



# 中华人民共和国医药行业标准

YY/T XXXXX—XXXX

## 注射用透明质酸钠溶液

Sodium hyaluronate solution for injection

(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。

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - 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 .....	1
5 要求 .....	1
6 试验方法 .....	3
7 包装 .....	4
8 标签 .....	4
附录 A (规范性) 透明质酸钠含量的测定 .....	6
附录 B (资料性) 氨基酸、肌肽含量的测定 .....	8
附录 C (资料性) 水溶性维生素含量的测定 .....	11
附录 D (资料性) 盐酸利多卡因含量的测定 .....	13
附录 E (规范性) 蛋白质含量的测定 .....	15
附录 F (规范性) 乙醇残留量的测定 .....	18

## 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。

本文件由国家药品监督管理局提出。

本文件由全国外科植入物和矫形器械标准化技术委员会（SAC/TC110）归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

# 注射用透明质酸钠溶液

## 1 范围

本文件规定了注射用透明质酸钠溶液的材料及要求，描述了相应的试验方法，规定了包装和标签的内容。

本文件适用于注射用透明质酸钠溶液。

## 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。

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 0308-2015 医用透明质酸钠凝胶

YY/T 0962-2021 整形手术用交联透明质酸钠凝胶

YY/T 1571 组织工程医疗器械产品 透明质酸钠

《中华人民共和国药典》（2020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 $\beta$ -(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 $\beta$ -(1-4)糖苷键与另一个双糖单元连接起来。透明质酸一般以钠盐形式存在，即透明质酸钠。

[来源：YY/T 0962-2021，3.1]

### 3.2

#### 注射用透明质酸钠溶液 sodium hyaluronate solution for injection

以透明质酸钠为主要成分的水溶液，还可包含氨基酸、维生素、盐酸利多卡因等其他成分，用于注射到人体真皮层，主要通过所含透明质酸钠等材料的保湿、补水等作用，来改善皮肤状态。

## 4 材料

所采用原材料应符合YY/T 1571等相关文件的要求。

## 5 要求

### 5.1 外观

应为无色透明液体，无任何肉眼可见的异物。若注射用透明质酸钠溶液中含有影响溶液颜色和透明度的成分，外观应符合制造商的规定。

### 5.2 有效使用量

应为标示装量的90%~120%。

### 5.3 鉴别

#### 5.3.1 化学鉴别

应呈下列反应：

- a) 按照 YY/T 0308-2015 附录 A 方法进行，生成紫红色溶液；
- b) 取 1mL 注射用透明质酸钠溶液，加氯代十六烷基吡啶（1→20）2 滴～3 滴，生成白色絮状沉淀；
- c) 取 1mL 注射用透明质酸钠溶液，用铂金丝灼烧，火焰为黄色。

### 5.3.2 红外鉴别

红外图谱应符合制造商的规定。

### 5.4 透明质酸钠含量

应为标示含量的90%~120%。

### 5.5 其他成分含量

若注射用透明质酸钠溶液中含有氨基酸、维生素、盐酸利多卡因等其他成分，这些成分的含量应在标称数值范围内。

### 5.6 pH 值

应在6.0~7.6范围内。

### 5.7 渗透压

应在标称数值范围内。

### 5.8 特性黏数

应在标称数值范围内。

### 5.9 透明质酸钠重均分子量及分子量分布

重均分子量应在标称数值范围内，分布系数 $\overline{M}_w / \overline{M}_n$ 应为1.0~3.0。

### 5.10 蛋白质含量

应不大于20  $\mu\text{g/g}$ 。

### 5.11 重金属总量

应不大于5  $\mu\text{g/g}$ （以 $\text{Pb}^{2+}$ 计）。

### 5.12 紫外吸光度（如适用）

在波长280 nm和260 nm处的吸光度应不大于1.0。

### 5.13 乙醇残留量

应不大于200  $\mu\text{g/g}$ 。

### 5.14 无菌

应无菌。

### 5.15 细菌内毒素

应小于0.5 EU/mL。

### 5.16 溶血性链球菌溶血素

应无溶血环。

### 5.17 生物学评价

按照GB/T 16886.1的要求进行生物学评价，评价结果应无不可接受的生物学危害。

## 6 试验方法

### 6.1 外观

取成品，按照《中华人民共和国药典》（2020年版）四部通则0904可见异物检查法测定。

### 6.2 有效使用量

取成品，将每支单包装中注射用透明质酸钠溶液按临床使用方式尽量取出，精密称定后除以注射用透明质酸钠溶液密度得到溶液的体积（若标示装量以质量表示，则无需除以密度），再除以标示装量。

### 6.3 鉴别

#### 6.3.1 化学鉴别

- a) 按照 YY/T 0308-2015 附录 A 方法进行，观察溶液颜色；
- b) 取 1mL 注射用透明质酸钠溶液，加氯代十六烷基吡啶（1→20）2 滴~3 滴，观察是否生成白色絮状沉淀；
- c) 取 1mL 注射用透明质酸钠溶液，用铂金丝灼烧，观察火焰颜色。

#### 6.3.2 红外鉴别

取注射用透明质酸钠溶液适量，冻干，采用溴化钾压片法，然后按照《中华人民共和国药典》（2020年版）四部通则 0402 红外分光光度法测定。

### 6.4 透明质酸钠含量

按照附录A的方法测定或按照YY/T 0308-2015附录A的方法（仲裁法）测定。

### 6.5 其他成分含量

按照制造商提供的方法进行测定。附录B、C、D分别给出了注射用透明质酸钠溶液中氨基酸、肌肽、水溶性维生素、盐酸利多卡因的测定方法。

注：本文件不评价注射用透明质酸钠溶液中添加这些成分的适宜性。

### 6.6 pH 值

取注射用透明质酸钠溶液，按照《中华人民共和国药典》（2020年版）四部通则0631 pH值测定法测定。

### 6.7 渗透压

取注射用透明质酸钠溶液，按照《中华人民共和国药典》（2020年版）四部通则0632渗透压摩尔浓度测定法测定。

### 6.8 特性黏数

取注射用透明质酸钠溶液，一般用 0.2mol/L的 NaCl 溶液进行适当稀释，然后按照《中华人民共和国药典》（2020年版）四部通则 0633 黏度测定法第二法测定。

### 6.9 透明质酸钠重均分子量及分子量分布

按照YY/T 0308-2015附录B的方法测定。

### 6.10 蛋白质含量

按照附录E的方法测定。

### 6.11 重金属总量

取注射用透明质酸钠溶液，按照《中华人民共和国药典》2020 版四部通则 0821 重金属检查法测定。

## 6.12 紫外吸光度（如适用）

取注射用透明质酸钠溶液，用质量浓度为9g/L氯化钠溶液作10倍稀释，按照《中华人民共和国药典》2020版四部通则0401紫外-可见分光光度法测定，结果需乘以稀释倍数换算成注射用透明质酸钠溶液原浓度的吸收值。

## 6.13 乙醇残留量

按照附录F的方法测定。

## 6.14 无菌

按照《中华人民共和国药典》2020版四部通则1101无菌检查法测定。

## 6.15 细菌内毒素

取注射用透明质酸钠溶液，按照《中华人民共和国药典》2020版四部通则1143细菌内毒素检查法测定。

## 6.16 溶血性链球菌溶血素

取注射用透明质酸钠溶液1mL直接接种于血液琼脂平板培养基上，在（37±1）℃恒温箱内培养24h后观察。

## 6.17 生物学评价

按照GB/T 16886.1的要求进行生物学的评价。

## 7 包装

注射用透明质酸钠溶液小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。

## 8 标签

### 8.1 包装上应包括以下内容：

- a) 产品名称；
- b) 生产企业名称和地址；
- c) 产品注册证编号；
- d) 型号规格；
- e) 生产批号或生产日期；
- f) 失效日期或使用期限；
- g) “无菌”、“灭菌方式”、“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 外（大、中）包装上应包括以下内容：

- a) 生产企业名称和地址；
- b) 产品名称；
- c) 产品注册证编号，产品技术要求编号；
- d) 生产批号或生产日期；
- e) 型号规格；
- f) 失效日期或使用期限；
- g) 贮存条件；
- h) 体积、重量；
- i) “温度限制”、“湿度限制”等字样或图示。

### 8.3 应包括至少两个附加标签贴附在手术记录和联系卡片中，附加标签应包括以下内容：

- a) 产品名称；

- b) 生产企业名称和地址；
- 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。

**附 录 A**  
(规范性)  
**透明质酸钠含量的测定**

**A.1 原理**

透明质酸钠分子结构中含有乙酰胺基,可在碱性条件下降解生成醋酸钠,醋酸钠在酸性环境和一定温度下与乙醇反应生成乙酸乙酯,通过检测衍生物乙酸乙酯的含量来计算得出注射用透明质酸钠溶液中透明质酸钠的含量。

**A.2 仪器**

气相色谱仪,配备氢火焰离子化检测器(FID);  
电子天平,精度0.1 mg。

**A.3 试剂**

醋酸钠对照品;硫酸、无水乙醇、氢氧化钠、盐酸、氯化钠均为分析纯或以上级别。

**A.4 试验方法****A.4.1 溶液制备****A.4.1.1 硫酸乙醇溶液**

量取硫酸15 mL,缓慢加入85 mL无水乙醇中,边加边搅拌,混匀。

**A.4.1.2 4 mol/L 氢氧化钠溶液**

称取氢氧化钠160 g,加水至1000 mL,搅拌使溶解,放冷后使用。

**A.4.1.3 4 mol/L 盐酸溶液**

量取盐酸360 mL,加水至1000 mL,摇匀,放冷后使用。

**A.4.1.4 0.8 mol/L 氯化钠溶液(稀释剂)**

称取氯化钠23.4 g,加水至500 mL,搅拌使溶解。

**A.4.1.5 醋酸钠对照品贮备液**

称取醋酸钠对照品(120℃干燥2 h后使用)约100 mg,精密称定,置100 mL量瓶中,加稀释剂溶解并稀释至刻度,摇匀,作为醋酸钠对照品贮备液,2℃~8℃下贮存。

**A.4.1.6 标准溶液**

临用现配,精密量取醋酸钠对照品贮备液,用稀释剂稀释制成约200 μg/mL的溶液,作为醋酸钠对照品工作液,按照表A.1制得醋酸钠系列浓度标准溶液。

**表 A.1 醋酸钠系列浓度标准溶液**

顶空瓶编号	S0(空白)	S1	S2	S3	S4	S5
醋酸钠对照品工作液(mL)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
稀释剂(mL)	1.0	0.8	0.6	0.4	0.2	0
醋酸钠理论浓度(μg/mL)	0	40	80	120	160	200

**A.4.1.7 供试品溶液制备**

取样品适量(约含透明质酸钠 20 mg)，精密称定，置适宜大小的非玻璃材质的耐热试管（如聚丙烯管）中，加4 mol/L氢氧化钠溶液10 mL，沸水浴中反应60 min后，取出放冷，加4 mol/L盐酸溶液10 mL中和，冷却至室温，转移至50 mL量瓶中，加水定容至刻度，摇匀。

#### A. 4. 2 色谱条件

以6%氰丙基苯基-94%聚二甲基硅氧烷为固定相的毛细管柱（例如DM-624），30 m×0.53 mm×3 μm；或其他效能相当的色谱柱；升温程序为：初温40℃，维持5 min，以30℃/min升至220℃，维持5 min，检测器为氢火焰离子化检测器（FID），检测器温度为250℃，进样口温度为200℃，柱流量：5mL/min，分流比为1:1（可根据仪器灵敏度进行调整），顶空方式进样，平衡温度为55℃，平衡时间为90 min。醋酸钠衍生物峰与相邻峰的分离度应不低于1.5。

#### A. 4. 3 试验步骤

精密量取供试品溶液1.0 mL于顶空瓶中，在系列浓度标准溶液和供试品溶液中分别加入硫酸乙醇溶液1.0 mL，摇匀，密封后进样，记录色谱图。

#### A. 4. 4 结果计算

以标准溶液浓度（C）对峰面积（A）进行线性回归，得标准曲线，标准曲线的线性系数r应不低于0.99；根据供试品溶液的峰面积从标准曲线上计算出供试品溶液中醋酸钠的浓度，并按式（A.1）计算样品中透明质酸钠的含量：

$$M_h = \frac{4.8921 \times c \times V \times \rho}{m \times 1000 \times B} \times 100\% \quad (\text{A. 1})$$

式中：

$M_h$ ——样品中透明质酸钠的含量（%）

$c$ ——标准曲线上计算得出的醋酸钠的浓度，单位为微克每毫升（μg/mL）；

$V$ ——供试品稀释后体积，单位为毫升（mL）；

$m$ ——供试品的取样质量，单位为克（g）；

$\rho$ ——供试品的相对密度，单位为克每毫升（g/mL）；

$B$ ——供试品中透明质酸钠的标示含量，单位为毫克每毫升（mg/mL）。

4.8921——透明质酸钠双糖结构单元分子量（401.3）与产生的醋酸钠分子量（82.03）的比值。理论情况下：

$$4.8921 = \frac{\text{透明质酸钠重复双糖单元相对分子质量}}{\text{醋酸钠相对分子质量}} = \frac{401.3}{82.03}$$

## 附 录 B (资料性) 氨基酸、肌肽含量的测定

### B.1 方法一

#### B.1.1 原理

大部分氨基酸无明显的紫外吸收，在弱碱性溶液中，氨基酸的 $\alpha$ -氨基与2,4-二硝基氟苯作用，生成稳定的2,4-二硝基苯氨基酸，该物质在360 nm下有紫外吸收。通过高效液相色谱检测衍生物含量来间接计算出氨基酸的含量。

本方法适用于注射用透明质酸钠溶液中天冬氨酸、谷氨酸、羟脯氨酸、天冬酰胺、丝氨酸、谷氨酰胺、甘氨酸、苏氨酸、精氨酸、牛磺酸、脯氨酸、丙氨酸、缬氨酸、 $\alpha$ -氨基丁酸、蛋氨酸、胱氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、组氨酸、鸟氨酸、赖氨酸、酪氨酸和肌肽的测定。

#### B.1.2 仪器

高效液相色谱仪，配备紫外检测器(UV)；电子天平，精度0.1 mg。

#### B.1.3 试剂

氨基酸和肌肽对照品；2,4-二硝基氟苯、醋酸钠、冰醋酸、N,N-二甲基甲酰胺、碳酸氢钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )、盐酸均为分析纯或以上级别；乙腈为色谱纯。

#### B.1.4 试验方法

##### B.1.4.1 溶液制备

##### B.1.4.1.1 对照品储备液(除苯丙氨酸和色氨酸以外的22种氨基酸和肌肽)

分别称取氨基酸对照品约50 mg，置100 mL量瓶中，加0.1 M盐酸(取盐酸9.0 mL，加水至1000 mL，摇匀，即得)适量使溶解并稀释至刻度，摇匀。

##### B.1.4.1.2 对照品溶液(除苯丙氨酸和色氨酸以外的22种氨基酸和肌肽)

精密量取对照品储备液1.0 mL至10 mL容量瓶中，加纯化水稀释定容至刻度，摇匀，即得。

##### B.1.4.1.3 供试品溶液

取适量样品置超滤管中(根据样品中透明质酸钠的分子量，选择适宜的超滤管)，4500 rpm离心30 min后取滤液。根据所含氨基酸浓度稀释至适宜浓度。

##### B.1.4.1.4 0.5 mol/L的 $\text{NaHCO}_3$ 溶液

称取8.40 g碳酸氢钠，加水定容至200 mL，摇匀备用。

##### B.1.4.1.5 体积分数为1%的2,4-二硝基氟苯溶液

量取1 mL的2,4-二硝基氟苯，加入99 mL乙腈，摇匀待用。

##### B.1.4.1.6 pH 7.0的磷酸盐缓冲液(PBS)

称取8.0 g无水磷酸氢二钠，3.5 g一水合磷酸二氢钠溶于1000 mL纯化水中，完全溶解后将pH调至7.0。

#### B.1.4.2 色谱条件

以Inter Sustain AQ-C18 (4.6×250 mm, 3  $\mu\text{m}$ )为色谱柱，或其他效能相当的色谱柱；0.05 mol/L醋酸钠+1% N,N-二甲基甲酰胺，醋酸调节pH至6.5为流动相A，乙腈：水(50：50)为流动相B；进样量：10  $\mu\text{L}$ ；柱温：22°C；检测波长：360 nm；流速：1 mL/min；按照梯度进行洗脱，洗脱梯度见表B.1。

表 B.1 洗脱梯度

时间 (min)	流动相A (%)	流动相B (%)
0	84	16
5	84	16
10	76	24
12	70	30
27	65	35
30	50	50
40	35	65
50	35	65
60	2	98
65	2	98
65.1	84	16
75	84	16

#### B.1.4.3 试验步骤

分别取对照品溶液、供试品溶液各1mL，分别加入1 mL的0.5 mol/L的NaHCO<sub>3</sub>溶液和1 mL的1%的2,4-二硝基氟苯溶液，在60°C加热反应50 min，反应结束使用pH 7.0的PBS定容至25 mL，过0.22 μm的滤膜，取续滤液10 μL，注入液相色谱仪，记录色谱图。

#### B.1.4.4 结果计算

按式 (B.1) 计算样品中氨基酸的含量：

$$M_a = \frac{A_x \times C_s}{A_s \times B} \times 100\% \dots\dots\dots (B.1)$$

式中：

$M_a$ ——样品中氨基酸的含量 (%)

$A_x$ ——供试品峰面积；

$C_s$ ——对照品的浓度，单位为微克每毫升 (μg/mL)；

$A_s$ ——对照品峰面积；

$B$ ——供试品中氨基酸的标示含量，单位为微克每毫升 (μg/mL)；

### B.2 方法二

#### B.2.1 原理

苯丙氨酸和色氨酸在260nm有紫外吸收，通过外标法可直接计算苯丙氨酸和色氨酸的含量。本方法适用于注射用透明质酸钠溶液中苯丙氨酸、色氨酸的测定。

#### B.2.2 仪器

高效液相色谱仪，配备紫外检测器 (UV)；电子天平，精度0.1 mg。

#### B.2.3 试剂

氨基酸对照品；醋酸钠、冰醋酸、N,N-二甲基甲酰胺、盐酸均为分析纯或以上级别；甲醇为色谱纯。

#### B.2.4 试验方法

##### B.2.4.1 溶液制备

##### B.2.4.1.1 对照品储备液 (苯丙氨酸和色氨酸)

分别称取氨基酸对照品约50 mg，置100 mL量瓶中，加0.1 M盐酸适量使溶解并稀释至刻度，摇匀。

##### B.2.4.1.2 对照品溶液 (苯丙氨酸和色氨酸)

精密移取对照品储备液1.0 mL至10 mL容量瓶中，加纯化水稀释定容至刻度，摇匀，即得。

##### B.2.4.1.3 供试品溶液

取适量样品置超滤管中（根据样品中透明质酸钠的分子量，选择适宜的超滤管），4500 rpm离心30 min后取滤液。根据所含氨基酸浓度稀释至适宜浓度。

#### B. 2. 4. 2 色谱条件

以Inter Sustain AQ-C18 (4.6×250 mm, 3 μm)为色谱柱，或其他效能相当的色谱柱；0.05mol/L 醋酸钠+1% N,N-二甲基甲酰胺，醋酸调节pH至6.5为流动相A，甲醇为流动相B；进样量：20μL；柱温：40°C；检测波长：260 nm；流速：0.6 mL/min；按照等度进行洗脱，流动相A：流动相B为10：90。

#### B. 2. 4. 3 试验步骤

精密量取对照品溶液、供试品溶液20 μL，注入液相色谱仪，记录色谱图。

#### B. 2. 4. 4 结果计算

按式（B. 2）计算样品中氨基酸的含量：

$$M_a = \frac{A_x \times C_s}{A_s \times B} \times 100\% \dots\dots\dots (B. 2)$$

式中：

$M_a$ ——样品中氨基酸的含量（%）

$A_x$ ——供试品峰面积；

$C_s$ ——对照品的浓度，单位为微克每毫升（μg/mL）；

$A_s$ ——对照品峰面积；

$B$ ——供试品中氨基酸的标示含量，单位为微克每毫升（μg/mL）；

**附 录 C**  
**(资料性)**  
**水溶性维生素含量的测定**

### C.1 原理

利用水溶性维生素在210 nm有吸收的特性；样品溶液由高效液相色谱的流动相带入色谱柱内，各组分在柱内被分离，并进入检测器检测，由积分仪或数据处理系统记录和处理色谱信号，外标法可计算注射用透明质酸钠溶液中水溶性维生素的含量。

本方法适用于注射用透明质酸钠溶液中烟酸、烟酰胺、泛酸钙、吡哆醛、吡哆醇、硫胺素、生物素、维生素B<sub>12</sub>、维生素B<sub>2</sub>含量的测定。

### C.2 仪器

高效液相色谱仪，配备紫外检测器（UV）；电子天平，精度0.1 mg。

### C.3 试剂

水溶性维生素对照品；1-己烷磺酸钠、磷酸二氢钾、氢氧化钠均为分析纯或以上级别；乙腈、甲醇为色谱纯。

### C.4 试验方法

#### C.4.1 溶液制备

##### C.4.1.1 对照品贮备液 A（生物素）

取对照品约25 mg精密称定，置5 mL量瓶中，0.05 mol/L氢氧化钠稀释至刻度，摇匀，即得。

##### C.4.1.2 对照品贮备液 B（烟酸、烟酰胺、泛酸钙、吡哆醛、吡哆醇、硫胺素、维生素 B<sub>12</sub>、维生素 B<sub>2</sub>）

取对照品约25 mg精密称定，置5 mL量瓶中，加纯化水稀释至刻度，摇匀，即得。

##### C.4.1.3 对照品溶液

分别精密移取0.1 mL对照品贮备液A和对照品贮备液B，置100 mL量瓶中，加纯化水稀释至刻度，摇匀，即得。

##### C.4.1.4 供试品溶液

取适量样品置超滤管中（根据样品中透明质酸钠的分子量，选择适宜的超滤管），4500 rpm离心30 min后取滤液。根据所含维生素浓度稀释至适宜浓度。

##### C.4.1.5 0.05 mol/L 氢氧化钠溶液

称取2.0 g氢氧化钠，加水定容至1000 mL，摇匀备用。

##### C.4.1.6 流动相 A（6.5 mmol/L 1-己烷磺酸钠和 50 mM 磷酸二氢钾，磷酸调节 pH 至 3.0）

称取1.22 g 1-己烷磺酸钠和6.8 g磷酸二氢钾，加水定容至1000 mL，摇匀，用磷酸调节pH至3.0，摇匀。

##### C.4.1.7 流动相 B

分别取乙腈400 mL、甲醇100 mL、流动相A 500 mL，摇匀。

#### C.4.2 色谱条件

以Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 (4.6×250 mm, 5μm)为色谱柱，或其他效能相当的色谱柱；6.5 mmol/L 1-己烷磺酸钠和50 mM 磷酸二氢钾，磷酸调节pH至3.0为流动相A，乙腈：甲醇：流动相A

(4:1:5)为流动相B；进样量：20 $\mu$ L；柱温：40 $^{\circ}$ C；检测波长：210nm；流速：1 mL/min；按照梯度进行洗脱，梯度见表C.1。

表 C.1 洗脱梯度

时间 (min)	流动相A (%)	流动相B (%)
0	95	5
15	95	5
22	90	10
55	60	40
56	60	40
56.1	95	5
65	95	5

#### C.4.3 试验步骤

精密量取对照品溶液、供试品溶液20 $\mu$ L，注入液相色谱仪，记录色谱图。

#### C.4.4 结果计算

按式 (C.1) 计算样品中维生素的含量：

$$M_v = \frac{A_x \times C_s}{A_s \times B} \times 100\% \dots\dots\dots (C.1)$$

式中：

$M_v$ ——样品中维生素的含量 (%)

$A_x$ ——供试品峰面积；

$C_s$ ——对照品的浓度，单位为微克每毫升 ( $\mu$ g/mL)；

$A_s$ ——对照品峰面积；

$B$ ——供试品中维生素的标示含量，单位为微克每毫升 ( $\mu$ g/mL)；

**附 录 D**  
**(资料性)**  
**盐酸利多卡因含量的测定**

**D.1 原理**

采用高效液相色谱法(HPLC)检测盐酸利多卡因的含量。将样品溶解于适当溶剂中,然后将溶液通过HPLC色谱柱进行分离,利用紫外检测器进行检测,在软件中选择最佳的流速和波长,通过读取盐酸利多卡因的峰面积,采用外标法计算注射用透明质酸钠溶液中盐酸利多卡因的含量。

**D.2 仪器**

高效液相色谱仪,配备紫外检测器(UV);电子天平,精度0.1 mg。

**D.3 试剂**

盐酸利多卡因对照品;磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、磷酸均为分析纯或以上级别、乙腈为色谱纯。

**D.4 试验方法****D.4.1 溶液制备****D.4.1.1 1 mol/L 磷酸二氢钠溶液**

取12.0 g无水磷酸二氢钠,加水溶解,定容至100 mL。

**D.4.1.2 0.5 mol/L 磷酸氢二钠溶液**

取7.0 g无水磷酸氢二钠,加水溶解,定容至100 mL。

**D.4.1.3 磷酸盐缓冲液**

取1 mol/L磷酸二氢钠溶液1.3 mL,0.5 mol/L磷酸氢二钠溶液32.5 mL,置1000 mL量瓶中,加水至刻度,摇匀。

**D.4.1.4 对照品溶液**

称取盐酸利多卡因对照品适量,置于50 mL容量瓶中,加流动相溶解并稀释至刻度,摇匀。

**D.4.1.5 供试品溶液**

称取样品适量置于10 mL容量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,用0.45 μm滤膜过滤,得滤液,即为供试品溶液。

**D.4.2 色谱条件**

以Eclipse Plus C18 (4.6×250 mm, 5 μm)为色谱柱,或其他效能相当的色谱柱;以磷酸盐缓冲液-乙腈以体积比50:50混合(用磷酸调pH至8.0)为流动相;流速为1.5 mL/min;检测波长254 nm;柱温为30℃。

**D.4.3 试验步骤**

精密量取对照品溶液、供试品溶液各20 μL,注入液相色谱仪,记录色谱图,以外标法按峰面积计算盐酸利多卡因的含量。

**D.4.4 结果计算**

按式(D.1)计算样品中盐酸利多卡因的含量:

$$M_l = C_1 \times \frac{A_0 \times v_0}{A_1 \times m_0} \times 10^{-3} \times 100\% \dots \dots \dots (D. 1)$$

式中：

$M_l$ ——样品中盐酸利多卡因的含量（%）

$C_1$ ——盐酸利多卡因对照品的浓度，单位为毫克每毫升（mg/mL）；

$A_0$ ——供试品溶液中盐酸利多卡因的峰面积；

$v_0$ ——供试品溶液的体积，单位为毫升（mL）；

$A_1$ ——盐酸利多卡因对照品峰面积；

$m_0$ ——样品称样量，单位为克（g）；

附 录 E  
(规范性)  
蛋白质含量的测定

### E.1 方法一 福林酚法（仲裁法）

#### E.1.1 原理

福林酚试液能够与溶液中的蛋白质发生有色反应，且其颜色深浅与蛋白质浓度成正比，且在750 nm处有最大光吸收，可用分光光度计进行测定。

#### E.1.2 仪器

紫外可见分光光度计；电子天平，精度0.1 mg。

#### E.1.3 试剂

牛血清白蛋白对照品；水合硫酸铜、水合酒石酸钾钠、无水碳酸钠、氢氧化钠、福林酚试液。

#### E.1.4 试验方法

##### E.1.4.1 溶液制备

###### E.1.4.1.1 试剂 A

称取1.0 g水合硫酸铜（ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ），加水溶解并稀释至100 mL。

###### E.1.4.1.2 试剂 B

称取2.0 g水合酒石酸钾钠（ $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ），加水溶解并稀释至100 mL。

###### E.1.4.1.3 试剂 C

称取25.0 g无水碳酸钠及5.0 g氢氧化钠，加水溶解并稀释至250 mL。

###### E.1.4.1.4 试剂 D

临用前，将等量的试剂A及试剂B混合。

###### E.1.4.1.5 试剂 E

临用前，将1份试剂D及10份试剂C混合。

###### E.1.4.1.6 试剂 F

临用前，取福林酚试液进行10倍稀释。

###### E.1.4.1.7 牛血清白蛋白对照品溶液

取牛血清白蛋白对照品适量，加水溶解，并稀释至浓度约200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。精密移取上述对照品溶液1.0 mL、2.0 mL、4.0 mL、5.0 mL、10.0 mL稀释至100 mL（浓度约为2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）。

#### E.1.4.2 试验步骤

精密移取上述各标准溶液1.0 mL，得到牛血清白蛋白的质量约为2  $\mu\text{g}$ 、4  $\mu\text{g}$ 、8  $\mu\text{g}$ 、10  $\mu\text{g}$ 、20  $\mu\text{g}$ 的标准系列溶液，精密移取纯化水1.0 mL作为空白对照管，样品管精密称取样品1.0 g，分别置于具塞玻璃试管中，于上述各管中加入1.0 mL试剂E，经旋涡式混合器混合，室温放置10 min。加入3.0 mL试剂F，经旋涡混匀后，在50℃水浴放置10 min，用紫外可见分光光度计测定750 nm处各标准管和样品管的吸光度。用标准管数据绘制牛血清白蛋白的吸光度—质量曲线。

#### E.1.4.3 结果计算

按式 (E.1) 计算样品中蛋白质的含量:

$$c = \frac{m_1}{m} \dots \dots \dots (E.1)$$

式中:

$c$ ——样品中蛋白质的含量, 单位为微克每克 ( $\mu\text{g/g}$ );

$m_1$ ——标准曲线上读出的样品管中蛋白质的质量, 单位为微克 ( $\mu\text{g}$ );

$m$ ——样品的称样量, 单位为克 (g)。

## E.2 方法二 考马斯亮蓝法

### E.2.1 原理

考马斯亮蓝G250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.2.2 仪器

紫外可见分光光度计; 电子天平, 精度0.1 mg。

### E.2.3 试剂

牛血清白蛋白对照品; 考马斯亮蓝G-250、85%磷酸、95%乙醇均为分析纯或以上级别。

### E.2.4 试验方法

#### E.2.4.1 溶液制备

##### E.2.4.1.1 考马斯亮蓝染色液

称取考马斯亮蓝G-250 100 mg, 加95%乙醇50 mL, 待考马斯亮蓝溶解后(可以通过超声溶解), 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24 h后使用。如有沉淀产生, 使用前需经滤过。

##### E.2.4.1.2 牛血清白蛋白标准溶液

牛血清白蛋白加水溶解, 稀释至浓度约 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ , 然后按表E.1配制标准液系列。

表 E.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
牛血清白蛋白标准溶液/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/ $(\mu\text{g}/\text{mL})$	0	2	4	6	8	10

##### E.2.4.1.3 供试品溶液制备

取样品2 g, 精密称定, 置10 mL容量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 摇匀, 从中吸出1 mL置试管中。

#### E.2.4.2 试验步骤

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, 沿着比色皿的角落倾倒溶液, 排除气泡。在595 nm波长处测定吸光度。用标准管数据绘制吸光度—浓度曲线。

#### E.2.4.3 结果计算

按式 (E.2) 计算样品中蛋白质的含量:

$$E = \frac{\rho \times V}{m} \dots \dots \dots (E.2)$$

式中:

$E$ ——样品中蛋白质的含量，单位为微克每克 ( $\mu\text{g/g}$ )；

$\rho$ ——标准曲线上读得的供试品溶液中蛋白质的浓度，单位为微克每毫升 ( $\mu\text{g/mL}$ )；

$V$ ——供试品溶液的总体积，10 mL；

$m$ ——供试品质量，单位为克 (g)。

## 附 录 F (规范性) 乙醇残留量的测定

### 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 仪器

气相色谱仪: 配备氢火焰离子化检测器 (FID); 电子天平: 精度0.1 mg。

### F.3 试剂

无水乙醇: 优级纯或以上级别。

### F.4 试验方法

#### F.4.1 乙醇标准溶液制备

取无水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的标准贮备液。在2°C~8°C下储存,有效期为1个月。临用前,取上述标准贮备液稀释成10 µg/mL~200 µg/mL的系列标准溶液。

#### F.4.2 色谱条件

以6%氰丙基苯基-94%聚二甲基硅氧烷为固定相的毛细管柱,30 m×0.32 mm×1.8 µm (例如DM-624),或其他效能相当的色谱柱;柱温: 60°C,保持10 min;进样口温度: 200°C;检测室温度: 250°C。

#### F.4.3 试验步骤

取样品1 g,精密称定,置顶空瓶中,准确加入纯化水1.0 mL,混合均匀。另精密量取乙醇系列标准溶液各1.0 mL,置顶空瓶中,准确加入纯化水1.0 mL,混合均匀。将系列标准溶液和样品瓶于80°C温度下加热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,读取乙醇峰的面积值,绘制峰面积-乙醇浓度曲线,并根据样品溶液中乙醇的峰面积在标准曲线上读出对应的乙醇浓度。

#### F.4.4 结果计算

按式 (F.1) 计算样品中乙醇的残留量:

$$C = \frac{M \times \left(\frac{m}{\rho} + 1\right)}{2 \times m} \dots \dots \dots (F.1)$$

式中:

$C$  ——样品中乙醇的残留量,单位为微克每克 (µg/g);

$M$  ——标准曲线上读出的样品溶液中乙醇的浓度,单位为微克每毫升 (µg/mL);

$m$  ——样品称样量,单位为克 (g);

$\rho$  ——样品密度,单位为克每毫升 (g/mL),如无特别说明,按1.00g/mL计算。