



中华人民共和国医药行业标准

YY/T 0953—20XX

替代 YY 0953—2015

医用羧甲基壳聚糖

Medical carboxymethyl chitosan

(征求意见稿)

20XX-XX-XX 发布

20XX-XX-XX 实施

国家药品监督管理局

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 动物源性材料要求	2
5 要求	2
6 试验方法	4
7 标志、使用说明书	6
8 包装、运输和贮存	7
附录 A (资料性附录) 羧甲基壳聚糖红外谱图	8
附录 B (规范性附录) 重均分子质量及分子质量分系数测定	9
附录 C (规范性附录) 羧甲基壳聚糖脱乙酰度和取代度测定	10
附录 D (规范性附录) 羧甲基壳聚糖含量测定	11
附录 E (规范性附录) 蛋白质含量测定	12
附录 F (规范性附录) 乙醇残留量测定 (气相色谱法)	14
附录 G (规范性附录) 二甘醇酸残留量测定	16
附录 H (规范性附录) 等电点的测定	18
附录 I (资料性附录) 羧甲基壳聚糖降解试验	19

前 言

本标准按照GB/T 1.1-2009给出的规则起草。

本标准是对YY0953-2015《医用羧甲基壳聚糖》的修订，与YY0953-2015《医用羧甲基壳聚糖》相比，主要技术变化如下：

- 修改了规范性引用文件以及《中华人民共和国药典》的版本年号（见2，2015年版的2）；
- 修改了羧甲基甲壳素和羧甲基壳聚糖的定义（见3.3和3.4，2015年版的3.3和3.4）；
- 修改了外观的要求及试验方法（见5.1，2015年版的5.1）；
- 修改了傅里叶变换红外光谱的部分主要特征峰（见5.2，2015年版的5.2）；
- 增加了脱乙酰度的要求及试验方法（见5.4，6.4及附录C）；
- 修改了等电点的要求及试验方法（见5.5、附录H，2015年版的5.4、附录H）；
- 修改了蛋白质残留量的要求（见5.12，2015年版的5.11）；
- 修改了灰分的要求及试验方法（见5.14和6.14，2015年版的5.13和6.13）；
- 修改了不溶物的要求及试验方法（见5.15和6.15，2015年版的5.14和6.14）；
- 修改了乙醇残留量的试验方法（见附录F，2015年版的附录F）；
- 修改了微生物限度的要求（见5.17.2，2015年版的5.16.2）；
- 修改了细菌内毒素限量要求（见5.18，2015年版的5.17）；
- 删除了生物学评价的具体要求及试验方法，仅保留总则（见5.19、6.19，2015年版的5.18及6.18）；
- 删除了检验规则（见2015年版的7）；

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。

本标准由国家药品监督管理局提出。

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（SAC/TC110/SC3）归口。

本标准起草单位：

本标准主要起草人：

医用羧甲基壳聚糖

1 范围

本标准规定了医用羧甲基壳聚糖原料的要求、试验方法、包装、运输、贮存等要求。

本标准适用于以壳聚糖或甲壳素为原料，经脱乙酰化、羧化、纯化而制成的医用级羧甲基壳聚糖，用于医疗器械产品。

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 9969 工业产品使用说明书 总则

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 16886.17 医疗器械生物学评价 第17部分：可沥滤物允许限量的建立

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 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

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）因子的去除和灭活确认

中华人民共和国药典（四部）2015年版

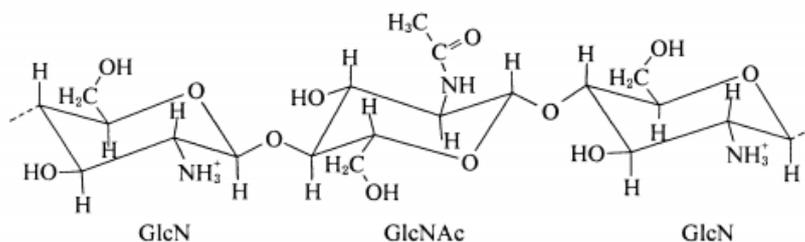
3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

壳聚糖 Chitosan

由2-氨基-2-脱氧-D-吡喃葡萄糖(GlcN)和 2-乙酰氨基-2-脱氧-D-吡喃葡萄糖 (GlcNAc) 通过 β (1 \rightarrow 4) 连接而成的线性聚多糖。其结构式为：



3.2

甲壳素 Chitin

几丁质

甲壳质

壳多糖

化学名称： β -1,4-2乙酰胺基-2-脱氧-D-吡喃葡萄糖，为自然界的一种半透明而坚固的材料，是真菌的细胞壁和节肢动物的外骨骼里的主要组成部分。

3.3

羧甲基甲壳素 Carboxymethylchitin

甲壳素的羟基上的氢被羧甲基取代后的产物。

3.4

羧甲基壳聚糖 Carboxymethylchitosan

羧甲基甲壳素脱乙酰化后或壳聚糖的羟基/氨基上的氢被羧甲基取代后的产物。

3.5

残留物 residues

在原料中存在或材料加工过程中引入（或产生）的可能对人体产生一定副作用的需要去除而可能在最终产品中仍然会残留的某种物质。

3.6

降解 degradation

环境条件下引起的材料的化学键断裂，导致机械性能和/或化学完整性降低。

3.7

体外降解 degradation in vitro

贮存于生理液或模拟环境中所引起的降解。

4 动物源性材料要求

动物源性初始原料，应按 YY/T 0771.1、YY/T 0771.2、YY/T 0771.3的要求进行管理和控制。

5 要求

5.1 外观

羧甲基壳聚糖应为白色或淡黄色固体，无肉眼可见异物。

5.2 定性试验（鉴别试验）

羧甲基壳聚糖的傅里叶变换红外光谱 (FT-IR), 在 3250 cm^{-1} - 3450 cm^{-1} (宽峰)、 2910 cm^{-1} - 2950 cm^{-1} 、 1600 cm^{-1} (或 1654 cm^{-1} 和 1550 cm^{-1})、 1380 cm^{-1} (或 1410 cm^{-1} 和 1323 cm^{-1})有羧甲基壳聚糖特征吸收峰。除了 3250 cm^{-1} - 3450 cm^{-1} 和 2910 cm^{-1} - 2950 cm^{-1} 波数处的吸收峰外, 其它特征吸收峰实测值的波数误差应小于规定值的0.5%。

注: 羧甲基壳聚糖参考红外图谱见附录A。

5.3 取代度 (羧化度)

羧甲基壳聚糖的取代度应大于80%。

5.4 脱乙酰度

羧甲基壳聚糖的脱乙酰度应符合标示值。

5.5 等电点

羧甲基壳聚糖的等电点应在3.0~5.0范围内。

5.6 干燥失重

羧甲基壳聚糖的干燥失重应不大于12% (质量分数)。

5.7 pH

羧甲基壳聚糖, 其检验液的pH值应在6.0~8.0之间。

5.8 透光率

羧甲基壳聚糖, 其检验液在波长660 nm处透光率应不小于98.0%。

5.9 重均分子质量及分子质量分布

应确定羧甲基壳聚糖的重均分子质量和允差范围, 分子质量分散系数应为1.0~3.0。

5.10 紫外吸光度

羧甲基壳聚糖, 其检验液在260 nm和280 nm波长处的吸光度均不大于0.1。

5.11 羧甲基壳聚糖纯度

羧甲基壳聚糖纯度应不小于85% (质量分数)。

5.12 蛋白质残留量

羧甲基壳聚糖蛋白质残留量应不大于0.2% (质量分数)。

5.13 重金属和微量元素

5.13.1 羧甲基壳聚糖重金属总量 (以 Pb^{2+} 计, 铁元素除外) 应不大于 $10\text{ }\mu\text{g/g}$ 。

5.13.2 总砷含量不大于 $4\text{ }\mu\text{g/g}$, 汞含量不大于 $4\text{ }\mu\text{g/g}$, 铁含量不大于 $50\text{ }\mu\text{g/g}$ 。

5.14 灰分

羧甲基壳聚糖灰分应符合标示值。

5.15 不溶物

羧甲基壳聚糖中不溶物应不大于 0.5%(质量分数,以干燥品计)。

5.16 残留物

5.16.1 乙醇残留量

羧甲基壳聚糖中乙醇残留量应不大于0.5%(质量分数)。

5.16.2 二甘醇酸残留量

羧甲基壳聚糖中二甘醇酸残留量应不大于0.1%(质量分数)。

5.16.3 其他残留物

若产品含有《中华人民共和国药典(四部)》(2015年版) 0861残留溶剂测定法附表1中一、二类溶剂,以及经确证含有的其他有害残留物,应按GB/T 16886.17要求给出许可限量。

5.17 无菌或微生物限度

5.17.1 若原料标示为“无菌”,应通过无菌检查。

5.17.2 若原料为非无菌,供试品中需氧菌总数应小于 100 cfu/g,霉菌和酵母菌菌落数应小于 10 cfu/g,不得检出金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌和大肠埃希菌。

5.18 细菌内毒素检查

若原料标示为“无菌”,细菌内毒素应小于0.05 EU/mg。

注:如果以非无菌的方式提供,则最终用户需进行去除细菌内毒素的处理以达到细菌内毒素限量要求。

5.19 生物学评价

羧甲基壳聚糖生物学评价应按照GB/T 16886.1 的要求进行。

6 试验方法

6.1 外观

目视观察,应符合5.1规定。

6.2 傅里叶变换红外光谱(FT-IR)

按照《中华人民共和国药典(四部)》(2015年版) 0402红外分光光度法测定,应符合5.2规定要求。

注:羧甲基壳聚糖,采用 KBr压片法制样。

6.3 取代度

按照附录C规定的方法测定,应符合5.3规定。

6.4 脱乙酰度

按照附录C规定的方法测定,应符合5.4规定。

6.5 等电点

按照附录H规定的方法测定，应符合5.5规定。

6.6 干燥失重

按照《中华人民共和国药典（四部）》（2015年版）0831干燥失重测定法测定，应符合5.6的规定。

6.7 pH

羧甲基壳聚糖以新制备的纯化水配制成30mg/ml的检验液，按照《中华人民共和国药典（四部）》（2015年版）0631 pH值测定法测定，应符合5.7规定要求。

6.8 透光率

取羧甲基壳聚糖用0.9%氯化钠注射液（生理盐水）配制成1 mg/mL的检验液，以生理盐水为空白对照，按《中华人民共和国药典（四部）》（2015年版）0401紫外-可见分光光度法测定，应符合5.8规定要求。

6.9 重均分子质量及分子质量分布

按照附录B规定的方法测定，应符合5.9规定。

6.10 紫外吸光度

用0.9%氯化钠注射液（生理盐水）配制成含羧甲基壳聚糖1 mg/mL的检验液。按照《中华人民共和国药典（四部）》（2015年版）0401紫外-可见分光光度法测定，测定的吸收值应符合5.10规定。

6.11 羧甲基壳聚糖纯度

按照附录D的方法测定，应符合5.11规定。

6.12 蛋白质含量

按附录E的方法测定，应符合5.12规定。

6.13 重金属和微量元素

6.13.1 重金属总量（以Pb²⁺计）按《中华人民共和国药典》（2015版，四部）0821 重金属检查法第二法测定，若按该法操作溶液有颜色，可按《中华人民共和国药典》（2015版，四部）0821 第一法中“若供试液带颜色”项下进行。应符合5.13.1规定。

6.13.2 微量铁元素按《中华人民共和国药典》（2015年版，四部）0406 原子吸收分光光度法或0412 电感耦合等离子体质谱法（ICP-MS）测定；总砷、汞按GB/T 14233.1 原子荧光光谱法或按《中华人民共和国药典》（2015年版，四部）0412 电感耦合等离子体质谱法（ICP-MS）测定，应符合5.13.2规定。

6.14 灰分

取羧甲基壳聚糖0.5 g~1.0 g，按《中华人民共和国药典（四部）》（2015年版）2302灰分测定法1. 总灰分测定法进行，应符合5.14规定。

6.15 不溶物

称取羧甲基壳聚糖1.0 g（按干燥品计算），溶解于100 mL纯化水中，搅拌至完全溶解，将溶液转移至1 L烧杯中，加水900 mL，加热至微沸保持0.5h，加热过程中盖住烧杯口。用恒重的砂芯漏斗（3#）过滤，用水洗涤残留物，并在100~105℃烤箱中干燥至恒重。应符合5.15的规定。

6.16 残留物测定

6.16.1 乙醇残留量测定

按照附录F的方法测定，应符合5.16.1规定要求。

6.16.2 二甘醇酸残留量测定

按照附录G方法测定，应符合5.16.2规定要求。

6.16.3 其他残留物

若产品含有《中华人民共和国药典（四部）》（2015年版）0861残留溶剂测定法附表1中一、二类溶剂，以及经确证含有的其他有害残留物，应按GB/T 16886.17要求给出许可限量，并给出相应的检验方法。

6.17 无菌或微生物限度检查

6.17.1 无菌检查

按《中华人民共和国药典》（2015版，四部）1101 无菌检查法测定。

6.17.2 微生物限度检查

按《中华人民共和国药典》（2015版，四部）1105非无菌产品微生物限度检查：微生物计数法和1106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，应符合5.17.2的规定。

6.18 细菌内毒素检查

按《中华人民共和国药典》（2015版，四部）1143细菌内毒素检查法检验，应符合5.18规定要求。

6.19 生物学评价

羧甲基壳聚糖生物学评价应按照GB/T 16886.1 的要求进行。

7 标志、使用说明书

7.1 标志

7.1.1 大包装上应至少有下列标志：

- a) 产品名称；
- b) 性状；
- c) 产品标准编号和名称；
- d) 生产企业名称和地址；
- e) 规格；
- f) 生产批号或日期；
- g) 失效日期；

h) 贮存条件。

7.1.2 小包装上应至少有下列标志：

- a) 产品名称
- b) 生产企业名称和地址；
- c) 产品标准编号和名称；
- d) 规格；
- e) 生产批号或日期；
- f) 失效日期；
- g) 无菌或微生物限度；
- h) 贮存条件。

注：建议采用YY/T 0466.1中所给出的图形符号。

7.1.3 储运标志应符合 GB/T 191 中的规定。

7.2 说明书

7.2.1 说明书应包括下列内容：

- a) 主要成份；（包括主要成分的准确的命名，取材来源、加工工艺过程简述、相对分子质量等）；
- b) 物理性状；
- c) 产品名称、规格；
- d) 贮存条件；
- e) 失效日期；
- f) 产品标准编号和名称；
- g) 生产企业名称、注册地址、生产地址、联系方式及售后服务单位。

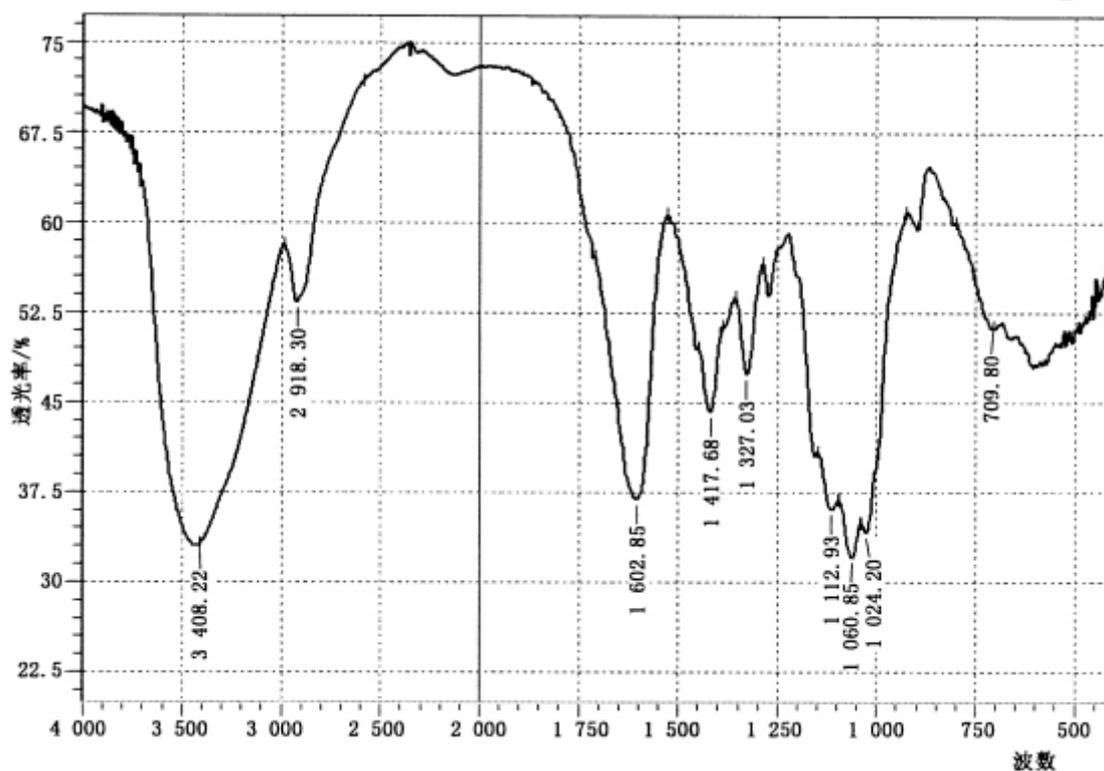
7.2.2 产品使用说明书的编写还应符合 GB/T 9969 中的规定。

8 包装、运输和贮存

产品的包装、运输和贮存应符合YY/T 0313的规定。

附 录 A
(资料性附录)
羧甲基壳聚糖红外谱图

羧甲基壳聚糖红外图谱见图A.1。



图A.1 羧甲基壳聚糖红外谱图

红外图谱解析如下：

- a) 1603 cm^{-1} 左右和 1418 cm^{-1} 左右的吸收峰分别为羧基的不对称和对称伸缩振动吸收峰，表明羧基的存在；
- b) 2918 cm^{-1} 左右和 1327 cm^{-1} 左右的吸收峰分别为 C—H 键的伸缩振动和弯曲振动吸收峰；
- c) 3408 cm^{-1} 左右的强宽吸收峰为 O—H 和 N—H 的伸缩振动吸收峰。

附 录 B
(规范性附录)
重均分子质量及分子质量分系数测定

B.1 原理

光散射法是测定高聚物绝对分子质量的方法。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，并且与高聚物的相对分子质量链形态、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质量 (M_w) 等。若要得到分子质量分布系数，可采用激光散射-凝胶渗透色谱联用法 (MALS-GPC)。

B.2 设备

分析天平、激光散射仪、示差检测器、HPLC泵、柱温箱、保护柱、色谱柱；进样环。

B.3 溶液制备

B.3.1 流动相

0.2 mol/L 醋酸铵-0.2 %叠氮化钠溶液：精密配制0.2 mol/L醋酸铵-0.2 %叠氮化钠溶液，并用0.45 μm 的滤膜过滤。

B.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含羧甲基壳聚糖 0.02~0.05 mg/mL (或根据样品分子量大小稀释至适当浓度，使样品溶液能够通过色谱柱，并且不影响响应)，0.45 μm 滤膜过滤。

注：试验所用试剂均为分析纯及以上。

B.4 步骤

折光指数增量 (dn/dc)：由各企业或实验室自行测定。

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质量及分子质量分布。

B.5 结果计算

检测完毕后，通过仪器配套的色谱分析软件确定样品的峰面积，输入 dn/dc 值，根据软件要求设置其他相关参数，计算分子质量及分子质量分布系数并输出报告。

注1：同一物质在同一溶剂下的折光指数增量为—恒值。

注2：可采用凝胶色谱法，但应予以验证并在报告中说明。

附 录 C (规范性附录)

羧甲基壳聚糖脱乙酰度和取代度测定

C.1 原理

取代度为试样中羧甲基的总摩尔数占试样中总的氨基糖单元摩尔数的百分数,脱乙酰度为试样中脱乙酰基的总摩尔数占试样中总的氨基糖单元摩尔数的百分数。

将试样溶于盐酸,用氢氧化钠标准溶液将已知量的酸式羧甲基壳聚糖重新滴定成钠盐,滴定曲线中先后出现第一拐点(过剩盐酸滴定终点),第二拐点(羧基滴定终点),第三拐点(氨基滴定终点),可测得试样中羧基和氨基的含量,从而计算出羧甲基壳聚糖的取代度和脱乙酰度。

C.2 设备与试剂

微量天平,酸度计,电位滴定仪,盐酸和氢氧化钠(分析纯及以上)

C.3 实验步骤

取0.1g 羧甲基壳聚糖,精密称定,加入 20 mL0.3 mol/L 盐酸溶液溶解,用滴定管滴定,标准滴定液为 0.1 mol/L 标准氢氧化钠溶液,记录滴定液消耗的体积与 pH 值。以滴入的氢氧化钠标准溶液体积为横坐标,溶液的pH值为纵坐标作图,得到所测样品的pH滴定曲线,或者以所滴加的氢氧化钠标准溶液体积为横坐标, $\Delta\text{pH}/\Delta\text{NaOH}$ 为纵坐标做图,得到一阶微商曲线。

注1:可根据具体样品调整溶解时的样品浓度、盐酸溶液浓度和体积。

注2:如果在曲线上无法确定第一突跃点,可通过观察原始滴定数据的方法确定。

C.4 计算

羧甲基壳聚糖取代度和脱乙酰度分别按式 C.1和式 C.2计算。

$$\text{取代度} = \frac{203 \times \Delta V_1 \times c}{m \times (1-D) - 80 \times \Delta V_1 \times c + 42 \times \Delta V_2 \times c} \times 100\% \cdots \cdots (C.1)$$

$$\text{脱乙酰度} = \frac{203 \times \Delta V_2 \times c}{m \times (1-D) - 80 \times \Delta V_1 \times c + 42 \times \Delta V_2 \times c} \times 100\% \cdots \cdots (C.2)$$

式中:

203 ——N-乙酰氨基-D-葡萄糖结构单元相对分子量;

ΔV_1 ——第一和第二突跃点之间消耗的标准NaOH溶液的体积之差, mL;

ΔV_2 ——第三和第二突跃点之间消耗的标准NaOH溶液的体积之差, mL;

c ——NaOH标准溶液的浓度, mol/L;

m ——样品质量,单位为毫克 mg;

D ——样品的干燥失重, %;

80 ——羧甲基钠的相对分子量;

42 ——乙酰基的相对分子量。

附 录 D
(规范性附录)
羧甲基壳聚糖含量测定

D.1 测定

按《中华人民共和国药典》(2015版, 四部) 0704氮测定法测定。

D.2 结果计算

羧甲基壳聚糖按照式 (D.1) 和式 (D.2) 计算

$$C_N = \frac{(V_1 - V_0) \times c \times 2 \times 14}{m \times (1 - F)} \dots\dots\dots (D.1)$$

$$W = \frac{C_N \times \bar{M}}{14 \times 1000} \times 100\% \dots\dots\dots (D.2)$$

式中:

- C_N ——待检样品中的总氮含量, mg/g ;
- m ——待检样品质量, 单位为克 g ;
- F ——待检样品中水分含量, %;
- V_1 ——样品管消耗标准硫酸溶液体积, mL;
- V_0 ——空白管消耗标准硫酸溶液体积, mL;
- C ——标准硫酸溶液的浓度, mol/L;
- W ——羧甲基壳聚糖含量, %
- 14 ——氮原子质量;
- \bar{M} ——理论条件下, 羧甲基壳聚糖糖单元平均相对分子质量。

糖单元平均相对分子质量计算式:

$$\bar{M} = (80 \times DS + 161) + (1 - DD) \times 42$$

式中:

- DS ——样品羧甲基化取代度, %;
- DD ——样品脱乙酰度, %;

附 录 E
(规范性附录)
蛋白质含量测定

E.1 原理

库马斯亮蓝G-250 (Compassion Brilliant Blue G-250) 具有两种色调, 在游离状态下呈红色, 与蛋白质结合后转为青色, 其颜色深浅与蛋白质的浓度成正比, 且在595 nm处有最大光吸收, 可用分光光度计进行测定。

E.2 设备

- a) 分析天平;
- b) 紫外分光光度计。
- c) 漩涡式混合器。

E.3 溶液制备

库马斯亮蓝G-250试液: 称取库马斯亮蓝G-250 100 mg溶解于50 mL的95%乙醇中, 溶解后再加入盐酸50 mL, 并用纯化水稀释至1000 mL, 置于棕色瓶内, 室温贮存。

蛋白质标准液: 称取牛血清白蛋白于容量瓶中, 用纯化水稀释至刻度, 4 °C下贮存。

注: 试验所用试剂均为分析纯及以上。

E.4 样品准备

取羧甲基壳聚糖100 mg精密称重, 置于容量瓶中, 加纯化水使其完全溶解并充分振荡混匀后定容, 计算样品溶液中羧甲基壳聚糖的浓度。

E.5 测定步骤

按表E.1制备蛋白质标准液系列

表E.1 蛋白质标准管溶液系列浓度

试管号	0	1	2	3	4	5
蛋白质标准溶液/mL	0	0.1	0.2	0.4	0.8	1.0
水 H ₂ O/mL	1.0	0.9	0.8	0.6	0.2	0
蛋白质浓度/(μ g/mL)	0	3	6	12	24	30

取样品1 mL于样品管中，在标准液系列的各管及样品管中分别加入5 mL的库马斯亮蓝G-250溶液。用旋涡式混合器使试管中溶液充分混合，并在室温（20±10）℃下放置15 min。用0号管作对照，用分光光度计测定595 nm处各标准管和样品管的吸光度。用标准管绘制吸光度—浓度曲线，根据样品的吸光度从标准曲线上查得样品管的蛋白质含量。

E.6 结果表示

按按式（E.1）计算羧甲基壳聚糖中蛋白质含量 ρ_3 ：

$$\rho_3 = \frac{\rho_2}{\rho_1} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (E.1)$$

式中：

- ρ_3 ——羧甲基壳聚糖中蛋白质含量，%；
- ρ_1 ——样品管中羧甲基壳聚糖含量， $\mu\text{g/mL}$ ；
- ρ_2 ——样品管中蛋白质含量， $\mu\text{g/mL}$ 。

TC110SC3征求意见稿

附 录 F
(规范性附录)
乙醇残留量测定 (气相色谱法)

F.1 原理

采用顶空气相色谱法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,用外标法计算试验结果。

F.2 设备与试剂

- a) 气相色谱仪 (配备氢火焰离子化检测器、顶空进样器)
- b) 色谱柱: (6%氰丙基苯基)-甲基聚硅氧烷 (30 m×0.32 mm, 1.8 μm) 或相同分离效果的其他色谱柱。
- c) 乙醇 (分析纯及以上)。

F.3 乙醇标准溶液制备

取乙醇适量置于容量瓶中,精密称定,用纯化水稀释至刻度,摇匀,制成每1 mL含1 mg的标准贮备溶液。在4 °C下储存,有效期为1个月。临用前,取上述标准贮备溶液稀释成10 μg/mL~250 μg/mL的系列标准溶液。

F.4 操作条件

柱温: 50 °C, 保持2 min, 以10 °C/min的速率升至160 °C, 保持5 min。汽化、检测器温度: 250 °C。

F.5 步骤

取羧甲基壳聚糖0.05 g, 精密称定, 置10 mL顶空瓶中, 准确加入纯化水2.0 mL, 混合均匀。精密量取乙醇标准溶液各2.0 mL, 置10 mL顶空瓶中, 压盖密封, 混匀。将样品瓶和标准系列置于80 °C加热30 min, 在规定的色谱分析条件下, 顶空进样, 待乙醇色谱峰流出后, 量取乙醇峰的面积值, 作为外标的定量标准。

F.6 结果计算

羧甲基壳聚糖中乙醇的残留量 C_i 可按照下式 (F.1) 计算:

$$C_i = \frac{M_i \times 10^{-6}}{m} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (F.1)$$

式中:

C_i ——样品中乙醇的残留量, %;

M_i ——标准曲线上查得样品溶液中乙醇的含量, μg ;

m ——样品的称样量 (视溶液密度为 1.00g/mL) , g 。

TC110SC3 征求意见稿

附 录 G
(规范性附录)
二甘醇酸残留量测定

G.1 第一法：离子色谱法

G.1.1 原理

采用离子色谱法使要测定的二甘醇酸与其他组分分开，用电导检测器检测，并将得到的有二甘醇酸谱峰与外标物得到的色谱峰相比较。

G.1.2 设备与试剂

- a) 离子色谱仪（配有电导检测器、自动进样器）；
- b) 色谱柱：Lon Pac ICE AS9-HC或相同分离效果的其他色谱柱；
- c) 注射器、0.45 μ m的无机滤膜；
- d) 二甘醇酸（分析纯及以上）。

G.1.3 二甘醇酸标准溶液制备

取二甘醇酸适量置于容量瓶中，精密称定，用去离子水稀释至刻度，摇匀，制成每1 mL含0.1 mg的标准贮备溶液。在4 $^{\circ}$ C下储存，有效期为1个月。临用前，取上述标准贮备溶液稀释成2 μ g/mL~30 μ g/mL的系列标准溶液。

G.1.4 操作条件

淋洗液：12 mmol/L Na₂CO₃(去离子水溶液)；流速：1.0 mL/min

G.1.5 步骤

取羧甲基壳聚糖约0.3 g，精密称定，置容量瓶中，准确加入去离子水，溶解定容成约含羧甲基壳聚糖3 mg/mL的样品溶液，经0.22 μ m滤膜过滤后，取过滤液为供试品溶液，精密量取供试品试液和二甘醇酸标准溶液系列适量，进样，待二甘醇酸色谱峰流出后，取二甘醇酸峰的面积值，作为外标的定量标准。

G.1.6 结果计算

样品中二甘醇酸的浓度 C_i 可按式 (G.1) 计算：

$$C_i = \frac{M_i \times 10^{-6}}{m} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (G.1)$$

式中：

C_i ——样品中二甘醇酸的残留量，%；

M_i ——标准曲线上查得的样品溶液中二甘醇酸的含量， μ g；

m ——样品的称样量，g。

注1：对不同离子色谱体系，洗脱程序可能存在差异，可以采用其他符合系统适用性要求的洗脱体系

注2：本法为仲裁法

G.2 第二法：高效液相色谱法

G.2.1 原理

采用高效液相色谱法使要测定的二甘醇酸与其他组分分开，用紫外检测器检测，并将得到的有二甘醇酸谱峰与外标物得到的色谱峰相比较。

G.2.2 设备

G.2.2.1 高效液相色谱仪，紫外检测器

G.2.2.2 色谱柱：symmetryC18色谱柱或类似分离效果的其它色谱柱

G.2.2.3 二甘醇酸（分析纯及以上）。

G.2.3 二甘醇酸标准溶液制备

取二甘醇酸适量置于容量瓶中，精密称定，用去离子水稀释至刻度，摇匀，制成每1 mL含0.1 mg的标准贮备溶液。在4 °C下储存，有效期为1个月。临用前，取上述标准贮备溶液稀释成2 μg/mL~30 μg/mL的系列标准溶液。

G.2.4 操作条件

G.2.4.1 流动相：（0.01 mol/L磷酸二氢钾溶液，磷酸调节pH=2.0）：甲醇=97：3

G.2.4.2 流速： 1.0 mL/min

G.2.5 步骤

取供试品0.250 g，精密称定，置容量瓶中，准确加入浸提液（甲醇：水=7：4）10 mL，超声提取10分钟后，6000 r/min离心15 min，取上清液，流动相稀释15倍，经0.22 μm滤膜过滤后，作为供试品进样溶液。取20 μL，在规定的色谱分析条件下进样，记录色谱图。精密量取二甘醇酸标准溶液20 μL，在规定的色谱分析条件下进样，记录色谱图。

G.2.6 结果计算

样品中二甘醇酸的残留量 C_i 可按式(G.2)计算：

$$C_i = \frac{M_i \times 10^{-6}}{m} \times 100\% \quad \dots\dots\dots(G.2)$$

式中：

C_i ——样品中二甘醇酸的残留量，%；

M_i ——标准曲线上查得的样品溶液中二甘醇酸的含量，单位为微克（μg）；

m ——样品的称样量，单位为克（g）。

附录 H

(规范性附录)

等电点的测定

H.1 原理

在波长250 nm处羧甲基壳聚糖有明显的紫外吸收，用盐酸溶液调节羧甲基壳聚糖水溶液的pH值，由于羧甲基壳聚糖具有两性物质特性，羧甲基壳聚糖会随着pH值下降产生白色絮状沉淀，当羧甲基壳聚糖中氨基和羧基均以带电荷形式存在，处于电中性状态，沉淀达到最大，此时的pH值为羧甲基壳聚糖的等电点，随着pH值继续下降，溶液逐渐变澄清，沉淀溶解。

H.2 设备

紫外可见分光光度计，pH计，恒温磁力搅拌器。

H.3 样品准备

供试液制备：称取一定量的羧甲基壳聚糖用纯化水配置成质量浓度为0.1%-0.3%的溶液500 mL，搅拌使完全溶解，过滤掉不溶物。

溶液pH梯度调节：将供试液分装在12个100 mL烧杯中，每杯30 mL，用恒温磁力搅拌器不断搅拌，用pH计连续测定溶液pH值，缓慢向其中滴加盐酸，调节每杯pH分别为5.2，5.0，4.8，4.6，4.4，4.2，4.0，3.8，3.6，3.4，3.2，3.0后，离心或用滤纸过滤掉不溶物，以纯化水为空白对照，测定滤液在250 nm处的透光率。

H.4 结果处理

以透光率为纵坐标，pH值为横坐标作出T%-pH曲线，观察透光率发生突变的点，羧甲基壳聚糖的等电点为透光率突跃为最大值的pH值。

附 录 I
(资料性附录)
羧甲基壳聚糖降解试验

1.1 概述

本附录主要研究了羧甲基壳聚糖的生物降解性,以便对这一新材料产品进行初步降解条件的摸索,为体外降解标准提供初步的理论依据,通过利用PMMA(聚甲基丙烯酸甲酯)管包埋羧甲基壳聚糖防粘连膜材料,进行水解后的组织病理观察,并结合材料对照,探讨利用PMMA(聚甲基丙烯酸甲酯)管模拟体内降解方法的可行性,为单独研究体液降解提供参考性资料。

1.2 材料准备

- a) 实验动物:健康成年新西兰试验用兔,体重2.5 Kg~3.2 Kg,皮肤无损伤。
- b) 手术剪、手术刀片、止血钳、持针钳、套针、缝合针、缝合线、棉球、纱布、手术洞巾,试验前应用高压蒸气灭菌。准备足量的麻醉药。
- c) 样品准备:厚度为50 μm 的羧甲基壳聚糖膜。
- d) 容器:圆柱体容器,底面直径1.5 cm,高度2.5 cm。两底面为截留相对分子质量1000的透析膜。

1.3 实验步骤

每只实验用兔作为一个取样时间点,植入4支分别用样品容器承载的样品和1支直接植入的样品。

试验当天,剪去动物脊椎两侧区域毛,试验时静脉注射麻醉药,麻醉药的剂量按使用说明给药。按外科常规手术要求以碘酊和75%(V/V)乙醇消毒手术区域皮肤。

用钝器解剖法在一个皮肤切口部位制成一个或几个皮下囊,囊的底部距皮肤切口应为10 mm 以上,每个囊内植入一个植入物,用套针将植入物推入囊内,植入物之间不能互相接触。

在规定取样时间点将样品取出,用纯化水冲去样品上的残余组织并用滤纸沾干,将样品置于干燥器中小于500 Pa 真空干燥至恒重,进行分子量及分子量分布测定。分子量及分子量分布测定操作按附录B方法进行。

注:每次试验前根据所植入的羧甲基壳聚糖设计取样时间点,取样时间点不少于5个,最后一个取样时间点载体降解率应在50%以上。

1.4 结果表示

报告不同时间点相对分子量分布状况。