

ICS 11.040.40
CCS C 35

T/CSBM

团 体 标 准

T/CSBM 0032—2023

同种异体产品中有机溶剂残留量测定指南

Test guidance for organic solvent residuals of allogeneic grafts

2023 - 04 - 24 发布

2023 - 10 - 01 实施

中国生物材料学会 发布

目 次

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 浸提液制备	2
5 测定方法	2
6 允许限量的确定	3
附录 A (规范性) 同种异体骨、半月板中乙醇残留量测定方法	4
附录 B (规范性) 同种异体骨、半月板中曲拉通 X-100 残留量测定方法 高效液相色谱法	7
附录 C (规范性) 同种异体骨、半月板中甲醇残留量测定方法 气相色谱法	9
附录 D (规范性) 同种异体骨、半月板中氯仿残留量测定方法 气相色谱法	10
附录 E (规范性) 同种异体骨、半月板中异丙醇残留量测定方法 气相色谱法	12
附录 F (规范性) 同种异体骨、半月板中过氧乙酸残留量测定方法 间接碘量法	14
附录 G (规范性) 同种异体骨、半月板中十二烷基硫酸钠残留量测定方法 亚甲基蓝-紫外可见分光光度计检测法	16
附录 H (规范性) 脱细胞异体真皮、敷料皮、补片中乙醇残留量测定方法	18
附录 I (规范性) 脱细胞异体真皮、敷料皮、补片中异丙醇残留量测定方法 气相色谱法	20
附录 J (规范性) 脱细胞异体真皮、敷料皮、补片中甲醛残留测定方法 乙酰丙酮法	21
附录 K (规范性) 脱细胞异体真皮、敷料皮、补片中戊二醛残留量测定方法 高效液相色谱法	23
附录 L (规范性) 脱细胞异体真皮、补片中十二烷基硫酸钠残留量测定方法	25
附录 M (规范性) 脱细胞异体真皮、敷料皮、补片中聚山梨酯 80 残留量测定方法 紫外可见分光光度计检测法	28
附录 N (规范性) 同种异体肌腱修复材料中乙醇残留量测定方法	30
附录 O (规范性) 生物羊膜中硫酸庆大霉素残留量测定方法	31
参考文献	34

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。

本文件由中国生物材料学会提出。

本文件由中国生物材料学会团体标准化技术委员会归口。

本文件起草单位：中国食品药品检定研究院、华南理工大学、西安石油大学、北京科健生物技术有限公司、北京鑫康辰医学科技发展有限公司、北京清源伟业生物组织工程科技有限公司、北京桀亚莱福生物技术有限责任公司、江西瑞济生物工程技术股份有限公司、江西省科星生物工程有限公司、北京运康恒业生物技术有限公司、上海亚朋生物技术有限公司。

本文件主要起草人：付步芳、郝丽静、林春玲、陈卓颖、刘子琪、李智峰、袁军林、李燕青、孙继煌、胡冠君、雷良伟、王巍、陈云华、汪晶晶、刘伟、刘璟、王召旭。

引 言

同种异体产品是指从人类不同个体内获取与制备的组织，经清洗、病毒灭活、脱脂肪、成型、冻干、灭菌等工艺加工处理而成的产品。同种异体产品在生产加工过程中，会用到多种有机溶剂，如乙醇、异丙醇、丙三醇、戊二醛、氯仿等，这些有机溶剂如果在工艺过程中未能有效去除，将会给使用者带来不同程度的危害，因此对该类产品中有机溶剂残留的检测和控制非常必要。

目前，我国同种异体医疗器械产品相关的行业标准YY/T 0513.1《同种异体修复材料 第1部分：组织库基本要求》、YY/T 0513.2《同种异体修复材料 第2部分：深低温冷冻骨和冷冻干燥骨》、YY/T 0513.3《同种异体修复材料 第3部分：脱矿骨》，均没有涉及该类产品中有机溶剂残留量的要求和试验方法，不利于相关产品的质量控制和安全性保障。

本文件给出了同种异体产品中有机溶剂残留量的测定指南，可以作为相关行业标准的有益补充。由于不同品种的产品在临床的应用情况有很大的差异，本文件所给出的方法不一定适用于所有产品。因此，任何表明其分析可靠的方法，都可以使用。“分析可靠”是指器械产品在特定浸提条件下获得的浸提液进行有机溶剂残留量测定时，所选择的方法具有足够的准确性、重复性、灵敏度和选择性，以及良好的线性和可接受的检测限。

同种异体产品中有机溶剂残留量测定指南

1 范围

本文件规定了同种异体产品中有机溶剂残留量的测定方法指南。
本文件适用于同种异体产品中有机溶剂残留量的测定。

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 16886.17 医疗器械生物学评价 第17部分：可沥滤物允许限量的建立
中华人民共和国药典（2020年版四部）（国家药监局 国家卫生健康委 2020年第78号）

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

同种异体产品 allogeneic products

从人类不同个体内获取与制备的组织，经清洗、病毒灭活、脱脂肪、成型、冻干、灭菌等工艺加工处理而成的产品。

[来源：YY/T 0513.2—2020，3.1，有修改]

3.2

浸提液 extract

由试验样品或对照样品浸提而得的液体。

[来源：GB/T 16886.12—2017，3.7]

3.3

残留溶剂 residual solvents

在产品生产中使用的，但在工艺过程中未能完全去除的溶剂。

[来源：《中华人民共和国药典》（2020年版），四部通则0861，有修改]

3.4

加严浸提 exaggerated extraction

与临床使用条件下产生的化学成分相比，旨在释放更多化学成分的浸提。

注：重要的是确保加严浸提不会导致材料或被提取物质发生化学变化。

[来源：ISO 10993—18:2020，3.14]

3.5

极限浸提 exhaustive extraction

进行多次浸提，直到在随后的浸提中提取的物质的重量（或用其他方式度量）小于在初次浸提中确定量的10%。

[来源：ISO 10993—18:2020，3.15]

3.6

模拟使用浸提 simulated-use extraction

使用模拟临床使用的方法进行的浸提。

[来源: ISO 10993—18:2020, 3.35]

4 浸提液制备

4.1 总则

同种异体产品中有机溶剂残留量测定的浸提液制备方法通常有极限浸提、加严浸提和模拟使用浸提等, 由于极限浸提操作简单, 浸提效率高、便于测试等优点, 广泛应用于残留溶剂测定的浸提液制备。

4.2 浸提容器

浸提容器宜使用硼硅酸盐玻璃容器, 带磨口玻璃塞, 或带惰性材料密封垫(如聚四氟乙烯)的螺口盖。

4.3 浸提溶剂

如果待测溶剂易溶于水, 优先选用水作为浸提溶剂; 如果待测溶剂难溶或不溶于水, 应选择能将其溶解的浸提溶剂, 但不应溶解主体材料, 所选的浸提溶剂不应干扰待测溶剂的测定。

4.4 浸提比例

除另有规定外, 同种异体的骨科材料、肌腱、半月板、神经, 一般按0.1 g~0.2 g样品加1 mL浸提溶剂的比例来浸提; 同种异体的敷料皮、真皮、补片、羊膜等薄膜类产品, 一般按0.5 cm²~6.0 cm²样品加1 mL浸提溶剂的比例来浸提, 浸提前须将样品切成不大于5 mm长的小段, 浸提溶剂须能浸没样品。

4.5 其它浸提条件

4.5.1 其他浸提条件包括浸提时间、温度、是否动态浸提(超声、振荡)。

4.5.2 采用顶空气相色谱法测定时, 通常选择在线浸提方式。以水为浸提溶剂时, 顶空瓶平衡温度为60 °C~85 °C, 顶空瓶平衡时间为30 min~60 min。以水之外的其它溶剂为浸提溶剂时, 顶空瓶平衡温度应至少比浸提溶剂的沸点低10 °C。

4.5.3 采用溶液直接进样气相色谱法测定或高效液相法、紫外法等方法测定时, 通常选择离线浸提方式。由于大多数有机溶剂易挥发, 除另有规定外, 浸提温度一般不高于37 °C, 浸提时间不超过72 h。超声、振荡等动态浸提方式有助于提高浸提效率, 缩短浸提时间。

5 测定方法

同种异体产品按来源可分为同种异体骨、半月板, 脱细胞异体真皮、敷料皮、补片, 同种异体肌腱修复材料, 生物羊膜等, 其可能存在的有机溶剂残留及相应的检测方法举例见表1。

表1 同种异体产品可能存在的有机溶剂残留和测定方法举例

产品名称	可能存在的	测定方法名称举例 (不限于)	具体方法 (不限于)
同种异体骨、半月板	乙醇	顶空气相色谱法 (HS-GC) 康卫皿扩散法	附录A
	曲拉通X-100	高效液相色谱法 (HPLC)	附录B
	甲醇	顶空气相色谱法 (HS-GC)	附录C
	氯仿	顶空气相色谱法 (HS-GC)	附录D
	异丙醇	顶空气相色谱法 (HS-GC)	附录E
	过氧乙酸	间接碘量法	附录F
	十二烷基硫酸钠	紫外可见分光光度法 (UV)	附录G
脱细胞异体真皮、敷料皮、 补片	乙醇	顶空气相色谱法 (HS-GC) 康卫皿扩散法	附录H
	异丙醇	顶空气相色谱法 (HS-GC)	附录I
	甲醛	紫外可见分光光度法 (UV)	附录J
	戊二醛	高效液相色谱法 (HPLC)	附录K
	十二烷基硫酸钠	紫外可见分光光度法 (UV)	附录L
同种异体肌腱修复材料	乙醇	顶空气相色谱法 (HS-GC)	附录N
		康卫皿扩散法	
生物羊膜	硫酸庆大霉素	管碟法 ELISA检测试剂盒法	附录O
<p>注1: 使用该标准中方法检测时, 如供试液中待测物质含量小于标准曲线最小浓度, 建议给出检出限。检出限确定方法可参考《中华人民共和国药典》(2020年版四部) 9101分析方法验证指导原则进行。</p> <p>注2: 在有机溶剂检测过程中, 若检出其它未知成分, 可采用气相色谱-质谱联用 (GC-MS), 液相色谱-质谱联用 (LC-MS) 等方法进行定性和进一步的定量分析。</p>			

6 允许限量的确定

同种异体产品中有机溶剂残留允许限量可参照《中华人民共和国药典》(2020年版四部) 通则0861 残留溶剂测定法附表1和GB/T 16886.17, 并结合产品的预期用途来确定。

附录 A

(规范性)

同种异体骨、半月板中乙醇残留量测定方法

A.1 气相色谱法

A.1.1 原理

气相色谱法是利用气体(载气)作为流动相的色谱分析方法。气化的试样被载气带入色谱柱中,由于色谱柱中的固定相与试样中各组分分子作用力不同,使得各组分从色谱柱中流出的时间不同,因而各组分能够实现彼此分离。用数据处理系统记录色谱信号,信号强度(峰高或峰面积)与试样中各组分浓度呈比例关系,通过对标准溶液浓度和对应峰高或峰面积作图绘制标准曲线,可对供试品溶液中目标物质进行定量分析。

A.1.2 仪器与试剂

A.1.2.1 气相色谱仪:配备氢火焰离子化检测器(FID)。

A.1.2.2 恒温摇床。

A.1.2.3 电子天平:精度0.1 mg。

A.1.2.4 无水乙醇。

A.1.3 参考色谱条件

参考色谱条件如下:

——色谱柱:DM-624(30 m×0.32 mm×1.8 μm)或等效色谱柱;

注:等效色谱柱是指制造商或牌号不同,但固定相、柱长、内径、膜厚都相同的色谱柱。下同。

——平衡温度:80 °C;

——平衡时间:30 min;

——柱温:初温40 °C,保持5 min,以10 °C/min升至100 °C,再以20 °C/min升至240 °C,保持2 min;

——检测器:氢火焰离子化检测器(FID);

——载气:N₂;

——进样口温度:160 °C;

——检测器温度:250 °C;

——载气流速:1.5 mL/min;

——分流比:20:1。

A.1.4 溶液制备

A.1.4.1 标准溶液

精密称取0.5 g乙醇,纯化水定容至100 mL,作为储备液;再将该溶液用纯化水依次稀释,配制成浓度在5 μg/mL~500 μg/mL范围内的至少5个不同浓度的系列标准溶液。

A.1.4.2 供试品溶液

随机取同种异体骨或半月板产品,如果产品是大固体状态,应切割成不大于5 mm的小块,精密称取重量并记录。按材料质量与浸提液体积比1 g:5 mL比例,加入纯化水浸提,37 °C±1 °C振荡浸提24 h±2

h, 振荡速率100 rpm±10 rpm。冷却至室温后, 分离出所有浸提液再重复浸提一次, 分别吸取两次浸提液各2 mL混合作为供试品溶液。不加样品, 同法制备空白对照液。

A. 1. 5 测定

A. 1. 5. 1 依次量取空白对照液、供试品溶液、系列标准溶液各 1 mL 于顶空瓶中, 在 A. 1. 3 色谱条件下进行测试。

A. 1. 5. 2 记录色谱图, 根据标准曲线方程, 用外标法计算供试品溶液中乙醇的浓度, 再按式 (A. 1) 计算供试品中乙醇的含量。

$$X_1 = \frac{C_1 \times V_1}{W_1} \dots\dots\dots (A. 1)$$

式中:

X_1 ——供试品中乙醇的含量, $\mu\text{g/g}$;

C_1 ——供试品溶液中乙醇浓度, $\mu\text{g/mL}$;

V_1 ——两次浸提液总体积, mL;

W_1 ——供试品称样量, g。

A. 2 康卫皿扩散法

A. 2. 1 原理

本法依据乙醇在饱和碳酸钠溶液中加热逸出, 被重铬酸钾-硫酸溶液吸收后呈现黄绿色至绿色的现象, 用比色法在650 nm处测定样品中乙醇残留量。

A. 2. 2 仪器与试剂

A. 2. 2. 1 康卫皿。

A. 2. 2. 2 紫外可见分光光度计。

A. 2. 2. 3 烘箱。

A. 2. 2. 4 电子天平 (精度 0. 1 mg)。

A. 2. 2. 5 无水乙醇。

A. 2. 2. 6 硫酸。

A. 2. 2. 7 重铬酸钾。

A. 2. 2. 8 无水碳酸钠。

注: 所用试剂均为分析纯以上。

A. 2. 3 溶液配制

A. 2. 3. 1 重铬酸钾-硫酸溶液

称取重铬酸钾3. 7 g, 加水150 mL, 充分溶解后缓慢加入硫酸280 mL, 放冷, 加水至500 mL。

A. 2. 3. 2 饱和碳酸钠溶液

称取碳酸钠适量, 加入适量的水, 充分摇匀使成饱和溶液, 取上清液。

A. 2. 3. 3 供试品溶液

同A. 1. 4. 2。

A. 2. 4 测定

在康卫皿外圈的突出部位均匀的涂抹凡士林，量取重铬酸钾-硫酸溶液2.0 mL加入内圈中，量取饱和碳酸钠溶液1.5 mL和供试品溶液1.5 mL加入外圈中，立即加盖玻璃板（粗糙面向下）密封扩散皿，摇匀。80 °C反应30 min后，取内圈溶液，采用紫外可见分光光度计，在波长650 nm处测定吸光度（A1）。精密量取无水乙醇适量，加水制成每1 mL中含有乙醇X mg的溶液，即为对照品溶液。精密量取对照品溶液1.5 mL替代供试品，同法操作，测定吸光度（A2）。A1不应大于A2。

注：对照品溶液：根据产品中乙醇的限量要求和浸提液制备的比例确定X的值，例如：若乙醇的限量要求 $\leq 0.5\%$ ，样品质量与浸提介质体积比为1 g: 5 mL，则X的值为1。

附录 B

(规范性)

同种异体骨、半月板中曲拉通 X-100 残留量测定方法 高效液相色谱法

B.1 原理

高效液相色谱法是采用高压输液泵将规定的流动相泵入装有填充剂的色谱柱,对供试品进行分离测定的色谱方法。注入的供试品由流动相带入色谱柱内,各组分从色谱柱中流出的时间不同,因而各组分能够实现彼此分离。用数据处理系统记录色谱信号,信号强度(峰高或峰面积)与试样中各组分浓度呈比例关系,通过对标准溶液浓度和对应峰高或峰面积作图绘制标准曲线,可对供试品溶液中目标物质进行定量分析。

B.2 仪器与试剂

B.2.1 高效液相色谱仪: 配备二极管阵列检测器(DAD)。

B.2.2 超声波清洗仪。

B.2.3 电子天平: 精度0.1 mg。

B.2.4 曲拉通X-100。

B.2.5 甲醇(色谱纯)。

B.3 参考色谱条件

参考色谱条件如下:

——色谱柱: 90 Å 4.6×250 mm×5 μm 或等效色谱柱;

——流动相: 水: 甲醇(v/v)=15: 85;

——柱温: 35 °C;

——流速: 0.8 mL/min;

——进样量: 20 μL;

——检测波长: 225 nm;

——监测时间: 10 min。

B.4 溶液制备

B.4.1 标准溶液

精密称取0.01 g曲拉通 X-100, 甲醇定容至100 mL, 作为储备液; 再将该溶液用甲醇依次稀释, 配成浓度在0.5 μg/mL~10 μg/mL范围内的至少5个不同浓度的标准溶液。

B.4.2 供试品溶液

随机选取同种异体骨或半月板产品, 如果产品是大固体状态, 应切割成不大于5 mm的小块, 精密称取样品于玻璃瓶中, 按样品质量与浸提液体积比1 g: 5 mL加入对应体积甲醇浸没。室温下超声浸提30 min后, 取浸提液1 mL经0.45 μm滤膜过滤后作为供试品溶液。取甲醇, 不加样品同法制备空白溶液。

B.5 测定

B.5.1 依次取空白溶液、供试品溶液、不同浓度标准溶液1 mL于液相小瓶中, 在B.1.3色谱条件下进行测试。

B.5.2 记录色谱图，根据标准曲线方程，用外标法计算供试品溶液中曲拉通X-100的浓度，再按式（B.1）

1) 计算供试品中曲拉通X-100的含量X。

$$X_2 = \frac{C_2 \times V_2}{W_2} \dots\dots\dots (B.1)$$

式中：

X_2 ——供试品中曲拉通X-100的含量， $\mu\text{g/g}$ ；

C_2 ——供试品溶液中曲拉通X-100浓度， $\mu\text{g/mL}$ ；

V_2 ——两次浸提液总体积， mL ；

W_2 ——供试品称样量， g 。

附录 C

(规范性)

同种异体骨、半月板中甲醇残留量测定方法 气相色谱法

C.1 原理

同A.1.1。

C.2 仪器与试剂

C.2.1 气相色谱仪：配备氢火焰离子化检测器（FID）。

C.2.2 恒温摇床。

C.2.3 电子天平：精度0.1 mg。

C.2.4 甲醇（色谱纯）。

C.3 参考色谱条件

同A.1.3。

C.4 溶液制备

C.4.1 标准溶液

精密称取0.3 g甲醇，加入纯化水定容至100 mL，作为标准贮备液。用纯化水依次稀释，配成浓度在3 μg/mL~300 μg/mL范围内的至少5个不同浓度的标准溶液。

C.4.2 样品溶液

同A.1.4.2。

C.5 测定

C.5.1 依次取空白溶液、样品溶液、不同浓度标准溶液1 mL于顶空瓶中，在上述检测条件下进行测试。

C.5.2 记录色谱图，根据标准曲线方程，用外标法计算供试品溶液中甲醇的浓度，再按式（C.1）计算供试品中甲醇的含量。

$$X_3 = \frac{C_3 \times V_3}{W_3} \dots\dots\dots (C.1)$$

式中：

 X_3 ——供试品中甲醇的含量，μg/g； C_3 ——供试品溶液中甲醇浓度，μg/mL； V_3 ——两次浸提液总体积，mL； W_3 ——供试品称样量，g。

附录 D

(规范性)

同种异体骨、半月板中氯仿残留量测定方法 气相色谱法

D.1 原理

同A.1.1。

D.2 仪器与试剂

D.2.1 气相色谱仪：配备氢火焰离子化检测器（FID）。

D.2.2 电子天平：精度0.1 mg。

D.2.3 氯仿（色谱纯）。

D.3 参考色谱条件

参考色谱条件如下：

——色谱柱：DM-624（30 m×0.32 mm×1.8 μm）或等效色谱柱；

——平衡温度：80 °C；

——平衡时间：40 min；

——柱温：初温 40 °C，保持 5 min，以 10 °C/min 升至 100 °C，保持 0 min，再以 20 °C/min 升至 240 °C，保持 2 min；

——检测器：氢火焰离子化检测器（FID）；

——载气：N₂；

——进样口温度：160 °C；

——检测器温度：250 °C；

——载气流速：1.5 mL/min；

——分流比：20:1。

D.4 溶液制备

D.4.1 标准溶液

精密称取0.01 g氯仿，纯化水定容至100 mL，作为标准贮备液；用纯化水依次稀释标准贮备液，配成浓度在2-24 μg/mL范围内的至少5个不同浓度的氯仿系列标准溶液。

D.5 测定

D.5.1 随机选取同种异体骨或半月板产品，如果产品是大固体状态，应切割成不大于5 mm的小块，精密称取0.4 g样品于顶空瓶中，加入2 mL纯化水浸没，压盖密封，作为供试品组。再依次取纯化水、系列标准溶液2 mL于顶空瓶中，压盖密封。在D.1.3色谱条件下进行检测。

D.5.2 记录色谱图，根据标准曲线方程，用外标法计算供试品溶液中氯仿的浓度，再按式（D.1）计算供试品中氯仿的含量。

$$X_4 = \frac{C_4 \times V_4}{W_4} \dots\dots\dots (D.1)$$

式中：

X₄——供试品中氯仿的含量，μg/g；

C_4 ——供试品溶液中氯仿浓度， $\mu\text{g}/\text{mL}$ ；

V_4 ——两次浸提液总体积， mL ；

W_4 ——供试品称样量， g 。

附录 E

(规范性)

同种异体骨、半月板中异丙醇残留量测定方法 气相色谱法

E.1 原理

同A.1.1。

E.2 仪器与试剂

E.2.1 气相色谱仪：配备氢火焰离子化检测器（FID）。

E.2.2 恒温摇床。

E.2.3 电子天平：精度0.1 mg。

E.2.4 异丙醇（分析纯以上）。

E.3 参考色谱条件

参考色谱条件如下：

——色谱柱：DM-624（30 m×0.32 mm×1.8 μm）或等效色谱柱；

——平衡温度：80 °C；

——平衡时间：30 min；

——柱温：初温 50 °C，保持 1 min，以 10 °C/min 升至 160 °C，保持 1 min；

——检测器：氢火焰离子化检测器（FID）；

——载气：N₂；

——进样口温度：160 °C；

——检测器温度：250 °C；

——载气流速：2 mL/min；

——分流比：20:1。

E.4 溶液制备

E.4.1 标准溶液

精密称取0.5 g异丙醇，加入纯化水定容至100 mL，作为储备液；再将该溶液用纯化水依次稀释，配成浓度在5 μg/mL～500 μg/mL范围内的至少5个不同浓度的标准溶液。

E.4.2 供试品溶液

同A.1.4.2。

E.5 测定

依次取空白溶液、样品溶液、不同浓度标准溶液1 mL于顶空瓶中，在上述检测条件下进行测试。记录色谱图，根据标准曲线方程，用外标法计算供试品溶液中异丙醇的浓度，再按式（E.1）计算供试品中异丙醇的含量。

$$X_5 = \frac{C_5 \times V_5}{W_5} \dots\dots\dots (E.1)$$

式中：

X_5 ——供试品中异丙醇的含量， $\mu\text{g/g}$ ；

C_5 ——供试品溶液中异丙醇浓度， $\mu\text{g/mL}$ ；

V_5 ——两次浸提液总体积， mL ；

W_5 ——供试品称样量， g 。

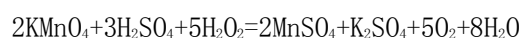
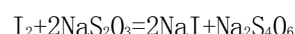
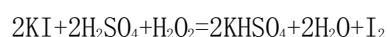
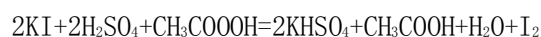
附录 F

(规范性)

同种异体骨、半月板中过氧乙酸残留量测定方法
间接碘量法

F.1 原理

采用间接碘量法测定样品中全部过氧化物的量；在酸性条件下，采用高锰酸钾标准滴定溶液滴定得到过氧化氢的含量。用过氧化物的量减去过氧化氢的量，计算得到过氧乙酸含量，反应方程式如下：



F.2 仪器与试剂

F.2.1 电子天平：精度0.1 mg。

F.2.2 碘量瓶。

F.2.3 滴定管。

F.2.4 硫酸：分析纯以上。

F.2.5 可溶性淀粉。

F.2.6 碘化钾溶液：100 mg/mL。

F.2.7 钼酸铵溶液：30 mg/mL。

F.2.8 硫酸锰溶液：100 mg/mL。

F.2.9 淀粉指示液：10 mg/mL。

F.2.10 硫酸：1+9。

F.2.11 硫代硫酸钠标准滴定溶液： $c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3)=0.1\text{ mol/L}$ 。

F.2.12 高锰酸钾标准滴定溶液： $c(\text{KMnO}_4)=0.02\text{ mol/L}$ 。

F.3 溶液制备

F.3.1 高锰酸钾标准溶液

取高锰酸钾标准滴定溶液稀释10倍待用。

F.3.2 硫代硫酸钠标准滴定溶液

取硫代硫酸钠标准滴定溶液稀释10倍待用。

F.3.3 供试品溶液

精密称量约1 g同种异体骨或半月板产品，如果产品是大固体状态，应切割成不大于5 mm的小块，加入10 mL纯化水， $37\text{ }^\circ\text{C}\pm 1\text{ }^\circ\text{C}$ 振荡浸提 $24\text{ h}\pm 2\text{ h}$ ，振荡速率为 $100\text{ rpm}\pm 10\text{ rpm}$ 。冷却至室温后，吸取浸提液，置于 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 下备用。

F.4 测定

在碘量瓶中加入6 mL 10 °C 以下的水、1 mL 硫酸溶液和3滴钼酸铵溶液，再加入4 mL 供试品溶液，2 mL 碘化钾溶液，水封瓶塞摇匀，在暗处放置5 min~10 min，用硫代硫酸钠标准滴定溶液滴定，接近终点时（溶液呈淡黄色）加入0.2 mL 淀粉指示液，继续滴定至蓝色消失，并保持30 s 不变为终点。记录消耗硫代硫酸钠标准滴定溶液的体积数值。在锥形瓶中加入6 mL 10 °C 以下的水、2 mL 硫酸溶液和3滴硫酸锰溶液，再加入4 mL 供试品溶液，摇匀，用高锰酸钾标准滴定溶液滴定至溶液呈浅粉色。记录消耗高锰酸钾标准滴定溶液的体积数值。

F.5 结果计算

按式（F.1）计算过氧乙酸的质量分数。

$$w = \frac{\left(\frac{1}{2} \times V_6 \times c_1 - \frac{5}{2} \times V_7 \times c_2\right) \times \frac{m}{1000}}{m} \times \frac{10}{4} \times 100 \% \dots\dots\dots (F.1)$$

式中：

- w ——过氧乙酸的质量分数，%；
- V_6 ——硫代硫酸钠标准滴定溶液滴定体积数值，mL；
- c_1 ——硫代硫酸钠标准滴定溶液浓度，mol/L；
- V_7 ——高锰酸钾标准滴定溶液滴定体积数值，mL；
- c_2 ——高锰酸钾标准滴定溶液实际浓度，mol/L；
- m ——供试品称样量，g；
- 4——滴定中所取供试品溶液体积，mL；
- 10——浸提液体积，mL；
- M ——过氧乙酸的摩尔质量数值，76.05 g/mol。

附录 G

(规范性)

同种异体骨、半月板中十二烷基硫酸钠残留量测定方法
亚甲基蓝-紫外可见分光光度计检测法

G.1 原理

十二烷基硫酸钠 (SDS) 可与亚甲基蓝结合形成蓝色复合物, 通过氯仿萃取, 采用紫外可见分光光度计在 651 nm 波长处对氯仿中蓝色复合物进行检测, 其吸光度值与 SDS 浓度呈正比关系。通过对标准溶液浓度和对应吸光度值作图绘制标准曲线, 可对供试品溶液中 SDS 进行定量分析。

G.2 仪器与试剂

- G.2.1 紫外可见分光光度计。
- G.2.2 超声清洗仪。
- G.2.3 离心机。
- G.2.4 涡旋混合器。
- G.2.5 电子天平: 精度 0.1 mg。
- G.2.6 氯仿。
- G.2.7 亚甲基蓝。
- G.2.8 无水硫酸钠。
- G.2.9 硫酸。
- G.2.10 碳酸钠溶液: 10 mmol/L。
- G.2.11 甲醇。
- G.2.12 十二烷基硫酸钠: 分析纯以上。

G.3 溶液制备

G.3.1 亚甲基蓝溶液

称取亚甲基蓝 0.025 g, 无水硫酸钠 5 g, 用 100 mL 水溶解, 加浓硫酸 1 mL, 混匀。

G.3.2 甲醇-碳酸钠溶液

取甲醇、碳酸钠溶液等体积混合。

G.3.3 SDS 标准溶液制备

精密称取 SDS 适量, 加甲醇-碳酸钠溶液溶解定容, 配制浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ SDS 标准溶液。再依次稀释得到浓度在 0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~ 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内至少 5 个不同浓度标准溶液。

G.3.4 供试品溶液制备

精密称取同种异体骨或半月板产品约 0.8 g 于玻璃瓶中, 如果产品是大固体状态, 应切割成不大于 5 mm 的小块, 加入 4 mL 甲醇-碳酸钠溶液, 室温下超声浸提 30 min。吸取出所有浸提液, 再加入 4 mL 甲醇-碳酸钠溶液, 超声浸提 30 min。若浸提液出现浑浊, 对浸提液采用 3000 r/min 离心 10 min 或 0.45 μm 滤膜过滤方式使浸提液呈澄清透明状。依次取各浸提液 1 mL 混合均匀作为供试品溶液。

G.3.5 测定

G.3.5.1 取 1 mL SDS 系列标准溶液、供试品溶液、空白溶液于离心管中，分别加入亚甲基蓝溶液 1 mL，采用涡旋混合器充分混匀，加入氯仿 6 mL，上下剧烈振荡 30 s 使充分萃取，以 2 000 r/min 离心 5 min，吸弃溶液上层。在保留有溶液下层的每一试管中加入无水硫酸钠（约 1 g，不定量），即刻混匀后，以 2000 r/min 离心 5 min。取试管内澄清溶液在 651 nm 波长处测定吸光度。

G.3.5.2 根据标准溶液浓度和对应吸光度绘制线性回归方程，并代入供试品吸光度值计算得到供试品溶液中 SDS 浓度，再按式（G.1）计算供试品中 SDS 的含量。

$$X_6 = \frac{C_6 \times 8}{W_6} \dots\dots\dots (G.1)$$

式中：

X_6 ——供试品中 SDS 的含量， $\mu\text{g/g}$ ；

C_6 ——供试品溶液中 SDS 浓度， $\mu\text{g/g}$ ；

8——两次浸提液总体积，mL；

W_6 ——供试品称样量，g。

附录 H

(规范性)

脱细胞异体真皮、敷料皮、补片中乙醇残留量测定方法

H.1 气相色谱法

H.1.1 检测方法与标准溶液制备

同附录A.1。

H.1.2 供试品溶液制备

H.1.2.1 脱细胞异体真皮、补片供试品溶液

H.1.2.1.1 取湿态样品，用滤纸吸去表面水分，将其裁剪成1 cm×1 cm碎片置于玻璃瓶中，按照样品面积（双面）与纯化水体积比1.25 cm²:1 mL加入对应体积纯化水浸没样品，加盖后于37℃±1℃振荡浸提24 h±2 h，振荡速率为100 rpm±10 rpm。结束后将样品与液体分离，冷却至室温作为检验液。

H.1.2.1.2 取干态样品，将其裁剪成1 cm×1 cm碎片置于玻璃瓶中，与H.1.2.1.1同法操作。

H.1.2.2 敷料皮供试品溶液

取湿态样品，用滤纸吸去表面水分，将其裁剪成1 cm×1 cm碎片置于玻璃瓶中，按照样品单面面积与纯化水体积比1.25 cm²:1 mL加入对应体积纯化水浸没样品，加盖后于37℃±1℃振荡浸提24 h±2 h，振荡速率为100 rpm±10 rpm。结束后将样品与液体分离，冷却至室温作为检验液。

H.1.3 测定

H.1.3.1 依次量取空白溶液、供试品溶液、系列标准溶液1 mL于顶空瓶中，在A.1.3检测条件下进行测试。

H.1.3.2 记录色谱图，根据标准曲线方程，用外标法计算供试品溶液中乙醇的浓度，按式(H.1)计算脱细胞异体真皮或补片样品中乙醇的含量，按式(H.2)计算敷料皮样品中乙醇的含量。

$$X_7 = \frac{C_7 \times V_8}{A_1} \dots\dots\dots (H.1)$$

式中：

X_7 ——脱细胞异体真皮或补片样品中乙醇的含量，μg/cm²；

C_7 ——脱细胞异体真皮或补片供试品溶液中乙醇浓度，μg/mL；

V_8 ——浸提液体积，mL；

A_1 ——脱细胞异体真皮或补片样品的双面面积，cm²。

$$X_8 = \frac{C_8 \times V_9}{A_2} \dots\dots\dots (H.2)$$

式中：

X_8 ——敷料皮样品中乙醇的含量，μg/cm²；

C_8 ——敷料皮供试品溶液中乙醇浓度，μg/mL；

V_9 ——浸提液体积，mL；

A_2 ——敷料皮样品的单面面积，cm²。

H.2 康卫皿扩散法

H. 2.1 标准溶液制备及检测方法

同附录A. 2。

H. 2.2 供试品溶液配制及计算方法

同附录H. 1。

附 录 I

(规范性)

脱细胞异体真皮、敷料皮、补片中异丙醇残留量测定方法 气相色谱法

I.1 标准溶液制备及检测方法

同附录E。

I.2 供试品溶液制备及计算方法

同H.1.2。

附录 J

(规范性)

脱细胞异体真皮、敷料皮、补片中甲醛残留测定方法 乙酰丙酮法

J.1 原理

本法系用汉栖反应 (Hantzsch Reaction) 原理测定微量游离甲醛的含量。甲醛在接近中性的乙酰丙酮、铵盐混合溶液中, 生成黄色的产物 [3, 5-二乙酰基-1, 4-二氢二甲基吡啶 (DDL)], 该产物在波长 412 nm 处的吸光度与甲醛含量成正比。通过对标准溶液浓度和对应吸光度值作图绘制标准曲线, 可对供试品溶液中的甲醛进行定量分析。

J.2 仪器与试剂

J.2.1 紫外可见分光光度计。

J.2.2 恒温摇床。

J.2.3 电加热恒温水浴锅。

J.2.4 电子天平: 精度 0.1 mg。

J.2.5 乙酸铵。

J.2.6 乙酸。

J.2.7 乙酰丙酮。

J.2.8 已标定的甲醛溶液: 分析纯以上。

J.3 溶液制备

J.3.1 0.25% 乙酰丙酮溶液

称取 150 g 乙酸铵, 加入少量水溶解, 加入 3 mL 冰乙酸及 2 mL 乙酰丙酮, 混匀后加水定容至 1 000 mL, 室温避光贮存。

J.3.2 甲醛标准溶液

精密量取已标定的甲醛溶液适量, 置 500 mL 量瓶中, 用水稀释至刻度, 摇匀, 制成 0.05% (w/v) 甲醛标准溶液贮备液。再将该溶液用纯化水依次稀释制成 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内至少 5 个不同浓度溶液。

J.3.3 脱细胞异体真皮、补片供试品溶液

J.3.3.1 取湿态样品, 用滤纸吸去表面水分, 将其裁剪成 1 cm \times 1 cm 碎片置于玻璃瓶中, 按照样品面积 (双面) 与纯化水体积比 1.25 cm²: 1 mL 加入对应体积纯化水浸没样品, 加盖后于 37 ^\circ C \pm 1 ^\circ C 振荡浸提 72 h \pm 2 h, 振荡速率为 100 rpm \pm 10 rpm。结束后将样品与液体分离, 冷却至室温作为供试品溶液。

J.3.3.2 取干态样品, 将其裁剪成 1 cm \times 1 cm 碎片置于玻璃瓶中, 与 J.3.3.1 同法操作。

J.3.4 敷料皮供试品溶液

J.3.4.1 取湿态样品, 用滤纸吸去表面水分, 将其裁剪成 1 cm \times 1 cm 碎片置于玻璃瓶中, 按照样品单面面积与纯化水体积比 1.25 cm²: 1 mL 加入对应体积纯化水浸没样品, 加盖后于 37 ^\circ C \pm 1 ^\circ C 振荡浸提

72 h±2 h, 振荡速率为 100 rpm±10 rpm。结束后将样品与液体分离, 冷却至室温作为检验液。

J. 3. 4. 2 同法制备空白溶液。

J. 4 测定

J. 4. 1 将供试品溶液置于离心管中, 在 3 000 rpm 下离心 15 min, 取上清液进行后续实验操作。

J. 4. 2 精密量取一定体积供试品置试管中, 加水至 5 mL, 加乙酰丙酮显色液 5 mL, 摇匀, 40 °C 水浴放置 40 min 后取出, 降至室温, 采用紫外可见分光光度计在波长 412 nm 处测定吸光度。

J. 4. 3 精密量取上述系列甲醛标准溶液 1 mL, 加水至 5 mL, 加乙酰丙酮显色液 5 mL, 摇匀, 40 °C 水浴放置 40 min 后取出, 降至室温, 采用紫外可见分光光度计在波长 412 nm 处测定吸光度。

J. 4. 4 精密量取纯化水 5 mL, 加水至 5 mL, 加乙酰丙酮显色液 5 mL, 摇匀, 40 °C 水浴放置 40 min 后取出, 降至室温, 采用紫外可见分光光度计在波长 412 nm 处测定吸光度作为空白对照。

J. 4. 5 以甲醛标准溶液的浓度对其相应的吸光度做线性回归方程, 计算出供试品溶液中甲醛浓度, 按式 (J. 1) 计算脱细胞异体真皮或补片样品中甲醛的含量, 按式 (J. 2) 计算敷料皮样品中甲醛的含量。

$$X_9 = \frac{C_9 \times V_{10}}{A_3} \dots \dots \dots (J. 1)$$

式中:

X_9 ——脱细胞异体真皮或补片样品中甲醛的含量, $\mu\text{g}/\text{cm}^2$;

C_9 ——脱细胞异体真皮或补片供试品溶液中乙醇浓度, $\mu\text{g}/\text{mL}$;

V_{10} ——浸提液体积, mL;

A_3 ——脱细胞异体真皮或补片样品的双面面积, cm^2 。

$$X_{10} = \frac{C_{10} \times V_{11}}{A_4} \dots \dots \dots (J. 2)$$

式中:

X_{10} ——敷料皮样品甲醛的含量, $\mu\text{g}/\text{cm}^2$;

C_{10} ——敷料皮供试品溶液中乙醇浓度, $\mu\text{g}/\text{mL}$;

V_{11} ——浸提液体积, mL;

A_4 ——敷料皮样品的单面面积, cm^2 。

附录 K

(规范性)

脱细胞异体真皮、敷料皮、补片中戊二醛残留量测定方法 高效液相色谱法

K.1 原理

戊二醛与2,4-二硝基苯肼反应生成正戊醛二硝基苯肼,采用高效液相色谱法对正戊醛二硝基苯肼进行检测,其峰面积响应与戊二醛浓度呈正比。通过对戊二醛标准溶液浓度和对应峰面积值作图绘制标准曲线,可对供试品溶液中戊二醛进行定性定量分析。

K.2 仪器与试剂

K.2.1 高效液相色谱仪:配备二极管阵列检测器(DAD)。

K.2.2 恒温摇床。

K.2.3 涡旋混合器。

K.2.4 电子天平:精度0.1 mg。

K.2.5 50%戊二醛水溶液。

K.2.6 2,4-二硝基苯肼。

K.2.7 乙腈:色谱纯。

K.2.8 高氯酸:分析纯以上。

K.3 参考色谱条件

参考色谱条件如下:

——色谱柱:SG120 4.6×250 mm×5 μm 或等效色谱柱;

——流动相:水:乙腈(v/v)=30:70;

——流速:1.2 mL/min;

——进样量:10 μL;

——检测波长:360 nm;

——监测时间:20 min。

K.4 溶液制备

K.4.1 2,4-二硝基苯肼溶液

精密称取2.4 g 2,4-二硝基苯肼,加入30%高氯酸溶液溶解定容至100 mL。

K.4.2 戊二醛标准溶液

取戊二醛对照品适量,精密称定,加水溶解并定量稀释成每1 mL中约含10 μg的戊二醛溶液。

K.4.3 供试品溶液

同J.3.3、J.3.4。

K.5 测定

K.5.1 系列戊二醛标准溶液配制

系列戊二醛标准溶液配制见表J.1。

表K.1 系列戊二醛标准溶液配制

试管编号	1	2	3	4	5
戊二醛标准溶液/mL	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
水/mL	0.8	0.6	0.4	0.2	0
戊二醛标准溶液浓度/ (μg/mL)	2.0	4.0	6.0	8.0	10.0

K.5.2 标准曲线测定

取上述系列标准溶液，精密加入流动相1 mL和2,4-二硝基苯肼0.1 mL，涡旋混合均匀后，用0.45 μm膜过滤，装入液相小瓶中。采用高效液相色谱按K.3条件检测，需现配现测。以标准溶液浓度和对应峰面积作图得标准曲线。

K.5.3 供试品溶液测定

取供试品溶液，以3 000 rmp/min离心15 min，精密量取上清液1 mL，与K.5.2同法操作。供试品单位面积中戊二醛含量计算方法同J.4。

附录 L

(规范性)

脱细胞异体真皮、补片中十二烷基硫酸钠残留量测定方法

L.1 吖啶橙-紫外可见分光光度计检测法

L.1.1 原理

十二烷基硫酸钠(SDS)可与吖啶橙结合形成橙色复合物,通过甲苯萃取后,可采用紫外可见分光光度计在499 nm波长处对甲苯中橙色复合物进行检测,其吸光度值与SDS浓度呈正比,通过对标准溶液浓度和对应吸光度值作图绘制标准曲线,可对供试品溶液中SDS进行定量分析。

L.1.2 仪器与试剂

L.1.2.1 紫外可见分光光度计。

L.1.2.2 恒温摇床。

L.1.2.3 离心机。

L.1.2.4 涡旋混合器。

L.1.2.5 电子天平:精度 0.1 mg。

L.1.2.6 一水合硫酸氢钠。

L.1.2.7 吖啶橙。

L.1.2.8 十二烷基硫酸钠。

L.1.2.9 甲苯:分析纯以上。

L.1.3 溶液制备

L.1.3.1 0.5 mol/L 硫酸氢钠溶液

精密称取一水合硫酸氢钠13.8 g,加水溶解并稀释至200 mL。

L.1.3.2 0.4%吖啶橙溶液

精密称取0.4 g吖啶橙粉末,加入100 mL 0.5 mol/L的硫酸氢钠溶液,振荡溶解。

L.1.3.3 SDS 标准溶液

精密称取SDS适量,加水溶解定容,配置浓度为100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ SDS标准溶液。再依次稀释配置得到浓度在2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内至少5个不同浓度系列标准溶液。

L.1.3.4 脱细胞异体真皮、补片供试品溶液

L.1.3.4.1 取5 cm^2 湿态样品,用滤纸吸去表面水分,将其裁剪成1 $\text{cm}\times 1$ cm 碎片置于玻璃瓶中,按照样品面积(双面)与纯化水体积比1.25 cm^2 :1 mL加入对应体积纯化水浸没样品,加盖后于37 $^{\circ}\text{C}\pm 1$ $^{\circ}\text{C}$ 振荡浸提2 h,振荡速率为100 $\text{rpm}\pm 10$ rpm 。冷却至室温,取浸提液作为供试品溶液。

L.1.3.4.2 取干态样品,将其裁剪成1 $\text{cm}\times 1$ cm 碎片置于玻璃瓶中。与L.1.3.4.1同法操作。

L.1.4 测定

L.1.4.1 取100 μL 纯化水、SDS系列标准溶液、供试品溶液于离心管中,各加入1 mL 0.4%吖啶橙

溶液、5 mL 甲苯，采用涡旋混合器剧烈振荡 3 min 使混合均匀，采用离心机 2 000 rpm 离心 5 min，吸取上层有机相，在 499 nm 波长处进行检测。

L. 1. 4. 2 根据标准溶液浓度和对应吸光度绘制线性回归方程，并代入供试品吸光度值计算得到供试品溶液中 SDS 浓度，再按式 (L. 1) 计算供试品单位面积中 SDS 的含量。

$$X_{11} = \frac{C_{11} \times 8}{A_5} \dots \dots \dots (L. 1)$$

式中：

X_{11} ——供试品单位面积中 SDS 的含量， $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ；

C_{11} ——供试品溶液中 SDS 浓度， $\mu\text{g}/\text{mL}$ ；

8——浸提液体积，mL；

A_5 ——脱细胞异体真皮双面面积， cm^2 。

L. 2 亚甲基蓝-紫外可见分光光度计检测法

L. 2. 1 原理

十二烷基硫酸钠 (SDS) 可与亚甲基蓝结合形成蓝色复合物，通过氯仿萃取后，可采用紫外可见分光光度计在 651 nm 波长处对氯仿中蓝色复合物进行检测，其吸光度值与 SDS 浓度呈正比，通过对标准溶液浓度和对应吸光度值作图绘制标准曲线，可对供试品溶液中 SDS 进行定量分析。

L. 2. 2 仪器与试剂

L. 2. 2. 1 紫外可见分光光度计。

L. 2. 2. 2 离心机。

L. 2. 2. 3 涡旋混合器。

L. 2. 2. 4 电子天平：精度 0. 1 mg。

L. 2. 2. 5 氯仿。

L. 2. 2. 6 亚甲基蓝。

L. 2. 2. 7 无水硫酸钠。

L. 2. 2. 8 硫酸。

L. 2. 2. 9 碳酸钠溶液：10 mmol/L。

L. 2. 2. 10 甲醇。

L. 2. 2. 11 十二烷基硫酸钠：分析纯以上。

L. 2. 3 溶液制备

L. 2. 3. 1 亚甲基蓝溶液

称取亚甲基蓝 0. 025 g，无水硫酸钠 5 g，用 100 mL 水溶解，加浓硫酸 1 mL，混匀。

L. 2. 3. 2 甲醇-碳酸钠溶液

取甲醇、碳酸钠溶液等体积混合制备。

L. 2. 3. 3 SDS 标准溶液制备

精密称取SDS适量，加甲醇-碳酸钠溶液溶解定容，配置浓度为20 μg/mL SDS标准溶液。再依次稀释配置得到浓度在0.4 μg/mL~20 μg/mL范围（检出限 0.1 μg/mL）内至少5个不同浓度系列标准溶液。

L. 2. 3. 4 脱细胞异体真皮、补片供试品溶液制备

取样品10 cm²（正反两面之和），在50 mL水中浸泡30 min，以洗去表面氯离子。吸干表面水分，剪成约1 cm²碎片于玻璃瓶中，加入甲醇-碳酸钠溶液4 mL，加盖密封，室温下超声浸提30 min，吸取出所有浸提液后再加入甲醇-碳酸钠溶液4 mL。若浸提液出现浑浊，采用离心或0.45 μm过滤膜过滤方式使浸提液呈澄清透明。分别吸取1 mL浸提液至管中，混合均匀作为供试品溶液。

L. 2. 3. 5 测定

L. 2. 3. 5. 1 取1 mL SDS系列标准溶液、供试品溶液和空白溶液于离心管中，分别加亚甲基蓝溶液1 mL，采用涡旋混合器充分混匀，加入氯仿6 mL，上下剧烈振荡30 s振荡使充分萃取，以2000 r/min离心5 min，吸弃溶液上层。在保留有溶液下层的每一试管中加入无水硫酸钠（约1 g，不定量），即刻混匀后，以2000 r/min离心5 min。取试管内澄清溶液在651 nm波长处测定吸光度。

L. 2. 3. 5. 2 根据标准溶液浓度和对应吸光度绘制线性回归方程，并代入供试品吸光度值计算得到供试品溶液中SDS浓度，再按式（L. 2）计算供试品单位面积中SDS的含量X（μg/cm²）。

$$X_{12} = \frac{C_{12} \times 8}{A_6} \dots \dots \dots (L. 2)$$

式中：

X_{12} ——供试品单位面积中SDS的含量，μg/cm²；

C_{12} ——供试品溶液中SDS浓度，μg/mL；

8——两次浸提液总体积，mL；

A_6 ——脱细胞异体真皮双面面积，cm²。

附录 M

(规范性)

脱细胞异体真皮、敷料皮、补片中聚山梨酯 80 残留量测定方法 紫外可见分光光度计检测法

M.1 原理

聚山梨酯80中的聚乙氧基和铵钴硫氰酸盐反应形成蓝色复合物，可溶于二氯甲烷。采用紫外可见分光光度计在620 nm波长处对二氯甲烷中蓝色复合物进行检测，其吸光度值与聚山梨酯80浓度呈正比，通过对标准溶液浓度和对应吸光度值作图绘制标准曲线，可对供试品溶液中聚山梨酯80进行定量分析。

M.2 仪器与试剂

M.2.1 紫外可见分光光度计。

M.2.2 超声清洗仪。

M.2.3 离心机。

M.2.4 涡旋混合器。

M.2.5 平行蒸发仪。

M.2.6 电子天平：精度0.1 mg。

M.2.7 乙醇。

M.2.8 氯化钠。

M.2.9 硝酸钴。

M.2.10 硫氰酸铵。

M.2.11 二氯甲烷。

M.2.12 聚山梨酯80：分析纯以上。

M.3 溶液制备

M.3.1 硫氰钴铵溶液

精密称取硝酸钴3 g、硫氰酸铵20 g，加水溶解并稀释至100 mL。

M.3.2 聚山梨酯80标准溶液

精密称取聚山梨酯80适量，加水溶解定容，配置浓度为1 mg/mL聚山梨酯80标准溶液。

M.3.3 脱细胞异体真皮、补片供试品溶液

M.3.3.1 取湿态样品，用滤纸吸去表面水分，将其裁剪成1 cm×1 cm碎片，取4 cm²（双面面积），加入5 mL乙醇-氯化钠饱和溶液浸没样品，室温下超声浸提30 min。冷却至室温后将样品与液体分离，再用乙醇-氯化钠饱和溶液1 mL冲洗管壁，合并溶液作为供试液。若存在杂质，将供试液以3 000 r/min离心10 min，取上层清液检测。

M.3.3.2 取干态样品，将其裁剪成1 cm×1 cm碎片，与M.3.3.2同法操作。

M.3.4 敷料皮供试品溶液

取湿态样品，用滤纸吸去表面水分，将其裁剪成1 cm×1 cm碎片置于玻璃瓶中，取4 cm²（单面面积），加入5 mL乙醇-氯化钠饱和溶液浸没样品，室温下超声浸提30 min。冷却至室温后将样品与液体

分离，再用乙醇-氯化钠饱和溶液1 mL冲洗管壁，合并溶液作为供试液。若存在杂质，将供试液以3 000 r/min离心10 min，取上层清液检测。

M. 4 测定

M. 4.1 供试品溶液测定

取供试液置55 ℃水浴中，用空气吹扫法将其浓缩至0.1 mL~0.5 mL，加1 mL水溶解。准确加入二氯甲烷2 mL、硫氰钴铵溶液3 mL，加塞，涡旋混匀，室温放置1.5 h，每15 min振荡1次，振荡摇晃1 min。测定前静置30 min，弃上层液，使用紫外可见分光光度计在波长620 nm处测定下层二氯甲烷液的吸光度。

M. 4.2 系列标准溶液测定

M. 4.2.1 依次取0 μL、10 μL、25 μL、50 μL、75 μL、100 μL、200 μL 聚山梨酯 80 标准溶液，加水至1 mL，混合均匀。精确量取二氯甲烷2 mL、硫氰钴铵溶液3 mL，加塞，混匀，室温放置1.5 h，每15 min振荡1次，振荡摇晃1 min。测定前静30 min，弃上层液，使用紫外可见分光光度计在波长620 nm处测定下层二氯甲烷液的吸光度。

M. 4.2.2 根据标准溶液浓度和对应吸光度绘制线性回归方程，并代入供试品吸光度值得知供试品溶液中聚山梨醇 80 浓度，按式 (M. 1) 计算脱细胞异体真皮或补片样品中甲醛的含量，按式 (M. 2) 计算敷料皮样品中甲醛的含量。

$$X_{13} = \frac{C_{13} \times 1}{A_7} \dots \dots \dots (M. 1)$$

式中：

X_{13} ——脱细胞异体真皮或补片样品中聚山梨酯80的含量， $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ；

C_{13} ——脱细胞异体真皮或补片供试品溶液中聚山梨酯80浓度， $\mu\text{g}/\text{mL}$ ；

1——供试液体积，mL；

A_7 ——脱细胞异体真皮或补片样品的双面面积， cm^2 。

$$X_{14} = \frac{C_{14} \times 1}{A_8} \dots \dots \dots (M. 2)$$

式中：

X_{14} ——敷料皮样品中聚山梨酯80的含量， $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ；

C_{14} ——敷料皮供试品溶液中聚山梨酯80浓度， $\mu\text{g}/\text{mL}$ ；

1——供试液体积，mL；

A_8 ——敷料皮样品的单面面积， cm^2 。

附录 N

(规范性)

同种异体肌腱修复材料中乙醇残留量测定方法

N.1 气相色谱法

N.1.1 供试品溶液制备

随机选取同种异体肌腱产品，如果产品是大固体状态，应切割成不大于5 mm的小块，精密称取重量并记录，按样品质量与纯化水体积比1 g:10 mL比例加入对应体积纯化水浸没样品，加盖密封。 $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 振荡浸提 $48\text{ h} \pm 2\text{ h}$ ，振荡速率为 $100\text{ rpm} \pm 10\text{ rpm}$ 。浸提液作为测试液。以纯化水作对照。

N.1.2 标准溶液制备及检测方法

同附录A.1。

N.2 康卫皿扩散法

N.2.1 供试品溶液制备

同附录N.1.1。

N.2.2 标准溶液制备及检测方法

同附录A.2。

附录 0

(规范性)

生物羊膜中硫酸庆大霉素残留量测定方法

0.1 管碟法

0.1.1 原理

利用抗生素在琼脂培养基内的扩散作用,比较标准品与供试品两者对接种的试验菌产生抑菌圈的大小,以测定供试品中抗生素浓度。

0.1.2 仪器与试剂

0.1.2.1 生物安全柜。

0.1.2.2 恒温培养箱。

0.1.2.3 水浴锅。

0.1.2.4 显微镜。

0.1.2.5 游标卡尺。

0.1.2.6 无菌牛津杯。

0.1.2.7 平底双碟:直径约 90 mm,高 16 mm~17 mm。

0.1.2.8 培养基。

0.1.2.9 试验菌:短小芽孢杆菌。

0.1.2.10 磷酸盐缓冲溶液。

0.1.2.11 革兰氏染液。

0.1.3 溶液制备

0.1.3.1 短小芽孢杆菌菌悬液的制备

精取短小芽孢杆菌试验用菌种斜面1支,接种于盛有营养琼脂培养基的培养瓶中,在35℃~37℃培养7d,用革兰染色法涂片镜检,应有芽孢85%以上。用灭菌水将芽孢洗下,在65℃加热30min,备用。

0.1.3.2 庆大霉素标准溶液制备

取庆大霉素标准品适量,用灭菌水稀释得高、低剂量溶液每毫升中含10U和5U的庆大霉素。

0.1.3.3 供试品溶液制备

0.1.3.3.1 取适量样品按 $12\text{ cm}^2/\text{mL}$ (双面面积)加入灭菌水(体积 V_2)37℃浸提90min,再用适量灭菌水冲洗样品,使浸提液和冲洗液总量为 $2V_3$,作为高浓度供试品溶液,将高浓度供试品溶液稀释为梯度浓度供试品溶液,按0.1.4.2.1操作,确定抑菌圈直径与标准品高浓度抑菌圈直径相同的供试品溶液作为高浓度供试品溶液,即此浓度供试品的标示量或估计单位为每毫升10U。

0.1.3.3.2 随后按一定比例,加入样品和灭菌水(V_4),37℃浸提90min,再用适量灭菌水冲洗羊膜,使浸提液和冲洗液总量为 $2V_4$ 作为高浓度供试液,之后取出2mL加灭菌水稀释至4mL作为低浓度供试液。

0.1.4 测定方法

0.1.4.1 双碟的制备

0.1.4.1.1 取直径约 90 mm，高 16 mm~17 mm 的平底双碟，分别注入加热融化的抗生素检定 1 号培养基 20 mL，使在碟底内均匀摊布，放置水平台面上使凝固，作为底层。

0.1.4.1.2 另取培养基适量加热融化后，放冷至 48 °C~50 °C（芽孢可至 60 °C），加入规定的试验菌悬液适量（至能得到清晰的抑菌圈），摇匀，在每 1 双碟中分别加入 5 mL，使在底层上均匀摊布，作为菌层。

0.1.4.1.3 放置在水平台上冷却后，在每一双碟中以等距离均匀安置牛津杯 4 个，用陶瓦圆盖覆盖备用。

0.1.4.2 检定及培养

0.1.4.2.1 在制备的 4 个双碟中加高低浓度的标准品和供试品溶液，在双碟的 4 个牛津杯中以对角线滴加标准品与供试品的高、低浓度的溶液，滴加溶液至牛津杯口平满，注意滴加溶液间隔不可过长，防止溶液的扩散时间不同影响测定结果。

0.1.4.2.2 滴加完毕，用陶瓦圆盖覆盖双碟，平稳置于托盘内，平底双碟叠放不可超过 3 个，避免受热不均，影响抑菌圈大小，以水平位置平稳移入 35 °C~37 °C 恒温培养箱，培养时远离培养箱出风口，培养 14 h~16 h 后用游标卡尺测定抑菌圈大小并记录。

0.1.5 结果计算

按照式（0.1）计算供试品溶液和标准品溶液的浓度比。

$$X_{15} = D \times \text{antilg} \left(I \times \frac{(UH+UL)-(SH+SL)}{(SH+UH)-(SL+UL)} \right) \dots\dots\dots (0.1)$$

式中：

X_{15} ——供试品溶液和标准品溶液的浓度比；

D ——标准品高剂量与供试品高剂量之比，一般为 1；

I ——高低剂量之比的对数，即 $\log 2$ ；

SH ——标准品高剂量之抑菌圈直径；

UH ——供试品高剂量之抑菌圈直径；

SL ——标准品低剂量之抑菌圈直径；

UL ——供试品低剂量之抑菌圈直径。

0.2 ELISA 试剂盒检测法

0.2.1 原理

庆大霉素检测试剂盒基于竞争性酶联反应原理，酶标板微孔条上预包被庆大霉素偶联抗原，加入庆大霉素标准品或样品，游离庆大霉素与微孔条上预包被的庆大霉素偶联抗原竞争抗庆大霉素抗体酶标记物。加入底物后显色，产物颜色强弱与其中庆大霉素含量成负相关，用酶标仪在 450 nm 波长下检测，通过标准曲线计算样品中庆大霉素的含量。

0.2.2 仪器与试剂

- 0.2.2.1 摇床。
- 0.2.2.2 冰箱：4℃。
- 0.2.2.3 酶标仪。
- 0.2.2.4 庆大霉素 ELISA 检测试剂盒。

0.2.3 溶液制备

0.2.3.1 庆大霉素标准溶液制备

取庆大霉素ELISA检测试剂盒中系列标准溶液直接进行测试。

0.2.3.2 供试品溶液制备

取12 cm²（双面面积）生物羊膜，裁剪成1 cm×1 cm，加入1 mL纯化水，室温下超声浸提30 min，随后用试剂盒中稀释液依次稀释一定倍数，使待测物浓度在试剂盒线性范围内。

0.2.4 测定

检测方法和数据处理过程按照试剂盒中说明书进行，并根据标准曲线计算稀释后样品中庆大霉素含量。按照式（0.2）计算生物羊膜中庆大霉素含量。

$$X_{16} = \frac{C_{15} \times N \times 1}{4} \times 10^{-3} \dots\dots\dots (0.2)$$

式中：

- X_{16} ——生物羊膜中庆大霉素含量，μg/cm²；
- C_{15} ——稀释后供试品中庆大霉素含量，ng/mL；
- N ——供试品溶液稀释倍数；
- 1——供试液体积，mL；
- 4——生物羊膜供试品面积，cm²。

参 考 文 献

- [1] GB/T 16886.12 医疗器械生物学评价 第12部分：样品制备与参照材料
 - [2] YY/T 0513.2 同种异体修复材料 第2部分：深低温冷冻骨和冷冻干燥骨
 - [3] ISO 10993-18 医疗器械生物学评价 第18部分：材料的化学表征 (Biological evaluation of medical devices—Part 18: Chemical characterization of medical device materials within a risk management process)
-