

ICS 11.030.30

CCS 30

YY

中华人民共和国医药行业标准

XX/T XXXXX—XXXX

## 组织工程医疗器械 胶原蛋白

Tissue Engineered Medical Devices Collagen

(点击此处添加与国际标准一致性程度的标识)

(征求意见稿)

(本草案完成时间: 2022.8)

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

国家药品监督管理局 发布

## 目 次

前言 .....	III
引言 .....	IV
1 范围 .....	5
2 规范性引用文件 .....	5
3 术语和定义 .....	5
4 工艺质量控制 .....	5
5 检测指标、要求及检测方法 .....	6
5.1 一般理化性质指标 .....	6
5.1.1 外观（如性状、颜色） .....	6
5.1.2 可见异物 .....	6
5.1.3 溶解性 .....	6
5.1.4 pH 值 .....	6
5.1.5 水分 .....	6
5.1.6 炽灼残渣 .....	6
5.2 胶原蛋白的特性指标 .....	6
5.2.1 胶原蛋白鉴别 .....	6
5.2.2 胶原蛋白高级结构分析 .....	6
5.2.3 纯度 .....	7
5.2.4 含量 .....	8
5.2.5 分子量 .....	8
5.2.6 氨基酸分析 .....	8
5.2.7 热稳定性 .....	8
5.2.8 变性胶原蛋白分析 .....	9
5.2.9 胶原蛋白-细胞相互作用 .....	9
5.2.10 胶原蛋白自组装 .....	9
5.3 杂质、污染物和添加剂 .....	9
5.3.1 概述 .....	9
5.3.2 杂蛋白 .....	9
5.3.3 弹性蛋白 .....	10
5.3.4 总糖含量（以葡萄糖计） .....	10
5.3.5 脂肪残留 .....	10
5.3.6 内毒素 .....	10
5.3.7 重金属与微量元素 .....	10
5.3.8 微生物 .....	10
5.3.9 添加剂 .....	10
6 生物学评价 .....	10
7 初始材料外源因子污染的风险控制 .....	11

8	存储条件/货架期稳定性	11
9	包装、运输	11
附录 A (规范性)	胶原蛋白高级结构分析	12
附录 B (规范性)	I 型胶原蛋白纯度测定	14
附录 C (规范性)	羟脯氨酸含量测定	16
附录 D (规范性)	胶原蛋白分子量测定——分子排阻色谱法	19
附录 E (规范性)	色氨酸含量的测定	20
附录 F (规范性)	变性胶原蛋白检测——蛋白酶酶解法	22
附录 G (规范性)	细胞黏附性测定——离心法	26
附录 H (规范性)	胶原蛋白自组装性能测试方法	29
附录 I (规范性)	弹性蛋白含量检测——液相色谱-质谱法	31
附录 J (规范性)	总糖含量测定	34
	参考文献	35

## 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/TC110/SC3）归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

## 引 言

胶原蛋白是结缔组织的主要蛋白，也是与机体的细胞、组织和器官功能紧密相关的功能性蛋白，具有良好的生物相容性、生物可降解性和低免疫性。随着人们对胶原蛋白结构和功能等研究的不断深入，胶原蛋白在医疗领域的应用日益广泛，包括止血海绵、敷料、软组织填充注射剂、组织工程医疗器械产品、细胞基产品的基质以及药物递送的载体。

另一方面，组织提取胶原蛋白的理化性能、生物学、免疫学或毒理学特性可能因来源和提取工艺而异。因为尚未完全了解胶原蛋白性质随来源材料和提取工艺的变化，因此需要充分研究不同来源和工艺制备的胶原蛋白的性质，并通过进行特定表征来比较不同的胶原蛋白材料。

虽然胶原蛋白具有多功能性而在医疗领域中广泛应用，但是胶原蛋白的实际应用需要基于材料的生物相容性和预期特定应用的功能性指标（包括物理、化学和生物学检测与评价的数据）进行设计开发。因此，规范胶原蛋白质量和安全性相关的性能指标和建立相应的检测评价方法，对于胶原蛋白研发生产、质量控制、检测评价以及技术审评都具有重要意义。

# 组织工程医疗器械 胶原蛋白

## 1 范围

本文件给出了组织提取胶原蛋白的工艺控制、检测指标和检测方法、生物学评价等要求。本文件适用于组织工程医疗器械用胶原蛋白的表征和质量评价。

注1：本文件所列出的检测指标和要求主要基于纯化的I型胶原蛋白考虑，并不一定适用于全部胶原类型。

注2：其他医疗器械用胶原蛋白的表征和质量评价可参考本文件。

注3：由培养细胞提取的胶原蛋白可参考本文件进行胶原蛋白的表征，宜基于风险分析进行质量控制。

## 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 5009.6 食品安全国家标准 食品中脂肪的测定
- GB/T 16886.1 医疗器械生物学评价 第1部分：风险管理过程中的评价与试验
- GB/T 16886.10 医疗器械生物学评价 第10部分：刺激与皮肤致敏试验
- GB/T 16886.20 医疗器械生物学评价 第20部分 医疗器械免疫毒理学试验原则和方法
- YY/T 0771.1 动物源医疗器械 第1部分：风险管理应用
- YY/T 0771.2 动物源医疗器械 第2部分：来源、收集与处置的控制
- YY/T 0771.3 动物源医疗器械 第3部分：病毒和传播性海绵状脑病（TSE）因子去除与灭活的确认
- YY/T 0771.4 动物源医疗器械 第4部分：传播性海绵状脑病（TSE）因子的去除和/或灭活及其过程确认分析的原则
- YY/T 1511 胶原蛋白海绵
- YY/T1805.2 组织工程医疗器械产品 胶原蛋白 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
- 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
- YY/T XXXX 组织工程医疗器械产品 胶原蛋白 术语  
《中华人民共和国药典》

## 3 术语和定义

YY/T XXXX 组织工程医疗器械产品 胶原蛋白 术语界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1

**胶原蛋白特征多肽 collagen marker peptide**

在不同来源及不同类型的胶原蛋白序列进行Blast多序列比对中，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，化学修饰或交联对其丰度没有影响，在色谱分离过程中有较高的分离度的肽段。

## 4 工艺质量控制

宜根据组织来源的特点和影响所提取胶原蛋白性能和质量的风险分析，建立完善的质量控制体系，包括但不限于以下方面：基本要求（生产及检定用设施、动物组织等生产用原材料及辅料、生产用水和器具等），生产过程的控制（原料预处理、半成品、成品、分装、病毒去除与灭活等）以及生产工艺变更要求，建立质量控制体系，不适用条款或事项需给出合理的说明。

## 5 检测指标、要求及检测方法

### 5.1 一般理化性质指标

#### 5.1.1 外观（如性状、颜色）

肉眼直接观测，供试品应为半透明白色/半透明淡黄色/无色透明液体，或白色/类白色粉末或海绵状固体。

#### 5.1.2 可见异物

适用时，按照《中华人民共和国药典》“可见异物检查法”的“灯检法”进行检测，供试品应无明显异物。

#### 5.1.3 溶解性

应根据供试品的溶解特性，对供试品在稀酸溶液中的溶解程度和条件进行表征和阐述，包括但不限于溶解时的酸种类、pH值、酸浓度、时间、温度等条件。

#### 5.1.4 pH值

胶原蛋白液体直接取供试品，胶原蛋白固体用纯化水配制成0.5 mg/mL~1 mg/mL的溶液，在37℃浸提24 h制备供试品，按照《中华人民共和国药典》“pH值测定法”测定，供试品pH值应符合所标示范围。

#### 5.1.5 水分

取胶原蛋白固体约1g~2g，按照《中华人民共和国药典》“干燥失重测定法”测定，供试品减失重量应符合所标示范围。

#### 5.1.6 炽灼残渣

按照《中华人民共和国药典》“炽灼残渣检查法”测定，供试品炽灼残渣应符合所标示范围。

### 5.2 胶原蛋白的特性指标

#### 5.2.1 胶原蛋白鉴别

5.2.1.1 红外分光光度法：取供试品适量，按照《中华人民共和国药典》“红外分光光度法”测定，I型胶原蛋白应具有图1所示的红外光谱特征峰：3488  $\text{cm}^{-1}$ ~3188  $\text{cm}^{-1}$ 、3102  $\text{cm}^{-1}$ ~3062  $\text{cm}^{-1}$ 、2985  $\text{cm}^{-1}$ ~2915  $\text{cm}^{-1}$ 、1667  $\text{cm}^{-1}$ ~1627  $\text{cm}^{-1}$ ，1548  $\text{cm}^{-1}$ 、1452  $\text{cm}^{-1}$ 、1402  $\text{cm}^{-1}$ 、1338  $\text{cm}^{-1}$ 、1238  $\text{cm}^{-1}$ 。未给出范围的波数值，其变化值不应超过0.5%。

5.2.1.2 拉曼光谱法：取供试品适量，按照《中华人民共和国药典》“拉曼光谱法”测定，I型胶原蛋白应具有图2所示的拉曼光谱特征峰：856  $\text{cm}^{-1}$ 、876  $\text{cm}^{-1}$ 、922  $\text{cm}^{-1}$ 、938  $\text{cm}^{-1}$ 、1004  $\text{cm}^{-1}$ 、1033  $\text{cm}^{-1}$ 、1246  $\text{cm}^{-1}$ 、1271  $\text{cm}^{-1}$ 、1451  $\text{cm}^{-1}$ 、1668  $\text{cm}^{-1}$ 。

5.2.1.3 通过胶原蛋白特征多肽进行胶原蛋白种属和/或型别鉴别时，按照YY/T 1805.3的规定，采用液相色谱-质谱联用技术进行测定，供试品应检测出特定动物种属的该型别胶原蛋白特征多肽。

5.2.1.4 适用时，可用特异性抗体通过蛋白质免疫印迹法（Western blot）或酶联免疫法（ELISA）进行胶原蛋白鉴别。采用免疫印迹法应按照《中华人民共和国药典》“免疫印迹法”的要求进行，供试品应呈现明显色带。可使用商用试剂盒进行酶联免疫法检测，供试品应有明显阳性显色反应。

注：采用非标准化方法时宜进行方法学验证。

#### 5.2.2 胶原蛋白高级结构分析

##### 5.2.2.1 圆二色（CD）光谱

按照附录A.1的规定进行圆二色光谱分析，胶原蛋白供试品应在221nm~222nm出现正峰，且在195nm~220nm出现负峰；在221nm处正峰和195 nm处负峰的比值处于0.09~0.15之间。

注：胶原蛋白在CD光谱221nm处的峰高（峰面积）与供试品中具有三螺旋结构的胶原蛋白含量在一定质量范围内呈线性关系，可进行相对定量分析。

### 5.2.2.2 微量差示扫描量热法

按照附录A.2的规定进行，牛、猪、大鼠I型胶原蛋白特征吸热峰应在 $(42\pm 2)^\circ\text{C}$ ，罗非鱼I型胶原特征吸热峰应在 $(37\pm 2)^\circ\text{C}$ ；其他胶原蛋白供试品转换温度峰值应符合标示温度范围( $T_m$ 值)。

注1：低温鱼的生长环境不同，胶原蛋白转换温度峰值会较低。

注2：胶原蛋白吸热峰面积与供试品中具有三螺旋结构的胶原蛋白含量在一定质量范围内呈线性关系，可进行相对定量分析。

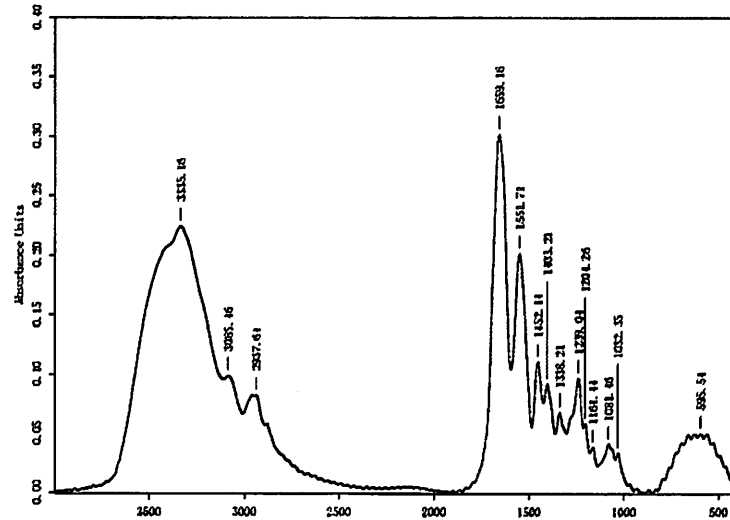


图1 牛I型胶原蛋白红外分光光度法谱图

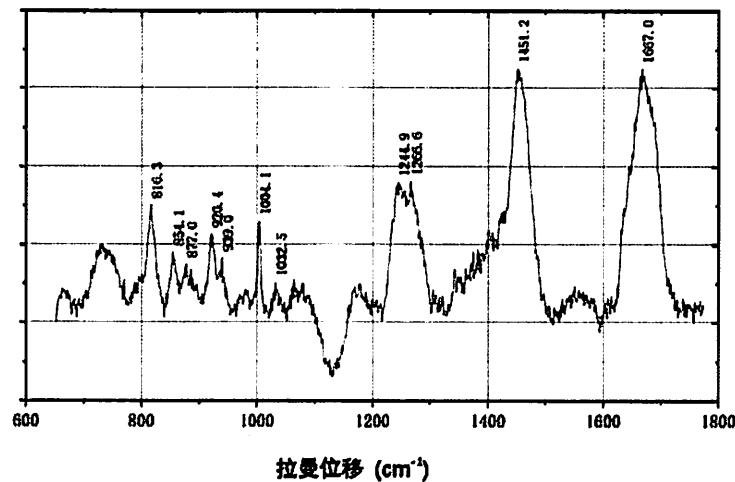


图2 牛I型胶原蛋白拉曼光谱法谱图

### 5.2.3 纯度

#### 5.2.3.1 色谱法

按照《中华人民共和国药典》“色谱法”的“分子排阻色谱法”测定，按面积归一化法计算纯度，胶原蛋白供试品纯度应符合标示范围。

注：胶原蛋白色谱柱可选择KW-803凝胶色谱柱或其他适宜的凝胶色谱柱，在色谱柱中大分子表现为保留时间较短，小分子保留时间较长。分子排阻法中二聚体或多聚体在主峰前面。二聚体或多聚体可不作为杂质。

#### 5.2.3.2 电泳法



按照附录B的规定，胶原蛋白供试品经特异性胶原蛋白酶作用后，通过SDS-PAGE凝胶电泳法进行分析，供试品纯度应符合标示范围。

注：与I型胶原蛋白伴随的III型胶原蛋白可不作为杂蛋白。

#### 5.2.4 含量

5.2.4.1 胶原蛋白含量可用总蛋白含量和纯度计算，胶原蛋白的含量（浓度）以“质量/质量”表示（固体）或“质量/体积”（液体）表示。总蛋白含量的测定按照 YY/T 1511 附录 A “凯氏定氮法蛋白含量测定”进行，或按照《中国药典》“蛋白质含量测定法 第三法 双缩脲法”进行测定。胶原蛋白纯度按 5.2.3 测定。胶原蛋白含量应在标示量的 90 %~110 %。

注：凯氏定氮法中胶原蛋白的系数推荐根据理论氨基酸序列中氮元素分析确定。

5.2.4.2 去端肽胶原蛋白含量可用羟脯氨酸含量按下述方式计算，去端肽胶原蛋白含量应在标示量的 90 %~110 %。

- 通过蛋白数据库获得去端肽胶原蛋白（不含信号肽、前肽和端肽）理论氨基酸序列中脯氨酸和羟脯氨酸的总数。
- 根据去端肽胶原蛋白供试品氨基酸组成分析获得的脯氨酸和羟脯氨酸含量，确定脯氨酸和羟脯氨酸的实际比例。由于羟脯氨酸分子量比脯氨酸分子量高 16 Da，按照脯氨酸和羟脯氨酸的实际测定比例，可计算去端肽胶原蛋白的分子量。然后用羟脯氨酸分子量总和除以去端肽胶原蛋白分子量，可计算出羟脯氨酸在去端肽胶原蛋白供试品的质量百分比。
- 用羟脯氨酸含量除以羟脯氨酸在去端肽胶原蛋白供试品的质量百分比，即可获得供试品中去端肽胶原蛋白含量。

注：去端肽胶原蛋白分子量未考虑糖基化修饰和羟赖氨酸修饰。

5.2.4.3 胶原蛋白羟脯氨酸含量：采用色谱法时，按照《中华人民共和国药典》“高效液相色谱法”进行测定；采用紫外分光光度法或氨基酸分析仪法时，按照附录 C 的要求进行检测，胶原蛋白羟脯氨酸含量应符合标示范围。

5.2.4.4 胶原蛋白特征多肽含量：按照 YY/T1805.3 的规定，采用液相色谱-质谱法进行定量检测，胶原蛋白特征多肽含量应符合标示范围。

注：胶原蛋白特征多肽含量以单位质量总蛋白中标示型别胶原蛋白特征多肽含量表示。

#### 5.2.5 分子量

5.2.5.1 采用电泳法测定胶原蛋白分子量时，按照 YY/T 1805.2 的规定进行，供试品结果应符合标示范围。

5.2.5.2 非变性条件下，胶原蛋白分子量可用分子排阻色谱法检测，按照附录 D 的规定进行，供试品结果应符合标示范围。

5.2.5.3 动力黏度：取供试品按照《中华人民共和国药典》“黏度测定法”的“旋转黏度计测定法”测定，需要详细描述试验条件，胶原蛋白动力黏度值应符合所标示范围。

注：以上3种分子量分析方法联合使用，可充分反映供试品的分子量大小、分布及多聚体和降解信息，推荐给出3种方法的测试结果。

#### 5.2.6 氨基酸分析

5.2.6.1 采用色谱法进行胶原蛋白氨基酸分析时，按照《中华人民共和国药典》“色谱法”的“高效液相色谱法”进行测定，供试品结果应符合标示范围。

5.2.6.2 采用氨基酸分析仪法时，制备胶原蛋白酸水解检验液来测定酸水解最终产物中的氨基酸组成，供试品结果应符合标示范围。

5.2.6.3 色氨酸：胶原蛋白色氨酸含量按照附录 E 的规定进行，供试品结果应符合标示范围。

注：色氨酸可能存在于胶原蛋白非三螺旋端肽末端，

5.2.6.4 胶原蛋白端肽检测：对胶原蛋白端肽序列进行 Blast 多序列比对，选择只在某一特定来源和/或特定类型胶原蛋白端肽序列中出现的肽段，作为其特异性的端肽特征多肽，按照 YY/T 1805.3 的规定进行检测，无/去端肽胶原蛋白不应检出。

#### 5.2.7 热稳定性

根据供试品的通常贮存性状（液体或固体）和预期使用性状进行相同或相似样品条件下的差示扫描量热分析，胶原蛋白固体样品按照《中华人民共和国药典》“热分析法”用差示扫描量热法测定，胶原蛋白溶液样品按照附录A的规定用微量差示扫描量热法进行测定。供试品转换温度峰值应符合标示范围。

### 5.2.8 变性胶原蛋白分析

具有三螺旋结构的胶原蛋白能抵御大多数蛋白酶的消化，而变性胶原蛋白可被蛋白酶消化，通过测定消化后分离组分的羟脯氨酸含量可反映变性胶原蛋白含量。按照附录F进行胰蛋白酶、胃蛋白酶消化的变性胶原蛋白分析，变性胶原蛋白含量结果应符合标示范围。

### 5.2.9 胶原蛋白-细胞相互作用

#### 5.2.9.1 细胞黏附性

按照附录G的规定进行细胞黏附性测定，阳性对照组的黏附百分比应高于阴性对照组，且具有统计学意义（ $P < 0.05$ ），则试验结果成立，否则应重复该试验。胶原蛋白供试品试验组的黏附百分比高且具有统计学意义（ $P < 0.05$ ），则判定供试品对细胞有促进黏附的作用。

#### 5.2.9.2 细胞迁移

按照YY/T 1849 附录C“细胞移行试验——细胞划痕法”进行检测并计算细胞迁移率。

结果判定：阳性对照组的细胞迁移率与阴性对照组相比，其差值应 $>30\%$ 且具有统计学意义（ $P < 0.05$ ），否则应重复该试验。胶原蛋白供试品组的细胞迁移率显著大于阴性对照组且具有统计学意义（ $P < 0.05$ ），则判定供试品在该浓度下具有促进细胞迁移的能力。

注1：人表皮角质形成细胞是构成皮肤表皮的主要细胞种类，适宜用于评价终产品使用部位为皮肤的胶原原料的生物学效应。此外，宜根据终产品使用部位，选择与其相关的细胞种类，参考本法进行试验。

注2：人角质形成细胞HaCat在培养过程中需控制传代前细胞汇合度，使其小于95%，过高汇合度会导致HaCat细胞分化，影响测试稳定性。HaCat细胞的生长迁移能力会随培养所用胎牛血清、培养基及细胞培养过程等有差异，具体的划痕前预处理条件需进行预实验摸索确定。

注3：供试液制备过程中应避免加热（样品温度不应超过其热变性温度）或冷冻，同时应避免激烈的震荡、搅拌或超声处理，因为加热或剪切力等因素会导致样品中的胶原蛋白变性，从而影响测试结果的准确性。

注4：建议选用EGF、明胶作为阳性对照。阳性对照应按说明书保存，应避免反复冻融。

注5：本法适用于检测可溶/部分可溶性的胶原蛋白样品。若采用无血清DMEM培养基配置供试品时，胶原供试液的体积不可超过终体积的10%。若配置好的加样样品颜色呈现黄色，可适量添加0.4M NaOH溶液进行中和，使加样样品颜色呈桔红至红色。建议供试品胶原浓度大于等于0.5 mg/mL。

注6：若配置好的加样样品呈现凝胶状，无法进行转移，可在加样样品配置过程中预冷所用试剂和供试液，并在配置完成后将加样样品保存在冰上，并尽快完成加样操作；加样样品凝胶化时间与样品的去端肽程度、样品离子强度及加样样品温度相关，推荐冰上配置加样样品后在5分钟内完成加样操作。

注7：在能形成凝胶的加样样品中，气泡会影响后继的图像收集、处理和定量，加样过程中也应尽量避免引入气泡；若配置好的加样样品中有气泡，可对样品进行短暂离心（ $>2000 \times g$ ，约15s），以去除气泡。

#### 5.2.10 胶原蛋白自组装

胶原蛋白自组装性能测试按附录H规定的方法进行，胶原蛋白供试品溶液的浊度变化曲线应呈现典型的S型，胶原蛋白自组装过程中静滞期结束时间（ $t_{lag}$ ）、胶原蛋白自组装的生长期增长斜率（K）应在标示范围内。

### 5.3 杂质、污染物和添加剂

#### 5.3.1 概述

胶原蛋白的杂质主要指外源性物质和材料。引起关注的杂质主要包括（但不限于）：糖胺聚糖、弹性蛋白、脂类、动物DNA、动物细胞成分、细胞培养组分、重金属、内毒素、微生物负载、酶及加工过程中使用的试剂（如酸、表面活性剂、溶剂等）。关于胶原蛋白中存在的加工助剂和其它杂质问题，生产者或供应商应提供工艺中可能引入的杂质信息。

#### 5.3.2 杂蛋白

杂蛋白的检测按照附录B的规定进行，结果应符合规定限值。

去端肽胶原蛋白的杂蛋白可用蛋白总量减去5.2.4.2测定的去端肽胶原蛋白含量，结果应符合规定限值。

注：在胶原蛋白纯化过程中残留的除目标类型胶原蛋白以外的其他蛋白质。主要包括（但不限于）：弹性蛋白、蛋白酶抑制剂等。与I型胶原伴随的III型胶原不作为杂蛋白考虑。

### 5.3.3 弹性蛋白

5.3.3.1 适宜时，采用经验证的酶联免疫试剂盒进行测定，弹性蛋白残留量应符合规定限值。

5.3.3.2 弹性蛋白残留采用测定锁链素和/或异锁链素含量时，按照附录I的规定进行，结果应符合规定限值。

### 5.3.4 总糖含量（以葡萄糖计）

按照附录J的规定进行检测，胶原蛋白供试品结果应符合规定限值。

### 5.3.5 脂肪残留

称取干燥恒重的胶原蛋白供试品1 g~2 g，按照GB 5009.6的规定进行测定，结果应符合规定限值。

### 5.3.6 内毒素

按照《中华人民共和国药典》“细菌内毒素检查法”规定的方法测定，胶原蛋白供试品内毒素含量应符合规定限值。

注：医疗器械产品的细菌内毒素限量要求与其与人体的接触方式等因素有关，宜考虑这些因素来规定作为原材料的胶原蛋白的细菌内毒素限值。

### 5.3.7 重金属与微量元素

5.3.7.1 依据材料来源和工艺，对可能存在的重金属进行总含量检测和必要的单项重金属含量检测。

5.3.7.2 残留重金属总量按照《中华人民共和国药典》“重金属检查法”“第二法”检测，重金属总量（以Pb计）应 $\leq 10 \mu\text{g/g}$ （质量分数）。

5.3.7.3 残留微量元素按照《中华人民共和国药典》“原子吸收分光光度法”、“ICP-OES”、“电感耦合等离子体质谱法”或相当的方法进行测定，其结果应符合限量要求：砷（As） $\leq 1 \mu\text{g/g}$ ，汞（Hg） $\leq 4 \mu\text{g/g}$ ，铅（Pb） $\leq 15 \mu\text{g/g}$ ，铬（Cr）、镉（Cd） $\leq 50 \mu\text{g/g}$ （质量分数）。预期植入用胶原蛋白铜（Cu）、钼（Mo）、铁（Fe）、镍（Ni）均 $\leq 50 \mu\text{g/g}$ （质量分数）。

### 5.3.8 微生物

5.3.8.1 以无菌方式提供时，应进行灭菌和无菌保证水平的工艺验证，并进行无菌检测。按照《中华人民共和国药典》“无菌检查法”进行检测，结果应无菌。

注1：使用者宜确认灭菌方法不会对胶原蛋白造成不利影响。胶原蛋白可通过不同的方法进行灭菌，例如（但不限于）：伽马射线辐照、电子束或环氧乙烷。也可利用无菌工艺进行制备。

注2：胶原溶液多通过在胶原溶液黏度许可的情况下过滤除菌，或辐照灭菌。黏度的任何改变可能引起分子量的改变，宜对此种情况进行评估。

5.3.8.2 以非无菌方式提供时，每1 g供试品中需氧菌总数不得超过 $10^2$  CFU，霉菌和酵母菌总数不得超过20 CFU。不得检出金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌和大肠埃希菌。按照《中华人民共和国药典》“非无菌产品微生物限度检查：微生物计数法”、“非无菌产品微生物限度检查：控制菌检查法”规定的方法进行检测。

### 5.3.9 添加剂

如果使用了防腐剂、冻干保护剂等添加剂，应给出其限量要求和检测方法。

## 6 生物学评价

胶原蛋白在结构方面存在较少的种属间差异，其主要结构和更高级的结构在不同种属间具有高度的相似性。然而，胶原蛋白材料的生物相容性还取决于其纯度、杂质成分、工艺中使用的化学试剂残留等因素。

胶原蛋白用于组织工程医疗产品或其他医疗器械的安全性应按照 GB/T 16886.1 的要求，以及 YY/T 0771.1~3，组织工程医疗器械产品的相关标准进行生物相容性评价。

胶原蛋白制备工艺中使用的化学试剂也可能引起胶原蛋白免疫原性的改变。免疫原性试验宜考虑，但不限于，按照 GB/T 16886.10 规定进行皮肤致敏试验、按照 GB/T 16886.20 规定进行免疫毒理学试验，具体要求可参照《动物源医疗器械注册技术审查指导原则》（2017年版）的附录 A。

## 7 初始材料外源因子污染的风险控制

组织提取胶原蛋白的初始材料主要为动物源组织，应建立适宜的动物供体筛查及组织采集程序，以保证控制初始材料外源因子污染的风险。因此，宜对组织来源进行控制和相应的风险评估。参照 YY/T 0771.1~2、《动物源医疗器械注册技术审查指导原则》（2017年版）的要求进行源头控制。

应建立病毒清除灭活工艺，以减少或消除潜在的传染性。按照 YY/T 0771.3 及《动物源医疗器械注册技术审查指导原则》（2017年版）的要求进行病毒清除灭活工艺的验证。病毒清除灭活过程应按适宜的经过验证的病毒清除灭活方案进行。

TSE 来源问题和 TSE 清除率：对于能耐受灭活 TSE 因子所要求的严苛处理方式的产品来说，宜对原材料的来源，去除潜在 TSE 因子的工艺设计，以及灭活 TSE 因子的处理方式有细致的考量。蛋白酶朊病毒测试的阴性结果可能不足以保证用于制备胶原的源材料是安全的，应按照 YY/T 0771.4 进行风险管理。

## 8 存储条件/货架期稳定性

理想的储存条件和货架期稳定性取决于胶原蛋白的物理形态（如溶液或固体）。

组织提取的冻干胶原蛋白宜储存在干燥、低温条件下。组织提取的胶原蛋白在冻干状态下的稳定性与含水量、pH值等有关，应经过验证，确定其货架期。宜避免将组织提取的任一形式的胶原蛋白反复冻融，因为会产生变性。

当进行胶原蛋白的储存和货架期测试时，最相关的指示稳定性的参数是那些与胶原蛋白的功能性相关的指标，宜考虑下述参数，如：分子量、高级结构、黏度、变性胶原蛋白、热稳定性、自组装及其它认为相关的参数。

## 9 包装、运输

9.1 若生产商将胶原蛋白作为本单位研发医疗器械产品的初始材料（原材料）时，应按照医疗器械生产中对原材料管理的质量体系进行包装、贮存、运输相关管理。

9.2 若生产商将胶原蛋白作为医疗器械研发的原材料销售时，建议参照医疗器械产品对包装、贮存、运输的要求，提供必要的信息。品名和来源信息中应注明种属来源、组织类型、胶原型别等信息。

**附录 A**  
**(规范性)**  
**胶原蛋白高级结构分析**

### A.1 圆二色光谱 (Circular Dichroism, CD)

#### A.1.1 原理

圆二色光谱 (Circular Dichroism, CD) 是利用蛋白质分子中具有光学活性的生色基团对左、右平面圆偏振光吸收不同, 对蛋白质结构进行表征的方法, 可以测定溶液状态下的蛋白质构象。

天然生物活性胶原具有三螺旋结构, 胶原的CD谱图在221 nm左右的波长处有正峰, 在195 nm左右的波长处有负峰, 正吸收峰是胶原三螺旋构型的圆二色谱典型特征, 可以作为胶原蛋白三螺旋结构有无的定性判定指标。加上负峰位置, 说明胶原的三螺旋结构完整性, 正峰与负峰的比值越大, 其三螺旋结构越完整。

通过采用有完整三螺旋结构的胶原蛋白对照品与经变性处理后失去三螺旋结构的变性胶原蛋白按照不同比例混合, 制备系列不同三螺旋结构含量的标准样品, 测定其221 nm处的峰高, 获得定量标准曲线, 用于供试品三螺旋结构相对含量的计算。

胶原的CD光谱性质由两个因素决定, 即吸光度和 CD光谱信号强度, 测定时样品应具有低吸光度和强CD光谱强度, 应无吸光干扰。溶剂对检测吸收波长无干扰, 样品能完全溶解在溶剂中形成均质透明溶液。

#### A.1.2 试剂和对照品

- a) 冰醋酸, 色谱纯;
- b) 胶原蛋白对照品: 推荐使用国家医药标准物质 (中国食品药品检定研究院可提供部分胶原蛋白对照品)。

注: 根据胶原蛋白的可溶性选择适宜的溶剂。

#### A.1.3 仪器和设备

- a) 分析天平 (附有防静电装置): 万分之一;
- b) 离心机;
- c) 圆二色光谱仪。

#### A.1.4 检测流程

##### A.1.4.1 待测样品制备

称取5 mg胶原蛋白对照品/供试品, 置于10mL容量瓶, 加入0.5 %醋酸 (HAc) 溶液, 定容至10mL, 混合均匀, 配制成浓度为0.5 mg/mL胶原溶液, 10000 r/min离心5 min, 取上清液备用。

##### A.1.4.2 检测条件

取配制后的胶原蛋白对照品/供试品溶液, 加入石英比色皿, 置于CD光谱仪上进行检测。具体参数为: 检测温度: 20 ℃; 样品池光径: 1 mm; 扫描范围: 180 nm~260 nm; 扫描波长: 0.1 nm; 扫描速度: 120 nm/min。使用0.5 %醋酸 (HAc) 溶液作为参比。对照品和供试品均平行测定三次, 取平均值。

注: 使用其他试验条件时宜进行说明。

##### A.1.4.3 数据处理

用工作软件记录CD光谱数据, 并做数据处理。

##### A.1.5 实验结果及分析

供试品不进行前处理, 直接溶解、离心后通过与对照品CD的谱图比较, 根据谱峰与对照品的一致性 or 差异进行有无三螺旋的定性判定。具体判定标准如下:

- a) 在 221nm~222nm 出现正峰, 且在 195nm~220nm 出现负峰;
- b) 在 221nm 处正峰和 195 nm 处负峰的比值处于 0.09~0.15 之间;
- c) 若在 221nm 处没有正峰, 表明供试品没有三螺旋结构。

## A.2 微量差示量热扫描法

### A.2.1 原理

胶原蛋白在加热发生相变时, 伴随着热量的吸收过程, 具有特定的物相转换温度和相应的热焓变化。胶原蛋白在解开三螺旋结构时, 可以观察到特定的转变温度, 用 $T_m$ 表示, 微量差示扫描量热法可以检测胶原结构变化的温度, 在特征温度下如出现吸热峰可以佐证具有三螺旋结构。

### A.2.2 试剂、仪器与设备

#### A.2.2.1 试剂及配置

0.5 %醋酸: 取冰醋酸5 mL, 加水稀释至1000 mL。

#### A.2.2.2 仪器和设备

- a) 微量差示扫描微量热仪;
- b) 电子天平 (精度 0.0001g);
- c) 真空脱气仪;
- d) 低温离心机;
- e) 涡旋仪。

#### A.2.2.3 耗材

0.22  $\mu$ m孔径滤膜、塑料容量瓶、塑料离心管。

### A.2.3 供试液制备

溶剂: 酸溶性胶原蛋白加0.5 %醋酸溶解。

胶原溶液或冻干样品: 精密称取适量 (胶原蛋白含量约5 mg), 置10 mL塑料容量瓶中加溶剂适量, 使充分溶解后稀释至刻度, 制成约0.5 mg/mL的溶液。

### A.2.4 测定

升温程序: 10  $^{\circ}$ C平衡10 min, 以1  $^{\circ}$ C/min速度升温至85  $^{\circ}$ C。N<sub>2</sub>保护 (表压力0.3 MPa), 采样间隔5 s。

### A.2.5 结果与判定

牛 I 型、牛 II 型、猪 I 型、鼠 I 型胶原蛋白转换温度峰值在(42 $\pm$ 2)  $^{\circ}$ C有吸热峰, 罗非鱼 I 型胶原在(37 $\pm$ 2)  $^{\circ}$ C有吸热峰, 低温鱼的生长环境不同,  $T_m$ 值会较低。供试品溶液 $T_m$ 出现对应的吸热峰可以佐证具有三螺旋结构; 否则为无三螺旋结构。

**附录 B**  
(规范性)  
**I 型胶原蛋白纯度测定**

**B.1 原理**

本方法所用的胶原蛋白酶是从溶组织梭状芽孢杆菌中纯化而来，可特异性作用于Pro-X-Gly-Pro序列的中性氨基酸(X)和甘氨酸之间的位点，这种序列在胶原蛋白中的频率很高，因此该胶原蛋白酶可降解具有三螺旋结构的胶原蛋白，但不会降解其它蛋白质。

通过对胶原蛋白酶解前后的样品进行电泳和考马斯亮蓝染色分析，可测定胶原蛋白纯度。

**B.2 仪器与试剂****B.2.1 仪器**

- a) 天平；
- b) 电泳仪；
- c) 影像分析系统。

**B.2.2 试剂及溶液配制**

除特别注明者外，所有试剂均不低于分析纯。

- a) 胶原蛋白酶：CAS 9001-12-1
- b) 牛血清白蛋白标准品(BSA)；
- c) 胶原蛋白对照品(应根据种属来源，选择胶原蛋白对照品)；
- d) 胶原蛋白酶消化液：按胶原蛋白酶说明书配置，配成含适当活性单位(U/mL)的消化液(建议提前进行预实验，胶原蛋白酶消化液的活性单位以37℃下酶解4h可以完全消化对照品为宜)；
- e) 样品缓冲液(2X)：分别量取0.5 mol/L三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液2.5 mL、甘油2.0 mL、10%十二烷基磺酸钠4.0 mL、0.1%溴酚蓝0.5 mL，加超纯水稀释至10 mL；
- f) 电泳缓冲液(5X)：称取三羟甲基氨基甲烷15.1 g、甘氨酸72.0 g、十二烷基磺酸钠5.0 g，加超纯水稀释至1000 mL，使用前稀释5倍；
- g) 考马斯亮蓝染色液：称取考马斯亮蓝R250 1 g，加入甲醇200 mL、冰醋酸50 mL、超纯水250 mL，混匀；
- h) 考马斯亮蓝脱色液：量取甲醇400 mL，冰醋酸100 mL与超纯水500 mL，混匀；
- i) 分离胶浓度：7%；
- j) 浓缩胶浓度：4%。

**B.3 测定****B.3.1 考马斯亮蓝对BSA的染色极限分析**

**B.3.1.1 BSA 溶液配制：**用水将BSA稀释成梯度浓度，浓度在0.001 mg/mL~0.025 mg/mL。

**B.3.1.2 SDS-PAGE 分析：**取各浓度BSA溶液20 μL上样进行SDS-PAGE电泳。电泳结束后用影像分析系统对脱色后的胶片进行分析，确定考马斯亮蓝对BSA的染色极限。

**B.3.2 样品中杂蛋白分析**

**B.3.2.1 样品 a：**用0.1%~0.5%的醋酸溶解或稀释样品，使蛋白浓度为1 mg/mL。

**B.3.2.2 样品 b：**用胶原蛋白酶消化液配置样品，配成蛋白浓度与样品a相同，于37℃水浴作用4h。

**B.3.2.3 样品 c：**取超纯水加胶原蛋白酶消化液，使胶原蛋白酶的浓度与样品b中的浓度相同。

**B.3.2.4 上样分析：**将上述样品与2X的样品缓冲液等体积混合(若溶液变成微黄色，需用NaOH调成蓝色)后，置于90℃~100℃热水中1 min~2 min取出进行SDS-PAGE电泳。样品、BSA(取染色极限量)和分子量标准品上样体积均为20 μL，电泳电压110V。电泳结束后用影像分析系统对脱色后的胶片进

行分析，记录条带光密度。

#### B.4 结果计算

##### B.4.1 胶原蛋白纯度计算

B.4.1.1 当  $B-C \neq 0$  时，样品中胶原蛋白纯度按式 (B.1) 计算。

$$\text{纯度}(\%) = \frac{A-(B-C)}{A} \times 100\% \dots\dots\dots (B.1)$$

式中：

A——样品a所有条带光密度之和；

B——样品b所有条带光密度之和；

C——样品c所有条带光密度之和。

B.4.1.2 当  $B-C=0$  时，样品中胶原蛋白纯度按式 (B.2) 计算。

$$\text{纯度}(\%) = \frac{10000 - \text{BSA极限值}}{10000} \times 100\% \dots\dots\dots (B.2)$$

##### B.4.2 杂蛋白含量计算

样品中杂蛋白含量按式 (B.3) 计算。

$$\text{杂蛋白含量}(\%) = 100\% - \text{胶原蛋白纯度} \dots\dots\dots (B.3)$$



**附录 C**  
**(规范性)**  
**羟脯氨酸含量测定**

**C.1 紫外分光光度法**

**C.1.1 原理**

羟脯氨酸是胶原蛋白中含有的特异性氨基酸,且含量比较稳定。将试样在105 ℃和 $c(\text{HCl})=6 \text{ mol/L}$ 盐酸作用下,水解成羟脯氨酸,羟脯氨酸经氯胺T氧化后,与对二甲氨基苯甲醛反应生成红色化合物,在波长560 nm处进行比色测定。

**C.1.2 仪器与试剂**

**C.1.2.1 仪器**

- a) 天平;
- b) 紫外分光光度计;
- c) 恒温箱。

**C.1.2.2 试剂及溶液配制**

除特别注明者外,所有试剂均为分析纯。

- a) L-羟脯氨酸对照品:国家对照品;
- b) 盐酸溶液,  $c(\text{HCl})=6 \text{ mol/L}$ :将优级纯盐酸与水等体积混合;
- c) pH=6.0 缓冲液:称取 57 g 三水合醋酸钠、37.5 g 柠檬酸三钠、5.5 g 一水合柠檬酸, 385 mL 异丙醇,加水 500 mL,用一水合柠檬酸调节 pH 至 6.0,加水稀释至 1000 mL;
- d) 氯胺 T 溶液:称取 3.5 g 氯胺 T,加水稀释至 50 mL,使用前现配;
- e) 氧化剂溶液:将加氯胺 T 溶液和 pH=6.0 缓冲液按 1:4 的比例混合;
- f) 60%高氯酸溶液:量取高氯酸 43 mL,加水稀释至 50 mL;
- g) 对二甲氨基苯甲醛溶液:称取 10 g 对二甲氨基苯甲醛溶液,加 15 mL 60%高氯酸溶液溶解;
- h) 显色剂:量取 15 mL 对二甲氨基苯甲醛溶液,溶于 65 mL 异丙醇中;
- i) 氢氧化钠溶液,  $c(\text{NaOH})=6 \text{ mol/L}$ :称取 24 g 氢氧化钠,加水稀释至 100 mL。

**C.1.3 L-羟脯氨酸对照品溶液制备**

**C.1.3.1 L-羟脯氨酸对照品储备液:**取 L-羟脯氨酸对照品,精密称定,加水溶解并定量稀释成每 1 mL 中含 20  $\mu\text{g}$  的溶液;

**C.1.3.2 L-羟脯氨酸对照品系列溶液:**精密量取 L-羟脯氨酸对照品储备液 2.5 mL、3.75 mL、5.0 mL、7.5 mL、10.0 mL,分别置 10 mL 容量瓶中,用水定容,配制 L-羟脯氨酸对照品系列溶液。

**C.1.4 供试液制备**

取干燥恒重后的样品置于水解管中,精密称定,加入 6 mol/L HCl 适量,充氮封管。105 ℃水解 22~24 小时,冷却,将水解产物转移至容量瓶中,加水洗涤水解管,将洗涤液合并转移至容量瓶中,加酚酞指示剂 2 滴,加 6 mol/L NaOH 到溶液呈粉红色为止;用水定容、摇匀,制得供试液。(供试液中 L-羟脯氨酸浓度应在对照品系列溶液浓度范围内)。

**C.1.5 测定**

精密量取 0.5 mL 空白(水)、羟脯氨酸对照品系列溶液及供试液,分别加入 1 mL 异丙醇、0.5 mL 氧化剂溶液,混合后在室温下放置 4 min;再分别加入 6.5 mL 显色剂,混合后,将各管放置在 60 ℃ 水浴中加热 15 min,冷却。用空白作对照,于 560 nm 测定吸光度值,以羟脯氨酸对照品溶液系列浓度对其吸光度做直线回归,求得直线回归方程,计算出供试品溶液中羟脯氨酸含量。

**C.1.6 结果与计算**

样品中羟脯氨酸含量按式 (C.1) 计算。

$$\text{Hyp}(\%) = \frac{C_{sa} \times V}{m \times 10^4} \dots\dots\dots (C.1)$$

式中：

Hyp——样品中L-羟脯氨酸含量，% (m/m)；

$C_{sa}$ ——由标准曲线得到的供试品溶液中L-羟脯氨酸的浓度， $\mu\text{g/mL}$ ；

$V$ ——稀释体积，mL；

$m$ ——干燥恒重后样品质量，g。

注：本方法为仲裁方法。

## C.2 氨基酸分析仪法

### C.2.1 原理

羟脯氨酸、脯氨酸是胶原蛋白中含有的特异性氨基酸，且含量比较稳定。将试样在105℃和 $c(\text{HCL}) = 6 \text{ mol/L}$ 盐酸作用下，水解成单一氨基酸，再用氨基酸分析仪测定样品中羟脯氨酸的含量。

### C.2.2 仪器与试剂

#### C.2.2.1 仪器

- a) 天平；
- b) 氨基酸分析仪；
- c) 旋转蒸发仪或浓缩器；
- d) 恒温箱。

#### C.2.2.2 试剂及溶液配制

除特别注明者外，所有试剂均为分析纯。

- a) L-羟脯氨酸对照品：国家对照品；
- b) 盐酸溶液， $c(\text{HCL}) = 6 \text{ mol/L}$ ：将优级纯盐酸与水等体积混合；。
- c) 洗脱用柠檬酸钠缓冲液：按仪器使用说明书配制；。
- d) 茚三酮溶液：按仪器使用说明书配制。

#### C.2.3 L-羟脯氨酸对照品溶液制备

C.2.3.1 L-羟脯氨酸对照品储备液：取L-羟脯氨酸对照品适量于100 mL容量瓶中，精密称定，加水溶解并稀释至刻度。

C.2.3.2 L-羟脯氨酸对照品溶液：精密量取L-羟脯氨酸对照品储备液，加水稀释至刻度。

#### C.2.4 供试液制备

取干燥恒重后的样品置于水解管中，精密称定，加入 $6 \text{ mol/L HCL}$ 适量，充氮封管。105℃水解22 h~24 h。冷却，置旋转蒸发仪瓶中，60℃减压蒸发至干。用水洗涤蒸发瓶，转移洗涤液至容量瓶中，加水定容至刻度，制得供试液。（供试液与对照品溶液中L-羟脯氨酸浓度相对偏差应在±10%内）。

#### C.2.5 测定

取对照品溶液、供试液用0.2  $\mu\text{m}$ 的膜过滤后，分别注入氨基酸分析仪进行测定。记录对照品溶液、供试液中羟脯氨酸的峰面积。

#### C.2.6 结果与计算

样品中羟脯氨酸含量按式 (C.2) 计算。

$$\text{Hyp}(\%) = C_{st} \times V \times \frac{A_{sa}}{A_{st} \times m \times 10} \dots\dots\dots (C.2)$$

式中：

Hyp——样品中L-羟脯氨酸含量，%；

$C_{st}$ ——对照品中L-羟脯氨酸的浓度，mg/mL；

$A_{sa}$ ——供试液中L-羟脯氨酸的峰面积；

$A_{st}$ ——对照品溶液中L-羟脯氨酸的峰面积；

$V$ ——稀释体积，mL；

$m$ ——干燥恒重后样品质量，g。

## 附录 D

(规范性)

## 胶原蛋白分子量测定——分子排阻色谱法

## D.1 原理

分子排阻色谱法是根据待测组分的分子大小进行分离的一种液相色谱技术,分离原理为凝胶色谱柱的分子筛机制。分子排阻色谱法结合多角度激光散射检测器与示差检测器联用,测定分子量可以克服样品与标准品的化学组成、分子结构及大小不同带来的误差。分子量可用重均分子量( $M_w$ )和数均分子量( $M_n$ )来表示,采用折光指数增量( $dn/dc$ )计算,得到分子量和分子量分布指数。

## D.2 仪器设备

分析天平、激光散射仪及示差检测器、HPLC泵、柱温箱。色谱柱用KW-803、KW-804或其他适宜的色谱柱。

## D.3 试剂

除特别注明者外,所有试剂均为分析纯。

冰醋酸、三水合醋酸钠,水为超纯水。

## D.4 溶液配制

## D.4.1 流动相

醋酸钠-醋酸缓冲液:称取三水合醋酸钠3.74 g,加冰醋酸20 mL,加水溶解并稀释至1000 mL,混匀,用0.22  $\mu\text{m}$ 的滤膜过滤,脱气备用。

## D.4.2 样品溶液制备

准确称取样品10 mg,用10 mL上述流动相溶解并稀释至浓度为0.5mg/mL~1 mg/mL的溶液,37  $^{\circ}\text{C}$ 放置2 h~24 h,使完全溶解,用0.45  $\mu\text{m}$ 的滤膜过滤,滤液备用。

## D.5 步骤

用流动相将基线冲至平稳后,取适量样品溶液进样,流速0.5 mL/min,柱温30  $^{\circ}\text{C}$ 条件下检测样品的分子量及分子量分布。

折光指数增量( $dn/dc$ ):采用流动相稀释胶原蛋白标准品或供试品至不同浓度梯度(1.0 mg/mL~0.1 mg/mL),用示差检测器测定。

## D.6 结果计算

检测完毕后,将 $dn/dc$ 值输入仪器配套的色谱分析软件,根据软件要求设置其他相关系数,计算重均分子量( $M_w$ )及分子量分布指数( $M_w/M_n$ )。

**附录 E**  
**(规范性)**  
**色氨酸含量的测定**

**E.1 原理**

样品中的色氨酸经氢氧化锂水解，用高效液相色谱法分离，紫外检测器检测，外标法定量。

**E.2 仪器与试剂****E.2.1 仪器**

- a) 天平；
- b) 高效液相色谱仪，配紫外检测器；
- c) 旋转蒸发仪或浓缩器；
- d) 恒温箱；
- e) 聚四氟乙烯水解管：配衬管和密封垫。

**E.2.2 试剂**

除特别注明者外，所有试剂均为分析纯。

- a) 色氨酸对照品：国家对照品；
- b) 氢氧化钾溶液， $c(\text{KOH})=0.1 \text{ mol/L}$ ：称取氢氧化钾 0.56 g，溶解于 100 mL 水中，即得；
- c) 氢氧化锂溶液， $c(\text{LiOH})=4 \text{ mol/L}$ ：称取氢氧化锂 83.9 g，溶解于 500 mL 水中，即得；
- d) 醋酸钠缓冲溶液，(0.0085 mol/L  $\text{Na}^+$ , pH=4.5)：称取无水醋酸钠 0.70 g，溶解于 1 000 mL 水中，用冰醋酸调节 pH 为 4.5；
- e) 甲醇：色谱纯；
- f) 流动相：醋酸钠缓冲溶液 (d) + 甲醇 (e) =95+5；
- g) L-色氨酸对照品储备液：准确称取 25 mg (精确到 0.000 1g) 色氨酸对照品置于 25 mL 烧杯中，用滴管滴加氢氧化钾溶液 (b) 使其溶解，将其转移至 250 mL 棕色容量瓶中，用水定容，浓度为 100  $\mu\text{g/mL}$ 。2  $^{\circ}\text{C}$ ~8  $^{\circ}\text{C}$  保存，有效期为 1 个月；
- h) L-色氨酸对照品系列液：准确移取 L-色氨酸对照品储备液 (g) 0.05 mL、0.125 mL、0.25 mL、0.375 mL、0.50 mL 分别置于 25 mL 棕色容量瓶中，用水定容至刻度，摇匀。其溶液浓度分别为 0.20  $\mu\text{g/mL}$ 、0.50  $\mu\text{g/mL}$ 、1.0  $\mu\text{g/mL}$ 、1.5  $\mu\text{g/mL}$  和 2.0  $\mu\text{g/mL}$ 。2  $^{\circ}\text{C}$ ~8  $^{\circ}\text{C}$  保存，有效期为 2 周。

**E.3 供试液制备**

取样品 50 mg~100 mg (精确至 0.000 1g) 置于聚四氟乙烯水解管中，加 1.5 mL 氢氧化锂溶液 (c)，充氮，旋紧密封后放入 110  $^{\circ}\text{C}$   $\pm$  2  $^{\circ}\text{C}$  恒温干燥箱中，水解 20 h。取出水解管，冷却至室温，用醋酸钠缓冲溶液 (d) 将水解液定量转移至 25 mL 容量瓶中，并用上述缓冲液定容，用 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜过滤后上液相色谱仪测定。

**E.4 色谱条件**

- a) 色谱柱：C18，250 mm  $\times$  4.6 mm，5  $\mu\text{m}$  或与之相当的柱子。
- b) 流动相：见 E.2.2 列项 f)
- c) 流速：1.0 mL/min
- d) 柱温：室温
- e) 进样体积：10  $\mu\text{L}$
- f) 检测器：紫外检测器
- g) 检测波长：280 nm

**E.5 测定**

按上述色谱条件平衡色谱柱后，分别取色氨酸对照品系列溶液和供试液进液相色谱仪测试，记录色谱图。

#### E.6 结果与计算

以色氨酸对照品系列溶液浓度-峰面积作图，得到线性方程，以外标法对供试液中色氨酸定量。样品中色氨酸含量，按式（E.1）计算：

$$\omega = C * V/W \dots\dots\dots (E.1)$$

式中：

$\omega$ ——样品中色氨酸含量，单位为微克每克（ $\mu\text{g/g}$ ）；

$C$ ——供试液中色氨酸含量，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g/mL}$ ）；

$V$ ——试样稀释体积，单位为毫升（ $\text{mL}$ ）；

$W$ ——试验质量，单位为克（ $\text{g}$ ）。

**附录 F**  
**(规范性)**  
**变性胶原蛋白检测——蛋白酶酶解法**

### F.1 原理

具有三螺旋结构的胶原蛋白可抵御大多数蛋白酶的消化，而变性的胶原蛋白容易被蛋白酶消化。胶原蛋白供试品经过蛋白酶处理后，将消化液中的非变性胶原蛋白进行盐析回收，通过检测供试品以及回收的非变性胶原蛋白的羟脯氨酸含量，可定量分析供试品中非变性胶原蛋白和变性胶原蛋白的含量。

本附录中包含胰蛋白酶和胃蛋白酶两种酶解处理方法。这两种酶的最适酶解条件不同，覆盖了常见的胶原蛋白供试品的pH和热变性温度范围。为了减少样品前处理步骤可能导致的蛋白变性，并降低酶解过程中温度对胶原三螺旋结构的影响，应根据样品原始pH和热变性温度选择适宜的蛋白酶进行本试验。

胰蛋白酶在中性至弱碱性环境中活力较高，最适pH约为8.0，在pH<3的环境中基本失去活力。本法中胰蛋白酶酶解温度为20℃。因此，pH为中性或弱碱性的样品，以及在溶液中热变性温度低于或等于30℃的供试品，宜采用胰蛋白酶消化。

胃蛋白酶在酸性环境下具有较高活力，在pH>5.5的环境中基本失去活力。本法中胃蛋白酶酶解温度为30℃。因此，pH为酸性的样品，以及在溶液中热变性温度高于30℃的样品，宜采用胃蛋白酶消化。

### F.2 适用范围

本法适用于胶原蛋白溶液或可溶性的胶原蛋白固体（海绵、粉末等）中变性和非变性胶原蛋白的含量分析，间接反映具有完整三螺旋结构的非变性胶原蛋白含量。

### F.3 仪器、试剂与特殊用具耗材

#### F.3.1 仪器

- a) 分析天平（精度0.1 mg）；
- b) 移液器；
- c) 恒温振荡培养箱；
- d) 高速离心机（最高离心力 $\geq 20,000 \times g$ ）；
- e) 恒温烘箱（加热温度 $> 110^\circ\text{C}$ ）；
- f) 紫外可见分光光度计。

#### F.3.2 试剂及溶液配制

除特别注明外，所有试剂均为分析纯。

##### F.3.2.1 通用试剂

- a) 纯水；
- b) 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  L-羟脯氨酸对照品储备液：按照附录C.1.3.1配制；
- c) I型胶原参比品：建议采用国家药品标准物质或者企业参比品；
- d) 5 mol/L 氯化钠溶液及 2 mol/L 氯化钠溶液；
- e) 6mol/L 盐酸溶液；
- f) 8mol/L 盐酸溶液。

##### F.3.2.2 胰蛋白酶消化法用试剂及溶液

- a) 0.05 mol/L 醋酸溶液；
- b) 1 mol/L NaOH 溶液；
- c) 1 mol/L Tris-HCl 缓冲液（pH 7.4，含 0.5M NaCl）；
- d) 胰蛋白酶消化液：用 1 mol/L Tris-HCl 缓冲液（pH 7.4，内含 0.5 mol/L NaCl）溶解胰蛋白酶，配制成含适量活力单位的胰蛋白酶消化液，建议酶活力单位不低于 937 U/mL；

注1：胰蛋白酶级别不低于生化级。

注2: 胰蛋白酶活力以BAEE (N<sub>α</sub>-苯甲酰基-L-精氨酸乙酯盐酸盐) unit表示, 每单位即胰蛋白酶在pH为7.6, 25 °C的条件下, 以BAEE作为底物, 在253nm处每分钟产生0.001的吸光值。

注3: 胰蛋白酶消化液浓度的确定宜经过试验摸索, 确保其经过8×稀释后, 在24h内变性胶原对照样品被完全降解。可通过SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法, 观察变性胶原对照溶液被消化后的电泳图谱是否仍存在胶原特征条带, 若无特征条带, 则可判断样品已经充分消化。

### F.3.2.3 胃蛋白酶消化法用试剂及溶液

- a) 0.1 mol/L 醋酸溶液;
- b) 胃蛋白酶消化液: 用0.1 mol/L 醋酸溶液溶解胃蛋白酶, 配制成适量活力单位的胃蛋白酶消化液, 建议酶活力单位不低于12 U/mL; 胃蛋白酶的效价按照《中华人民共和国药典》“胃蛋白酶”规定的方法进行测定。

注1: 胃蛋白酶的级别不低于生化级。

注2: 胃蛋白酶浓度的确定需经过试验摸索, 确保其经过6×稀释后, 在24h内变性胶原对照样品被完全降解。可通过SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法, 观察变性胶原对照溶液被消化后的电泳图谱是否仍存在胶原特征条带, 若无特征条带, 则可判断样品已经充分消化。

### F.3.2.4 特殊用具耗材

- a) 水解管;
- b) 5 mL 容量瓶;
- c) 精密 pH 试纸 (pH 范围覆盖 7.0~8.0, 精度 0.2 及以上)。

## F.4 供试液制备

### F.4.1 基本要求

F.4.1.1 供试液制备过程中应避免加热 (样品温度不应超过其热变性温度) 或冷冻, 同时应避免激烈的震荡、搅拌或超声处理, 因为加热或剪切力等因素会导致样品中的胶原蛋白变性, 从而影响测试结果的准确性。

F.4.1.2 采用胰蛋白酶消化的样品供试液, 宜调节 pH 至 7.0~8.0; 采用胃蛋白酶消化的样品供试液, 宜调节 pH 至 2.0~4.5。

F.4.1.3 样品供试液一般宜在测试的当天配制; 如有必要, 可 2 °C~8 °C 冷藏保存不超过 3 天。

### F.4.2 样品及对照品制备

F.4.2.1 胶原蛋白样品供试液: 若样品为溶液, 采用 0.05 mol/L 醋酸溶液 (胰蛋白酶消化法) 或 0.1 mol/L 醋酸溶液 (胃蛋白酶消化法) 将样品稀释至胶原蛋白浓度为 1~1.2 mg/mL, 备用; 若样品为可溶性固体, 称取样品 10.0 mg, 加入 0.05 mol/L 醋酸溶液溶解 (胰蛋白酶消化法) 或 0.1 mol/L 醋酸溶液溶解 (胃蛋白酶消化法), 至胶原蛋白浓度为 1~1.2 mg/mL, 备用。

F.4.2.2 非变性胶原对照品溶液: 称取 I 型胶原参比品 10.0 mg, 加入适量 0.05 mol/L 醋酸溶液 (胰蛋白酶消化法) 或 0.1 mol/L 醋酸溶液 (胃蛋白酶消化法) 溶解后, 采用 0.05 mol/L 醋酸 (胰蛋白酶消化法) 或 0.1 mol/L 醋酸溶液 (胃蛋白酶消化法) 定容至 10 mL, 备用。

F.4.2.3 变性胶原对照品溶液: 取 5 mL F.4.2.2 配置的非变性胶原对照品溶液至带盖试管或离心管中, 盖紧管盖, 60 °C 恒温加热 1 h, 立即冰浴 10 min, 备用。

## F.5 蛋白酶消化

### F.5.1 胰蛋白酶消化

F.5.1.1 用移液器分别精确量取样品供试液及对照品溶液各 500 μL, 置于 1.5 mL 带盖锥底离心管中, 加入胰蛋白酶消化液 75 μL, 加入 1 mol/L NaOH 溶液及纯水, 使总体积为 600 μL 且样品混合液 pH 值在 7.0~8.0 之间。盖紧管盖, 混合均匀。每组样品设置 2 个平行。

注: 加入的 NaOH 及纯水的体积宜预先试验进行确定。可用微量移液器吸取 1 μL~2 μL 消化液滴加于精密 pH 试纸以检测 pH 值。



F.5.1.2 放入恒温至 $(20.0\pm 0.5)$  °C的恒温摇床中, 80 rpm~120 rpm 振荡 24 h, 取出, 立即置冰浴中。

#### F.5.2 胃蛋白酶消化

F.5.2.1 用移液器分别精确量取样品供试液及对照品溶液各 500  $\mu$ L, 置于 1.5 mL 带盖锥底离心管中, 加入胃蛋白酶消化液 100  $\mu$ L, 盖紧管盖, 混合均匀。每组样品设置 2 个平行。

F.5.2.2 放入恒温至 $(30.0\pm 0.5)$  °C的恒温摇床中, 80 rpm~120 rpm 恒温振荡 24 h, 取出, 立即置冰浴中。

注: 该消化温度仅适用于哺乳动物胶原蛋白原料, 若供试品在酸性溶液中的热变性温度低于 30 °C, 首先考虑应用胰蛋白酶酶解试验进行变性胶原的检测; 如果需用胃蛋白酶酶解试验进行检测, 应对胃蛋白酶消化的温度和胃蛋白酶的浓度进行摸索。

### F.6 NaCl 沉淀

F.6.1 采用胰蛋白酶消化法时, 用移液器精确量取F.5.1所得的样品消化液及对照品消化液各 300  $\mu$ L, 分别转移至 1.5 mL 带盖锥底离心管中, 加入 5 mol/L 氯化钠溶液 450  $\mu$ L。采用胃蛋白酶消化法时, 用移液器精确量取F.5.2所得的样品消化液及对照品消化液各 300  $\mu$ L, 分别转移至 1.5 mL 带盖锥底离心管中, 加入 5 mol/L 氯化钠溶液 200  $\mu$ L。

F.6.2 盖上离心管盖, 上下颠倒混合均匀, 置于摇床中以 160 rpm~200 rpm 转速振荡 30 min;

F.6.3 20,000 $\times g$ 离心 20 min, 小心地用移液器移去全部上清液, 保留沉淀备用。

注: 吸取上清液的操作过程应最大程度避免吸取到沉淀。

F.6.4 往沉淀中加入 500  $\mu$ L 2 mol/L NaCl 溶液, 盖上离心管盖, 上下颠倒混合均匀。

F.6.5 20,000 $\times g$ 离心 20 min, 小心地用移液器移去全部上清液, 保留沉淀备用。

F.6.6 重复F.6.3操作。

### F.7 羟脯氨酸含量测定

#### F.7.1 L-羟脯氨酸对照品

精密量取 20  $\mu$ g/mL L-羟脯氨酸对照品储备液 0 mL、1.25 mL、2.5 mL、5 mL、10 mL, 分别置于 10 mL 容量瓶中, 用水定容, 配置 L-羟脯氨酸对照品系列溶液。参照附录 C.1 制作标准曲线。

#### F.7.2 沉淀的羟脯氨酸含量测定

向F.6所得沉淀中加入 6 mol/L 盐酸 0.5 mL, 充分溶解后全部转移至水解管中, 再用 6 mol/L 盐酸溶液冲洗离心管 2 次, 每次冲洗加 6 mol/L 盐酸溶液 0.5 mL, 润洗液全部转移至水解管中。充氮封管, 并参照附录 C.1 进行水解, 羟脯氨酸含量测定之前溶液定容体积为 5 mL, 其余操作参照附录 C.1 进行羟脯氨酸含量测定。

#### F.7.3 样品供试液及对照品溶液的羟脯氨酸含量测定

用移液器精确量取样品供试液及对照品溶液各 250  $\mu$ L, 分别置于水解管中, 加入 8 mol/L 盐酸 0.75 mL, 充氮封管, 并按照附录 C.1 进行水解, 羟脯氨酸含量测定之前溶液定容体积为 5 mL, 其余操作参照附录 C.1 进行羟脯氨酸含量测定。

### F.8 结果与计算

#### F.8.1 羟脯氨酸总质量

上述F.7.2和F.7.3的羟脯氨酸总质量按照式(F.1)计算:

$$\text{样品中羟脯氨酸的质量}(\mu\text{g}) = C \times V \dots\dots\dots (F.1)$$

式中:

C——由标准曲线得到的供试品溶液中L-羟脯氨酸的浓度,  $\mu$ g/mL;

$V$ ——稀释体积，mL，本试验中为5 mL。

#### F.8.2 变性胶原蛋白及非变性胶原蛋白含量计算

样品中变性胶原蛋白含量按式（F.2）计算，样品中非变性胶原蛋白含量按式（F.3）计算：

$$\text{样品中变性胶原蛋白含量(\%)} = \left( \frac{m_2 - m_1}{m_2} \right) \times 100\% \dots\dots\dots (\text{F. 2})$$

$$\text{样品中非变性胶原蛋白含量(\%)} = \frac{m_1}{m_2} \times 100\% \dots\dots\dots (\text{F. 3})$$

式中：

$m_1$ ——沉淀中羟脯氨酸的质量， $\mu\text{g}$ ；

$m_2$ ——250  $\mu\text{L}$ 样品供试液或对照品溶液中羟脯氨酸的质量， $\mu\text{g}$ 。

#### F.8.3 判定标准

变性胶原对照中变性胶原含量应 $>90\%$ （ $\pm 10\%$ ），非变性胶原对照中变性胶原含量应在实验室历史数据范围内，否则应重复该试验。

## 附录 G (规范性) 细胞黏附性测定——离心法

### G.1 原理

将荧光标记细胞在涂有胶原蛋白的培养皿中培养一定时间，在适宜的离心力下洗脱未黏附的细胞，测定离心前后的黏附细胞数量，评价待测样品的相对促细胞黏附性。试验原理参见YY/T 1849附录B。

本法采用的人表皮角质形成细胞是构成皮肤表皮的主要细胞种类，适宜评价终产品使用部位为皮肤的胶原蛋白的生物学效应。其他用途的胶原蛋白生物学效应评价，宜根据预期使用部位，选择与其相关的细胞种类，参考本法进行测试。

### G.2 适用范围

本法适用于检测胶原蛋白溶液或可溶性胶原蛋白固体（海绵、粉末等）促进人角质形成细胞黏附的能力。

### G.3 仪器、试剂与耗材

#### G.3.1 仪器

试验用仪器包括分析天平（精度0.1 mg）、移液器、血球计数板或细胞计数仪、水平离心机、细胞培养箱、生物安全柜或超净工作台、配置有照相机的荧光倒置显微镜等。

#### G.3.2 试剂

除特别注明外，所有试剂均为细胞培养级别。

试剂包括人角质形成细胞HaCat细胞株（编号：KCB 200442YJ，购自中国科学院昆明细胞库）、DMEM培养基（含酚红）、胎牛血清、0.25 %胰蛋白酶-EDTA溶液、无钙镁磷酸盐缓冲液（PBS）、纯水、0.1 mol/L醋酸溶液、Hoechst 33342、1 % BSA-PBS溶液、阳性对照品；推荐采用国家牛I型胶原或猪I型胶原标准品。

#### G.3.3 耗材

耗材包括96孔贴壁细胞培养板、胞培养瓶或细胞培养皿、移液管或巴斯德吸管、移液枪头、离心管、加样槽、封板膜等。

### G.4 供试液制备

#### G.4.1 基本要求

供试液制备过程中应避免加热（样品温度不应超过其热变性温度）或冷冻，同时应避免激烈的震荡、搅拌或超声处理，因为温度或剪切力等因素会导致样品中的胶原蛋白变性，从而影响测试结果的准确性。

样品供试液一般宜在测试的当天配制，样品供试液中胶原蛋白浓度为5 μg/mL~100 μg/mL。推荐胶原被动吸附的浓度为10 μg/mL。如研究胶原蛋白促进黏附的量效关系，建议从10 μg/mL向下进行倍比稀释。

#### G.4.2 胶原蛋白溶液样品

直接使用或采用纯水将样品稀释至相应浓度，备用。

注：如胶原溶液黏度较高，可在4℃下搅拌稀释，使样品充分分散，必要时可提前1天配制并4℃储存。

#### G.4.3 可溶性固体胶原蛋白样品

称取适量样品，用0.1 mol/L醋酸溶液溶解至1 mg/mL，在样品溶解后，采用纯水将供试液稀释至相应浓度，备用。

#### G.4.4 阴性/阳性对照

阴性对照：纯水。

阳性对照：使用0.1 mol/L醋酸溶液溶解或稀释阳性对照品至1 mg/mL，储存于4 °C冰箱，一个月有效。使用前，用纯水将阳性对照稀释到5 μg/mL~10 μg/mL浓度，现配现用。

## G.5 试验步骤和方法

### G.5.1 96孔细胞培养板包被

- 在96孔贴壁细胞培养板，分别加入阴性对照、阳性对照和样品供试液100 μL，室温孵育1 h。每个样品设置3个平行。
- 弃去上清，加入200 μL PBS进行洗涤；弃去上清后，加入100 μL 1% BSA的PBS溶液进行封闭，室温孵育1 h。
- 弃去上清，加入200 μL PBS洗涤两次，弃去上清，待用。
- 包被后的细胞培养板在室温下放置待用，并在当天使用。

### G.5.2 细胞接种及离心前图像采集

- 稳定传代2次以上的HaCaT细胞，在细胞汇合度约80%~95%时，使用0.25%胰蛋白酶-EDTA消化收获；  
注1：HaCat细胞培养过程中需控制传代前细胞汇合度，使其小于95%，过高汇合度会导致HaCat细胞的分化，影响测试结果的稳定性。  
注2：细胞消化过程中，注意控制PBS及消化液使用温度及消化时间，以上因素会影响介导细胞黏附的表面受体的状态和留存，从而影响测试结果。
- 采用含有一定量胎牛血清的DMEM进行重悬，计数，调整细胞密度为 $10^5$  cell/mL；  
注3：胎牛血清中纤维粘连蛋白会影响细胞的黏附，消化后细胞重悬培养基中胎牛血清的量需要进行摸索，推荐尝试0~2%的胎牛血清浓度。
- 细胞悬液加入Hoechst 33342至终浓度为1 μg/mL（下述操作步骤注意避光）；
- 每孔加入细胞悬液100 μL。将96孔板置于细胞培养箱静置孵育1 h；
- 获取覆盖全孔范围的细胞荧光图像。

### G.5.3 离心后细胞黏附检测

- 获取离心前细胞荧光图像后，每孔补充约320 μL的DMEM培养基至液面凸起，使用封板膜进行封板，注意封板后不能够产生气泡，否则应补充DMEM培养基后重新进行封板。
- 倒扣培养板进行离心5 min。  
注：离心力一般选取150 g~500 g之间。可通过阳性对照黏附百分比和阴性对照黏附百分比的比值进行确定适宜的离心力，一般比值在2左右。
- 离心后揭去封板膜，弃原培养基后用200 μL PBS清洗。  
注：采用PBS清洗时注意控制PBS加入速度和角度，以防吹起黏附细胞。
- 沿着孔壁缓慢加入100 μL含1 μg/mL Hoechst 33342的DMEM培养基，获取离心后每孔全孔范围的细胞荧光图像。

### G.5.4 数据计算

G.5.4.1 计数离心前后细胞荧光图像中荧光标记的细胞核数量。

G.5.4.2 按公式(G.1)计算黏附百分比和公式(G.2)计算相对细胞黏附性比值。

$$V = \frac{N_t}{N_c} \times 100\% \dots\dots\dots (G.1)$$

式中：

V——黏附百分比，%；

$N_t$ ——离心后细胞数量，个；

$N_c$ ——离心前细胞数量，个。

$$P = \frac{V1}{V2} \dots\dots\dots (G. 2)$$

式中：

P——相对细胞黏附性比值；

V1——样品供试液或阳性对照各复孔的黏附百分比平均值；%

V2——阴性对照各复孔的黏附百分比平均值，%。

#### G. 5. 5 结果判定

G. 5. 5. 1 阳性对照组中的黏附百分比应高于阴性对照组的黏附百分比，且具有统计学意义（ $P < 0.05$ ），否则应重复该试验。

G. 5. 5. 2 胶原蛋白样品的黏附百分比与阴性对照组相比更高且具有统计学意义（ $P < 0.05$ ），则判定胶原蛋白样品对细胞有促进黏附的作用。

## 附录 H (规范性) 胶原蛋白自组装性能测试方法

### H.1 试验原理

具有三螺旋结构的胶原蛋白，在适宜条件下可自组装形成胶原纤维，在这过程中胶原溶液的浊度会发生变化，利用紫外分光光度法可实时监测胶原溶液自组装过程中浊度的变化，从而可反映胶原的自组装性能。胶原溶液的浊度变化曲线呈现典型的S型（图H.1），包括静滞期（lag phase）、快速生长期（growth phase）和平台期（plateau phase）三个阶段，可通过对S型曲线和相关参数的检测分析来评价胶原蛋白供试品的自组装性能。

### H.2 仪器、试剂及耗材

试验使用的仪器、试剂和耗材如下：

- a) 电子天平，精度 0.0001g；
- b) 紫外分光光度计（带恒温水浴）；
- c) 多功能酶标仪；
- d) pH 计；
- e) 磁力搅拌器；
- f) 微量移液器；
- g) 0.01 M PBS 缓冲液（pH7.4）：称取磷酸二氢钾 0.27 g、磷酸氢二钠 1.14 g、氯化钾 0.20 g、氯化钠 8.00 g 加水 800 mL 溶解，用 0.1 mol/L 盐酸或氢氧化钠调节 pH 值  $7.40 \pm 0.05$ ，加水至 1000 mL；
- h) 0.1 %醋酸（v/v）：量取 0.1 mL 冰醋酸加水至 100mL，摇匀；
- i) 0.01 mol/L 盐酸：量取盐酸 0.9 mL，加水至 1000 mL，摇匀；
- j) 0.1 mol/L 氢氧化钠：称取氢氧化钠 4.00 g，加新沸过的冷水至 1000 mL，摇匀。

### H.3 试验步骤与方法

#### H.3.1 供试液及标准液配制

胶原蛋白液体：低温水浴（4~8）℃条件下，直接用0.01 M的PBS缓冲液配制成0.5 mg/mL ~1.0 mg/mL的胶原溶液。

胶原蛋白固体：精密称取20 mg供试品，低温水浴（4~8）℃条件下加0.1 %醋酸（或0.01 mol/L盐酸）5 mL搅拌溶解，吸取适量，低温水浴（4~8）℃下加入0.01 M的PBS缓冲液配制成0.5 mg/mL~1.0 mg/mL胶原溶液，并使pH值在7.0~7.4之间。

注：pH值可用少量0.1 mol/L氢氧化钠调节。

#### H.3.2 测定

采用酶标仪测定：吸取200 μL制备好的供试液加入96孔板中，设定检测波长313 nm，控温37℃条件下，在仪器上测量光学密度值（O.D.值）随时间的变化曲线，至少每30 s记录一次OD值，达到平台期稳定后即可结束测量，一般为60 min，可根据平台期时间延长。

#### H.3.3 计算

H.3.3.1 按照公式（H.1）~（H.4）分别计算 $\Delta H$ 、 $A_{1/4}$ 、 $A_{1/2}$ 、 $A_{3/4}$ 。

$$\Delta H = A_2 - A_1 \dots\dots\dots (H.1)$$

式中：

$\Delta H$ ——总浊度变化值

$A_2$ ——浊度变化达到平衡时的吸光度

$A_1$ ——初始吸光度

$$A_{1/4} = \Delta H \times 1/4 + A_1 \dots\dots\dots (H. 2)$$

$$A_{1/2} = \Delta H \times 1/2 + A_1 \dots\dots\dots (H. 3)$$

$$A_{3/4} = \Delta H \times 3/4 + A_1 \dots\dots\dots (H. 4)$$

H. 3. 3. 2 通过记录的光密度值和时间数据对, 分别查 $A_{1/4}$ 、 $A_{1/2}$ 、 $A_{3/4}$ 光密度值对应的时间  $t$  值, 得到 $t_{1/4}$ 、 $t_{1/2}$ 、 $t_{3/4}$ , 单位以分钟计。当光密度值与对应时间不是完全一致时, 取与其最为接近的光密度值所对应的时间。

注:  $t_{1/4}$ 、 $t_{1/2}$ 、 $t_{3/4}$ 分别为总浊度变化达1/4 ( $\Delta H/4$ )、1/2 ( $\Delta H/2$ )、3/4 ( $\Delta H/4$ ) 所需的时间。

H. 3. 3. 3 按照公式 (H. 5) ~ (H. 6) 分别计算胶原自组装过程中静滞期结束的时间 ( $t_{lag}$ )、胶原自组装的生长期增长斜率  $K$ 。

$$t_{lag} = \frac{t_{1/2} \times t_{1/4}}{t_{3/4}} \dots\dots\dots (H. 5)$$

$$K = \frac{\Delta H}{2(\log t_{1/2} - \log t_{lag})} \dots\dots\dots (H. 6)$$

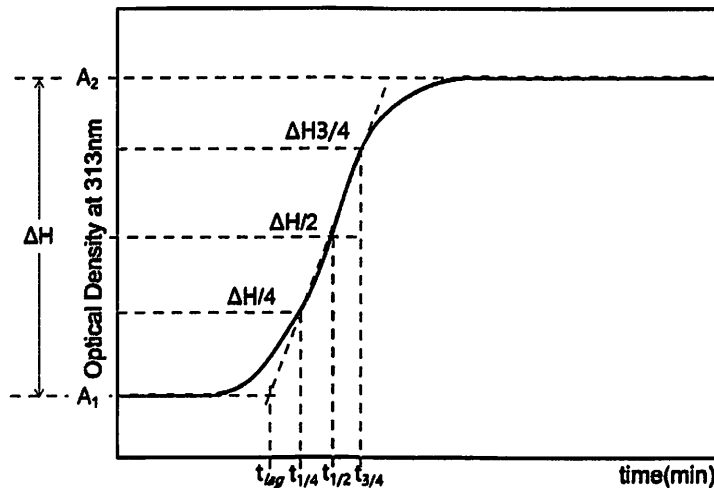


图 H. 1 胶原溶液浊度变化 S 曲线示例

H. 3. 4 结果判定

胶原蛋白供试品溶液浊度变化曲线呈现典型的S型, 胶原自组装过程中静滞期结束时间 ( $t_{lag}$ )、胶原自组装的生长期增长斜率 ( $K$ ) 应在标示范围内。

## 附录 I

(规范性)

## 弹性蛋白含量检测—液相色谱-质谱法

## 1.1 概述

弹性蛋白在酸性条件下水解，可产生其标志性水解产物锁链素和异锁链素。利用液相色谱-质谱法测定锁链素和/或异锁链素含量。以锁链素和/或异锁链素的保留时间和二级子离子碎片的质荷比进行定性和确证，用外标法进行定量。锁链素和/或异锁链素的含量可用于反映弹性蛋白的残留量。本附录中液相色谱-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。

## 1.2 试剂、仪器和设备

## 1.2.1 试剂

- a) 乙腈，色谱纯；
- b) 锁链素和/或异锁链素标准品；
- c) 盐酸（HCl），分析纯；
- d) 醋酸铵；
- e) 七氟丁酸甘（HFBA）；

## 1.2.2 仪器和设备

- a) 分析天平（附有防静电装置）：精度：0.00001 g；
- b) 离心机；
- c) 恒温烘箱；
- d) 液相色谱柱：十八烷基硅烷键合硅胶柱（粒径 1.9  $\mu\text{m}$ ，150 mm $\times$ 2.1mm）；
- e) 液相色谱质谱联用系统（HPLC-MS/MS，三重四级杆质谱）：建议使用梯度洗脱；

## 1.2.3 溶液配制

溶液配制用水应满足GB/T 6682中分析实验室用水的要求。

- a) 6 mol/L HCl：将浓盐酸（12 mol/L）与纯水按体积比 1:1 混合；
- b) 乙腈水溶液（体积比）：乙腈：水为 8:2；
- c) 液相色谱流动相；
- d) 流动相 A：取 200 mL 水置 1 L 容量瓶中，加入 1.66 mL 七氟丁酸甘、385.40 mg 醋酸铵，并加水定容至 1 L，用 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤后备用；
- e) 流动相 B：取 200 mL 乙腈水溶液（b）置 1 L 容量瓶中，加入 1.66 mL 七氟丁酸甘、385.40 mg 醋酸铵，并加乙腈水溶液（b）定容至 1 L，用 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤后备用；
- f) 锁链素和/或异锁链素标准工作溶液制备；
- g) 锁链素和/或异锁链素储备液配制：精密称定一定量的锁链素和/或异锁链素（1 mg/瓶），用 1 mL 纯水溶解，用纯水定容至 5 mL，配制成浓度为 0.2 mg/mL 的标准溶液，-20  $^{\circ}\text{C}$  保存；
- h) 锁链素和/或异锁链素标准工作溶液配制：用纯水稀释成系列浓度的锁链素和/或异锁链素标准工作溶液，制备系列标准样品，离心（3000 g，10 min），取上清液置进样瓶中，待用。

## 1.3 检测方法

## 1.3.1 待测样品制备

1.3.1.1 固体样品水解：精密称定胶原蛋白样品（10 mg）置安培瓶中，加入 2 mL 6 mol/L 盐酸溶液，封口，于 110  $^{\circ}\text{C}$  水解 18 h，将水解液于 100  $^{\circ}\text{C}$  蒸干，加入 1 mL 纯水复溶，离心（3000 g，10 min），取上清液置进样瓶中，待用。

1.3.1.2 液体样品水解：取一定体积的液体样品（胶原蛋白含量约 10 mg），加入一定体积的 12 mol/L 盐酸至盐酸终浓度为 6 mol/L，封口，于 110  $^{\circ}\text{C}$  水解 18 h，将水解液于 100  $^{\circ}\text{C}$  蒸干，加入 1 mL 纯水复溶，



离心 (3000 g, 10 min), 取上清液置进样瓶中, 待用。

### 1.3.2 色谱条件

#### 1.3.2.1 液相色谱参考条件如下:

- a) 流动相: 流动相 A: 7 mmol/L 七氟丁酸甘水溶液 (含 5 mmol/L 醋酸铵), 流动相 B: 7 mmol/L 七氟丁酸甘 60%乙腈溶液 (含 5 mmol/L 醋酸铵);
- b) 流速: 0.3 mL/min;
- c) 柱温: 30 °C;
- d) 进样量: 10  $\mu$ L;
- e) 色谱柱: 十八烷基硅烷键合硅胶柱 (粒径 3  $\mu$ m, 150 mm $\times$ 2.1mm), 推荐使用 Atlantis dC18 (粒径 3  $\mu$ m, 2.1 $\times$ 150 mm, )

#### 1.3.2.2 洗脱梯度: 梯度洗脱程序见表 I.1;

表 I.1 梯度洗脱条件

时间 min	流动相A %	流动相B %
0.00	100	0
12.00	88	12
13.00	100	0
15.00	100	0
16.00	0	100
18.00	0	100
19.00	100	0
25.00	100	0

### 1.3.3 质谱条件

#### 1.3.3.1 根据不同的质谱仪器设定相应的参数, 参考条件如下:

- a) 离子源: 电喷雾离子源;
- b) 扫描方式: 正离子扫描;
- c) 检测方式: 根据锁链素和/或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;
- d) 喷雾电压: 3.5 kV;
- e) 离子源蒸发温度: 300 °C。

#### 1.3.3.2 根据不同的质谱仪器设定相应的参数, 锁链素、异锁链素检测参考条件见表 I.2。

表 I.2 监测离子通道

检测方式	母离子 m/z	子离子 m/z
锁链素	526.3	481.3
异锁链素	526.3	397.3

### 1.3.4 检测条件要求

- a) 线性  $R^2$  值:  $\geq 0.99$ ;
- b) 加标回收率: 80 %~120 %;
- c) 精密度: 参照《中华人民共和国药典》2020 版 四部 通则 9101 分析方法验证指导原则。
- d) 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。

## 1.4 测定

### 1.4.1 标准工作曲线

以一系列锁链素和/或异锁链素标准工作溶液浓度为横坐标，以锁链素和/或异锁链素的峰面积为纵坐标绘制标准曲线，得到回归方程（I.1）和相关系数 $R^2$ 。

$$Y = aX + b \quad \text{..... (I.1)}$$

式中：

$X$  ——锁链素和/或异锁链素标准工作溶液浓度， $\mu\text{g/mL}$ ；

$Y$  ——锁链素和/或异锁链素的峰面积；

$a$  ——常数；

$b$  ——常数。

#### 1.4.2 定量检测

将标准工作溶液和待测溶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溶液和样品，样品和标准工作溶液中待测物的保留时间与对照品一致。定量测定时采用外标法定量。

#### 1.5 结果计算

用标准曲线的回归方程（I.1）计算测试样品的锁链素和/或异锁链素浓度（ $X$ ）。

根据试样的锁链素和/或异锁链素浓度（ $X$ ），计算试样中的锁链素和/或异锁链素含量（I.2）

$$M_t = \frac{X \times V}{m} \quad \text{..... (I.2)}$$

式中：

$M_t$  ——试样中锁链素和/或异锁链素含量， $\mu\text{g/mg}$ ；

$X$  ——样品中锁链素和/或异锁链素浓度， $\mu\text{g/mL}$ ；

$V$  ——样品最终定容体积， $\text{mL}$ ；

$m$  ——最终测试样液的试样质量， $\text{mg}$ 。

## 附录 J (规范性) 总糖含量测定

### J.1 原理

利用多糖在硫酸的作用下先水解成单糖，并迅速脱水生成糖醛衍生物，然后与苯酚生成橙黄色化合物，在波长490 nm处进行比色测定。

### J.2 仪器与试剂

#### J.2.1 仪器

- a) 天平；
- b) 紫外分光光度计；
- c) 水浴锅。

#### J.2.2 试剂

除特别注明者外，所有试剂均为分析纯。

- a) D-无水葡萄糖对照品；
- b) 苯酚；
- c) 硫酸；
- d) 冰醋酸。

### J.3 对照品溶液配制

**J.3.1 D-无水葡萄糖对照品储备液：**精密称取105℃干燥至恒重的D-无水葡萄糖对照品10 mg，置50 mL容量瓶中，加水溶解并稀释至刻度，摇匀，即得对照品溶液（每1 mL中含D-无水葡萄糖0.2 mg）。

**J.3.2 D-无水葡萄糖对照品系列溶液：**精密量取D-无水葡萄糖对照品储备液0.2 mL、0.4 mL、0.6 mL、0.8 mL、1.0 mL，分别置具塞试管中，各管分别加水至2.0 mL，混匀。

### J.4 供试品溶液配制

用3%的醋酸或0.01 mol/L的盐酸溶解样品，作为供试品溶液。

### J.5 测定

分别取空白液（3%的醋酸或0.01 mol/L的盐酸）、D-无水葡萄糖对照品系列溶液及供试液2 mL，精密加入5%苯酚溶液1 mL，摇匀，迅速加入浓硫酸5.0 mL，摇匀，于40℃水浴中保持40 min，取出后迅速放入冰水中冷却20 min。以空白作对照，于490 nm测定吸光度值，以D-无水葡萄糖对照品溶液系列浓度对其吸光度做直线回归，求得直线回归方程，计算出供试品溶液中相当于D-无水葡萄糖的质量(mg)。

### J.6 结果与计算

样品中总糖含量（以D-无水葡萄糖计）按式（J.1）计算。

$$m_c = \frac{m_D \times k}{m} \dots\dots\dots (J.1)$$

式中：

$m_D$ ——供试品溶液中相当于D-无水葡萄糖的重量，mg；

$k$ ——稀释倍数；

$m$ ——干燥恒重后样品质量，g。

## 参 考 文 献

- [1] ASTM F2212-2020 Standard Guide for Characterization of Type I Collagen as Starting Material for Surgical Implants and Substrates for Tissue Engineered Medical Products (TEMPs)
- [2] ASTM F3089-2014 Standard Guide for Characterization and Standardization of Polymerizable Collagen-Based Products and Associated Collagen-Cell Interaction
- [3] 《动物源医疗器械注册技术审查指导原则》(2017年版)
- [4] 马荣甜, 郭周义, 刘智明, 钟会清, 庄正飞, and 翟娟. "长波紫外辐射对 I 型胶原损伤的拉曼光谱研究." *光谱学与光谱分析* 32, no. 2 (2012): 383-385
- [5] 孙坤, 杨帆, 孔英俊, 康跻耀, 曹玮, 张贵锋. 基于生物质谱的胶原蛋白定量检测方法, *生物工程学报*, 2015, 31(11): 1660-1668
- [6] 徐丽明, 张贵锋, 等, 医用胶原蛋白类产品的表征和质量评价技术共识[J], *中国药事*, 2019, 33(11): 1223-1234
- [7] 闫婷婷, 郑学晶, 刘捷, 裴莹, 汤克勇. 胶原大分子自组装研究进展[J]. *高分子通报*, 2016(08): 18-28
- [8] Zhang G, Sun A, Li W, Liu T, Su Z. Mass spectrometric analysis of enzymatic digestion of denatured collagen for identification of collagen type. *Journal of Chromatography A*. 2006, 1114: 274-277
- [9] Deyl Z, Novotna J, Miksik I, Jelinkova D, Uhrova M, Suchánek M. Quantitation of collagen types I, III and V in tissue slices by capillary electrophoresis after cyanogen bromide solubilization. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 1997, 689(1): 181-194
- [10] Pataridis S, Eckhardt A, Mikulikova K, Sedlakova P and Miksik I. Determination and Quantification of Collagen Types in Tissues Using HPLC-MS/MS. *Current Analytical Chemistry*, 2009, 5, 316-323
- [11] Novotna J, Deyl Z, Miksik I. Capillary zone electrophoresis of collagen type I CNBr peptides in acid buffers. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 1996, 681(1), 77-82
- [12] Drzewiecki K E, Grisham D R, S. Parmar A S, et al. Circular Dichroism Spectroscopy of Collagen Fibrillogenesis. *Biophysical Journal*, 2016, 111(11): 2377-2386
- [13] Schroeffer M, Meyer M. DSC investigation of bovine hide collagen at varying degrees of crosslinking and humidities *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017, 103: 120-128
- [14] Pataridis S, Eckhardt A, Mikulikova K, Sedlkova P, Miksik I. Identification of collagen types in tissues using HPLC-MS/MS. *J. Sep. Sci.* 2008, 31, 3483 – 3488
- [15] Kaga N, Soma S, Fujimura T, et al. Quantification of elastin cross-linking amino acids, desmosine and isodesmosine, in hydrolysates of rat lung by ion-pair liquid chromatography– spectrometry. *Analytical Biochemistry*, 2003, 318: 25–29
- [16] Dusemund B, Barrach H J. Double-antibody enzyme-linked immunosorbent microassay for quantification of collagen types I and II. *Journal of Immunological Methods*, 1982, 50(3): 255-268
- [17] Brightman A O, Rajwa B P, Sturgis J, et al. Time-lapse confocal reflection microscopy of collagen fibrillogenesis and extracellular matrix assembly in vitro. *Biopolymers*, 2000, 54(3): 222-234
- [18] Sun L, Hou H, Li B, et al. Characterization of acid- and pepsin soluble collagen extracted from the skin of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017, 99: 8-14
- [19] Kar K, Amin P, Bryan M A, et al. Self-association of Collagen Triple Helix Peptides into Higher Order Structures. *Journal of Biological Chemistry*. 2006, 281(44): 33283-33290
- [20] Rubin, A., Drake, M. P., Davison, P. F., Pfahl, D., Speakman, P. T., and Schmitt, F. O., "Effects of Pepsin Treatment on the Interaction Properties of Tropocollagen Macromolecules," *Biochemistry*, Vol 4, 1965, pp. 181–190
- [21] Helseth, D. L. and Veis, A. J., "Collagen Self-assembly In Vitro. Differentiating Specific Telopeptide-dependent Interactions using Selective Enzyme Modifications and the Addition of Free Amino Telopeptide," *Biol Chem*, Vol 256, 1981, pp. 7118–7128
- [22] Capaldi, M. J. and Chapman, J. A., "The C-terminal Extrahelical Peptide of Type I Collagen and its Role in Fibrillogenesis In Vitro," *Biopolymers*, Vol 21, 1982, pp. 2291–2313
- [23] Gelman, R. A., Poppe, D. C., and Piez, K. A., "Collagen Fibril Formation In Vitro. The Role of the Nonhelical Terminal Regions," *J Biol Chem*, Vol 254, 1979, pp. 11741–11745.
- [24] Catherine D. Reyes, Andre's J. Garcı́a. Influence of Type I Collagen Surface Density on Fibroblast Spreading, Motility, and Contractility. *CENTRIFUGATION CELL ADHESION ASSAY*. 2003; 328-333

- [25] Hellman, K. B. and Asher, D. M., "Meeting Report: International Workshop on Clearance of TSE Agents from Blood Products and Implanted Tissues," *Biologicals*, Vol 28, 2000, pp. 189–192
- [26] Cooley, W. A., et al., "Evaluation of a rapid western immunoblotting procedure for the diagnosis of bovine spongiform encephalopathy(BSE) in the UK," *J Comp Pathol*, 2001, 125, 1: 64–70
- [27] Handley, J. and Zubritsky, E., "Blood-based Prion Test," *Anal Chem*, 73, 9: 252A, 2001
- [28] Abraham, L. C., Zuena, E., Perez-Ramirez, B., and Kaplan, D. L., "Guide to Collagen Characterization for Biomaterial Studies," *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater*, Vol 87B, 2008, pp.264–285
- [29] Christianne Gaudet, William A. Marganski, Sooyoung Kim, Christopher T. Brown, Vaibhavi Gunderia, Micah Dembo, and Joyce Y. Wong. A centrifugation cell adhesion assay for high-throughput screening of biomaterial surfaces\_wrapper. *Biophysical Journal*. 2003;(85):3329–3335
- [30] Z. Keresztes, P. G. Rouxhet, C. Remacle, C. Dupont-Gillain. Supramolecular assemblies of adsorbed collagen affect the adhesion of endothelial cells\_wrapper. *ENDOTHELIAL CELLS ON NANOSTRUCTURED COLLAGEN LAYERS*. 2005;30472
- [31] Rodriguez LG, Wu X, Guan JL. Wound-healing assay. *Methods Mol Biol*. 2005;294:23-9.
- [32] Vang Mouritzen M, Jensen H. Optimized Scratch Assay for In Vitro Testing of Cell Migration with an Automated Optical Camera. *J Vis Exp*. 2018;(138):57691
- [33] Suarez-Arnedo A, Torres Figueroa F, Clavijo C, Arbeláez P, Cruz JC, Muñoz-Camargo C. An image J plugin for the high throughput image analysis of in vitro scratch wound healing assays. *PLoS One*. 2020;15(7):e0232565
- [34] Rygula, A., Katarzyna Majzner, Katarzyna M. Marzec, Agnieszka Kaczor, Marta Pilarczyk, and M. Baranska. "Raman spectroscopy of proteins: a review." *Journal of Raman Spectroscopy* 44, no. 8 (2013): 1061-1076
- [35] Bonifacio, Alois, Claudia Beleites, Franco Vittur, Eleonora Marsich, Sabrina Semeraro, Sergio Paoletti, and Valter Sergio. "Chemical imaging of articular cartilage sections with Raman mapping, employing uni-and multi-variate methods for data analysis." *Analyst* 135, no. 12 (2010): 3193-3204
-