



中华人民共和国医药行业标准

YY/T 1571—2017
代替 YY/T 0606.9—2007

组织工程医疗器械产品 透明质酸钠

Tissue engineering medical device products—Sodium hyaluronate

2017-05-02 发布

2018-04-01 实施

国家食品药品监督管理总局 发布

目 次

前言	III
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 分类	2
5 要求	2
6 试验方法	4
7 标志	6
8 包装、运输和贮存.....	7
附录 A (规范性附录) 透明质酸钠含量测定	8
附录 B (规范性附录) 蛋白质含量测定	10
附录 C (规范性附录) 乙醇残留量测定(顶空气相色谱法)	12
附录 D (资料性附录) 季铵盐(氯化十六烷基吡啶)残留量测定	14
附录 E (规范性附录) 重均分子量及分子量分布系数测定	16
参考文献	17

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准代替 YY/T 0606.9—2007《组织工程医疗产品 第 9 部分：透明质酸钠》。与 YY/T 0606.9—2007 相比，主要技术变化如下：

- 标准名称修改为《组织工程医疗器械产品 透明质酸钠》；
- 删除了 YY/T 16886 系列规范性引用文件(仅 YY/T 16886.1 保留)(见第 2 章，2007 年版的第 2 章)；
- 增加了规范性引用文件 YY/T 0771.1~0771.3 动物源医疗器械(见第 2 章)；
- 修改了规范性引用文件中《中华人民共和国药典》的版本年号(见第 2 章，2007 年版的第 2 章)；
- 修改了透明质酸钠的分子式(结构单元)(见 3.2, 2007 年版的 3.2)；
- 修改了透明质酸钠含量的要求及试验方法(见 5.3、6.3 及附录 A, 2007 年版的 5.3、6.3 及附录 A)；
- 修改了特性黏数的要求及试验方法的公式中分子量符号 M (见 5.5、6.5, 2007 年版的 5.5, 6.5)；
- 删除了动力粘度要求及试验方法(见 2007 年版 5.6、6.6)；
- 修改了蛋白质含量的试验方法(见 6.6 及附录 B, 2007 年版的 6.7 及附录 B)；
- 增加了核酸的要求及试验方法(见 5.7 及 6.7)；
- 修改了重金属含量的试验方法(见 6.8, 2007 年版的 6.8)；
- 修改了乙醇残留量的要求及试验方法(见 5.9、6.9 及附录 C, 2007 年版的 5.9、6.9 及附录 C)；
- 删除了灰分要求及试验方法(见 2007 年版 5.11、6.11)；
- 删除了紫外吸收的要求及试验方法(见 2007 年版的 5.12、6.12)；
- 修改了干物质含量要求及试验方法(见 5.10、6.10, 2007 年版的 5.10、6.10)；
- 增加了季铵盐残留的要求及试验方法(见 5.11、6.11 及附录 D)；
- 增加了硫酸化黏多糖的要求及试验方法(见 5.12 及 6.12)；
- 增加了铁含量的要求及试验方法(见 5.13 及 6.13)；
- 增加了氯化物的要求及试验方法(见 5.14 及 6.14)；
- 增加了重均分子量及分子量分布系数的要求及试验方法(见 5.15、6.15 及附录 E)；
- 增加了溶液的澄清度和颜色的要求及试验方法(见 5.16 及 6.16)；
- 增加了微生物限度要求及试验方法(见 5.18、6.18)；
- 修改了细菌内毒素限量要求及试验方法(见 5.19、6.19, 2007 年版的 5.14、6.14)；
- 修改了原材料安全性要求及试验方法(见 5.20、6.20、6.21, 2007 年版的 5.15、6.15)；
- 删除了生物学评价的具体要求及试验方法, 仅保留总则(见 5.21, 2007 年版的 5.16、6.16)；
- 删除了第 7 章检验规则(见 2007 年版的第 7 章)。
- 删除了附录 D 背景资料(见 2007 年版的附录 D)；
- 增加了参考文献《动物源性医疗器械产品注册申报资料指导原则》和欧洲药典(见参考文献)；
- 修改了参考文献 ASTM F2347-03 版本号(见参考文献, 2007 年版的参考文献)。

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。

本标准由国家食品药品监督管理总局提出。

YY/T 1571—2017

本标准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归口。

本标准起草单位：华熙福瑞达生物医药有限公司、中国食品药品检定研究院、上海其胜生物制剂有限公司。

本标准主要起草人：郭学平、穆淑娥、蒋丽霞、徐丽明、魏长征、王秀娟、邵安良。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

——YY/T 0606.9—2007。

组织工程医疗器械产品 透明质酸钠

1 范围

本标准规定了用于外科植入物和组织工程医疗器械产品透明质酸钠的要求、试验方法等。
本标准适用于制备组织工程医疗器械产品及其支架材料的透明质酸钠。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是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 191 包装储运图示标志

GB/T 14518 胶粘剂的 pH 值测定

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 16886.1—2011,ISO 10993-1:2009, IDT)

GB 18278(所有部分) 医疗保健产品灭菌 湿热

GB 18279(所有部分) 医疗保健产品灭菌 环氧乙烷

GB 18280(所有部分) 医疗保健产品灭菌 辐射

YY/T 0313 医用高分子产品 包装和制造商提供信息的要求

YY/T 0606.25 组织工程医疗产品 第 25 部分:动物源性生物材料 DNA 残留量测定法:荧光染色法

YY/T 0771.1 动物源医疗器械 第 1 部分:风险管理应用(YY/T 0771.1—2009,ISO 22442-1:2007, IDT)

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 0771.2—2009,ISO 22442-2:2007, IDT)

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 0771.3—2009,ISO 22442-3:2007, IDT)

《中华人民共和国药典》(2015 年版,四部)

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

透明质酸 **hyaluronic acid**

由 D-葡萄糖醛酸和 N-乙酰基-D-葡萄糖胺通过 β -(1-3)糖苷键连接而成的双糖重复结构单元组成的线性多糖。每个双糖单元通过 β -(1-4)糖苷键与另一个连接起来。

3.2

透明质酸钠 **sodium hyaluronate**

透明质酸的钠盐形式,其结构单元相对分子质量为 401.3,分子结构式如图 1 所示。

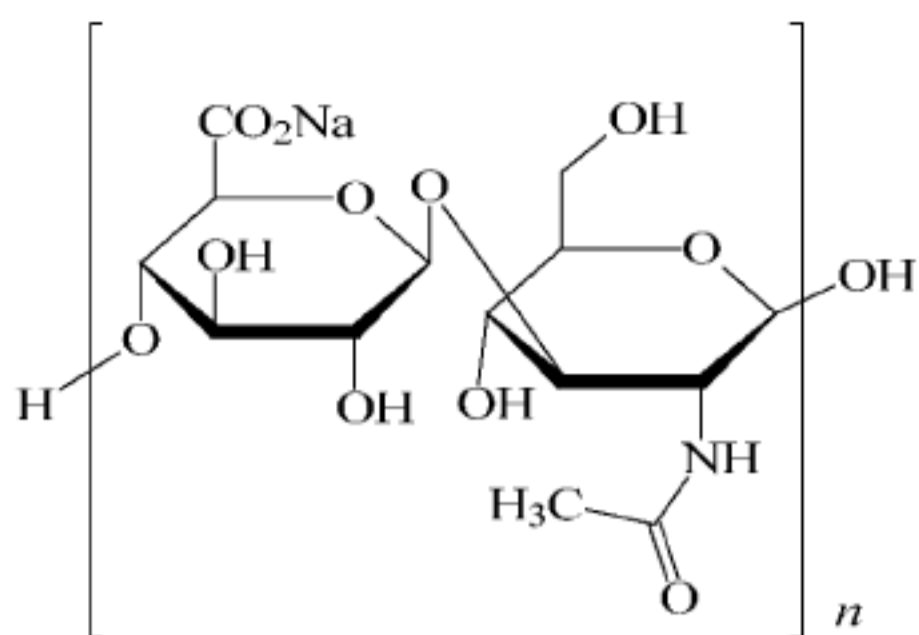


图 1 透明质酸钠的分子式(结构单元)

4 分类

透明质酸钠的制备工艺按照原料来源和制备方法不同,可分为组织提取法和细菌发酵法。

5 要求

5.1 外观

白色或类白色粉末状或颗粒状或纤维状固体,无任何肉眼可见异物。

5.2 鉴别

透明质酸钠典型的傅立叶变换红外光谱(FT-IR)频率(cm^{-1})有 3 275~3 390(b)、1 615(s)、1 405(m)、1 377(m)、1 150、1 077、1 045(s)、946(m)、893(w)。指纹区实测谱带的波数误差应小于规定值 $\pm 5 \text{ cm}^{-1}$ (0.5%)。

注: s, 强的; m, 中等的; w, 弱的; b, 宽的。

5.3 透明质酸钠含量

以干燥品计,含透明质酸钠应为 95.0%~105.0% (质量分数)。

5.4 pH

0.5%浓度溶液的 pH 应为 5.0~8.5。

5.5 特性黏数

应为其标示值的 90%~120%。

5.6 蛋白质含量

不得超过 0.1% (质量分数)。

5.7 核酸含量

5.7.1 细菌发酵法

0.33%浓度的溶液,在 260 nm 波长处的吸光度值(OD 值)不得超过 0.5。

5.7.2 组织提取法

按照 YY/T 0606.25, 根据可能的预期用途给出残留 DNA 的限值。

5.8 重金属含量

不得超过 $10 \mu\text{g/g}$ (质量分数)。

5.9 乙醇残留量

不得超过 $4\ 000 \mu\text{g/g}$ (质量分数)。

5.10 干燥失重

不得超过 15.0% (质量分数)。

5.11 季铵盐残留

不得超过 $100 \mu\text{g/g}$ (质量分数)。

注: 限于组织提取法。

5.12 硫酸化黏多糖

不得超过 1%。

注: 限于组织提取法。

5.13 铁含量

不得超过 $80 \mu\text{g/g}$ 。

5.14 氯含量

不得超过 0.5%。

5.15 重均分子量及分子量分布系数

透明质酸钠重均分子量应在生产商标示范围值范围内, 分布系数 $\overline{M}_w/\overline{M}_n$ 应为 1.0~3.0。

5.16 溶液的澄清度与颜色

0.33% 浓度的溶液应澄清, 在 600 nm 的波长处测定吸光度 (OD 值), 不得过 0.01。

5.17 无菌试验

如果透明质酸钠以无菌的方式提供, 应无菌。

应按照 GB 18278、GB 18279、GB 18280 进行无菌工艺确认或进行该项目检测。

5.18 微生物检查

每 1 g 供试品中细菌菌落数不得超过 10^2 CFU, 霉菌和酵母菌菌落数不得超过 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。

注: 如果透明质酸钠以非无菌的方式提供, 则进行该项目检测; 若最终产品为无菌要求, 则宜采用灭菌处理以达到无菌要求。

5.19 细菌内毒素

每 1 mg 透明质酸钠含内毒素的量应小于 0.05 EU。

5.20 原材料安全性

5.20.1 细菌发酵法制备的透明质酸钠应进行溶血性链球菌溶血素试验,结果应无溶血环。

5.20.2 组织提取法制备的透明质酸钠应按照动物源医疗器械系列行业标准(YY/T 0771.1、YY/T 0771.2、YY/T 0771.3)的要求进行安全性评价和质量控制。

5.21 生物学评价

应按照 GB/T 16886.1 的要求对透明质酸钠进行生物学评价,透明质酸钠应不释放对人体有不良作用的物质。

6 试验方法

6.1 外观

肉眼直接观测,应符合 5.1 规定。

6.2 傅立叶变换红外光谱(FT-IR)

样品制备采用溴化钾压片法,按照《中华人民共和国药典》(2015 年版,四部)通则 0402 规定的方法测定,应符合 5.2 规定。

6.3 透明质酸钠含量测定

按照附录 A 规定的方法测定,应符合 5.3 规定。

6.4 pH 测定

将透明质酸钠(以干燥品计)用蒸馏水配制成 5 mg/mL 浓度溶液,按照 GB/T 14518 规定的方法测定,应符合 5.4 规定。

6.5 特性黏数测定

透明质酸钠的溶液浓度以流出时间为准,应控制在 120 s~180 s 范围内,以 0.2 mol/L 氯化钠为溶剂,按照《中华人民共和国药典》(2015 年版,四部)通则 0633 第二法测定。应符合 5.5 规定。

特性黏数用以表征透明质酸钠的相对分子质量,两者的关系见下式。

$$[\eta] = 0.036M_r^{0.78}$$

式中:

η ——特性黏数,单位为毫升每克(mL/g);

M_r ——相对分子质量。

6.6 蛋白质含量测定

按照附录 B 规定的方法测定,应符合 5.6 规定。

6.7 核酸测定

取本品(相当于干燥品 0.10 g)加入 0.9%的氯化钠溶液 30 mL,振荡使其混匀并溶解后作为供试品

溶液,按照《中华人民共和国药典》(2015年版,四部)通则 0401 规定的方法,将透明质酸钠用生理盐水配制成 3.3 mg/mL 的溶液测定,应符合 5.7 规定。

6.8 重金属含量测定

取本品 1.0 g,按照《中华人民共和国药典》(2015年版,四部)通则 0821 第二法规定的方法测定,应符合 5.8 规定。

6.9 乙醇残留量测定

按照附录 C 规定的方法测定,应符合 5.9 规定。

6.10 干燥失重测定

按照《中华人民共和国药典》(2015年版,四部)通则 0831 规定的方法,取本品 0.5 g,以五氧化二磷为干燥剂,在 105 °C 干燥 6 h 测定,应符合 5.10 规定。

6.11 季铵盐残留测定

参见附录 D 规定的方法测定,应符合 5.11 规定。

6.12 硫酸化黏多糖测定

供试液:取本品约 50.0 mg(按干燥品计),置具塞试管(长 15 cm,内径 1.6 cm)中加 1.0 mL 高氯酸,使其溶解,作为供试液。

对照溶液:称取无水硫酸钠 0.149 g,加水稀释至 100 mL,使其溶解。再取上述溶液 10.0 mL,加水稀释至 100 mL,即得;取 1.0 mL 溶液置具塞试管中,90 °C~95 °C 加热蒸干,再加 1.0 mL 高氯酸,作为对照溶液。

供试液和对照溶液均用玻璃棉塞试管,在 180 °C 加热至澄清(约 12 h)后冷却至室温。分别加入 33.3 g/L 的氯化钡溶液 3.0 mL,密塞后振摇,放置 30 min;振摇后按照《中华人民共和国药典》(2015年版,四部)通则 0401 规定的方法,以水为空白,在 660 nm 波长处测定供试液和对照溶液的吸光度,供试液的吸光度小于对照溶液的吸光度,即符合 5.12 规定。

6.13 铁含量测定

取本品 0.25 g(按干燥品计),加硝酸 1.0 mL,水浴加热使其溶解,平行制备 5 份,冷却后,其中 1 份加水稀释至 10 mL,作为供试液,另 4 份分别加入 0.5 mL、1.0 mL、1.5 mL 和 2.0 mL 铁标准溶液(每 1.0 mL 相当于 10 μg/mL 的铁)后加水稀释至 10 mL,作为对照溶液,按照《中华人民共和国药典》(2015年版,四部)通则 0406 第二法规定的方法,在 248.3 nm 波长处测定,应符合 5.13 规定。

6.14 氯含量测定

取本品 67 mg,置 100 mL 量瓶中,加水溶解并稀释至刻度。取 15 mL 置 25 mL 纳氏比色管中,作为供试品溶液;另取标准氯化钠溶液(1.0 mL 相当于 5 μg 的 Cl)10 mL 与水 5 mL 为对照液。供试品溶液和对照液分别加入 1.0 mL 稀硝酸(取硝酸 20 g,加水稀释至 100 mL)及 1.0 mL 硝酸银试液,混匀;在暗处放置 5 min,在黑色背景中从侧面观察。应符合 5.14 规定。

6.15 分子量及分子量分布测定

按照附录 E 规定的方法测定,应符合 5.15 规定。

6.16 溶液的澄清度与颜色测定

取本品 0.10 g(按干燥品计),加入 0.9%的氯化钠溶液 30 mL,振摇使其混匀并溶解,应符合 5.16 规定。

6.17 无菌试验

按照《中华人民共和国药典》(2015 年版,四部)通则 1101 规定的方法测定,应符合 5.17 规定。

注:如果透明质酸钠以无菌的方式提供,则进行该项目的检测,否则进行 6.18 的检测。

6.18 微生物限度

取本品 5.0 g,加入含玻璃酸酶 45 000 单位的无菌磷酸盐缓冲液(pH 7.2) 100 mL,42 °C 水浴振荡溶解 1 h,得到 1:20 的供试品溶液。按照《中华人民共和国药典》(2015 年版,四部)通则 1105、1106 规定的方法测定,应符合 5.18 规定。

6.19 细菌内毒素试验

用细菌内毒素检测用水配制成 2 mg/mL 透明质酸钠,按照《中华人民共和国药典》(2015 年版,四部)通则 1143 规定的方法测定,应符合 5.19 规定。

6.20 溶血性链球菌溶血素试验

用生理盐水配制成 2 mg/mL 透明质酸钠,取 1 mL 直接接种于血液琼脂平板培养基上,在 37 °C 培养 24 h,应符合 5.20.1 规定。

注:本条款适用于细菌发酵法透明质酸钠。

6.21 原材料病毒去除/灭活工艺验证

针对组织提取法生产透明质酸钠的原材料,应按照 YY/T 0771.3 和国家《动物源性医疗器械产品注册申报资料指导原则》的要求进行病毒去除/灭活工艺验证,并应符合相关要求。

7 标志

7.1 大包装应有下列标志:

- a) 生产厂名和地址;
- b) 产品名称;
- c) 执行标准编号;
- d) 规格和数量;
- e) 生产批号或日期;
- f) 失效日期;
- g) 贮存条件。

7.2 小包装应有下列标志:

- a) 产品名称;
- b) 生产厂名和地址;
- c) 规格和数量;
- d) 生产批号或日期;
- e) 原料来源;

f) 失效日期；

g) 贮存条件。

7.3 储运标志应符合 GB/T 191 中的规定。

注：可参考 YY 0466.1 中所给出的图形符号满足上述要求。

8 包装、运输和贮存

8.1 包装应采用适宜的包装,确保透明质酸钠产品的安全性和有效性。

8.2 产品的包装、贮存、运输应符合 YY/T 0313 的规定。

附 录 A
(规范性附录)
透明质酸钠含量测定

A.1 原理

透明质酸钠水解后生成的葡萄糖醛酸与吡啶试剂作用产生紫红色,生成的颜色深浅与葡萄糖醛酸含量成正比。因此,以测定的葡萄糖醛酸含量代表透明质酸钠的含量。

A.2 设备

A.2.1 分析天平。

A.2.2 紫外分光光度计或相当设备。

A.2.3 旋涡式混合器或相当设备。

A.3 溶液制备

A.3.1 吡啶试液

称取 0.125 g 吡啶,加无水乙醇 100 mL 溶解。置暗处保存。

A.3.2 葡萄糖醛酸(GA)标准溶液

精密称取经 105 °C 以五氧化二磷为干燥剂,真空干燥至恒重的葡萄糖醛酸对照品约 0.1 g,置 100 mL 量瓶中,加水溶解稀释至刻度,摇匀,作为贮备液。精密量取贮备液 5.0 mL,置 100 mL 量瓶中,加水制成每 1.0 mL 中含 50 μg 的溶液,摇匀,4 °C 下贮存。

A.3.3 0.025 mol/L 的四硼酸钠硫酸溶液

称取四硼酸钠($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$)9.54 g,加入 1 L 浓硫酸中,加盖。不定时地振摇,直至四硼酸钠完全溶解。室温下贮存。

注: 试验所用试剂均为分析纯,硫酸宜为优级纯。

A.4 样品准备

精密称取透明质酸钠约 100 mg,置已称量的 100 mL 量瓶中,加水溶解,并稀释至刻度,摇匀;称量,计算溶液的重量。称取溶液约 4.0 g,置 50 mL 量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,即得。

A.5 步骤

A.5.1 按表 A.1 制备葡萄糖醛酸标准液系列。

A.5.2 将标准液系列各试管和样品试管一起置于冰水浴中,缓慢地向每管中加入 0.025 mol/L 四硼酸钠硫酸 5.0 mL, 密塞,混匀。沸水浴中加热 10 min,冰水浴中冷却至室温。精密加入吡啶试液 0.2 mL,

摇匀,沸水浴中加热 15 min,冰水浴中冷却至室温。用 0 号管作对照,用分光光度计测定 530 nm 处各标准管和样品管的吸光度。

表 A.1 葡萄糖醛酸(GA)标准液系列浓度

试管号	0	1	2	3	4	5
GA 标准溶液/mL	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
水/mL	1.0	0.8	0.6	0.4	0.2	0
GA 含量/($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0	10	20	30	40	50

A.5.3 用标准管绘制吸光度—浓度曲线,根据样品管的吸光度从标准曲线上查得样品管葡萄糖醛酸浓度($c_i, \mu\text{g}/\text{mL}$)。

A.6 结果计算

按式(A.1)计算。

$$M_h = \frac{c_i \times 50 \times m_2 \times 401.3 \times 100}{m_1 \times (100 - h) \times m_3 \times 10^6 \times 194.1} \times 100\% \quad \dots\dots\dots(\text{A.1})$$

式中:

- M_h ——透明质酸钠含量, %;
- c_i ——样品管中葡萄糖醛酸的浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g}/\text{mL}$);
- m_2 ——第一次稀释后样品溶液的量,单位为克(g);
- 401.3——玻璃酸钠双糖片断的相对分子质量;
- m_1 ——透明质酸钠的称样量,单位为克(g);
- h ——透明质酸钠的干燥失重百分数;
- m_3 ——第二次稀释称取溶液的量,单位为克(g);
- 194.1——葡萄糖醛酸的相对分子质量。

附 录 B
(规范性附录)
蛋白质含量测定

B.1 原理

福林酚试液能够与透明质酸溶液中的蛋白质发生有色反应,且其颜色深浅与蛋白质的浓度成正比。

B.2 设备

分析天平、紫外分光光度计或相当设备、旋涡式混合器或相当设备。

B.3 溶液制备

B.3.1 碱性酒石酸铜试液

称取硫酸铜 0.5 g、酒石酸钠 1.0 g 置于 50 mL 容量瓶内,加水溶解并定容至刻度作为 A 液;称取无水碳酸钠 2.0 g 置于 50 mL 容量瓶内,加氢氧化钠 0.4 g,加水溶解并定容至刻度作为 B 液。取 A 液与 B 液以 1 : 50 混合,摇匀。以上试液需现用现配。

B.3.2 福林试液(按如下方法制备或购买)

称取钨酸钠 100 g 与钼酸钠 25 g,加水 700 mL、85%磷酸 50 mL 与盐酸 100 mL,置烧瓶中,缓缓加热回流 10 h,放冷,再加硫酸锂 150 g、水 50 mL 与溴液数滴煮沸约 15 min,至溴除尽,放冷至室温,加水使成 1 000 mL。滤过,滤液作为贮备液,置棕色瓶中,于冰箱中 2 ℃~8 ℃保存。临用前,取贮备液,与水按 1 : 1 稀释,混匀。

B.3.3 标准溶液的制备

精密称取牛血清白蛋白对照品适量,加水制成每 1.0 mL 中约含 50 μg 的溶液,摇匀。

B.4 样品准备

精密称取透明质酸钠约 25 mg(*m*),置 15 mL 具塞试管中,加水 2.5 mL 使样品溶胀,至完全溶解,加塞密封。24 h 之内测定。

B.5 试验步骤

B.5.1 按表 B.1 制备牛血清白蛋白标准液系列。

B.5.2 将标准液系列各试管和样品试管中分别加入碱性酒石酸铜试液 2.5 mL,混匀,放置 10 min,再加入福林试液 0.5 mL,混匀,放置 30 min。用 0 号管作对照,用分光光度计测定 750 nm 处各标准管和样品管的吸光度。

表 B.1 牛血清白蛋白标准液系列浓度

试管号	0	1	2	3	4	5
标准溶液/mL	0	0.25	0.5	1.0	1.5	2.0
水/mL	2.5	2.25	2.0	1.5	1.0	0.5
牛血清白蛋白/($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0	5	10	20	30	40

B.5.3 用标准管绘制吸光度—浓度曲线,根据样品管的吸光度从标准曲线上查得样品中的蛋白质的浓度($c, \mu\text{g}/\text{mL}$)。

B.6 结果计算

按式(B.1)计算。

$$M_p = \frac{c \times 2.5 \times 100}{m \times (100 - h) \times 10^6} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (B.1)$$

式中:

M_p ——蛋白质含量, %;

c ——样品管中蛋白质的浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g}/\text{mL}$);

m ——透明质酸钠的称样量,单位为克(g);

h ——透明质酸钠的干燥失重百分数。

B.7 结果报告

样品管的吸光度值小于1号标准溶液管的吸光度值时,蛋白质含量结果按小于0.05%报告。其他按式(B.1)计算蛋白质含量。

附录 C

(规范性附录)

乙醇残留量测定(顶空气相色谱法)

C.1 原理

样品溶于 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液,在一定温度下,顶空抽取试样通过色谱柱,使要测定的乙醇与其他组分分开,用氢火焰离子化检测器检测,并将得到的乙醇色谱峰与外标物得到的色谱峰相比较,计算。

C.2 设备

C.2.1 气相色谱仪(配备 FID 检测器)。

C.2.2 顶空进样器。

C.2.3 毛细管色谱柱:DB-624(0.45 mm×30 m,膜厚 2.55 μm)或相同分离效果的其他色谱柱。

C.2.4 20 mL 顶空瓶。

C.2.5 无水乙醇:色谱纯。

C.3 溶液制备

C.3.1 空白溶液

移取 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液 5.0 mL 于 20 mL 顶空瓶中,密封。

C.3.2 标准溶液

精密称取乙醇约 0.1 g 于已加入 10 mL 水的 100 mL 容量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,精密量取 5 mL,置 50 mL 量瓶中,加 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液稀释至刻度,摇匀,精密量取 5 mL 置 20 mL 顶空瓶中,密封,作为标准溶液。

C.4 样品制备

精密称取透明质酸钠约 0.1 g,置于 20 mL 顶空瓶中,加入 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液 5.0 mL,密封,放置过夜,使溶解。

C.5 操作条件

C.5.1 柱温:初始温度 40 °C,维持 5 min,以 20 °C/min 升至 150 °C,维持 3 min。以 30 °C/min 升至 200 °C,维持 3 min。

C.5.2 进样口温度:200 °C。

C.5.3 检测器温度:250 °C。

C.5.4 载气:氮气,5 mL/min。

C.5.5 顶空瓶平衡温度:80 ℃,平衡时间:30 min。

C.6 测定方法

取标准溶液顶空进样,连续进样 5 次,记录色谱图,乙醇峰与其他峰之间的分离度应大于 2.0,其峰面积的相对标准偏差(RSD)应小于 10%,取空白溶液和样品溶液顶空进样,记录色谱图。

C.7 结果计算

按式(C.1)计算乙醇残留量。

$$w = \frac{(A_i - A_0) \times m_{si} \times 5\,000}{(A_{si} - A_0) \times m} \dots\dots\dots (C.1)$$

式中:

- w —— 残留乙醇含量,单位为微克每克($\mu\text{g/g}$);
- A_i —— 样品溶液的图谱中乙醇的峰面积;
- A_0 —— 空白溶液的图谱中乙醇的峰面积;
- A_{si} —— 标准溶液的图谱中乙醇的峰面积;
- m —— 透明质酸钠的称样量,单位为克(g);
- m_{si} —— 标准贮备溶液中乙醇的质量,单位为克(g)。

附录 D

(资料性附录)

季铵盐(氯化十六烷基吡啶)残留量测定

D.1 原理

利用 CPC 能够溶于有机溶剂中的特性,将透明质酸钠干粉先用 25%氯化钠溶液浸润,再用乙腈浸提,然后采用高效液相色谱将氯化十六烷基吡啶(CPC)与其他组分分开,用紫外检测器检测,进而进行定量测定。

D.2 设备及试剂

D.2.1 高效液相色谱仪 Agilent technologies 1260 infinity。

D.2.2 Waters 色谱柱:Symmetry Shield RP18,5 μm , (2.1 \times 150)mm。

D.2.3 METTLER TOLEDO 分析天平。

D.2.4 旋涡式混合器。

D.2.5 乙腈:色谱纯(纯度 $>99.9\%$)。

D.2.6 甲酸:色谱纯(纯度 $>99.9\%$)。

D.2.7 超纯水。

D.2.8 标准品:氯化十六烷基吡啶(纯度 $>99.5\%$)。

D.3 色谱检测条件

D.3.1 流动相 A:乙腈,流动相 B:0.25%甲酸水溶液,A : B=38 : 62。

D.3.2 仪器设定:检测波长:259 nm;进样量 10 μL ;流速:0.4 mL/min;柱温:25.0 $^{\circ}\text{C}$;程序时间:15 min。

D.4 溶液制备

D.4.1 乙腈:水(1:1)溶液制备:100 mL 乙腈加 100 mL 水,混合均匀。

D.4.2 25%氯化钠溶液制备:25.0 g 氯化钠加 100 mL 水,溶解,混合均匀。

D.4.3 标准品贮备液的制备:

精密称取经 P_2O_5 真空干燥的氯化十六烷基吡啶 50.0 mg 于 25 mL 容量瓶中,用乙腈:水(1:1)溶液稀释至刻度,摇匀,得浓度为 2 mg/mL 的标准品溶液,取 1 mL 的 2 mg/mL 的标准品溶液于 1 000 mL 容量瓶中,用乙腈:水(1:1)溶液稀释至刻度,摇匀,得浓度为 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准品贮备液。

注:贮存 2 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 下,3 个月有效期。

D.4.4 0.25%甲酸水溶液制备:取 2.5 mL 甲醇置 1 000 mL 水中,混合均匀。

D.5 样品准备

取透明质酸钠干粉约 100 mg,精密称定,至具塞试管中,加 25%的氯化钠溶液 2 mL,于旋涡式混合

器振荡、混合,解离约 1 h;加乙腈约 10 mL,反复振荡,浸提 1 h 后将上清液转移至 25 mL 容量瓶中,残渣同法处理 3 次,其中第 3 次浸提时放置过夜,第 2 次和第 4 次浸提时间同第 1 次,每次浸提时应将固体尽量捣碎,用旋涡式混合器充分振荡。合并上清液并用乙腈稀释至刻度,摇匀,取溶液经 0.45 μm 针头过滤器过滤后(两份平行样品)用水 1:1 稀释,待测。

D.6 步骤

取 D.4.3 溶液按表 D.1 进行稀释,得到标准液系列。

表 D.1 氯化十六烷基吡啶(CPC)标准液系列

试管号	0	1	2	3	4	5
2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 标准溶液/mL	0	0.05	0.1	0.25	0.5	0.75
乙腈:水(1:1)溶液/mL	1	0.95	0.9	0.75	0.5	0.25
标准品浓度/ $(\mu\text{g}/\text{mL})$	0	0.1	0.2	0.5	1.0	1.5

D.7 实验步骤

选择高效液相色谱检测各标准溶液和样品溶液的峰面积,绘制峰面积-浓度曲线,根据样品的峰面积从标准曲线上查得样品氯化十六烷基吡啶残留量的浓度。

D.8 结果计算

透明质酸钠原料中氯化十六烷基吡啶的残留量 w_i 可按式(D.1)计算:

$$w_i = c_i / m \times V \times 2 \quad \dots\dots\dots (D.1)$$

式中:

w_i ——透明质酸钠样品中氯化十六烷基吡啶的残留量,单位为微克每克($\mu\text{g}/\text{g}$);

c_i ——根据标准曲线计算出的样品检测液中氯化十六烷基吡啶残留量的浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g}/\text{mL}$);

m ——透明质酸钠样品的称样量,单位为克(g);

V ——每克样品制备过程中加入浸提液后的总体积,单位为毫升(mL)。

附 录 E
(规范性附录)
重均分子量及分子量分布系数测定

E.1 原理

光散射法是测定高聚物绝对分子量的方法。高分子溶液可视为不均匀介质,当光通过它时,入射光就会发生散射。其散射光强度远高于纯溶剂,并且与高聚物的分子量链形态、溶液浓度、散射光角度和折光指数增量(dn/dc)密切相关。因此由光散射法测得不同浓度(c)的高聚物溶液在不同散射角(θ)下的散射光强(I_θ)数据后,即可求得其重均分子量(M_w)等。若要得到分子量分布系数,可采用凝胶渗透色谱-激光散射联用法(GPC-LLS)。

E.2 设备

分析天平、激光散射仪、示差检测器、HPLC 泵、柱温箱、色谱柱用 SD805/806、TSK5000pw-TSK6000 或其他适宜的色谱柱、进样环。

E.3 溶液配制**E.3.1 流动相**

0.2 mol/L 氯化钠-0.2‰ 叠氮化钠溶液:精密配制 0.2 mol/L 氯化钠-0.2‰ 叠氮化钠溶液,并用 0.22 μm 的滤膜过滤、脱气备用。

E.3.2 样品溶液制备

准确称取样品,用上述流动相溶解并稀释至适宜浓度,用 0.22 μm 滤膜过滤。

E.4 步骤

E.4.1 折光指数增量(dn/dc):采用流动相稀释透明质酸钠,至不同浓度梯度,在室温下,用激光检测波长测定或采用经典折光指数增量 0.160。

注:不同的分子量范围 dn/dc ,有较小的变化,建议针对一定范围内进行检测。

E.4.2 将色谱柱与激光散射仪和示差检测器连接,流动相冲洗至基线平稳后,取适量样品溶液进样,在规定流速、色谱柱温度条件下检测样品的分子量及分子量分布。

E.5 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参数,计算分子量及分子量分布系数并输出报告。

注 1:可采用凝胶色谱法,但应予以验证并在报告中说明。

注 2:提供色谱柱型号,仅为使用者提供方便,不意味着对它们的认可。

参 考 文 献

- [1] YY/T 0308—2015 医用透明质酸钠凝胶
 - [2] YY 0466.1 医疗器械用于医疗器械标签、标记和提供信息的符号 第1部分:通用要求
 - [3] 动物源性医疗器械产品注册申报资料指导原则(2009年发布,关于印发无源植入性和动物源性医疗器械注册申报资料指导原则的通知,食药监办械函[2009]519号)
 - [4] ASTM F2347-11 Standard Guide for Characterization and Testing of Hyaluronan as Starting Materials Intended for Use in Biomedical and Tissue Engineered Medical Product Applications
 - [5] EU MEDDEV 2.5-8 rev2 关于含有涉及病毒和传染性病原体的动物源性材料医疗器械的评价指导方针
 - [6] European Pharmacopoeia 8.0 version
-

中华人民共和国医药
行业标准
组织工程医疗器械产品 透明质酸钠
YY/T 1571—2017

*

中国标准出版社出版发行
北京市朝阳区和平里西街甲2号(100029)
北京市西城区三里河北街16号(100045)

网址: www.spc.org.cn

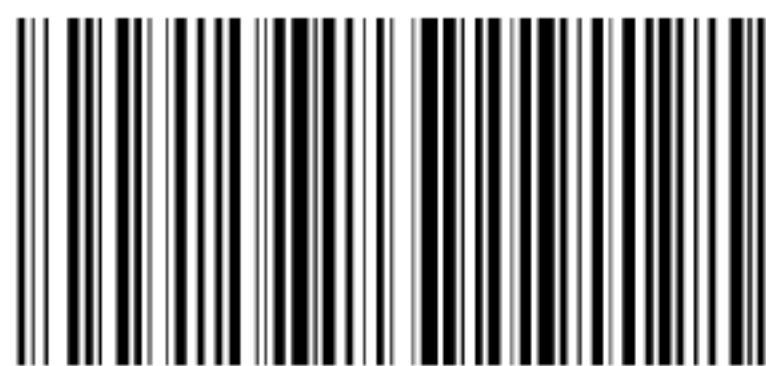
服务热线: 400-168-0010

2017年11月第一版

*

书号: 155066·2-32521

版权专有 侵权必究



YY/T 1571-2017