

ICS 11.120.20

CCS C 48

C I E S C

团 体 标 准

T/CIESC XXXX—XXXX

敷料中重组胶原蛋白的检测 液相色谱- 质谱/质谱法

Detection of recombinant collagen in dressings by liquid
chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry

（征求意见稿）

XXXX-XX-XX 发布

XXXX-XX-XX 实施

中国化工学会 发 布

目 次

1 范围	1
2 规范性引用文件.....	1
3 术语和定义.....	1
4 原理	1
5 试剂、材料、仪器和设备.....	1
6 定性和定量检测.....	2
附 录 A（资料性）敷料中重组 III 型胶原蛋白定性定量检测示例	8

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这些专利的责任。

本文件由中国化工学会提出并归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

敷料中重组胶原蛋白的检测 液相色谱-质谱/质谱法

警示：本文件并未指出所有可能的安全问题。使用者有责任采取适当的安全和健康措施，并保证符合国家有关法规规定的条件。

1 范围

本文件规定了敷料中重组胶原蛋白的液相色谱-质谱/质谱检测方法。

本文件适用于各种敷料中重组胶原蛋白的定性鉴别和定量检测。

注：敷料中重组胶原蛋白可能有全长、片段、同型别片段编辑组合或不同型别片段编辑组合等类型。若该重组胶原蛋白序列没有合适的酶切位点或者可用的特征多肽时，则该方法不适用。

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 6682 分析实验用水规格和试验方法

YY/T 1805.3 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 重组胶原蛋白

3 术语和定义

YY/T 1849中界定的术语和定义适用于本文件。

4 原理

采用液相色谱法将混合物中各组分进行分离，采用质谱法将待测物质离子化，按照离子的质荷比（ m/z ）大小进行分离，通过分析离子的质荷比和相对丰度获得样品组分的结构和分子量信息，进而对未知化合物进行定性和定量分析。

5 试剂、材料、仪器和设备

5.1 试剂或材料

5.1.1 水：符合 GB/T 6682 要求的一级水。

5.1.2 乙腈：色谱纯。

5.1.3 蛋白酶：序列纯。

5.1.4 碳酸氢铵：分析纯。

5.1.5 甲酸：色谱纯。

5.1.6 重组胶原蛋白特异性特征多肽对照品（经设计和验证确认后进行化学合成）或用于供试品的重组胶原蛋白原料（与供试品用相同，由供试品提供方提供）。

5.1.7 基质对照样品（与相应的供试品敷料用基质相同，由供试品提供方提供）。

5.1.8 溶液配制

5.1.8.1 三羟甲基氨基甲烷—盐酸（Tris-HCl）溶液（pH 8.0）：0.1 mol/L。准确称取0.121 g三羟甲基氨基甲烷，加水 5 mL溶解，以盐酸调 pH 至 8.0，移入 10 mL 容量瓶，定容至刻度，混匀，现配现用。

5.1.8.2 液相色谱流动相

5.1.8.2.1 流动相 A：取 200 mL 水于 1 L 容量瓶中，加入 1 mL 甲酸，并加水定容至 1 L，用 0.22 μ m滤膜过滤后备用。

5.1.8.2.2 流动相 B：取 200 mL 乙腈于 1 L 容量瓶中，加入 1 mL 甲酸，并加乙腈定容至 1 L，用 0.22 μ m 滤膜过滤后备用。

5.2 仪器和设备

5.2.1 液相色谱-质谱联用系统（HPLC-MS/MS）：电喷雾离子源。

5.2.2 分析天平（附有防静电装置）：感量 0.00001g。

5.2.3 离心机。

5.2.4 恒温振荡反应器。

5.2.5 冻干机或氮吹仪。

6 定性和定量检测

6.1 供试品特异性特征多肽设计原则和确认方法

6.1.1 设计原则

6.1.1.1 根据供试品中所含重组胶原蛋白的理论氨基酸序列，选择合适的蛋白水解酶（如：胰蛋白酶、Glu-C或糜蛋白酶等）模拟酶切，选择合适的肽段作为定性的目标肽和/或化学合成后用于定量的对照品。

6.1.1.2 特征肽段的选择原则：在供试品所含重组胶原蛋白的理论氨基酸序列中的肽段，与不同种属来源及不同型别的胶原蛋白序列进行Blast多序列比对，只在某一特定种属来源（如人）的胶原蛋白序列和特定型别的胶原蛋白序列中出现的肽段作为特异性特征多肽的首选，且化学修饰或交联对其丰度不会造成影响。

6.1.2 确认方法

通过实际样品（供试品中所含重组胶原蛋白原料）的酶解产物HPLC-MS/MS测试，分析所选特征多肽的信号强度和分离度（谱峰是否清晰，理论塔板数： >4000 ），保证在色谱分离过程中有足够的信号强度和较高的分离度。

6.2 方法学确认

6.2.1 检测限和定量限的确认

将一系列低浓度的重组胶原蛋白原料或合成的特征多肽对照品溶液直接添加到基质对照样品（除重组胶原蛋白之外的所有组分）中，按照本文件中给出的样品前处理方法和基于HPLC-MS/MS的定量检测方法，确认用于供试品检测的实验方法的检测限和定量限。以重组胶原蛋白原料或特征多肽峰面积的信噪比为3和10所对应的重组胶原蛋白的浓度分别作为检测限和定量限。以上确认的数据可用于低于最低检测限或最低定量限的供试品检测结果的描述。

低于检测限时表示在该浓度下未检测到供试品中重组胶原蛋白。

低于定量限，但高于检测限时表示在该浓度下检测到了供试品中重组胶原蛋白，但该方法不能定量。

6.2.2 检测回收率分析

为充分分析供试品样品前处理方法的有效性及其供试品基质的干扰，宜采用基质对照样品中重组胶原蛋白原料或合成的特征多肽对照品加标的方式，即：将基质对照样品制备3份，加入一定量（以相当于供试品所含重组胶原蛋白量为核心，设定高、中、低3个剂量组）的重组胶原蛋白原料或合成的特征多肽对照品，同时设定重组胶原蛋白原料或合成的特征多肽对照品作为对照组（高、中、低3个剂量组）。添加了重组胶原蛋白原料或合成的特征多肽对照品的基质对照样品组结果与实际添加的重组胶原蛋白原料或合成的特征多肽对照品比较，分析目标物检测回收率，其结果应满足80 %~120 %。如果检测回收率过高或者过低，无法满足80 %~120 %，则宜考虑使用所确认的检测回收率对供试品测试结果进行校正。

6.3 样品前处理

6.3.1 通用要求

重组胶原蛋白敷料的产品型式通常为凝胶、液体、敷贴、膏状等，按照液体类、半固体类和固体类产品的不同性状，分别给出前处理的参考方法，敷料中重组 III 型胶原蛋白定性定量检测示例参见附录 A。实际样品检测时可根据具体样品的基质组分进行方法优化。

6.3.2 液体类

准确量取一定体积的液体类产品，通过冷冻干燥或者氮吹的方式去除供试品中的溶剂成分，按照体积比（v/v）1:1 加入 0.1 mol/L Tris-HCl（pH 8.0）复溶，磁力搅拌 20~30 min，使组分充分溶解并混合均匀；

注：由冻干粉和水分别包装，使用时调配的液体类产品，可直接取冻干粉检测。

6.3.3 半固体类

准确称取一定质量的半固体类产品，通过冷冻干燥或者氮吹的方式去除供试品中的溶剂成分，按照质量体积比（m/v）1:2 加入 0.1 mol/L Tris-HCl（pH 8.0）复溶，磁力搅拌 20~30 min，使产品组分充分混合均匀备用。

注：加入 Tris-HCl 的量以能够使干燥的产品组分充分混匀为宜。

6.3.4 固体类

准确称取一定质量的固体类产品中的液体/半固体组分，按照 6.3.2或6.3.3的方式处理备用。

注：加入 Tris-HCl 的量以能够使干燥后的产品组分充分混匀为宜。

6.3.5 基质对照样品

与相应供试品的前处理方法相同。

6.3.6 方法学确认样品

用于检测限和定量限确认的样品，以及检测回收率分析样品按照 6.2 的要求配制后，与相应供试品的前处理方法相同。

6.4 检测方法

6.4.1 试样制备

6.4.1.1 变性溶解

待测样品按照 6.3 进行前处理后按如下步骤进行试样制备。

若供试品所含重组胶原蛋白为聚合体或有三螺旋结构，将供试品于沸水浴中加热变性 30 min，供试品变性处理后冷却至室温；若供试品所含重组胶原蛋白为单链（无三螺旋结构或聚合体），无需进行变性处理；使用重组胶原蛋白原料作为定量标准品的供试品以及方法学确认供试品变性处理与上述处理方法相同。

6.4.1.2 供试品及方法学确认酶解

取变性溶解后的供试品及方法学确认供试品（6.4.1.1）0.5 mL，建议按照重组胶原蛋白和蛋白水解酶的质量比（m/m）（20~50）:1 混合，于适宜温度下恒温振荡反应，反应一定时间使样品完全酶解（随时间延长，特征多肽丰度不再变化，不再增加或无减少），加入 50 μ L 10 %的甲酸至酶解液中（甲酸终浓度为 1 %）使蛋白酶失活，离心（3000 g，10 min），取上清液/下层溶液（液体以及凝胶取上清，乳膏取下层）于进样瓶中，待用。

注 1：宜结合酶解时间，经实验验证确认酶解效率满足要求。

注 2：具体的蛋白水解酶的用量应根据产品基质种类进行优化，确保重组胶原蛋白能够被充分酶解。

6.4.1.3 标准样品酶解和标准工作溶液配制

6.4.1.3.1 称取一定量的重组胶原蛋白原料，用 0.1 mol/L Tris-HCl 溶液（pH 8.0）配制成一定浓度的溶液作为母液，现配现用。

6.4.1.3.2 取全部变性溶解后的重组胶原蛋白原料标准样品母液，与供试品及方法学确认样品酶解方法一致，取上清液，用相应基质对照样品溶液（6.3.5）稀释成系列浓度的重组胶原蛋白标准工作溶液，用于定量标准曲线样品，其浓度范围应在线性区间内，并含最低检测限和定量限，离心（3000 g，10 min），取上清液于进样瓶中，待用。

注：适用于以重组胶原蛋白原料为标准样品，采用外标法进行供试品重组胶原蛋白定量测定。

6.4.1.4 特征多肽标准工作溶液配制

6.4.1.4.1 特征多肽标准样品配制：取 10 mg 重组胶原蛋白特征多肽用 1 mL 0.1 mol/L Tris-HCl 溶液（pH 8.0）溶解，并定容至 10 mL，配制成浓度为 1 mg/mL 的标准溶液，现配现用。

6.4.1.4.2 特征多肽标准工作溶液配制：用相应的基质对照样品溶液（6.3.5）稀释成系列浓度的特征多肽标准工作溶液，制备系列标准样品，其浓度范围应在线性区间内，并含最低检测限和定量限，离心（3000 g，10 min），取上清液于进样瓶中，待用。

注 1：适用于以重组胶原蛋白特征多肽为标准样品，采用外标法进行供试品重组胶原蛋白定量测定。

注 2：为防止特征多肽的吸附，可在配制储备液或工作液时添加 10 %乙腈；同时在样品配制时，同样添加 10 %乙腈。

6.4.2 色谱-质谱条件设定

6.4.2.1 通则

参照 YY/T 1805.3 进行设定。液相色谱-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，以获得最佳效果。

6.4.2.2 色谱条件

6.4.2.2.1 流动相：流动相 A：含 0.1 %甲酸水溶液，流动相 B：含 0.1 %甲酸的乙腈溶液（或含 0.1 %甲酸的 60 %乙腈溶液）。

6.4.2.2.2 流速：0.2 mL/min~0.6 mL/min。

6.4.2.2.3 柱温：25 °C~30 °C。

6.4.2.2.4 进样量：2 μL~10 μL。

6.4.2.2.5 色谱柱：十八烷基硅烷键合硅胶柱[粒径 3 μm 或 5 μm，（100 mm 或 150 mm）×2.1 mm 或 2.0mm]。

注：建议梯度洗脱，根据不同仪器和样品优化洗脱条件。

6.4.2.3 质谱条件

6.4.2.3.1 离子源：电喷雾离子源。

6.4.2.3.2 扫描方式：正离子扫描。

6.4.2.3.3 检测方式：多反应检测（MRM）。根据特征多肽的离子质荷比进行二级质谱分析，选择稳定特异的子离子监测。

6.4.2.3.4 喷雾电压：3.5 kV。

6.4.2.3.5 离子源蒸发温度：300 °C。

注：参数需根据不同的质谱仪器设定相应的参数

6.5 定性鉴别分析

将重组胶原蛋白原料标准工作溶液或特征多肽的标准工作溶液供试品（6.4.1）分别注入联用仪中，按照液相色谱-质谱条件（6.4.2）测定，供试品样品和标准样品中待测物（目标特征多肽）的保留时间一致。

6.6 定量计算

6.6.1 标准工作曲线绘制

以标准工作溶液系列浓度（特征多肽标准工作溶液或重组胶原蛋白原料标准工作溶液浓度）为横坐标，以所测定的目标特征多肽的峰面积为纵坐标绘制标准曲线，按式（1）得到回归方程和相关系数，用于样品特征多肽含量或重组胶原蛋白含量计算。

$$Y = aX + b; R^2 \dots\dots\dots (1)$$

式中：

X ——特征多肽含量或重组胶原蛋白原料含量，单位为微克每毫升（μg/mL）。

Y ——特征多肽峰面积。

a ——常数。

b ——常数。

R^2 ——相关系数。

6.6.2 供试品检测结果计算

6.6.2.1 采用合成特征多肽进行定量分析时，用特征多肽标准曲线的回归方程，根据测试样品中特征多肽峰面积（ Y ），得出测试样品中特征多肽的含量（ C_i ），再根据重组胶原蛋白特征多肽分子量、重组胶原蛋白分子量、供试品的取样体积或取样质量、酶解后样品的稀释倍数以及前处理后测试样品的体积，计算出供试品中重组胶原蛋白的含量[见式（2）或式（3）]。

注：如果重组胶原蛋白原料样品存在异质性、糖基化等修饰时，其实际分子量与理论分子量可能有差异，此种情况需要获得重组胶原蛋白原料样品的准确分子量，而不是理论分子量。

6.6.2.1.1 半固体样品和固体样品

供试品中重组胶原蛋白含量 X_i ，单位为微克每克（μg/g），用系统处理软件或按式（2）计算：

$$X_i = \frac{C_i \times X \times V \times M_1}{m \times M_2 \times n} \dots\dots\dots (2)$$

式中：

X_i ——供试品中重组胶原蛋白含量，单位为微克每克（ $\mu\text{g/g}$ ）。

C_i ——测试样品中特征多肽的含量，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g/mL}$ ）。

M_1 ——重组胶原蛋白分子量。

M_2 ——重组胶原蛋白特征多肽分子量；

V ——前处理后测试样品的体积，单位为毫升（ mL ）。

X ——酶解后样品稀释倍数。

n ——重组胶原蛋白理论序列中特征多肽的重复个数。

m ——供试品的取样质量，单位为克（ g ）。

注：公式（2）适用于半固体以及固体样品中的重组胶原蛋白含量计算，即每克样品中含有重组胶原蛋白的量（ μg ）。

6.6.2.1.2 液体样品

供试品中重组胶原蛋白含量 X_i ，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g/mL}$ ），按式（3）计算：

$$X_i = \frac{C_i \times X \times V_1 \times M_1}{m \times V_2 \times n} \dots\dots\dots (3)$$

式中：

C_i ——测试样品中特征多肽的含量，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g/mL}$ ）。

M_1 ——重组胶原蛋白分子量。

M_2 ——重组胶原蛋白特征多肽分子量。

V_1 ——前处理后测试样品的体积，单位为毫升（ mL ）。

X ——酶解后样品稀释倍数。

n ——重组胶原蛋白理论序列中特征多肽的重复个数。

V_2 ——供试品的取样体积，单位为毫升（ mL ）。

6.6.2.2 采用重组胶原蛋白原料进行定量分析时，用重组胶原蛋白原料标准曲线的回归方程，根据测试样品中特征多肽峰面积（ Y ），直接计算得出测试样品中重组胶原蛋白含量（ C_i ），再根据供试品的取样体积或取样质量、酶解后样品的稀释倍数、前处理后测试样品的体积以及重组胶原蛋白中特征多肽的个数，计算最终供试品中重组胶原蛋白含量（见式 4 或式 5）。

6.6.2.2.1 半固体样品和固体样品

供试品中重组胶原蛋白含量 X_i ，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g/mL}$ ），按式（4）计算：

$$X_i = \frac{C_i \times X \times V}{m \times n} \dots\dots\dots (4)$$

式中：

X_i ——供试品中重组胶原蛋白含量，单位为微克每克（ $\mu\text{g/g}$ ）。

C_i ——测试样品中重组胶原蛋白含量，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g/mL}$ ）。

V ——前处理后测试样品的体积，单位为毫升（ mL ）。

X ——酶解后样品稀释倍数。

n ——重组胶原蛋白理论序列中特征多肽的重复个数。

m ——供试品取样质量，单位为克（ g ）。

注：公式（4）适用于半固体以及固体样品中重组胶原蛋白的含量计算，即每克样品中含有重组胶原蛋白的量（ μg ）。

6.6.2.2.2 液体样品

供试品中重组胶原蛋白含量 X_i ，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g/mL}$ ），按式（4）计算：

$$X_i = \frac{C_i \times X \times V_1}{V \times n} \dots\dots\dots (5)$$

式中：
 X_i ——供试品中重组胶原蛋白含量，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g/mL}$ ）。
 C_i ——测试样品中重组胶原蛋白含量，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g/mL}$ ）。
 V_1 ——前处理后测试样品的体积，单位为毫升（ mL ）。
 X ——酶解后样品稀释倍数。
 n ——重组胶原蛋白理论序列中特征多肽的重复个数。
 V ——供试品取样体积，单位为毫升（ mL ）。

6.6.3 检测回收率计算

按 6.6.2 计算添加了重组胶原蛋白原料或合成特征多肽对照品的基质对照样品组结果，再按式（6）计算目标物（实际添加的重组胶原蛋白原料或特征多肽质量）检测回收率，其结果应满足 6.2.2 的要求。
 检测回收率 R_1 ，以%表示，按式（6）计算：

$$R_1 = \frac{X_s^*}{X_s} \times 100\% \dots\dots\dots (6)$$

式中：
 R_1 ——检测回收率，以%表示。
 X_s^* ——添加了重组胶原蛋白原料或合成特征多肽对照品的基质对照样品中重组胶原蛋白质量或特征多肽的实际检测质量，单位为毫克（ mg ）。
 X_s ——理论添加的重组胶原蛋白原料或合成特征多肽质量，单位为毫克（ mg ）。

6.6.4 方法的可接受标准

- 6.6.4.1 标准曲线线性 R^2 值： ≥ 0.98 ；
- 6.6.4.2 检测加标回收率：80 %~120 %。

6.6.5 检测报告

- 检测报告宜包括以下内容：
- a) 供试品基本信息；
 - b) 主要实验步骤；
 - c) 特征多肽设计确认结果；
 - d) 方法学确认结果；
 - e) 方法可接受标准；
 - f) 检测结果
 - 1) 液体样品的重组胶原蛋白含量以 $\mu\text{g/mL}$ 计；
 - 2) 半固体样品和固体样品的重组胶原蛋白含量以 $\mu\text{g/g}$ 计。

附录 A
(资料性)

敷料中重组 III 型胶原蛋白定性定量检测示例

A.1 试剂、材料、仪器和设备

A.1.1 试剂或材料

A.1.1.1 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）。

A.1.1.2 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。

A.1.1.3 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）。

A.1.1.4 其它试剂：见本文件正文相应条款。

A.1.1.5 溶液配制：见本文件正文条款5.1.8。

A.1.2 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×2.1 mm）。其他见本文件正文的条款5.2。

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（1.0×150 mm，1.7 μm）；流速为0.1 mL/min；柱温为60 °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.2.3.1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℃ 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 µg/mL、1 µg/mL、5 µg/mL、10 µg/mL、20 µg/mL、50 µg/mL、100 µg/mL、200 µg/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℃ 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 °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×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，监测离子通道参数见表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 监测离子通道参数

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。

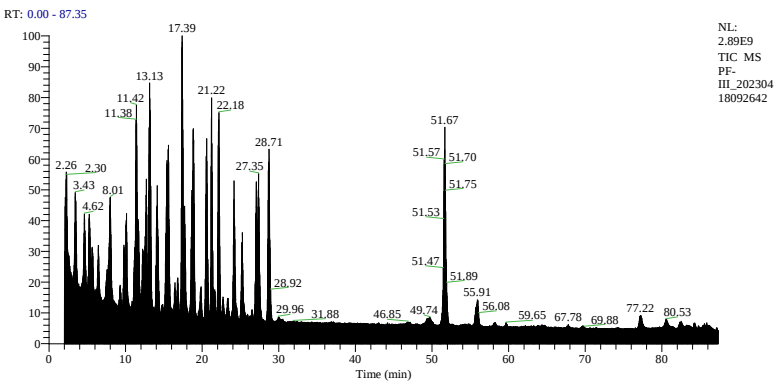
A. 2. 5 定性鉴别和定量检测

按文件正文的6.5和6.6条款进行定性鉴别和定量检测。

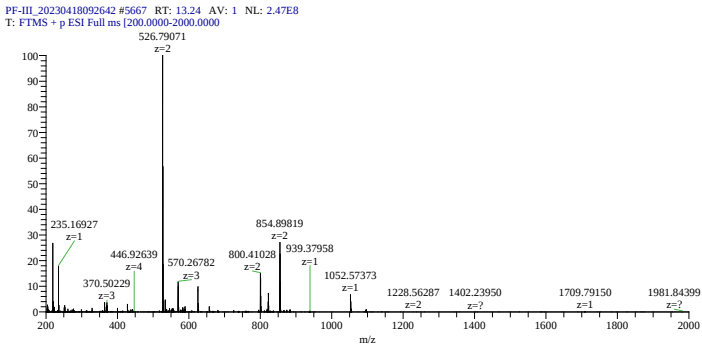
A. 3 结果

A. 3. 1 特征多肽设计和确认

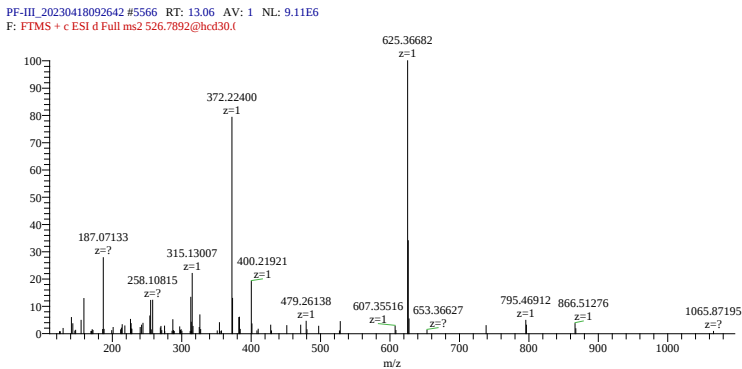
重组III型胶原原料样品胰蛋白酶酶解产物的总离子流图（图A.1）经过BioFinder软件分析，检索到m/z 526.79042的一级质谱图（图A.2）表明该离子带双电荷，其分子量与多肽GEAGIPGVPGAK的理论分子量一致，m/z 526.79042的二级质谱图（图A.3）的碎片离子与多肽GEAGIPGVPGAK的理论碎片离子高度匹配，因此，该样品中存在多肽GEAGIPGVPGAK。通过Blast多序列比对及Uniprot网站搜索，此多肽不存在于人的其它类型胶原蛋白及其它常见哺乳动物（牛、猪、大鼠、小鼠、马、兔子等）的胶原蛋白序列中。因此，多肽GEAGIPGVPGAK可作为本示例中供试品重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

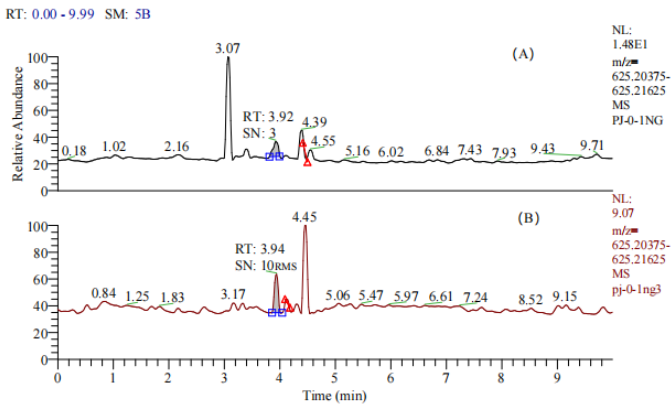


图A.3 重组III型胶原蛋白原料酶解产物中m/z 526.79042的二级质谱图

A.3.2 方法学验证

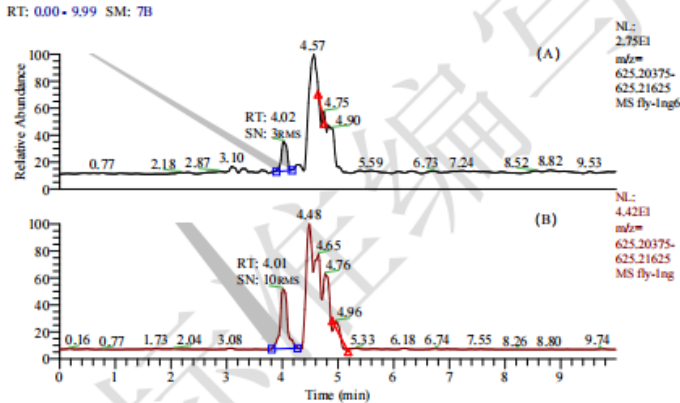
A.3.2.1 检测限和定量限的确认

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。



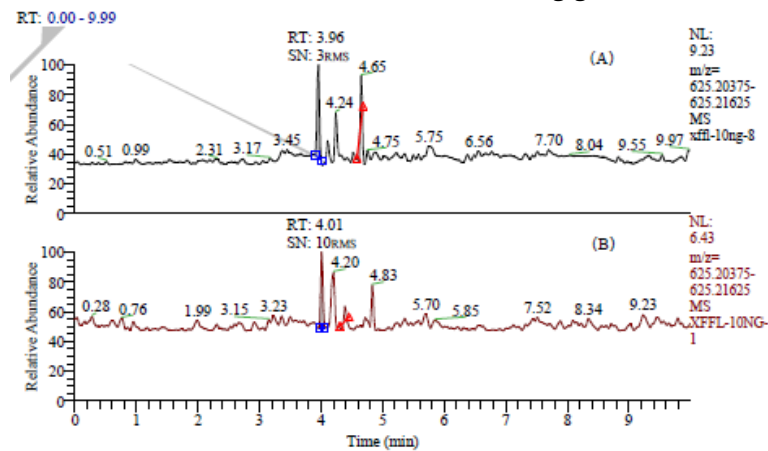
图A.4 喷剂敷料中重组III型胶原蛋白原料终浓度为0.5 ng/mL (A)、1 ng/mL (B) 的特征多肽质谱图

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。

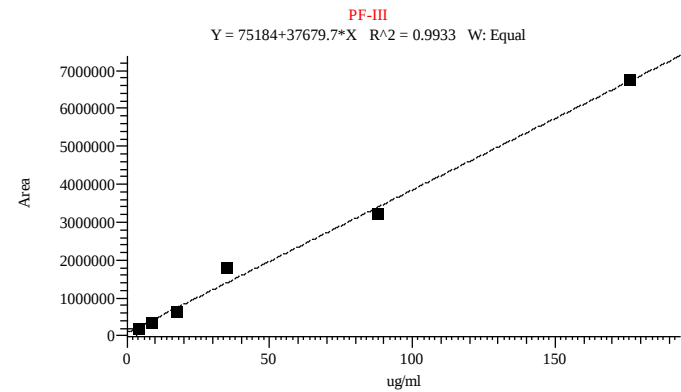


图A. 6 修复敷料中重组III型胶原蛋白原料终浓度为1 ng/g（A）、2 ng/g（B）的特征多肽质谱图

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 μg/mL和200 μg/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 μg/mL和50 μg/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 μg/mL、50 μg/mL、100 μg/mL和200 μg/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

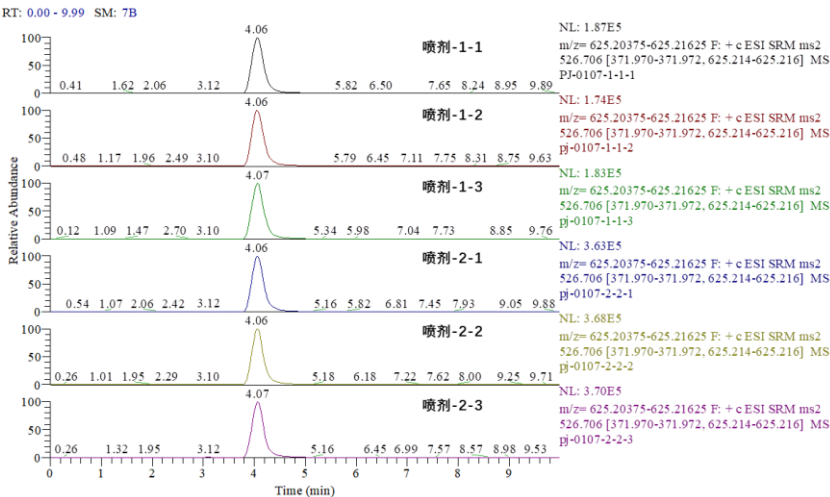


图 A.8 喷剂敷料基质对照中重组 III 型胶原原料添加浓度为 100 µg/mL 和 200 µg/mL 的特征多肽质谱图

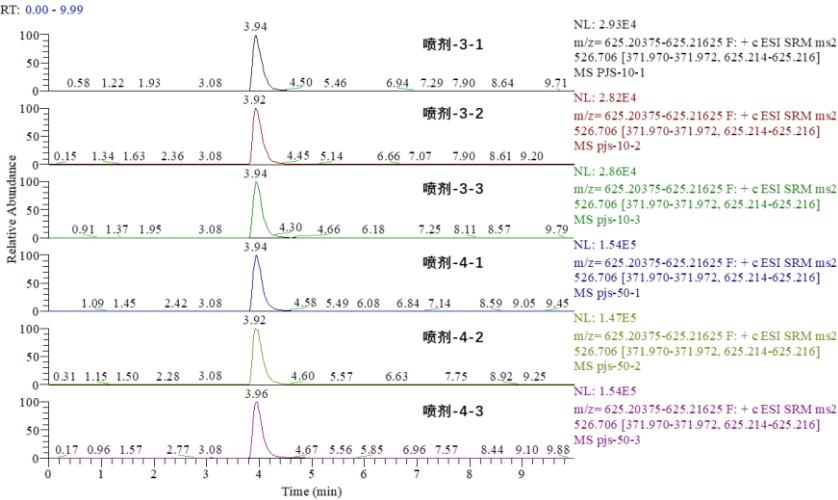


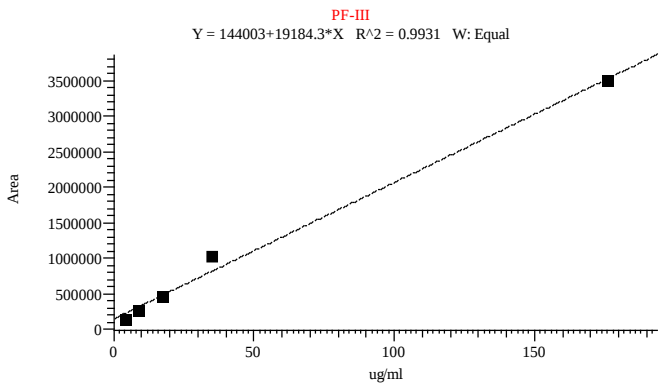
图 A.9 喷剂敷料基质对照中重组 III 型胶原原料添加浓度为 10 µg/mL 和 50 µg/mL 的特征多肽质谱图

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 µg/mL	体积 mL	质量 µg	添加量 µg	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%	355905.23	7.29	0.55	4.01	5	80.21	80.26
喷剂-3-2	0.001%	3576781.37	7.33	0.55	4.03	5	80.63	
喷剂-3-3	0.001%	354738.16	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	87.85
喷剂-4-2	0.005%	1939380.61	40.60	0.55	22.33	25	89.32	
喷剂-4-3	0.005%	1918181.11	40.15	0.55	22.09	25	88.34	

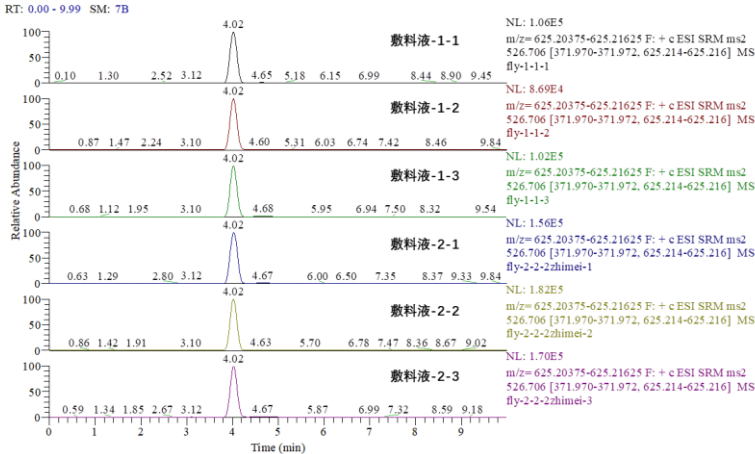
A. 3. 2. 2. 2 敷料液

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。

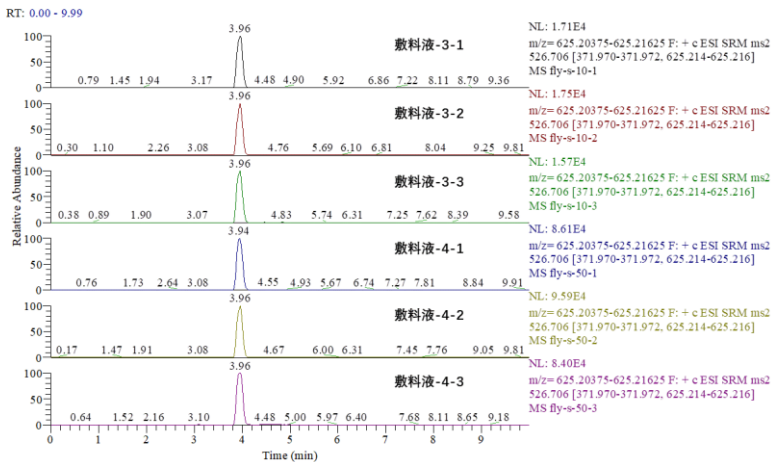


图A. 10 敷料液中重组III型胶原蛋白原料标准曲线

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

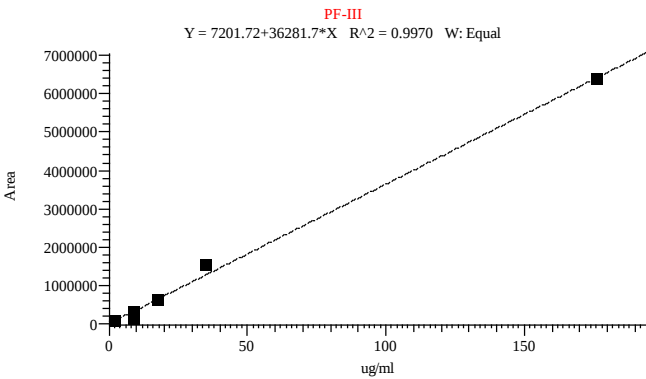
利用标准曲线计算得到敷料液样品前处理的重组 III 型胶原蛋白原料的添加回收率见表 A. 5，结果表明，敷料液基质中重组 III 型胶原蛋白原料添加浓度为 10 µg/g、50 µg/g、100µg/g 和 200 µg/g 的回收率均在 80%~112%之间，符合添加回收率的要求。

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 ug/mL	体积 mL	质量 ug	理论添加 质量 ug	回收率%	平均回收 率%
敷料液-1-1	0.01%	1123970.89	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%	1058012.66	47.70	0.55	26.24	25	104.95	
敷料液 2-1	0.02%	1760609.69	81.76	0.55	44.97	50	89.94	93.66
敷料液 2-2	0.02%	1936988.38	90.31	0.55	49.67	50	99.34	
敷料液 2-3	0.02%	1794006.43	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	

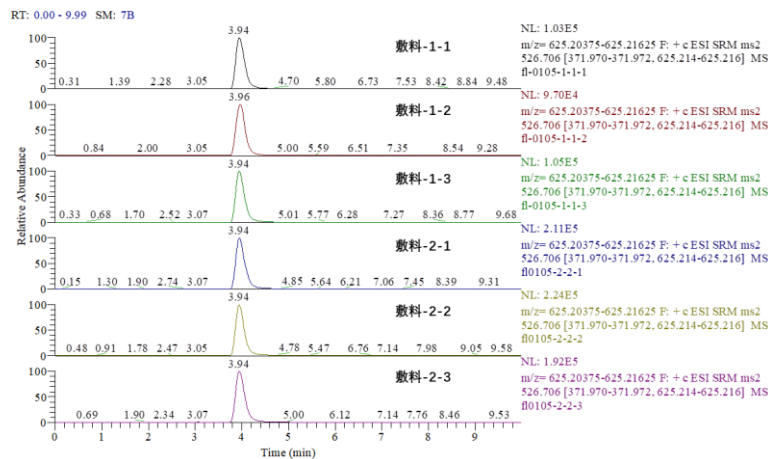
A. 3. 2. 2. 3修复敷料

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。

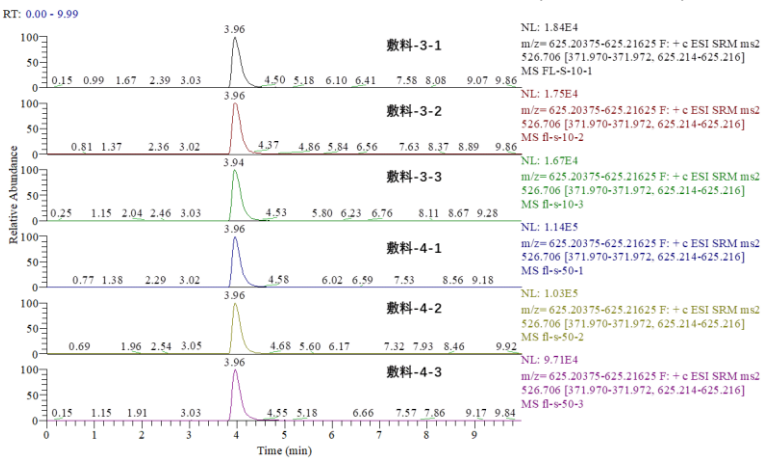


图A. 13 修复敷料中重组III型胶原蛋白特征多肽标准曲线

修复敷料中添加浓度为 100 µg/g 和 200 µg/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 µg/g 和 50 µg/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 μg/g和200 μg/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 μg/g和50 μg/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 μg/g、100 μg/g 和 200 μg/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 μg/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 μ g	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。

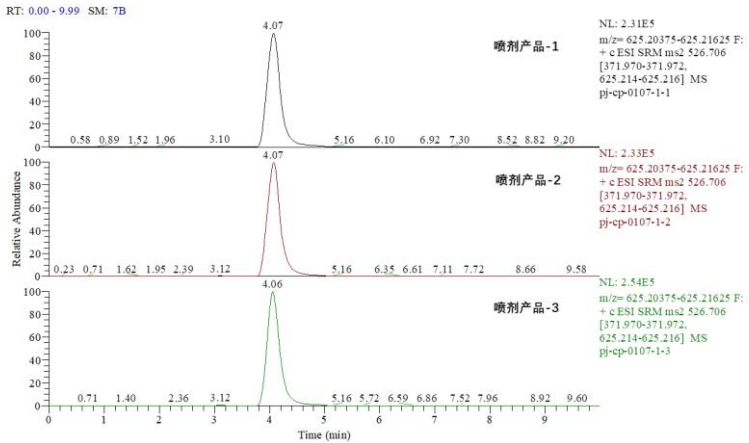


图 A. 16 喷剂敷料产品中重组 III 型胶原原料的特征多肽质谱图

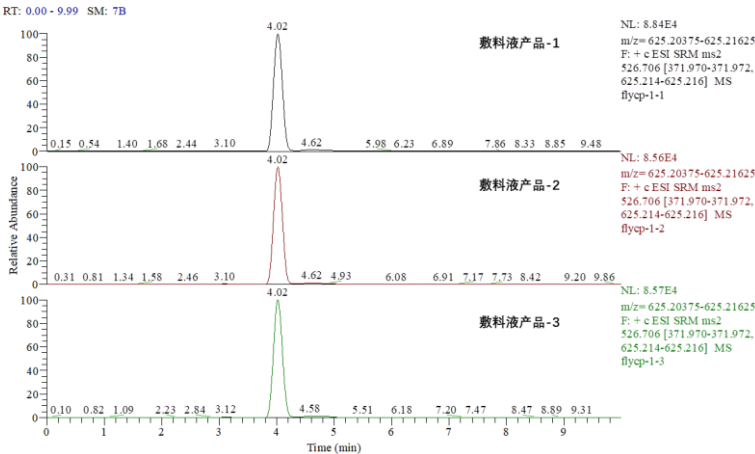
产品中的重组 III 型胶原含量见表 A.7。医用重组 III 型胶原蛋白喷剂敷料产品中重组 III 型胶原原料的平均含量检测结果为 106 $\mu\text{g/mL}$ ，检测回收率 100%，满足方法学要求。该产品重组 III 型胶原蛋白的理论添加量为 100 $\mu\text{g/mL}$ ，检测结果与理论添加量基本一致。

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 $\mu\text{g/mL}$	体积 mL	质量 μg	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。

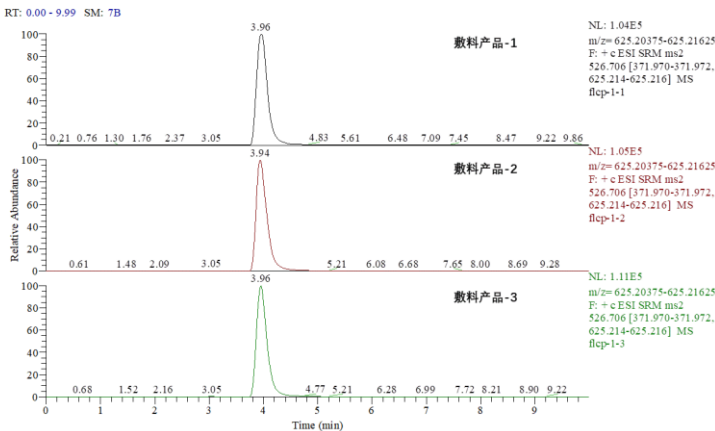
表A.8 敷料液产品中重组III型胶原蛋白原料含量

实际产品	峰面积 mAU	浓度 μg/mL	体积 mL	质量 μg	总质量 μg	取样质量 g	含量 μg/g	平均含量 μg/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 μg/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 μg/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 μg/mL	体积 mL	质量 μg	总质量 μg	取样质量 g	含量 μg/g	平均含量 μg/g
敷料产品-1	1432261.77	38.58	0.55	21.22	169.76	2.06	82	83
敷料产品-2	1402699.25	37.78	0.55	20.78	166.23	2.06	81	
敷料产品-3	1478654.03	39.84	0.55	21.91	175.29	2.06	85	

本标准版权归中国化工学会所有。除了用于国家法律或事先得到中国化工学会文字上的许可外，不许以任何形式复制该标准。
中国化工学会地址：北京市朝阳区安定路 33 号化信大厦 B 座 7 层
邮政编码：100029 电话：010-64455951 传真：010-64411194
网址：www.ciesc.cn