

《敷料中重组胶原蛋白的检测 液相色谱-质谱/质谱法》
编制说明

编制单位：西安巨子生物基因技术股份有限公司

编制日期：2024 年 10 月 23 日

《敷料中重组胶原蛋白的检测 液相色谱-质谱/质谱法》

编制说明

一、任务来源

（一）任务来源

本标准由中国化工学会提出并归口，由西安巨子生物基因技术股份有限公司牵头制定。

（二）标准制定的目的和意义

重组胶原蛋白是采用重组 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、酵母和其他真核细胞等）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。由于其具有良好的生物相容性、生物功效性以及安全性，被广泛地应用于化妆品、医用敷料等产品中。

近几年，随着化妆品、医美等下游应用领域的飞速发展，重组胶原蛋白产业呈现欣欣向荣的景象，对重组胶原蛋白的需求不断增大，市场规模不断扩大，2021 年中国重组胶原蛋白市场规模达 108 亿元，预计 2027 年中国重组胶原蛋白市场规模将达到 1083 亿元。同时，重组胶原蛋白日用化学产品数量也出现了急剧的增加。

重组胶原蛋白因不同厂家氨基酸序列或者表达体系等的不同而形式多样，如不同型别或不同型别组合，单链或有三螺旋结构的三聚体，全长、片段或片段编辑拼接等。产品中重组胶原蛋白的含量和特性是影响产品的关键因素，虽然目前蛋白质含量测定可参考《中华人民共和国药典》（2020 年版 四部）通则 0731 中的方法，包括凯氏定氮法、福林酚法（Lowry 法）、双缩脲法、2,2'-联喹啉-4,4'-二羧酸法（BCA 法）、考马斯亮蓝法（Bradford 法）以及紫外-可见分光光度法，但是以上方法均是常规的蛋白质含量测定方法，无法区分重组胶原蛋白和其他蛋白分子。已发布的 YY/T 1849-2022《重组胶原蛋白》、YY/T 1888-2023《重组人源化胶原蛋白》原材料行业标准，仅适用于重组胶原蛋白原材料的鉴别和含量检测。YY/T 1805.3-2022《组织工程医疗器械产品胶原蛋白 基于特征多肽测定的胶原蛋白含量检测方法--液相色谱-质谱法》行业标准，是针对组织提取的牛 I 型、牛 II 型和猪 I 型胶原蛋白给出的具体方法，且仅适用于纯化的胶原蛋白。而日用化学产品中的重组胶原蛋白是存在于复杂基质中，应用以上方法均难以鉴别和准确检测。导致市场上日用化学产品存在微量添加、含量不清、质量良莠不齐等问题，所以急需制定相关的标准来规范行业的发展。

二、起草工作简要过程

按照中国化工学会标准制修订程序的要求，《敷料中重组胶原蛋白的定性定量检测—液相色谱-质谱法》团体标准的编制完成了以下工作：

（一）资料的收集

在标准编制过程中，起草工作组收集了以下资料，包括但不限于相关标准、期刊文献等：

— 《中华人民共和国药典》（2020 年版 四部）

— YY/T 1805.3-2022《组织工程医疗器械产品 胶原蛋白 第 3 部分：基于特征多肽测定的胶原蛋白含量检测—液相色谱-质谱法》

— YY/T 1849-2022《重组胶原蛋白》

— YY/T 1888-2023《重组人源化胶原蛋白》

— 胡欢,李云兰,张蕪,等.重组胶原蛋白在生物医药方面的应用[J/OL].生物化学与生物物理进展,1-27

— 张亚,孙欣,王瑞妍.重组Ⅲ型胶原蛋白在护肤品和药械领域的应用综述[J].上海轻工业,2024,(04):133-135

— 程娟,刘雯恩,黄敏菊,等.双缩脲法测定胶原贴敷料中I型胶原蛋白含量[J].中国医疗器械信息,2019,25(11):18-20

— 张成,杨海燕.比色法测定胶原蛋白贴敷料中胶原蛋白的含量[J].中国医疗器械信息,2013,19(01):26-28

（二）标准的起草

1. 2024 年 6 月至 2024 年 9 月，项目组完成标准的前期预研工作。

2. 2024 年 10 月，召开标准启动会，成立起草工作组，正式启动《敷料中重组胶原蛋白的检测 液相色谱-质谱/质谱法》的团体标准编制工作，根据启动会企业代表意见，修改完成《敷料中重组胶原蛋白的检测 液相色谱-质谱/质谱法》工作组初稿。

3. 2024 年 11 月至 2025 年 1 月，工作组成员根据启动会讨论内容和要求，开展验证试验，按照标准指标项要求，开展了产品指标数据验证试验，并在此基础上统一各方意见，形成标准征求意见稿。

（三）主要参加单位和工作组成员

标准起草单位为西安巨子生物基因技术股份有限公司、陕西巨子生物技术有限公司、陕西巨丽康生物技术有限公司、江苏创健医疗科技股份有限公司，具体情况如表 1 所示。

表 1 主要参加单位和工作组成员表

成员姓名	所在单位	专业方向	邮箱
范代娣	西北大学	生物化工	fandaidi@nwu.edu.cn
贾利平	西安巨子生物基因技术股份有限公司	生物化工	liping.jia@xajuzi.com

三、编写原则和确定标准主要内容的依据

（一）标准的编写原则

本标准的编制过程遵循规范性、功能特性、可证实性、可操作性、科学性、合理性以及持续改进等基本原则，格式上按照 GGB/T 1.1《标准化工作导则 第1部分：标准的结构和编写》、GB/T 20000《标准化工作指南》、GB/T 20001《标准编写规则》、GB/T 20002《标准中特定内容的起草》要求进行编写。

（二）确定标准主要内容的依据

技术层面上，参考了 YY/T 1849-2022《重组胶原蛋白》、国家药监局发布的《重组胶原蛋白类医疗产品分类界定原则》通告（2021 年第 27 号）和《重组胶原蛋白创面敷料等 2 项医疗器械产品注册审查指导原则》通告（2023 年第 16 号），此外，还有相关的技术共识、行业指南以及相关期刊论文等，如《医用胶原蛋白类产品的表征和质量控制》等，为胶原蛋白类产品的质量控制和评价提供了参考，由此开展相关起草工作。

四、技术经济分析论证和预期的经济效益

1、技术经济分析论证

重组胶原蛋白作为一种重要的生物材料，在医疗、美容护肤等多个领域具有广泛的应用。随着技术的不断进步和市场需求的不断增长，相关的标准制定显得尤为重要。本分析旨在探讨敷料中重组胶原蛋白定性定量检测相关标准的技术经济影响，主要体现在自筹经费以及经费总额的预算。自筹经费需要通过行业合作、企业资助等渠道进行，主要投入于相关标准验证的材料费、差旅费、仪器运行费等，目前本标准中所涉及的试验仪器及材料均为分析化学领域常用设备，如 HPLC 色谱仪、质谱仪等，不会对实施单位产生较大的生产经营成本，加之在胶原蛋白医药等大健康产业的快速发展下，对相关产品的促进作用也日益显著，据数据预测，2024 年胶原蛋白市场规模将达到 17.8 亿美元且复合年增长率为 6.16%左右。作为敷料用原料之一，通过准确判断重组胶原蛋白的含量和特性对敷料等相关产业经济发展意义重大，预计到 2030 年，中国重组胶原蛋白产品市场将达到 2193.8 亿元，市场将实现蓬勃发展，技术经济性较为突出。

2、预期的经济效益

重组胶原蛋白型别分类较多，不同重组胶原蛋白具有不同功效，目前以重组胶原蛋白为标志性成分的原料在敷料领域已使用多年，但各厂家检测重组胶原蛋白的方法多种，差异较大，重组胶原蛋白种类也没有对应的鉴别要求，导致市场上原料质量参差不齐，主要原因是没有统一且特异性的标准对其原料进行质量规定。该项目主要涉及建立法规标准，对重组胶原蛋白类敷料原料进行规范化质量检测管理。使相关产品中重组胶原蛋白类别、含量的指标明确化，杜绝各企业对其原料混淆消费者视听，进行夸大宣传。随着目前行业中对重组胶原蛋白检测手段更加成熟准确，涵盖范围更广泛，建立适合重组胶原蛋白敷料原料的质量标准具有必要性及可行性。该项目落地实现后，将有利于重组胶原蛋白类相关原料的各质量指标清晰化管理，为其他敷料原料定性定量检测管理提供模板和思路，有利于促进该行业的健康发展，创造经济效益。

益。

该项目是在《中华人民共和国药典》、YY/T 1805.3-2022《组织工程医疗器械产品 胶原蛋白 第3部分：基于特征多肽测定的胶原蛋白含量检测—液相色谱-质谱法》、YY/T 1849-2022《重组胶原蛋白》、YY/T 1888-2023《重组人源化胶原蛋白》等现行的法律法规和国家标准、行业标准以及期刊论文的基础上，提供的作为敷料用重组胶原蛋白原料的定性定量检测方法，有利于完善重组胶原蛋白类敷料原料的质量体系。

五、采用国际标准和国外先进标准情况及水平对比

目前已发布相关行业标准3项，暂无相关国际标准的发布。

六、与现行法律、法规、政策及相关标准的协调性

关于重组胶原蛋白相关的法律法规主要包括以下三个方面：

国家及行业标准：目前国内还未发布有关重组胶原蛋白领域的强制性国家标准，相关的行业标准有YY/T 1849-2022《重组胶原蛋白》、YY/T 1805.3-2022《组织工程医疗器械产品 胶原蛋白 第3部分：基于特征多肽测定的胶原蛋白含量检测—液相色谱-质谱法》、YY/T 0954-2015《无源外科植入物-I型胶原蛋白植入剂》以及YY/T 1888-2023《重组人源化胶原蛋白》。这些标准涵盖了重组胶原蛋白的质量控制要求、检测指标及其方法，以及相关产品如胶原蛋白植入剂的要求和检验方法等。本标准在以上标准基础上提供了针对相关重组胶原蛋白特异性定性定量检测的方法，完善了重组胶原蛋白相关标准体系和全面质量评价，为上述标准做出了补充。

相关法律法规：包括但不限于《重组胶原蛋白生物材料命名指导原则》、《重组胶原蛋白类医疗产品分类界定原则》、《重组胶原蛋白创面敷料注册审查指导原则》以及《化妆品监督管理条例》等，这些法律法规为敷料中重组胶原蛋白的定性定量检测提供了科学的评估方法、依据和规范，相关标准和产品开发需要遵循这些法律法规的要求。

整体来看，该项《敷料中重组胶原蛋白的定性定量检测—液相色谱-质谱法》的标准与相关标准、法律法规相互配套，共同构成了一个完整的监管体系，旨在确保产品的安全性、有效性和合规性，促进产业的健康发展。

七、贯彻实施标准的措施和建议

1. 宣传材料制作

制作标准实施目的、内容等宣传手册，以便在不同场合进行宣传。

2. 网络推广

通过社交媒体、电商平台、行业网站发布相关标准实施信息，并开展网上授课等方式对标准实施进行解读和培训。

3.合作推广

与不同地区审评、监督部门合作，促进标准的正确使用。

4.人才培养

在公司内部、或地区范围内进行相关人员培训，在科研机构院校，鼓励科学研究过程中使用该标准进行原料质量检测。

八、其他应予以说明的事项

无。

附录 试验数据

敷料中重组 III 型胶原蛋白定性定量检测

A.1 仪器、试剂及其配制

A.1.1 仪器和设备

液相色谱柱：十八烷基硅烷键合硅胶柱（粒径 5 μm ，150 mm $\times$ 2.1 mm）。其它见标准正文的条款5。

A.1.2 供试品、对照品及试剂

供试品：医用重组III型胶原蛋白喷剂敷料（以下简称为喷剂敷料，液体状）、医用重组III型胶原蛋白修复敷料（以下简称为修复敷料，乳膏状）、医用重组III型胶原蛋白敷料液（以下简称为敷料液，凝胶状）。

对照品：重组III型胶原蛋白原料，是供试品的功能成分，冻干粉，纯度大于95 %，用于定性鉴别和定量检测的标准样品。

基质对照样品：对应于三种敷料的供试品基质（除重组III型胶原蛋白原料之外的所有组分）。

其它试剂见标准正文相应条款。

A.1.3 溶液配制

见标准正文条款5.3。

A.2 定性鉴别和定量检测方法

A.2.1 特征多肽设计和确认

按正文6.1条款的要求进行供试品特异性特征多肽的设计。将供试品所含重组胶原蛋白的理论氨基酸序列以胰蛋白酶进行理论酶切，收集所有肽段信息，利用BioFinder软件进行分析，检索高度匹配的重组III型胶原蛋白肽段，与蛋白数据库中不同种属来源和不同型别的胶原蛋白序列进行Blast多序列比对，根据正文6.1条款的筛选原则，筛选仅存在于供试品（人III型胶原蛋白）的肽段，且不存在于常见的哺乳动物的肽段作为重组III型胶原蛋白供试品特异性的特征肽段，并且确认所选择用于定性定量的特征肽段不存在特异性修饰。

将供试品所含重组胶原蛋白原料按正文6.4条款进行胰蛋白酶酶解和特征多肽检测，确认所选择的供试品特异性特征多肽具有足够的信号强度和良好的分离度，谱峰清晰，理论塔板数：>4000。特征多肽确认的色谱质谱条件如下：

A.2.1.1 色谱条件

流动相A相为含0.1%甲酸水溶液；流动相B相为含0.1%甲酸乙腈溶液；色谱柱为Peptide CSH C18（1.0 $\times$ 150 mm，1.7 μm ）；流速为0.1 mL/min；柱温为60 $^{\circ}\text{C}$ ；进样量为5 μL ；洗脱梯度见表A.1。

表A.1 液相色谱洗脱梯度

时间 (min)	A%	B%
0	98	2
80	70	30
90	10	90
100	10	90
110	98	2
120	98	2

A.2.1.2 质谱条件

根据不同的质谱仪器设定相应的参数，参考条件如下：

离子源喷雾电压：3.5 kV；

毛细管温度：320 °C；

鞘气流速：19.8 mL/min；

辅助器流速：5 psi；

扫描模式：正离子扫描；

scan event 1为full scan，扫描范围：m/z 400–2000，分辨率：60000，RF Lens：45%，Normalized AGC Target：300%，最大离子注入时间为：100 ms；

scan event 2为data dependent MS/MS，分辨率：15000，Isolation Window：m/z 1.6，最大离子注入时间为；200 ms，Normalized AGC Target：100%，碰撞能量：30%，循环时间为2 s。

A.2.2 方法学确认

按正文6.2条款的要求进行样品准备，具体见A.2.3.4和A.2.3.5。

A.2.3 样品前处理

A.2.3.1 供试品样品

精密量取喷剂敷料（液体状）2 mL 于 10 mL 离心管中；精密称取修复敷料（乳膏状）和医凝胶敷料（凝胶状）各 2 g，分别置于 10 mL 离心管中，冷冻干燥。向冻干后的喷剂敷料中加入0.1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0) 溶液 2 mL，磁力搅拌 20~30 min，使敷料基质充分溶解并混合均匀，备用；分别向

修复敷料和敷料液中分别加入 0.1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0) 溶液 4mL, 磁力搅拌 20~30 min, 使敷料基质充分混合均匀, 备用。

A. 2. 3. 2标准样品母液

精密称取 5.0 mg 重组 III 型胶原蛋白原料置于 5 mL 离心管中, 加入 2 mL 0.1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0) 溶解, 转移至 10 mL 容量瓶中, 用 0.1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0) 定容至 10 mL。

A. 2. 3. 3基质对照样品

A. 2. 3. 3. 1喷剂敷料基质对照样品溶液

准确量取 5 mL 喷剂敷料基质对照样品, 冷冻干燥, 加入 5 mL 0.1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0) 复溶, 磁力搅拌 20~30 min, 使敷料组分充分溶解并混合均匀备用。

A. 2. 3. 3. 2修复敷料基质对照样品溶液

准确量取 2 g 修复敷料基质对照样品, 冷冻干燥, 加入 4 mL 0.1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0) 复溶, 磁力搅拌 20~30 min, 使敷料组分充分混合均匀备用。

A. 2. 3. 3. 3敷料液基质对照样品溶液

准确量取 2 g 敷料液基质对照样品, 冷冻干燥, 加入 4 mL 0.1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0) 复溶, 磁力搅拌 20~30 min, 使敷料组分充分混合均匀备用。

A. 2. 3. 4检测限和定量限确认样品

分别向喷剂敷料、修复敷料以及敷料液的基质对照样品中添加不同量的低浓度重组 III 型胶原蛋白原料溶液后, 按与 A. 2. 3 a) 供试品样品相同的前处理方法进行处理。

A. 2. 3. 4. 1喷剂敷料基质对照样品中添加重组 III 型胶原蛋白原料终浓度至 0.1 ng/mL、0.5 ng/mL、1 ng/mL、2 ng/mL、4 ng/mL;

A. 2. 3. 4. 2修复敷料基质对照样品中添加重组 III 型胶原蛋白原料终浓度至 0.1 ng/g、0.5 ng/g、1 ng/g、2 ng/g、4 ng/g;

A. 2. 3. 4. 3敷料液基质对照样品中添加重组 III 型胶原蛋白原料终浓度至 0.1 ng/g、0.5 ng/g、1 ng/g、2 ng/g、4 ng/g。

A. 2. 3. 5检测回收率分析样品

A. 2. 3. 5. 1在喷剂敷料的基质对照样品中分别添加高中低剂量的重组 III 型胶原蛋白原料, 如: 10 µg/mL、50 µg/mL、100 µg/mL 和 200 µg/mL, 按与 A. 2. 3. 1) 供试品样品相同的前处理方法进行处理。

A. 2. 3. 5. 2在修复敷料和敷料液的基质对照样品中分别添加高中低剂量的重组 III 型胶原蛋白原料, 如: 10 µg/g、50 µg/g、100 µg/g 和 200 µg/g, 按与 A. 2. 3. 1) 供试品样品相同的前处理方法进行处理。

A. 2. 4 试样制备

A. 2. 4. 1 样品溶解

因供试品所含的重组III型胶原蛋白为单链，不含三螺旋结构或多聚体，无需变性溶解处理。

A. 2. 4. 2 样品酶解

A. 2. 4. 2. 1标准样品酶解及标准工作液配制

A. 2. 4. 2. 1. 1取 1 mL 重组 III 型胶原蛋白标准样品母液[A. 2. 3. 2]，与 40 μg 胰蛋白酶混合，于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温震荡反应器中，反应 24 h，加入 100 μL 10 %甲酸溶液，终止酶解反应；

A. 2. 4. 2. 1. 2精密吸取适量的重组 III 型胶原蛋白原料酶解液[A. 2. 4. 2. 1. 1]，分别用[A. 2. 3. 3]中制备的相应基质对照样品溶液稀释成浓度为 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 、1 $\mu\text{g/mL}$ 、5 $\mu\text{g/mL}$ 、10 $\mu\text{g/mL}$ 、20 $\mu\text{g/mL}$ 、50 $\mu\text{g/mL}$ 、100 $\mu\text{g/mL}$ 、200 $\mu\text{g/mL}$ 的系列标准工作液，用于定量标准曲线绘制。

A. 2. 4. 2. 1. 3将 A. 2. 4. 2. 1. 2中的标准工作溶液继续用基质对照样品溶液稀释至更低浓度的系列溶液，用于定量限和检测限确认。

A. 2. 4. 2. 2供试品样品酶解

取前处理后的供试品样品溶液[A. 2. 3. 1)] 500 μL 加入酶解小瓶中（含胰蛋白酶 20 μg ），于37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温震荡反应器中，反应 24 h，加入 50 μL 10 %甲酸溶液，终止反应，离心（3000 g，10 min），取上清液待用。

A. 2. 4. 2. 3检测限和定量限确认样品酶解

取前处理后的检测限和定量限确认样品[A. 2. 3. 4]，按[A. 2. 4. 2. 2]进行酶解。

A. 2. 4. 2. 4检测回收率分析样品

取前处理后的检测回收率分析样品[A. 2. 3. 5]，按[A. 2. 4. 2. 2]进行酶解。

A. 2. 4. 3 色谱质谱条件

A. 2. 4. 3. 1 色谱条件

流动相A相为含0.1 %甲酸的水溶液，B 相为乙腈溶液（0.1 %甲酸），流速为0.2 mL/min，柱温为30 $^{\circ}\text{C}$ ，进样量为5 μL ，色谱柱为十八烷基硅烷键合硅胶柱（粒径5 μm ，150 mm $\times$ 2.1 mm），洗脱条件见表A. 2。

表A. 2 液相色谱洗脱梯度

时间 (min)	A%	B%
0.00	95	5
0.50	55	45
2.00	45	55
8.00	35	65

8.10	95	5
10.00	95	5

注：以上液相色谱操作条件是典型操作参数，可根据不同仪器的特点，对操作参数作适当调整，以获得最佳效果。

A.2.4.3.2 质谱条件

根据不同的质谱仪器设定相应的参数，参考条件见表A.3：

离子源：电喷雾离子源；

扫描方式：正离子扫描；

喷雾电压：3.5 kV；

离子源蒸发温度：300℃。

表A.3 监测离子通道

检测方式	Precursor m/z	Product m/z
PF-III 特征多肽	526.71	371.97
		625.22

注1：以上质谱操作条件是典型操作参数，可根据不同仪器的特点，对操作参数作适当调整，选取最优SRM条件检测。

注2：优先选择受试物相对应的子离子碎片，推荐使用受试物m/z 526.71→625.21作为定量离子通道。

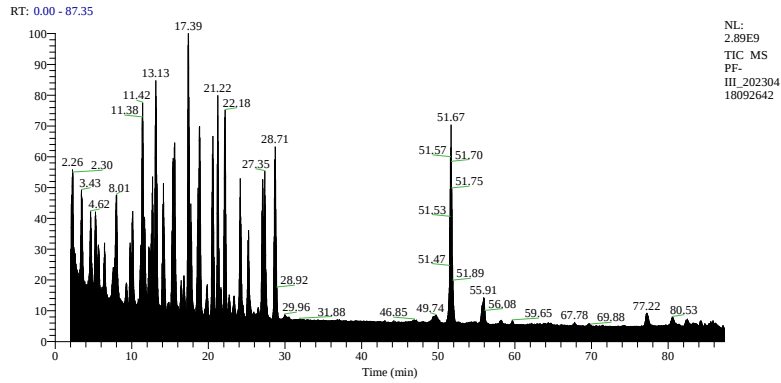
A.2.5 定性鉴别和定量检测

按标准正文的6.5和6.6条款进行定性鉴别和定量检测。

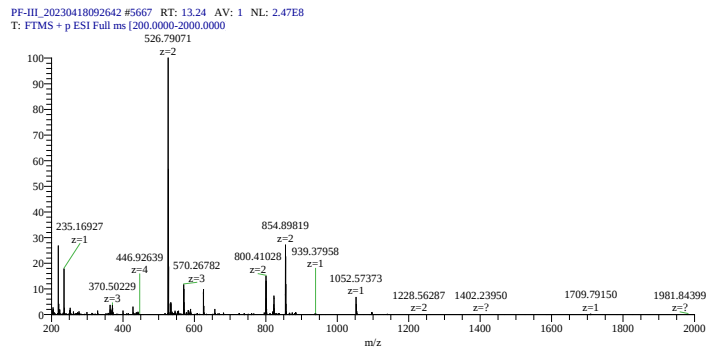
A.3 结果

A.3.1 特征多肽设计和确认

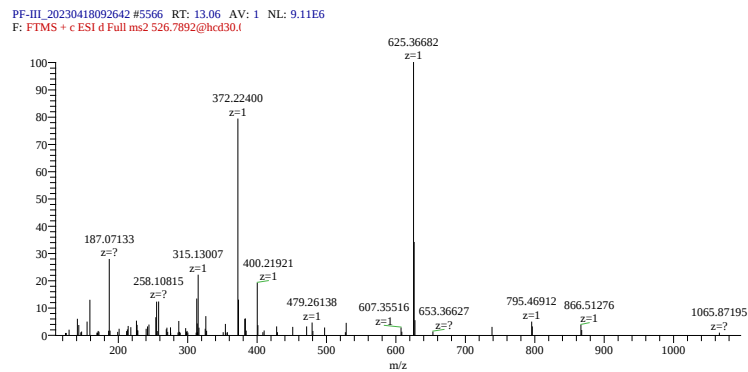
重组III型胶原原料样品胰蛋白酶酶解产物的总离子流图（图A.1）经过BioFinder软件分析，检索到m/z 526.79042的一级质谱图（图A.2）表明该离子带双电荷，其分子量与多肽GEAGIPGVPGAK的理论分子量一致，m/z 526.79042的二级质谱图（图A.3）的碎片离子与多肽GEAGIPGVPGAK的理论碎片离子高度匹配，因此，该样品中存在多肽GEAGIPGVPGAK。通过Blast多序列比对及Uniprot网站搜索，此多肽不存在于人的其它类型胶原蛋白及其它常见哺乳动物（牛、猪、大鼠、小鼠、马、兔子等）的胶原蛋白序列中。因此，多肽GEAGIPGVPGAK可作为本示例中供试品重组III型胶原蛋白原料的特异性特征多肽，用于供试品的定性鉴别分析和定量检测。



图A.1 重组III型胶原蛋白原料酶解产物总离子流图



图A.2 重组III型胶原蛋白原料酶解产物中m/z 526.79042的一级质谱图

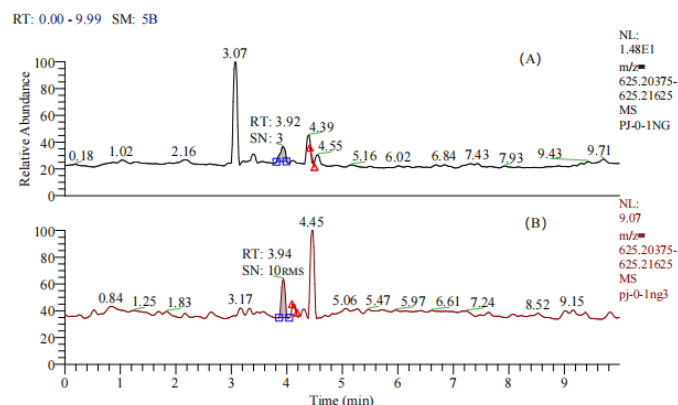


图A.3 重组III型胶原蛋白原料酶解产物中m/z 526.79042的二级质谱图

A. 3. 2 方法学验证

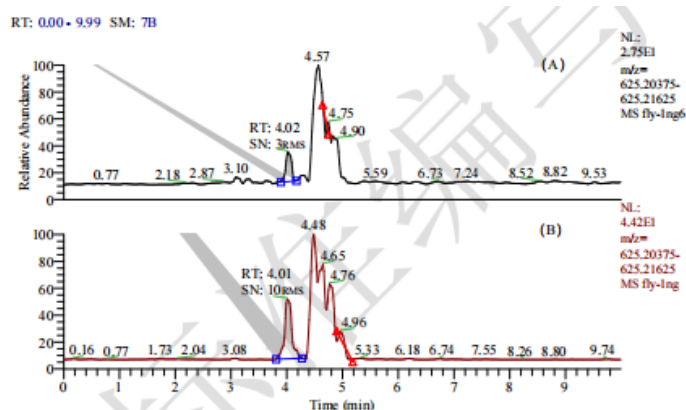
A. 3. 2. 1 检测限和定量限的确认

A. 3. 2. 1. 1 喷剂敷料中添加重组 III 型胶原蛋白原料终浓度为 0.5 ng/mL、1 ng/mL 的质谱图见图 A. 4。终浓度为 1 ng/mL 的特征多肽质谱信噪比 S/N 为 10，终浓度为 0.5 ng/mL 的特征多肽质谱信噪比 S/N 为 3，因此，确定喷剂敷料产品的重组 III 型胶原蛋白原料检测限为 0.5 ng/mL、定量限为 1 ng/mL。



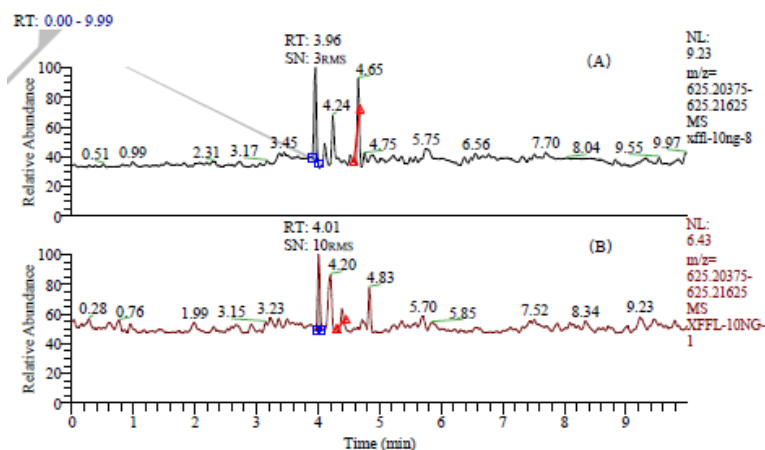
图A.4 喷剂敷料中重组III型胶原蛋白原料终浓度为0.5 ng/mL (A)、1 ng/mL (B) 的特征多肽质谱图

A.3.2.1.2敷料液中添加重组 III 型胶原蛋白原料终浓度为 0.5 ng/g、1 ng/g 的质谱图见图 A.5。终浓度为 1 ng/g 的特征多肽质谱信噪比 S/N 为 10，终浓度为 0.5 ng/g 的特征多肽质谱信噪比 S/N为 3，因此，确定敷料液的重组 III 型胶原蛋白原料检出限为 0.5 ng/g、定量限为 1 ng/g。



图A.5 凝胶敷料中重组III型胶原蛋白原料终浓度为0.5 ng/g (A)、1 ng/g (B) 的特征多肽质谱图

A.3.2.1.3修复敷料中添加重组 III 型胶原蛋白原料终浓度为 1 ng/g、2 ng/g 的质谱图见图 A.6。终浓度为 2 ng/g 的特征多肽质谱信噪比 S/N 为 10，终浓度为 1 ng/g 的特征多肽质谱信噪比 S/N 为3，因此，确定修复敷料产品的重组 III 型胶原蛋白原料检出限为 1 ng/g、定量限为 2 ng/g。

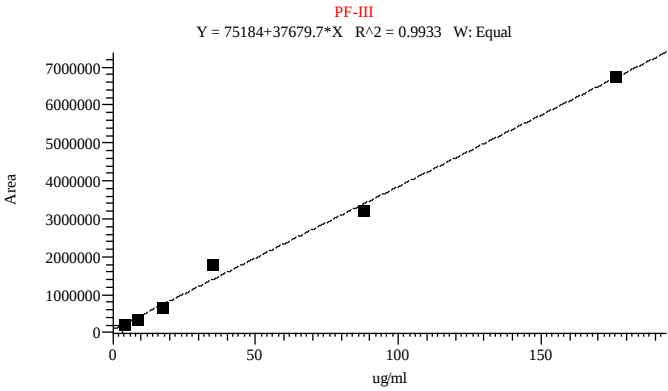


图A. 6 修复敷料中重组III型胶原蛋白原料终浓度为1 ng/g (A)、2 ng/g (B) 的特征多肽质谱图

A. 3. 2. 2 添加回收率确认

A. 3. 2. 2. 1 喷剂敷料

将喷剂敷料基质对照样品作为溶液配制不同重组III型胶原原料浓度的标准溶液，进行HPLC-MS/MS分析，得到的标准曲线见图A. 7。添加浓度为100 $\mu\text{g/mL}$ 和200 $\mu\text{g/mL}$ 的医用重组III型胶原蛋白喷剂敷料的特征多肽质谱图见图A. 8；添加浓度为10 $\mu\text{g/mL}$ 和50 $\mu\text{g/mL}$ 的医用重组III型胶原蛋白喷剂敷料的特征多肽质谱图见图A. 9；利用标准曲线计算得到医用重组III型胶原蛋白喷剂敷料基质对照样品前处理的重组III型胶原蛋白添加回收率见表A. 4。结果表明，喷剂敷料基质中添加浓度为10 $\mu\text{g/mL}$ 、50 $\mu\text{g/mL}$ 、100 $\mu\text{g/mL}$ 和200 $\mu\text{g/mL}$ 的重组III型胶原蛋白原料的回收率均在79%~88%之间，平均回收率均大于80%，符合添加回收率的要求。



图A. 7 喷剂敷料中重组III型胶原蛋白标准曲线

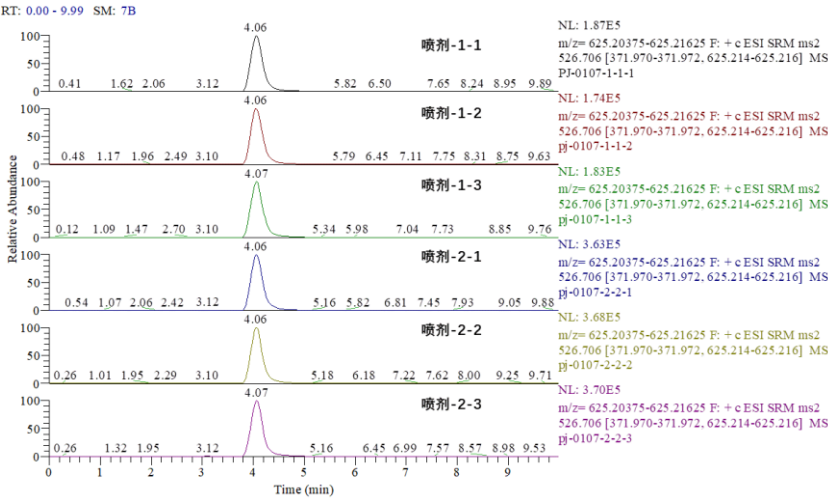


图 A. 8 喷剂敷料基质对照中重组 III 型胶原原料添加浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 和 200 $\mu\text{g/mL}$ 的特征多肽质谱图

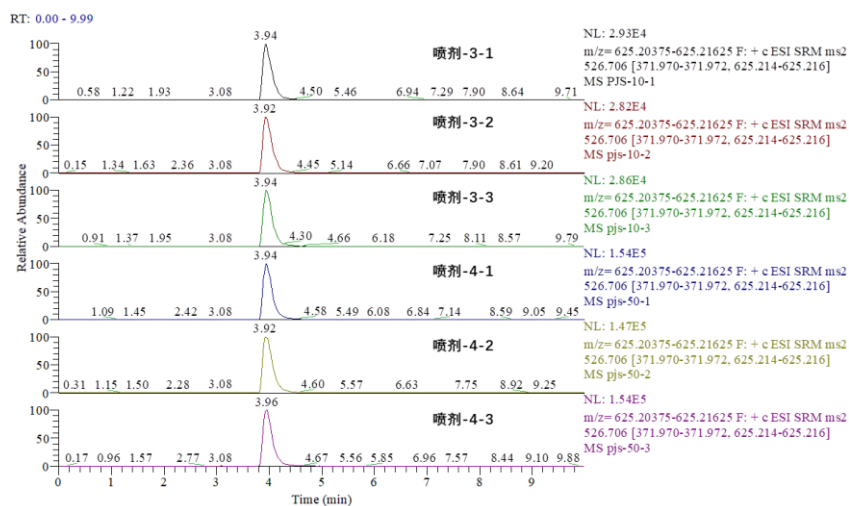


图 A.9 喷剂敷料基质对照中重组 III 型胶原原料添加浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ 和 50 $\mu\text{g/mL}$ 的特征多肽质谱图

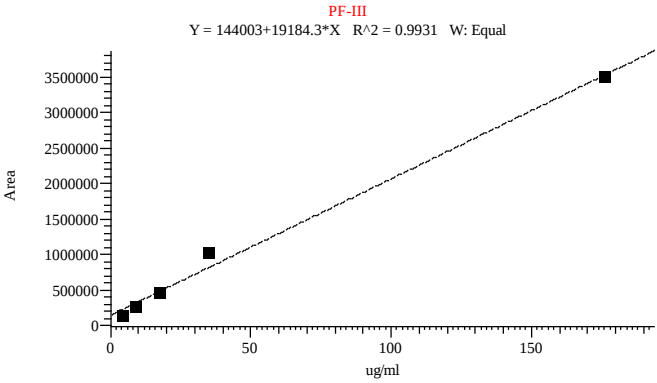
表 A.4 喷剂敷料重组 III 型胶原蛋白原料添加检测回收率结果

编号	原料添加浓度%	峰面积 mAU	浓度 $\mu\text{g/mL}$	体积 mL	质量 μg g	添加 量 μg g	回收 率%	平均回收 率%
喷剂-1-1	0.01%	3029959. 25	77.89	0.55	42.84	50	85.68	83.07
喷剂-1-2	0.01%	2828740. 23	72.67	0.55	39.97	50	79.94	
喷剂-1-3	0.01%	2956585. 47	75.99	0.55	41.79	50	83.59	
喷剂-2-1	0.02%	5836400. 56	150.70	0.55	82.89	100	82.89	82.78
喷剂-2-2	0.02%	5755385. 66	148.60	0.55	81.73	100	81.73	
喷剂-2-3	0.02%	5895548. 11	152.23	0.55	83.73	100	83.73	
喷剂-3-1	0.001%	355905.2	7.29	0.55	4.01	5	80.21	80.26

		3						
喷剂-3-2	0.001%	3576781. 37	7.33	0.55	4.03	5	80.63	
喷剂-3-3	0.001%	354738.1 6	7.27	0.55	4.00	5	79.95	
喷剂-4-1	0.005%	1865047. 23	39.03	0.55	21.47	25	85.87	
喷剂-4-2	0.005%	1939380. 61	40.60	0.55	22.33	25	89.32	87.85
喷剂-4-3	0.005%	1918181. 11	40.15	0.55	22.09	25	88.34	

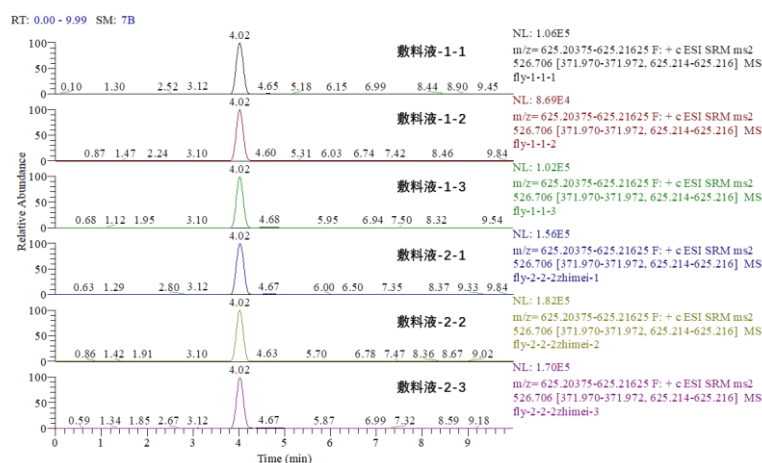
A.3.2.2.2 敷料液

将敷料液基质对照样品作为溶液配制不同浓度重组 III 型胶原蛋白原料的标准溶液，进行 HPLC-MS/MS 分析，得到的标准曲线见图 A.10。

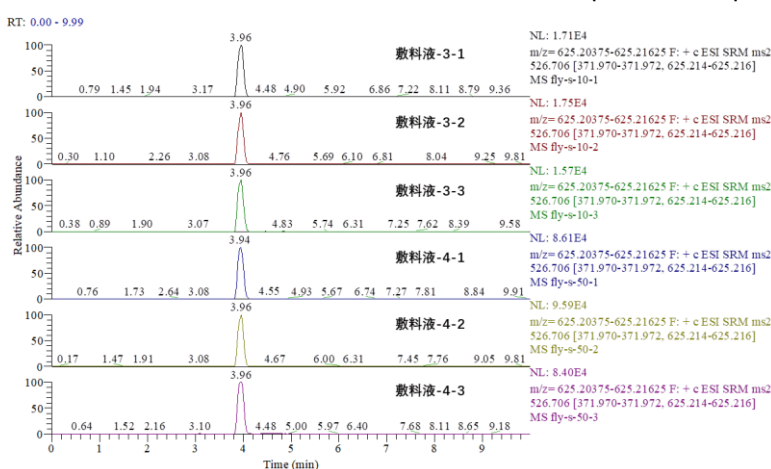


图A.10 敷料液中重组III型胶原蛋白原料标准曲线

敷料液中添加浓度为 100 $\mu\text{g/g}$ 和 200 $\mu\text{g/g}$ 重组 III 型胶原蛋白原料的特征多肽质谱图见图 A.11；
添加浓度为 10 $\mu\text{g/g}$ 和 50 $\mu\text{g/g}$ 重组 III 型胶原蛋白原料的特征多肽质谱图见图 A.12；



图A. 11 敷料液空白基质中重组III型胶原蛋白原料添加浓度为100 $\mu\text{g/g}$ 和200 $\mu\text{g/g}$ 的特征多肽质谱图



图A. 12 敷料液空白基质中重组III型胶原蛋白原料添加浓度为10 $\mu\text{g/g}$ 和50 $\mu\text{g/g}$ 的特征多肽质谱图

利用标准曲线计算得到敷料液样品前处理的重组 III 型胶原蛋白原料的添加回收率见表 A. 5，结果表明，敷料液基质中重组 III 型胶原蛋白原料添加浓度为 10 $\mu\text{g/g}$ 、50 $\mu\text{g/g}$ 、100 $\mu\text{g/g}$ 和 200 $\mu\text{g/g}$ 的回收率均在 80%~112%之间，符合添加回收率的要求。

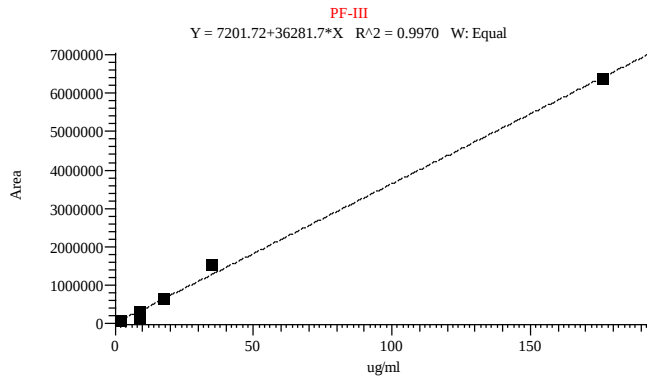
表 A. 5 敷料液重组 III 型胶原蛋白原料添加检测回收率结果

编号	原料添加 浓度%	峰面积 mAU	浓度 $\mu\text{g/mL}$	体积 mL	质量 μg	理论添 加质量 μg	回收 率%	平均回 收率%
敷料液 -1-1	0.01%	1123970.8 9	50.90	0.55	28.00	25	111.98	102.59
敷料液 -1-2	0.01%	925612.60	41.29	0.55	22.71	25	90.83	

敷料液 -1-3	0.01%	1058012.6 6	47.70	0.55	26.24	25	104.95	
敷料液 2-1	0.02%	1760609.6 9	81.76	0.55	44.97	50	89.94	93.66
敷料液 2-2	0.02%	1936988.3 8	90.31	0.55	49.67	50	99.34	
敷料液 2-3	0.02%	1794006.4 3	83.38	0.55	45.86	50	91.72	
敷料液 -3-1	0.001%	144161.67	3.79	0.55	2.08	2.5	83.29	80.02
敷料液 -3-2	0.001%	139135.65	3.67	0.55	2.02	2.5	80.71	
敷料液 -3-3	0.001%	130944.74	3.46	0.55	1.90	2.5	76.06	
敷料液 -4-1	0.005%	733578.69	20.10	0.55	11.05	12.5	88.42	92.01
敷料液 -4-2	0.005%	792388.49	21.73	0.55	11.95	12.5	95.59	
敷料液 -4-3	0.005%	763161.16	20.92	0.55	11.50	12.5	92.03	

A. 3. 2. 2. 3修复敷料

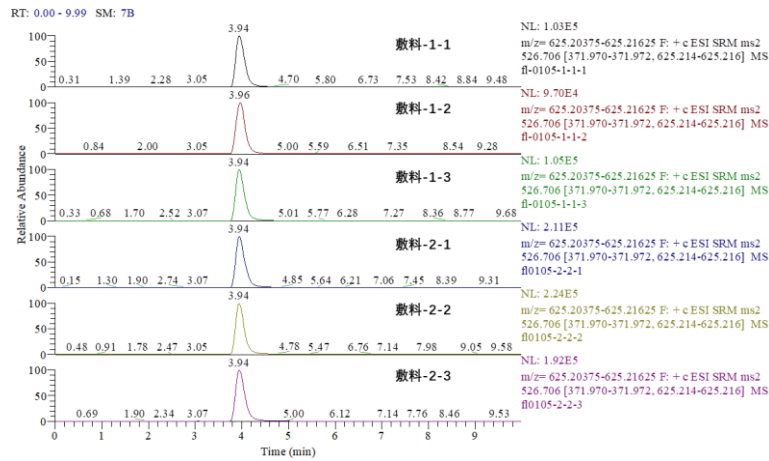
将修复敷料基质对照样品作为溶液配制不同浓度的重组 III 型胶原蛋白原料标准溶液，进行 HPLC-MS/MS 分析，得到的标准曲线见图 A. 13。



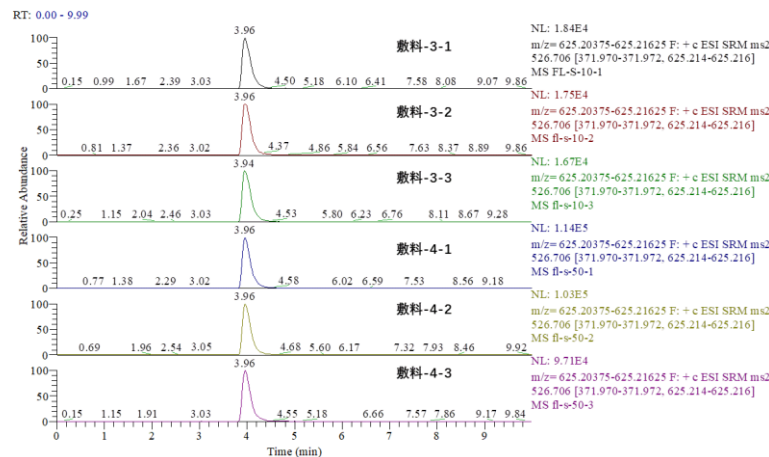
图A. 13 修复敷料中重组III型胶原蛋白特征多肽标准曲线

修复敷料中添加浓度为 100 $\mu\text{g/g}$ 和 200 $\mu\text{g/g}$ 重组 III 型胶原蛋白原料的特征多肽质谱图见图 A. 14；

添加浓度为 10 $\mu\text{g/g}$ 和 50 $\mu\text{g/g}$ 重组 III 型胶原蛋白原料的特征多肽质谱图见图 A. 15；



图A. 14 修复敷料中重组III型胶原蛋白原料添加浓度为100 $\mu\text{g/g}$ 和200 $\mu\text{g/g}$ 的特征多肽质谱图



图A. 15 修复敷料中重组III型胶原蛋白原料添加浓度为10 $\mu\text{g/g}$ 和50 $\mu\text{g/g}$ 的特征多肽质谱图

利用标准曲线计算得到修复敷料样品的重组 III 型胶原蛋白原料添加回收率见表 A. 6，结果表明，修复敷料基质中重组 III 型胶原蛋白原料添加浓度为 50 $\mu\text{g/g}$ 、100 $\mu\text{g/g}$ 和 200 $\mu\text{g/g}$ 的回收率均在 77%~88% 之间，平均回收率均大于 80%，符合添加回收率的要求；修复敷料基质中重组 III 型胶原蛋白原料添加浓

度为 10 $\mu\text{g/g}$ 的回收率均在 67%~74%之间, 平均回收率为 70.46%, 低于添加回收率的要求, 可能是由于低浓度条件下基质对定量检测结果较大引起的。

表 A.6 修复敷料重组 III 型胶原蛋白原料添加检测回收率结果

编号	原料添加 浓度%	峰面积 mAU	浓度 μ g/mL	体积 mL	质量 μ g	理论添 加质量 μg	回收 率%	平均回 收率%
敷料 -1-1	0.01%	1367832.86	36.84	0.55	20.26	25	81.04	80.46
敷料 -1-2	0.01%	1324688.35	35.67	0.55	19.62	25	78.47	
敷料 -1-3	0.01%	1381768.67	37.21	0.55	20.47	25	81.87	
敷料 -2-1	0.02%	2834480.74	76.57	0.55	42.11	50	84.23	82.69
敷料 -2-2	0.02%	2876800.42	77.72	0.55	42.74	50	85.49	
敷料 -2-3	0.02%	2637920.09	71.24	0.55	39.18	50	78.37	
敷料 -3-1	0.001%	238908.23	3.32	0.55	1.83	2.5	73.06	70.46
敷料 -3-2	0.001%	232033.66	3.22	0.55	1.77	2.5	70.91	
敷料 -3-3	0.001%	220942.38	3.06	0.55	1.69	2.5	67.40	
敷料 -4-1	0.005%	1387164.31	19.82	0.55	10.90	12.5	87.22	81.87

敷料 -4-2	0.005%	1291118.45	18.44	0.55	10.14	12.5	81.14
敷料 -4-3	0.005%	1229423.21	17.56	0.55	9.66	12.5	77.24

A. 3. 3 供试品检测结果

A. 3. 3. 1 医用重组 III 型胶原蛋白喷剂敷料

产品的特征多肽质谱图见图 A. 16，其特征多肽质谱图与相应的重组 III 型胶原蛋白原料标准样品的特征多肽质谱图（见图 A. 8、图 A. 9）一致。

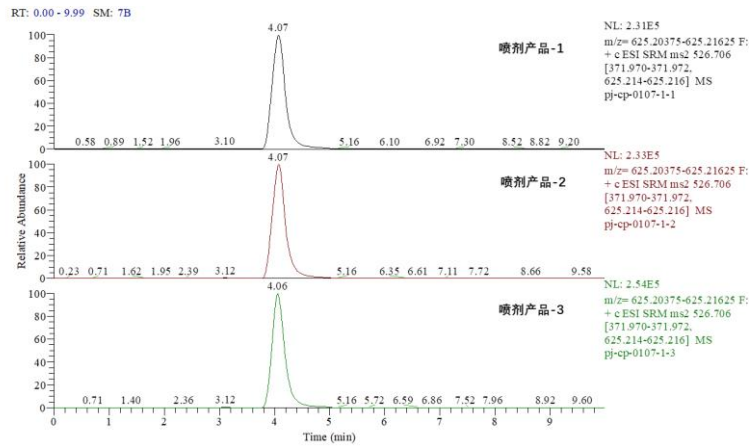


图 A. 16 喷剂敷料产品中重组 III 型胶原原料的特征多肽质谱图

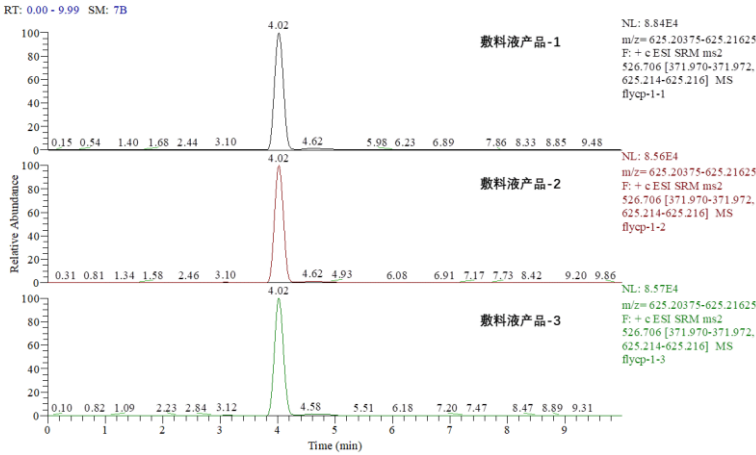
产品中的重组 III 型胶原含量见表 A. 7。医用重组 III 型胶原蛋白喷剂敷料产品中重组 III 型胶原原料的平均含量检测结果为 106 $\mu\text{g/mL}$ ，检测回收率 100%，满足方法学要求。该产品重组 III 型胶原蛋白的理论添加量为 100 $\mu\text{g/mL}$ ，检测结果与理论添加量基本一致。

表 A. 7 喷剂敷料产品中重组 III 型胶原蛋白含量

编号	峰面积 mAU	浓度 μ g/mL	体积 mL	质量 μ g	总质量 μg	取样体积 mL	含量 $\mu\text{g/mL}$	平均含量 $\mu\text{g/mL}$
喷剂产品-1	3681789	94.80	0.55	52.14	208.57	2	104	106
喷剂产品-2	3687238	94.95	0.55	52.22	208.88	2	104	
喷剂产品-3	3921064	101.01	0.55	55.56	222.23	2	111	

A. 3. 3. 2 医用重组 III 型胶原蛋白敷料液

产品的特征多肽质谱图见图A. 17, 其特征多肽质谱图与相应的重组Ⅲ型胶原蛋白原料标准样品的特征多肽质谱图（见图A. 8、图A. 9）一致。



图A. 17 医用Ⅲ型重组胶原蛋白敷料液产品的特征多肽质谱图

敷料液产品中的重组Ⅲ型胶原蛋白含量见表A. 8, 结果表明, 敷料液产品中重组Ⅲ型胶原蛋白的平均含量为92 $\mu\text{g/g}$, 检测回收率大于90 %, 满足方法学要求。该产品重组Ⅲ型胶原蛋白的理论添加量为100 $\mu\text{g/g}$, 检测结果与理论添加量基本一致。

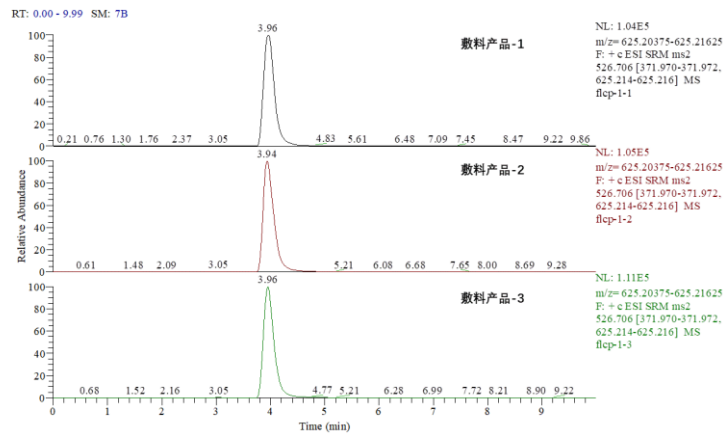
表A. 8 敷料液产品中重组Ⅲ型胶原蛋白原料含量

实际产品	峰面积 mAU	浓度 μ g/mL	体积 mL	质量 μ g	总质量 μg	取样质 量 g	含量 $\mu\text{g/g}$	平均含量 $\mu\text{g/g}$
敷料液-1	940881.34	42.03	0.57	23.95	191.64	2.049	94	92
敷料液-2	911116.59	40.58	0.57	23.13	185.06	2.049	90	
敷料液-3	926743.91	41.34	0.57	23.56	188.51	2.049	92	

A. 3. 3. 3 医用重组Ⅲ型胶原蛋白修复敷料

产品的特征多肽质谱图见图A. 18, 其特征多肽质谱图与相应的重组Ⅲ型胶原蛋白原料标准样品的特征多肽质谱图（见图A. 8、图A. 9）一致。

修复敷料产品中的重组Ⅲ型胶原蛋白含量见表A. 9, 结果表明, 修复敷料产品中重组Ⅲ型胶原蛋白的平均含量为83 $\mu\text{g/g}$, 检测回收率大于80%, 满足方法学要求。该产品重组Ⅲ型胶原蛋白的理论添加量为100 $\mu\text{g/g}$, 检测结果与理论添加量基本一致。



图A. 18 修复敷料产品中重组Ⅲ型胶原蛋白特征多肽质谱图

表A. 9 修复敷料产品中重组Ⅲ型胶原蛋白含量

实际产品	峰面积 mAU	浓度 μ g/mL	体积 mL	质量 μ g	总质量 μ g	取样质 量 g	含量 μ g/g	平均含 量 μ g/g
敷料产 品-1	143226 1.77	38. 58	0. 55	21 .22	169 .76	2.0 6	82	83
敷料产 品-2	140269 9.25	37. 78	0. 55	20 .78	166 .23	2.0 6	81	
敷料产 品-3	147865 4.03	39. 84	0. 55	21 .91	175 .29	2.0 6	85	