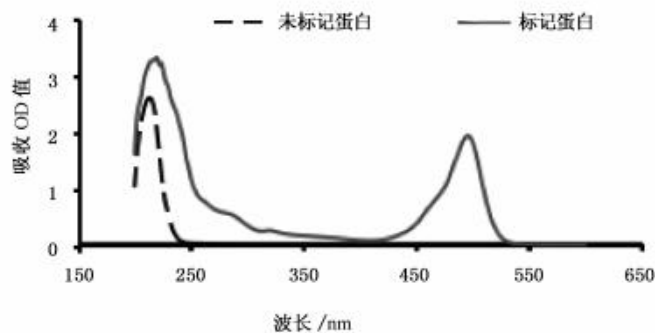


图 1 FITC 标记前后重组胶原蛋白全波段吸收峰扫描图

5.3 受试物制备

应提供采用荧光标记的重组胶原蛋白制备受试物的过程。受试物的制备过程应与终产品的工艺过程相同。如终产品工艺过程涉及灭菌,但受试物制备过程未涉及灭菌,应考虑终产品中灭菌工艺对重组胶原蛋白分子量的影响,并提供灭菌前后重组胶原蛋白分子量变化的研究资料,以用来评价灭菌过程对体外透皮吸收试验的影响。

5.4 受试物稳定性考查

在体外透皮吸收试验前,应先在与试验条件相同条件下(如温度、湿度、光照程度等)考查受试物的荧光稳定性。建议至少考查 48 h 内受试物的荧光稳定性。

6 试验方法

6.1 体外透皮吸收试验

6.1.1 扩散池的选取

建议选择静止式(Franz)扩散池作为扩散设备。

6.1.2 离体皮肤组织选取

考虑到物理和化学结构的相似性、创面制备的要求以及对亲水性分子来说猪皮通透性高于人皮,选择离体皮肤组织选择猪皮进行试验。离体猪皮肤组织选取 1 月~2 月龄巴马猪背部或腹部的皮肤,厚度 1 mm 以下。新鲜或是低温保存的离体猪皮肤组织均可以用于试验。如低温保存,可保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 或更低温度下,试验前在室温下自然解冻,使用前用生理盐水清洗。

新鲜离体皮肤组织或低温保存后的离体皮肤组织使用前建议采用经皮失水仪对皮肤的经皮失水率进行检测,经皮失水率 $<15\text{ g}/(\text{m}^2\cdot\text{h})$ 认为皮肤屏障功能保持完好,可用于创面皮肤制备。

注:其他方法也可以用来评估皮肤屏障的完整性,应证明所采用方法的试验参数和接受标准是合理的。

6.1.3 接收液

考虑到待测物重组胶原蛋白水溶性极好,推荐接收池溶液选用 pH 为 6.8~7.4 的磷酸盐缓冲液(PBS)、Hank's 平衡盐溶液(HBSS)等,温度建议设置为 $32\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

6.1.4 上样

受试物上样量要求如下:

- a) 半固体、固体受试物:不低于 $5\text{ mg}/\text{cm}^2$;
- b) 液体受试物:不低于 $10\text{ }\mu\text{L}/\text{cm}^2$;
- c) 产品说明书使用量;
- d) 产品临床实际使用剂量。

6.1.5 试验时长

应依据终产品说明书确定产品每日累计使用时长,最低试验时长为每日累计使用时长的 2 倍;如按照说明书使用时间计算出的最低试验时长小于 4 h,建议最低的试验时长设定为 4 h。最高试验时长不宜超过 24 h。建议至少在试验结束时间点取样,可根据试验时长及具体情况设定期间取样次数。

6.1.6 实验分组

为了去除猪皮本身的胶原蛋白带来的误差,建议设置空白对照组。

- a) 空白对照组:使用纯化水替代重组胶原蛋白溶液样品,按照受试物配方及工艺制备空白对照品。
- b) 样品组:受试物是重组胶原蛋白医用敷料。

空白对照组至少设置 2 个平行样,样品组至少设置 4 个平行样,建议试验结果至少为 3 组有效数据。

6.1.7 装置准备

将配套的磁子放置于扩散池的接收池内,并将离体皮肤组织固定于供给池和接收池之间,在接收池中加满接收液。排尽空气,使离体皮肤组织的底面与接收液紧密接触。搅拌速率的选取以实现对接收池内样品进行充分混匀但表面无涡旋为宜。

6.2 创面皮肤制备

应使用合适的方法制备皮肤创面,不恰当的处理可能导致角质层被完全破坏,使离体皮肤组织对亲水性分子无任何屏障功能。为了保证试验系统的有效性,创面的制备应结合终产品临床用途适用的创面情况,重点考虑角质层的损伤程度,建议保留角质层部分屏障功能。角质层完整的皮肤经皮失水值为 $<15\text{ g}/(\text{m}^2 \cdot \text{h})$ 。

推荐的创面皮肤制备方法有胶带剥离法(附录 A)和微针穿刺法(附录 B)。

试验人员可见附录 A、附录 B 或者参考文献进行创面皮肤的制备,也可以选择其他经论证的创面皮肤制备方法。

注:试验中可根据创面皮肤制备后创面情况及经皮失水值变化情况,选择合适的经皮失水值。

6.3 受试物检测

6.3.1 定性检测

试验中至少 1 个样品平行样应用于重组胶原蛋白在皮肤组织中分布的定性检测。进行皮上部分待测物清洗后,从离体皮肤组织取下约 $10\text{ mm} \times 10\text{ mm}$ 大小的组织块,采用适宜的切片或磨片技术进行冰冻切片。操作过程中注意避光减少荧光淬灭,封片时可使用 DAPI 染色封片剂,用于荧光成像时定位细胞核。

冰冻切片样品中应加入未进行创面制备的离体猪皮组织作为对照,用于对比说明创面制备情况。

6.3.2 定量检测

试验的 2 个空白对照平行样和至少 3 个样品组平行样应该用于重组胶原蛋白的定量检测。

荧光标记的重组胶原蛋白可用酶标仪或荧光分光光度计测定皮上、皮中和皮下部分的荧光值,用荧光标记的重组胶原蛋白制备重组胶原蛋白浓度-荧光强度的标准曲线,换算体外透皮吸收试验皮上、皮中和皮下的受试物的含量。

由于分析的样本涉及皮上、皮中和皮下三部分,且不同的基质对标准曲线有影响,因此检测皮上、皮中和皮下样本的检测方法均需要进行方法验证。定量检测的方法验证应考虑方法的检出限,定量限,精密度和准确度,其中检出限不应高于 $1\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

定量检测应计算体外透皮吸收试验中待测物在每个扩散池的回收率。若回收率处于 $90\% \sim 110\%$ 内,无需讨论,可直接接受;若回收率在上述该范围之外,应解释回收率较大变异性的来源。

- 原始样本中待测物含量测定(a_0);
- 皮上待测物含量(a_1):皮肤组织表面洗出物的重组胶原蛋白含量,可包括皮肤清洗液、供给池清洗液等部分;
- 皮中待测物含量(a_2):皮肤组织中重组胶原蛋白含量,将皮肤剪碎或磨碎后用与接收池同样成分的溶液进行提取;
- 皮下待测物含量(a_3):接收液中重组胶原蛋白的含量,包括不同时间点的接收液、接收池清洗

液等部分；

e) 受试物回收率计算：

$$\text{回收率} = \frac{a_1 + a_2 + a_3}{a_0} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中：

a_0 ——原始样本中待测物含量测定；

a_1 ——皮上待测物含量；

a_2 ——皮中待测物含量；

a_3 ——皮下待测物含量。

6.4 受试物透皮吸收评价标准

受试物中重组胶原蛋白是否透皮吸收，应结合定量检测数据和定性检测结果综合判断。

- a) 若皮中待测物含量大于或等于零，而皮下待测物含量为零（即 $a_2 \geq 0, a_3 = 0$ ），应再结合定性检测结果进行判断，观察荧光标记的重组胶原蛋白残留部位。若荧光仅出现在角质层、皮肤附件（包括毛囊、汗腺和皮脂腺）或创伤部位（如微针穿刺形成的针孔等），则认为受试物不透皮吸收。若还出现在了上述皮肤组织之外的其他部位，建议进一步依据 GB/T 27825—2011 进行体内试验，对受试物的透皮吸收进行分析评价。
- b) 若皮下待测物含量大于零（即 $a_3 > 0$ ），则认为透皮吸收。

注：检出限以下的待测物含量被判定含量为零。

7 试验数据和报告

7.1 数据

应列出皮上、皮中和皮下部分各个时间点的重组胶原蛋白浓度，累计总量，占理论上样总量的比例。

7.2 试验报告

试验报告应包含以下内容。

- a) 受试物：
 - 1) 重组胶原蛋白分子量；
 - 2) 重组胶原蛋白标记所选用荧光分子，标记方法的简述；
 - 3) 重组胶原蛋白的标记效果；
 - 4) 受试物制备的方法；
 - 5) 受试物稳定性的考查。
- b) 试验条件：
 - 1) 皮肤来源和位置、制备方法、使用前的储藏条件、所有预处理（清洗、抗生素处理等）步骤、皮肤完整性测量、代谢状况等；
 - 2) 创面皮肤制备方法、制备方法选择的依据及理由等；
 - 3) 扩散池的设计、接收液的组分、接收液的温度、采样次数和规程；
 - 4) 分组设置、上样量、上样方法、上样时长、检测时长、取样间隔时长（若有）；
 - 5) 皮上部分重组胶原蛋白回收的详细操作；
 - 6) 皮中部分重组胶原蛋白回收的详细操作；
 - 7) 皮下部分重组胶原蛋白回收的详细操作；
 - 8) 检测方法、检出限确定的依据和方法，应讨论分析方法的有效性，尤其应结合重组胶原蛋

白的理论上样量讨论检出限的合理性；

9) 组织切片制备过程的详细操作。

c) 结果：

1) 皮上、皮中和皮下受试物检测的方法验证结果；

2) 皮上、皮中和皮下部分各个时间点的重组胶原蛋白浓度,累计总量,占理论上样总量的比例；

3) 皮上、皮中和皮下部分的每个反应池的受试物回收率；

4) 展示未经创面制备的离体组织和样品组的冰冻切片的白光观察及荧光观察图片(带有0.25 mm标尺),说明创面制备情况和重组胶原蛋白残留部位；

5) 透皮吸收与否的判断。

d) 结果讨论：

结合方法验证结果,讨论受试物回收率的合理性。结合受试物回收率结果及组织切片结果讨论受试物体外透皮吸收情况。

e) 结论。

附录 A

(资料性)

创面皮肤制备方法(胶带剥离法)

A.1 仪器/耗材

A.1.1 吸水纸

A.1.2 胶带:D-Squame[®]胶带、Scotch[®]胶带、Corneofix[®]胶带或是其他等效的通用型胶带。

A.1.3 经皮失水仪;delfin 经皮水分流失测量仪。

A.2 制备过程

A.2.1 Scotch[®]胶带剥离法

A.2.1.1 取符合试验要求的离体猪背部/腹部皮肤,用吸水纸吸干猪皮正反两面水分,角质层面朝上置于用石蜡膜覆盖的软木板上并拉伸。

A.2.1.2 将 Scotch[®]胶带(每 1 cm 宽度所需平均力为 1.0 N)由胶面覆盖在猪皮肤上,用手轻轻快速按压胶带,使胶带完全贴合在皮肤上,然后沿同一方向缓慢匀速剥离胶带。每次剥离都使用一条新的胶带,并将其放置在完全相同的区域上。每个部位重复剥离胶带 13 次~15 次,每剥离 2 次~3 次可用经皮失水仪监测经皮失水率,当经皮失水率在 $20 \text{ g}/(\text{m}^2 \cdot \text{h}) \sim 25 \text{ g}/(\text{m}^2 \cdot \text{h})$ 时,则停止剥离,认为皮肤创面制备完成。每次剥离后注意观察胶带上粘附的残留物。

A.2.1.3 按扩散池面积及试验所需的数量,将制备好的创面皮肤剪切成合适的尺寸进行试验。

A.2.2 D-Squame[®]胶带剥离法

A.2.2.1 取符合试验要求的离体猪背部/腹部皮肤,用吸水纸吸干猪皮正反两面水分,角质层面朝上置于用石蜡膜覆盖的软木板上并拉伸。

A.2.2.2 按扩散池面积及试验所需的数量,将制备猪皮剪切成适合的尺寸。

A.2.2.3 将圆形 D-Squame[®]胶带由胶面覆盖在猪皮肤上,使用配套 D-Squame[®]压力器($225 \text{ g}/\text{cm}^2$)将胶带按压 10 s(即快速按压 20 次),然后快速剥离胶带。每次剥离都使用一条新的胶带,并将其放置在完全相同的区域上。每个部位重复剥离胶带 4 次~7 次,每剥离 1 次可用经皮失水仪监测经皮失水率,当经皮失水率在 $20 \text{ g}/(\text{m}^2 \cdot \text{h}) \sim 25 \text{ g}/(\text{m}^2 \cdot \text{h})$ 时,则停止剥离,认为皮肤创面制备完成。每次剥离后注意观察胶带上粘附的残留物。

注 1: 由于角质层的过度剥离可能使离体皮肤组织无任何屏障功能,一般剥离次数越多,角质层破坏越严重,且表层物质去除量越多,皮肤屏障功能越差,建议不损伤到活性表皮层。

注 2: 胶带剥离法制备皮肤创面影响因素较多,为规范试验操作、避免偏差,各机构应在试验前进行探索、验证与操作演练,确保皮肤制备达到试验要求,建议各机构在预试验或前期探索时制定角质层剥离操作的 SOP。

附 录 B

(资料性)

创面皮肤制备方法(微针穿刺法)

B.1 耗材

B.1.1 皮肤点刺针

针体长度固定(0.25 mm)或可调,针体直径 0.2 μm 及以上,针体密度为 34 针/ cm^2 及以上。

B.1.2 皮肤滚针

针体长度为 0.25 mm,针体直径 0.2 μm 及以上,针体密度为 34 针/ cm^2 及以上。

B.2 制备过程

B.2.1 皮肤点刺针穿刺法

B.2.1.1 取符合试验要求的离体猪背/腹部皮肤,用吸水纸吸干猪皮正反两面水分,角质层面朝上置于用石蜡膜覆盖的软木板上并拉伸。

B.2.1.2 调整针体长度至 0.25 mm,将皮肤点刺针垂直于皮肤表面,同一点刺针面积的皮肤上至少穿刺一次进行皮肤创面制备。

B.2.1.3 按扩散池面积及试验所需的数量,将制备好的创面皮肤剪切成合适的尺寸进行试验。

B.2.2 皮肤滚针穿刺法

B.2.2.1 取符合试验要求的离体猪背/腹部皮肤,用吸水纸吸干猪皮正反两面水分,角质层面朝上置于用石蜡膜覆盖的软木板上并拉伸。

B.2.2.2 为了保持微针辊施加的力大致恒定,将其上具有皮肤的软木板放置在平坦表面厨房天平上。

B.2.2.3 将皮肤滚针应用于皮肤所有表面,滚动一次,滚动时施加力度保持在 4 N~5 N,即滚动时厨房秤显示 400 g~500 g。

B.2.2.4 按扩散池面积及试验所需的数量,将制备好的创面皮肤剪切成合适的尺寸进行试验。

注:每次试验使用新的皮肤点刺针或皮肤滚针,以保证微针无磨损,其穿刺所有产生的孔的穿透深度和半径在试验间保持大致恒定。

参 考 文 献

- [1] GB/T 27818—2011 化学品 皮肤吸收 体外试验方法
 - [2] GB/T 27825—2011 化学品 皮肤吸收 体内试验方法
 - [3] YY/T 1849 重组胶原蛋白
 - [4] 中华医学会皮肤性病学分会皮肤激光医疗美容学组,中华医学会皮肤性病学分会激光技术应用研究中心,中华医学会医学美学与美容学分会,等.微针治疗临床应用中国专家共识[J].实用皮肤病学杂志, 2022,15(4):193-196.
 - [5] Neupane R, Boddu SHS, Renukuntla J, et al.Alternatives to Biological Skin in Permeation Studies; Current Trends and Possibilities.Pharmaceutics.2020,12(2):152.
 - [6] Simon G A, Maibach H I.The pig as an experimental animal model of percutaneous permeation in man: qualitative and quantitative observations--an overview. Skin Pharmacology & Physiology, 2000, 13(5):229-234.
 - [7] Schreiber S, Mahmoud A , Vuia A, et al.Reconstructed epidermis versus human and animal skin in skin absorption studies.Toxicology in Vitro.2005,19(6):813-822.
 - [8] Testing and Assessment.28.Paris: 2004.OECD Guidance document for the conduct of skin absorption studies.OECD Environmental health and safety publications.
 - [9] Draft In Vitro Permeation Test Studies for Topical Drug Products Submitted in ANDAs. FDA.2022.
 - [10] Draft Guidance on Acyclovir.FDA.2022.
 - [11] Henning A, Schaefer UF, Neumann D.Potential pitfalls in skin permeation experiments: influence of experimental factors and subsequent data evaluation.Eur J Pharm Biopharm. 2009 Jun;72(2): 324-331.
 - [12] Löffler H, Dreher F, Maibach HI.Stratum corneum adhesive tape stripping: influence of anatomical site, application pressure, duration and removal. Br J Dermatol. 2004 Oct; 151(4): 746-752.
 - [13] Draft guideline on quality and equivalence of topical products.EMA.2018.
 - [14] 中华人民共和国药典
 - [15] 皮肤外用化学仿制药研究技术指导原则(试行)
-

广东省医疗器械管理学会
团 体 标 准
重组胶原蛋白医用敷料体外透皮吸收
评价指南(荧光标记法)
T/GDMDMA 0029—2023

*

中国标准出版社出版发行
北京市朝阳区和平里西街甲2号(100029)
网址 www.spc.net.cn
总编室:(010)68533533 发行中心:(010)51780238
读者服务部:(010)68523946
中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销

*

开本 880×1230 1/16 印张 1 字数 21 千字
2025 年 3 月第 1 版 2025 年 3 月第 1 次印刷

*

书号: 155066 • 5-10233 定价 31.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换
版权专有 侵权必究
举报电话:(010)68510107

