

# 检验方法验证对比报告

项目名称：非变性 II 型胶原蛋白中羟脯氨酸含量测定

委托单位：安徽盛美诺生物技术有限公司

验证单位：中国科学院过程工程研究所 (盖章)

日期：2024. 8. 28



# 检验方法验证报告

## 1. 高效液相色谱法检测羟脯氨酸含量

### 1.1 方法依据

参照 YY/T 1453-2016 《组织工程医疗器械产品 I 型胶原蛋白表征方法》附录 B 方法二。

### 1.2 实验条件

#### 1.2.1 仪器设备

高效液相色谱仪、天平、电热恒温干燥箱、恒温水浴锅、真空泵、微孔滤膜、旋涡混合器。

#### 1.2.2 实验条件

在波长 360 nm 处比色，利用 DNFB 溶液与羟脯氨酸衍生测定其峰面积。色谱柱：Zorbax C<sub>18</sub>(4.6×250mm, 5μm)或相当；流动相：A 0.05 mol/L 乙酸钠水溶液（现用现配，0.22 μm 滤膜过滤），B 50%乙腈水溶液(v/v)；梯度：0-15min, 30-55% B, 15-25 min, 55%-100% B, 25-35 min, 100%-30% B, 35-45 min, 30% B 保持 10 min；流速：0.5 ml/min；检测波长：360 nm；柱温：32℃；上样量 10μl。

#### 1.2.3 其他需要说明的内容：(环境、前处理、试剂、水等)

用称量纸称取样品 0.2g，转移至 50mL 离心管中，加入 25ml 4M 盐酸胍，置于 4℃ 中放置 16h 进行胍洗。胍洗结束后在 4℃、11000r/min 的条件下离心 20min。离心完成后去除上清液后，加入 Tris-EDTA 缓冲液 25mL 左右，混匀，4℃ 放置 1h。在 4℃、11000r/min 的条件下离心 20min，去除上清液，再加入 25mL 2.3.2 溶液重复洗涤 1 次。

向上述离心管中加入 20ml 的α-糜蛋白酶溶液，于 37℃搅拌反应 48h，酶解结束后迅速放入离心机中，在 4℃、11000r/min 的条件下离心 20min，离心后弃去上清液，再水洗离心一次。将沉淀全部转移到水解管中，用 5~7ml 的 6mol 盐酸于 110℃水解 22h。110℃水解完成后冷却至室温；将酶解液用滤纸过滤并转移至 50mL 容量瓶中，用去离子水多次清洗水解管和滤纸确保酶解液完全转移至容量瓶中，用去离子水定容至刻度线。取 5mL 定容后的水解液，氮吹或减压蒸干挥发干多余的盐酸，冷却后将样品转移至 10 mL 容量瓶中，加入一定体积纯水定容至 10 mL 或 25mL。

水解产物的衍生:取出 200  $\mu\text{l}$  定容后的样品,分别加入 100  $\mu\text{L}$  0.5 M  $\text{NaHCO}_3$  缓冲液和 100  $\mu\text{L}$  的 DNFB 溶液,在 60 $^\circ\text{C}$ 下恒温避光反应 1 h;取出后加入 600  $\mu\text{l}$  0.1 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (pH 7.0)终止反应。0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤(或 10000 r/min 离心 10 min)后进行 HPLC 分析。

### 1.3 实验样品、标准品的说明

对照品: L-羟脯氨酸, 购自源叶公司。

非变性 II 型胶原样品: 安徽盛美诺生物技术有限公司 (20240409F)

### 1.4 验证试验

#### 1.4.1 方法线性范围

羟脯氨酸标准曲线的绘制

线性范围: 标准品 L-羟脯氨酸浓度为 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ~ 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  之间, 包括: 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  五个点。经上述方法衍生上机得到相应的峰面积。

标准曲线见图 1.

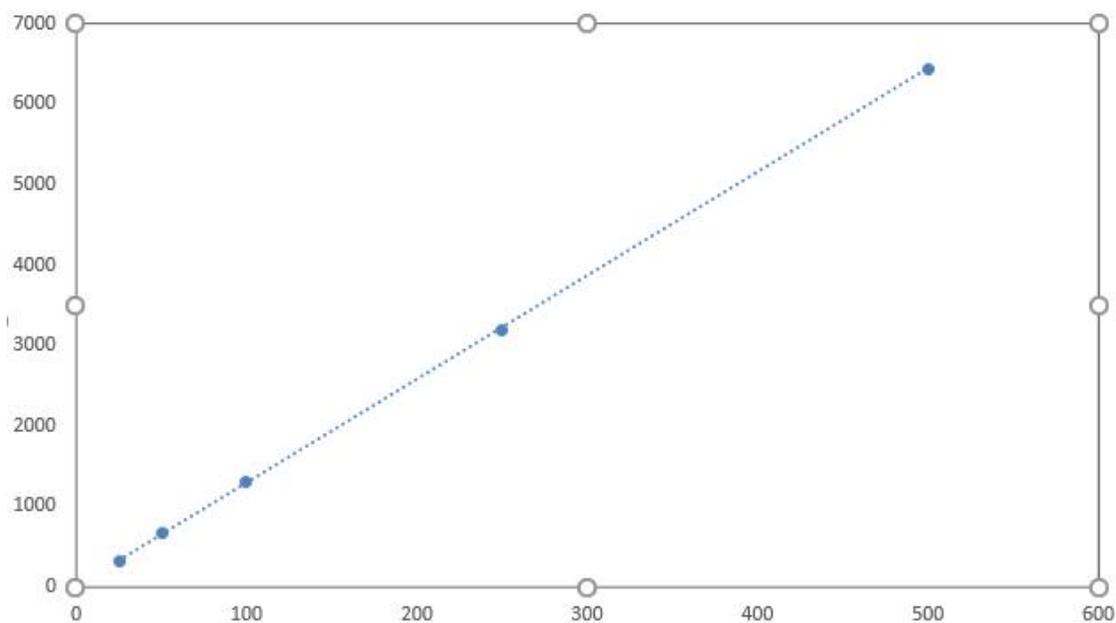


图 1 羟脯氨酸测定标准曲线

表 1 峰面积、曲线结果

羟脯氨酸浓度 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	峰面积 $\text{mAU}\cdot\text{S}$
25	330.12
50	667.4
100	1316.5
250	3198.1

500	6444.7
线性方程	$y = 12.836x + 16.744$
R	0.9999

#### 1.4.2 检出限

检出限：2.97  $\mu\text{g/ml}$  (试剂空白、3 倍信噪比)。

定量限：9.90  $\mu\text{g/ml}$  (样品空白、10 倍信噪比)。

#### 1.4.3 重复性

本方法重复性测试依照 GB/T27417-2017 合格评定 化学分析方法确认和验证指南，测定仪器重复性。重复性测试：取 25mg/L 标品，做 6 个平行，计算标准偏差，样品数据结果见附件 1，结果分析见下表：

表 2 方法重复性测试数据表

	平行号	峰面积 (mAU*S)	浓度 (mg/l)
样品	1	326.2	24.1
	2	334.1	24.7
	3	323.5	23.9
	4	331.4	24.5
	5	330.2	24.4
	6	318.6	23.5
平均值		327.3	24.2
标准偏差		5.71	0.44
相对标准偏差 RSD (%)		1.74%	1.84%

重复性结果分析：依据上表可以得出，实验做出的相对标准偏差为 1.84%，满足方法要求。

#### 1.4.4 精密度

本方法重复性测试依照 GB/T27417-2017 合格评定 化学分析方法确认和验证指南，测定精密度。取盛美诺 20240409F 样品，按方法独立测定 6 次，计算标准偏差，样品数据结果见附件 1，结果分析见下表：

表 3 方法精密度测试数据表

	平行号	峰面积 (mAU*S)	浓度 C ( $\mu\text{g/mL}$ )
样品	1	824.6	62.9
	2	814.7	62.2
	3	833.2	63.6
	4	826.5	63.1
	5	846.9	64.7

	6	831.6	63.5
平均值		829.6	63.3
标准偏差		10.70	0.83
相对标准偏差 RSD (%)		1.29%	1.32%

精密度结果分析：依据上表可以得出，盛美诺 20240409F 样品测得定容后的沉淀中含量为 63.3ug/ml，实验做出的相对标准偏差为 1.32%，符合方法要求。

#### 1.4.5 准确度

准确度的测定采用加标回收的方法完成，取盛美诺 20240409F 样品分别加标 L-羟脯氨酸标准物质 2.5mg、10.0mg，样品按照方法分别做 6 个平行，计算结果、测定回收率。结果分析见下表：

表 4 方法准确度测试数据表

标液	测定回收率结果 (%)	
	加标 2.5mg	加标 10.0mg
1	108.0%	100.6%
2	105.6%	102.2%
3	96.0%	101.8%
4	102.4%	99.8%
5	104.0%	103.2%
6	104.8%	103.6%
平均值 (mg/L)	103.5%	101.9%
标准偏差 (mg/L)	4.1%	1.5%
相对标准偏差 RSD	4.0%	1.4%

准确度结果分析：依据上表可以得出，实验做出的样品加标实验数据回收率分别为 103.5%、101.9%，符合质控 GB/T27417-2017 方法要求。

## 2. 氨基酸分析仪方法检测羟脯氨酸含量

### 2.1 参考方法

NY/T 3130-2017 的第三法测定酶解沉淀中羟脯氨酸的总含量。

110 °C 水解完成后冷却至室温；将酶解液用滤纸过滤并转移至 100mL 容量瓶中，用去离子水多次清洗水解管和滤纸确保酶解液完全转移至容量瓶中，用去离子水定容至刻度线。取 1mL 定容后的水解液，氮吹或减压蒸干挥发干多余的

盐酸，冷却后用 0.02mol/L 盐酸溶液复溶。

## 2.2 实验方法

### 2.2.1 仪器设备

氨基酸分析仪、天平、电热恒温干燥箱、恒温水浴锅、真空泵、微孔滤膜、旋涡混合器、。

### 2.2.2 实验条件

在波长440 nm 处比色，利用茚三酮溶液与羟脯氨酸衍生测定其在440nm的峰面积。

### 2.2.3 其他需要说明的内容：(环境、前处理、试剂、水等)

用称量纸称取样品 0.2g ，转移至 50mL 离心管中，加入 25ml 4M 盐酸胍，置于 4°C 中放置 16h 进行胍洗。胍洗结束后在 4°C、11000r/min 的条件下离心 20min。离心完成后去除上清液后，加入 Tris-EDTA 缓冲液 25mL 左右，混匀，4°C 放置 1h。在 4°C、11000r/min 的条件下离心 20min，去除上清液，再加入 25mLA.2.3.2 溶液重复洗涤 1 次。

向上述离心管中加入 20ml 的 $\alpha$ -糜蛋白酶溶液，于 37°C 搅拌反应 48h，酶解结束后迅速放入离心机中，在 4°C、11000r/min 的条件下离心 20min，离心后弃去上清液，再水洗离心一次。将沉淀全部转移到水解管中，用 5~7ml 的 6mol 盐酸于 110 °C 水解 22h。

## 2.3 实验样品、标准品的说明

标准品：L-羟脯氨酸，购自源叶公司。

非变性 II 型胶原样品(按委托方的要求)：安徽盛美诺生物技术有限公司 (20240317F)

## 2.4 验证试验

### 2.4.1 方法线性范围

羟脯氨酸标准曲线的绘制

准确吸取L-羟脯氨酸标准工作溶液10.0mL于100mL容量瓶中，用样品稀释液或0.02mol/L盐酸定容。准确吸取羟脯氨酸标准工作液2.5、5.0、10.0、15.0与20.0mL，分别用蒸馏水定容至100mL，此标准溶液的羟脯氨酸浓度分别为10、20、40 、60和80 $\mu$ g/mL；上机测定其在440nm的峰面积，建立线性回归方程。

线性范围：标准品 L-羟脯氨酸浓度为 10  $\mu$ g/ml ~ 80  $\mu$ g/ml 之间，包括：

10 $\mu$ g/ml、20  $\mu$ g/ml、40 $\mu$ g/ml、60  $\mu$ g/ml、80  $\mu$ g/ml 五个点。

标准曲线见图 2。

线性方程： $y = 99.461x + 12.211$ ，（ $R = 0.9999$ ）

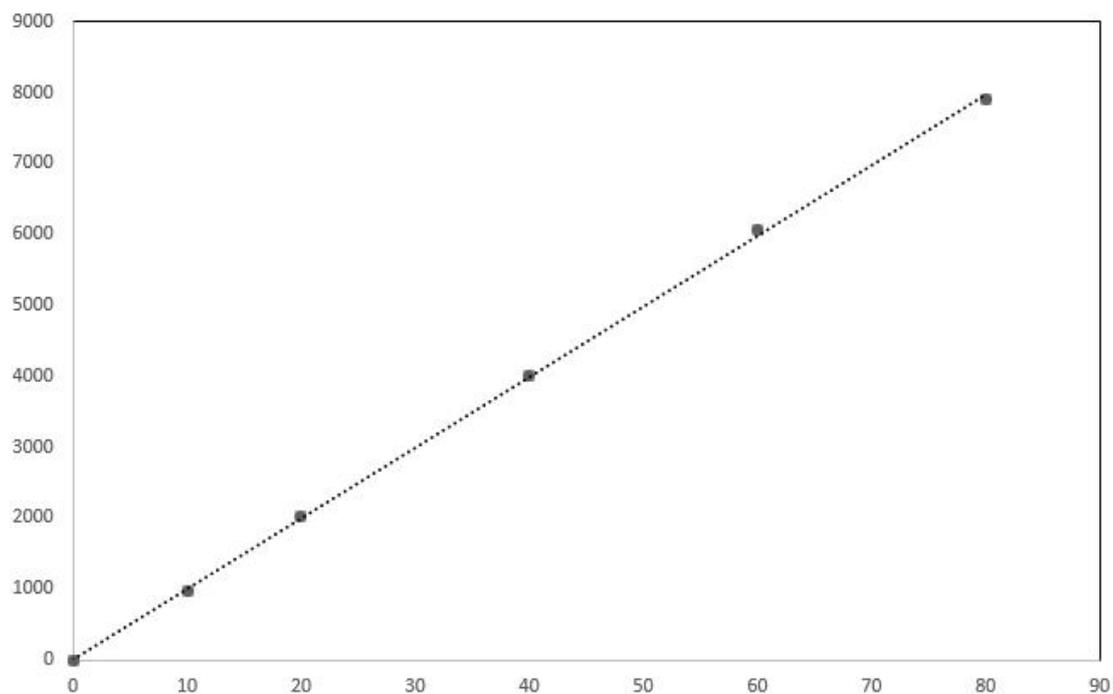


图 2 羟脯氨酸测定标准曲线

#### 2.4.2 检出限

检出限：0.39  $\mu$ g/ml (试剂空白、3 倍信噪比)，相当于固体样品中羟脯氨酸含量为 1.95 mg/g。

定量限：1.56  $\mu$ g/ml (样品空白、10 倍信噪比)，相当于固体样品中羟脯氨酸含量为 7.8 mg/g。

#### 2.4.3 重复性

本方法重复性测试依照 GB/T27417-2017 合格评定 化学分析方法确认和验证指南，测定仪器重复性。重复性测试：取 20mg/L 样品，做 6 个平行，计算标准偏差，样品数据结果见附件 2，结果分析见下表：

表 5 方法重复性测试数据表

平行号	峰面积 (mAU*S)	浓度 (mg/l)
-----	-------------	-----------

	1	1957.65	19.6
	2	1956.62	19.5
	3	1967.60	19.7
	4	1957.65	19.6
	5	1956.62	19.5
	6	1967.60	19.7
平均值		1960.62	19.6
标准偏差		5.42%	5.42%
相对标准偏差 <i>RSD</i> (%)		0.28%	0.28%

重复性结果分析：依据上表可以得出，实验做出的相对标准偏差为 0.28%，满足方法要求。

#### 2.4.4 精密度

本方法重复性测试依照 GB/T27417-2017 合格评定 化学分析方法确认和验证指南，测定精密度。取盛美诺 20240317F 样品，按方法独立测定 6 次，计算标准偏差，样品数据结果见附件 2，结果分析见下表：

表 6 方法精密度测试数据表

		峰面积 (mAU*S)	浓度 C (ug/mL)
平行号	1	5768.55	57.9
	2	5839.78	58.6
	3	5526.73	55.4
	4	5626.74	56.4
	5	5526.38	55.4
	6	5433.21	54.5
平均值		5620.23	56.4
标准偏差		156.7	1.58
相对标准偏差 <i>RSD</i> (%)		2.79%	2.79%

精密度结果分析：依据上表可以得出，盛美诺 20240317F 样品测得定容后的沉淀中含量为 56.4ug/ml,实验做出的相对标准偏差为 2.79%，符合方法要求。

#### 2.4.5 准确度

准确度的测定采用加标回收的方法完成,取盛美诺 20240317F 样品分别加标 L-羟脯氨酸标准物质 0.5mg、2.0mg, 样品按照方法分别做 6 个平行, 计算结果, 测定回收率, 结果分析见下表:

表 7 方法准确度测试数据表

标液	测定回收率结果 (%)	
	加标 0.5mg	加标 2.0mg
1	102%	96%
2	96.0%	94%
3	101%	102%
4	99.6%	106%
5	109%	106%
6	103%	97%
平均值 (mg/L)	102%	100.0%
标准偏差 (mg/L)	4.23%	5.47%
相对标准偏差 RSD (%)	4.23%	5.47%

准确度结果分析: 依据上表可以得出, 实验做出的样品加标实验数据回收率分别为 102%, 100%符合质控要求, GB/T27417-2017 方法要求。

#### 4.4.6 样品测试

测定 20240317F, 20240323F 样品, 根据计算公式测得非变性 II 型含量结果分析见下表:

$$W=X*7.4/m \times 100\% \dots\dots\dots(2)$$

式中:

W——非变性 II 型胶原蛋白含量, %

X——测得羟脯氨酸质量, mg

m——称量总质量, mg

7.4——折算系数

表 3 实际样品结果

序号	非变性 II 型含量检测结果(%)
20240317F	20.9

20240323F	23.2
-----------	------

### 3 两种方法验证

#### 3.1 F 检验测试

取 20240411F 批次非变性样品进行前处理酶解，自由度：1，水解冷却定容后分别取 2ml 蒸干，2ml 复溶，分别用氨基酸分析仪法和液相色谱衍生发测定 6 次，自由度：(5)，结果如下表：

参照 RB/T 208-2016 《化学实验室质量对比 比对实验》中对比试验结果评价。经计算，并查 F 临界值表，得  $F_{0.05}(1,5)=6.61$ ，由于  $F=S_{大}^2/S_{小}^2=1.213 < F_{0.05}(1,5)=6.61$ ，两种结果无显著差别，下一步按 t 检验结果进行评价。

表 5 两种方法对比试验结果表

标液	羟脯氨酸结果 (mg)	
	液相色谱法	氨基酸分析仪法
1	6.28	6.32
2	6.05	6.13
3	6.24	6.26
4	6.17	6.18
5	6.56	6.02
6	6.36	6.12
平均值 (mg)	6.28	6.17
标准偏差 S	17.4%	10.7%
S <sup>2</sup>	3.03%	1.14%

#### 3.2 t 检验测试

t 检验值按式(2)计算：

$$t = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{s} \sqrt{\frac{n_1 n_2}{n_1 + n_2}} \dots \dots (2)$$

式中：

$\bar{x}_1$ ：第 1 组测定结果的平均值；

$\bar{x}_2$ ：第 2 组测定结果的平均值；

S：两组等精度测定结果的合并实验标准偏差；

$n_1$ : 第 1 组测定的平行测定次数;

$n_2$ : 第 2 组测定的平行测定次数。

其中两组等精度测定结果的合并实验标准偏差  $s$  按式(3)计算:

$$s = \sqrt{\frac{(n_1-1)s_1^2 + (n_2-1)s_2^2}{n_1+n_2-2}} \dots\dots (3)$$

自由度为 10, 显著性水平为 0.05 时, 在表中找到对应的  $t$  值为 1.81。 计算出来的  $t$  值为 0.45,  $t$  计算  $< t_{0.05,10}$ , 故两种方法测定结果不存在显著差异。

### 3.3 标准品检测

取中科院过程工程研究所的牛源 II 型胶原蛋白 (20 mg/瓶) 标准品一瓶, 批号 20211001, 羟脯氨酸含量  $10.91\% \pm 0.42\%$ 。直接用盐酸水解定容, 分别用两种方法测定 3 次, 结果如下:

结果进行评价。

表 6 两种方法标准品对比试验结果表

标液	羟脯氨酸结果 (%)	
	高效液相色谱法	氨基酸分析仪法
1	10.95	10.52
2	10.92	10.42
3	10.86	10.55
平均值 (mg)	10.91	10.50
标准偏差 S	0.046	0.068

两种检测方法测定牛源 II 型胶原蛋白结果的羟脯氨酸结果均在标准品范围内。

### 3.4 结论

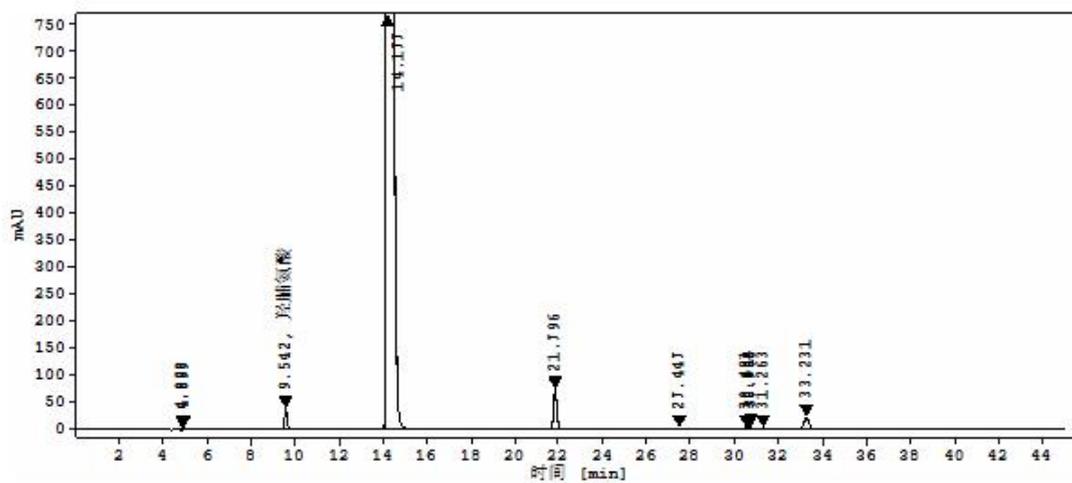
经过 F 检验和  $t$  检验, 两种方法结果不存在显著差异, 两种方法均可测定非变性 II 型中胶原蛋白中的羟脯氨酸。测定牛源 II 型胶原蛋白标准物质两种方法得到的羟脯氨酸结果都在合理误差范围内。

检测 \_\_\_\_\_ 审核 \_\_\_\_\_ 批准 \_\_\_\_\_

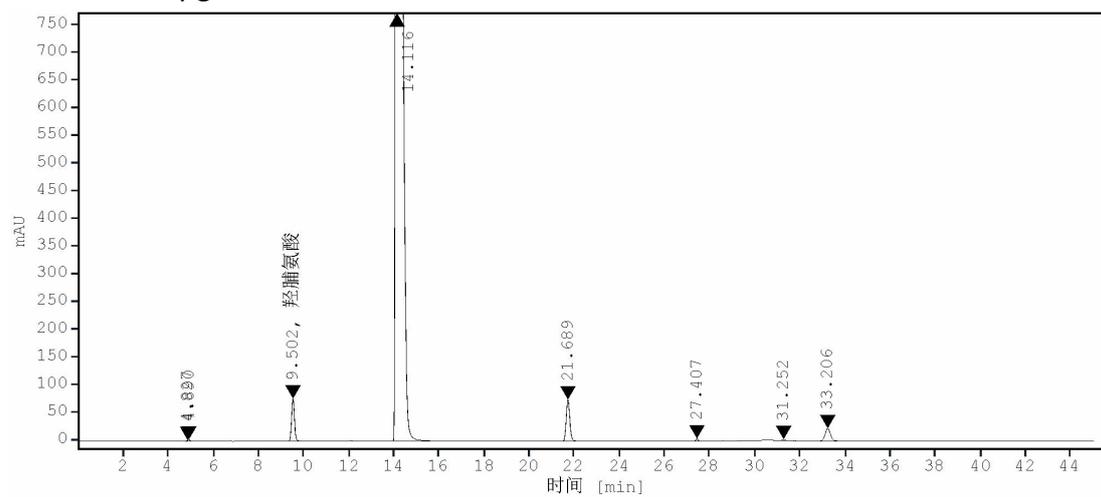
# 附件 1：液相色谱仪分析仪图谱

## (一) 标准曲线

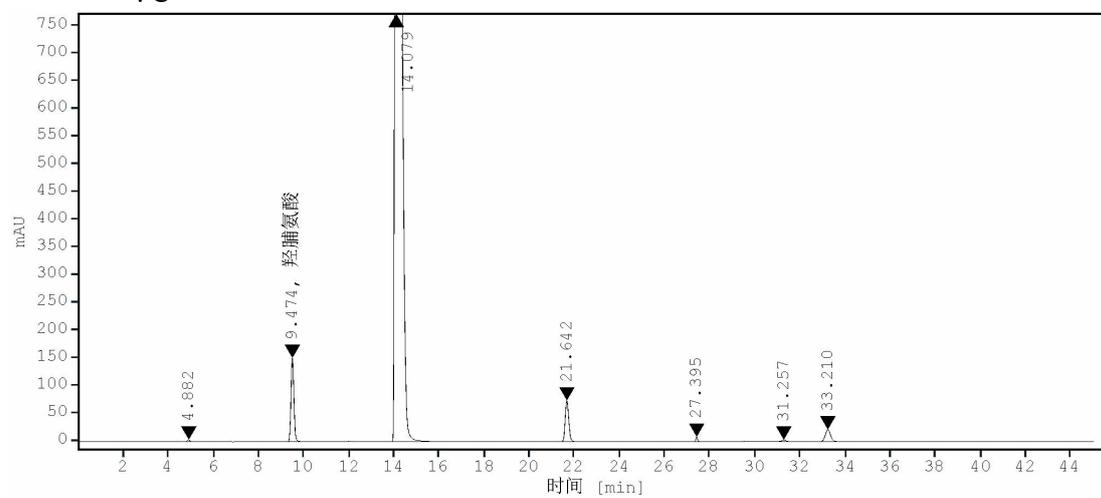
浓度 25.0 $\mu$ g/ml



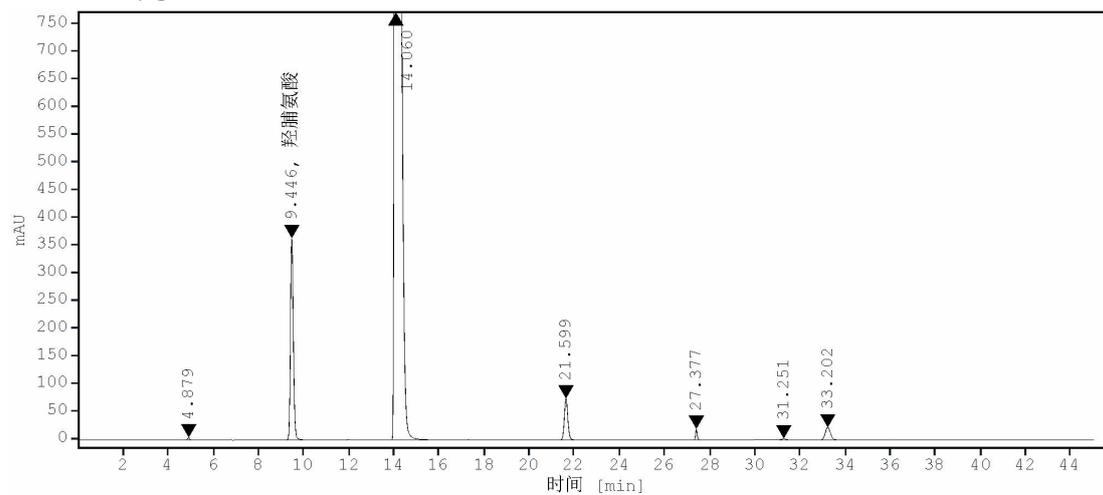
浓度 50.0 $\mu$ g/ml



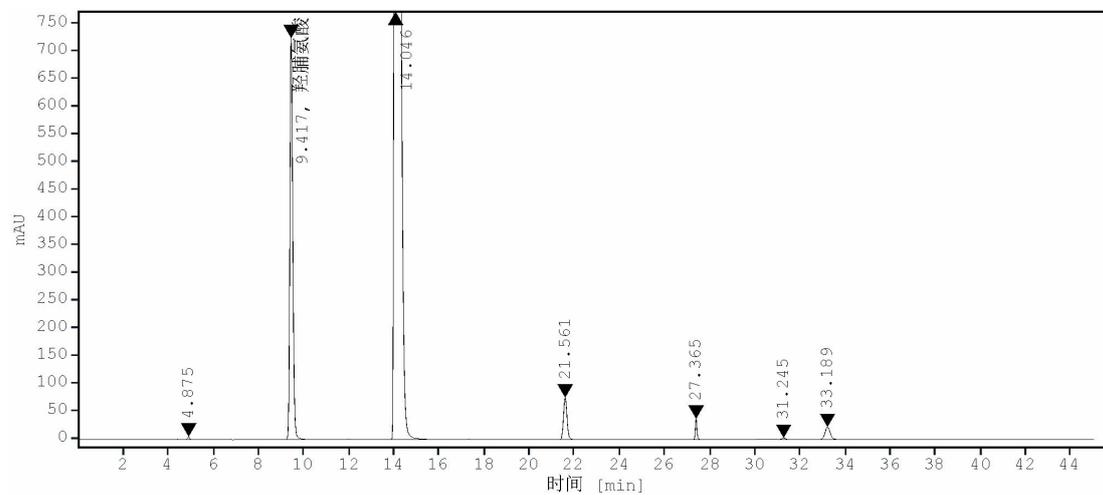
浓度 100.0 $\mu$ g/ml



浓度 250.0 $\mu$ g/ml

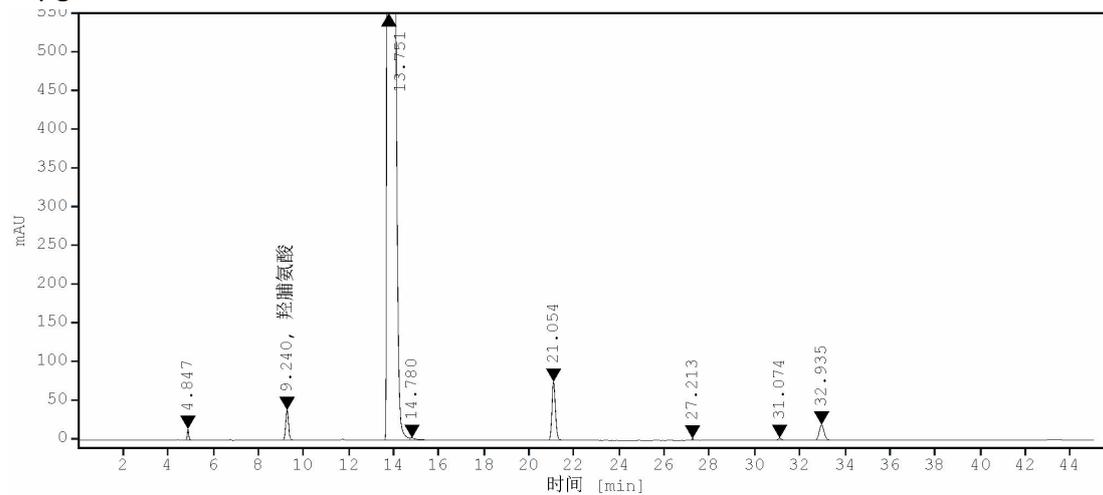


浓度 500.0 $\mu$ g/ml



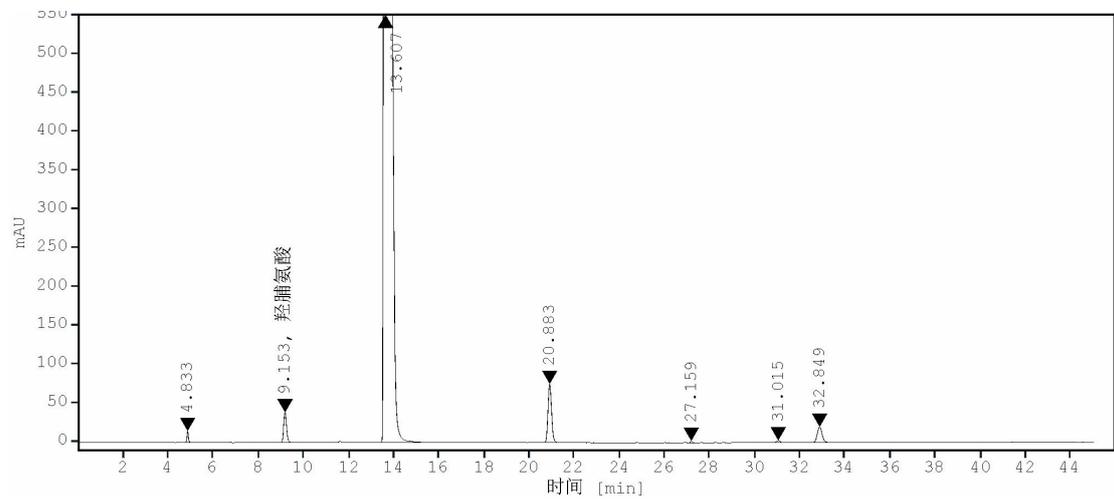
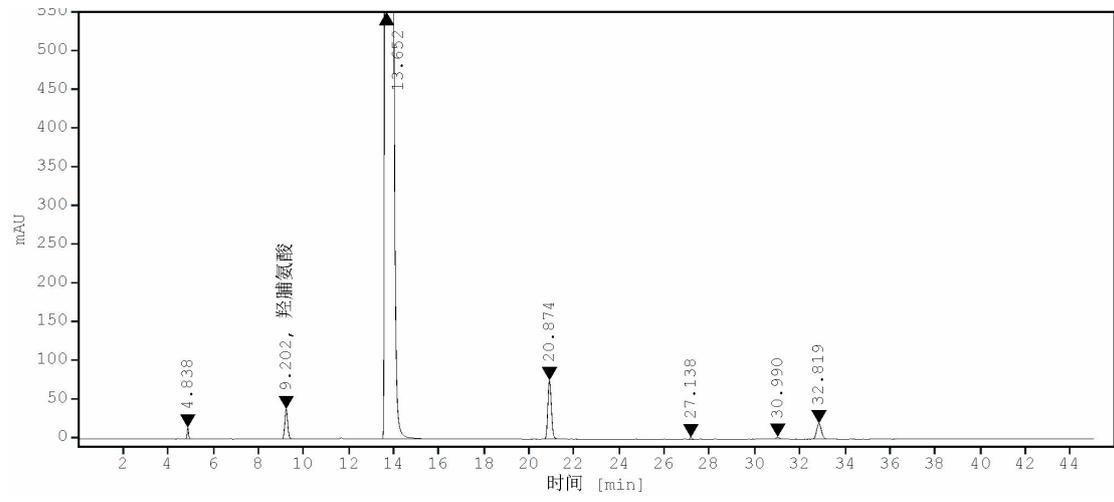
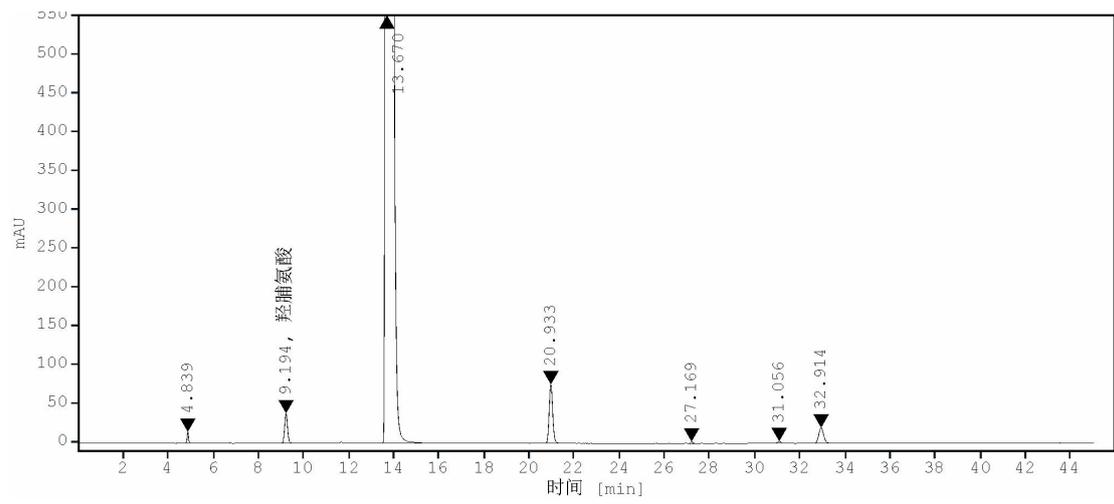
(二) 重复性

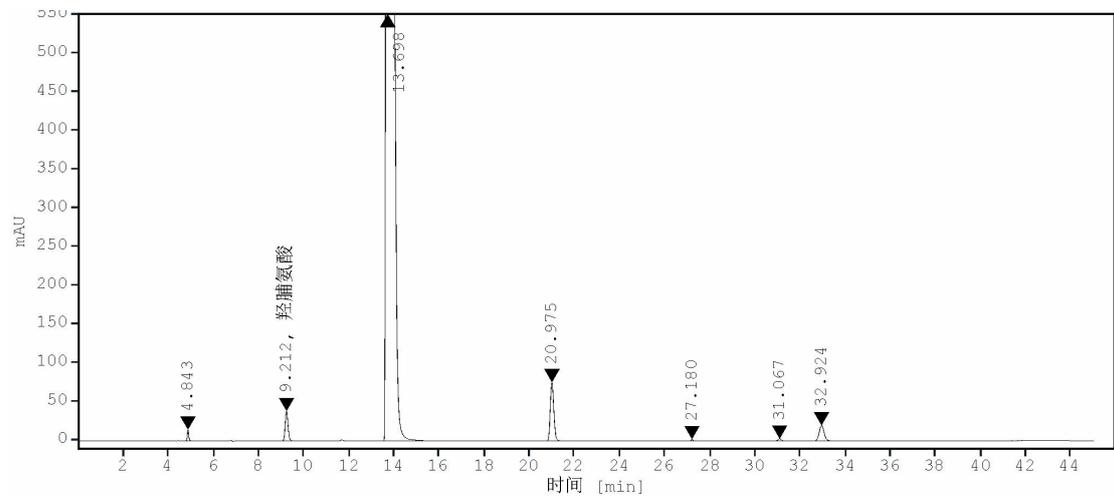
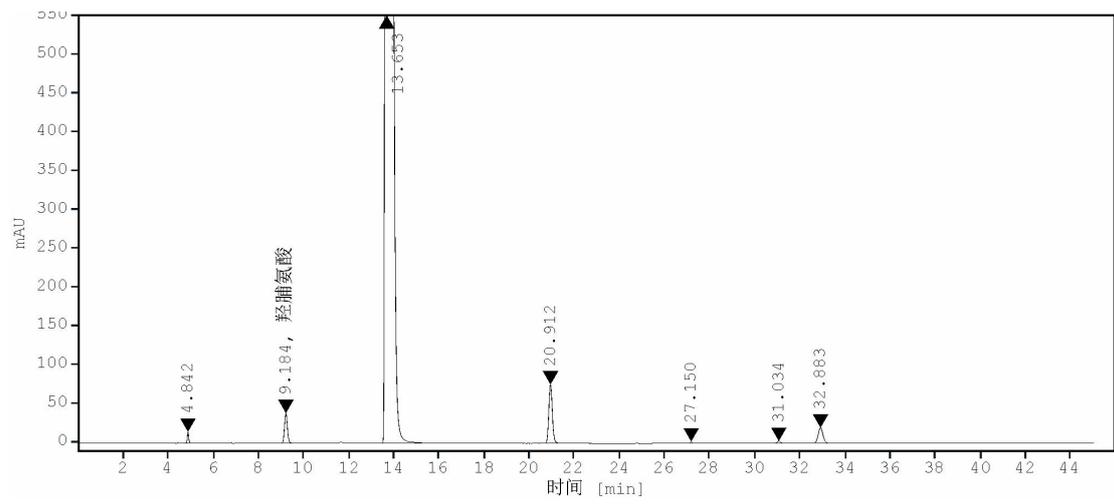
25 $\mu$ g/ml



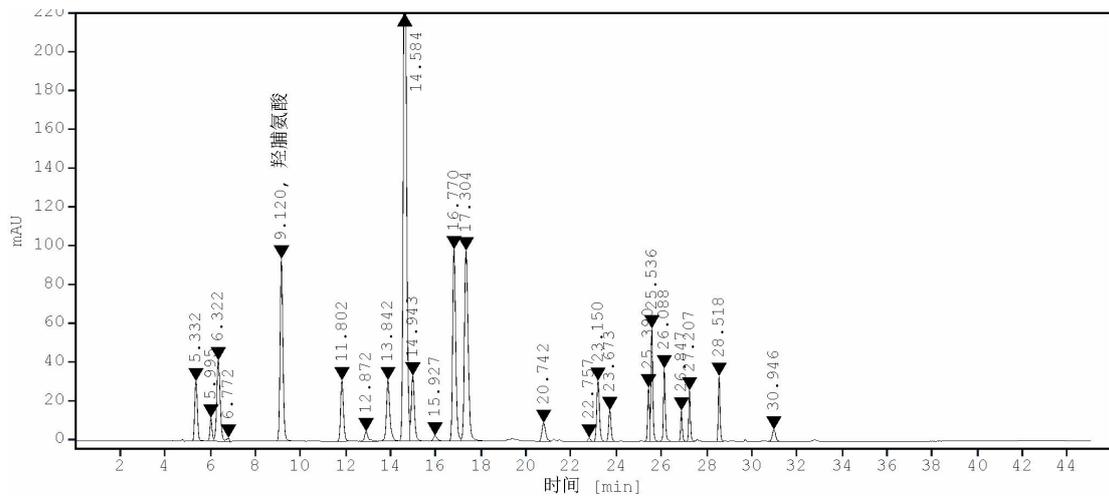
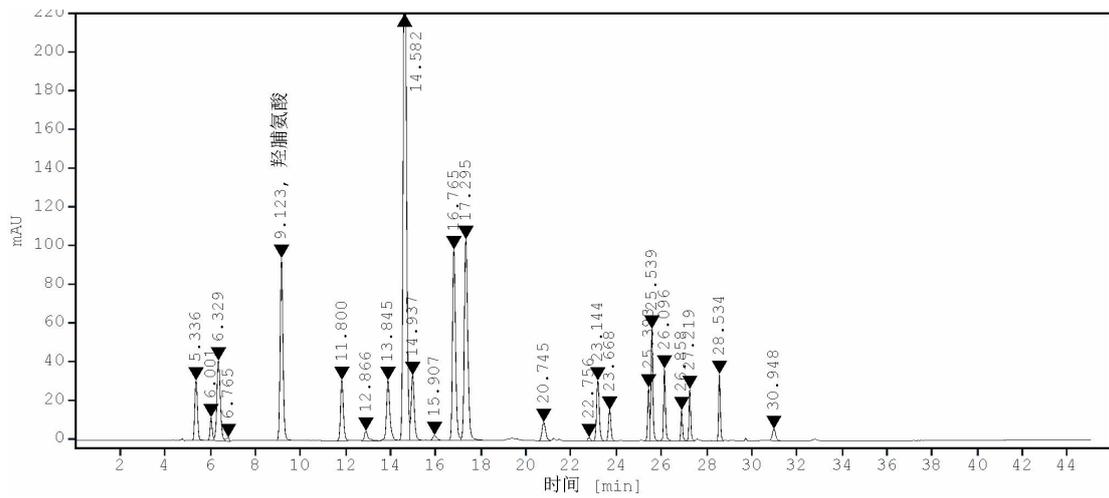
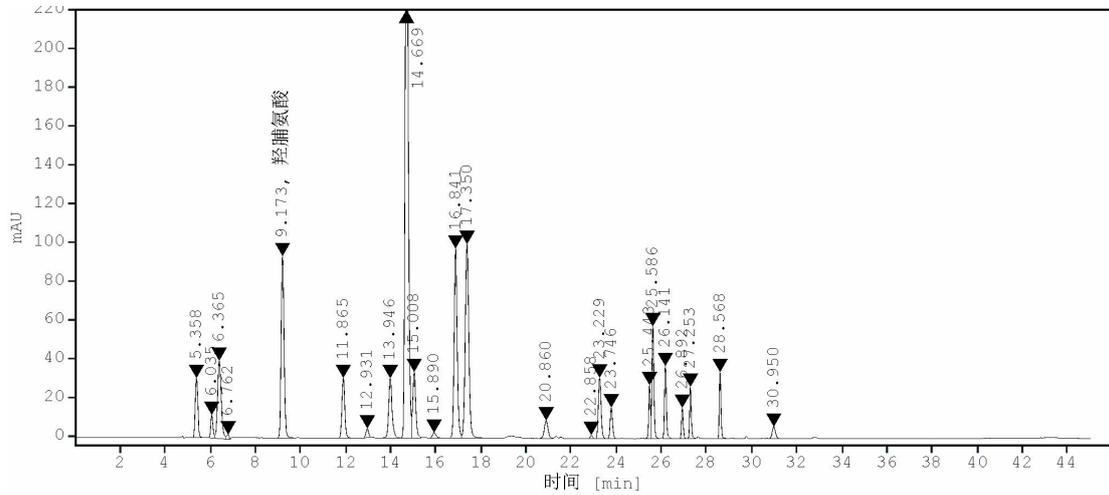
图

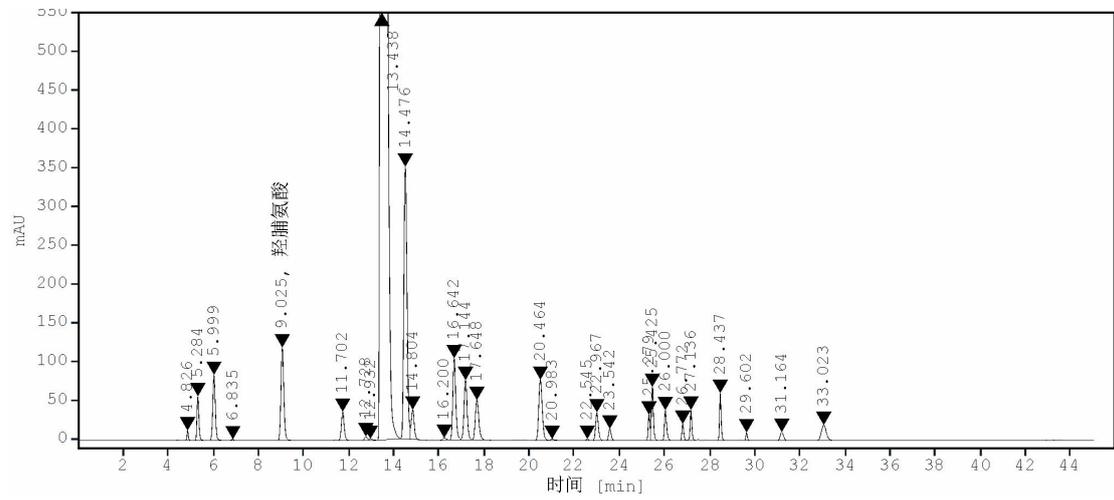
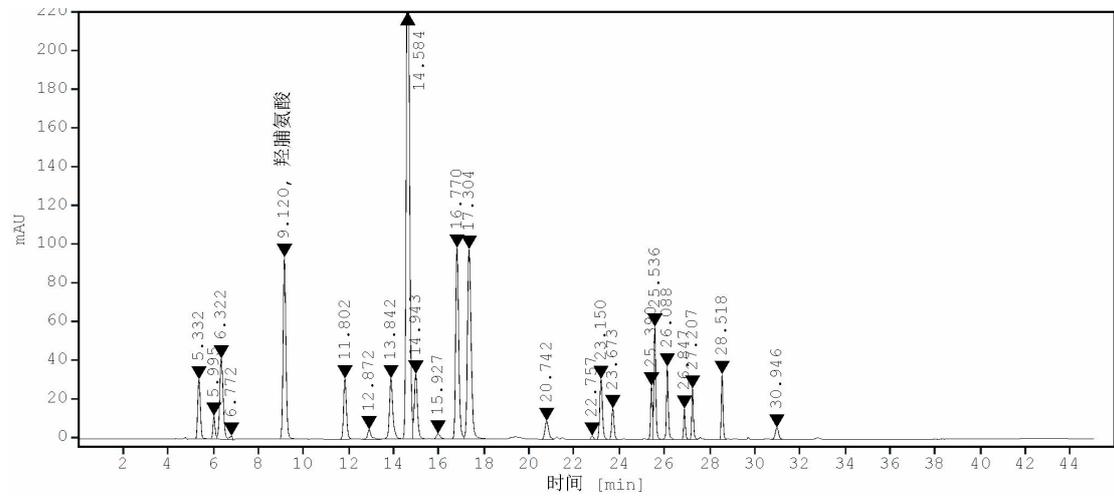
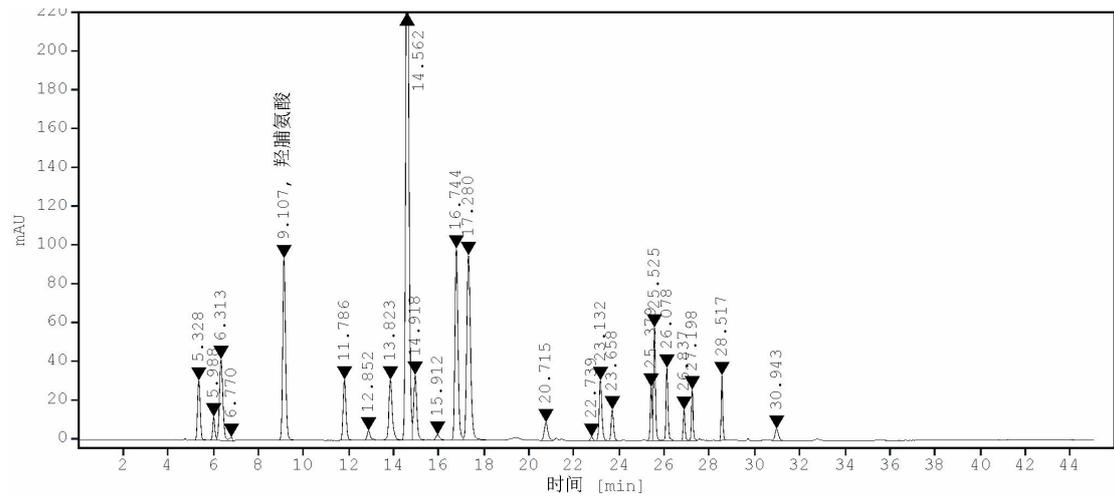
谱





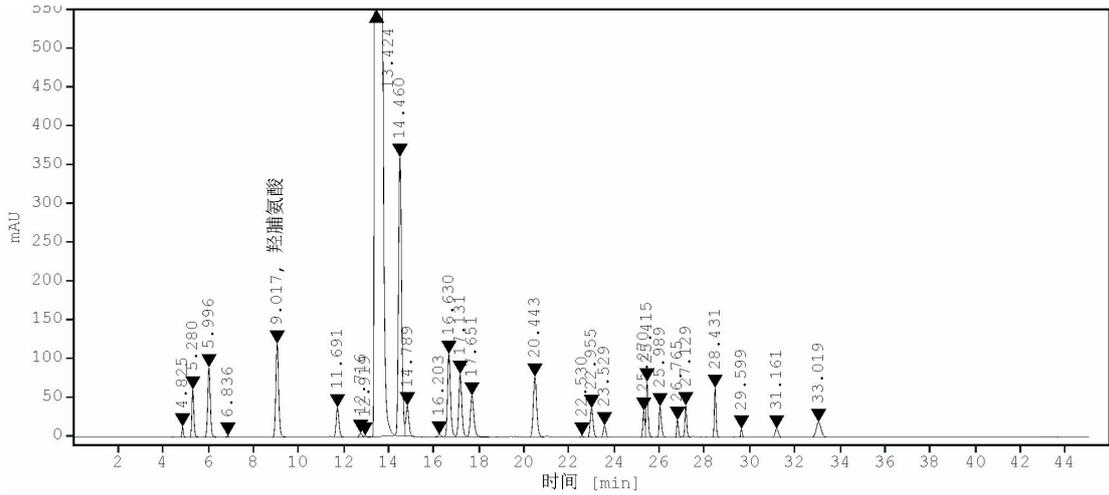
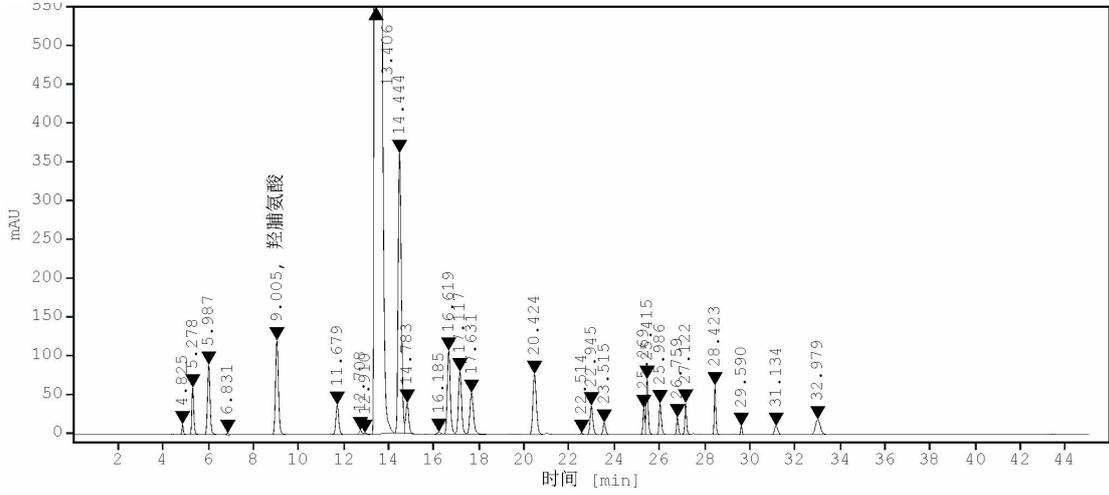
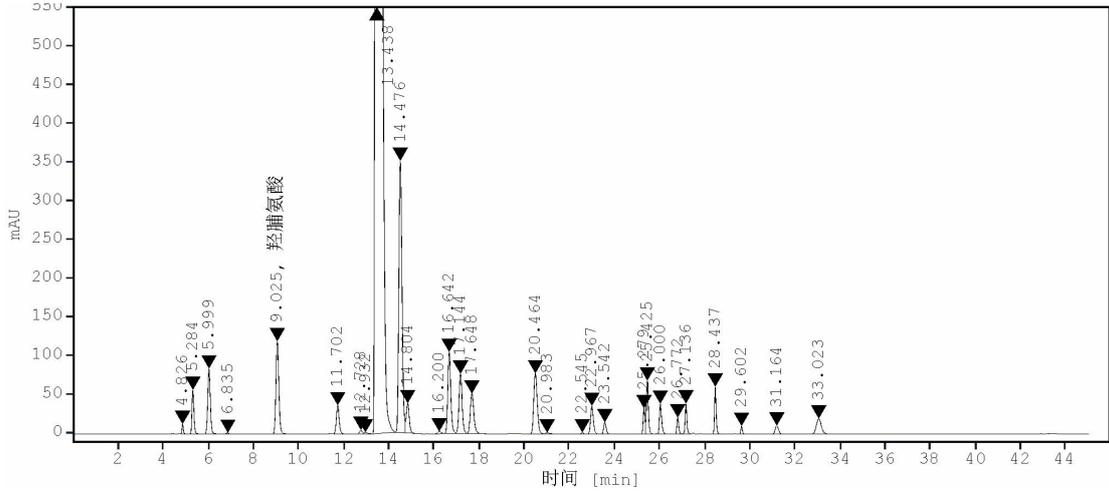
### (三) 精密度

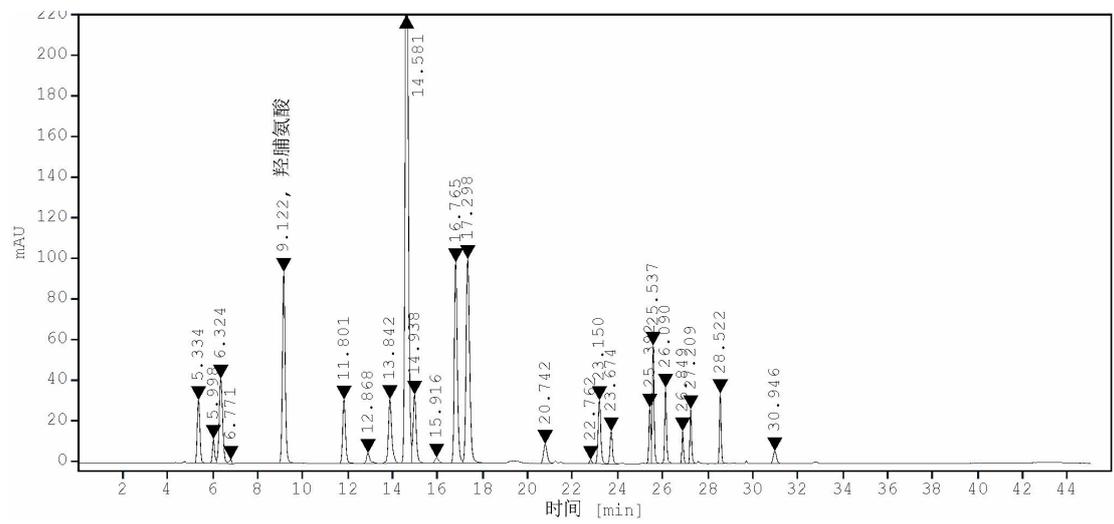
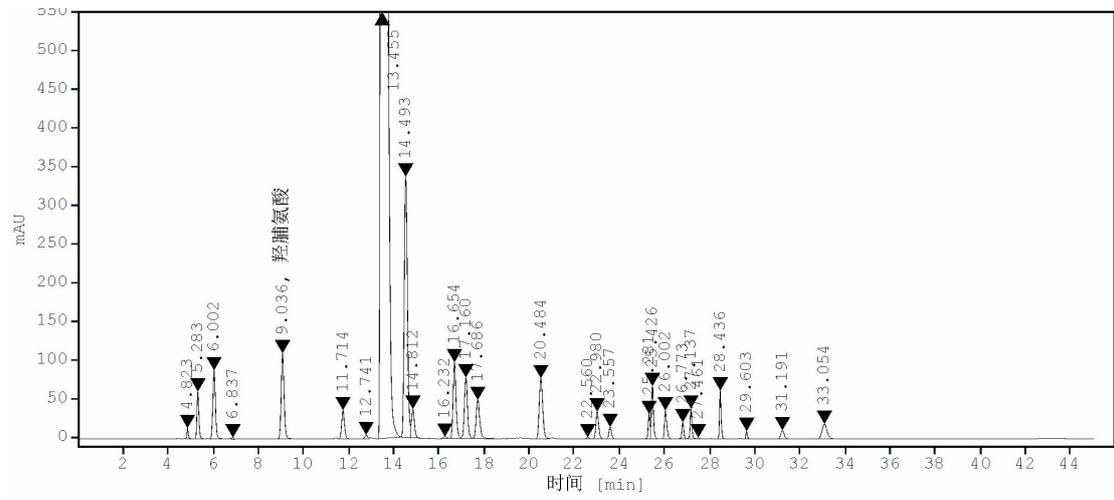
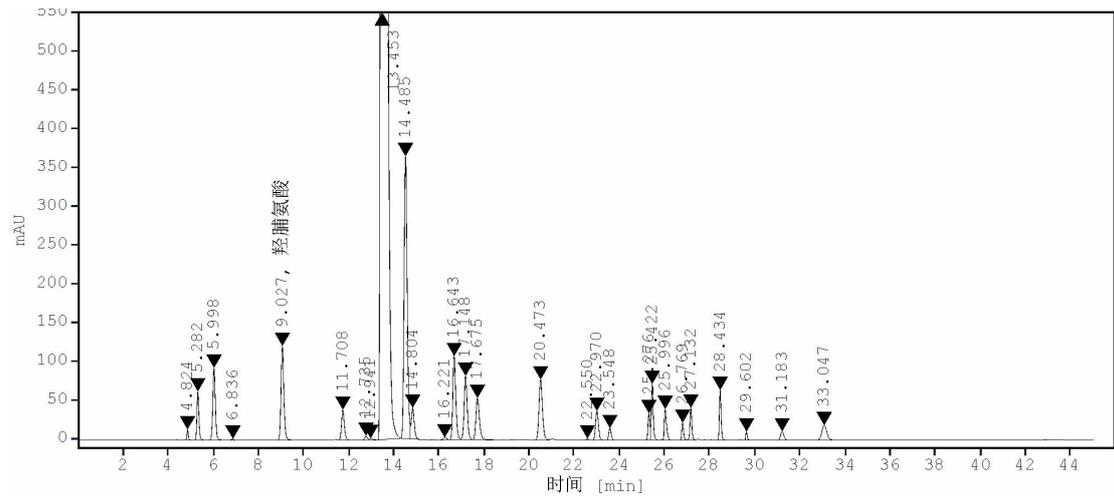




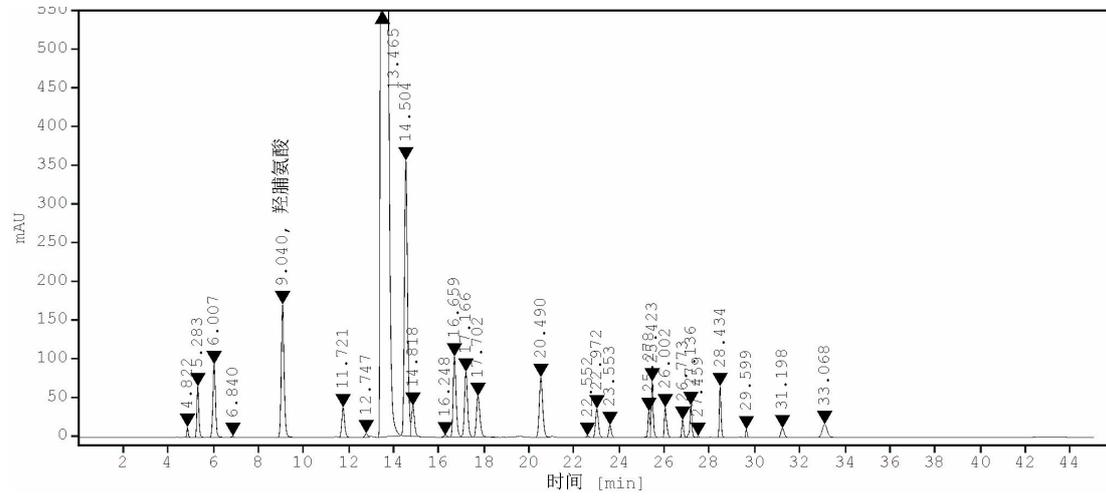
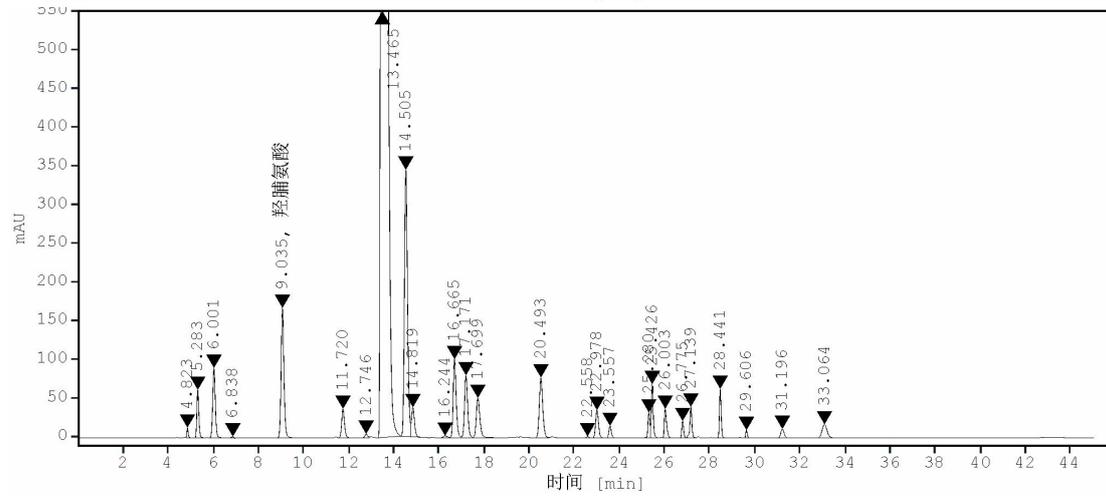
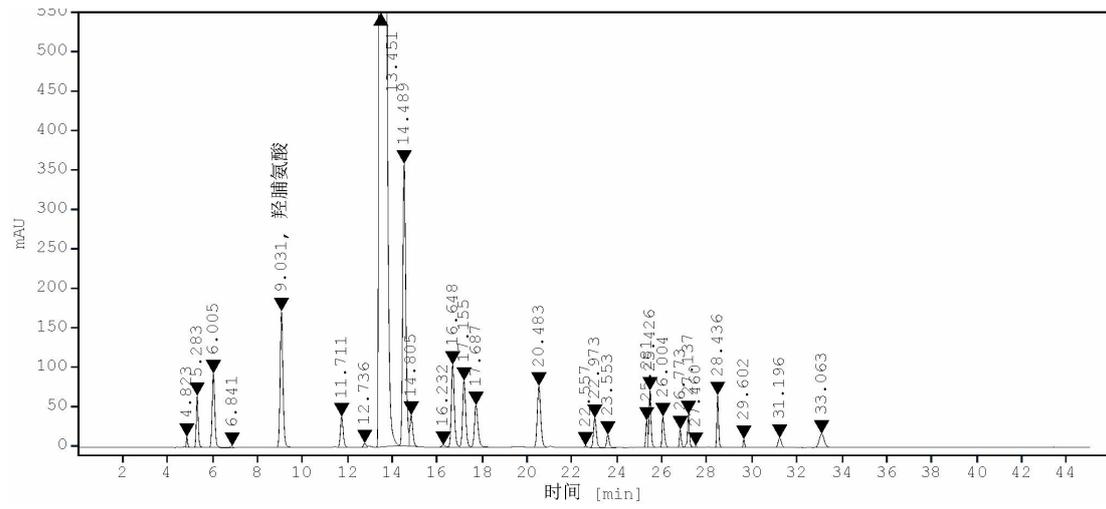
(四) 准确度

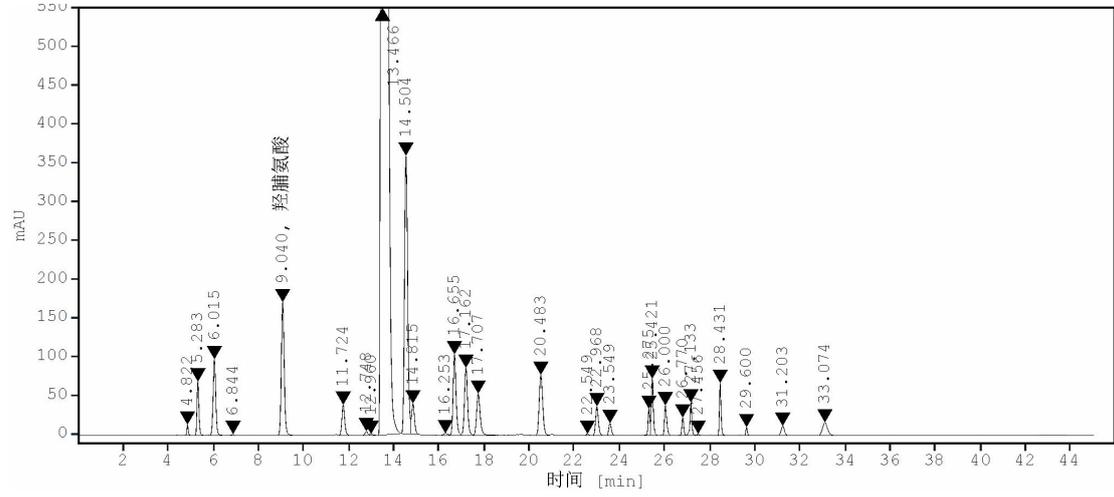
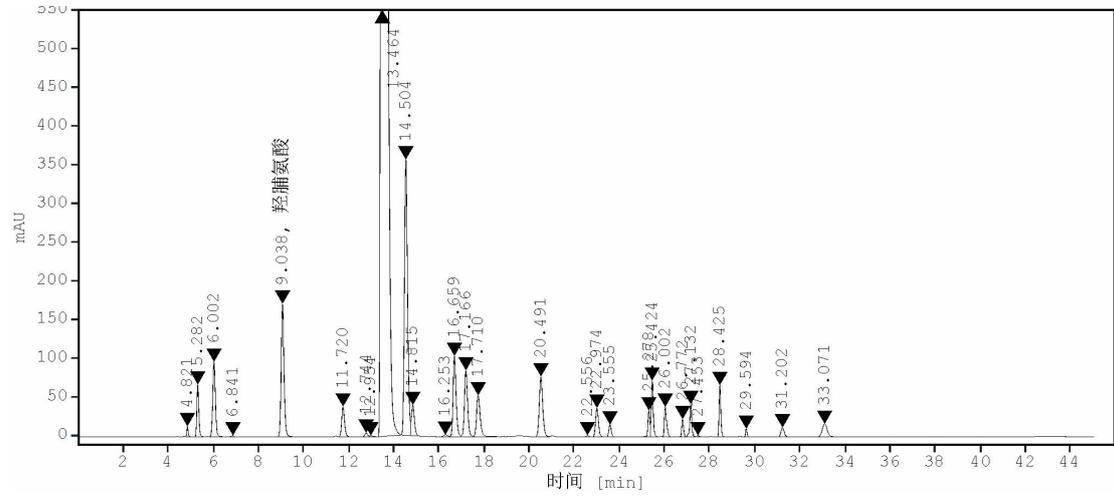
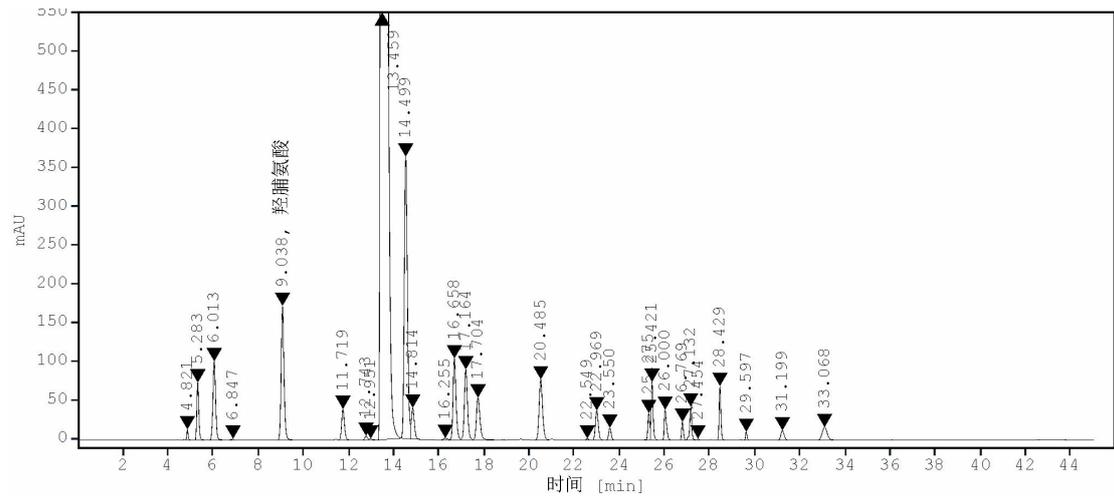
加标 2.5mg





加标 10.0mg

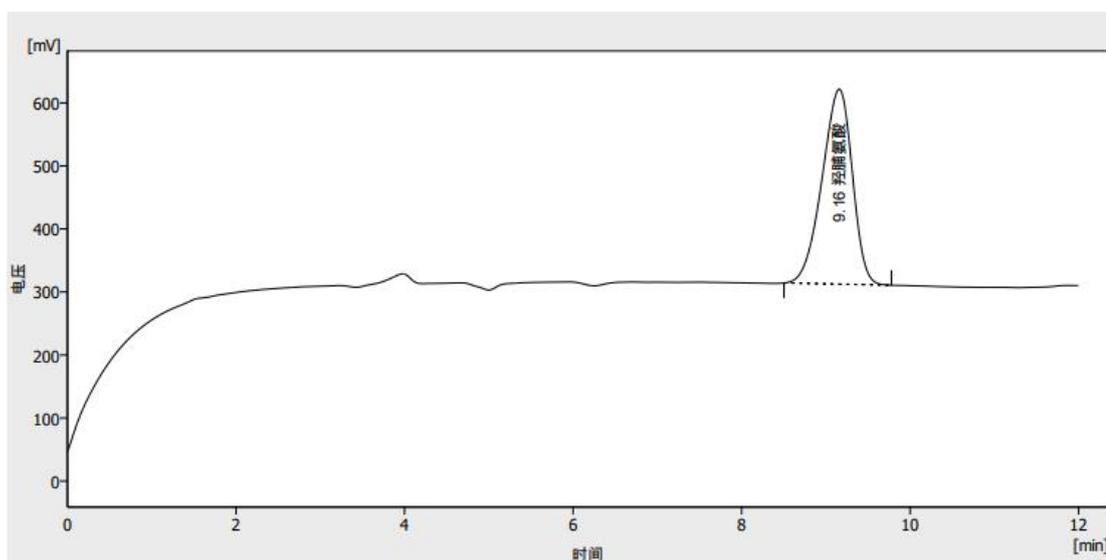




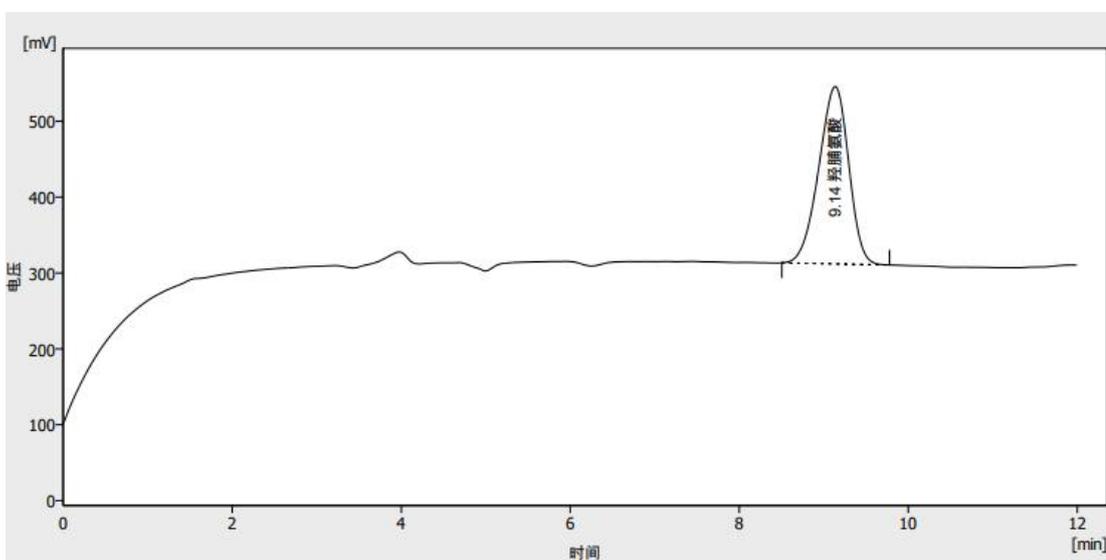
## 附件 2：氨基酸分析仪图谱

### (一) 标准曲线

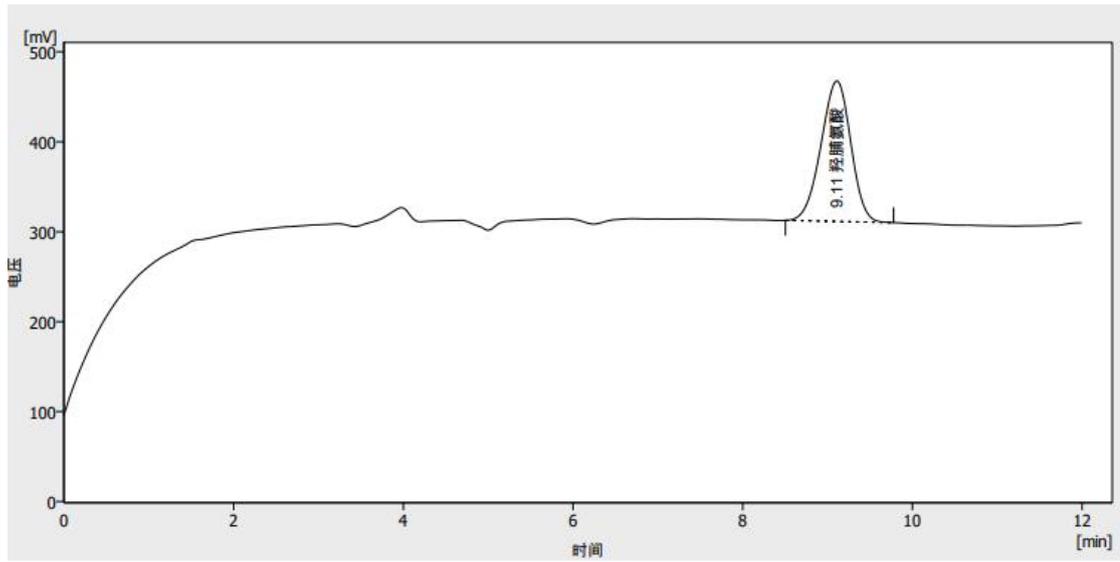
浓度 80.0 $\mu\text{g/ml}$



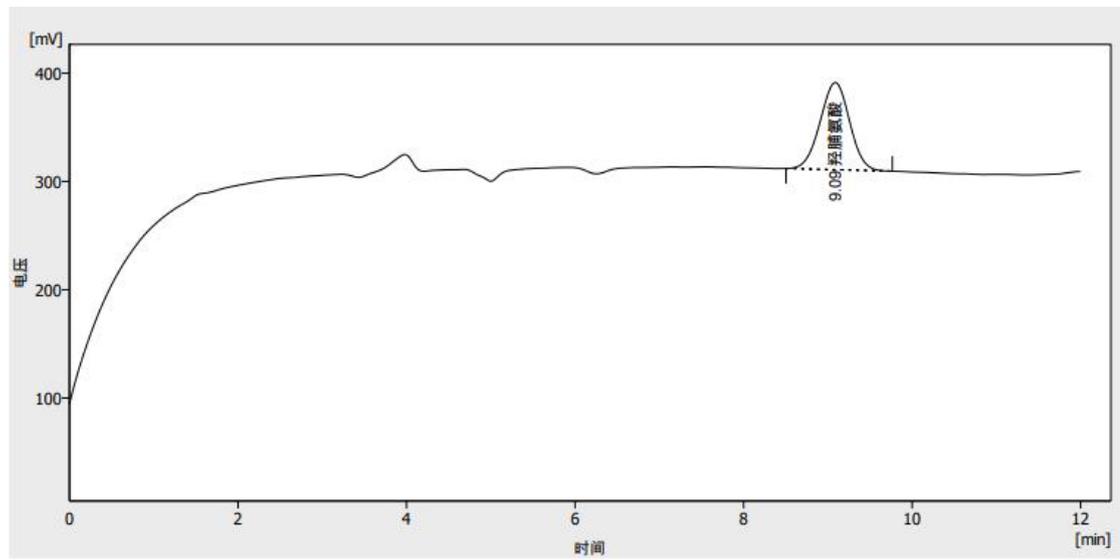
浓度 60.0 $\mu\text{g/ml}$



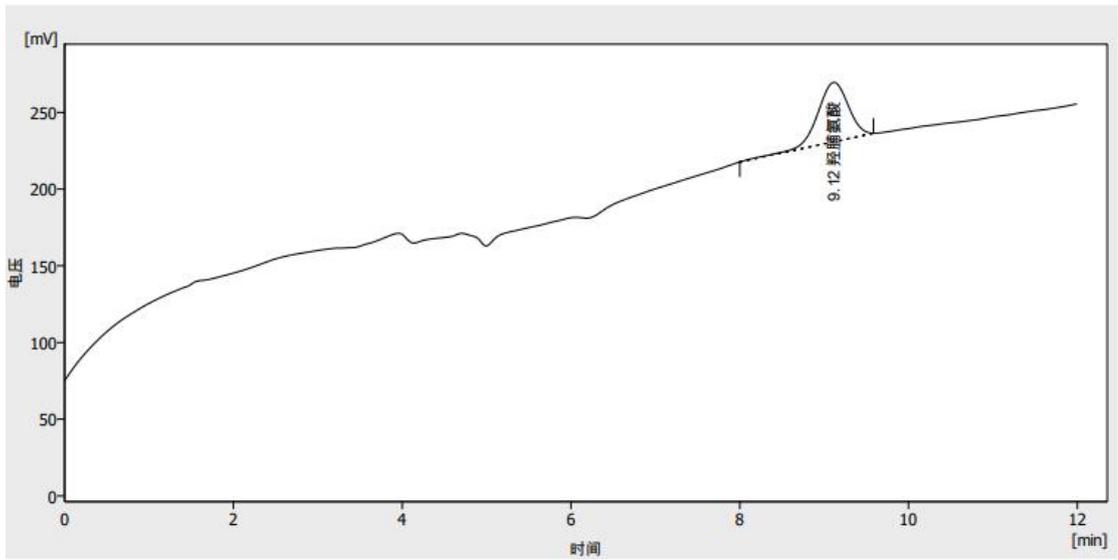
浓度 40.0 $\mu\text{g/ml}$



浓度 20.0  $\mu\text{g/ml}$

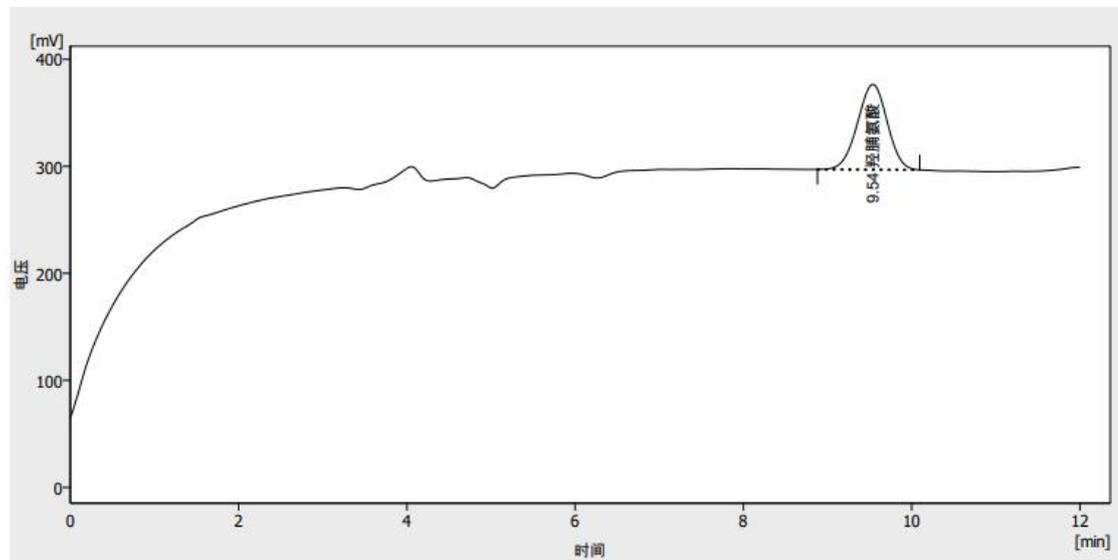
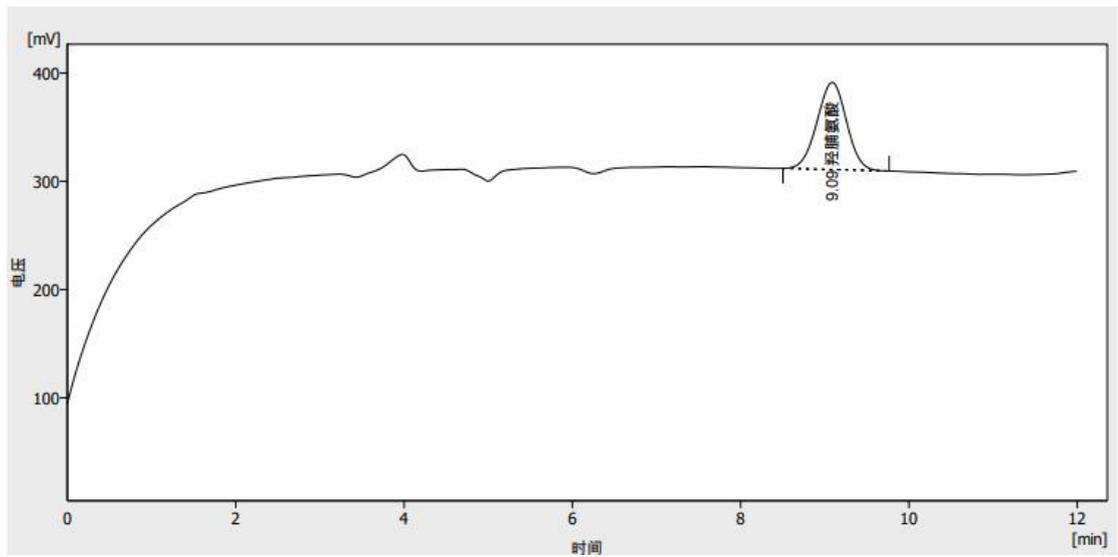


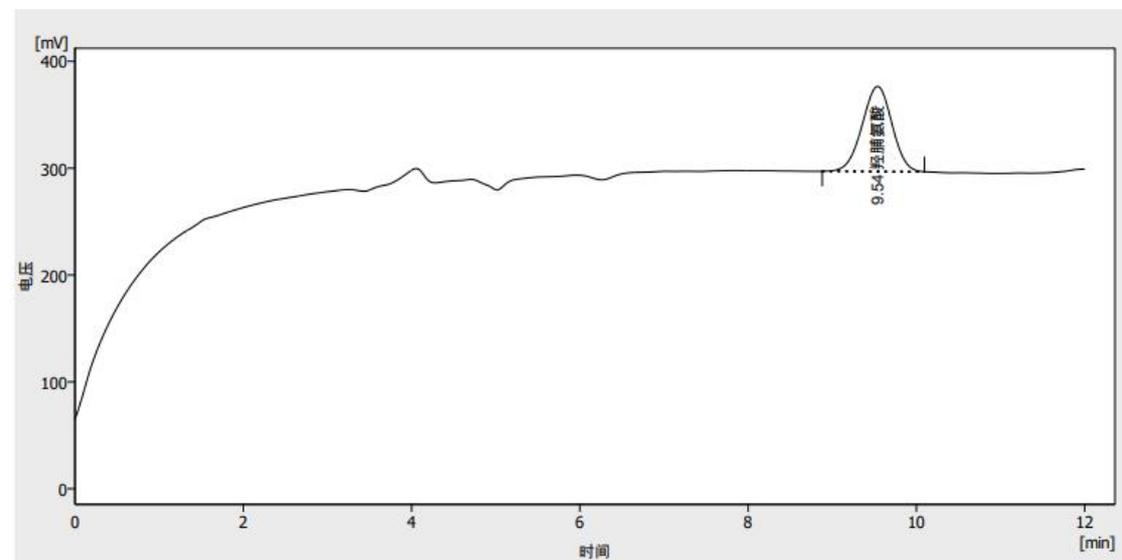
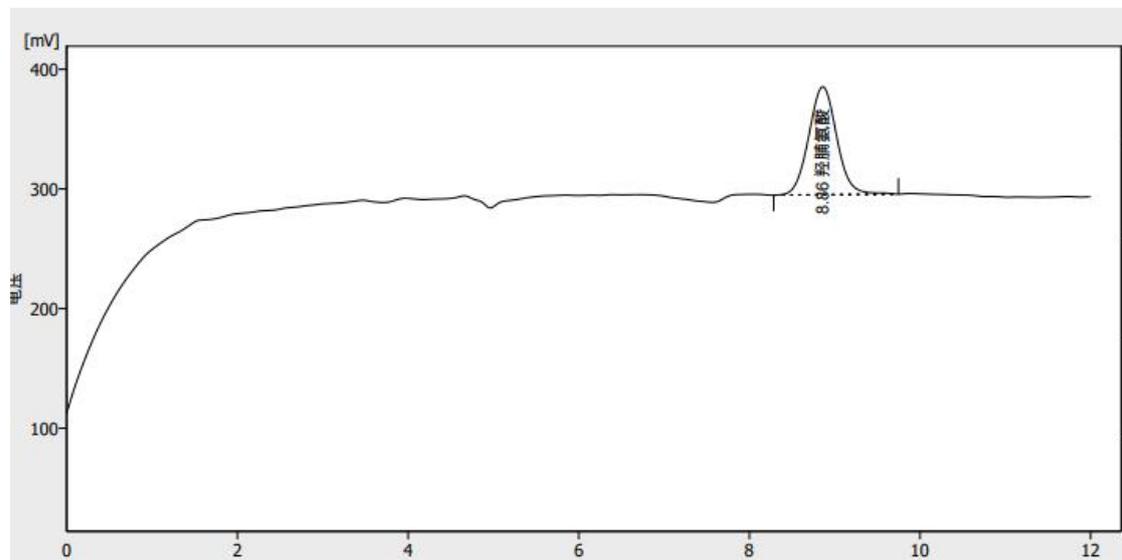
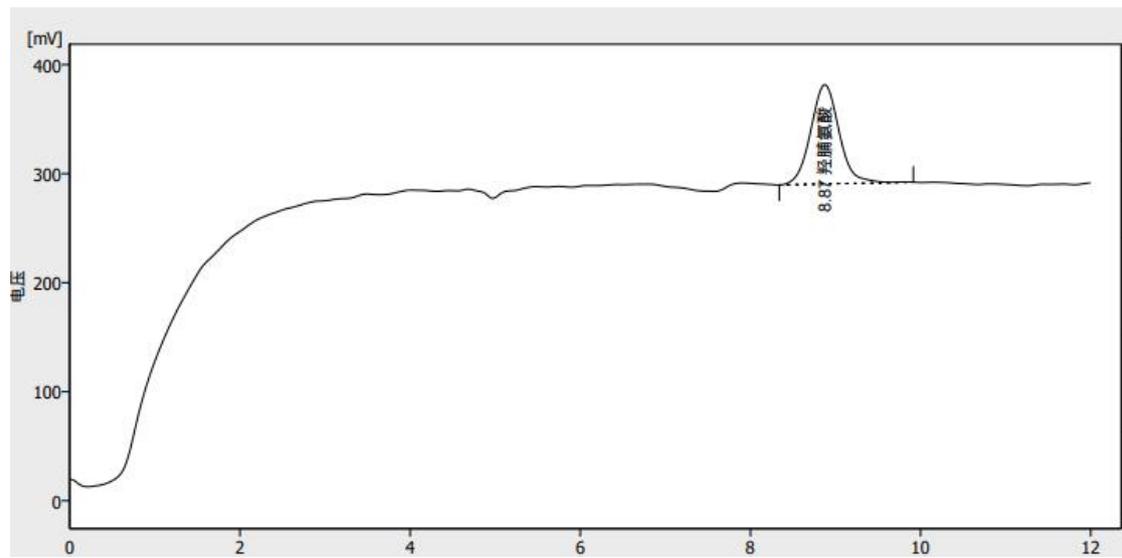
浓度 10.0  $\mu\text{g/ml}$

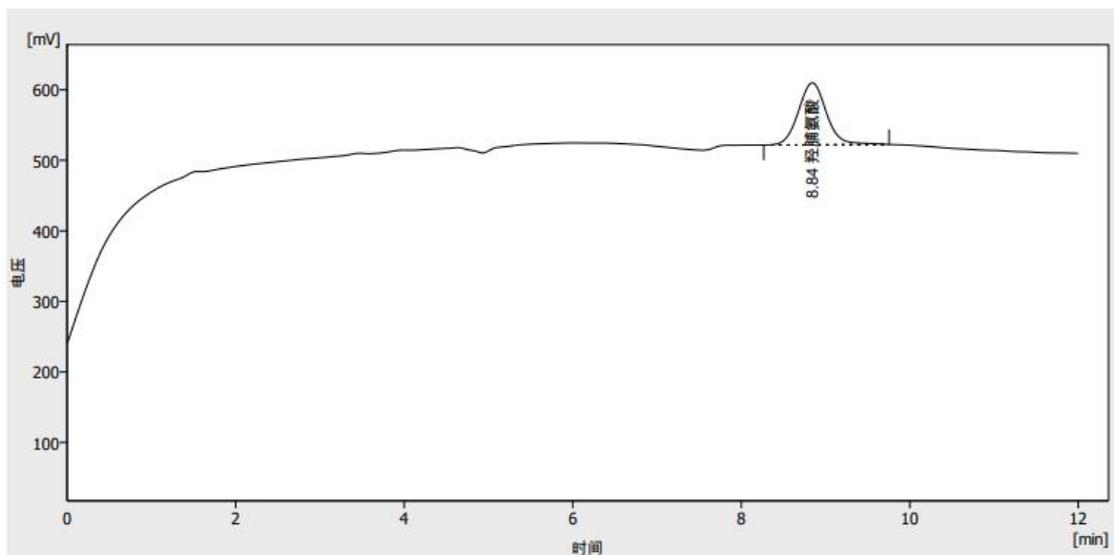


(二) 重复性

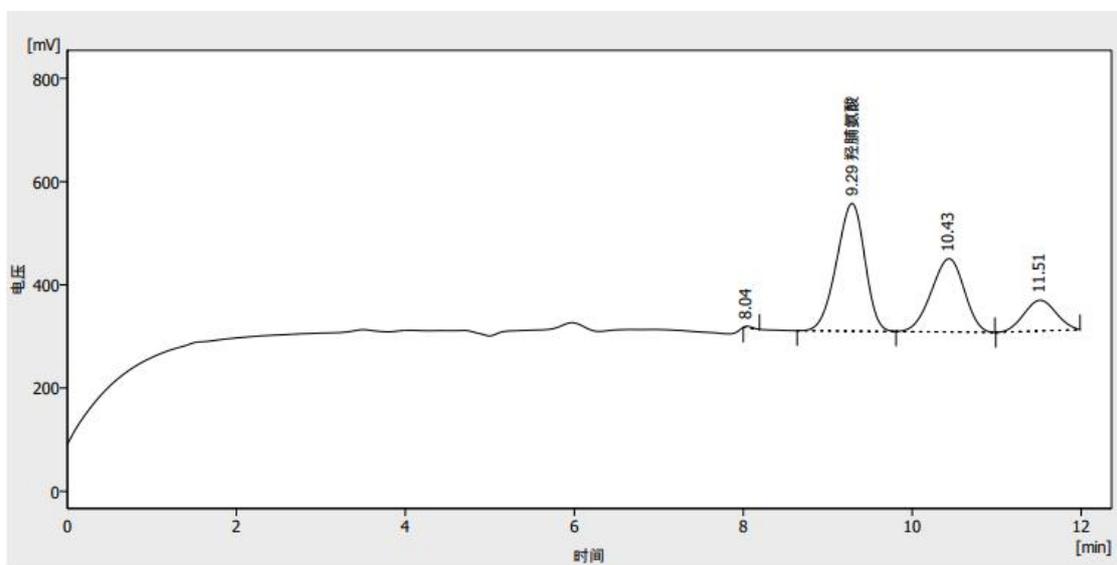
1、20mg/L 图谱

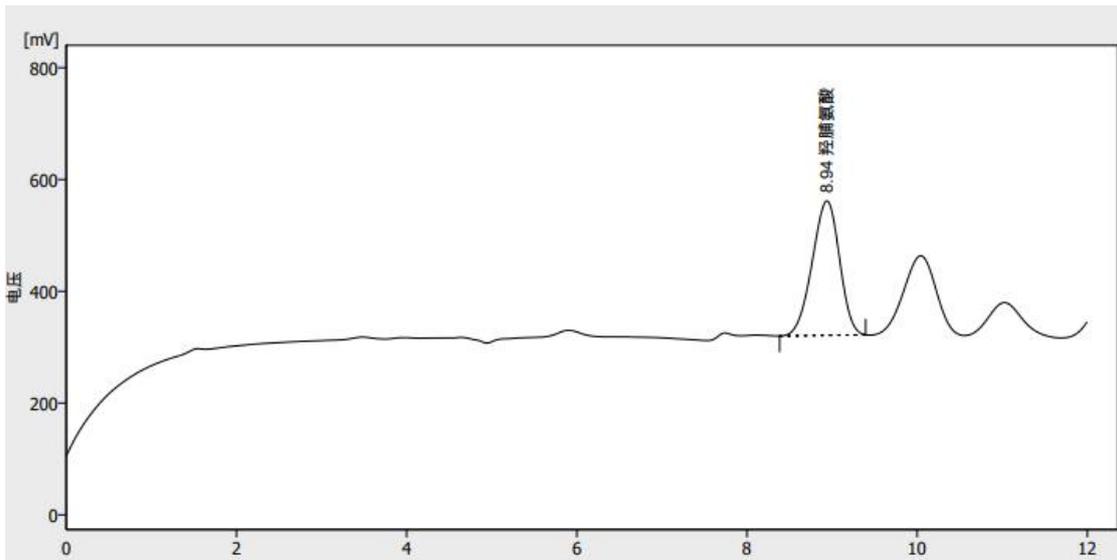
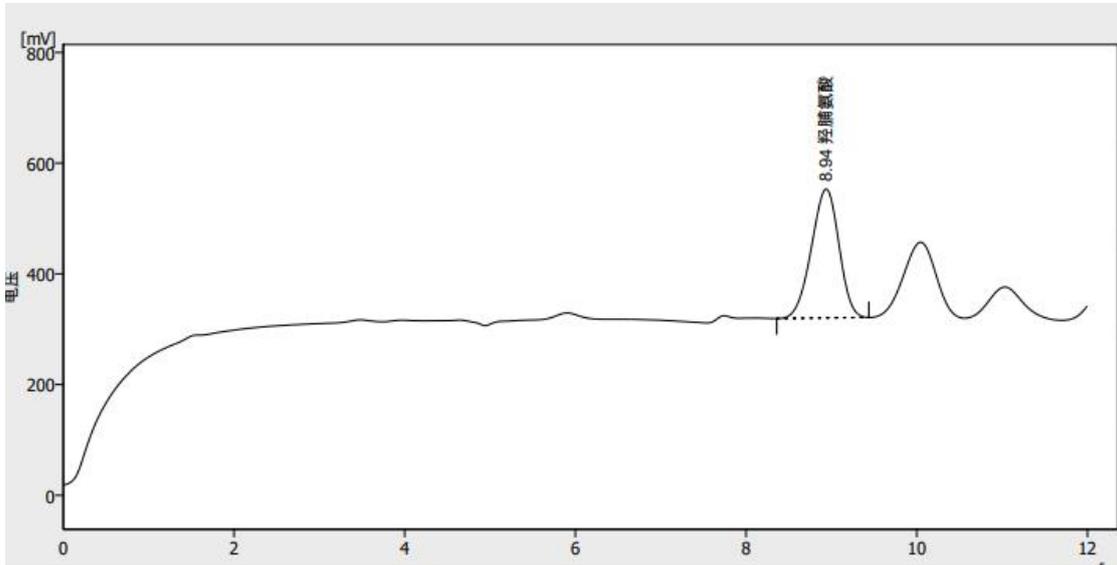
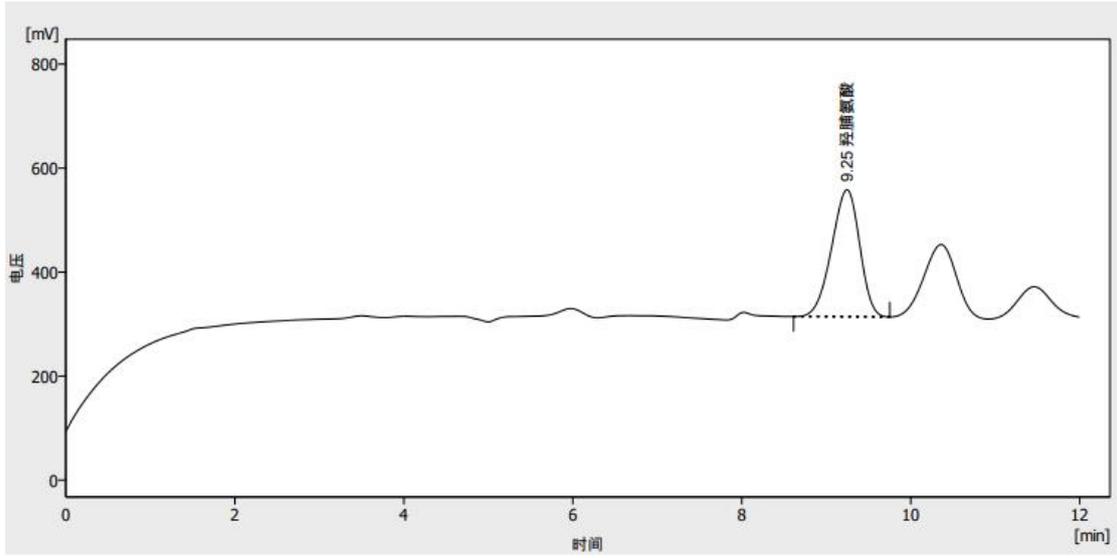


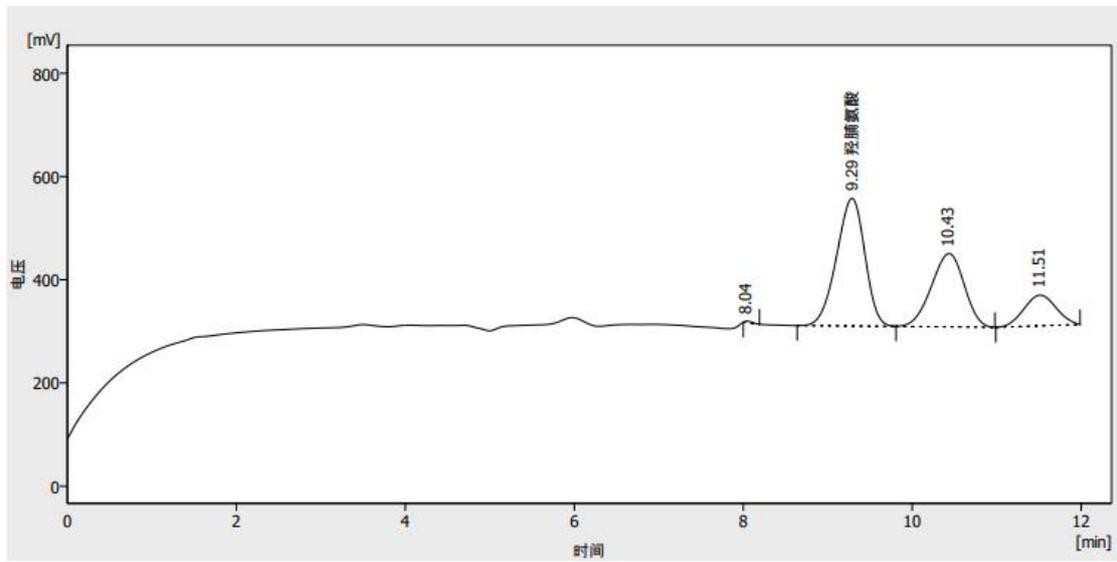
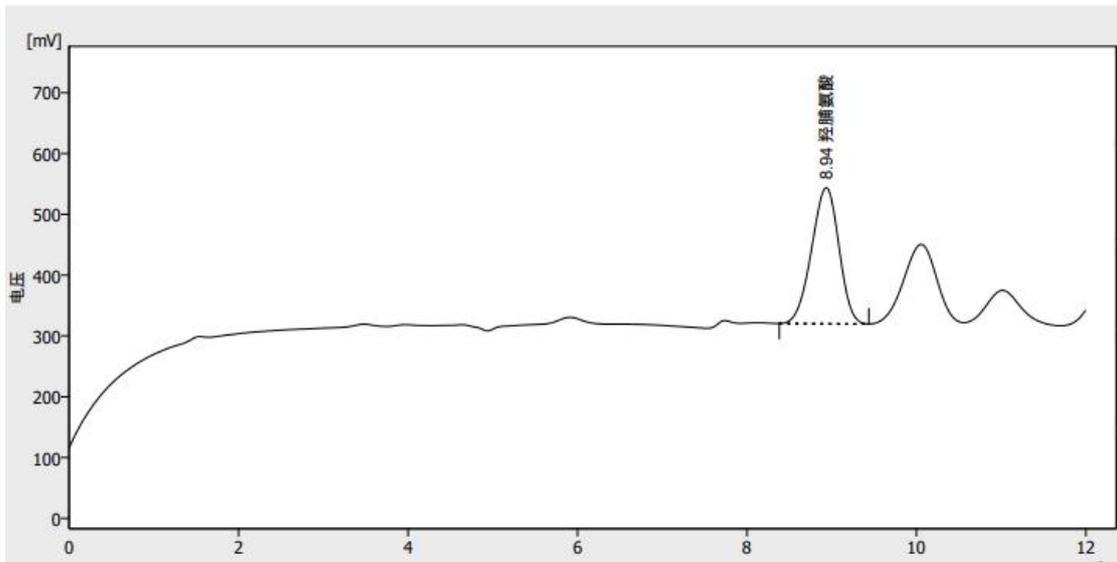




### (三) 精密度



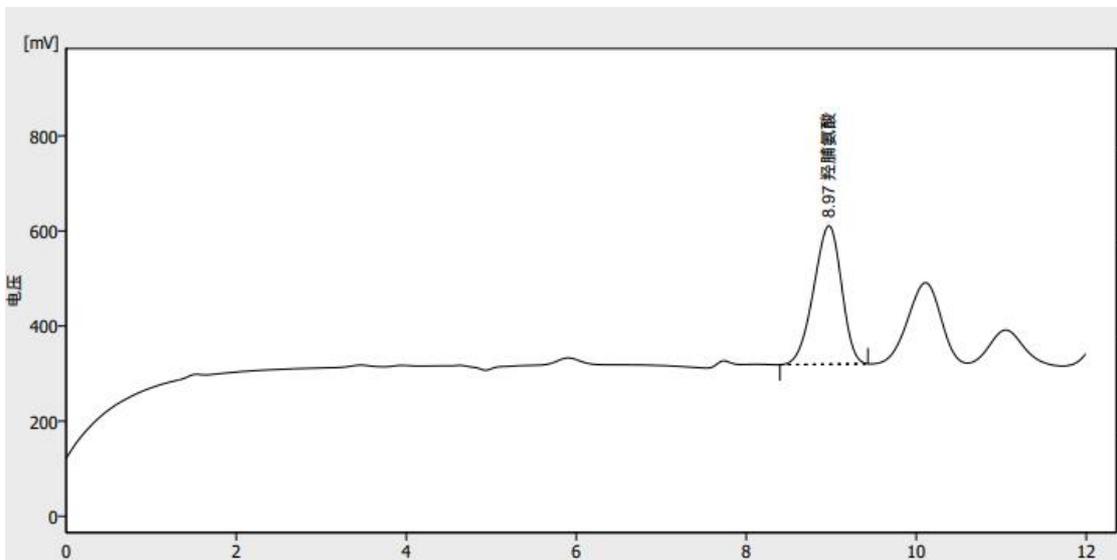


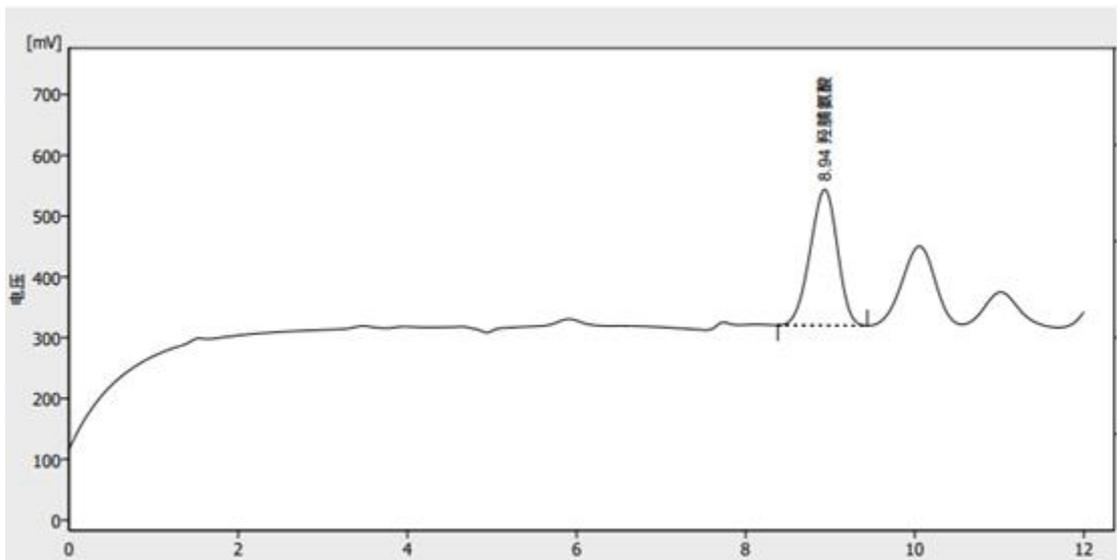
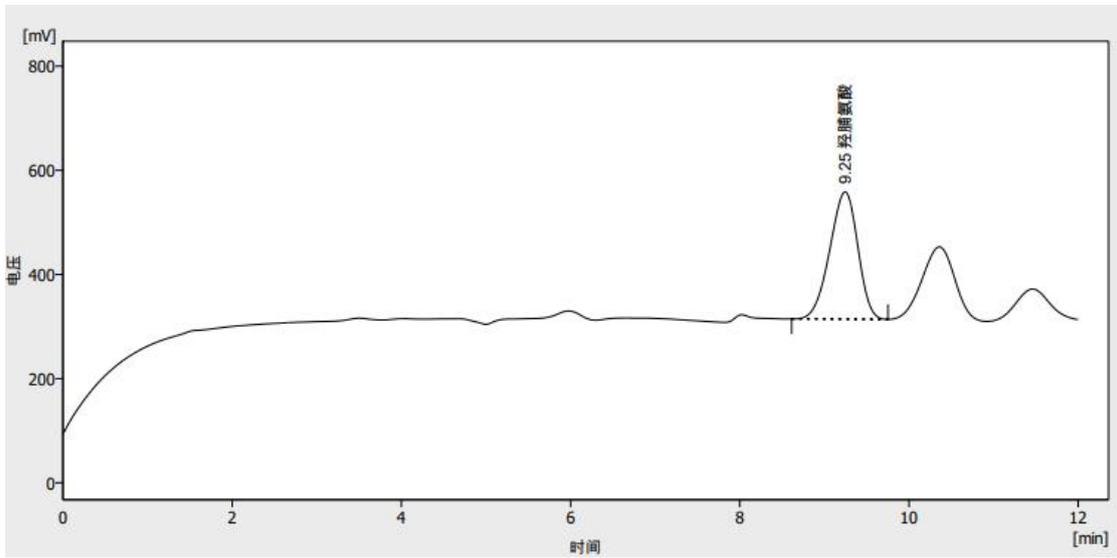
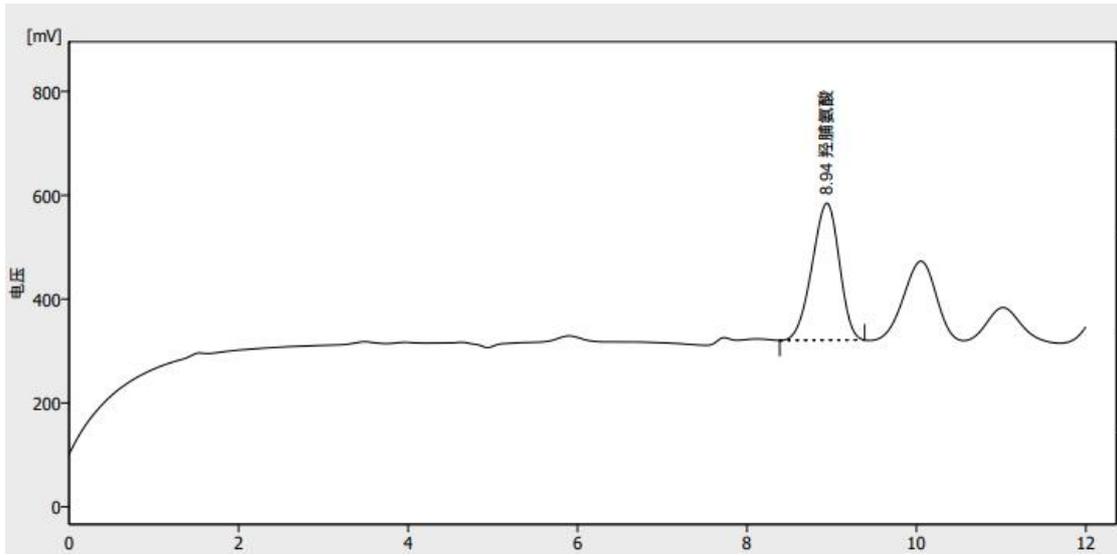


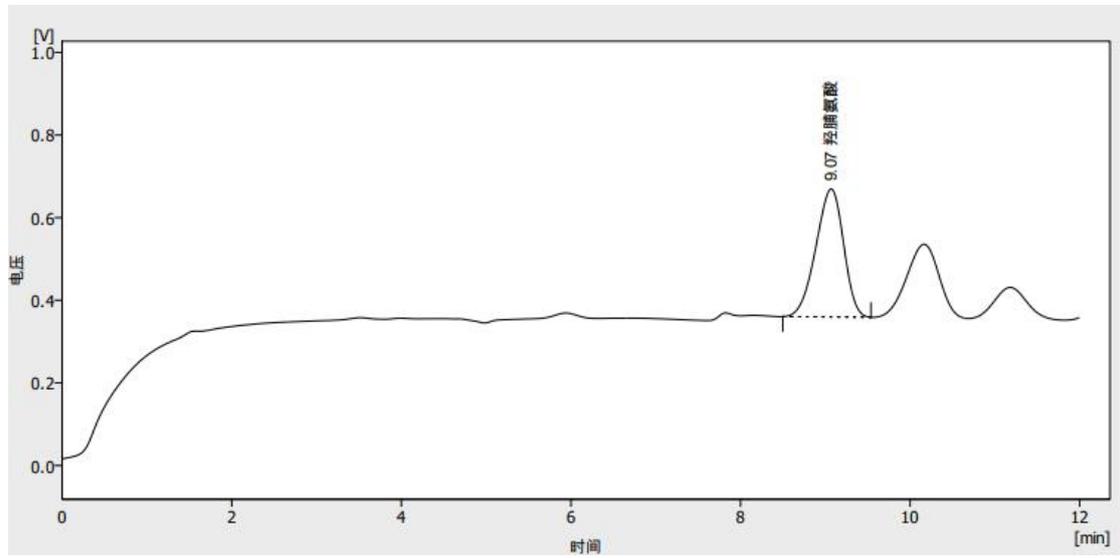
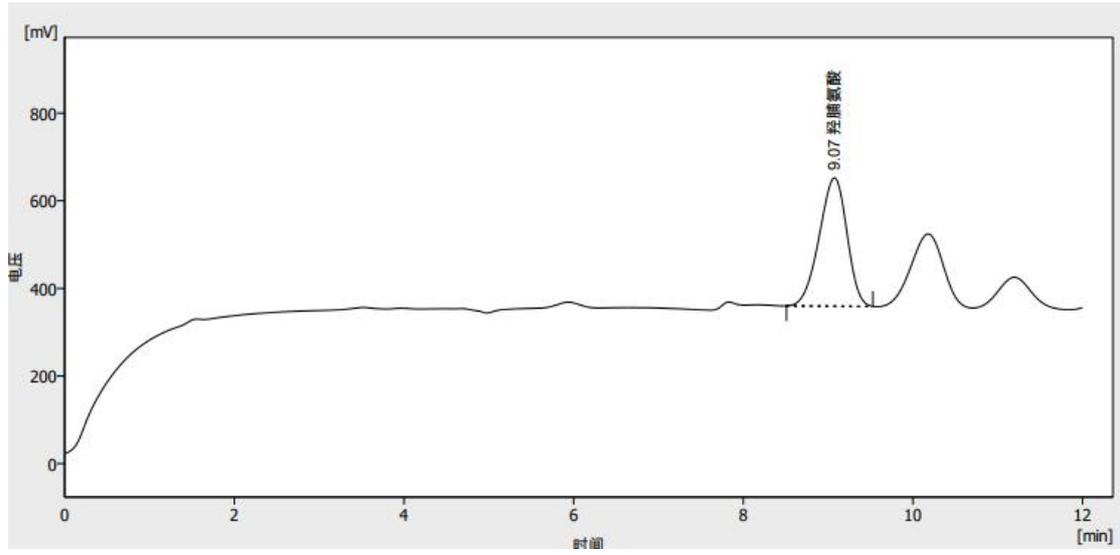
(四) 准确度

试样谱图

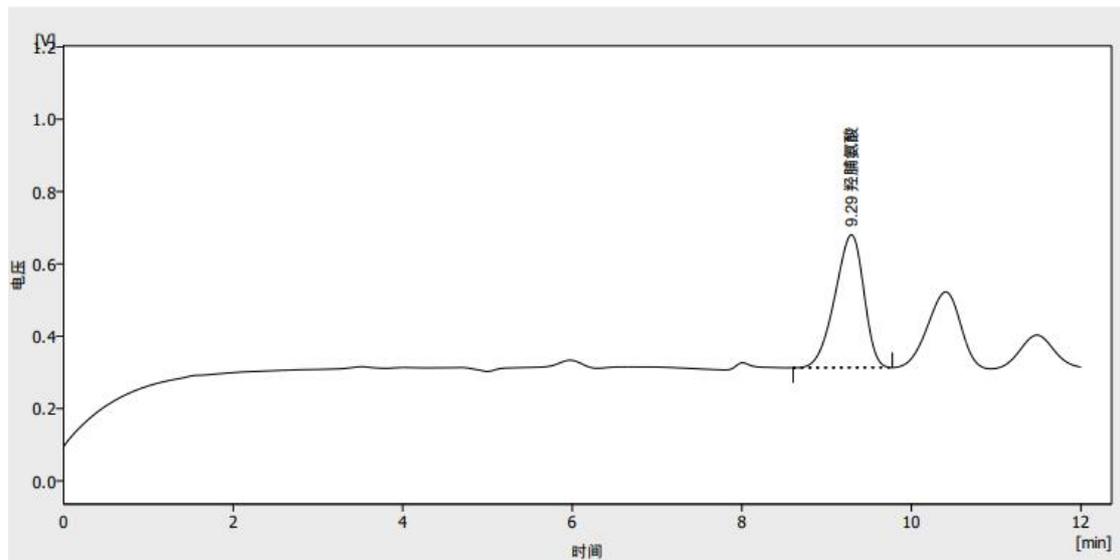
1. 低含量组

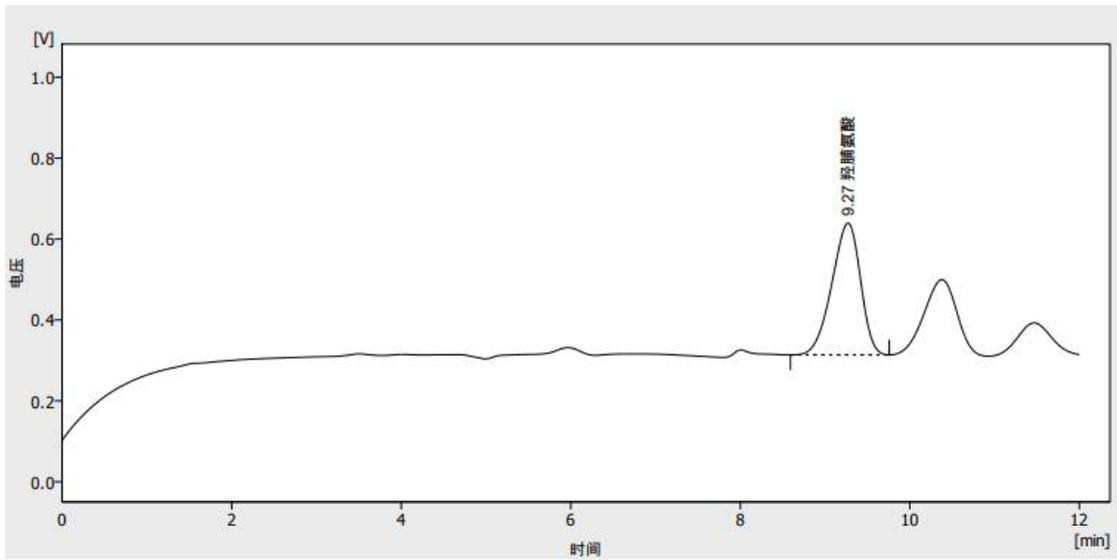
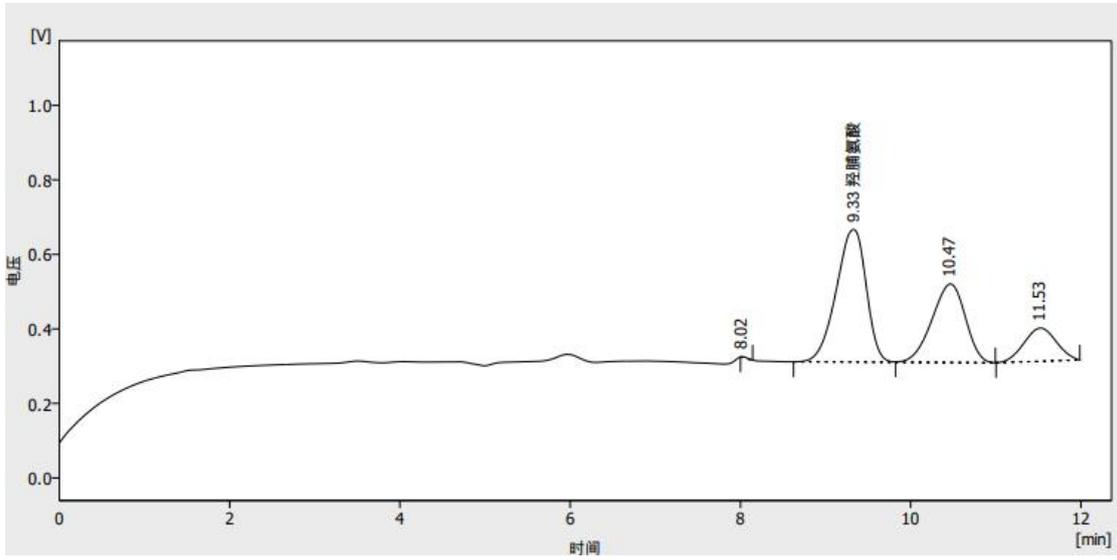
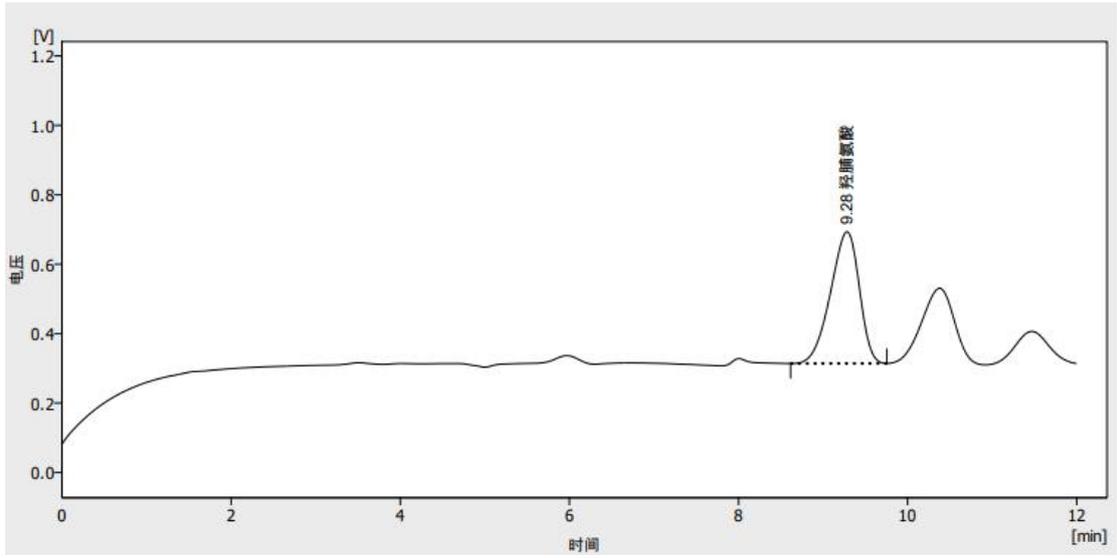


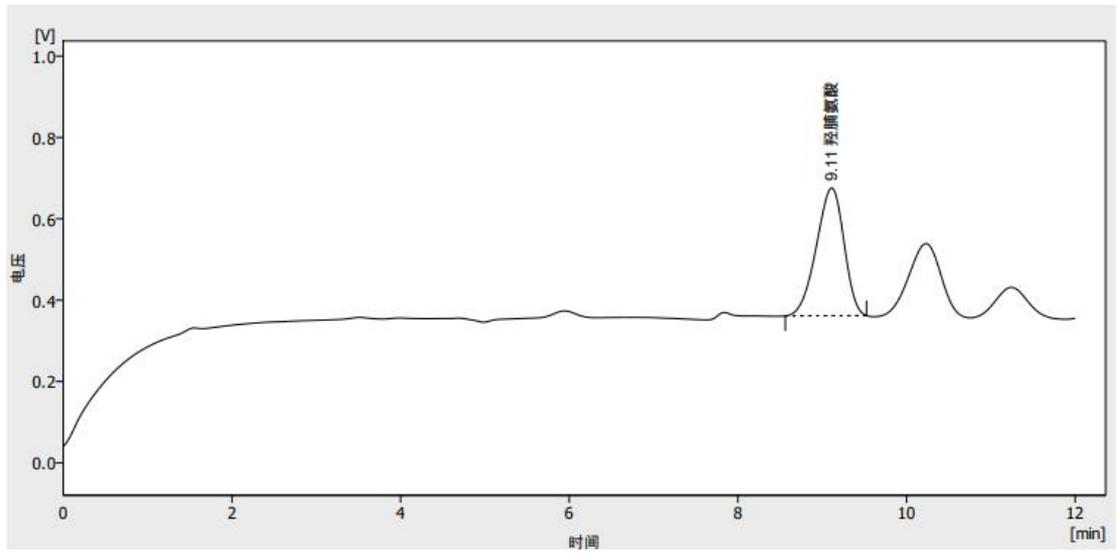
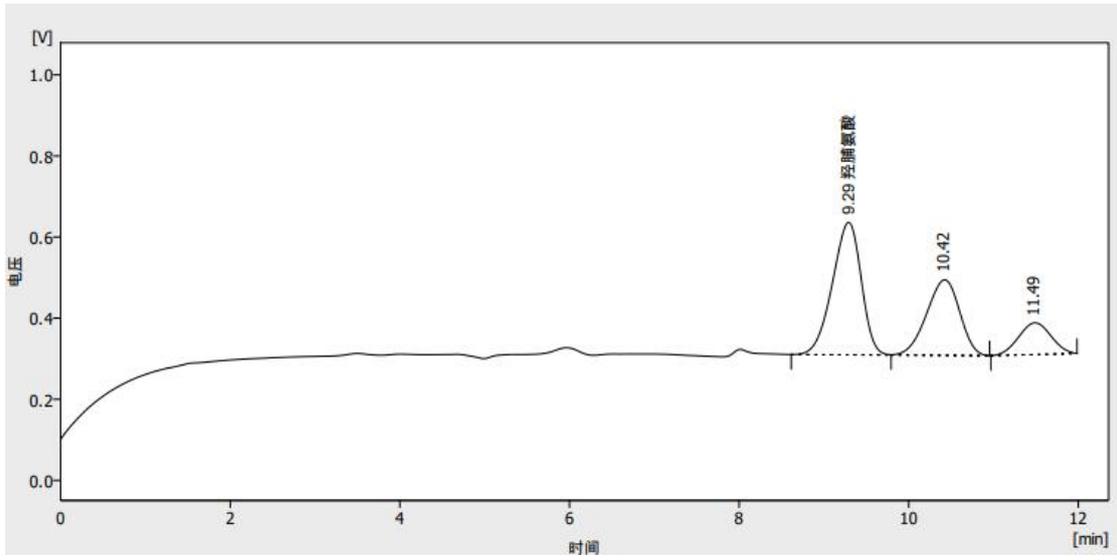




## 2、高含量组

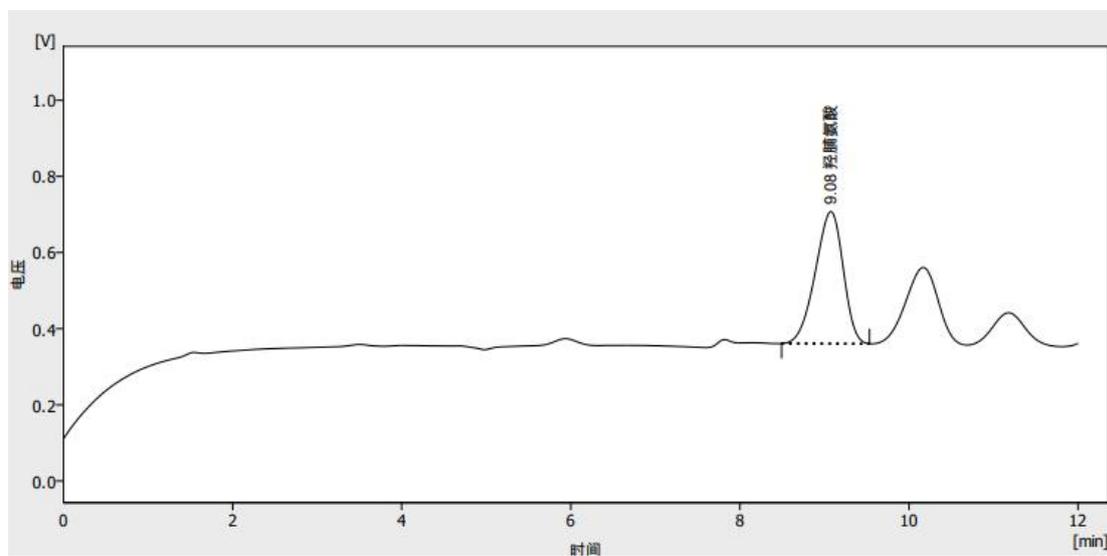




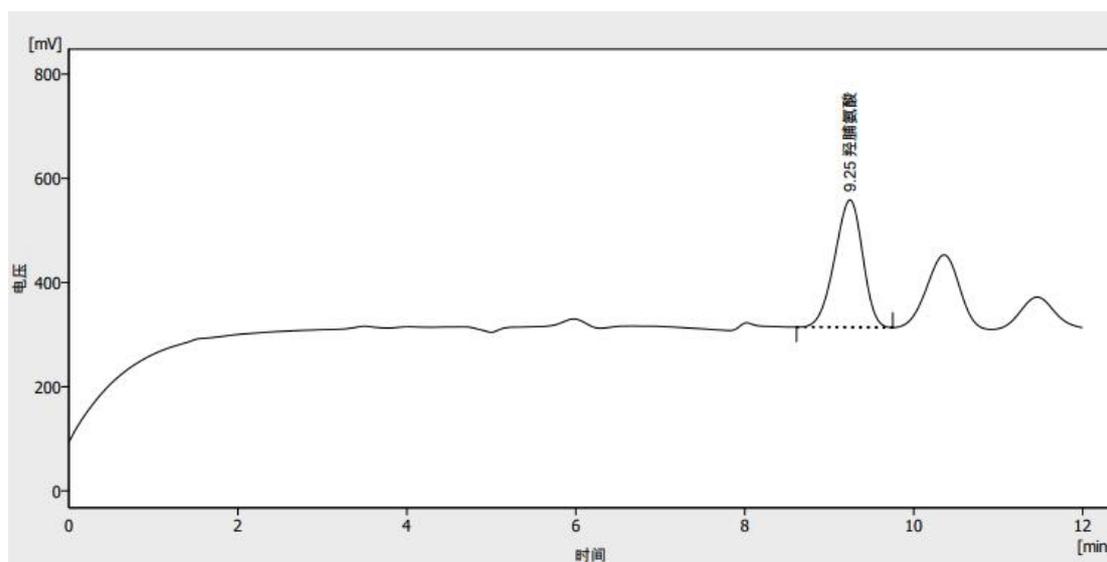


(五) 样品图谱

20240323F



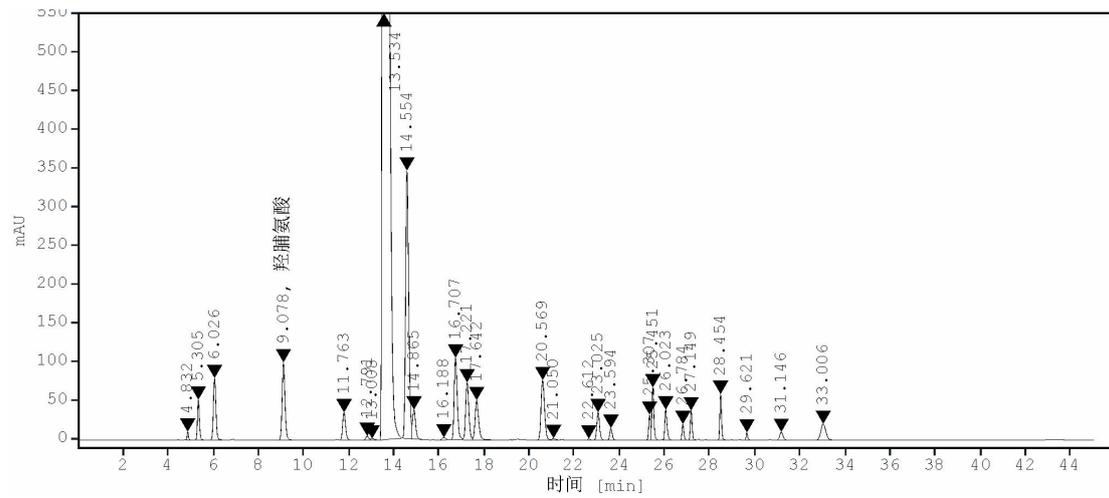
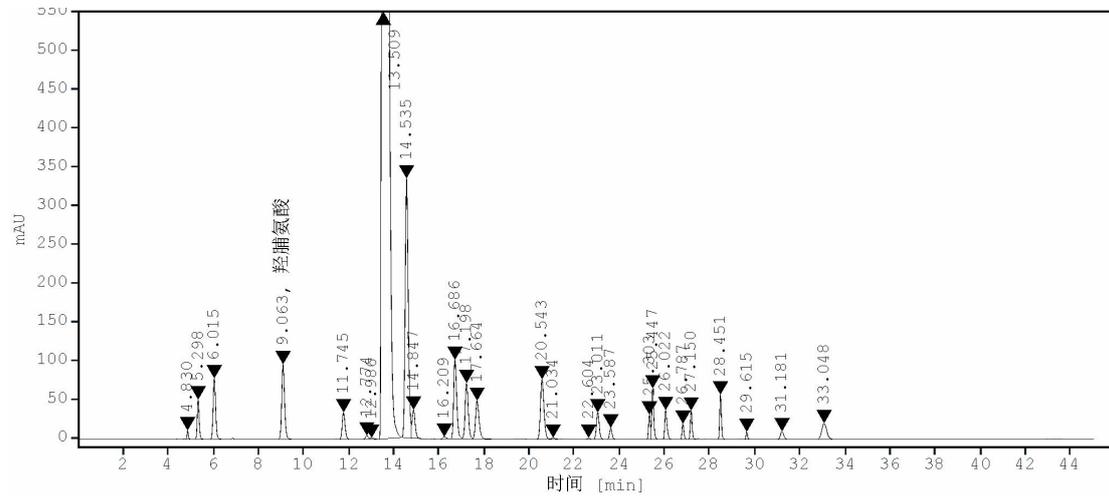
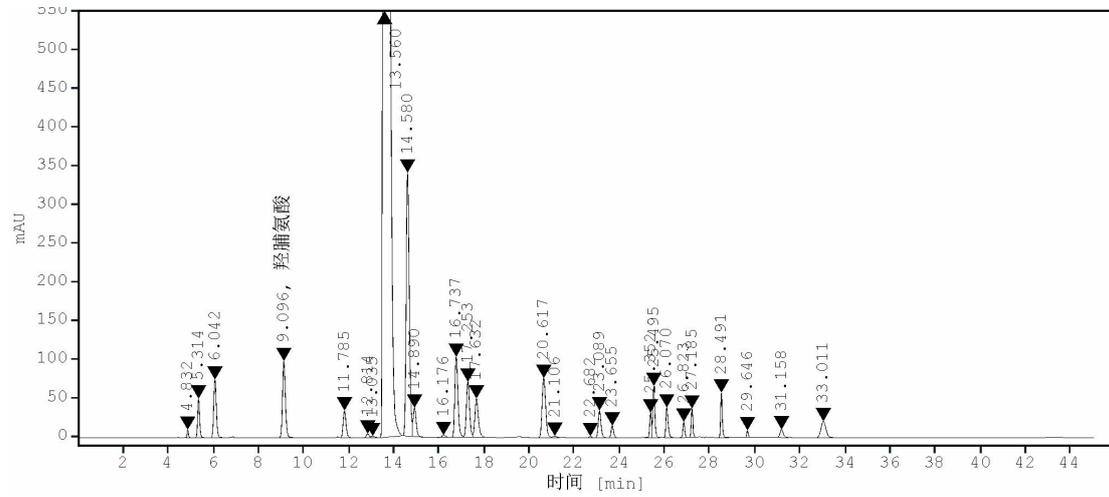
20240317F

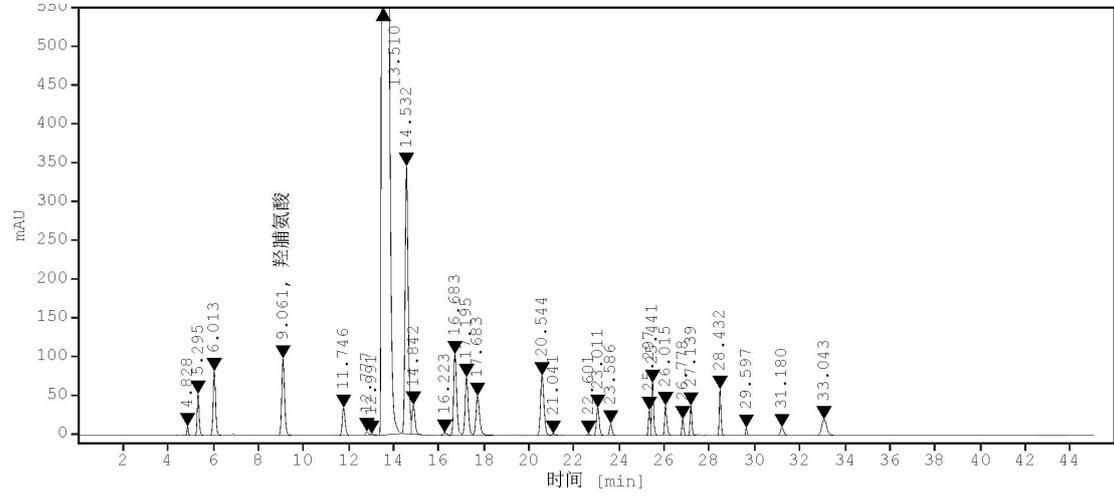
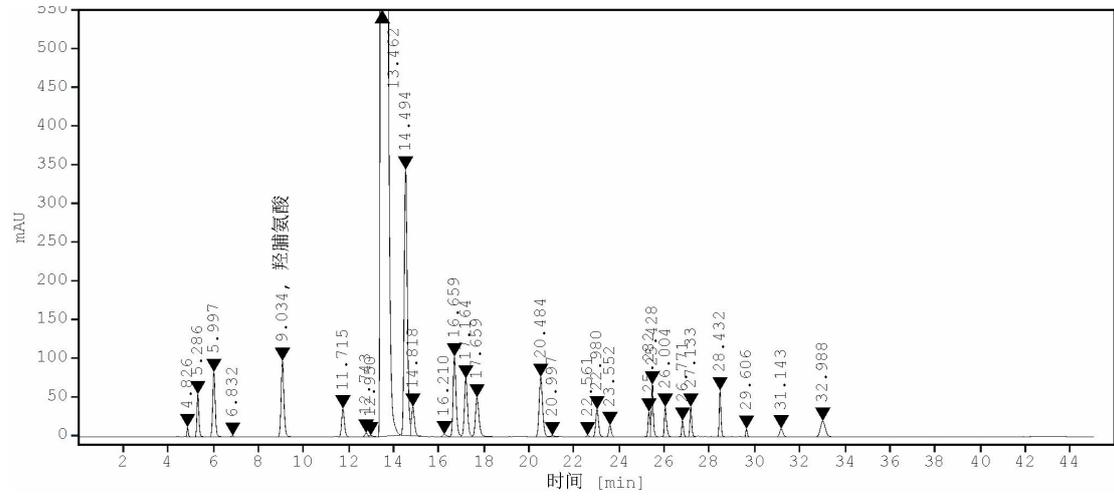
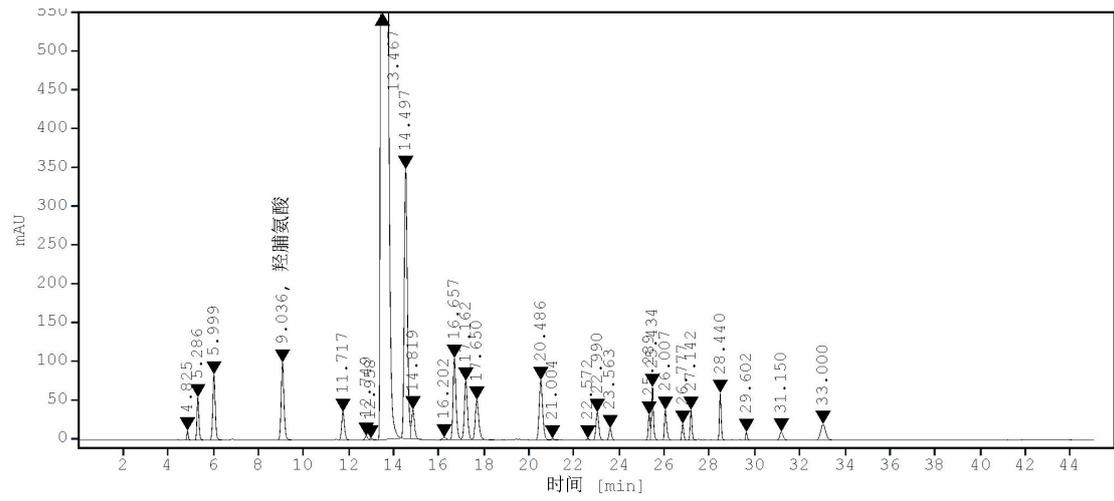


# 附件 3：两种方法比较图谱

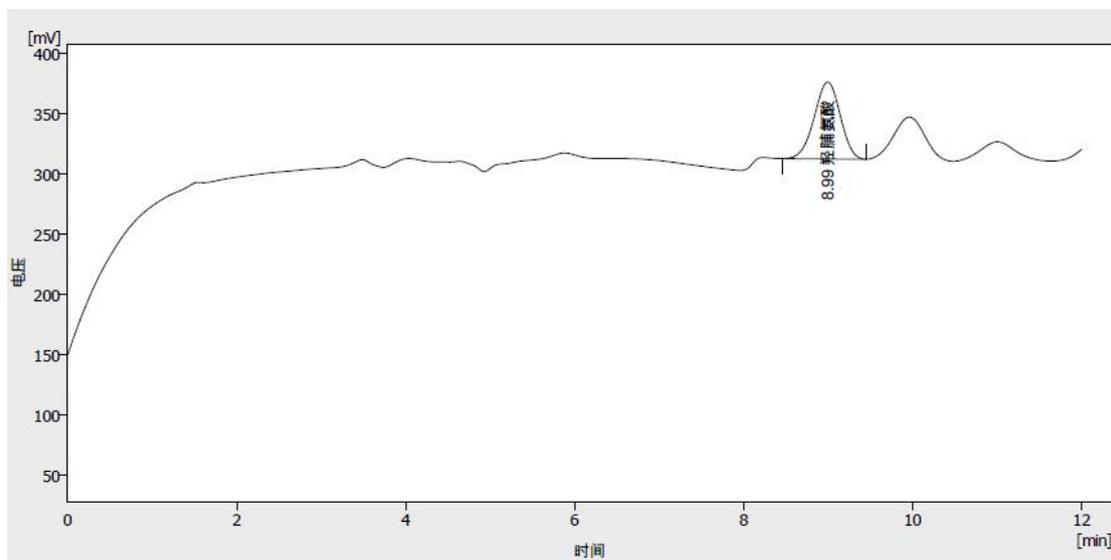
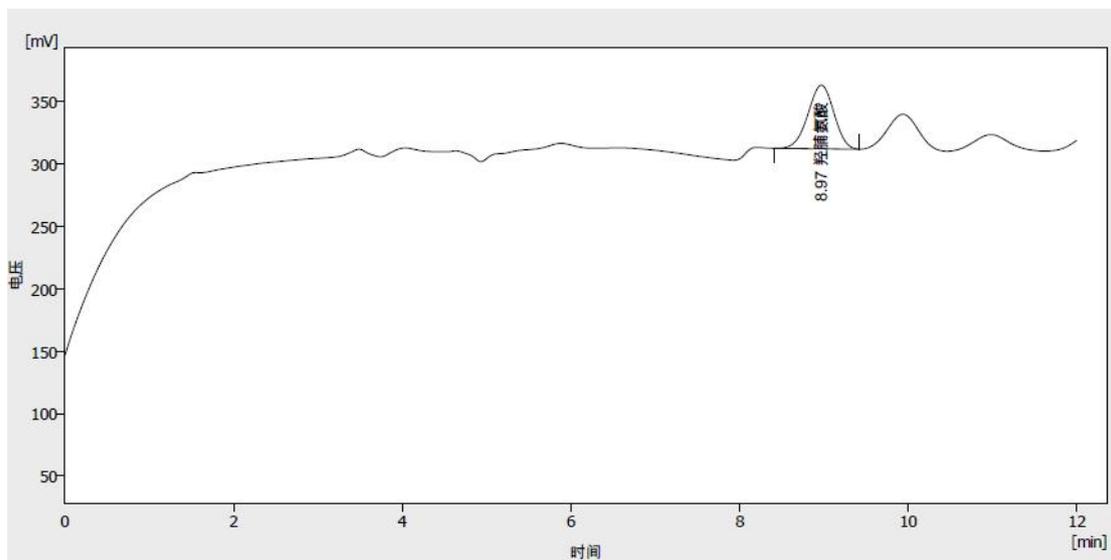
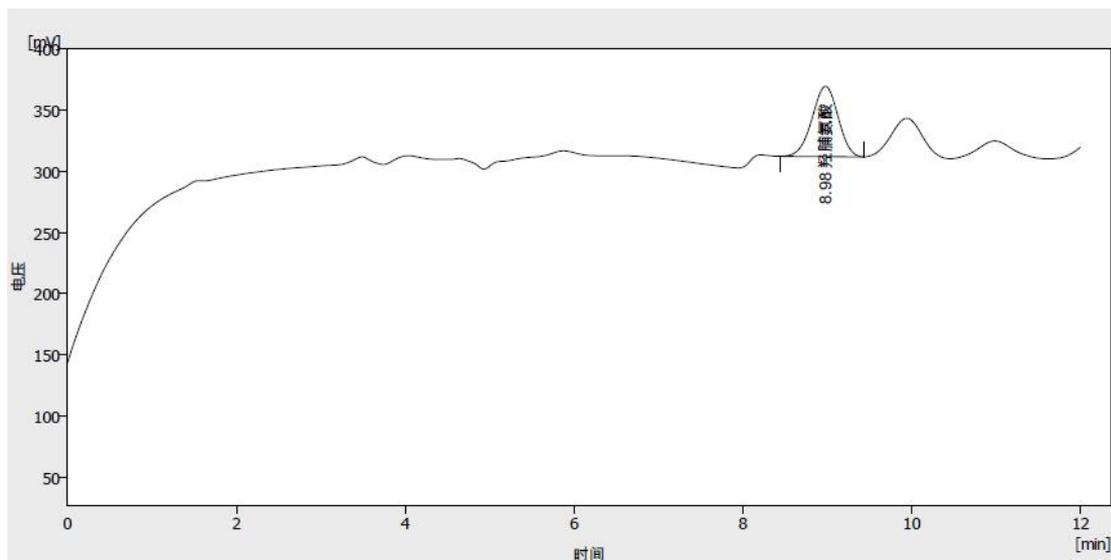
## (一) t 检验图谱

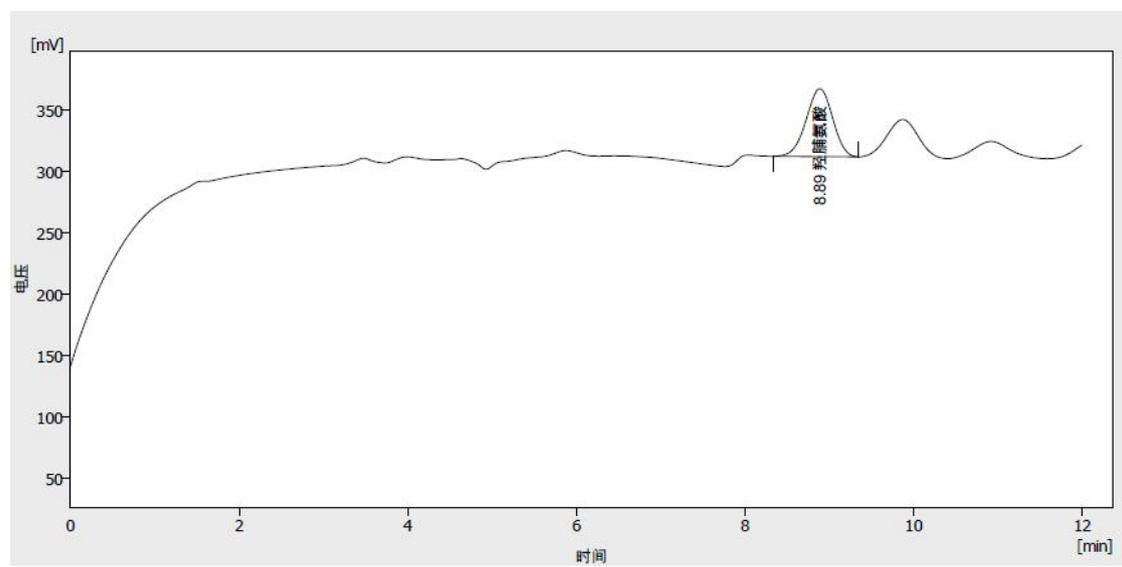
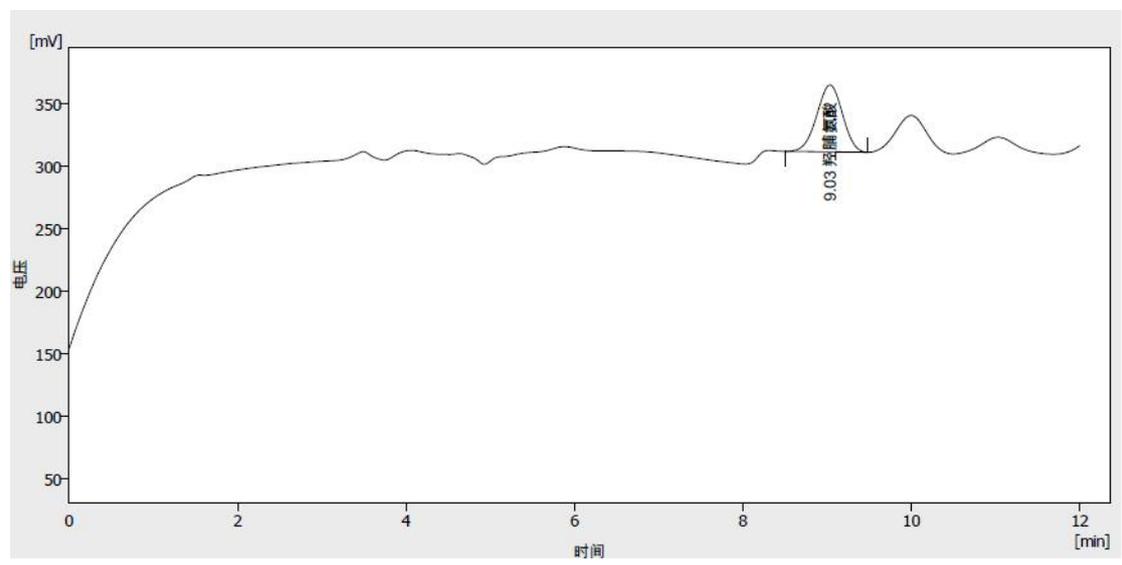
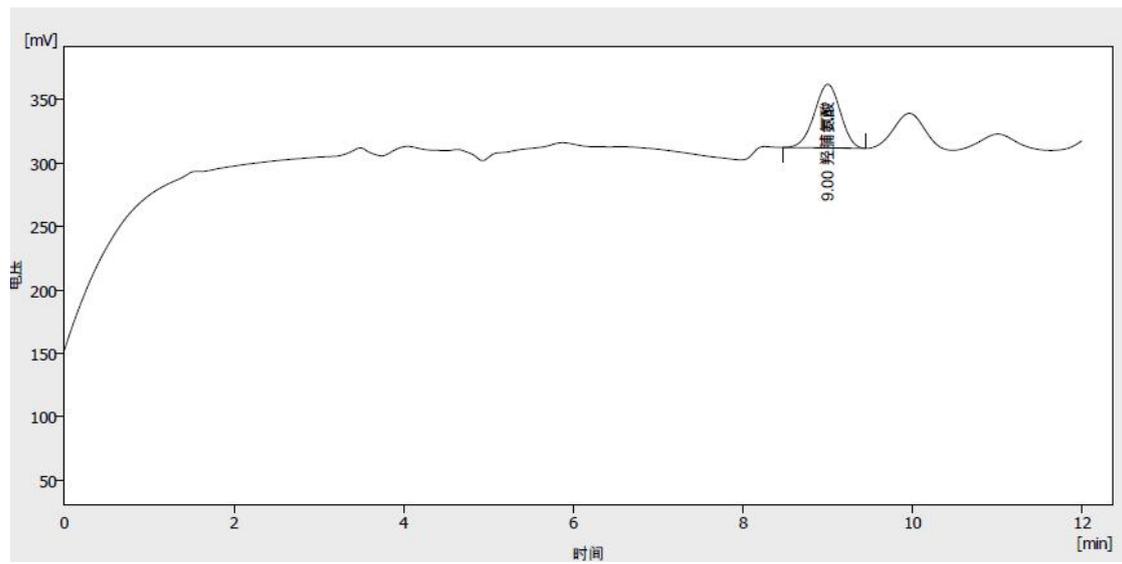
### 液相图谱



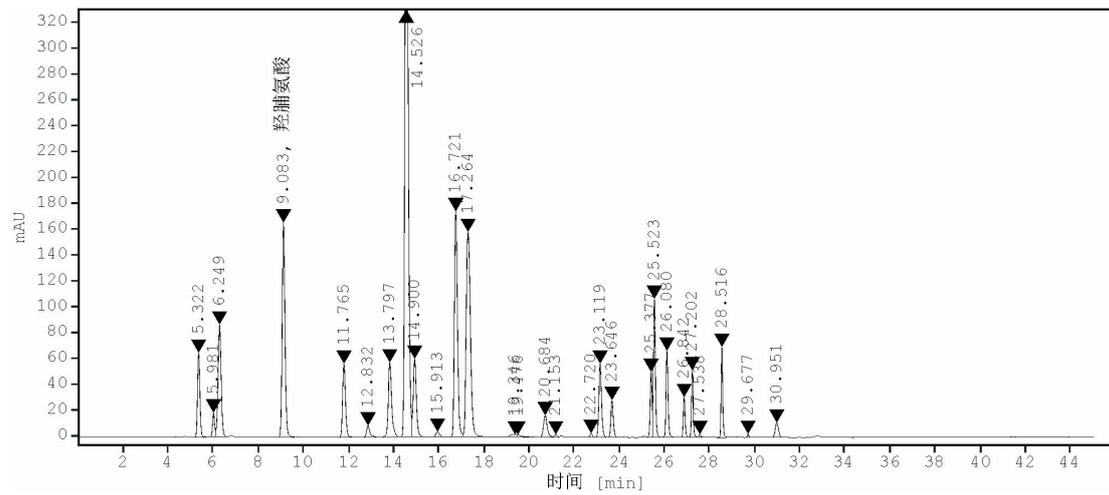
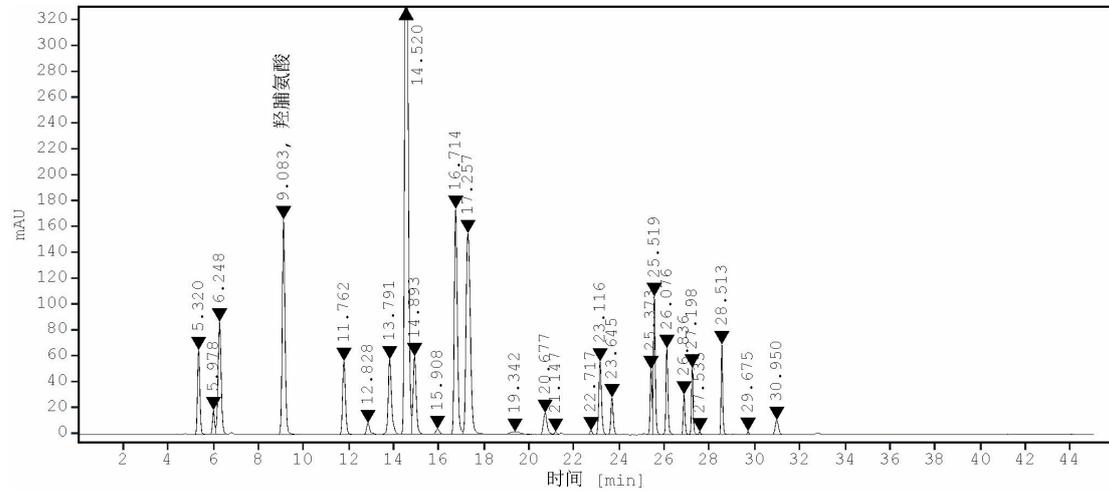
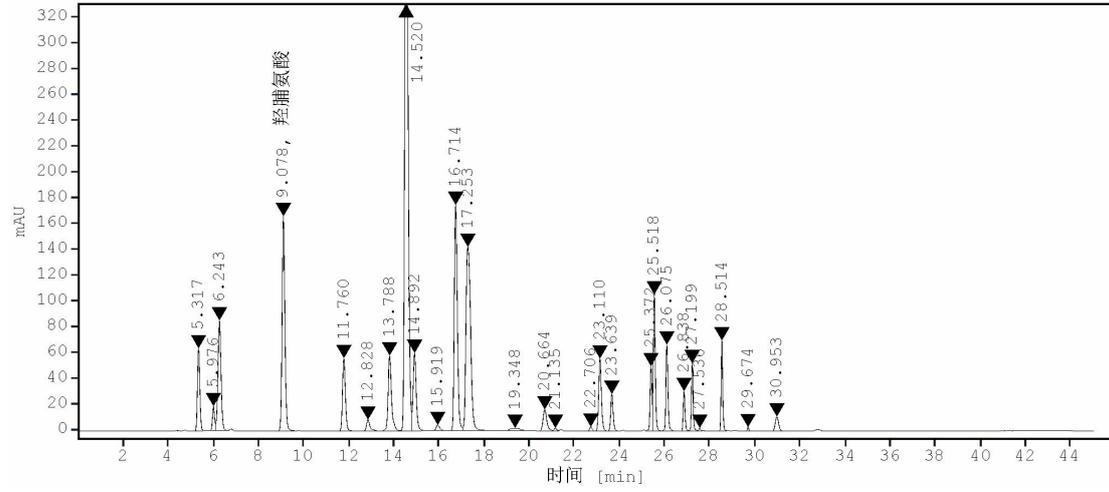


# 氨基酸分析仪图谱





(二) 标品检测图谱  
液相色谱仪图谱



# 氨基酸分析仪图谱

