

T/GDMDMA

广东省医疗器械管理学会团体标准

T/GDMDMA XXXX—XXXX

复杂体系中胶原蛋白含量检测方法

Determination Method for Collagen Content in Complex Systems

Social Organization Standard

T/GDMDMA

(征求意见稿)

医疗器械团体标准

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

广东省医疗器械管理学会 发布

目 次

前言 II

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 术语和定义 1

4 试验设备、耗材与试剂 1

5 样品前处理 2

6 氨基酸含量检测 2

7 结果计算 2

8 试验报告 3

附录 A（资料性） 高效液相色谱法检测条件参考 4

附录 B（资料性） 样品前处理原理 5

附录 C（资料性） 氨基酸检测原理 6

附录 D（资料性） 胶原蛋白含量计算原理 7

参考文献 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专利的责任。

本文件由广州创尔生物技术股份有限公司提出。

本文件由广东省医疗器械管理学会归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：



复杂体系中胶原蛋白含量检测方法

1 范围

本文件规定了膏、霜、乳、水剂、精华、敷贴类等复杂体系中胶原蛋白含量检测的试验试剂、耗材与设备、样品前处理、氨基酸含量检测、结果计算与试验报告的要求。

本文件适用于膏、霜、乳、水剂、精华、敷贴等复杂体系中胶原蛋白含量的检测。

本文件不适用于样品中额外添加游离氨基酸、寡肽、多肽、油溶性胶原蛋白的体系。

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。

YY/T 1955—2025 组织工程医疗器械产品 胶原蛋白 术语

YY/T 1985—2025 组织工程医疗器械 胶原蛋白

T/GDMDMA 0052 组织提取胶原蛋白细胞划痕试验操作指南

3 术语和定义

YY/T 1955-2025、T/GDMDMA 0052界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

3.1

复杂体系 complex matrix system

由胶原蛋白、油脂、乳化剂、香精、增稠剂、无纺布、保湿剂等两种及以上组分构成的膏、霜、乳、水剂、精华、敷贴等医疗器械/化妆品基质体系，基质组分对胶原蛋白定量检测存在干扰。

4 试验设备、耗材与试剂

4.1 试验设备

高效液相色谱仪或氨基酸分析仪、通风橱、高速离心机、全温振荡培养箱、涡旋振荡仪、烘箱、氮吹仪或旋转蒸发仪、万分之一分析天平、可调量程单道移液器。

4.2 试验耗材

15 mL聚丙烯离心管、50 mL聚丙烯离心管、5 mL容量瓶、10 mL容量瓶、密封水解反应瓶、0.22 μm水系滤膜、移液枪配套无菌枪头、一次性进样瓶。

4.3 试验试剂

乙酸（冰醋酸）（分析纯，纯度≥99.5%）、正己烷（制备色谱级，纯度≥99.5%）、邻苯二甲醛(OPA)(分析纯)、FMOC(分析纯)、3-巯基丙酸(分析纯)、浓盐酸(分析纯)、硼酸(分析纯)、氢氧化钠(分析纯)、二水合磷酸二氢钠(分析纯)、十二水合磷酸氢二钠(分析纯)、胶原蛋白三螺旋区17种氨基酸的标准品（分别是甘氨酸、脯氨酸、羟脯氨酸、丙氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、丝氨酸、精氨酸、赖氨酸、苏氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、蛋氨酸、组氨酸）、甲醇(色谱纯)、乙腈(色谱纯)。

注：在纤维状胶原（如I、II、III型）中，三螺旋核心区通常不含半胱氨酸，色氨酸仅存在于非三螺旋区，大部分重组胶原不含羟脯氨酸，个别重组胶原的序列含有半胱氨酸或者其他氨基酸标签，因此需根据样品中添加的胶原蛋白的类型及其氨基酸组成特点，选择适当的氨基酸标准品。

5 样品前处理

5.1 分类处理原则

乳剂、霜剂、含油脂的精华或敷贴产品：按照5.2步骤开展前处理；

水剂、不含油脂的精华或敷贴产品：按照5.3步骤开展前处理。

5.2 含油脂样品的前处理

含油脂样品的前处理操作步骤如下：

- 精密称定样品 1.000 g，置于 50 mL 离心管。
 - 转移至通风橱内操作，往上述离心管加入 5.0 mL 0.1 mol/L 乙酸溶液，涡旋振荡 5 min（每振荡 30 s 暂停 30 s，重复 5~6 次）至样品充分分散于乙酸溶液中，放入全温振荡培养箱振荡（设置参数：25 °C，250 rpm）提取 3 h。
 - 通风橱内操作，往上述离心管加入 5.0 mL 正己烷，涡旋 2 min，转移至 15 mL 离心管。
 - 室温 8000 r/min 离心 10 min，弃上层正己烷相至距离中间层分界线 1cm 左右，枪头小心深入下层吸取下层水相样品转移到新的 15 mL 离心管中。
 - 重复 5.2.3~5.2.4 至少 3 次，合并全部下层水相样品。
- 注：每次离心后的中间层建议另行收集合并，最后室温8000 r/min离心10 min后收集下层样品，与转移保留的下层样品合并。
- 通风橱开盖挥发 30 min 以上，除去残留正己烷。
 - 用 0.1 mol/L 乙酸溶液定容至 5.0 mL 或适合的体积，混匀。

5.3 不含油脂样品的前处理

精密称定1.000 g样品，加入0.1 mol/L乙酸溶液，充分振荡分散，定容至5.0 mL。

6 氨基酸含量检测

6.1 酸水解

酸水解操作步骤如下：

- 精密量取 1.0 mL 前处理后样品溶液至密封水解反应瓶，加入 3.0 mL 6 mol/L 盐酸。
- 通入高纯氮气 1 min 排尽瓶内氧气，迅速密封水解反应瓶。
- 于 105 °C~110 °C 恒温水解 22 h~24 h。
- 取出冷却至室温，加超纯水定容至 10.0 mL，混匀。
- 精密量取 1.0 mL 稀释的水解液，在 95 °C 下氮吹至完全干燥；或精密量取 10.0 mL 稀释的水解液旋转蒸干或减压蒸干。
- 经氮吹干燥的样品，精密加入 1.0 mL 0.01 mol/L 盐酸复溶；旋转蒸干或减压蒸干的样品，精密加入 10.0 mL 0.01 mol/L 盐酸复溶，混匀。
- 复溶后的溶液经 0.22 μm 水系滤膜过滤，滤液即为待测液。

6.2 氨基酸检测

氨基酸分析仪法检测按照YY/T 1985-2025附录C.2的规定进行；

高效液相色谱法的检测条件可参考附录A。

7 结果计算

胶原蛋白含量计算公式：

$$C_{Col}(mg/L) = C_{Gly} \times K \quad (1)$$

式中： C_{Col} ——胶原蛋白含量，单位为mg/L；

C_{Gly} ——甘氨酸的含量；

K ——由胶原蛋白氨基酸序列确定的甘氨酸胶原蛋白换算系数。

注：不同氨基酸序列的胶原蛋白应采用对应计算得到 K 值。如哺乳动物I型胶原蛋白的三螺旋序列的 K 值为3.637。

K 的理论计算公式：

$$K = \frac{3 \times \bar{M}_{\text{残基}}}{M_{\text{Gly}}} \dots\dots\dots (2)$$

式中： $\bar{M}_{\text{残基}}$ ——胶原蛋白氨基酸平均肽残基摩尔质量（脱去水分子）；

M_{Gly} ——游离甘氨酸摩尔质量，取75.07 g/mol。

8 试验报告

试验报告应有下列信息：

- h) 产品名称、型号或规格、生产批号等产品信息；
- i) 标明耗材、试剂、仪器和设备；
- j) 供试液制备情况；
- k) 试验步骤；
- l) 结果计算；
- m) 结果分析；
- n) 结论。



附录 A (资料性) 高效液相色谱法检测条件参考

A.1 通用

以下柱条件以液相色谱仪（配VWD检测器）为例，其他的高效液相色谱仪需调整参数。

A.2 在线柱前衍生

采用自动在线衍生化方法，一级氨基酸与邻苯二甲醛（OPA）、二级氨基酸与茚甲氧羰酰氯（FMOC）衍生后过柱检测。

A.3 色谱条件

ZORBAX Eclipse AAA(4.6 x 75 mm, 3.5 μ m);

检测信号：紫外338 nm(0~19 min), 266 nm(19.01~25 min);

流动相A: 40 mM 磷酸二氢钠 (pH 7.8); 流动相B: 乙腈/甲醇/水=45/45/10;

流速: 1.0 mL/min。

A.4 梯度洗脱过程

梯度洗脱过程参数如下表所示:

表 A.1 梯度洗脱过程参数

时间	A/% (40 mM磷酸缓冲液)	B/%甲醇: 乙腈: 水 (45:45:10)
0	100	0
1	100	0
23	43	57
27	0	100
34	0	100
40	100	0
41	100	0

A.5 自动衍生进样过程

自动进样过程如下:

- a) 从样品中抽取 1 μ L 样品液（进样针插入洗液瓶（水）中 1 次，清洗进样针外壁）；
- b) 抽取 2 μ L 硼酸缓冲液，在空气中反复抽吸 3 次，混匀（进样针插入洗液瓶（水）中 1 次，清洗进样针外壁）；
- c) 抽取 1 μ L OPA 衍生试剂，在空气中反复抽吸 3 次混匀，静置反应 0.5 min（进样针插入洗液瓶（水）中 1 次，清洗进样针外壁）；
- d) 抽取 1 μ L FMOC 衍生试剂，在空气中反复抽吸 3 次混匀，静置反应 0.5 min（进样针插入洗液瓶（乙腈）中 1 次，清洗进样针外壁）；
- e) 抽取 13 μ L 超纯水，在空气中反复抽吸 3 次混匀，进样。

附 录 B
(资料性)
样品前处理原理

该前处理方法的原理是基于液液萃取与破乳净化相结合的分离机制，核心目标在于将化妆品复杂基质中的水溶性目标分析物与大量油脂、乳化剂及增稠体系进行有效剥离，以获得适于反相高效液相色谱分析的水相溶液。

提取阶段利用0.1 mol/L乙酸提供的弱酸性环境，调节目标物（如极性防腐剂、水溶性维生素或有机酸类成分）的解离平衡，使其以稳定的分子状态存在于水相中。同时，乙酸提供的离子强度可压缩配方中表面活性剂胶束的双电层结构，破坏原有的油水乳化平衡，促使水溶性成分从油脂包裹体或凝胶网络中充分释放。根据相似相溶原则，极性目标物在酸性水相中具有较高的分配系数。

净化阶段引入正己烷作为非极性萃取剂，基于液液分配原理，样品中的矿物油、硅油、合成酯类及香精成分等疏水性基质组分因与正己烷极性相近而被选择性溶解并富集于上层有机相。通过施加离心力克服两相间的界面张力与乳化层黏度，利用正己烷与酸性水相之间显著的密度差异实现加速分层，使脂溶性杂质随上层有机相被移除。



附 录 C
(资料性)
氨基酸检测原理

依据 YY/T 0954、YY/T 1453、YY/T 1985 等胶原蛋白相关医疗器械行业标准，胶原蛋白样品普遍采用6 mol/L 盐酸、105℃~110℃条件下酸水解22 h~24 h，水解后通过氨基酸分析法测定羟脯氨酸含量。该水解条件能够充分断裂胶原蛋白分子内全部肽键，实现胶原多肽链完全解离为游离氨基酸，满足羟脯氨酸准确定量的前处理要求。同时，GB 5009.124中同样采用盐酸酸水解前处理方式用于蛋白质氨基酸组成分析，说明该水解体系除特异性检测羟脯氨酸外，理论上可用于胶原样品中多种氨基酸的同步定量。

哺乳动物I型胶原蛋白的三螺旋区由保守Gly-X-Y 重复序列构成，共包含18种标准氨基酸，分别为甘氨酸、脯氨酸、羟脯氨酸、丙氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、丝氨酸、精氨酸、赖氨酸、苏氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、蛋氨酸、组氨酸、半胱氨酸。本文所述酸水解条件下部分氨基酸会发生降解或化学转化：色氨酸完全破坏；半胱氨酸、蛋氨酸易发生氧化损失；丝氨酸、苏氨酸存在不同程度降解；天冬酰胺、谷氨酰胺发生脱酰胺作用，分别转化为天冬氨酸与谷氨酸。然而，上述易受水解条件影响的氨基酸，绝大部分富集于胶原N端、C端端肽区域。哺乳动物I型胶原蛋白的三螺旋区不含色氨酸，含少量或不含半胱氨酸（取决于端肽切割的位点）；蛋氨酸含量极低，通常不足总氨基酸摩尔占比0.1%；丝氨酸、苏氨酸少量分布于三螺旋区，合计摩尔占比约3%~4%；而天冬酰胺、谷氨酰胺水解后转化为对应的酸性氨基酸，可被合并计入天冬氨酸、谷氨酸总量。另外，对于仅复制天然胶原三螺旋功能区的重组胶原蛋白，分子序列中几乎不含色氨酸、半胱氨酸，蛋氨酸、丝氨酸、苏氨酸总量占比很低，这些氨基酸即便在水解过程中产生不同程度降解，其损失对氨基酸总量影响极小。因此使用本文所述酸水解条件基本满足试验需求。

现行胶原蛋白行业标准中氨基酸检测基准方法多采用专用氨基酸分析仪，而高效液相色谱法（HPLC）与氨基酸分析仪的核心检测原理具备同源性：二者均基于色谱分离结合衍生化检测实现氨基酸定量。氨基酸分析仪采用阳离子交换色谱柱分离氨基酸，分离后进行柱后茚三酮衍生，依靠可见光检测器采集信号；HPLC 氨基酸分析多采用柱前衍生策略，氨基酸衍生为具有紫外/荧光响应的衍生物后，经反相色谱完成组分分离，再通过紫外或荧光检测器定量。两种方法均依靠不同氨基酸在色谱固定相与流动相间分配行为差异实现氨基酸组分分离，且衍生响应信号强度与氨基酸浓度在一定范围内呈良好线性关系，因此在匹配相同水解前处理条件下，HPLC 法同样可用于胶原水解液中各类氨基酸的定性与定量检测。

附录 D

(资料性)

胶原蛋白含量计算原理

天然I型胶原蛋白三螺旋区具有高度保守的Gly-X-Y重复肽链结构，肽链氨基酸残基中甘氨酸(Gly)的摩尔占比恒定趋近1/3，即每3个氨基酸残基中含有1个甘氨酸残基。样品经6 mol/L浓盐酸 105 °C~110 °C恒温水解22 h~24 h后，胶原蛋白肽链完全断裂，肽键结合态的甘氨酸残基全部转化为游离甘氨酸，水解后游离甘氨酸的物质的量与胶原蛋白肽链中甘氨酸残基的物质的量完全相等。游离甘氨酸摩尔质量为75.07 g/mol；哺乳动物I型胶原蛋白三螺旋区的氨基酸平均残基摩尔质量为 91.0 g/mol。通过氨基酸分析仪或高效液相色谱测得样品中游离甘氨酸质量浓度后，可计算溶液中游离甘氨酸的摩尔浓度。而天然I型胶原蛋白三螺旋区全部氨基酸残基的总摩尔浓度为甘氨酸摩尔浓度的3倍。结合天然I型胶原蛋白三螺旋区氨基酸平均残基摩尔质量，可将总氨基酸残基摩尔浓度换算为胶原蛋白质量浓度。

重组胶原蛋白大多是复制了天然胶原蛋白的三螺旋功能区的全长序列或部分序列，一般符合Gly-X-Y重复肽链结构，但其氨基酸平均残基的摩尔质量建议根据具体的氨基酸序列另行计算。



参 考 文 献

- [1] GB 5009.124 食品安全国家标准 食品中氨基酸的测定
 - [2] YY/T 0954 无源外科植入物 I型胶原蛋白植入剂
 - [3] YY/T 1453 组织工程医疗器械产品 I型胶原蛋白表征方法
-

