ICS 11.040.30
CCS C 30

YY

中华人民共和国医药行业标准

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

Tissue engineering medical device products—Collagen protein—Part 3：Quantification of collagen based on marker peptide detection—Liquid chromatography-mass spectrometry

2022-01-13 发布　　2022-08-01 实施

国家药品监督管理局　发布

目　　次

前言 …… Ⅰ
引言 …… Ⅱ
1　范围 …… 1
2　规范性引用文件 …… 1
3　术语和定义 …… 1
4　概述 …… 1
5　试剂及其配制 …… 2
6　仪器和设备 …… 3
7　检测方法 …… 3
8　结果计算 …… 5
附录 A（规范性）　牛Ⅰ型胶原蛋白特征多肽含量检测 …… 6
附录 B（规范性）　牛Ⅱ型胶原蛋白特征多肽含量检测 …… 9
附录 C（规范性）　猪Ⅰ型胶原蛋白特征多肽含量检测 …… 12
参考文献 …… 15

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。

本文件是YY/T 1805《组织工程医疗器械产品　胶原蛋白》的第3部分。YY/T 1805已经发布了以下部分：

——第2部分：Ⅰ型胶原蛋白分子量检测　十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳法；

——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。

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。

本文件由国家药品监督管理局提出。

本文件由全国外科植入物和矫形器械标准化技术委员会组织工程医疗器械产品分技术委员会(SAC/TC 110/SC 3)归口。

本文件起草单位：中国科学院过程工程研究所、中国食品药品检定研究院、岛津企业管理(中国)有限公司、国科卓越(北京)医药科技研究有限公司。

本文件主要起草人：张贵锋、高建萍、张天宏、李晓东、冀峰、李敬来、范行良、冯倩倩、张乐、徐丽明。

引　言

用于组织工程医疗器械产品的胶原蛋白类材料包括组织提取的胶原蛋白和基因重组的胶原蛋白。胶原蛋白被广泛应用于各种医疗器械产品的研发和产品制备。胶原蛋白类材料具有不同的特性，如：分子量、纯度、种属、型别差异、三螺旋结构、细胞黏附特性等，这些性能直接关系着胶原蛋白的质量和使用性能。YY/T 1805《组织工程医疗器械产品　胶原蛋白》旨在建立胶原蛋白某些特殊性能的检测和表征方法，拟由4个部分构成。

——第1部分：术语和定义。目的在于给出包括组织提取的胶原蛋白和基因重组胶原蛋白的各种术语和定义。

——第2部分：Ⅰ型胶原蛋白分子量检测　十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳法。目的在于提供可用于胶原蛋白分子量检测的方法。

——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。目的在于给出基于特征多肽定量测定，间接地反映胶原蛋白含量的液相色谱-质谱检测方法。该方法也可用于种属来源和型别的鉴别。

——第4部分：胶原蛋白螺旋结构表征方法。目的在于建立不同参数和指标的胶原蛋白结构分析和三螺旋结构表征方法，用于评价其三螺旋结构的有无、相对含量及其完整性。

胶原蛋白含量的检测目前常用的有羟脯氨酸法，通过羟脯氨酸含量的检测来反映胶原蛋白含量。本文件给出的是基于合成特异性胶原蛋白特征多肽对照品，利用液相色谱-质谱法进行胶原蛋白特征多肽含量的测定，间接地反映胶原蛋白的含量。

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

1　范围

本文件规定了用液相色谱-质谱法测定不同类型胶原蛋白特征多肽含量的方法。

本文件适用于组织提取纯化的胶原蛋白及其胶原类产品中不同类型胶原蛋白特征多肽含量的测定。

注:重组胶原蛋白、脱细胞基质经胶原蛋白提取后的样品可参考本方法进行相应的胶原蛋白特征多肽含量测定。

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　分析实验室用水规格和试验方法

YY/T 1453　组织工程医疗器械产品　Ⅰ型胶原蛋白表征方法

中华人民共和国药典(2020年版)

3　术语和定义

YY/T 1453界定的术语和定义适用于本文件。

4　概述

将胶原蛋白试样溶解,加热变性后进行胰蛋白酶酶解,释放特征多肽;再用液相色谱-质谱法测定。以不同类型胶原蛋白特征多肽的保留时间和二级子离子碎片的质荷比进行定性和确证,用外标法或内标法进行定量。

用合成的不同类型胶原蛋白特征多肽作为标准品,实现外标法定量检测;用合成的相同特征多肽序列的同位素标记特征多肽与非同位素标记特征多肽按一定比例混合,实现内标法定量检测。同位素内标法有助于改善基质效应对测定准确性的干扰。

本文件以同位素内标法为例,分别给出牛Ⅰ型、牛Ⅱ型和猪Ⅰ型胶原蛋白特征多肽含量检测的标准操作规程和要求。其中,牛Ⅰ型胶原蛋白特征多肽含量检测按附录A,牛Ⅱ型胶原蛋白特征多肽含量检测按附录B,猪Ⅰ型胶原蛋白特征多肽含量检测按附录C进行测定。针对不同动物来源或不同型别的胶原蛋白,也可自行筛选合适的特征多肽经验证后进行定量检测。

5 试剂及其配制

5.1 试剂和对照品

所用试剂及对照品要求如下：

a) 乙腈，色谱纯。

b) 胰蛋白酶，序列纯。

c) 碳酸氢铵，分析纯。

d) 甲酸，色谱纯。

e) 胶原蛋白特征多肽对照品：检测不同种属及不同类型的胶原蛋白特征多肽含量时，需要设计和合成相应的种属和/或型别特异性的胶原蛋白特征多肽，作为定量对照品。其设计原则为：对不同来源及不同类型的胶原蛋白序列进行 Blast 多序列比对，只在某一特定来源和/或特定类型的胶原蛋白序列中出现的肽段，且化学修饰或交联对其丰度没有影响，为其特异性的特征多肽，并保证在色谱分离过程中有较高的分离度。

注：推荐使用国家医药标准物质。

f) 同位素标记特征多肽：将作为定量用对照品的特征多肽进行同位素标记，与定量用特征多肽对照品以及待检测样品按一定比例混合，通过特征多肽与其同位素内标峰面积的比值对样品中特征多肽进行定量，有助于降低或消除基质干扰。

5.2 溶液配制

所用溶液配制方法如下：

溶液配制用水应满足 GB/T 6682 中分析实验室用水的要求。

a) 乙腈水溶液(体积比)：乙腈∶水为 6∶4；

b) 0.05 mol/L 碳酸氢铵溶液：精密称定 0.395 0 g 碳酸氢铵，加水定容至 100 mL(现用现配)；

c) 0.10 mol/L 碳酸氢铵溶液：精密称定 0.790 0 g 碳酸氢铵，加水定容至 100 mL(现用现配)；

d) 液相色谱流动相：

1) 流动相 A：取 200 mL 水置 1 L 容量瓶中，加入 1 mL 甲酸，并加水定容至 1 L，用 0.22 μm 滤膜过滤后备用；

2) 流动相 B：取 200 mL 乙腈水溶液[a)]置 1 L 容量瓶中，加入 1 mL 甲酸，并加乙腈水溶液[a)]定容至 1 L，用 0.22 μm 滤膜过滤后备用；

e) 特征多肽标准工作溶液配制：

1) 特征多肽储备液配制：精密称定一定量的胶原蛋白特征多肽(最小取样量 5 mg)，用 1 mL 0.05 mol/L 碳酸氢铵溶液溶解，用 0.05 mol/L 碳酸氢铵溶液定容，配制成浓度为 2 mg/mL 的标准溶液，2 ℃～4 ℃保存，有效期 7 天；

2) 同位素标记特征多肽内标储备液配制：精密称定一定量的同位素标记胶原蛋白特征多肽(最小取样量 5 mg)，用 1 mL 0.05 mol/L 碳酸氢铵溶液溶解，转移至 10 mL 容量瓶中，用 0.05 mol/L 碳酸氢铵溶液定容，配制成浓度为 2 mg/mL 的标准溶液，2 ℃～4 ℃保存，有效期 7 天；

取适量的同位素标记特征多肽内标储备液，用 0.05 mol/L 碳酸氢铵溶液稀释成适当浓度的同位素内标工作溶液(其信号强度应与被测组分相当，现用现配)；

注 1：特征多肽和同位素标记的特征多肽对照品可以取 1 瓶(20 mg/瓶)，直接全部溶解，配制成相应浓度的储备液，分装后－20 ℃以下冷冻保存。

注 2：推荐用纯甲醇配制同位素特征多肽内标储备液和特征多肽储备液，－20 ℃以下冷冻保存，使用时再用 0.05 mol/L 碳酸氢铵溶液稀释。

3) 特征多肽标准工作液配制：用 0.05 mol/L 碳酸氢铵溶液稀释成系列浓度的特征多肽标准工作液，并与同位素内标标准工作溶液按一定比例混合(现用现配)，制备系列标准样品，离心(3 000g，10 min)，取上清液置进样瓶中，待用；

注 3：采用外标法时直接用特征多肽标准工作溶液进行测定。

注 4：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(体积分数)；同时在样品配制时，同样添加 10%乙腈(体积分数)，以保持有机溶剂组成与特征多肽标准工作液一致。

f) 加标样品的配制：以样品量为基准，加入特征多肽对照品的量在正负 3 倍以内，尽量与样品中待测特征多肽含量相近；加标体积不超过样品原体积的 10%(≤10%)。

6 仪器和设备

所用仪器和设备规格参照以下要求：

a) 分析天平(附有防静电装置)：精度：0.000 01 g；
b) 离心机；
c) 恒温振荡反应器；
d) 液相色谱柱：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 2.0 mm)]；
e) 液相色谱-质谱联用系统(HPLC-MS/MS，三重四极杆质谱)：建议使用梯度洗脱；
f) 水浴锅。

7 检测方法

7.1 待测样品制备

7.1.1 样品变性溶解：

a) 固体样品：精密称定胶原蛋白样品(最小称样量 5 mg)置 5 mL 或 10 mL 离心管中，加入 5 mL 去离子水，置沸水浴中加热变性 30 min，冷却至室温。将变性后的胶原蛋白溶液转移至10 mL 容量瓶中，加 0.10 mol/L 的碳酸氢铵溶液定容，摇匀，并根据样品原始浓度配制成最终浓度为 0.5 mg/mL 的样品工作溶液。
b) 液体样品：取一定体积的液体样品(胶原蛋白含量约 5 mg)，调节 pH 值至 7.5～8.5，置沸水浴中加热变性 30 min，冷却至室温。将变性后的胶原蛋白溶液转移至 10 mL 容量瓶中，加 0.05 mol/L 的碳酸氢铵溶液定容，摇匀。

7.1.2 样品酶解：

取配制好的浓度为 0.5 mg/mL 的样品工作溶液(7.1.1)1 mL，加入酶解小瓶中(含胰蛋白酶 20 μg，酶活力 15 000 u/mg)，置 37 ℃恒温振荡反应器中，恒温振荡频率 150 次/分～200 次/分，反应一定时间，至特征多肽丰度不再变化，沸水浴加热 5 min 使胰蛋白酶失活，冷却至室温，离心(3 000g，10 min)，取上清液置进样瓶中，待用。

注：推荐的蛋白样品：胰蛋白酶比为(25～100)：1，宜结合酶解时间，经试验验证确认酶解效率满足要求。

7.2 色谱-质谱条件

下述液相色谱-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(待检测碎片离子稳定、特异、丰度高、信噪比优良)。

a) 色谱条件

液相色谱参考条件如下:

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 60%乙腈溶液;

流速:0.2 mL/min~0.6 mL/min;

柱温:25 ℃~30 ℃;

进样量:2 μL~10 μL;

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 2.0 mm)];

建议梯度洗脱,根据不同仪器和样品优化洗脱条件。

b) 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:电喷雾离子源;

扫描方式:正离子扫描;

检测方式: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;

喷雾电压:3.5 kV;

离子源蒸发温度:300 ℃。

c) 检测条件要求

理论板数:>4 000

线性 R^2 值:≥0.99;

加标回收率:80%~120%;

精密度:按照《中华人民共和国药典》2020 年版 四部 通则 9101 分析方法验证指导原则。

外标法时,对照品溶液的色谱峰面积与供试品中对应的色谱峰面积比值不超过 2 倍。

7.3 测定

7.3.1 标准工作曲线

以一系列特征多肽与同位素标记特征多肽标准工作溶液浓度比值为横坐标,以特征多肽与同位素标记特征多肽的峰面积比值为纵坐标绘制标准曲线,得到回归方程和相关系数。

$$Y = aX + b, R^2 \quad \cdots\cdots(1)$$

式中:

Y ——特征多肽与同位素标记特征多肽峰面积比值;

a ——常数;

X ——特征多肽浓度与同位素标记特征多肽浓度比值;

b ——常数;

R^2——相关系数。

注:采用外标法时,以标准工作液浓度(μg/mL)为横坐标,特征多肽的峰面积为纵坐标绘制标准曲线,用于样品特征多肽含量计算。

7.3.2 定量检测

将标准工作液和待测液分别注入液相色谱-质谱联用仪中,以保留时间和稳定特异的子离子色谱峰进行定性。按照液相色谱-质谱条件测定标准工作液和样品,样品和标准工作液中待测物的保留时间与对照品一致。定量测定时采用内标法或外标法定量。

8 结果计算

8.1 用标准曲线的回归方程计算测试样品的特征多肽浓度。根据测试样品中特征多肽与同位素标记特征多肽峰面积比值(Y),得出测试样品中特征多肽与同位素内标的浓度比(X)。

8.2 根据试样的同位素特征多肽浓度和测试样品中特征多肽与同位素内标的浓度比,计算试样中的特征多肽浓度和含量[见式(2)和式(3)]。

用系统处理软件或按照式(2)计算试样中特征多肽含量:

$$M_t = \frac{X \times C_i \times V}{m} \quad \cdots\cdots(2)$$

式中:

M_t ——试样中特征多肽含量,单位为微克每毫克(μg/mg);

X ——样品中特征多肽与同位素内标特征多肽的浓度比;

C_i ——同位素内标特征多肽浓度,单位为微克每毫升(μg/mL);

V ——样品最终定容体积,单位为毫升(mL);

m ——最终测试样液的试样质量,单位为毫克(mg)。

注:式(2)适用于固体样品,包括:凝胶、海绵、膜、冻干粉等样品的胶原蛋白特征肽含量计算,即以每毫克样品中含有特征多肽的量(μg)表示。由于凝胶类样品含水量较多,其单位质量中胶原蛋白的特征多肽含量意义不同,建议在结果后面标注样品的性状(凝胶)。

液体样品按照式(3)计算试样中特征多肽含量:

$$M_t = \frac{X \times C_i \times V_1}{V_2} \quad \cdots\cdots(3)$$

式中:

M_t ——试样中特征多肽含量,单位为微克每毫升(μg/mL);

X ——样品中特征多肽与同位素内标特征多肽的浓度比;

C_i ——同位素内标特征多肽浓度,单位为微克每毫升(μg/mL);

V_1 ——样品最终定容体积,单位为毫升(mL);

V_2 ——最终测试样液的试样体积,单位为毫升(mL)。

附 录 A
（规范性）
牛Ⅰ型胶原蛋白特征多肽含量检测

A.1 试剂及配制

A.1.1 试剂及对照品

所用试剂及对照品均符合以下要求：

a) 牛Ⅰ型胶原蛋白特征多肽对照品：序列为 GPAGPQGPR 的多肽，纯度大于 98%；

b) 同位素标记牛Ⅰ型胶原蛋白特征多肽：序列为 G(N^{15})PA(N^{15})G(N^{15})PQG(N^{15})PR 的多肽，纯度大于 95%；

c) 其他试剂见 5.1。

注：GETGPAGPAGPIGPVGAR 的特征多肽已被验证也可用于牛Ⅰ型胶原蛋白特征多肽定量检测对照品，并推荐用于与其他种属Ⅰ型胶原蛋白的鉴别。该序列已被验证在适宜的色谱质谱条件下可进行定量检测，并进行种属鉴别。

A.1.2 试剂配制

所用试剂配制方法如下：

a) 牛Ⅰ型胶原蛋白特征多肽标准工作液配制：

1) 牛Ⅰ型胶原蛋白特征多肽储备液配制：按照 5.2 e)1)规定进行配制；

2) 同位素标记牛Ⅰ型胶原蛋白特征多肽储备液配制：按照 5.2 e)2)规定进行配制；

3) 特征多肽标准样品配制：将牛Ⅰ型胶原蛋白特征多肽储备液用 0.05 mol/L 碳酸氢铵溶液稀释成浓度为 0.1 μg/mL、0.5 μg/mL、1 μg/mL、2 μg/mL、5 μg/mL、10 μg/mL 的标准工作液，并与同位素标记特征多肽标准工作液按 1∶1(体积比)混合(现用现配)，制备系列标准样品，离心(3 000g，10 min)，取上清液置进样瓶中，待用；

b) 其他试剂按照 5.2 规定进行配制。

A.2 仪器

所用仪器规格参照以下要求：

a) 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)；

b) 其他仪器见第 6 章。

A.3 测试方法

A.3.1 试样制备

A.3.1.1 样品变性溶解

按照 7.1.1 规定进行处理。

A.3.1.2 样品酶解及配制

样品酶解及配制方法如下：

a) 样品酶解：酶解反应 17 h，其他按照 7.1.2 规定进行处理；

b) 待测样品配制：酶解后的样品与同位素内标牛Ⅰ型胶原蛋白特征多肽标准工作液按 1∶1 混

合，待测；

c) 加标样品溶液配制：取胰蛋白酶酶解后的牛Ⅰ型胶原蛋白样品溶液 455 μL，200 μg/mL 标准工作液 5 μL，混匀，待测。

A.3.2 色谱质谱条件

A.3.2.1 色谱条件

流动相 A 相为含 0.1%甲酸的水溶液，B 相为含 0.1%甲酸的 60%乙腈溶液，流速为 0.3 mL/min，柱温为 30 ℃，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），使用梯度洗脱。洗脱条件见表 A.1。

表 A.1 梯度洗脱条件

时间 min	流动相 A %	流动相 B %
0.00	95	5
0.50	95	5
6.00	75	25
7.50	5	95
8.00	5	95
8.01	95	5
10.00	95	5

A.3.2.2 质谱条件

根据不同的质谱仪器设定相应的参数，通用参数按照 7.2b）规定进行设置，牛Ⅰ型胶原蛋白特征多肽检测参考条件见表 A.2。

表 A.2 监测离子通道

检测方式	母离子 m/z	子离子 m/z
牛Ⅰ型胶原蛋白特征多肽	418.74	611.27
		682.18
同位素标记特征多肽	420.71	613.27
		685.43

注 1：上述液相色谱-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。

注 2：优先选择内标和受试物相对应的子离子碎片，推荐使用受试物 m/z 418.74→611.27、内标物 m/z 420.71→613.27 作为定量离子通道。

A.3.3 测定

按照 7.3 规定进行测定。

A.4 结果计算

按照第 8 章规定进行计算。

A.5 牛Ⅰ型胶原蛋白特征多肽对照品典型色谱质谱图

本文件中使用的牛Ⅰ型胶原蛋白特征多肽对照品的典型色谱图见图 A.1，质谱图见图 A.2。

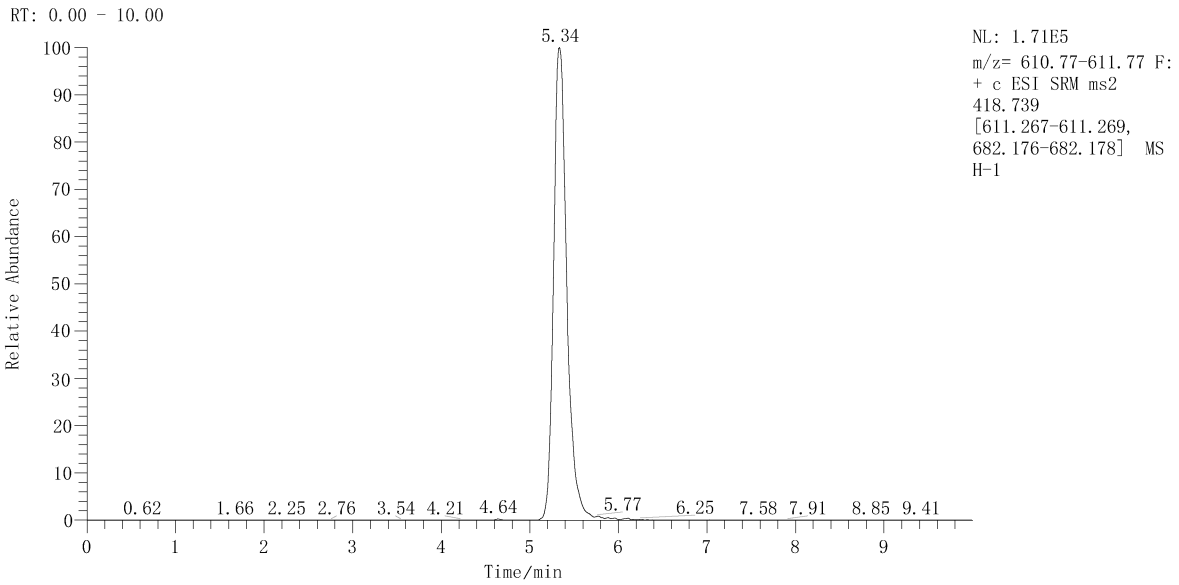

图 A.1 牛Ⅰ型胶原蛋白特征多肽对照品典型色谱图

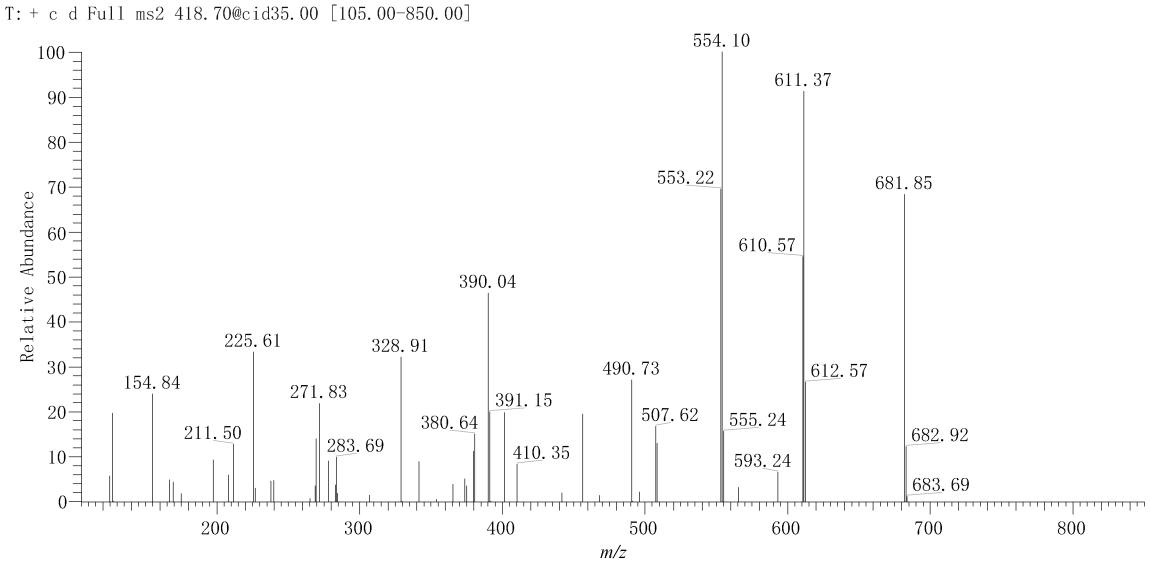

图 A.2 牛Ⅰ型胶原蛋白特征多肽对照品典型二级质谱图

附 录 B
（规范性）
牛Ⅱ型胶原蛋白特征多肽含量检测

B.1 试剂及配制

B.1.1 试剂及对照品

所用试剂及对照品均符合以下要求：

a) 牛Ⅱ型胶原蛋白特征多肽对照品：序列为 GEAGAQGPMGPAGPAGAR 的多肽，纯度大于 98%；

b) 同位素标记牛Ⅱ型胶原蛋白特征多肽：序列为 G(N^{15})EAG(N^{15})AQG(N^{15})PMG(N^{15})PAG(N^{15})PAG(N^{15})AR 的多肽，纯度大于 95%；

c) 其他试剂见 5.1。

B.1.2 试剂配制

所用试剂配制方法如下：

a) 牛Ⅱ型胶原蛋白特征多肽标准工作液配制：

1) 牛Ⅱ型胶原蛋白特征多肽储备液配制：按照 5.2 e)1)规定进行配制；

2) 同位素标记牛Ⅱ型胶原蛋白特征多肽储备液配制：按照 5.2 e)2)规定进行配制；

3) 牛Ⅱ型胶原蛋白特征多肽标准工作液配制：取适量的牛Ⅱ型胶原蛋白特征多肽储备液，用 0.05 mol/L 碳酸氢铵溶液(含 10%乙腈)稀释成浓度为 0.2 μg/mL、0.5 μg/mL、1 μg/mL、2 μg/mL、5 μg/mL、10 μg/mL、20 μg/mL、50 μg/mL 的系列标准工作液，备用；

b) 其他试剂按照 5.2 规定进行配制。

B.2 仪器

所用仪器规格参照以下要求：

a) 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)；

b) 其他仪器见第 6 章。

B.3 测试方法

B.3.1 试样制备

B.3.1.1 样品变性溶解

按照 7.1.1 规定进行处理。

B.3.1.2 样品酶解

取配制好的浓度为 1 mg/mL 的样品溶液 200 μL、0.05 mol/L 碳酸氢铵溶液 700 μL 和 100 μg/mL 的同位素标记牛Ⅱ型胶原蛋白特征多肽工作液 100 μL，加入酶解小瓶中(含胰蛋白酶 20 μg，酶活力 15 000 u/mg)，置 37 ℃恒温水浴锅中，振荡频率 150 次/分～200 次/分，反应 44 h，沸水浴加热 5 min 使胰蛋白酶失活，冷却至室温，离心(3 000g，10 min)，取上清液置进样小瓶中，待用。

牛Ⅱ型胶原蛋白样品：碳酸氢铵溶液：同位素内标胶原蛋白特征多肽工作液的体积比为 2∶7∶1。

B.3.2 色谱质谱条件

B.3.2.1 色谱条件

流动相 A 相为含 0.1%甲酸的水溶液，B 相为含 0.1%甲酸的 60%乙腈溶液，流速为 0.5 mL/min，柱温为 25 ℃，自动进样仓温度为 15 ℃，进样量为 2 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 B.1。

表 B.1 梯度洗脱程序

时间 min	流动相 A %	流动相 B %
0.00	95	5
1.00	95	5
6.00	70	30
7.50	5	95
9.00	5	95
9.01	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。		

B.3.2.2 质谱条件

根据不同的质谱仪器设定相应的参数，部分通用参数按照 7.2 b）规定进行设置，牛Ⅱ型胶原蛋白特征多肽检测参考条件如下：

雾化气流速：3 L/min；加热气流速：10 L/min；离子源温度：300 ℃；DL 管温度：250 ℃；加热块温度：400 ℃；干燥气流速：10 L/min；滞留时间 100 ms；检测方式为多反应监测模式（MRM），监测离子通道见表 B.2。

表 B.2 监测离子通道

检测方式	母离子 m/z	子离子 m/z
牛Ⅱ型胶原蛋白特征多肽	776.50	1 039.50
		696.10
		980.95
同位素标记特征多肽	779.35	1 043.10
		697.95
		984.50
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，以获得最佳效果。 注 2：优先选择内标和受试物相对应的子离子碎片，推荐使用受试物 m/z 776.50→1 039.50、内标物 m/z 779.35→1043.10 作为定量离子通道。		

B.3.3 测定

B.3.3.1 特征多肽系列标准样品的配制

取牛Ⅱ型胶原蛋白特征多肽系列标准工作液各 200 μL，分别加入 0.05 mol/L 碳酸氢铵溶液

700 μL 和 100 μg/mL 的同位素标记特征多肽标准工作液 100 μL，涡旋混匀后，取 450 μL，加入 50 μL 乙腈，混匀，待测。

牛Ⅱ型胶原蛋白特征多肽：碳酸氢铵溶液：同位素标记特征多肽的体积比为 2∶7∶1。

B.3.3.2 样品溶液配制

样品溶液配制方法如下：

a) 待测样品溶液配制：取胰蛋白酶酶解后的牛Ⅱ型胶原蛋白样品（见 B.3.1.2）溶液 450 μL，加入 50 μL 乙腈，混匀，待测；

b) 加标样品溶液配制：取胰蛋白酶酶解后的牛Ⅱ型胶原蛋白样品（见 B.3.1.2）溶液 450 μL，加入 45 μL 乙腈，5 μL 的 200 μg/mL 标准工作液[按照 B.1.2 a) 3)规定进行配制]，混匀，待测。

B.3.3.3 样品测定

按照 7.3 规定进行测定。

B.4 结果计算

按照第 8 章规定进行计算。

B.5 牛Ⅱ型胶原蛋白特征多肽对照品典型色谱质谱图

本文件中使用的牛Ⅱ型胶原蛋白特征多肽对照品的典型色谱图见图 B.1，质谱图见图 B.2。

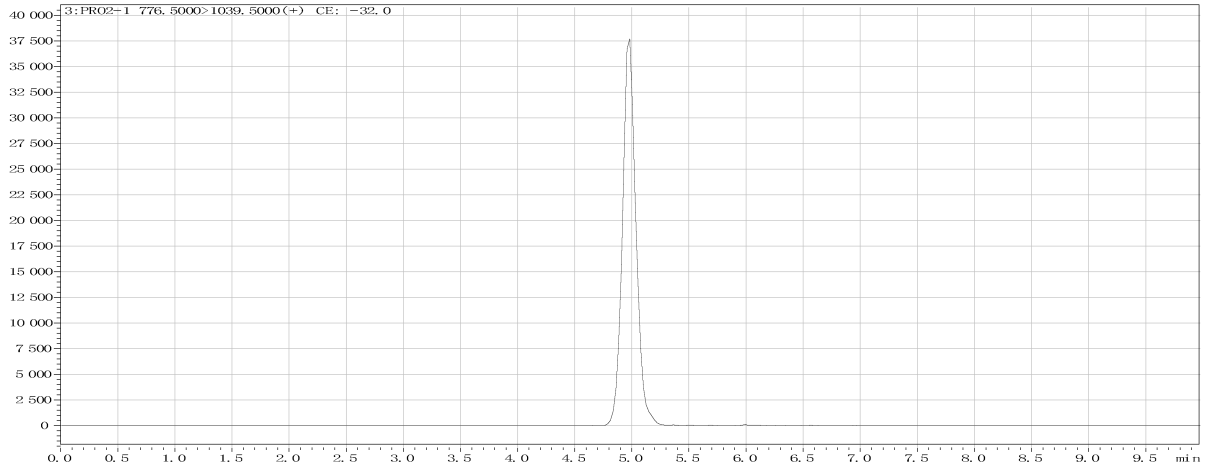

图 B.1 牛Ⅱ型胶原蛋白特征多肽对照品典型色谱图

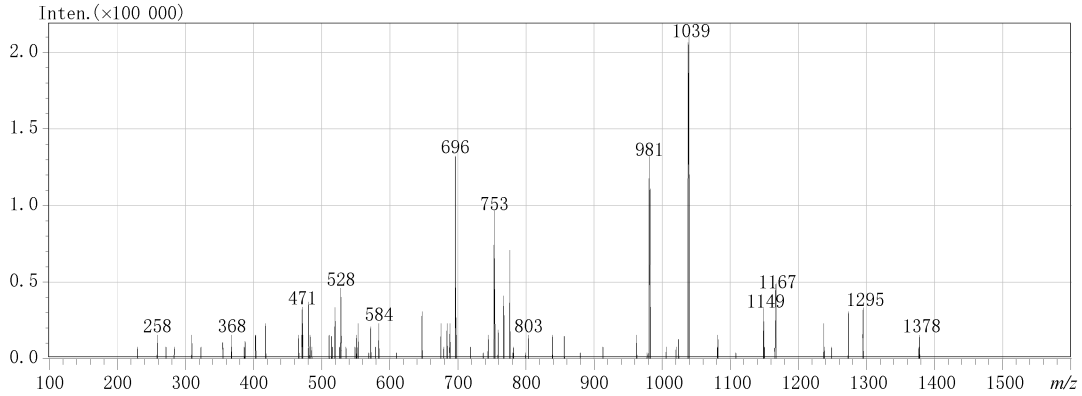

图 B.2 牛Ⅱ型胶原蛋白特征多肽对照品典型二级质谱图

附 录 C
（规范性）
猪Ⅰ型胶原蛋白特征多肽含量检测

C.1 试剂及配制

C.1.1 试剂

所用试剂均应符合以下要求：

a) 猪Ⅰ型胶原蛋白特征多肽对照品：序列为 GETGPAGPAGPVGPVGAR 的多肽，纯度大于 98%；

b) 同位素标记猪Ⅰ型胶原蛋白特征多肽：序列为 G(N^{15})ETG(N^{15})PAG(N^{15})PAG(N^{15})PVG(N^{15}) PVG(N^{15})AR 的多肽，纯度大于 95%；

c) 其他试剂见 5.1。

C.1.2 试剂配制

试剂配制方法如下：

a) 特征多肽标准工作液配制：

1) 猪Ⅰ型胶原蛋白特征多肽储备液配制：按照 5.2 e)1)规定进行配制；

2) 同位素标记猪Ⅰ型胶原蛋白特征多肽储备液配制：按照 5.2 e)2)规定进行配制；

3) 猪Ⅰ型胶原蛋白特征多肽标准样品配制：将猪Ⅰ型胶原蛋白特征多肽储备液用 0.05 mol/L 碳酸氢铵溶液稀释成浓度为 0.1 μg/mL、0.5 μg/mL、1 μg/mL、2 μg/mL、5 μg/mL、10 μg/mL 的标准样品溶液，并与同位素标记特征多肽标准工作液按 1∶1(体积比)混合(现用现配)，制备系列标准样品，离心(3 000g，10 min)，取上清液置进样小瓶中，待用；

b) 其他试剂按照 5.2 规定进行配制。

C.2 仪器

所用仪器规格参照以下要求：

a) 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)；

b) 其他仪器见第 6 章。

C.3 检测方法

C.3.1 试样制备

C.3.1.1 样品变性溶解

按照 7.1.1 规定进行处理。

C.3.1.2 样品酶解及配制

样品酶解及配制方法如下：

a) 样品酶解：酶解反应 17 h，其他按照 7.1.2 规定进行处理；

b) 待测样品配制：酶解后的样品与同位素内标猪Ⅰ型胶原蛋白特征多肽标准工作液按 1∶1(体

积比)混合,待测;

c) 加标样品溶液配制:取胰蛋白酶酶解后的猪Ⅰ型胶原蛋白样品溶液 455 μL,加入 400 μg/mL 的标准系列工作液[配制方法见 C.1.2a) 3)]5 μL,混匀,待测。

C.3.2 色谱质谱条件

C.3.2.1 色谱条件

流动相 A 相为含 0.1%甲酸的水溶液,B 相为含 0.1%甲酸的 60%乙腈溶液,流速为 0.3 mL/min,柱温为 30 ℃,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,100 mm×2.1 mm),使用梯度洗脱。洗脱条件见表 C.1。

表 C.1 梯度洗脱条件

时间 min	流动相 A %	流动相 B %
0.00	90	10
3.00	90	10
7.00	5	95
10.00	5	95
10.10	90	10
13.00	90	10

C.3.2.2 质谱条件

根据不同的质谱仪器设定相应的参数,通用参数按照 7.2 b)规定进行设置,猪Ⅰ型胶原蛋白特征多肽检测参考条件见表 C.2。

表 C.2 监测离子通道

检测方式	母离子 m/z	子离子 m/z
猪Ⅰ型胶原蛋白特征多肽	774.30	602.30
		977.45
同位素标记特征多肽	777.30	604.10
		980.45
注 1:上述液相色谱-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。 注 2:优先选择内标和受试物相对应的子离子碎片,推荐使用受试物 m/z 774.30→602.30、内标物 m/z 777.30→604.10 作为定量离子通道。		

C.3.3 测定

按照 7.3 规定进行测定。

C.4 结果计算

按照第 8 章规定进行计算。

C.5 猪Ⅰ型胶原蛋白特征多肽对照品典型色谱质谱图

本文件中使用的猪Ⅰ型胶原蛋白特征多肽对照品的典型色谱图见图 C.1，质谱图见图 C.2。

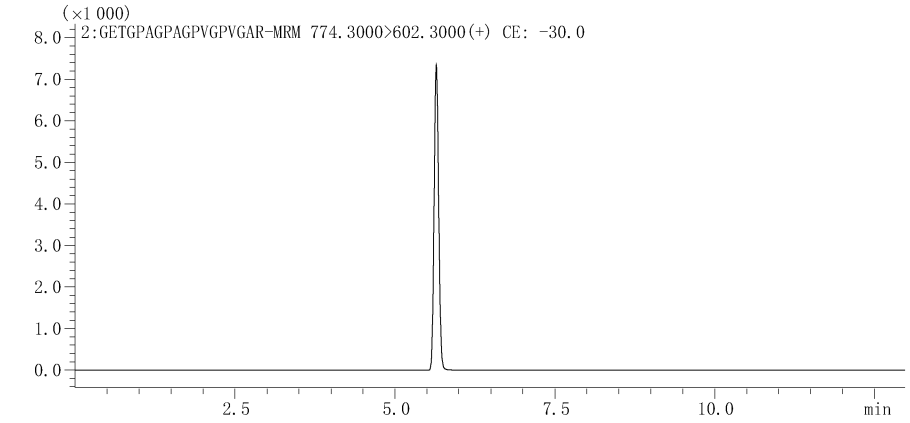

图 C.1 猪Ⅰ型胶原蛋白特征多肽对照品典型色谱图

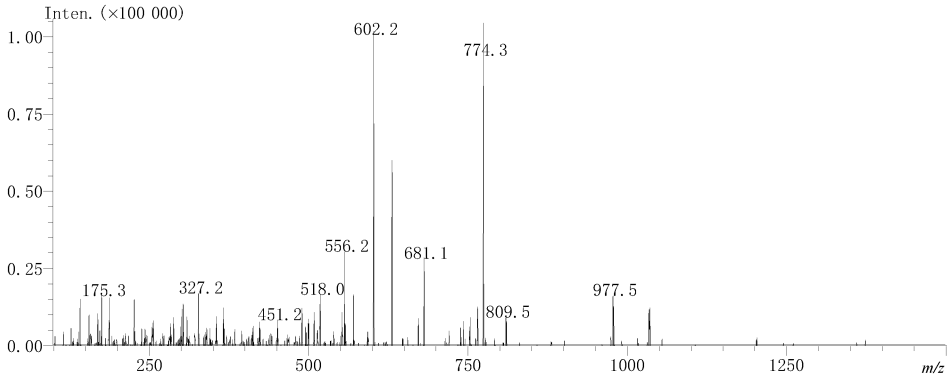

图 C.2 猪Ⅰ型胶原蛋白特征多肽对照品典型二级质谱图

参 考 文 献

[1] YY/T 0954 无源外科植入物 Ⅰ型胶原蛋白植入剂

[2] Lee CH, Singla A., Lee YY. Biomedical applications of collagen. Int J Phar, 2001, 221: 1-22

[3] Sherman VR , Yang W, Meyers MA. The materials science of collagen. J Mech Behav Biomed, 2015, 52: 22-50

[4] Liu XH, Zheng C, Luo XM, Wang XC, Jiang H. Recent advances of collagen-based biomaterials: Multi-hierarchical structure, modification and biomedical applications. Mater Sci Eng, R. 2019, 99:1509-1522

[5] Zhang GF, Sun AM, Li WJ, Liu T, Su ZG. Mass spectrometric analysis of enzymatic digestion of denatured collagen for identification of collagen type. J Chromatogr A, 2006, 1114: 274-277

[6] Pataridis S, Eckhardt A, Mikulikova K. Identification of collagen types in tissues using HPLC-MS/MS. J Sep Sci, 2008 (31): 3483-3488

[7] Pataridis S, Eckhardt A, Mikulíkova K, Sedlakova P, Miksik I. Determination and quantification of collagen types in tissues using HPLC-MS/MS. Curr Anal Chem, 2009, 5 (4):316-323

[8] Nimptsch A, Schibur S, Ihling C, Sinz A, Riemer T, Huster D, Schiller J. Quantitative analysis of denatured collagen by collagenase digestion and subsequent MALDI-TOF mass spectrometry. Cell Tissue Res, 2011, 343 (3): 605-617

[9] Peffers MJ, Beynon RJ, Clegg PD. Absolute quantification of selected proteins in the human osteoarthritic secretome. International Int J Mol Sci, 2013, 14 (10): 20658-20681

[10] Buckley M. Species identification of bovine, ovine and porcine type 1 collagen; comparing peptide mass fingerprinting and LC-based proteomics methods. Int J Mol Sci, 2016, 17(4): 1-17

[11] Van Huizen NA, Ijzermans JNM, Burgers PC, Luider TM. Collagen analysis with mass spectrometry. Mass Spectrom Rev. 2020, 39: 309-335