

ICS

点击此处添加中国标准文献分类号

# 中华人民共和国医药行业标准

YY/T XXX—XXXX

## 外科植入物 聚乙二醇系列水凝胶

Polyethylene glycol series hydrogels Quality specification

(草案)

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

国家药品监督管理局 发布

# 目 次

目 次 .....	I
前 言 .....	II
引 言 .....	III
1 范围 .....	1
2 规范性引用文件 .....	1
3 术语和定义 .....	1
4 要求 .....	2
5 试验方法 .....	4
6 检验规则 .....	7
7 标志 .....	7
8 包装、运输和储存 .....	8
附录A 结构鉴定的测定 .....	9
附录B 数均分子量（Mn）的测定 .....	16
附录C 多分散系数和标称分子量含量的测定 .....	17
附录D 挥发性有机溶剂残留物的测定 .....	19
附录E 2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚（BHT）含量的测定 .....	21
附录F 二环己基脲（DCU）残留物的测定 .....	23
附录G 交联度的测定 .....	25

## 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归口。

本标准起草单位：

本标准主要起草人：

## 引 言

随着行业的发展,越来越多医疗器械制造商选择医用多臂聚乙二醇琥珀酰亚胺戊二酸酯制备水凝胶类产品。目前国内外也没有相应的标准规定对其性能检测,质量把控。基于规范原料质量标准考虑,现制定聚乙二醇系列水凝胶质量规范供大家参考。

作为应用于制造组织封合渗漏、填充、栓塞、防粘连等医疗器械产品使用的原材料,聚乙二醇系列水凝胶对于终端产品的生物学评价,建议终端产品的制造商根据产品的预期用途,按照GB/T 16886.1 选择相应的生物学评价。

## 1 外科植入物 聚乙二醇系列水凝胶范围

本标准规定了外科植入物-聚乙二醇系列水凝胶的质量要求、实验方法、检验规则、包装、运输和储存要求。

本标准适用于多聚季戊四醇或者多聚甘油、环氧乙烷为起始原料，经聚合、修饰、纯化而制成聚乙二醇系列水凝胶，应用于组织封合渗漏、填充、栓塞、防粘连。

## 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 14233.1-2022 医用输液、输血、注射器具检验方法 第1部分：化学分析方法

GB/T 16886.1-2022 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 22728-2008 化妆品中丁基羟基茴香醚（BHA）和二丁基羟基甲苯（BHT）的测定

JY/T 007-1996 超导脉冲傅里叶变换核磁共振波谱方法通则

YY/T 0466.1-2016 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 0313-2014 医用高分子产品 包装和制造商提供信息的要求

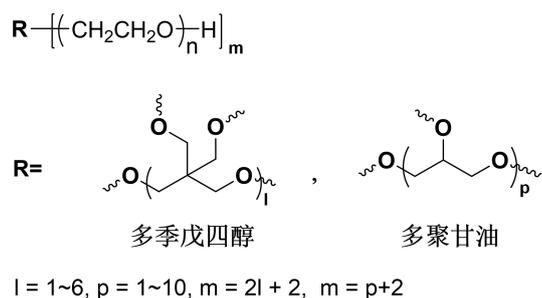
GBT1.1-2020 《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》

中华人民共和国药典（2020年版）四部

## 3 术语和定义

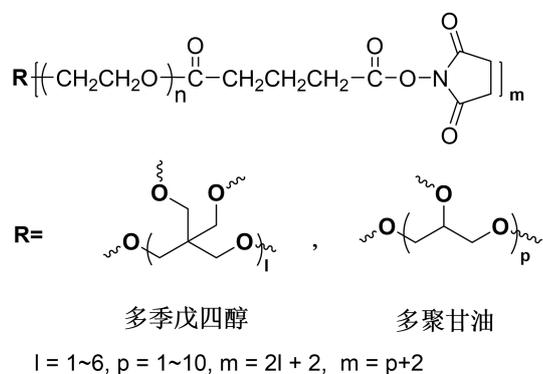
### 3.1 多臂聚乙二醇 Multi-arm Poly(ethylene glycol)

多臂聚乙二醇为一种以核为多季戊四醇或者多聚甘油，链为聚乙二醇的聚合物，其结构式如下，标称分子量范围为1000-60000 g/mol，标称分子量组分含量要求  $\geq 90\%$ 。



### 3.2 多臂聚乙二醇琥珀酰亚胺戊二酸酯 Multi-arm Poly(ethylene glycol) succinimidyl glutarate

由多臂聚乙二醇通过端羟基的酯化反应修饰得到的产物。其化学结构如下：



### 3.3 残留物 residues

在原料中存在或在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物质。

### 3.4 取代率 substitution rate

化学修饰反应被修饰基团转化为修饰基团的百分比。

### 3.5 标称分子量含量 target molecular weight fraction content

高分子材料所要求的分子量组分占总的高分子材料的百分比。

## 4 要求

### 4.1 外观

多臂聚乙二醇琥珀酰亚胺戊二酸酯应为白色或类白色粉末状固体。

#### 4.2 色级

色级应不大于YG3。

#### 4.3 澄清度

澄清度应不大于3级浊度标准液，无可见异物。

#### 4.4 结构鉴定

多臂聚乙二醇琥珀酰亚胺戊二酸酯核磁氢谱测试结果与附录 A 中谱图进行对照，产品主要吸收峰的位置应相对应。

#### 4.5 取代率

取代率应不小于90.0%。

#### 4.6 数均分子量

数均分子量应介于目标分子量（ $100\% \pm 10\%$ ）的范围内。

#### 4.7 多分散系数（PDI）

PDI 应不大于1.20。

#### 4.8 标称分子量含量

标称分子量含量应不小于90.0%。

#### 4.9 挥发性有机溶剂残留物

单个溶剂残留物应不大于200 ppm。

#### 4.10 2,6-叔丁基-4-甲基苯酚（BHT）含量

2,6-叔丁基-4-甲基苯酚（BHT）含量应不大于300 ppm。

#### 4.11 二环己基脲（DCU）残留物

二环己基脲（DCU）残留物应不大于 1000 ppm。

#### 4.12 重金属含量

重金属总含量应不大于20 ppm。

#### 4.13 水分含量

水分含量应不大于1.0%。

#### 4.14 pH 值

pH值应为2.0-5.0。

#### 4.15 固化时间

固化时间应不大于 20s。

#### 4.16 溶胀率

溶胀率应为-50%-400%。

#### 4.17 破裂强度

破裂强度应不小于 50 mmHg。

#### 4.18 凝胶交联度

凝胶交联度应不小于 70%。

#### 4.19 细菌内毒素

细菌内毒素应不大于 0.1 EU/mg。

#### 4.20 生物学评价

根据水凝胶产品的预期用途，按照GB/T 16886.1选择相应的生物学评价。

### 5 试验方法

#### 5.1 外观

目视检测，应符合4.1规定。

#### 5.2 色级

取样品配制成100 mg/mL的样品水溶液，按照《中华人民共和国药典》（2020年版）四部 0901 “溶液颜色检查法”中第一法检验，应符合4.2规定。

### 5.3 澄清度

取样品配制成100 mg/mL的样品水溶液，取样品配制成含多臂聚乙二醇琥珀酰亚胺戊二酸酯100 mg/mL的水溶液，在光照为1000 lx-1500 lx条件下，按照《中华人民共和国药典》（2020年版）四部 0904 “可见异物检查法”中灯检法进行，应符合4.3规定。

### 5.4 结构鉴定

取样品配制成15.0 mg / 0.5 mL的样品氘代氯仿（CDCl<sub>3</sub>）溶液，在400M扫描256次条件下（或者600M扫描128次，谱图解析见附录A），按照《中华人民共和国药典》（2020年版）四部 0441 “核磁共振波谱法”测定，采用核磁共振氢谱（<sup>1</sup>H-NMR）进行测定，应符合4.4规定。

### 5.5 取代率

同5.4核磁共振氢谱法，计算方法见附录A规定，应符合4.5规定。

### 5.6 数均分子量

按照《中华人民共和国药典》（2020年版）四部 0431 “质谱法”规定，采用MALDI-TOF法，附录B规定的条件进行测定，应符合4.6规定。

### 5.7 多分散系数（PDI）

按照《中华人民共和国药典》（2020年版）四部 0514 “分子排阻色谱法”中生物大分子聚合物分子量分布测试法，附录C规定的条件测定，应符合4.7规定。

### 5.8 标称分子量含量

按照《中华人民共和国药典》（2020年版）四部 0514 “分子排阻色谱法”中高分子杂质测定法，按照附录C规定的条件测定，用面积归一化计算结果，应符合4.8规定。

### 5.9 挥发性有机溶剂残留物

按照《中华人民共和国药典》（2020年版）四部 0861 “残留溶剂法”中第二法，附录D的方法进行测定，应符合4.9规定。

### 5.10 2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚（BHT）含量

按照附录E方法测定，应符合4.10规定。

#### 5.11 二环己基脲（DCU）残留物

按照附录F方法测定，应符合4.11规定。

#### 5.12 重金属含量

按照《中华人民共和国药典》（2020年版）四部 0821“重金属检查法”第二法测定，应符合4.12规定。

#### 5.13 水分含量

按照《中华人民共和国药典》（2020年版）四部 0832“水分测定法”中第一法测定，应符合4.13规定。

#### 5.14 pH 值

准确称取200 mg多臂聚乙二醇琥珀酰亚胺戊二酸酯于样品瓶中，用4 mL纯化水配制成50 mg/mL的水溶液，按照《中华人民共和国药典》（2020年版）四部 0631“pH值测定法”测定，应符合4.14规定。

#### 5.15 固化时间

将装有6\*3 mm左右微型磁力搅拌棒的3 mL圆底离心管，放在磁力搅拌器中心，以1000 rpm的转速使搅拌棒匀速转动，取0.2 mL固化前的凝胶产品推注至圆底离心管底部，采用校准的秒表记录凝胶固化时间，从推注凝胶开始计时，至凝胶固化搅拌棒停止转动为止，应符合4.15规定。

#### 5.16 溶胀率

将产品按照使用说明制备水凝胶，取水凝胶样品1 g左右，做成直径约15.3 mm，高约5.5 mm的圆柱体（在10 mL注射器中制备成型取出）后置入50 mL烧杯中，加入已预热至 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 生理盐水缓冲液，缓冲液的质量为供试量的40倍，将烧杯密封放入 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 培养箱内，24小时后取出样品用滤纸吸去表面水分，精密称重，计算水凝胶溶胀率，应符合4.16规定。

$$\text{溶胀率} = \frac{\text{溶胀后称样量} - \text{取样量}}{\text{取样量}} \times 100\%$$

#### 5.17 破裂强度

取弹性良好的猪肠衣将其固定在检测装置的漏斗结构上并用橡胶卡上完全包裹扎紧，确保液体不会于捆扎处渗漏，用符合GB18457-2001的27G针头打孔，取水凝胶产品0.5 mL喷涂于此孔上（厚度控制在

1.6 mm± 0.4 mm)，使打孔处完全封堵。等待5 min后，从肠衣孔下方对水凝胶以70 mmHg/min的速度施加压力，至水凝胶破损，记录此时的压强，应符合4.17规定。检测装置如下图所示：

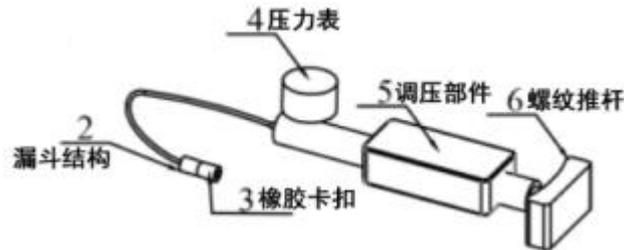


图1 检测装置示意图

### 5.18 凝胶交联度

按照附录G方法测定，应符合4.18规定。

### 5.19 细菌内毒素

按照《中华人民共和国药典》（2020年版）四部 1143“细菌内毒素检查法”第一法测定，应符合4.19规定。

### 5.20 生物学评价

按照GB/T 16886 提供的试验方法进行相应的生物学评价，应符合4.20规定。

## 6 检验规则

### 6.1 出厂检验

6.1.1 聚乙二醇系列水凝胶出厂检验项目为 4.1 ~ 4.20。

6.1.2 出厂检验时，若所有检验项目都合格，则判定为合格，否则判定为不合格。

### 6.2 型式检验

6.2.1 型式检验按照 4.1 ~ 4.20 进行全面的检查。

6.2.2 型式检验时 4.5 ~ 4.20 按照标准规定平行取两份样品检验，以算数平均值报告结果。若所有检查项目全部合格，则结果判定为合格，否则判定为不合格。

## 7 标志

产品包装上有以下内容：

- a) 产品名称全称和简称；
- b) 产品规格；
- c) 产品批号和编码；
- d) 产品包装规格；
- f) 产品的储存条件。

## 8 包装、运输和储存

产品粉剂包装为玻璃或塑料瓶。产品溶液和配套工具根据预期用途，厂家自行设计。

产品常温或者低温条件下运输。

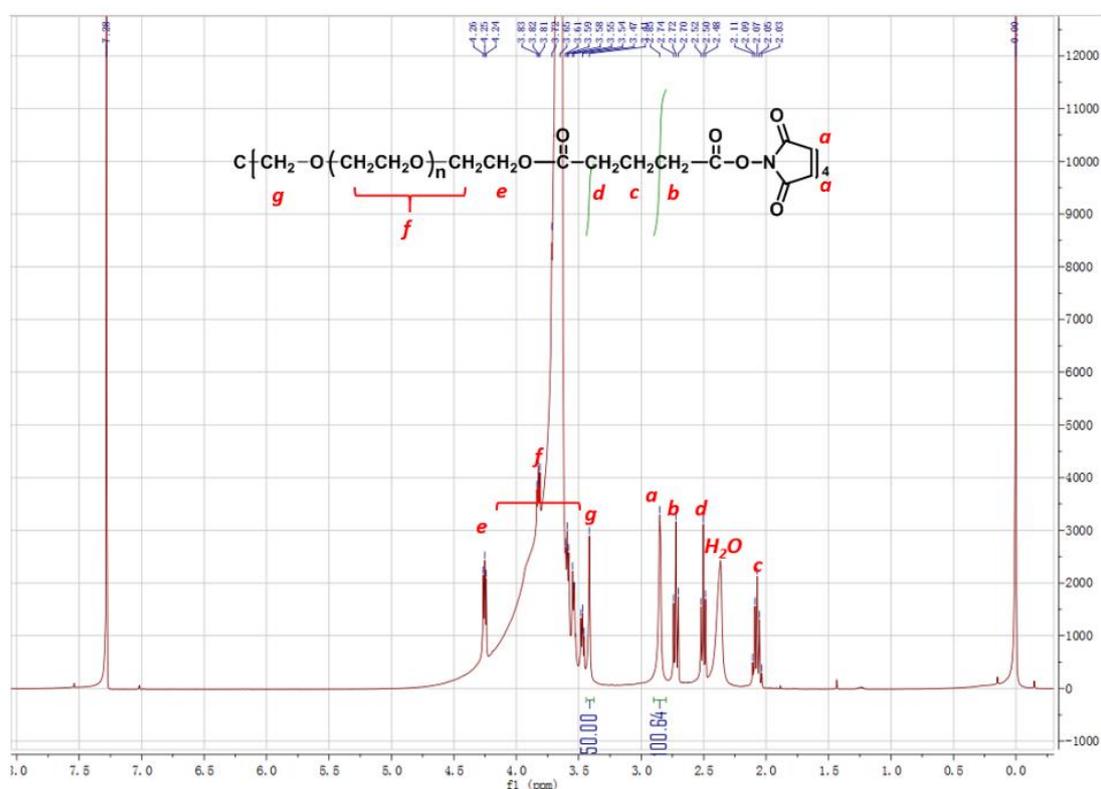
储存条件：2℃ ~ 25℃。

## 附录A

## 结构鉴定的测定

参考JY/T 007-1996，采用核磁共振波谱方法进行多臂聚乙二醇琥珀酰亚胺戊二酸酯的结构鉴定和取代率测试。

## A.1 四臂聚乙二醇琥珀酰亚胺戊二酸酯



图A.1 四臂聚乙二醇琥珀酰亚胺戊二酸酯  $^1\text{H-NMR}$ 图

A.1.1  $^1\text{H-NMR}$  (400M,  $\text{CDCl}_3$ ) 谱图解析如下:

- 在 $\delta=4.10 \sim 4.30$  ppm是一个三重峰,  $J=4.8\text{Hz}$ , 峰面积为8H, 归属为e位 $-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{C}(\text{O})-$ ;
- 在 $\delta=3.45 \sim 3.90$  ppm是一个多重峰, 峰面积为 $(16n+8)\text{H}$ , 归属为聚乙二醇链重复单元f位 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ ;
- 在 $\delta=3.35 \sim 3.45$  ppm是一个单峰, 峰面积为8H, 归属为四臂中间连接结构g位的 $-\text{CH}_2\text{O}-$ ;
- 在 $\delta=2.75 \sim 2.90$  ppm是一个单峰, 峰面积为16H, 归属为修饰基团NHS上a位的 $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})-$ ;
- 在 $\delta=2.60 \sim 2.75$  ppm是一个三重峰,  $J=7.4\text{Hz}$ , 峰面积为8H, 归属为修饰基团戊二酸b位 $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})-$ ;

f) 在  $\delta = 2.40 \sim 2.60$  ppm 是一个三重峰,  $J=7.2\text{Hz}$ , 峰面积为8H, 归属为修饰基团戊二酸d位  $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})-$ ;

g) 在  $\delta = 2.00 \sim 2.20$  ppm 是一个五重峰,  $J=7.2\text{Hz}$ , 峰面积为8H, 归属为修饰基团戊二酸d位  $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})-$ ;

#### A.1.2 四臂聚乙二醇琥珀酰亚胺戊二酸酯取代率计算

a) 峰位置校正: 将3.4 ppm左右四臂连接的 $-\text{CH}_2$ 峰校准为3.415 ppm。

b) 积分区间及峰面积标定:

Peak1 区间为3.35 ppm ~ 3.45 ppm 对应为g位的H, 自动积分并将Peak1的峰面积设定为50;

Peak2 积分区间为2.75 ppm ~ 2.90 ppm, 对应为a位的H。

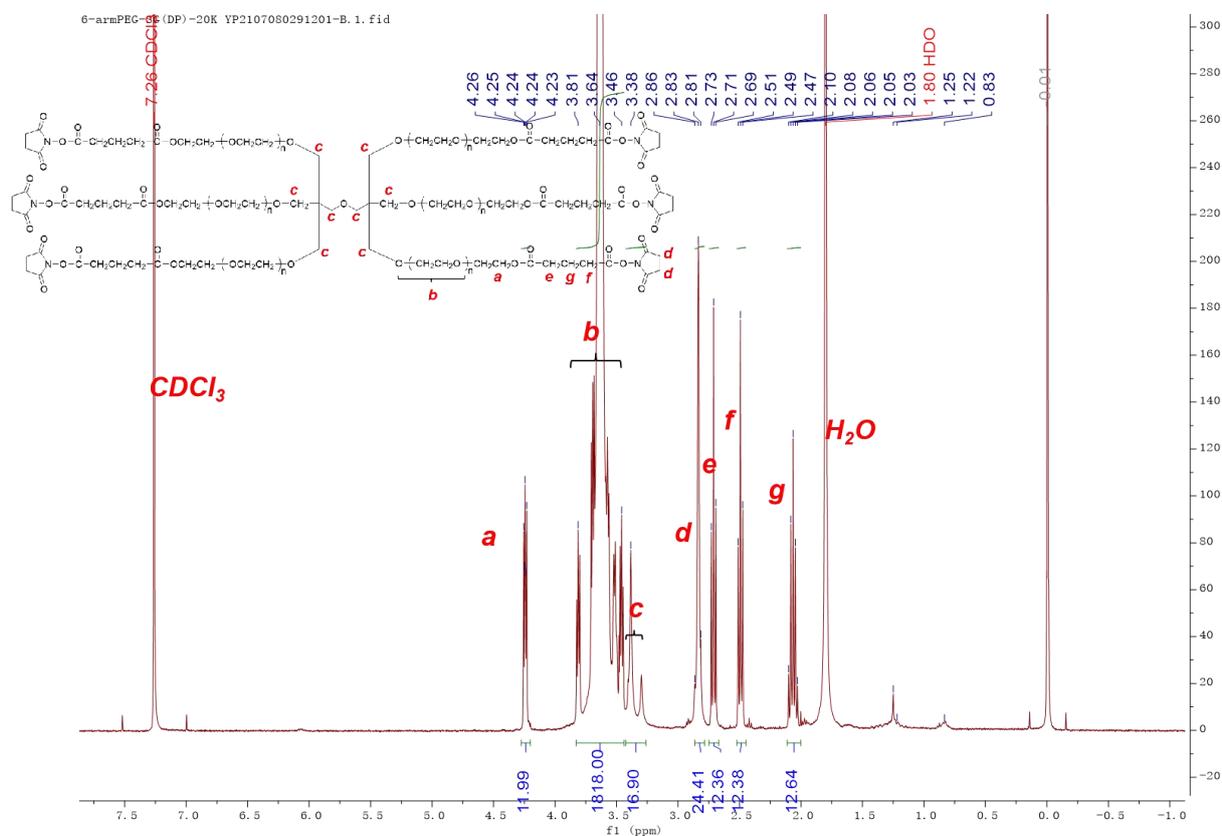
按照如下公式计算产品的端基取代率:

$$\text{产品取代率} = \frac{A_{\text{Peak2}} \times 100\%}{100}$$

式中:

$A_{\text{Peak2}}$ —产品溶液图谱中Peak2的积分H个数。

## A.2 六臂聚乙二醇琥珀酰亚胺戊二酸酯

图A.2 六臂聚乙二醇琥珀酰亚胺戊二酸酯 <sup>1</sup>H-NMR图

A.2.1 <sup>1</sup>H-NMR (400M, CDCl<sub>3</sub>) 谱图解析如下:

- 在  $\delta = 4.20 \sim 4.28$  ppm 是一个三重峰，峰面积为12H，归属为a位-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-C(O)-;
- 在  $\delta = 3.44 \sim 3.83$  ppm 是一个多重峰，峰面积为(24n+12)H，归属为b位为聚乙二醇链重复单元-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-;
- 在  $\delta = 3.26 \sim 3.42$  ppm 是一个双重峰，峰面积为16H，归属为c位八臂中间连接结构上的-CH<sub>2</sub>O-;
- 在  $\delta = 2.78 \sim 2.86$  ppm 是一个单峰，峰面积为24H，归属为d位的修饰基团NHS上的-C(O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)-;
- 在  $\delta = 2.67 \sim 2.75$  ppm 是一个三重峰，峰面积为12H，归属为e位，为修饰基团戊二酸的-CH<sub>2</sub>-O-C(O)-CH<sub>2</sub>-;
- 在  $\delta = 2.44 \sim 2.52$  ppm 是一个三重峰，峰面积为12H，归属为f位，为修饰基团戊二酸的-CH<sub>2</sub>-C(O)-O-N-;
- 在  $\delta = 2.00 \sim 2.11$  ppm 是一个五重峰，峰面积为12H，归属为g位，为修饰基团戊二酸的-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-;

**A.2.2** 六臂聚乙二醇琥珀酰亚胺戊二酸酯取代率计算

a) 峰位置校正： $\text{CDCl}_3$ 化学位移为7.26 ppm。

b) 积分区间及峰面积标定：

Peak1 区间为3.26 ~ 3.42 ppm对应为c位- $\text{CH}_2\text{O}$ -，自动积分并将Peak1的峰面积设定为16；

Peak2积分区间为2.78 ~ 2.86 ppm，对应为d位- $\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})$ -。

按照如下公式计算产品的取代率：

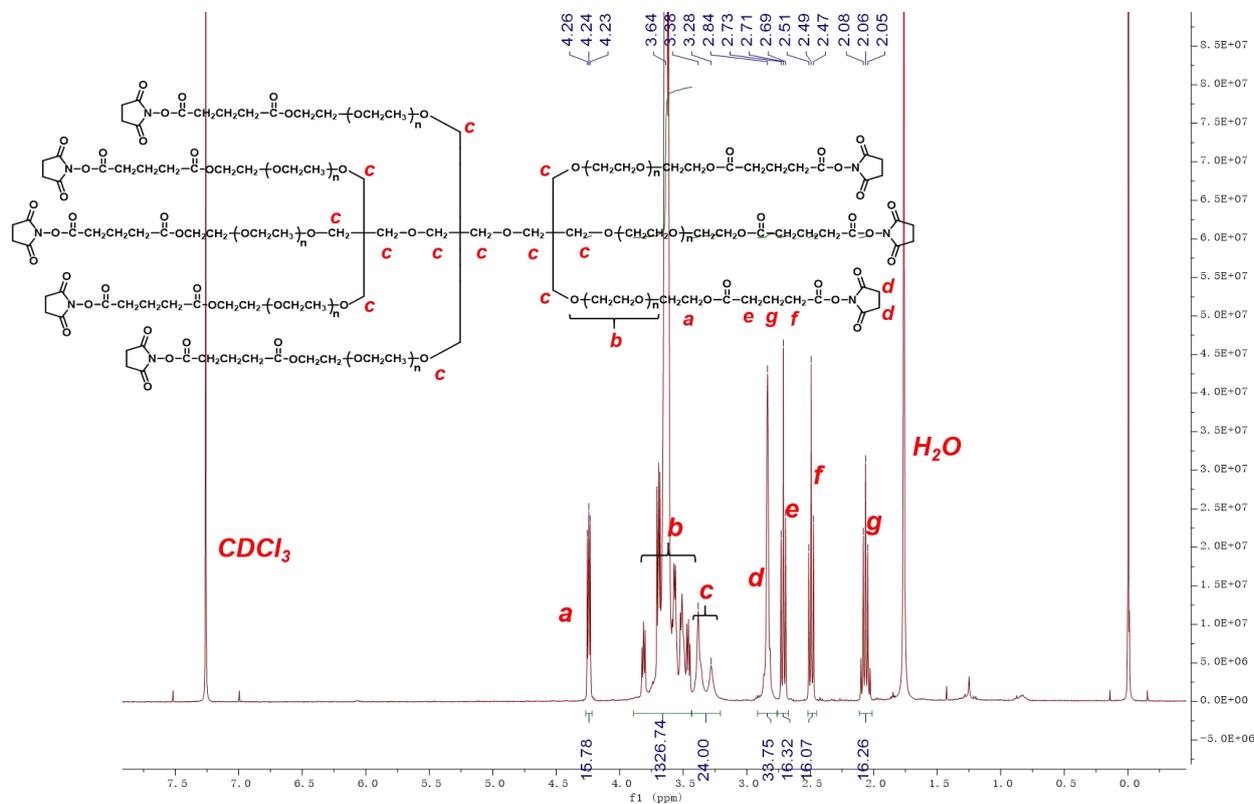
$$\text{产品取代率} = \frac{A_{\text{Peak2}} \times 100\%}{24}$$

式中：

$A_{\text{Peak2}}$ —产品溶液图谱中Peak2的积分H个数。

### A.3 八臂聚乙二醇琥珀酰亚胺戊二酸酯

#### A.3.1 八臂聚乙二醇琥珀酰亚胺戊二酸酯 (TP) :



图A.3.1 八臂聚乙二醇琥珀酰亚胺戊二酸酯 (TP)  $^1\text{H-NMR}$ 图

##### A.3.1.1 $^1\text{H-NMR}$ (400M, $\text{CDCl}_3$ ) 谱图解析如下:

- 在  $\delta = 4.21 \sim 4.26$  ppm是一个三重峰，峰面积为16H，归属为a位-O- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O-C(O)-}$ ;
- 在  $\delta = 3.43 \sim 3.89$  ppm是一个多重峰，峰面积为(32n+16)H，归属为b位为聚乙二醇链重复单元-( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ )n-;
- 在  $\delta = 3.20 \sim 3.43$  ppm是一个双重峰，峰面积为24H，归属为c位八臂中间连接结构上的- $\text{CH}_2\text{O-}$ ;
- 在  $\delta = 2.76 \sim 2.91$  ppm是一个单峰，峰面积为32H，归属为d位的修饰基团NHS上的- $\text{C(O)CH}_2\text{CH}_2\text{C(O)-}$ ;
- 在  $\delta = 2.69 \sim 2.74$  ppm是一个三重峰，峰面积为16H，归属为e位，为修饰基团戊二酸的- $\text{CH}_2\text{O-C(O)-CH}_2$ ;
- 在  $\delta = 2.44 \sim 2.51$  ppm是一个三重峰，峰面积为16H，归属为f位，为修饰基团戊二酸的- $\text{CH}_2\text{C(O)-O-N-}$ ;
- 在  $\delta = 2.01 \sim 2.11$  ppm是一个五重峰，峰面积为16H，归属为g位，为修饰基团戊二酸的- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ;

### A.3.1.2 取代率计算:

a) 峰位置校正:  $\text{CDCl}_3$  化学位移为 7.26 ppm。

b) 积分区间及峰面积标定:

Peak1 区间为 3.20 ~ 3.43 ppm 对应为 c 位- $\text{CH}_2\text{O}$ -，自动积分并将 Peak1 的峰面积设定为 24;

Peak2 积分区间为 2.76 ~ 2.91 ppm，对应为 d 位- $\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})$ -。

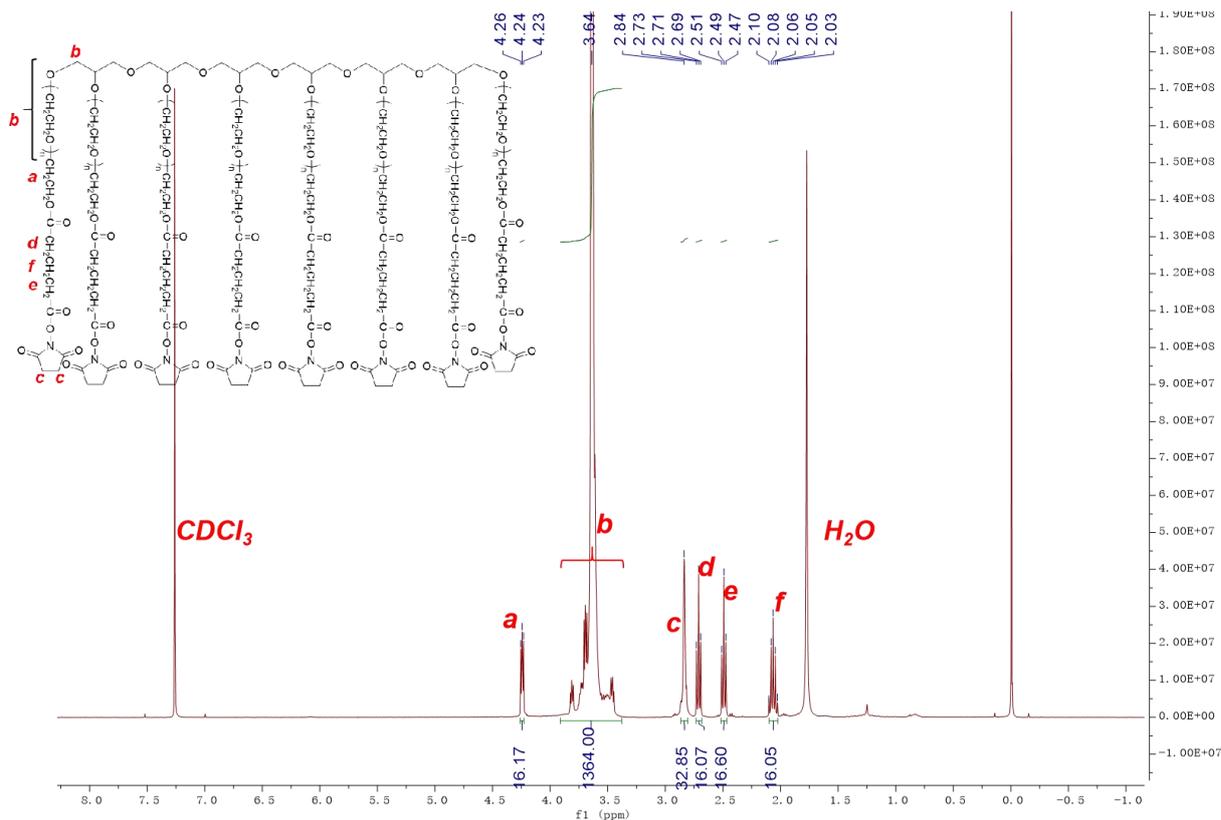
按照如下公式计算产品的取代率:

$$\text{产品取代率} = \frac{A_{\text{Peak2}} \times 100\%}{32}$$

式中:

$A_{\text{Peak2}}$ —产品溶液图谱中 Peak2 的积分 H 个数。

### A.3.2 八臂聚乙二醇琥珀酰亚胺戊二酸酯 (HG):



图A.3.2 八臂聚乙二醇琥珀酰亚胺戊二酸酯 (HG)  $^1\text{H-NMR}$ 图

#### A.3.2.1 $^1\text{H-NMR}$ (400M, $\text{CDCl}_3$ ) 谱图解析如下:

a) 在  $\delta = 4.22 \sim 4.26$  ppm 是一个三重峰，峰面积为 16H，归属为 a 位- $\text{O-CH}_2\text{CH}_2\text{O-C}(\text{O})$ -;

- b) 在  $\delta = 3.37 \sim 3.91$  ppm 是一个多重峰，峰面积为  $(32n+40)H$ ，归属为 b 位的聚乙二醇链重复单元和六聚甘油母核  $-CH_2-O-(CH_2CH_2O)_n-CH_2CH_2O-$ ；
- c) 在  $\delta = 2.80 \sim 2.86$  ppm 是一个单峰，峰面积为  $32H$ ，归属为 c 位的修饰基团 NHS 上  $-C(O)CH_2CH_2C(O)-$ ；
- d) 在  $\delta = 2.68 \sim 2.73$  ppm 是一个三重峰，峰面积为  $16H$ ，归属为 d 位为修饰基团戊二酸的  $-CH_2-O-C(O)-CH_2-$ ；
- e) 在  $\delta = 2.46 \sim 2.51$  ppm 是一个三重峰，峰面积为  $16H$ ，归属为 e 位为修饰基团戊二酸的  $-CH_2-C(O)-O-N-$ ；
- f) 在  $\delta = 2.02 \sim 2.09$  ppm 是一个五重峰，峰面积为  $16H$ ，归属为 f 位为修饰基团戊二酸的  $-CH_2CH_2CH_2-$ ；

### A.3.2.2 取代率计算：

- a) 峰位置校正：CDCl<sub>3</sub> 化学位移为 7.26 ppm。
- b) 积分区间及峰面积标定：

Peak1 区间为 3.37 ~ 3.91 ppm 对应为 b 位的  $-CH_2-O-(CH_2CH_2O)_n-CH_2CH_2O-$ ，自动积分并将 Peak1 的面积设定为 1364；

Peak2 积分区间为 2.80 ~ 2.86 ppm，对应为 c 位的  $-C(O)CH_2CH_2C(O)-$ 。

按照如下公式计算产品的端基取代率：

$$\text{产品取代率} = \frac{A_{\text{Peak2}} \times 100\%}{32}$$

式中：

$A_{\text{Peak2}}$ —产品溶液图谱中 Peak2 的积分 H 个数。

## 附录B

数均分子量 ( $M_n$ ) 的测定

## B.1 原理

仪器主要由两部分组成，基质辅助激光解吸电离离子源 (MALDI) 和飞行时间质量分析器 (TOF)。

MALDI的原理是用激光照射样品与基质形成的共结晶薄膜，基质从激光中吸收能量传递给大分子，而电离过程中将质子转移到大分子或从大分子得到质子，而使大分子电离的过程。因此它是一种软电离技术，适用于混合物及大分子的测定。

TOF的原理是离子在电场作用下加速飞过飞行管道，根据到达检测器的飞行时间不同而被检测即测定离子的质荷比 ( $M/Z$ ) 与离子的飞行时间成正比，检测离子。

## B.2 设备与试剂

仪器：MALDI-TOF/TOF串联质谱仪、分析天平、1 mL和10  $\mu$ L的移液枪；

试剂：乙腈（色谱级）、 $\alpha$ -氰基-4-羟基肉桂酸（HCCA, Suitable for MALDI-TOF MS）。

## B.3 实验步骤

a) 基质的配制：称取16 mg的HCCA溶于1 mL的70%乙腈/0.1%TFA中，配制16.0 mg/mL溶液；

b) 样品处理：称取10 mg待测样品溶于200  $\mu$ L纯水（或四氢呋喃）中，再用纯水（或四氢呋喃）稀释10倍后，取1  $\mu$ L样品和1  $\mu$ L基质溶液于靶位上混合，晾干；

c) 仪器参数的设置：

Voltage polarity	Positive (POS)
PIE delay	370 ns
Ion source voltage 1	20 kV
Ion source voltage 2	18 kV
Lens voltage	8 kV
Linear detector voltage	1.833 kV
Deflection	on true

d) 激光多点轰击，信号累加。

## B.4 结果计算

根据软件处理谱图得出数均分子量 $M_n$ 。

## 附录C

### 多分散系数和标称分子量含量的测定

#### C.1 原理

被测量的高聚物溶液通过一根内装不同孔径的色谱柱，柱中可供分子通行的路径有粒子间的间隙（较大）和粒子内的通孔（较小）。当聚合物溶液流经色谱柱时，较大的分子被排除在粒子的小孔之外，只能从粒子间的间隙通过，速率较快；而较小的分子可以进入粒子中的小孔，通过的速率要慢得多；中等体积的分子可以渗入较大的孔隙中，但受到较小孔隙的排阻，介乎上述两种情况之间。经过一定长度的色谱柱，分子根据相对分子质量被分开，相对分子质量大的在前面（即淋洗时间短），相对分子质量小的在后面（即淋洗时间长）。自试样进柱到被淋洗出来，所接受到的淋出液总体积称为该试样的淋出体积。

#### C.2 设备与试剂

设备：分析天平、凝胶渗透色谱仪（GPC，示差检测器、柱温箱）、色谱柱OHpark KF-G 4.6×10 mm、OHpark KF-804L300×8.0 mm、OHpark KF-803 300 × 8.0 mm顺序串联或具有同等分离效果的其他色谱柱；

试剂：四氢呋喃（色谱级）、聚乙二醇标准品（分子量范围为1000 Da ~ 60000 Da的6-8个标准品）。

#### C.3 溶液配制

标准品溶液的配制：称取10 mg聚乙二醇标准品溶于1mL四氢呋喃中，配制成浓度为10 mg/mL的四氢呋喃溶液；

样品溶液的配制：称取10 mg聚乙二醇样品溶于1mL四氢呋喃中，配制成浓度为10 mg/mL的四氢呋喃溶液。

#### C.4 操作条件

柱温40 °C，流动相为四氢呋喃，等度洗脱，流速1.0 mL/min，进样量20 μL。

#### C.5 步骤

- a) 按照 C.4 操作条件逐一注入标准样品，并制备校准曲线；
- b) 按照 C.4 操作条件注入样品溶液。

#### C.6 结果计算

**C.6.1** 《中华人民共和国药典》（2020年版）四部 0514 “分子排阻色谱法” 中大分子聚合物分子量和分子量分布测定法中的规定使用GPC处理软件处理得到多分散系数；

**C.6.2** 《中华人民共和国药典》（2020年版）四部 0514 “分子排阻色谱法” 中高分子杂质测定法中面积归一化法的规定使用GPC处理软件处理得到标称分子量含量。

## 附录D

### 挥发性有机溶剂残留物的测定

#### D.1 原理

采用顶空气相色谱法使要测定的相关挥发性有机残留溶剂组分分开，用氢火焰离子化检测器检测，并将得到的各个溶剂色谱峰用外标法得到的标准曲线测定得到溶剂残留物的量。

#### D.2 仪器和试剂

仪器：气相色谱仪（配备FID检测器、顶空进样器）、分析天平、色谱柱Capillary Column TC Series Liquid phase: WondaCAP5 0.25 mm × 30 m, df = 0.25 μm 或具有同等分离能力的气相色谱柱，1.0 mL 移液枪；

试剂：二氯甲烷（色谱纯）、甲基叔丁基醚（色谱纯）、异丙醇（色谱纯）、正己烷（色谱纯）、乙酸乙酯（色谱纯）、四氢呋喃（色谱纯）、甲苯（色谱纯）和N, N-二甲基甲酰胺（DMF，色谱纯）。

#### D.3 溶液的制备

##### D.3.1 标准品溶液的配制

溶液1：称取 1000 mg 二氯甲烷用 100 mL DMF溶解，配制成 5 mg/mL的溶液；

溶液2：称取 1000 mg 甲基叔丁基醚用 100 mL DMF溶解，配制成 5 mg/mL的溶液；

溶液3：称取 1000 mg 异丙醇用 100 mL DMF溶解，配制成 5 mg/mL的溶液；

溶液4：称取 1000 mg 正己烷用 100 mL DMF溶解，配制成 5 mg/mL的溶液；

溶液5：称取 1000 mg 乙酸乙酯用 100 mL DMF溶解，配制成 5 mg/mL的溶液；

溶液6：称取 1000 mg 四氢呋喃用 100 mL DMF溶解，配制成 5 mg/mL的溶液；

溶液7：称取 1000 mg 甲苯用 100 mL DMF溶解，配制成 5 mg/mL的溶液；

溶液（标准储备溶液）：用移液枪分别量取溶液1, 2, 3, 4, 5, 6, 7各1.0 mL，用DMF稀释成100 mL，作为标准储备溶液。

分别取上述标准储备溶液2.0 mL定容至10 mL，配制成含二氯甲烷、甲基叔丁基醚、异丙醇、正己烷、乙酸乙酯浓度为10.0 μg/mL的标准品溶液。

##### D.3.2 样品溶液的配制

准确称取待测样品100 mg多臂聚乙二醇琥珀酰亚胺戊二酸酯产品于顶空瓶，用2.0 mL的DMF溶解，样品实际浓度记为C<sub>多臂聚乙二醇琥珀酰亚胺戊二酸酯</sub>。

#### D.4 操作条件

顶空进样器设置：加热温度80 ℃，平衡30 min，阀箱温度115 ℃，管路温度125 ℃，分流比10:1；  
测试设置：进样口温度200 ℃，检测器温度250 ℃，色谱柱流量6.0 mL/min，N<sub>2</sub>吹扫速度3.0 mL/min。  
程序升温程序如下：

升温速率	温度	保留时间
/	35 ℃	5 min
50 ℃/min	200 ℃	10 min

#### D.5 步骤

D.5.1 按照 D.4 操作条件逐一注入标准样品，并制备二氯甲烷、甲基叔丁基醚、异丙醇、正己烷、乙酸乙酯浓度-相应峰面积标准曲线；

D.5.2 按照 D.4 操作条件注入样品溶液。

#### D.6 结果计算

D.6.1 根据二氯甲烷、甲基叔丁基醚、异丙醇、正己烷、乙酸乙酯外标曲线得到样品中相应溶剂的浓度分别为C<sub>二氯甲烷</sub> (μg/mL)、C<sub>甲基叔丁基醚</sub> (μg/mL)、C<sub>异丙醇</sub> (μg/mL)、C<sub>正己烷</sub> (μg/mL)、C<sub>乙酸乙酯</sub> (μg/mL)、C<sub>四氢呋喃</sub> (μg/mL)、C<sub>甲苯</sub> (μg/mL)；

D.6.2 在产品中单个溶剂残留物含量为：

$$W_{\text{二氯甲烷}} = 10^6 \times \frac{C_{\text{二氯甲烷}} \times 10^{-3}}{C_{\text{多臂聚乙二醇琥珀酰亚胺戊二酸酯}}} \text{ ppm}$$

$$W_{\text{甲基叔丁基醚}} = 10^6 \times \frac{C_{\text{甲基叔丁基醚}} \times 10^{-3}}{C_{\text{多臂聚乙二醇琥珀酰亚胺戊二酸酯}}} \text{ ppm}$$

$$W_{\text{异丙醇}} = 10^6 \times \frac{C_{\text{异丙醇}} \times 10^{-3}}{C_{\text{多臂聚乙二醇琥珀酰亚胺戊二酸酯}}} \text{ ppm}$$

$$W_{\text{正己烷}} = 10^6 \times \frac{C_{\text{正己烷}} \times 10^{-3}}{C_{\text{多臂聚乙二醇琥珀酰亚胺戊二酸酯}}} \text{ ppm}$$

$$W_{\text{乙酸乙酯}} = 10^6 \times \frac{C_{\text{乙酸乙酯}} \times 10^{-3}}{C_{\text{多臂聚乙二醇琥珀酰亚胺戊二酸酯}}} \text{ ppm}$$

$$W_{\text{四氢呋喃}} = 10^6 \times \frac{C_{\text{四氢呋喃}} \times 10^{-3}}{C_{\text{多臂聚乙二醇琥珀酰亚胺戊二酸酯}}} \text{ ppm}$$

$$W_{\text{甲苯}} = 10^6 \times \frac{C_{\text{甲苯}} \times 10^{-3}}{C_{\text{多臂聚乙二醇琥珀酰亚胺戊二酸酯}}} \text{ ppm}$$

## 附录E

## 2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚（BHT）含量的测定

## E.1 原理

参考GB/T 22728-2008，采用液相色谱法紫外检测器检测BHT，并将得到的BHT的峰面积使用外标曲线进行测定BHT含量。

## E.2 仪器与试剂

仪器：分析天平、液相色谱仪（配备紫外检测器）、谱宁C18色谱柱（300Å, 5 μm, 4.6 × 250 mm）或具有同等分离效果的色谱柱；

试剂：乙腈（色谱级）、BHT标准品（纯度大于99.0%）。

## E.3 溶液的配制（对照）

## E.3.1 BHT标准品溶液的配制

- a) 称取BHT 25 mg溶于25 mL乙腈中，配制浓度为1 mg/mL溶液；
- b) 取1.0 mL的 a) 溶液稀释，用乙腈定容至100 mL，配制成BHT浓度为10.0 μg/mL的乙腈溶液；

## E.3.2 样品溶液的配制

称取25 mg的多臂聚乙二醇琥珀酰亚胺戊二酸酯样品溶于5 mL乙腈中，配制成浓度为5 mg/mL乙腈溶液，实际浓度记为 $C_{\text{多臂聚乙二醇琥珀酰亚胺戊二酸酯}}$ （mg/mL）。

## E.4 操作条件

柱温40 °C，紫外检测波长210 nm，流速1.0 mL/min，进样量20 μL，流动相为乙腈和水，梯度洗脱如下：

时间	乙腈（%）	水（%）
0 min	40	60
10.0 min	60	40
20.0 min	60	40
22.0 min	100	0
27.0 min	100	0
28.0 min	40	60

30.0 min	40	60
40.0 min	停止	

### E.5 步骤

**E.5.1** 按照 E.4 操作条件逐一注入标准样品，并制备BHT浓度-相应峰面积标准线；

**E.5.2** 按照 E.4 操作条件注入样品溶液。

### E.6 结果计算

**E.6.1** 根据BHT外标法得到样品中BHT的溶度 $C_{\text{BHT}}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) ；

**E.6.2** BHT在产品中的含量为：

$$W_{\text{BHT}} = 10^6 \times \frac{C_{\text{BHT}} \times 10^{-3}}{C_{\text{多臂聚乙二醇琥珀酰亚胺戊二酸酯}}} \text{ ppm}$$

## 附录F

## 二环己基脲（DCU）残留物的测定

## F.1 原理

采用液相色谱法紫外检测器检测DCU，并将得到的DCU的峰面积使用外标曲线进行测定DCU残留物的量。

## F.2 仪器与试剂

仪器：液相色谱仪（配备紫外检测器）、分析天平、谱宁C<sub>18</sub>色谱柱或具有同等分离效果的色谱柱；  
试剂：乙腈（色谱级）、DCU标准品（纯度大于99.0%）。

## F.3 溶液的配制

## F.3.1 DCU标准品溶液的配制

- a) 称取DCU 125 mg溶于100 mL乙腈中，配制1.25 mg/mL的乙腈溶液；
- b) 取1.0 mL上述溶液稀释，定容至100 mL；
- c) 分别取1.0 mL、2.0 mL、5.0 mL、10.0 mL、15.0 mL、20.0 mL稀释溶液分别定容至25 mL，配制成DCU浓度分别为 0.5 μg/mL、1.0 μg/mL、2.5 μg/mL、5.0 μg/mL、7.5 μg/mL、10.0 μg/mL的乙腈溶液；

## F.3.2 样品溶液的配制

称取50 mg的多臂聚乙二醇琥珀酰亚胺戊二酸酯样品溶于10 mL乙腈中，配制成浓度为5 mg/mL的乙腈溶液，实际浓度记为C<sub>多臂聚乙二醇琥珀酰亚胺戊二酸酯</sub>（mg/mL）。

## F.4 操作条件

柱温40 °C，紫外检测波长210 nm，流速1.0 mL/min，进样量20 μL，流动相为乙腈和水，梯度洗脱如下：

时间	乙腈（%）	水（%）
0 min	40	60
5.0 min	40	60
19.0 min	100	0
20.0 min	100	0

21.0 min	40	60
30.0 min	40	60
30.01	停止	

## F.5 步骤

**F.5.1** 按照 F.4 操作条件逐一注入标准样品，并制备DCU浓度-相应峰面积标准曲线；

**F.5.2** 按照 F.4 操作条件注入样品溶液。

## F.6 结果计算

**F.6.1** 根据DCU外标曲线得到样品中DCU的浓度 $C_{DCU}$  ( $\mu\text{g/mL}$ )；

**F.6.2** DCU在产品中的残留量为：

$$W_{DCU} = 10^6 \times \frac{C_{DCU} \times 10^{-3}}{C_{\text{多臂聚乙二醇琥珀酰亚胺酸二胺}}} \text{ ppm}$$

## 附录G

### 交联度的测定

#### G.1 原理

产品交联后，粉剂n-arm-PEG-SG与伯胺发生亲核取代反应，n-arm-PEG-SG上的-NHS会以单体形式存在，N-羟基丁二酰亚胺（NHS）单体在波长260 nm处有最大吸收。通过紫外分光光度法测定NHS单体的含量，从而计算产品的交联度。

#### G.2 设备

紫外分光光度计

#### G.3 试剂

N-羟基丁二酰亚胺为对照品：纯度不小于98%（对照品名称：N-羟基丁二酰亚胺，CAS号：6066-82-6）。

pH值为7.4 PBS缓冲溶液：精密称取氯化钠8.0 g、氯化钾0.2 g、十二水合磷酸氢二钠2.9 g和磷酸二氢钾0.2 g，用超纯水中溶解，用磷酸调节pH到7.4，最后定容到1000 mL。

#### G.4 操作步骤

##### G.4.1 标准曲线

称取N-羟基丁二酰亚胺对照品（对照品名称：N-羟基丁二酰亚胺，CAS号：6066-82-6）5 mg至100 mL容量瓶中，用PBS缓冲溶液溶解并稀释至刻度，作为对照品储备溶液。

精密吸取对照品储备溶液适量，置于10ml容量瓶中，用pH值为7.4 PBS缓冲溶液逐级稀释得到质量浓度为2.0 μg/mL，4.0 μg/mL，6.0 μg/mL，8.0 μg/mL、10.0 μg/mL N-羟基丁二酰亚胺对照品溶液，用紫外分光光度计测量其在最大吸收波长260 nm处的吸收值，以浓度为横坐标，吸光度为纵坐标做标准曲线。

##### G.4.2 样品检测

准确制备1 mL的凝胶，将凝胶置于50 mL烧杯中，精密加入25倍凝胶体积的pH值为7.4 PBS缓冲溶液封口，将烧杯置于37℃生化培养箱中浸提5 h，取上述浸提液稀释25倍作为检验液，测定其吸光度值。根据标准曲线计算N-羟基丁二酰亚胺（NHS）含量。然后将N-羟基丁二酰亚胺总含量与凝胶中N-羟基丁二酰亚胺理论释放值（m）相比较，计算出凝胶交联度。

###### G.4.2.1 N-羟基丁二酰亚胺理论释放值（m）的计算：

$$m = \frac{n \times 520 \times M_0 \times m_1}{5 \times M_1 \times d} \times 10^3$$

式中：

$m$  -理论释放值， $\mu\text{g}$ 。

$M_0$  -N-羟基丁二酰亚胺的相对分子量，数值为115；

$M_1$  -n-arm-PEG-SG的相对分子量；

$d$  -凝胶密度，数值为1 g/mL（或根据各种水凝胶检测）；

$m_1$  -凝胶重量，g；

**G.4.2.2 交联度的计算：**

$$Xi = \frac{25 \times Ci \times V}{m} \times 100\%$$

式中：

$Xi$  -交联度，%；

$Ci$  -标准曲线查得的N-羟基丁二酰亚胺的质量浓度， $\mu\text{g/mL}$ ；

$V$  -加入25倍凝胶体积的pH值为7.4 PBS缓冲溶液的量，mL；

$m$  -理论释放值， $\mu\text{g}$ 。