



中华人民共和国医药行业标准

YY/T 0962—20XX

代替 YY 0962-2014

整形手术用交联透明质酸钠凝胶

Cross-linked sodium hyaluronate gel for plastic surgery

(征求意见稿)

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。

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 材料要求 1

5 要求 1

6 检验方法 3

7 包装 5

8 制造商提供的信息 5

附录 A（规范性附录） 注射器芯杆推挤力的测定 7

附录 B（规范性附录） 溶胀度的测定 8

附录 C（规范性附录） 透明质酸钠含量的测定 9

附录 D（规范性附录） 蛋白质含量的测定 11

附录 E（规范性附录） 交联剂 1,4 丁二醇二缩水甘油基醚（BDDE）残留量的测定 13

附录 F（规范性附录） 游离透明质酸钠含量的测定 16

前 言

本标准按照GB/T 1.1—2009给出的规则起草。

本标准是对YY/T 0962-2014《整形手术用交联透明质酸钠凝胶》的修订，与YY/T 0962-2014《整形手术用交联透明质酸钠凝胶》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2，2014年版的2）；
- 修改了外观的试验方法（见6.1，2014年版的6.1）；
- 修改了粒径分布的试验方法（见6.3，2014年版的6.3）；
- 修改了注射器芯杆推挤力的要求及试验方法（见5.4，6.4及附录A，2014年版的5.4，6.4及附录B）；
- 修改了红外鉴别的试验方法（见6.5，2014年版的6.5及附录C）；
- 修改了溶胀度的试验方法（见6.6及附录B，2014年版的6.6及附录D）；
- 修改了渗透压的单位（见5.7，2014年版的5.7）；
- 修改了含量的要求及试验方法（见5.9，6.9，2014年版的5.9，6.9）；
- 修改了蛋白质的要求及试验方法（见5.10和6.10及附录D，2014年版的5.10和6.10）；
- 修改了重金属总量的试验方法（见6.11，2014年版的6.11）；
- 修改了交联剂残留量的试验方法（见6.12及附录E，2014年版的6.12及附录F）；
- 修改了游离透明质酸钠含量的要求及试验方法（见5.13和6.13及附录F，2014年版的5.13和6.13及附录G）；
- 修改了其它添加剂的试验方法（见5.14和6.14，2014年版的5.13和6.13）；
- 修改了细菌内毒素的试验方法（见6.16，2014年版的6.15）；
- 删除了检验规则(见2014年版的7)；

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（SAC/TC 110）归口。

本标准起草单位：

本标准主要起草人：

整形手术用交联透明质酸钠凝胶

1 范围

本标准规定了整形手术用交联透明质酸钠凝胶（以下简称交联透明质酸钠凝胶）的要求、检验方法、包装和由制造商提供的信息。

本标准适用于整形手术用交联透明质酸钠凝胶。适用范围为面部皮肤真皮层的填充。

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 14233.2 医用输液、输血、注射器具检验方法 第2部分：生物学试验方法

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

YY/T 1571-2017组织工程医疗器械产品 透明质酸钠

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

透明质酸 hyaluronic acid

一种由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)糖苷键与另一个双糖单元连接起来。

3.2

交联剂 cross-linking agent

用于透明质酸钠交联的化学试剂。

3.3

交联透明质酸钠凝胶 cross-linked sodium hyaluronate gel

透明质酸钠与交联剂发生化学反应，形成的凝胶。

3.4

溶胀度 swelling degree

交联透明质酸钠溶胀时重量变化的量度，反映该凝胶的交联程度。

4 材料要求

所采用材料应符合YY/T 1571-2017的要求或其他规定。

5 要求

5.1 外观

交联透明质酸钠凝胶应无色、透明，无任何肉眼可见的异物。

5.2 有效使用量

所测得值应在标示装量的90%~120%之间。

5.3 粒径分布

交联透明质酸钠凝胶的粒径分布应在标称范围内。

5.4 注射器芯杆推挤力

注射器芯杆推挤力应在标称数值范围内。

5.5 红外鉴别

交联透明质酸钠凝胶应具备其特征性红外图谱。

5.6 溶胀度

交联透明质酸钠凝胶的溶胀度应在标称范围内。

5.7 渗透压

交联透明质酸钠凝胶渗透压摩尔浓度应为 270 mOsmol/kg~350 mOsmol/kg。

5.8 pH 值

pH 值应在 6.8~7.6 范围内。

5.9 含量

交联透明质酸钠凝胶的透明质酸钠含量应为标示值的 90%~120%之间。

5.10 蛋白质

交联透明质酸钠凝胶蛋白质含量应不大于 20μg/g。

5.11 重金属总量

交联透明质酸钠凝胶的重金属总量（以 Pb^{2+} 计）应不大于 5μg/g。

5.12 交联剂残留量

交联剂残留量应包括透明质酸钠颗粒内的交联剂残留量。1,4-丁二醇二缩水甘油基醚(1,4-butanediol diglycidyl ether,简称(BDDE)交联剂残留量应不大于2.0 $\mu\text{g/g}$ 。若使用其他交联剂,需提供限量要求和检验方法。

5.13 游离透明质酸钠含量

游离透明质酸钠含量应在标示范围内。

5.14 其它添加剂

如在生产过程中加入了其它添加剂,应提供其限量要求及检验方法。

5.15 无菌

交联透明质酸钠凝胶应无菌。

5.16 细菌内毒素

交联透明质酸钠凝胶细菌内毒素应小于 0.5 EU/mL。

5.17 溶血性链球菌溶血素

应无溶血环。

5.18 生物学评价

交联透明质酸钠凝胶应按照 GB/T 16886.1 的要求进行生物学的评价。

5.19 降解实验

交联透明质酸钠的降解是指在体内降解吸收至局部显微镜下材料消失并且无局部炎症反应,不包括材料在植入局部以外的进一步代谢过程。如果产品的降解时间过长,可以用其他适当的方法进行降解试验。

6 检验方法

6.1 外观

交联透明质酸钠凝胶垂直置于照度为1000 lx -1500 lx下任意旋转,从水平方向观察,应符合5.1的规定。

6.2 有效使用量

将每支单包装中交联透明质酸钠凝胶按正常使用方式尽量取出,称定后除以交联透明质酸钠凝胶密度($\rho=1.01 \text{ g/mL}$),应符合5.2的规定。

6.3 粒径分布

按照《中华人民共和国药典(四部)》(2015年版) 0982 粒度与粒度分布法 第三法(光散射法) 湿法测定,应符合5.3的规定。

6.4 注射器芯杆推挤力

按照附录 A 方法测定，应符合 5.4 的规定。

6.5 红外鉴别

用冷冻干燥法、乙醇沉淀后干燥法或直接干燥法（80℃及以下）将适量的交联透明质酸钠凝胶干燥后采用溴化钾压片，然后按照《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 5.5 的规定。

6.6 溶胀度

按照附录 B 方法测定，应符合 5.6 的规定。

6.7 渗透压

直接取样，按照《中华人民共和国药典（四部）》（2015年版）0632 渗透压摩尔浓度测定法测定，应符合 5.7 的规定。

6.8 pH 值

交联透明质酸钠凝胶用纯化水作等质量比例稀释，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 5.8 的规定。

6.9 含量

按照附录 C 方法测定，应符合 5.9 的要求。

6.10 蛋白质

按照附录 D 方法测定，应符合 5.10 的规定。

6.11 重金属总量

按照《中华人民共和国药典（四部）》（2015年版）0821 重金属检查法 第二法测定，应符合 5.11 的规定。

6.12 交联剂残留量

按照附录 E 方法测定，应符合 5.12 的规定。

若使用其他交联剂，需提供质量控制指标。

所有交联剂的残留量检测方法应能将交联透明质酸钠颗粒内的交联剂残留量一并检出。

6.13 游离透明质酸钠含量

按照附录 F 方法测定，应符合 5.13 的规定。

6.14 其它添加剂

如在生产过程中加入了其它添加剂，应提供其限量要求及检测方法。

6.15 无菌

按照《中华人民共和国药典（四部）》（2015年版）四部 1101 无菌检查法规定的方法检验，应符合 5.15 的规定。

6.16 细菌内毒素

供试液制备方法按 GB/T 14233.2《医用输液、输血、注射器具检验方法 第2部分：生物学试验方法》进行，然后按照《中华人民共和国药典（四部）》（2015年版）四部 1143 细菌内毒素检查法规定的方法进行检验，应符合 5.16 的规定。

6.17 溶血性链球菌溶血素

取交联透明质酸钠凝胶 1 mL 直接接种于血液琼脂平板培养基上，在 $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ 恒温箱内培养 24 h 后观察，应符合 5.17 的规定。

6.18 生物学评价

交联透明质酸钠凝胶应按照 GB/T 16886.1 的要求进行生物学的评价。

6.19 降解实验

以 GB/T 16886.1 为原则，根据产品的特性设计降解试验。

7 包装

交联透明质酸钠凝胶单包装宜采用一次用量包装，优先采用使用式包装设计。适宜的包装型式，例如装入玻璃注射器，注射器锥头套上保护帽，再封装于单包装容器（袋或塑料泡罩）内。注射器中的活塞宜采用丁基橡胶制造。

8 制造商提供的信息

8.1 使用说明书

如果适用，使用说明书应包括如下信息：

- a) 制造商名称和地址；
- b) 植入剂的描述，包括类型、主要的化学成分；
- c) 如果适用，包装中内容物为无菌和所使用灭菌方法的表示；
- d) 植入剂预期一次性使用的说明；
- e) 预期寿命；
- f) 植入剂的预期目的的明确陈述；
- g) 植入剂的预期性能和任何非预期的副作用；
- h) 贮存条件；
- i) 禁忌症；
- j) 使用说明（特别是过敏的皮试和判断规则）；
- k) 单次注射的最大剂量和注射频次；
- l) 植入剂使用前，所需的任何处理和操作细节；例如，最终装配、清洁、灭菌等；
- m) 潜在的并发症以及相应的解决办法；
- n) 手术及术后护理注意事项；
- o) 医疗随访的建议。

8.2 标志

8.2.1 单包装上应有下列标志：

- a) 产品名称或商标；
- b) 制造厂名称和地址；
- c) 产品注册号；
- d) 规格；
- e) 生产批号或日期；
- f) 失效日期；
- g) “无菌”、“一次性使用”、“包装破损禁止使用”等字样或图示；
- h) 贮存条件。

8.2.2 外（大、中）包装上应有下列标志：

- a) 制造厂名称、地址；
- b) 产品名称和商标；
- c) 产品注册号，执行标准编号；
- d) 生产批号或日期；
- e) 规格；
- f) 失效日期；
- g) 贮存条件；
- h) 体积、重量；
- i) “温度限制”“湿度限制”等文字或标志。

8.2.3 应包括至少两个附加标签贴附在手术记录和联系卡片。附加标签应列出：

- a) 产品名称和商品名；
- b) 制造商名称和地址；
- c) 产品序列号和/或批号；
- d) 注射部位及注射量；
- e) 患者姓名和联系方式。

8.2.4 告知患者的信息

一份关于要求医生保证能够向患者提供信息的声明；以下信息应该在手术前由医生告知患者，一些相关告知的内容还应该在手术后以适当的方式提供（例如填写在患者卡上）。

- a) 产品名称或商品名，制造商地址；
- b) 植入剂的描述，包括类型、主要的化学成分；
- c) 追溯用的制造商识别卡（例如：序列号和批号）等；
- d) 实际注射量；
- e) 预期寿命；
- f) 以下警告：告知患者“注射植入剂的过程为不可逆过程，一旦注射通过任何方法都不可能取出这些植入剂”；
- g) 预期效果；
- h) 预期风险：信息包括所有潜在的局部并发症，例如：过敏反应、炎性反应、流动或者位移至非预期部位，还应该说明其他潜在的影响健康的全身反应；
- i) 副作用：例如疼痛、感染、外形不满意（不对称、移位、瘢痕）等；

- j) 需要向外科医生咨询医疗随访事宜；
- k) 提示患者当怀疑有并发症发生的时候应该向医生咨询。

征求意见稿

附 录 A
(规范性附录)
注射器芯杆推挤力的测定

A.1 原理

本试验以恒定的速度推动注射器芯杆，试验时，安装上注射针，模拟实际使用情况。以恒定速度推动芯杆，注射器中的样品经由针头被推挤出，得到推挤力曲线。由推挤力曲线可以看出样品挤出过程中推挤力的变化，推挤力小，样品容易被挤出，推挤力大，样品不容易被挤出。另外，推挤力的高低落差大，表明样品有分散不均或聚集浓缩现象，这样也会影响注射时的适手性。

A.2 仪器

万能材料试验机

A.3 试验方法

去除产品外包装，安装配套的芯杆和注射针，排出注射器前端少量空气，然后安装在检测设备上，设置检测设备（万能材料试验机）测试参数。

测试条件如下：

测试温度：室温

室温平衡时间（针对冷藏条件储存的产品）：将产品取出，室温平衡 1h 后检测。

测试距离：将测试距离设置为满量程。

推挤速度：设置推挤速度为 10mm/min-30 mm/min。

按规定方法测试推挤力，记录推挤力读数。

附 录 B

（规范性附录）

溶胀度的测定

B.1 原理

溶胀度是体现凝胶亲水性能的重要物理参数，反映凝胶的交联程度。同样条件下，凝胶的交联度越大，溶胀度越小。本方法定量测定交联透明质酸钠凝胶的溶胀度。

B.2 仪器与试剂

电子天平（精度 0.1mg）、干燥箱、玻璃干燥器、直径 90mm 的平底蒸发皿、500 目筛网、0.9%氯化钠溶液。

B.3 实验步骤

取500目筛网（8cm×8cm的正方形）放入干燥箱中，80℃下至恒重，记作 m_0 。精密称取0.2g-0.5g交联透明质酸钠凝胶置于500目筛网上，将筛网置于蒸发皿中，一次性加入30mL 0.9%氯化钠溶液，使其完全浸润样品，待凝胶充分溶胀后（至少溶胀30min），将筛网并样品一起取出，用滤纸吸去筛网底部和周边液体至滤纸无湿痕为止，称量记作 m_1 。然后，将筛网放入干燥箱中，80℃下至恒重，记作 m_2 。

B.4 结果计算

$$\text{溶胀度 (Q)} = \frac{m_1 - m_2}{m_2 - m_0}$$

式中：

Q——交联透明质酸钠凝胶溶胀度；

m_0 ——恒重后筛网质量，g；

m_1 ——筛网加交联透明质酸钠凝胶溶胀后质量，g；

m_2 ——筛网加交联透明质酸钠凝胶烘干后质量，g。

附 录 C
(规范性附录)
透明质酸钠含量的测定

C.1 原理

透明质酸钠水解后,葡萄糖醛酸与吡唑试剂作用产生红紫色,生成的颜色深浅与葡萄糖醛酸含量成正比。

C.2 仪器

分析天平、紫外-可见分光光度计、旋涡式混合器或相当设备。

C.3 溶液制备

C.3.1 体积分数为0.125%的吡唑乙醇液

称取0.125 g吡唑,加无水乙醇100mL溶解。移至深棕色瓶中,置暗处保存,有效期为15天。

C.3.2 葡萄糖醛酸(GA)标准溶液

称取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,在2~8℃下贮存。临用前,精密量取贮备液5.0 mL,置100 mL量瓶中,加水制成每1 mL中含50μg的溶液。

C.3.3 0.025mol/L的四硼酸钠硫酸溶液

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1L浓硫酸中,加盖。不定时的振摇,直至四硼酸钠完全溶解。室温下贮存,有效期为12个月。

C.3.4 0.5 mol/L硫酸溶液

取98%硫酸5 mL,加入到含有179 mL水的烧杯中,混合均匀。

C.3.5 1mol/L氢氧化钠溶液

取氢氧化钠10 g,加水250 mL,搅拌溶解。

C.3.6 供试品溶液

取适量交联透明质酸钠凝胶,精密称定(精确到0.1 mg),加0.5 mol/L 硫酸溶液 10 mL,置(95±5)℃恒温箱,加热使完全溶解,加1 mol/L 氢氧化钠溶液 10 mL,加水稀释至含透明质酸钠约50 μg/mL,充分振荡混匀,从中吸出1mL置试管中。

注:试验所用试剂均为分析纯,硫酸宜为优级纯。

C.4 实验方法

按表E.1制备葡萄糖醛酸标准液系列。

表C.1 葡萄糖醛酸标准液系列

试管编号	0 (空白)	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 / $\mu\text{g/mL}$	0	10	20	30	40	50

将标准液系列各试管和样品试管一起置于冰水浴中，用移液器缓慢地向每管中加入 0.025 mol/L 四硼酸钠硫酸 5 mL（使用之前在 4℃ 冰箱内贮存至少 2h），边加边摇匀。加毕后混匀并置沸水浴中煮沸 15 min 后取出，冷却至室温。各试管内均加入咔唑试液 0.20 mL，充分摇匀后，置沸水浴中加热 15 min，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。

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含量。

C.5 结果计算

按下式计算透明质酸钠质量浓度值 ρ ，以毫克每毫升表示。

$$\rho = 2.0675c_1 \frac{m_2 \times \rho_1}{m_1 \times \rho_2}$$

式中：

ρ ——透明质酸钠的质量浓度，单位为毫克每毫升，mg/mL；

C_1 ——样品管中葡萄糖醛酸含量，单位为微克每毫升， $\mu\text{g/mL}$ ；

m_2 ——交联透明质酸钠凝胶和纯化水质量，单位为毫克，mg；

ρ_1 ——交联透明质酸钠凝胶密度，1.01 g/mL；

m_1 ——交联透明质酸钠凝胶质量，单位为微克， μg ；

ρ_2 ——交联透明质酸钠凝胶和纯化水混匀液密度，按 1.00 g/mL 计。

理论情况下：

$$2.0675 = \frac{\text{透明质酸钠重复双糖单元相对分子量}}{\text{葡萄糖醛酸相对分子量}} = \frac{401.3}{194.1}$$

附 录 D

（规范性附录）

蛋白质含量的测定

D.1 原理

考马斯亮蓝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。

D.2 仪器与试剂

紫外可见分光光度计、电子天平（万分之一）、恒温干燥箱

牛血清白蛋白、考马斯亮蓝G-250、95%乙醇、85%磷酸、硫酸、氢氧化钠

D.3 溶液配制

考马斯亮蓝染色液：称取考马斯亮蓝G-250 100mg，加95%乙醇50mL，待考马斯亮蓝溶解后（可以用超声），再加85%磷酸100 mL，加水稀释至1000 mL，混匀。滤过，取滤液即得。本染色液应置棕色瓶内，宜配制24h后使用。如有沉淀产生，使用前需经滤过。

牛血清白蛋白标准溶液的制备：牛血清白蛋白加水溶解，稀释至浓度约10 μg/mL。

表D.1 牛血清白蛋白标准液系列

棕色试管编号	0（空白）	1	2	3	4	5
牛血清标准溶液 /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
牛血清含量 / μg/mL	0	2	4	6	8	10

D.4 供试品溶液制备

称取交联透明质酸钠凝胶2g，精密称定（精确到0.1mg），置20mL顶空瓶中，避免沾到瓶壁影响酸解。加0.5mol/L 硫酸溶液3mL，不加振荡，压紧瓶盖，置（95±5）℃恒温干燥箱45min，使之完全溶解。放冷置室温后，将顶空瓶中溶液转移至10ml容量瓶，用3mL 1mol/L 氢氧化钠溶液润洗顶空瓶，将润洗液转移至容量瓶，最后用水定容至10mL，从中吸出1mL置试管中。

D.5 实验方法

在标准液系列各试管和供试品试管中，分别加考马斯亮蓝染色液5.0 mL，混匀，室温放置5 min，如产生气泡，可以通过超声去除；或者倒入比色皿时，沿着比色皿的角落倒溶液，排除气泡。在595 nm波长处测定吸光度。以牛血清白蛋白的浓度对相应的吸光度计算回归方程，由回归方程计算供试品溶液蛋白质的含量。

D.6 计算

按如下公式计算透明质酸钠凝胶中蛋白质的含量：

$$E = (a \times v) / m$$

式中：

E——透明质酸钠凝胶中蛋白质的含量， $\mu\text{g/g}$ ；

a——标准曲线上读得的供试品溶液中蛋白质的浓度， $\mu\text{g/mL}$ ；

V——供试品溶液的总体积 10 mL；

m——供试品质量，g。

附录 E (规范性附录)

交联剂 1,4 丁二醇二缩水甘油基醚 (BDDE) 残留量的测定

E.1 酶标法 (仲裁法)

E.1.1 原理

本方法是检测环氧化合物高灵敏度的方法。环氧化合物与烟碱反应在激发光370nm作用下产生荧光,其荧光强度与环氧化合物的量成正比,荧光分光光度计在发射波长为430nm处可检测其荧光强度。

E.1.2 仪器与试剂

多功能酶标仪 (或荧光分光光度计)。

万分之一天平。

恒温水浴锅。

微量加样器。

透明质酸酶。

1,4—丁二醇二缩水甘油基醚 (BDDE)。

尼克酰胺。

苯乙酮。

氢氧化钾。

甲酸。

乙醇。

注:以上试剂至少为分析纯。

E.1.3 溶液配制

E.1.3.1 2.0mg/mL BDDE标准储备液

精密称取0.1g的BDDE置50ml容量瓶中,加纯化水混匀,定容,备用。

E.1.3.2 125mmol/L尼克酰胺溶液

精密称取0.76 g尼克酰胺置50mL容量瓶中,加纯化水定容,混匀,备用。

E.1.3.3 15%苯乙酮溶液

移取1.5mL苯乙酮溶液置10mL容量瓶中,加无水乙醇定容,混匀备用 (因苯乙酮在水中的溶解度不好,故此处用无水乙醇)。

E. 1. 3. 4 1mol/L氢氧化钾溶液

精密称取7.0g氢氧化钾，溶解于15 mL纯化水中（放置冰面上），置100 mL 容量瓶中，用纯化水定容。混匀保存在具塞瓶中静置24h，取上清液备用（氢氧化钾为分析纯，含量>82%）。

E. 1. 3. 5 1500U/mL透明质酸酶溶液

称取适量透明质酸酶用纯化水配成1500U/mL透明质酸酶溶液。取80μ L于离心管中，临用前配制。

E. 1. 4 实验步骤

E. 1. 4. 1 系列标准溶液配制

表E. 1 BDDE 标准溶液系列

试管编号	1	2	3	4	5	6	7
BDDE 初始浓度/ μg/mL	2000	80	8	4	2	1	0.5
BDDE/ml	1	1	5	5	5	5	5
水 /ml	24	9	5	5	5	5	5
BDDE 含量 / μg/mL	80	8	4	2	1	0.5	0.25

E. 1. 4. 2 标准曲线制作

精密量取各浓度标准溶液20uL，加10uL的125mmol/L尼克酰胺溶液混合，在37℃下水浴120min。离心甩下壁上水分，向其中加入0.1mL的15%苯乙酮溶液和0.1mL的1mol/l氢氧化钾溶液，混匀后置冰上10min。加入0.5mL甲酸溶液，在60℃下水浴5min，随后在冰上冷却。在室温下10~15min后，用多功能酶标仪测定荧光值，激发和发射波长分别为370nm和430nm。

E. 1. 4. 3 样品测定

精密称取80.8mg交联透明质酸钠凝胶样品（根据交联透明质酸钠凝胶的密度（1.01g/mL）计算所称取样品的体积），然后加等体积的透明质酸酶溶液，水浴摇床37℃，70 r/min，24h后获得交联透明质酸钠凝胶酶解液。移取交联透明质酸钠凝胶酶解液20uL加10uL的125 mmol/L尼克酰胺溶液混合，其余操作同F.1.5.2。

E. 2 气相色谱法

E. 2. 1 原理

气相色谱法的分离原理是利用要分离的诸组分在流动相和固定相两相间的分配有差异，当两相作相对运动时，这些组分在两相间的分配反复进行，即使组分的分配系数只有微小的差异，随着流动相的移动可以有明显的差距，最后使这些组分得到分离。各组分先后进入检测器，用数据处理系统记录色谱信号。

E. 2. 2 仪器与试剂

气相色谱仪（FID检测器）1,4-丁二醇二缩水甘油醚（BDDE）、丙酮（色谱纯）。

E. 2. 3 色谱条件

色谱柱：DB-17（0.32 mm×30 m，膜厚0.50 μm）或类似色谱柱。

柱温：初温150℃，以30℃/min升至260℃，保持10 min。.

检测器：FID

载气：N₂

进样口温度：260℃

检测器温度：280℃

载气流速：1.5 mL/min

E. 2. 4 溶液制备

E. 2. 4. 1 标准贮备液

精密称取BDDE 40 mg于100 mL容量瓶中，加丙酮稀释至刻度，摇匀。

E. 2. 4. 2 标准溶液

精密量取对照品溶液贮备液0.2 mL于100 mL容量瓶中，加丙酮稀释至刻度，摇匀。制成含BDDE 0.8 μg/mL的对照品溶液。

E. 2. 4. 3 供试品溶液

取交联透明质酸钠凝胶样品(HAFG) 4 g，精密称定，置10 mL量瓶中，加丙酮适量，振摇后稀释至刻度，摇匀，滤过，取续滤液作为供试品溶液。

E. 2. 5 测定

取对照品溶液及供试品溶液各 1μL 进样，记录色谱图，按下式计算供试品中 BDDE 残留量 X。

$$X (\mu\text{g/g}) = \frac{C_s \times A_i \times 10}{A_s \times W_i}$$

式中：

C_s——标准溶液BDDE浓度，μg/mL；

A_i——供试品溶液中BDDE峰面积；

A_s——标准溶液中BDDE峰面积；

W_i——供试品称样量，g；

10——供试品的定容体积，mL

附 录 F
(规范性附录)
游离透明质酸钠含量的测定

F.1 原理

透明质酸钠水解后，葡萄糖醛酸与吡唑试剂作用产生红紫色，生成的颜色深浅与葡萄糖醛酸含量成正比。

F.2 仪器

分析天平、紫外可见分光光度计、旋涡式混合器或相当设备

F.3 溶液制备

体积分数为0.125%的吡唑乙醇溶液：称取0.125 g吡唑，加无水乙醇100 mL溶解。置暗处保存，有效期为15天。

葡萄糖醛酸（GA）标准溶液：精密称取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，在2~8℃下贮存。临用前，精密量取贮备液5.0 mL，置100 mL量瓶中，加水制成每1 mL中含50μg的溶液。

0.025mol/L的四硼酸钠硫酸溶液：称取四硼酸钠（Na₂B₄O₇·10H₂O）9.54 g，加入1L浓硫酸中，加盖。不定时的振摇，直至四硼酸钠完全溶解。室温下贮存，有效期为12个月。

注：试验所用试剂均为分析纯，硫酸宜为优级纯。

F.4 供试品溶液制备

取适量交联透明质酸钠凝胶精密称定（精确到0.1mg），加适量纯化水稀释，使稀释液中游离透明质酸钠含量在标准曲线线性范围内，充分振荡混匀。然后用慢速滤纸过滤，取续滤液1mL置试管中作为供试品溶液。或将稀释液15000 r/min离心15 min，定量取上清液作为供试品溶液。

注：样品过滤时宜多次折叠滤纸，建议32折，并对漏斗加盖以减缓供试液挥发。

F.5 实验方法

按表F.1制备葡萄糖醛酸标准溶液系列。

表F.1 葡萄糖醛酸标准溶液系列

试管编号	0（空白）	1	2	3	4	5
葡萄糖醛酸标准溶液 /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

葡萄糖醛酸含量 / μg/mL	0	10	20	30	40	50
-----------------	---	----	----	----	----	----

标准液系列各试管和样品试管一起置于冰水浴中，用移液器缓慢地向每管中加入0.025 mol/L四硼酸钠硫酸5 mL（使用之前在2~8℃冰箱内贮存至少2h），边加边摇匀。加毕后混匀并置沸水浴中煮沸15 min后取出，冰水浴中冷却。各试管内均加入吡唑乙醇溶液0.2 mL，充分摇匀后，置沸水浴中加热15 min，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。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含量。

F.6 结果计算

按下式计算透明质酸钠质量浓度值 c_2 ，以毫克每毫升表示。

$$c_2 = 2.0675c_1 \frac{m_2 \times \rho_1}{m_1 \times \rho_2}$$

式中：

- m_1 ——交联透明质酸钠凝胶质量，μg；
- m_2 ——交联透明质酸钠凝胶和纯化水质量，mg；
- ρ_1 ——交联透明质酸钠凝胶密度，按 1.01 g/mL 计；
- ρ_2 ——交联透明质酸钠凝胶和纯化水混匀液密度，按 1.00 g/mL 计；
- c_1 ——样品管中葡萄糖醛酸含量，μg/mL。

理论情况下：

$$2.0675 = \frac{\text{透明质酸钠重复双糖单元相对分子量}}{\text{葡萄糖醛酸相对分子量}} = \frac{401.3}{194.1}$$